AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Mention : «Science de la Vie et de la Santé»

par : Ganggang ZHANG

Tests des composés de nacre sur l'activité des ostéoblastes et leur identification

Soutenue le 29/06/2017

Directeur de thèse : Pr. Pierre GILLET

Co-encadrante de thèse : Dr. Marthe ROUSSEAU

Membres du jury :

Rapporteurs :	M. Frédéric MARIN	DR CNRS, UMR6282-CNRS/uB, Dijon
	M. Patrice LAQUERRIERE	PU, UMR7178-CNRS/Unistra, Strasbourg
Examinateurs :	M. Pierre GILLET	PU-PH, UMR7365-CNRS/UL, Nancy
	Mme. Marthe ROUSSEAU	CR CNRS, UMR7365-CNRS/UL, Nancy
Membre invité:	M. Didier MAINARD	PU-PH, CHU Nancy, Nancy

UMR 7365-CNRS-Université de Lorraine.
Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA)
9, Avenue de la Foret de Haye, Biopôle de l'Université de Lorraine, 54500 Vandoeuvre lès Nancy

A mes parents qui m'aiment tellement beaucoup et me supportent tout le temps pendant mes études!



Remerciements

Je remercie Monsieur **Frédéric MARIN** et Monsieur **Patrice LAQUERRIERE** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je remercie Monsieur **Didier MAINARD** pour avoir accepté d'être le membre invité de ma thèse.

Je tiens à exprimer à Monsieur le professeur **Pierre GILLET**, directeur de ma thèse, ma profonde gratitude pour m'accueillir au sein de son équipe.

Je tiens à exprimer à Madame **Marthe ROUSSEAU**, co-encadrante de ma thèse, ma gratitude distinguée et mon profond respect pour son accompagnement attentif sur mes travaux scientifiques, sa patience et tolérance incomparable, et tout son confort soigneux sur ma vie quotidienne. Elle m'a donné l'opportunité d'étendre mes recherches sur différents axes, de collaborer avec différentes équipes intra universitaires pour élargir mes connaissances scientifiques, et d'effectuer des communications nationales et internationales. Sa grande disponibilité a permis un suivi permanent du déroulement des travaux. Les discussions constantes entre nous m'ont beaucoup inspiré au niveau de la recherche scientifique et de la vie au cours de ces années de thèse. J'apprécie également son investissement dans la rédaction des articles et celle de ma thèse. Je lui suis profondément reconnaissant pour ses démarches et son dévouement aussi bien pour ma thèse que pour ma carrière.

Je remercie **mère patrie**, **China Scholarship Council** et **Université de Wuhan** pour financer et supporter mes études en France. Je ne l'oublierai pas de toute ma vie.

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA), UMR 7365 CNRS – Université de Lorraine au sein de la Faculté de Médecine de Nancy. Donc, je tiens à remercier Monsieur le Professeur **Jean-Yves JOUZEAU**, directeur de l'UMR CNRS 7365, pour m'avoir accepté dans l'unité de recherche et pour sa gentillesse.

J'exprime aussi ma reconnaissance à Monsieur le Professeur **Jean-François STOLTZ**, qui m'a proposé de réaliser ma thèse dans cette unité, et ses encouragements constants sur mes travaux pendant toute ma thèse.

Je remercie très sincèrement Madame **Marie-Hélène PIET** pour ses aides constantes sur les manipulations, notamment HPLC, et sur le français. Je remercie Madame

Vanessa MOBY pour ses suggestions sur mes travaux et la langue française.

Je souhaitais également remercier **Alice BRION**, notamment au début de ma thèse, elle m'a permis de me familiariser à la science en France et m'a fait apprendre presque toutes les techniques nécessaires pour effectuer mes manipulations expérimentales. Son attitude stricte sur les travaux m'a tellement touché.

Je tiens à remercier Monsieur **Vincent CARRÉ** pour tant des suggestions sur mes travaux, pour la collaboration, et pour avoir accepté d'être membre de jury de mon comité de suivi de thèse. J'exprime ma gratitude à Monsieur **Arnaud BIANCHI**, Monsieur **Cédric PARIS**, Monsieur **Frédéric AUBRIET**, et Madame **Virginie MARCHAND** pour leurs aides professionnelles sur mes travaux. Les collaborations avec vous sont fructueuses, et m'ont permis de faire de belles rencontres.

Je voudrais aussi remercier Monsieur **Pascal REBOUL**, Monsieur **Alexandre KRIZNIK**, Monsieur **Jacques MAGDALOU**, Madame **Cécile GUILLAUME**, Monsieur **Frédéric CAILOTTO**, Madame **Isabelle BERTIN-JUNG** pour leurs suggestions constructives sur mon projet de thèse ou sur mes manipulations.

Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur **Didier MAINARD**, directeur du COT, qui m'a fourni des prélèvements de l'os du genou et m'a aidé pour effectuer un stage d'observation de la chirurgie du rachis à Paris.

Je remercie également Madame **Monique GENTILS** et Madame **Brigitte GUERBER**, Madame **Karine LORCIN**, Madame **Valérie GOBERT,** Madame **Nadia BEZAI et** Madame **Ghislaine CHARPENTIER** pour leur gentillesse à mon égard et leur soutien constant.

Je remercie beaucoup à mes collègues français du laboratoire : **Anne-Sophie, Gabriel, Benjamin, Mathilde, Julie, Anne, Romain, Léonore, Paul, Irfan, Caroline, Reine, Jacqueline, Hassan, Mathew, Mélissa, David, Meriem, Christophe et Jean-Marc** pour m'avoir encouragé et supporté durant ces années. Vous allez me manquer.

Un grand merci à la grande famille chinoise à Nancy: **Qian chongsheng, Wei chaojie, Deng chaohua, Yu hao, Yang xu, Ye junsong, Liu xing, Hu yong, Xie zhe, Pang xiaomeng, Dan pan, Zhang lin, Xie yu, Luo yun, Wu xianglei, Duan jie, Li jie, Liang shiheng** pour leur soutien et rires aux éclats durant ces années.

Le meilleur pour la fin, je remercie toute ma famille, et plus particulièrement ma mère et mon père. A ma petite amie WEI **Congcong**, je t'aime, tu viens finalement après mon attente de 29 ans!

Liste des publications et communications

Revues à comité de lecture

3. Zhang G., Brion A., Willemin A-S., Piet M-H., Moby V., Bianchi A., Mainard D., Galois L., Gillet P., Rousseau M., Nacre, a natural, multi-use and timely biomaterial of bone graft substitute for current orthopaedic clinics, **Journal of Biomedical Material Research Part A**, 105(2):662-671, 2017.

2. Zhang G., Willemin A-S., Brion A., Piet M-H., Moby V., Bianchi A., Mainard D., Galois L., Gillet P., Rousseau M. A new method for the separation and purification of the nacre ethanol soluble matrix, **Journal of structural biology**, 196(2), 127-137, 2016.

1. Brion A.*, **Zhang G.***, Dossot M., Moby V., Dumas D., Hupont S., Piet M.H., Bianchi A., Mainard D., Galois L., Gillet P., Rousseau M., Nacre extract restores the mineralization capacity of subchondral osteoarthritis osteoblasts, **Journal of structural biology,** 192(3), 500-9, 2015. ***(*Co-premier auteur)***

Communications orales dans des congrès internationaux (le nom de l'orateur est souligné)

1. Zhang G., Brion A., Piet MH., Moby V., Bianchi A., Mainard D., Galois L., Aubriet F., Carré V., Gillet P., **Rousseau M.,** A new method for the purification and identification of the nacre ethanol soluble matrix, **BIOMIN XIII**, 13th International Symposium on Biomineralization, September 16-19, Granada, Spain, 2015.

Communications affichées

4. Zhang G., Willemin A-S., Piet M-H., Moby V., Paris C., Bianchi A., Mainard D., Galois L., Aubriet F., Carré V., Gillet P., Rousseau M., An exploration into

the mineral and organic composition of nacre ethanol soluble matrix towards the identification of osteogenic compounds, **18ème Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés**, 1-3 Juin, Nancy, France, 2016. (Flash poster)

3. Zhang G., Willemin A-S., Brion A., Piet M-H., Moby V., Bianchi A., Mainard D., Galois L., Gillet P., Rousseau M., Cationic nacre ethanol soluble matrix has an osteoanabolic effect on human subchondral osteoarthritic osteoblasts and MC3T3-E1 cell line, **43th European Calcified Tissue Society Congress**, May 14-17, Roma, Italy, 2016.
ECTS/Eli Lilly 2016 Scholarship.

2. Zhang G., Brion A., Piet M-H, Moby V., Bianchi A., Dossot M., Mainard D., Galois L., Aubriet F., Carré V., Gillet P., Rousseau M., Separation and identification of the osteogenic compounds of nacre using ion-exchange resin associated with a mineralization cell model, **XVII èmes Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés**, Feburary 4-6, Clermont-Ferrant, France, 2015.

1. Brion A., **Zhang G.**, Piet M.H., Moby V., Bianchi A., Dossot M., Mainard D., Galois L., Gillet P., Rousseau M., Pro-osteogenic properties of nacre extract on primary human osteoblasts and MC3T3-E1 cell line, **41st European Calcified Tissue Society Congress,** May 17-20, Prague, Czech Republic, 2014

Sommaire

Introduction 01
1. L'os 02
1.1 Qu'est-ce que l'os? 02
1.2 Principaux acteurs de l'homéostasie osseuse 02
1.3 Phases de la réparation osseuse 03
1.4 La greffe osseuse 04
1.4.1 Rôle de la greffe osseuse
1.4.2 Les propriétés des greffons osseux
1.5 Les greffes osseuses en clinique 05
1.5.1 L'autogreffe et l'allogreffe
1.5.2 Les substituts de greffe osseuse
2. La nacre 08
2.1 Qu'est-ce que la nacre? 08
2.1.1 La structure de nacre
2.1.2 La formation des tablettes et minéralisation
2.2 La composition de la nacre 12
2.2.1 Eléments minéraux
2.2.2 Protéines/peptides
2.2.3 Polysaccharides
2.2.4 Lipides
2.3 L'usage de la nacre comme substituts osseux
- Publication N°1 (Revue) 25
Objectifs de travail 35
1. L'identification des composés ostéogéniques de la nacre
1.1 Approche utilisant 2 modèles cellulaires de minéralisation
1.2 Approche utilisant les gènes rapporteurs
Chapitre 1. Approche utilisant 2 modèles cellulaires
1.1 Validation de l'effet pro-ostéogénique d' ESM (éthanol soluble molécules)
- Publication N°2 41
1.2 Tests de minéralisation avec diverses fractions d'ESM
- Publication N°3 55
Chapitre 2. Approche utilisant les gènes rapporteurs
- Publication N°4 (Zhang et al, en préparation, 2017) 69
Discussion générale 93
Conclusions 105

Abréviations

CSM=Cellule Souche Mésenchymateuse

DMEM-F12= Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12

TS=Transferrine, Sélénite de sodium

ITS= Insuline, Transferrine, Sélénite de sodium

MEC=Matrice Extra Cellulaire

ADN=Acide Désoxyribonucléique

DMSO=Diméthylsulfoxyde

ESM=Ethanol Soluble Matrix

ESMa=Ethanol Soluble Matrix anions

ESMc=Ethanol Soluble Matrix cations

CLHP=Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance

PAF=Paraformaldehyde

RPM=Rotation Par Minutes

WSM=Water Soluble Matrix

BMPs=Protéine Morphogénétique Osseuse/Bone Morphogenetic Protein

BSA=Bovine Serum Albumin

SVF=Sérum de Veau Fœtal

HA=Hydroxyapatite

PCR=Polymerase Chain Reaction (Réaction de Polymérisation en Chaîne)

pMetLuc2 R=plasmide contenant le gène rapporteur *Metridia* luciferase

pb=paire de bases

qsp=quantité suffisante pour

AA=Acide Ascorbique

GP=Acide érophosphate

dNTP=Désoxynucléotide Triphosphate

g/mg/µg/ng=Gramme/ Milligramme/ Microgramme/ Nanogramme

h/min/sec Heure/ Minute/ Seconde

J=Jour

PBS=Phosphate Buffer Saline (tampon phosphate)

PenStrep=Pénicilline/ Streptamycine

RT=Reverse Transcription (transcription inverse)

Introduction

1. L'os

1.1 Qu'est-ce que l'os?

Le squelette humain est composé de 206 os sans compter les os sésamoïdes. Il y a quatre catégories d'os, les os longs, les os courts, les os plats et les os irréguliers (**Fig. 1**). L'os fournit un support structural pour l'ensemble du corps permettant les mouvements des muscles, c'est un lieu de formation des érythrocytes ainsi qu'une réserve de sels minéraux (phosphore et calcium) et d'énergie (graisse et moelle jaune). Il protège aussi les organes internes. L'os permet un maintien de l'homéostasie minérale et de l'équilibre acide-base, c'est aussi un réservoir de facteurs de croissance et de cytokines [1].

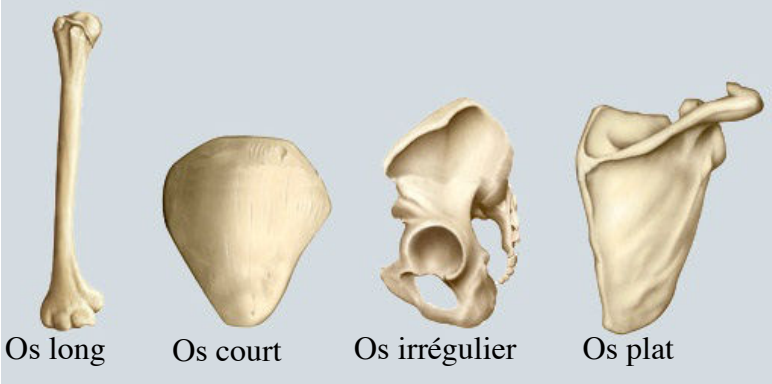


Figure 1. Les quatre catégories d'os humain

Schéma adapté de http://laquashaluckey.weebly.com/about-the-skeletal-system.html

1.2 Principaux acteurs de l'homéostasie osseuse

La résorption et la formation de l'os sont un équilibre délicat entre ostéoblastes, ostéocytes et ostéoclastes. L'activité régénératrice de l'os est tellement active que le squelette adulte est remplacé dans sa totalité tous les dix ans. Les ostéocytes, qui sont considérés comme des ostéoblastes matures, sont dérivés de cellules souches mésenchymateuses [2]. Le rôle principal d'un ostéoblaste est le dépôt de matrice ostéoïde osseuse. A mesure que l'ostéoblaste mûrit, il se transforme en un ostéocyte. Les ostéocytes représentent plus de 95% des cellules osseuses [2][3]. Les ostéoclastes sont de grandes cellules multinucléées qui sont créées à partir de la fusion de

multiples monocytes [2]. Le rôle principal des ostéoclastes dans le processus de réparation et de remodelage osseux est la résorption de la matrice osseuse par la production d'enzymes protéolytiques [4].

Cependant, l'homéostasie osseuse nécessite des cellules viables (ostéoblastes, ostéoclastes et ostéocytes), une vascularisation adéquate, la stabilité, la présence de facteurs de croissance et une matrice de croissance. Malheureusement, il y a souvent des situations où une ou plusieurs de ces conditions sont insuffisantes, et comme chirurgiens, nous devons fournir une assistance pour permettre aux os de cicatriser. Lorsque le processus de réparation osseuse nécessite une assistance supplémentaire, le greffage osseux est souvent utilisé pour fournir un environnement ostéoconducteur, ostéo-inducteur et/ou ostéogène pour favoriser la guérison et la réparation osseuse [5].

1.3 Phases de la réparation osseuse

Quand l'os est abîmé, fracture pour la plupart des cas, le processus de la réparation de l'os est démarré. La réparation de l'os a été classée en trois phases distinctes: inflammatoire, prolifération, et remodelage. La phase inflammatoire est contrôlée par une cascade de facteurs de croissance qui comprennent le facteur de croissance transformant β (TGF-ato le facteur de croissance des fibroblastes (FGF), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le facteur de croissance analogue à l'insuline -1 (IGF-1), les interleukines, le facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF) et les protéines morphogènes osseuses (BMP). Ces facteurs, libérés en réponse à une fracture osseuse, favorisent la migration vers l'intérieur, le recrutement et la prolifération des cellules souches mésenchymateuses qui se différencient en ostéoblastes, chondrocytes, adipocytes et cellules endothéliales [6][7]. Le résultat de la phase inflammatoire est la formation d'un cal osseux primitif. Ce cal est encore organisé au cours de la phase proliférative, ou fibroplasie. Au cours de la phase proliférative, une réponse périostée se produit, conduisant au remplacement du cal primitif par un os tissé immature par une ossification intramembranaire ou endochondrale [8]. Durant la phase finale de la réparation osseuse, cet os tissé irrégulier est converti en os lamellaire [9]. Cela implique le remplacement du callus de minéralisation par un os minéralisé mature et le remodelage de la zone osseuse à sa forme et à sa taille initiale [6]. Le produit final de la réparation osseuse est une zone

osseuse qui est revenue à son état antérieur [6].

1.4 La greffe osseuse

1.4.1 Rôle de la greffe osseuse

Le cycle continu de formation et de résorption osseuse est réalisé par les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes dans la direction de la voie de signalisation osseuse. Dans certaines situations, le cycle hôte de la réparation osseuse est insuffisant et nécessite l'aide de greffes osseuses et de leurs substituts [5].

Le greffon osseux a été utilisé pendant de nombreuses années par des chirurgiens orthopédiques pour aider au processus de réparation osseuse, et est utilisé dans toutes les sous-spécialités au sein de l'orthopédie. Les complications des lésions traumatiques telles que l'union retardée, la pseudarthrose exigent souvent l'utilisation de greffes osseuses. Outre les traumatismes, les greffes osseuses sont utilisées pour combler les défauts osseux tumoraux ou à la suite d'une ostéolyse péri-prosthétique [5].

1.4.2 Les propriétés des greffons osseux

Les greffons osseux diffèrent en termes de propriétés de l'ostéoconduction, de l'ostéoinduction, de l'ostéogenèse et du support structurel. Toutes les greffes osseuses n'ont pas les mêmes propriétés.

Ostéoconduction. La capacité de fournir un environnement capable d'accueillir les cellules souches mésenchymateuses endogènes, les ostéoblastes et les ostéoclastes. L'ostéoconduction est le processus par lequel un greffon agit comme échafaud, hébergeant passivement les cellules nécessaires [10].

Ostéoinduction. L'ostéoinduction a été définie comme le processus de recrutement, de prolifération et de différenciation des cellules souches mésenchymateuses de l'hôte en chondroblastes et ostéoblastes.

Ostéogenèse. Pour qu'un greffon osseux ait la propriété d'ostéogenèse, il doit contenir des cellules souches mésenchymateuses viables, des ostéoblastes et des ostéocytes [10]. Les greffes osseuses ostéogéniques ont tous les éléments cellulaires,

facteurs de croissance et échafaudage requis pour former un nouvel os.

Support structurel. Dans des conditions choisies, les greffes osseuses sont nécessaires pour fournir un soutien structurel, ainsi que pour stimuler la réparation osseuse [5].

1.5 Les greffes osseuses en clinique

De nombreuses formes de greffe osseuse sont disponibles, mais elles sont classées en trois grandes catégories: autogreffe, allogreffe et substituts de greffe osseuse.

1.5.1 L'autogreffe et l'allogreffe

Les autogreffes et les allogreffes ont été parmi les premiers types de greffes osseuses utilisés et sont encore largement utilisées aujourd'hui. Les autogreffes sont considérées comme la référence, car elle possède toutes les propriétés requises en conservant une histocompatibilité complète. Le greffon est ostéoconducteur, ostéoinductif (en raison de la présence des facteurs de croissance) et contient des cellules ostéogéniques vivantes. Certaines formes d'autogreffes (par exemple des greffes fibulaires vascularisées) peuvent également fournir un support structurel. Cependant, les greffes spontanées sont limitées et sont associées à des taux élevés de morbidité du site donneur, ce qui peut conduire à une augmentation du séjour hospitalier et à des coûts associés plus élevés [11]. Les taux de complications majeure et mineure de récolte d'autogreffe ont été rapportés à 8,6% et 20,6% respectivement [12].

L'allogreffe cadavérique est disponible sous forme d'os spongieux ou corticaux, ou sous forme de matrice osseuse déminéralisée (DBM). Les allogreffes sont principalement ostéoconductrices, tandis que la DBM est traitée de manière à conserver les propriétés ostéo-inductives [13]. Les allogreffes corticales (telles que les greffons utilisés typiquement dans la reconstruction du fémur durant l'arthroplastie de hanche de révision) peuvent également fournir un support structurel. Bien qu'elles n'aient pas de propriétés ostéogéniques, les allogreffes rémédient à des inconvénients des autogreffes parce qu'elles sont disponibles en grandes quantités, ne sont pas associées à la morbidité du site donneur ou au temps opératoire accru à cause de la récolte de l'os autogène et sont relativement peu coûteuses [13][14]. Cependant, les

allogreffes ne conduisent pas à une cicatrisation aussi complète que celle observée avec l'utilisation d'une greffe autogène, et elles peuvent entraîner la transmission de virus et d'autres agents infectieux [13][14][15].

1.5.2 Les substituts de greffe osseuse

Le sulfate de calcium a été utilisé comme matériau de greffe osseuse depuis 1892 [11]. Depuis lors, les propriétés matérielles du sulfate de calcium se sont améliorées et de nouvelles biocéramiques ont été introduites en tant que substitut de greffe osseuse. Aujourd'hui, il existe quatre principaux types de biocéramique: le sulfate de calcium, le phosphate de calcium, le phosphate tricalcique et l'hydroxyapatite coralline. Les biocéramiques composites utilisent une combinaison de ces types pour fournir des matériaux possédant des propriétés améliorées [11][14][16]. Les substituts de greffe osseuse viennent dans des formes multiples allant des granulés et des blocs solides au mastic injectable et modulable. Les biocéramiques ne sont ni ostéogènes ni ostéoinductives, mais travaillent en créant un échafaudage ostéoconducteur pour favoriser l'ostéosynthèse [11]. Cependant, les biocéramiques ont le potentiel d'éliminer bon nombre des limitations et complications associées à l'utilisation clinique de l'autogreffe et de l'allogreffe, et la recherche continue à améliorer les substituts de greffe osseuse [17]. En raison du degré variable de résistance à la compression et des taux de résorption, les ingénieurs ont tenté d'optimiser les caractéristiques d'une greffe osseuse en créant des composites composés de diverses formes de base des quatre types de substituts osseux [11].

Bien qu'il y ait beaucoup de littérature concernant les résultats cliniques des substituts de greffe osseuse, il est largement composé d'études rétrospectives avec peu d'essais randomisés contrôlés. Récemment, Kurien *et coll.*[16] ont effectué une revue systématique sur l'utilisation de greffe osseuse en pratique orthopédique. Ils ont tenté de revoir 59 substituts de greffe osseuse fabriqués par 17 sociétés, en demandant à chaque fabricant de fournir toutes les preuves publiées sur leur produit [16]. Après avoir limité la littérature aux études cliniques, il n’y a que 22 substituts de greffe osseuse avec 96 articles qui étaient disponibles pour analyser. Les seuls substituts de greffe osseuse avec la preuve de niveau I ont été Norian SRS (Synthes), Vitoss (Orthovita), Cortoss (Orthovita) et Alpha-BSM (Etex) [16]. Les auteurs ont passé en

revue la littérature concernant l'utilisation de substituts de greffe osseuse dans le cadre des fractures du plateau tibial, des fractures du rayon distal, des fractures calcanéennes, des fusions de la cheville, une chirurgie de la colonne vertébrale et une révision d'arthroplastie totale de la hanche (THA) [16]. Deux études rétrospectives ont été publiées sur l'utilisation de l'hydroxyapatite coralline dans le cadre de la révision THA. Dans les deux cas, il a été utilisé en combinaison avec une allogreffe [18][19].

2. La nacre

2.1 Qu'est-ce que la nacre ?

La nacre produite par les bivalves, gastéropodes et céphalopodes a une structure interne hautement organisée, chimiquement complexe, avec des propriétés mécaniques et des effets optiques qui créent un éclat brillant caractéristique. Pour la structure et la formation de la nacre, les huîtres géantes *Pinctada (P.) maxima* et *P. margaritifera* sont deux exemples les plus étudiés.

2.1.1 La structure de nacre

A l'échelle macroscopique, les coquilles *Pinctada* sont courbes, varient en hauteur, longueur et épaisseur. *P. margaritifera* et *P. maxima* sont parmi les plus grandes espèces de *Pinctada* (famille *Pteriidae*). La coquille de *P. margaritifera* à 2 ans peut atteindre à 10-12 cm de longueur, tandis que *P. maxima* pousse à 10-16 cm [20]. La coquille maximale de *P. maxima* peut atteindre 30 cm de diamètre tandis que celle de *P. margaritifera* est de 20 à 25 cm. L'épaisseur de la couche de nacre de *P. maxima* peut atteindre 2 cm [21]. Ces paramètres donnent à la nacre une possibilité multiple de concevoir des substituts de greffe osseuse.

A l'échelle microscopique, la nacre est composée de tablettes de cristal d'aragonite recouvertes par une matrice organique. Les tablettes d'aragonite pseudo-hexagonales mesurent environ 0,5 μm d'épaisseur et 5-15 μd de diamètre [22] (figure 1B). Les tablettes sont arrangées en lamelles parallèles continues séparées par des feuilles de matrice organique interlamellaire [23]. Les protéines hydrophobes sont quantitativement plus importantes. De plus, le rôle de la chitine n'est pas totalement élucidé. En premier lieu, la chitine formerait l'armature interlamellaire.

A la nanoéchelle, le biocristal lui-même est aussi une composante contenant à la fois l'aragonite et la matière organique intracristalline [23]. La matrice organique est continue à l'intérieur de la tablette, séparant le minéral en nanograins cohérents (30-50 nm de taille, à plat) qui partagent la même orientation cristallographique [24] (figure 1C), et les nanograins sont très probablement des nanotablettes en raison de la structure stratifiée de la tablette [25]. Mais la matrice organique intracristalline est très cristallisée et la tablette de nacre réagit comme un «monocristal» en microscopie

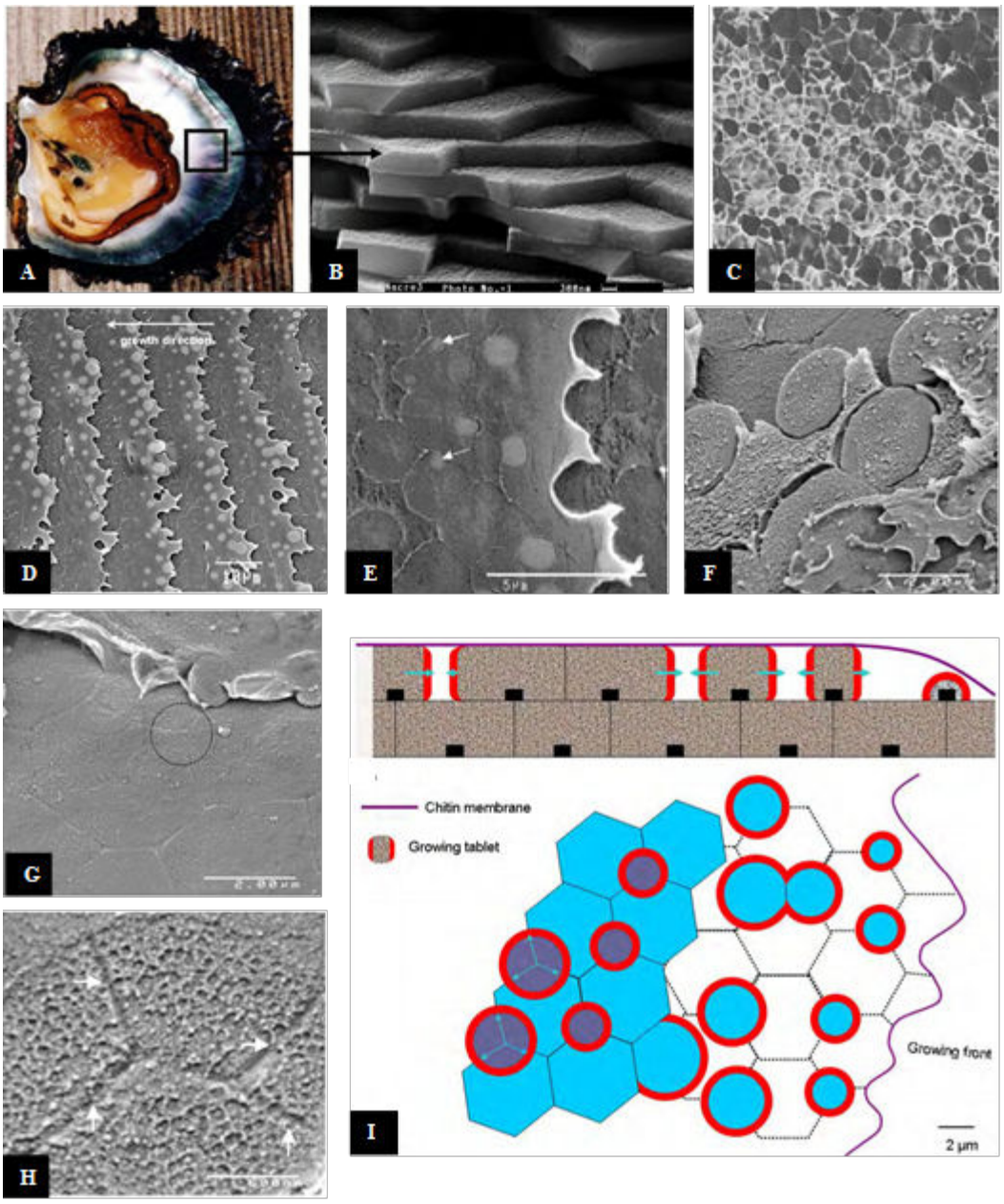
électronique à transmission à champ sombre [24]. En raison de la microstructure en couche particulière et des composants organiques, la nacre présente d'excellentes propriétés de résistance à la compression supérieures à celles de l'os. Le module d'Young ou module d'élasticité est de 30 à 40 GPa pour la nacre contre 20 GPa pour l'os, et les valeurs respectives de résistance mécanique sont au maximum 185-200 MPa contre 140 MPa [26] [27].

2.1.2 La formation des tablettes et minéralisation

La formation de la nacre est un processus de biominéralisation, qui est guidé par l'épithélium du manteau, régulé par de nombreux gènes et pour lequel des interactions organo-minérales sont impliquées [28]. D'après les études actuelles sur le mécanisme de formation de nacre, les tablettes de nacre individuelles sont supposées se former comme les procédures suivantes: (1) la matrice s'auto organise pour former les couches de chitine, et l'espace entre chaque couche de chitine est rempli d'un gel de protéines. (2) Formation des minéraux primaires, probablement amorphes et nanométriques. (3) Nucléation d'une tablette de nacre à partir d'un point central contenant des groupes réactifs spécifiques, puis les nanoéléments s'auto-organisent du centre, s'auto-orientent, formant de façon centrifuge le mésocristal de tablette de nacre. (4) Chaque tablette pousse verticalement jusqu'à atteindre la couche supérieure de chitine, puis se dilate latéralement (croissance centrifuge) à l'intérieur du gel qui est progressivement repoussé.

Rousseau et ses collègues [24], ont développé un modèle de Voronoi convaincant pour révéler le mécanisme de croissance de la feuille de nacre (Fig. 1D-1I). Selon ce modèle, les tablettes sont en agrégation à la même vitesse dans toutes les directions autour de centres de croissance unique, ainsi les tablettes obtenues ont une forme hexagonale qui répond à un modèle de croissance Voronoi.

Outre le processus normal de calcification, la coquille des mollusques a la capacité de réparer rapidement les dommages physiques ou pathologiques de la coquille et de «remodeler» en partie leur coquille [29].



Figue 1. Structure de la couche de nacre de *Pinctada* (A à C) et croissance de nacre (D à I). A: couche brillante de nacre en tant que revêtement de coquille interne; B: la microscopie électronique à balayage (SEM) montre la structure caractéristique en briques et mortier, les tablettes de cristal pseudo-hexagonal sont d'environ 0,5µm d'épaisseur et 5-10 µm de largeur, s'organisent régulièrement et étroitement; C: image de microscopie de force atomique en contraste de phase (1x1µm); D: couches de nacre naissantes à la surface fracturée du manteau *Pinctada* (SEM), la coquille est enlevée. Les tablettes rondes (gris clair) sont des plaquettes bio-aragonites naissantes; E: agrandissement de la Fig. 1D. Les empreintes sont les traces laissées par des

tablettes déjà presque développées dans la couche sous-jacente enlevée avec la coquille. Les flèches pointent les noyaux à la frontière entre deux tablettes adjacentes de la rangée sous-jacente; F: nacre naissante du côté enveloppe: détail de la surface fracturée montrant des noyaux cylindriques (SEM); G: nacre naissante du côté de l'enveloppe: des empreintes qui prouvent que la trace des noyaux en croissance est restée de l'autre côté (SEM, cercle: trace agrandie sur la figure H) ; H: Partie de la Fig. 1G avec détail de la couche alvéolaire. Les flèches révèlent la relation possible avec la matrice inter cristallin de la rangée sous-jacente; I: Représentation schématique du modèle de croissance des tablettes de nacre. Le schéma du dessus: vue latérale des couches de la tablette supérieure; le schéma du dessous: vue du front de nacre.

2.2 La composition de la nacre

La fraction inorganique (97%) de la nacre est constituée de carbonate de calcium sous forme d'aragonite et d'une partie mineure d'éléments minéraux. La fraction organique (3%) est un mélange de protéines, de peptides, d'acides aminés libres, de polysaccharides, de lipides, de pigments [28].

2.2.1 Éléments minéraux

Pour la fraction inorganique, divers éléments sont détectés dans la nacre de *Pinctada* [30][31]. Outre du Ca et du Na, la plupart des éléments existent généralement comme oligo-élément et montrent des variations temporelles et spatiales [32]. Les ions doublement chargés, Mn, Ti, Zn et en particulier Mg, ils participent à la régulation du polymorphisme aragonite-calcite, et favorisent la précipitation du $CaCO_3$ en aragonite plutôt que la calcite plus stable [33]. Les teneurs en Sr dans la couche nacrée et la couche prismatique sont semblables, ce qui indique son implication biologique lors du processus de biominéralisation [31]. L'eau dans la nacre est mesurée à 0,34% en poids [30], et contribue significativement à la viscoélasticité de la nacre [34].

2.2.2 Protéines/peptides: tableau en résumant les protéines et peptides identifiés

A ce jour, en cherchant « nacre » dans la base de données protéines (UniProt, voir www.uniprot.org), 94 protéines et 42 peptides ont été identifiés dans la nacre et révisés (**Tableau 1**) [35][36]. Parmi ces molécules, 40 molécules sont trouvées dans la nacre de *Pinctada margaritifera*, 39 dans *Nautilus macromphalu*, et 27 dans *Pinctada maxima*. Au total, 73 molécules proviennent de la nacre de *Pinctada*. Des molécules du Tableau 1 sont aussi explorées pour révéler leur fonction lors de la croissance de la nacre. Protein PIF est le composant essentiel de la matrice organique pour la croissance normale de la nacre. N66 matrix protein agit comme un régulateur négatif pour la calcification dans les coquilles des mollusques. Calcium-binding shell glycoprotein P95, P50 et P29 servent à associer le calcium. Putative chitinase 1, 2 et 3 présentent de l'activité catalytique. Perlin inhibe la croissance des cristaux de carbonate de calcium. Tyrosinase-like protein 1 et 2 fonctionnent en utilisant $Cu^{(2+)}$ comme fonctionne comme co-facteur. Les protéines et les peptides identifiés mais non révisés sont plus nombreux.

Le rendement (Poids/Poids) de l'extrait de matrice organique de la nacre avec différents solvants varie, WSM 0.24% [37], ESM 0.16% (donnée personnelle), et EDTA extrait 0.05% [38].

2.2.3 Polysaccharides

Quantitativement, les polysaccharides représentent la deuxième classe de macromolécules importantes, après les protéines, dans les coquilles de mollusques. Ils peuvent être divisés approximativement en deux groupes: la chitine et les polymères acides solubles [28]. La chitine est un polymère insoluble à chaîne longue constitué d'un seul monomère, la N- acétyl glucosamine. Dans la nacre, la chitine contribue essentiellement à l'architecture 3D de la matrice, qui joue un rôle clé en définissant la matrice interlamellaire entre les tablettes de la nacre [39] [40]. La chitine dans les coquilles des mollusques est du type ß, et forme avec d'autres macromolécules, en particulier des protéines, des complexes supramoléculaires.

Outre la chitine, des polysaccharides acides solubles peuvent également être présents dans la coquille, mais leur caractérisation est encore à ses débuts. De nombreux polysaccharides d'enveloppe sont liés par covalence au noyau protéique, formant alors des glycoprotéines ou des protéoglycannes [41]. Il est probable que certains sont libres dans la matrice, mais cet aspect est peu étudié. Les polysaccharides sont constitués de monosaccharides neutres et aminés acides dans des proportions variables [42]. De plus, ils peuvent être sulfatés, c'est-à-dire, chargés négativement [41]. Dans les modèles classiques de minéralisation de la coquille, les polysaccharides sulfatés jouent un rôle coopératif avec les protéines, en concentrant les ions calcium au voisinage des facteurs de nucléation[43].

2.2.4 Lipides

Dans les coquilles, les lipides ont été peu étudiés, car ils représentent une fraction extrêmement mineure de la matrice organique. Les lipides de la nacre de l'huître perlière ont été extraits et analysés [44]: ils se composent d'un mélange d'acides gras, de triglycérides, de cholestérol et de céramides. Ces lipides semblent favoriser la réparation du *stratum corneum*, la couche supérieure de la peau. Le rôle des lipides dans la minéralisation de la coquille est inconnu. On ne peut pas exclure qu'une partie

des fractions lipidiques se combine de façon covalente avec des polysaccharides ou des protéines, formant soit des lipopolysaccharides, soit des lipoprotéines [28].En résumé, pour le développement de la nacre comme substituts de greffe osseuse, il est nécessaire de comprendre le mécanisme d'action des composés ostéogéniques de la nacre sur les cellules formatrices de l'os, en particulier, les ostéoblastes. A présent, malgré le fait que de nombreuses molécules de nacre soient déjà identifiées, il n'est pas connu précisément lesquelles sont ostéogéniques. Donc, il faut tout d'abord identifier les composés ostéogéniques de la nacre.

Tableau1 Protéines et peptides indentifiés dans la nacre selon les données de la base Uniprot.

Entry	Entry name	Protein names (Alternative name)	Organism	Length	Fragment	PubMed ID	Mass (Da)	Annotation score
P85510	CBG29_UNIPI	Calcium-binding shell glycoprotein P29	Unio pictorum	12	fragment	18810748; 17488282	1,313	2 out of 5
P85508	CBG95_UNIPI	Calcium-binding shell glycoprotein P95	Unio pictorum	18	fragments	18810748; 17488282	1,832	2 out of 5
P85509	CBG50_UNIPI	Calcium-binding shell glycoprotein P50	Unio pictorum	24	fragments	18810748; 17488282	2,815	2 out of 5
K0P7H2	UPSA_UNIPI	Upsalin	Unio pictorum	125		22474002; 20815006	14,007	2 out of 5
P0CAY9	MA20_PINMA	Conchiolin protein p20 (Fragment)	Pinctada maxima	21	fragment	11250534; 9183443	2,728	3 out of 5
P86968	UP4_PINMA	Uncharacterized shell protein 4 (NUSP6)	Pinctada maxima	79		19915030; 23213212	8,820	2 out of 5
P86961	GTRP_PINMA	Glycine and tyrosine-rich protein (PUSP7)	Pinctada maxima	90		19915030; 23213212	9,517	2 out of 5
P86965	USP3_PINMA	Uncharacterized protein 3 (NUSP3)	Pinctada maxima	98		19915030; 23213212	10,198	2 out of 5
P86960	GRP3_PINMA	Glycine-rich protein 3 (KRMP7)	Pinctada maxima	132		19915030; 23213212	14,263	2 out of 5
P86959	KCP1_PINMA	BPTI/Kunitz domain-containing protein 1(PSPI1)	Pinctada maxima	138		19915030; 23213212	16,200	2 out of 5
Q9NL39	MA14_PINMA	N14 matrix protein	Pinctada maxima	140		10694502	16,361	3 out of 5
P86964	KCP3_PINMA	BPTI/Kunitz domain-containing protein 3 (NSPI2)	Pinctada maxima	157		19915030; 23213212	17,683	2 out of 5
P86958	USP1_PINMA	Uncharacterized shell protein 1 (PUSP2)	Pinctada maxima	158		19915030; 23213212	17,749	2 out of 5
P86962	USP2_PINMA	Uncharacterized shell protein 2 (PUSP8)	Pinctada maxima	214		19915030; 23213212	22,768	2 out of 5
P86947	VRP_PINMA	Valine-rich protein (Alveolin-like protein)	Pinctada maxima	238		19915030; 23213212	27,079	2 out of 5
P86948	MP_PINMA	Mantle protein	Pinctada maxima	260		19915030; 23213212	29,812	2 out of 5
P86871	MRNP_PINMA	Methionine-rich nacre protein (Pmax-MRNP34)	Pinctada maxima	262		19915030; 21590302; 23213212	28,767	2 out of 5
P86967	NRP_PINMA	Asparagine-rich protein (NUSP5)	Pinctada maxima	265		19915030; 23213212	32,108	2 out of 5
P86969	GRP2_PINMA	Glycine-rich protein 2 (NUSP6)	Pinctada maxima	294		19915030; 23213212	30,054	2 out of 5
P86957	SGQP_PINMA	Serine, glycine and glutamine-rich protein (Cement-like protein)	Pinctada maxima	329		19915030; 23213212	32,486	2 out of 5
P86949	SLP1_PINMA	Shematrin-like protein 1	Pinctada maxima	336		19915030; 23213212	32,794	2 out of 5

Entry	Entry name	Protein names (Alternative name)	Organism	Length	Fragment	PubMed ID	Mass (Da)	Annotation score
P86963	KCP2_PINMA	BPTI/Kunitz domain-containing protein 2 (NSPI1)	Pinctada maxima	337		19915030; 23213212	35,956	2 out of 5
P86951	SLP3_PINMA	Shematrin-like protein 3	Pinctada maxima	343		19915030; 23213212	32,074	2 out of 5
P86953	ELDP1_PINMA	EGF-like domain-containing protein 1	Pinctada maxima	348	fragment	19915030; 23213212	38,362	2 out of 5
P86954	ELDP2_PINMA	EGF-like domain-containing protein 2	Pinctada maxima	357		19915030; 23213212	39,637	2 out of 5
P86950	SLP2_PINMA	Shematrin-like protein 2	Pinctada maxima	394		19915030; 23213212	35,687	2 out of 5
P86966	GRP1_PINMA	Glycine-rich protein 1 (NUSP4)	Pinctada maxima	423	fragment	19915030; 23213212	38,266	2 out of 5
P86952	TYRO_PINMA	Tyrosinase-like protein (Tyrosinase-2)	Pinctada maxima	456		19915030; 23213212	52,851	2 out of 5
P86955	CHI_PINMA	Putative chitinase (EC 3.2.1.14) (Clp3)	Pinctada maxima	466		19915030; 23213212	53,984	3 out of 5
Q9NL38	MA66_PINMA	N66 matrix protein (EC 4.2.1.1)	Pinctada maxima	568		10694502	62,376	4 out of 5
P86956	HEX_PINMA	Putative beta-hexosaminidase (EC 3.2.1.52) (Beta-N-acetylhexosaminidase) (Chitobiase) (N-acetyl-beta-glucosaminidase)	Pinctada maxima	1130		19915030; 23213212	126,718	3 out of 5
H2A0N0	USP5_PINMG	Uncharacterized shell protein 5 (PUSP20)	Pinctada margaritifera	57		21040589; 23213212	6,846	1 out of 5
H2A0N8	USP9_PINMG	Uncharacterized shell protein 9 (NUSP10)	Pinctada margaritifera	71		21040589; 23213212	8,641	1 out of 5
H2A0P3	USP12_PINMG	Uncharacterized shell protein 12 (Nacre uncharacterized shell protein 20)	Pinctada margaritifera	75		21040589; 23213212	8,915	1 out of 5
H2A0M9	USP4_PINMG	Uncharacterized shell protein 4 (PUSP18)	Pinctada margaritifera	76		21040589; 23213212	8,685	1 out of 5
H2A0N7	USP8_PINMG	Uncharacterized shell protein 8 (NUSP6)	Pinctada margaritifera	79		21040589; 23213212	8,767	1 out of 5
H2A0N6	USP7_PINMG	Uncharacterized shell protein 7 (NUSP3)	Pinctada margaritifera	100		21040589; 23213212	10,491	1 out of 5
H2A0M8	USP3_PINMG	Uncharacterized shell protein 3 (PUSP17)	Pinctada margaritifera	109		21040589; 23213212	11,950	1 out of 5
H2A0P1	USP10_PINMG	Uncharacterized shell protein 10 (Nacre uncharacterized shell protein 17)	Pinctada margaritifera	113		21040589; 23213212	11,398	2 out of 5
H2A0M6	PMN14_PINMG	Prismalin-14	Pinctada margaritifera	123		21040589; 23213212	13,977	2 out of 5
H2A0M2	KCP1_PINMG	BPTI/Kunitz domain-containing protein 1 (PSPI1)	Pinctada margaritifera	138		21040589; 23213212	16,313	2 out of 5
Q14WA6	MAPE_PINMG	Perlin matrix protein	Pinctada margaritifera	140			16,314	2 out of 5

Entry	Entry name	Protein names (Alternative name)	Organism	Length	Fragment	PubMed ID	Mass (Da)	Annotation score
H2A0N1	KCP2_PINMG	BPTI/Kunitz domain-containing protein 2 (PISP2)	Pinctada margaritifera	141		21040589; 23213212	15,454	2 out of 5
H2A0N3	USP6_PINMG	Uncharacterized shell protein 6 (Prism tissue inhibitor metalloproteinase protein 3)	Pinctada margaritifera	146		21040589; 23213212	17,066	2 out of 5
H2A0M4	USP1_PINMG	Uncharacterized shell protein 1 (Prism tissue inhibitor metalloproteinase protein 1)	Pinctada margaritifera	146		21040589; 23213212	16,464	1 out of 5
H2A0N2	NCP_PINMG	NTR domain-containing protein (Prism tissue inhibitor metalloproteinase protein 2)	Pinctada margaritifera	148		21040589; 23213212	17,178	2 out of 5
H2A0M1	DRP_PINMG	Aspartate-rich protein (PUSP2)	Pinctada margaritifera	152		21040589; 23213212	16,954	2 out of 5
H2A0N5	KCP3_PINMG	BPTI/Kunitz domain-containing protein 3 (Nacre serine protease inhibitor 2)	Pinctada margaritifera	157		21040589; 23213212	17,715	2 out of 5
H2A0P0	KCP5_PINMG	BPTI/Kunitz domain-containing protein 5 (Nacre serine protease inhibitor 5)	Pinctada margaritifera	182		21040589; 23213212	20,824	2 out of 5
H2A0N9	KCP4_PINMG	BPTI/Kunitz domain-containing protein 4 (NSPI3)	Pinctada margaritifera	198		21040589; 23213212	22,096	2 out of 5
H2A0P2	USP11_PINMG	Uncharacterized shell protein 11 (Nacre uncharacterized shell protein 18)	Pinctada margaritifera	220		21040589; 23213212	24,826	1 out of 5
H2A0K9	SLP2_PINMG	Shematrin-like protein 2 (Shematrin-5)	Pinctada margaritifera	223		21040589; 23213212	24,113	2 out of 5
H2A0M5	USP2_PINMG	Uncharacterized shell protein 2 (PUSP10)	Pinctada margaritifera	225		21040589; 23213212	26,447	1 out of 5
H2A0K6	VRP_PINMG	Valine-rich protein (Alveoline-like protein)	Pinctada margaritifera	238		21040589; 23213212	27,150	2 out of 5
H2A0K7	MP_PINMG	Mantle protein (MP)	Pinctada margaritifera	254		21040589; 23213212	28,945	2 out of 5
P86872	MRNP_PINMG	Methionine-rich nacre protein (Pmarg-MRNP34)	Pinctada margaritifera	260		21040589; 21590302	28,455	2 out of 5

Entry	Entry name	Protein names (Alternative name)	Organism	Length	Fragment	PubMed ID	Mass (Da)	Annotation score
H2A0L9	SGYQP_PINMG	Serine, glycine, tyrosine and glutamine-rich protein (Cement-like protein)	Pinctada margaritifera	332		21040589; 23213212	32,498	2 out of 5
H2A0L2	ELDP1_PINMG	EGF-like domain containing protein 1	Pinctada margaritifera	348		21040589; 23213212	38,479	2 out of 5
H2A0K8	SLP1_PINMG	Shematrin-like protein 1 (Shematrin-3)	Pinctada margaritifera	349		21040589; 23213212	36,200	2 out of 5
H2A0L3	ELDP2_PINMG	EGF-like domain containing protein 2	Pinctada margaritifera	359		21040589; 23213212	39,659	2 out of 5
H2A0L1	TYRO2_PINMG	Tyrosinase-like protein 2 (EC 1.14.18.-) (Tyrosinase 2)	Pinctada margaritifera	456		21040589; 23213212	53,060	2 out of 5
H2A0L5	CHI2_PINMG	Putative chitinase 2 (EC 3.2.1.14) (Clp3)	Pinctada margaritifera	466		21040589; 23213212	53,985	3 out of 5
H2A0L4	CHI1_PINMG	Putative chitinase 1 (EC 3.2.1.14) (Clp1)	Pinctada margaritifera	468		21040589; 23213212	53,559	3 out of 5
H2A0L0	TYRO1_PINMG	Tyrosinase-like protein 1 (EC 1.14.18.-) (Tyrosinase 1)	Pinctada margaritifera	492		21040589; 23213212	55,061	2 out of 5
H2A0L8	FND2_PINMG	Fibronectin type III domain-containing protein 2	Pinctada margaritifera	624		21040589; 23213212	69,566	2 out of 5
H2A0M0	NRP_PINMG	Asparagine-rich protein (PUSP1)	Pinctada margaritifera	686		21040589; 23213212	74,849	2 out of 5
H2A0L7	FND1_PINMG	Fibronectin type III domain-containing protein 1	Pinctada margaritifera	754		21040589; 23213212	83,108	2 out of 5
H2A0M3	AMO_PINMG	Putative amine oxidase [copper-containing] (EC 1.4.3.-)	Pinctada margaritifera	781		21040589; 23213212	89,950	3 out of 5
H2A0M7	PLSP_PINMG	Peroxidase-like protein	Pinctada margaritifera	793		21040589; 23213212	88,310	2 out of 5
H2A0N4	PIF_PINMG	Protein PIF [Cleaved into: Protein Pif97; Protein Pif80 (Aragonite-binding protein)]	Pinctada margaritifera	1014		21040589; 23213212	116,591	3 out of 5
H2A0L6	HEX_PINMG	Putative beta-hexosaminidase (EC 3.2.1.52) (Beta-N-acetylhexosaminidase) (Chitobiase) (N-acetyl-beta-glucosaminidase)	Pinctada margaritifera	1135		21040589; 23213212	126,661	3 out of 5
Q9UAH3	MA162_PINFU	N16.2 matrix protein (N14#2)	Pinctada fucata	129		10580124; 19679771; 19679772	15,375	3 out of 5

Entry	Entry name	Protein names (Alternative name)	Organism	Length	Fragment	PubMed ID	Mass (Da)	Annotation score
O97048	MA165_PINFU	N16.5 matrix protein (N14#5) (N14#7) (Pearlin)	Pinctada fucata	129		11246407; 19679771; 19679772	15,388	3 out of 5
Q9TW98	MA163_PINFU	N16.3 matrix protein (N14#3) (N14#4)	Pinctada fucata	131		10580124; 19679771; 19679772	15,539	3 out of 5
Q9TVT2	MA161_PINFU	N16.1 matrix protein (N14#1)	Pinctada fucata	131		10580124; 19679771; 19679772	15,504	3 out of 5
Q27908	MANA_PINFU	Nacrein (EC 4.2.1.1)	Pinctada fucata	447		8790386; 18253795; 15795493	50,114	5 out of 5
C7G0B5	PIF_PINFU	Protein PIF [Cleaved into: Protein Pif97; Protein Pif80 (Aragonite-binding protein)]	Pinctada fucata	1007		19679771; 19679772	115,355	4 out of 5
P85372	SMP05_NAUMA	Uncharacterized protein SMPP5	Nautilus macromphalus	6	fragment	19472248	662	1 out of 5
P85373	SMP06_NAUMA	Uncharacterized protein SMPP6	Nautilus macromphalus	6	fragment	19472248	734	1 out of 5
P85389	IMP01_NAUMA	Uncharacterized protein IMPP1	Nautilus macromphalus	6	fragment	19472248	744	1 out of 5
P85393	IMP03_NAUMA	Uncharacterized protein IMPP3	Nautilus macromphalus	7	fragment	19472248	882	1 out of 5
P85392	SMP11_NAUMA	Uncharacterized protein SMPP11	Nautilus macromphalus	8	fragment	19472248	1,018	1 out of 5
P85398	SMP02_NAUMA	Uncharacterized protein SMPP2	Nautilus macromphalus	8	fragment	19472248	765	1 out of 5
P85374	SMP07_NAUMA	Uncharacterized protein SMPP7	Nautilus macromphalus	8	fragment	19472248	966	1 out of 5
P85379	SMP14_NAUMA	Uncharacterized protein SMPP14	Nautilus macromphalus	8	fragment	19472248	1,108	1 out of 5
P85364	SMP10_NAUMA	Uncharacterized protein SMPP10	Nautilus macromphalus	8	fragment	19472248	1,032	1 out of 5
P85384	IMP02_NAUMA	Uncharacterized protein IMPP2	Nautilus macromphalus	8	fragment	19472248	816	1 out of 5
P85388	SMP03_NAUMA	Uncharacterized protein SMPP3	Nautilus macromphalus	9	fragment	19472248	1,125	1 out of 5
P85376	SMP09_NAUMA	Uncharacterized protein SMPP9	Nautilus macromphalus	9	fragment	19472248	983	1 out of 5
P85381	SMP16_NAUMA	Uncharacterized protein SMPP16	Nautilus macromphalus	9	fragment	19472248	960	1 out of 5
P85386	IMP05_NAUMA	Uncharacterized protein IMPP5	Nautilus macromphalus	9	fragment	19472248	1,023	1 out of 5
P85378	SMP13_NAUMA	Uncharacterized protein SMPP13	Nautilus macromphalus	10	fragment	19472248	1,097	1 out of 5
P85377	SMP12_NAUMA	Uncharacterized protein SMPP12	Nautilus macromphalus	10	fragment	19472248	1,055	1 out of 5
P85380	SMP15_NAUMA	Uncharacterized protein SMPP15	Nautilus macromphalus	10	fragment	19472248	1,094	1 out of 5

Entry	Entry name	Protein names (Alternative name)	Organism	Length	Fragment	PubMed ID	Mass (Da)	Annotation score
P85387	IMP06_NAUMA	Uncharacterized protein IMPP6	Nautilus macromphalus	10	fragment	19472248	1,038	1 out of 5
P85385	IMP04_NAUMA	Uncharacterized protein IMPP4	Nautilus macromphalus	10	fragment	19472248	960	1 out of 5
P85399	IMP12_NAUMA	Uncharacterized protein IMPP12	Nautilus macromphalus	10	fragment	19472248	1,277	1 out of 5
P85375	SMP08_NAUMA	Uncharacterized protein SMPP8	Nautilus macromphalus	11	fragment	19472248	1,080	1 out of 5
P85382	SMP17_NAUMA	Uncharacterized protein SMPP17	Nautilus macromphalus	11	fragment	19472248	1,362	1 out of 5
P85383	SMP18_NAUMA	Uncharacterized protein SMPP18	Nautilus macromphalus	11	fragment	19472248	1,253	1 out of 5
P85394	IMP07_NAUMA	Uncharacterized protein IMPP7	Nautilus macromphalus	11	fragment	19472248	1,164	1 out of 5
P85391	SMP04_NAUMA	Uncharacterized protein SMPP4	Nautilus macromphalus	12	fragment	19472248	1,359	1 out of 5
P85396	IMP09_NAUMA	Uncharacterized protein IMPP9	Nautilus macromphalus	12	fragment	19472248	1,251	1 out of 5
P85395	IMP08_NAUMA	Uncharacterized protein IMPP8	Nautilus macromphalus	12	fragment	19472248	1,200	1 out of 5
P85397	IMP10_NAUMA	Uncharacterized protein IMPP10	Nautilus macromphalus	12	fragment	19472248	1,334	1 out of 5
P85370	IMP11_NAUMA	Uncharacterized protein IMPP11	Nautilus macromphalus	12	fragment	19472248	1,335	1 out of 5
P85368	IMP13_NAUMA	Uncharacterized protein IMPP13	Nautilus macromphalus	13	fragment	19472248	1,395	1 out of 5
P85390	SMP01_NAUMA	Uncharacterized protein SMPP1	Nautilus macromphalus	14	fragment	19472248	1,453	1 out of 5
P85366	IMP17_NAUMA	Uncharacterized protein IMPP17	Nautilus macromphalus	14	fragment	19472248	1,708	1 out of 5
P85367	IMP20_NAUMA	Uncharacterized protein IMPP20	Nautilus macromphalus	14	fragment	19472248	1,575	1 out of 5
P85369	IMP15_NAUMA	Uncharacterized protein IMPP15	Nautilus macromphalus	15	fragment	19472248	1,525	1 out of 5
P85371	IMP14_NAUMA	Uncharacterized protein IMPP14	Nautilus macromphalus	16	fragment	19472248	1,474	1 out of 5
P85401	IMP19_NAUMA	Uncharacterized protein IMPP19	Nautilus macromphalus	16	fragment	19472248	1,553	1 out of 5
P85400	IMP18_NAUMA	Uncharacterized protein IMPP18	Nautilus macromphalus	17	fragment	19472248	1,680	1 out of 5
P85365	IMP16_NAUMA	Uncharacterized protein IMPP16	Nautilus macromphalus	18	fragment	19472248	1,684	1 out of 5
P86702	NAUT_NAUMA	Nautilin-63 (N63)	Nautilus macromphalus	316	fragments	21585656	32,939	3 out of 5
P86855	PWAPL_MYTGA	Perlwapin-like protein	Mytilus galloprovincialis	141		19203376; 21643827	16,116	2 out of 5
P86854	PLCL_MYTGA	Perlucin-like protein	Mytilus galloprovincialis	156		17010391; 21643827	17,781	2 out of 5

Entry	Entry name	Protein names (Alternative name)	Organism	Length	Fragment	PubMed ID	Mass (Da)	Annotation score
P86853	MYT1_MYTGA	Mytilin-1 (MUSP-1)	Mytilus galloprovincialis	181	fragment	19203376; 21643827	19,907	2 out of 5
P86859	MYT3_MYTCA	Mytilin-3 (MUSP-3)	Mytilus californianus	174		21643827	18,623	2 out of 5
P86857	AGP_MYTCA	Alanine and glycine-rich protein (MSI60-like protein)	Mytilus californianus	189	fragment	21643827	16,035	2 out of 5
P86861	FND_MYTCA	Fibronectin type III domain-containing protein (Fibronectin-like protein)	Mytilus californianus	225	fragment	21643827	24,832	2 out of 5
P86860	PSM_MYTCA	Shell matrix protein	Mytilus californianus	294	fragment	21643827	32,796	1 out of 5
P86856	MANL_MYTCA	Nacrein-like protein	Mytilus californianus	321	fragment	21643827	37,951	2 out of 5
P86858	MYT2_MYTCA	Mytilin-2 (MUSP-2)	Mytilus californianus	341		21643827	38,644	2 out of 5
P85035	PLINH_HALLA	Perlinhibin	Haliotis laevigata	41		17496038	4,794	2 out of 5
P85036	PLINR_HALLA	Perlinhibin-related protein	Haliotis laevigata	42		17496038	4,545	1 out of 5
P82595	PLS_HALLA	Perlustrin	Haliotis laevigata	84		11444832; 10623567	9,338	2 out of 5
P84811	PWAP_HALLA	Perlwapin	Haliotis laevigata	134		16861275	14,528	3 out of 5
P82596	PLC_HALLA	Perlucin	Haliotis laevigata	155		10931211; 10623567	18,155	4 out of 5
P86733	KCP_HALAI	BPTI/Kunitz domain-containing protein	Haliotis asinina	126	fragment	19915030; 21050442	14,526	2 out of 5
P86730	PWAP_HALAI	Perlwapin (Fragment)	Haliotis asinina	152	fragment	17121673; 21050442	16,127	2 out of 5
P86728	UP5_HALAI	Uncharacterized protein 5	Haliotis asinina	173		19915030; 21050442	19,652	2 out of 5
P86735	UP2_HALAI	Uncharacterized protein 2	Haliotis asinina	179	fragment	19915030; 21050442	19,571	1 out of 5
P86736	DGRP_HALAI	Aspartate and glycine-rich protein	Haliotis asinina	296	fragment	19915030; 21050442	31,093	2 out of 5
P86732	GAAP_HALAI	Glycine, alanine and asparagine-rich protein	Haliotis asinina	507		19915030; 21050442	45,640	2 out of 5

1. Ce tableau est organisé en fonction des espèces de nacre. Les séquences dont la longueur de chaîne est inférieure à 50 acides aminés sont traitées comme des peptides. En somme, 42 peptides et 94 protéines sont identifiés et révisés.

2. Un score d'annotation de 5 points est donc associé aux entrées les mieux annotées et un score de 1 point désigne une entrée avec une annotation assez élémentaire [35].

2.3 L'usage de la nacre comme substituts osseux

Publication N°1
Manuscrit résumé en français

Nacre, un biomatériau naturel et multi-usage pour la substitution de greffe osseuse

Ganggang Zhang, Alice Brion, Anne-Sophie Willemin, Marie-Hélène Piet, Vanessa Moby, Arnaud Bianchi, Didier Mainard, Laurent Galois, Pierre Gillet & Marthe Rousseau

Au cours des deux dernières décennies, avec un besoin clinique immense et rapidement croissant de régénération et de réparation osseuse, les substituts osseux sont de plus en plus considérés comme une solution potentielle. De grands efforts d'innovation sont faits pour mettre au point de tels substituts, certains étant même commercialisés pour la pratique clinique. La nacre est une structure de la coquille en carbonate de calcium associé à une matrice organique produite par certains mollusques. Dotée de nombreuses propriétés exceptionnelles, la nacre représente un biomatériau naturel et multi-usage comme substitut de greffe osseuse. Cette revue vise à résumer les besoins actuels des chirurgiens orthopédiques et les défis pour le développement des substituts osseux. Cette revue résume systématiquement les caractéristiques physiologiques et les preuves biologiques des effets de la nacre sur l'ostéogenèse.

Il existe trois principaux types de greffes osseuses: les autogreffes, les allogreffes et les greffons osseux. Cependant, à cause de certains inconvénients bien connus, les applications de l'autogreffe et de l'allogreffe sont très limitées. Ainsi, l'espoir s'est tourné vers les substituts de greffe osseuse. Jusqu'à présent, aucun substitut de greffe osseuse n'est capable de satisfaire toutes les exigences cliniques. Une perte osseuse importante due à un traumatisme, à une infection et à des maladies tumorales à différents sites doit être traitée différemment. L'accent mis sur les substituts de greffe osseuse synthétiques vise actuellement à améliorer leur potentiel ostéogénique, ostéoconducteur et ostéoinducteur, mais le développement vers l'application clinique fait face à beaucoup de défis liés aux techniques, ou aux aspects commerciaux.

Due à la microstructure en couches et aux composants organiques particuliers, la nacre présente d'excellentes propriétés de contrainte de compression meilleures que

celles de l'os. Les qualités mécaniques et les dimensions confèrent à la nacre un grand potentiel pour concevoir des substituts de greffe osseuse.

L'utilisation médicale de la nacre chez l'homme a une longue histoire [45]. L'utilisation suggérée de la nacre comme substitut de greffe osseuse a connu une percée majeure en 1992, lorsque Lopez *et al*. ont découvert que la nacre de *P*. *maxima* était simultanément biocompatible et ostéogénique. Ensuite, de nombreuses études *in vivo* et *in vitro* sur la nacre ont été effectuées. Ces études sont bien résumées dans ce manuscrit. Les qualités de la biocompatibilité, de l'ostéogénèse, de l'ostéoconduction et de l'ostéointégration de la nacre ont toutes été prouvées chez l'homme et sur des modèles animaux. Par rapport aux substituts existants, la nacre a aussi démontré que son usage comme substitut de greffe osseuse est acceptable. Les résultats des études *in vitro* sont bien corrélés avec ceux des études *in vivo*. Il est supposé que la nacre contient des molécules signalisatrices qui sont libérées lorsque la nacre est placée dans les systèmes vivants, donc, des travaux sont aussi effectués pour identifier les composés ostéogéniques de la nacre. A la fin du manuscrit, le potentiel d'usage de la nacre pour la chirurgie orthopédique est proposé.

Society For Biomaterials

Review Article

Nacre, a natural, multi-use, and timely biomaterial for bone graft substitution

Ganggang Zhang, Alice Brion, Anne-Sophie Willemin, Marie-Hélène Piet, Vanessa Moby, Arnaud Bianchi, Didier Mainard, Laurent Galois, Pierre Gillet, Marthe Rousseau

Faculté de médicine, IMoPA, UMR 7365 CNRS Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Received 17 June 2016; revised 23 September 2016; accepted 13 October 2016
Published online 00 Month 2016 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jbm.a.35939

Abstract: During the past two decades, with a huge and rapidly increasing clinical need for bone regeneration and repair, bone substitutes are more and more seen as a potential solution. Major innovation efforts are being made to develop such substitutes, some having advanced even to clinical practice. It is now time to turn to natural biomaterials. Nacre, or mother-of-pearl, is an organic matrix-calcium carbonate coupled shell structure produced by molluscs. *In vivo* and *in vitro* studies have revealed that nacre is osteoinductive, osteoconductive, biocompatible, and biodegradable. With many other outstanding qualities, nacre represents a natural and multi-use biomaterial as a bone graft substitute. This review aims at summarising the current needs in orthopaedic clinics and the challenges for the development of bone substitutes; most of all, we systematically review the physiological characteristics and biological evidence of nacre's effects centred on osteogenesis, and finally we put forward the potential use of nacre as a bone graft substitute. © 2016 Wiley Periodicals, Inc. J Biomed Mater Res Part A: 00A:000–000, 2016.

Key Words: nacre, bone graft substitute, biomineralization, biomaterial, clinical applications

How to cite this article: Zhang G, Brion A, Willemin A-S, Piet M-H, Moby V, Bianchi A, Mainard D, Galois L, Gillet P, Rousseau M. 2016. Nacre, a natural, multi-use, and timely biomaterial for bone graft substitution. J Biomed Mater Res Part A 2016:00A:000–000.

INTRODUCTION

Nacre, or mother-of-pearl, is a calcium carbonate structure present in mollusc shells. *In vivo* and *in vitro* studies have revealed that nacre is osteoinductive, osteoconductive, biocompatible and biodegradable. Its vast and extensive availability, competitive cost, opacity to X rays, unique hierarchal structure, chemical complexity and outstanding mechanical properties all make nacre a natural and multi-use biomaterial as a bone graft substitute. Nevertheless, nacre has not yet drawn enough attention from investigators. This review aims at pointing out the current needs in orthopaedic clinics and the challenges for the development of bone substitutes, and principally to systematically review the physiological characteristics and biological evidence of nacre's contribution centred on osteogenesis, and thus to foresee the potential use of nacre as a bone graft substitute.

What are the real needs for a bone graft substitute in current orthopaedic clinics?

There are three main types of bone grafts: autografts, allografts, and bone graft substitutes. There are, however, some well-known drawbacks, for example, restricted supply or disease transmission. The application of autograft and allograft is greatly limited.[1,2] Thus, hope has turned to bone graft substitutes.[3] To date, no one bone graft substitute is able to satisfy all the clinical demands. Large bone loss due to trauma, infection and tumoral diseases at different sites should be treated differently. To meet the major requirements of a bone graft substitute, a 4Fs rule was introduced: form, function, fixation and formation.[3] Form means that the scaffold should fill the bone defect cavities. Function is the load-bearing property. Fixation requires scaffolds to be securely attached to the bone at the defect margins, eliminating motion between host bone and scaffold to avoid nonunion and pseudarthrosis. Formation means that scaffolds should promote bone formation. For all cases, the 4Fs should be respected. While cranial surgery has more demands concerning the form, orthopaedic surgery, particularly the treatment of severe fracture or limb reconstruction, has a higher requirement for function and fixation. In the case of delayed healing fractures, non-unions and infection,

All authors approved the entirety of the submitted material and contributed actively to the study.
Correspondence to: M. Rousseau; e-mail: marthe.rousseau@univ-lorraine.fr
Contract grant sponsor: China Scholarship Council

© 2016 WILEY PERIODICALS, INC.

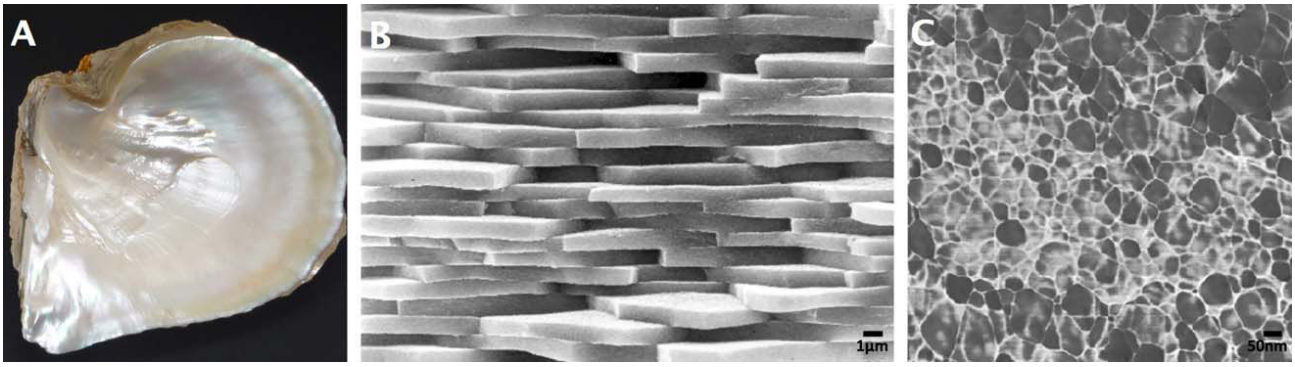


FIGURE 1. Structure of the nacreous layer of *Pinctada*: A: Lustrous nacreous layer as an internal shell coating; B: Scanning Electron Microscopy picture showing the characteristic brick and mortar structure of nacre; C: Atomic Force Microscopy image in Phase Contrast mode ($1 \times 1\ \mu m^2$) at the nanometer (nm) length scale.

orthopaedic clinics need treatment for bone formation. Furthermore, in spinal surgery, implants in the vertebral body need to be injectable, particularly when a mini-invasive approach is taken. The handling characteristics of different substitutes are very important for the orthopaedic surgeon. Similarly, the implants for maxillofacial and dental surgery have different requirements. Clinically, the choice of bone graft substitutes depends on several factors[4]: (1) the intended clinical application; (2) defect size and total bone mass required; (3) biomechanical properties; (4) chemical composition; (5) availability; (6) desired bioactivity (osteoconductivity/osteoinductivity/osteogenicity); (7) desired resorption rate; (8) handling characteristics; (9) associated side effects; (10) cost; (11) ethical issues. On the whole, the bone graft substitute should meet the multiple needs of any given specific case.

Current mainstream ideas on bone graft substitutes and the main dilemma

The focus on synthetic bone graft substitutes is currently aimed at improving their osteogenic, osteoconductive and osteoinductive potential. Osteogenesis implies the formation of bone matrix by bone-forming cells. Osteoconduction means bone growth on a surface: an osteoconductive surface permits bone growth on its surface or deeper down into pores, channels or pipes.[5] Osteoinduction means the recruitment of undifferentiated mesenchymal stem cells from the surrounding tissue and the stimulation of these cells to develop into preosteoblasts for bone regeneration.[5,6] Osseointegration is also an important concept, that of the stable anchorage of an implant achieved by direct bone-to-implant contact.[5] Although >21,000 papers on bone substitutes have been published in the last 20 years (PubMed search), bone substitutes have not all led to clinical practice because of several limitations or challenges,[3,4,7–9] related to techniques, business, or philosophy. The most urgent or toughest-to-satisfy ones are the following: (1) to develop mechanically strong porous scaffolds that retain proper vascularization and host integration properties; (2) to assess graft functionality in load-bearing large animal models; (3) to avoid single-component strategies involving cells, factors, or defect-filling materials; (4) to modulate the host's foreign-body response; (5) to solve the contradiction between the strategies incorporating all the necessary components with the difficulty in obtaining regulatory approval; (6) to assess technical difficulties, efficiency, cost during the manufacturing process and safety risks during the pre-implantation period; (7) to meet specific market needs.

NACRE

The core biological knowledge on nacre

Nacre (mother-of-pearl) is an acellular calcium carbonate composite produced worldwide by bivalves, gastropods, and cephalopods as an internal shell coating [Fig. 1(A)]. The structure and formation of nacre, particularly in giant oysters *Pinctada* (*P.*) *maxima* and *P. magaritifera*, is among the best-studied examples of calcium carbonate biomineralization, which gives a biomimetic approach for current bone substitutes.

Physical structure. *P. margaritifera* and *P. maxima* are among the largest *Pinctada* species (family *Pteriidae*). The largest *P. margaritifera* shells can reach 30 cm in diameter, versus 20–25 cm for *P. maxima*. The thickness of the *P. maxima* nacre layer can be up to 2 cm.[10] These parameters endow nacre with great potential to design bone graft substitutes. At the microscopic scale, nacre is composed of aragonite crystal tablets covered by and embedded in an organic matrix. The typical structure of *Pinctada* nacre involves a regular brick wall-like edifice, composed of pseudohexagonal aragonite tablets about 0.5-μm in thickness -thick and 5–15 μm in diameter [Fig. 1(B)].[11] The tablets are arranged in continuous parallel laminae separated by sheets of an interlamellar organic matrix.[12] On the nano-scale, the tablet itself is a composite containing both the mineral structure of aragonite and the intracrystalline organic material [Fig. 1(C)].[12,13] Because of the particular layered microstructure and organic components, nacre presents excellent compressive stress properties better than those of bone. The Young's modulus, or the elastic modulus, is 30–40 GPa for nacre versus 20 GPa for bone, and the respective values of resistance to failure are 185–200 MPa versus 140 MPa.[14,15]

Chemical composition. The inorganic fraction (97%) of nacre is composed of calcium carbonate in the form of aragonite. The organic fraction (3%) is a mixture of proteins, peptides, glycoproteins, chitin, lipids, and pigments.[16] To date, >50 proteins and 50 peptides from nacre have been identified (UniProt protein database, see www.uniprot.org). The organic molecules can be extracted with aqueous and organic solvents.[17]

NACRE AND BONE

The formation of bone and shell are both multi-gene regulated and environmentally-related biomineralization processes. Nacre is an acellular structure of the external skeleton of molluscs whereas bone is a cellularized structure of the internal skeleton of vertebrates. These two highly organized structures share an intervening organic matrix deposited by specialized cells: bone cells in vertebrates and epithelial mantle cells in molluscs. The organic framework provides a scaffold for crystallization and directs the mineralization. A good understanding and comparison of their physiological formation and hierarchical structure is a necessary prerequisite to promote the value of nacre as a bone graft substitute.

Biology of bone. Bone can be seen as an open cell composite material composed of osteogenic cells, an extracellular matrix, proteins, growth factors, mineral calcium phosphate in the form of hydroxyapatite and a complex vascular system. Ossification occurs via intramembraneous or endochondral pathways. In both cases, mesenchymal cellular condensation first occurs and serves as a template for subsequent ossification. The mesenchymal stem cells (MSCs) are stimulated or regulated by abundant signal molecules,[18] so that they migrate to a specific site, proliferating and differentiating into osteoblasts. Osteoblast differentiation occurs in three stages: (1) cell proliferation, (2) matrix maturation, and, (3) mineralization. Both ossification processes are involved during bone remodelling to maintain a balance between osteoclastic bone resorption and osteoblastic bone formation, in order to always maintain healthy bone, and homeostasis between the calcium and phosphates.

Structure of bone. There are two main structures, the outer cortical bone and the inner cancellous trabecular bone. Cortical bone is very dense and consists of hierarchical structures. They range from the solid material (>3 mm), to the cylindrically organized osteons (10–500 μm), lamellae (3–20 μm), and the collagen-mineral composite (60–600 nm). The primary function of cortical bone is to allow torsion, and to furnish bending resistance and compressive strength. Cancellous bone consists of an interconnected network of trabeculae which is usually filled with marrow.[19] The porous trabeculae are metabolically active and are remodelled more frequently than cortical bone.

Conservation of signal molecules involved in biomineralization control in vertebrate bone and mollusc shell. It is believed that there is conservation of the signal molecules involved in the biomineralization control in calcifying matrices of bone and shell. One facet of matrix-mediated control arises from the bone and nacre interaction. *In vivo* experiments of nacre implants have established its biocompatibility and osteogenic activity in bone (detailed in part 3.1). *In vitro* studies have provided evidence of the presence, in the nacre organic matrix, of signal molecules responsible for the recruitment of mammal cells in the osteogenic pathway and bone cell activation undergoing a complete sequence of mineralization (detailed in *In vitro* Studies section).

THE SYSTEMIC BIOLOGICAL EVIDENCE OF NACRE FOR BONE GRAFT SUBSTITUTION

The medical use of nacre in humans has a long history. As recorded in *Bencao Tujing (Illustrated Classics of Materia Medica)* written in 1061, traditional Chinese medicine used a decoction of nacre powder to treat hepatopathy for >1000 years. Discovered in 1931, teeth made of nacre in Mayan skulls integrated perfectly into the surrounding bone [Fig. 2(A)].[20] The suggested use of nacre as a bone graft substitute was a major breakthrough made in 1992, when Lopez et al.[26] discovered that the nacre from *P. maxima* was simultaneously biocompatible and osteoinductive. Ever since, attention has been paid continuously to nacre. In what follows, results of the major *in vivo* and *in vitro* studies will be introduced.

In vivo *studies.* Inspired by the nacre teeth found in Mayan skulls, nacre, as a bone graft substitute, was first designed many centuries later to restore dental defects in dogs and humans.[21,27] For the last 20 years, nacre has been designed more ingeniously and tested, *in vivo*, at various implantation sites for different uses (Table I and Fig. 2). New bone formation stimulated by nacre has been observed in humans, rats, sheep, rabbits and pigs. The implantation site involved the maxillary, mandible [Fig. 2(B)], midshaft of femur or femoral epiphysis, first metatarsus, in lumbar vertebrae or between the transverse processes. More recently, nacre has been designed as an injectable powder [Fig. 2(C)], or in the shape of rods [Fig. 2(D)], trochlea [Fig. 2(E)], screws [Fig. 2(F)] and plates, to match the clinical needs for orthopaedic bone devices.

Biocompatibility, osteoinduction, osteoconduction, and osseointegration of nacre. In 1997, Atlan et al.[28] mixed fine nacre powder into a slurry with the blood of eight patients suffering from bone loss in their upper jaw. The slurry was injected into tissues where the bone was missing. After 6 months, biopsies showed that the nacre had been well accepted by the local tissues. The newly formed bone was tightly welded to the nacre particles without any intervention of soft or fibrous tissue [Fig. 3(A)]. Osteoblasts had been activated and new healthy bone had formed throughout the implant [Fig. 3(B)], while the nacre particles slowly dissolved away gradually and centripetally, replaced by immature woven bone and then mature lamellar bone [Fig. 3(C)]. Thus, the qualities of biocompatibility, osteoinduction, osteoconduction, and osseointegration of nacre were all proven in a human, which was further confirmed

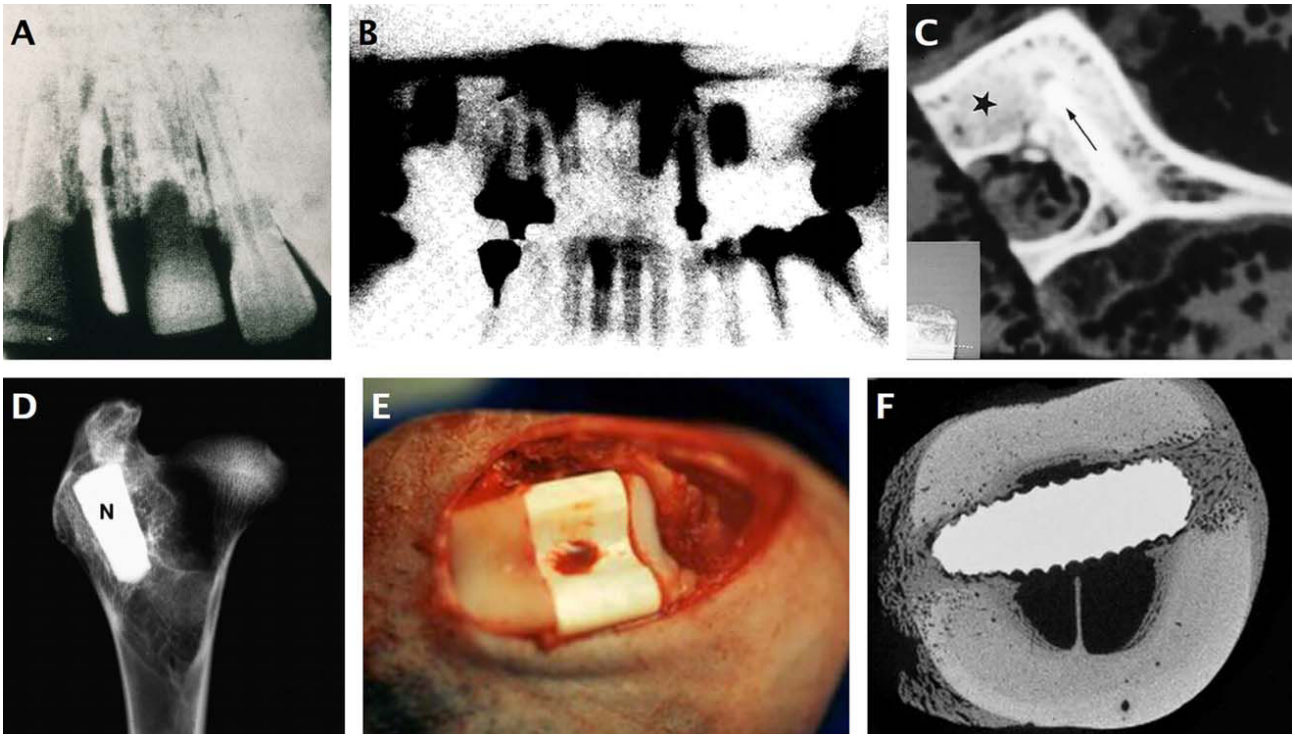


FIGURE 2. Different designs of nacre as Bone graft substitutes. A: Nacre incisor in the jaw of an Ancient Mayan individual. Excellent bone fusion was shown by X-ray imaging;[20] B: bioracine of nacre at levels of 12, 22, 15, and 25 in human maxillary, 4 months after implantation;[21] C: Injectable powder of nacre (★), implanted in sheep vertebrae, 1 week after implantation;[22] D: Nacre (N) in cylinder shape implanted in sheep femoral epiphysis, 10 months after implantation;[23] E: Nacre in trochlea shape as substitute of sheep femoral trochlea;[24] F: Nacre (N) in screw shape implanted in sheep first metatarsus, 2 months after implantation.[25]

by all the subsequent *in vivo* studies when nacre was implanted in a bone environment (Fig. 4).

Comparison between nacre and autologous bone graft. Lamghari et al.[32] implanted nacre in rabbits to evaluate the possibility of arthrodesis of lumbar spine transverse processes for 11 weeks. The nacre was compared to autologous bone grafts from the iliac crest of each rabbit. Results showed that nacre was well tolerated by the host tissue, stimulated a continuing endochondral bone formation, and formed a solid fusion between the transverse processes in one-third of the rabbits by week 5 and two-thirds after 11 weeks. After that period, a solid fusion was formed in all rabbits implanted with autologous bone graft, and no bone formation in sham operated rabbits. Thus, nacre induced spinal fusion in an acceptable percentage of the cases.

Comparison between nacre and hydroxyapatite coated titania (THA). The comparison between raw nacre and THA was made after 14 days of implantation in the midshafts of rat femurs.[29] By *in situ* hybridization using RNA probes complementary to collagen I RNA, osteonectin RNA and osteocalcin RNA, nacre cylinders stimulated a faster osteogenesis, which progressed beyond the phase of maximal synthetic activity, and a better osseointegration was observed than with THA.

Comparison between nacre and β-tricalcium phosphate (β-TCP). Rod-shaped nacre or β-TCP were implanted in the mandible of 8 male guinea pigs by bilateral drilling procedures, while 2 pigs were sham-operated.[34] The results showed that nacre induced the highest amount of new bone formation, followed by the β-TCP and the sham-operated group, respectively.

Comparison between nacre and polymethylmethacrylate (PMMA). Lamghari et al.[22,25,31] compared nacre powder and PMMA in sheep vertebrae. Experimental cavities were prepared in the lumbar vertebrae of sheep, and then filled with injectable nacre powder [Figs. 2(C) and 4(D)], PMMA or left empty. The vertebrae sections were performed 1, 8, 12 weeks after surgery, and evaluated histologically and morphometrically. The empty cavities were filled by fatty diffuse tissue [Fig. 4(C)]. No new bone was formed in the empty cavities [Fig. 4(E)], nor in those filled with PMMA. However, layers of newly formed bone, both woven and lamellar, in different stages of maturation in contact with or adjacent to the dissolving nacre powder were observed [Fig. 4(F)], confirming the results of an earlier study.[28]

Biodegradability of nacre. To understand the mechanisms of biodegradation is an important issue in the choice of materials and implant design.[30] The shape of nacre implants and endosseous sites are two important factors.

TABLE I. *In Vivo* Studies on the Osteogenic Activity of Nacre as a Bone Graft Substitute

Reference	Species of Nacre; Implant Design	Experimental Subject; Implantation Site (n=)	Follow-up	Principal Results
1997[28]	*P. maxima*; powder, particle size: 50–100 μm, mixed with autologous venous blood	Human (8), maxillary alveolar bone	6 months	Osteogenesis, biodegradable gradually and centripetally, replaced with immature and then mature lamellar bone
1997[29]	*P. margaritifera*; cylinders, 2-mm diameter and 3-mm high	Rat (−), midshaft femur	14 days	Nacre has a higher osteogenic bioactivity than titania-hydroxyapatite composite
1999[23]	*P. maxima*; cylinder, 6-mm mean diameter; 15-mm length	Sheep (6), femoral epiphysis	3 months ($n = 3$), 10 months ($n = 3$)	Osteogenesis and biocompatibility of nacre, continuity between the nacre and the bone
2000[30]	*P. margaritifera*; granules: diameters <2 mm	Rat (72), back muscle and femur	1, 2, 4, 8, and 16 weeks	Nacre is biocompatible, biodegradable and osteoconductive materials; Aragonite-bone bonding via a phosphorous-rich layer
2001[31]	*P. maxima*; mixture of powder (particle size: 50–150 μm) with autologous venous blood	Sheep (11), upper lumbar vertebrae (L1-L7)	1 week ($n = 3$), 2 months ($n = 3$), 3 months ($n = 5$)	Nacre stimulates bone-forming cells in vertebrae and results in new bone formation
2001[32]	*P. maxima*; mixture of powder (particle size: 50–150 μm) with autologous venous blood; graft volume: 2.5 mL	Rabbit (15), lumbar vertebrae (L5-L6)	2 weeks ($n = 3$), 5 weeks ($n = 3$), 11 weeks ($n = 3$)	Nacre stimulates the formation of a bone bridge between the transverse processes of rabbit lumbar vertebrae
2005[33]	*P. maxima*; nacre pieces, 20 mm length and 13 mm in diameter	Sheep (14), midshaft femur	3 months ($n = 5$), 6 months ($n = 5$), 9 months ($n = 4$)	Raw nacre implants are sustained when implanted into bone tissue in spite of a limited biodegradation process
2012[34]	*P. maxima*; rod-shaped, $2 \times 2 \times 2$ mm^3	Pig (10), mandible	1 month ($n = 5$), 2 months ($n = 5$)	Nacre-implanted group exhibits the highest new bone formation, without any fibrous tissue, compared to β-tricalcium phosphate implanted or sham-operated group
2012[24]	*P. maxima*; trochlea shape ($22 \times 15 \times 10$ mm^3)	Sheep (6), femoral trochlea	3 months ($n = 3$), 6 months ($n = 3$)	Biocompatibility, good tolerance in joint, osteochondroinductivity, endochondral ossification
2014[25]	*P. maxima*; screws	Sheep (5), first metatarsus	2 months	Erosion of nacre is observed; The interface shows a toothed-comb appearance; The interposing organic layer is not observed

When raw pieces of nacre were implanted in dogs',[27] or humans' dental defects,[21] or sheep femur epiphysis[23] for as long as 10 months, nacre appeared sustained, and no osteoclasts or absorption was observed at the bone/nacre interface. On the other hand, nacre powder (particle size 50–150 μm) was gradually dissolved in rabbit vertebrae, beginning 8 weeks after surgery.[28] No giant cells or macrophages were observed.[36] The result was confirmed by the study in a human maxillary,[28] over 6 months after implantation, and 16 weeks after implantation in rat femurs.[30] It was believed that a physicochemical dissolution was involved in the biodegradation of nacre,[30] but, some nacre powder was always observed at the end of all these studies.

Later, it was revealed that the change rate of the nacre/bone surface depended on the endosseous implantation site and the nacre/bone interaction.[33] Smooth-surfaced nacre pieces were implanted in sheep femurs after a midshaft hemidiaphysis resection of the femur bone to match the nacre. Bone/nacre and bone-marrow/nacre interfaces were analyzed at 3, 6, and 9 months after the surgery. The results showed that, the nacre surfaces facing bone marrow were always more irregular than when implanted in a mineralized-bone, and the changes at the nacre interfaces appeared to be site-dependent rather than time related. The presence of giant macrophage cells was confirmed in the first metatarsus of sheep, submitted to a simultaneous

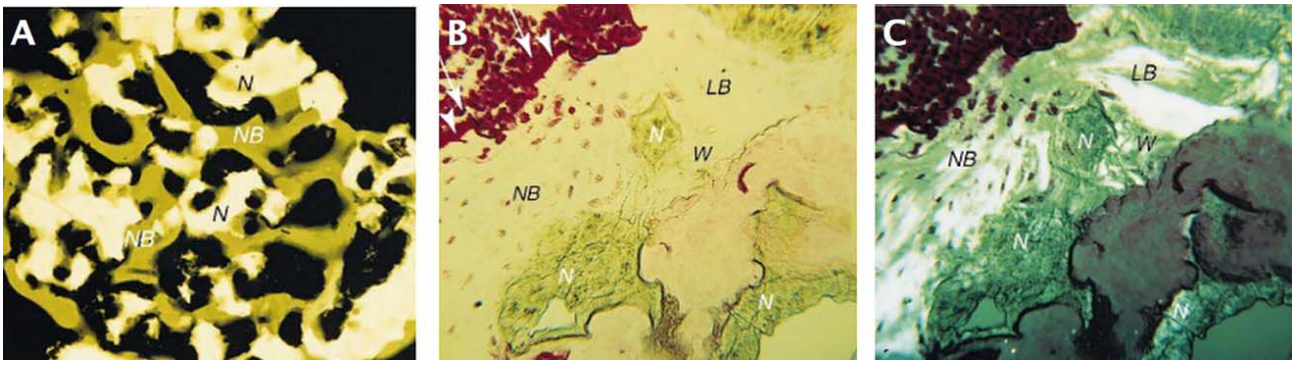


FIGURE 3. Osseointegration of nacre in human bone environment. Nacre powder was implanted in defective human maxillary bone; the images here were taken after 6 months of implantation.[28,35] The images above are respectively microradiography (A), histological (B, basic fuchsine staining) and polarised light images (C). A shows newly-formed bone (*NB*, low X-ray density) throughout the nacre (*N*, high X-ray density), welded together without intervening fibrous tissue, as shown in B. The bone surface was covered by the osteoid borders lined with osteoblasts. C: The new bone was composed of woven bone (*W*) and lamellar bone (*LB*) in close contact with the nacre implants. A × 26; B and C, ×157.

remodelling process that implied both erosion by giant macrophage cells, and bone apposition on the previously eroded areas [Fig. 4(A,B)].[25] In general, the *in vivo* biodegradability of nacre is a highly variable parameter depending on the size, shape, and endosseous implantation site. Nacre blocks are sustained during a period of bone regeneration and bone remodelling though a limited biodegradation, while, nacre powder dissolves much more quickly than nacre blocks. It is possible to make nacre absolutely degradable for a short period if the nacre powder is fine enough.

In vitro studies

In vitro studies, of which the results are shown in Table II, have been carried out to explain all that has been observed in

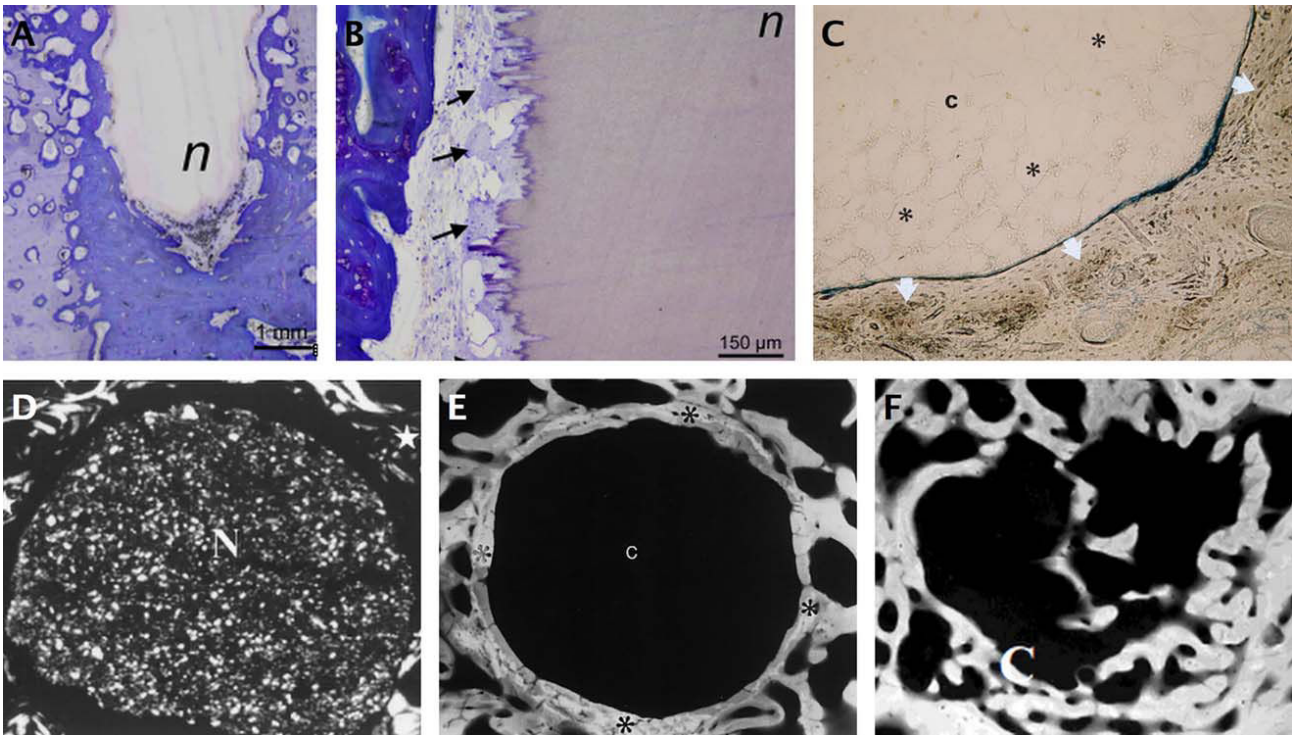


FIGURE 4. Osseointegration and biodegradation of nacre in sheep. A: Histological aspect of nacre screw after a 2-month implantation period in the first metatarsus.[25] Note the nacre erosion by giant cells; B is a higher magnification of A at the interface, showing bone apposition and erosion of nacre. Toluidine blue staining: Bone (in blue) and nacre (n, unstained); C: Histology of empty cavity (light microscopy) in vertebrae, showed a bone defect at 12 weeks post-surgery. Cavity (C) was filled by fatty diffuse tissue (*). Body of the vertebrae (white arrow), ×40;[25] D to F show bone defects in vertebrae.[22] D: Bone cavity was filled with nacre powder (N), 1 week post-surgery; vertebral trabecular bone (⋆), polarised light image, ×25; E: The bone around the cavity (C) without nacre was organised into concentric rings (*), no new bone formation at 12 weeks post-surgery, contact microradiograph, ×25; F: New bone formation and bone remodelling were observed in the cavity (C) with nacre at 8 weeks post-surgery, contact microradiograph, ×25.

TABLE II. *In Vitro* Studies on Nacre's Osteogenic Activity

Reference	Nacre Species and Treatment; Cells and Culture Time	Principal Results
1992[26]	*P. maxima*; Nacre chips (500–750 μm*100 μm); Human alveolar maxillary osteoblasts; 5–7 weeks	General chemical inducers not required to obtain bone formation; Human osteoblasts proliferated and were clearly attracted by nacre chips; Bone formation in the presence of nacre
1992[37]	*P. maxima*; Nacre chips (1 mm^3); Human alveolar maxillary osteoblasts; 4–6 weeks	Nacre induces different types of mineralisation in human osteoblasts
1999[36]	*P. maxima*; WSM[a]; rBMSC[b]; 7 days	WSM activates osteogenic bone marrow cells with enhanced alkaline phosphatase activity
2001[38]	*P. maxima*; WSM; MRC-5[c], rBMSC; 13 days	In rBMSC, WSM promotes the cell proliferation and ALP[g] activity as dexamethasone
2001[39]	*P. maxima*; WSM and HPLC fraction; rat parietal osteoblasts; 9 days	Nacre extract and the HPLC fraction have no effect on the proliferation of mature osteoblasts; Nacre extract stimulates Bcl-2 production in osteoblast
2002[40]	*P. maxima*; WSM and four HPLC fractions; MRC-5, rBMSC, rat calvaria osteoblasts; 13 days	WSM contains signal molecules that can stimulate the osteogenic pathway in mammalian cells
2003[17]	*P. maxima*; WSM; MC3T3-E1[d]; 6 days	WSM speeds up the differentiation and mineralisation more effectively than dexamethasone; WSM inhibits ALP activity and that of dexamethasone
2003[41]	*P. maxima*; WSM; MRC-5, rBMSC, MC3T3-E1, MG63[e]; 14 days	WSM contains the signals responsible for the biological activity of the whole nacre; WSM acts in particular on osteoblastic cell differentiation up until mineralisation
2004[42]	*Haliotis tuberculata*; WSM; MRC-5, rBMSC, MC3T3-E1, MG63; 14 days	WSM contains signal molecules responsible for the recruitment of mammal cells in the osteogenic pathway and bone cell activation undergoing a complete sequence of mineralisation
2006[43]	*P. fucata;* Matrix protein p10 from nacre; MRC-5, MC3T3-E1; 7 days	p10 increases ALP activity, while the viability of MRC-5 and MC3T3-E1 remained unchanged after treatment of p10
2007[44]	*P. margaritifera*; Slices of cylinder, 6 mm in diameter, 800 μm slices; Human osteoclast precursors, mouse osteoclast precursors, rabbit mature osteoclasts; 24 h	Osteoclastic degradation of nacre is a limited process
2007[45]	*P. fucata;* Protein complex p60 from nacre (decalcification process); MC3T3-E1, rBMSC; 8 days	Von Kossa staining shows the formation of mineralised nodules in the two cell types after the treatment of p60 without ascorbic acid and β-glycerophosphate
2008[46]	Nacre species unknown; WSM; Rabbit bone marrow stromal cells; 7 days	WSM increases ALP activity, and the expression of BMP-2, but not Runx2
2007[47]	*P. maxima*; Low molecular weight molecules (50–235 Da) of WSM; MC3T3-E1; 25 days	WSM speeds up the differentiation and mineralisation of damaged bone tissue; Hydroxyapatite was found in cells treated with WSM
2012[48]	*Pteria martensii*; WSM and nacre powder; Mouse calvaria osteoblast precursors, bone marrow derived osteoclast precursors; 10 and 2 days, respectively	WSM induces osteoblast biomineralisation compared to calcium dissolved from $CaCO_3$. WSM suppresses osteoclast formation; Related signaling pathways are also revealed
2013[49]	*P. fucata*; WSM; MC3T3-E1; 9 days	WSM induces differentiation of the preosteoblasts in mature osteoblasts
2015[50]	*P. maxima*; WSM and nacre chips (500–750 μm × 100 μm); Human bone marrow stromal cells; 21 days	Nacre induces the early stages of human bone cell differentiation
2015[51,52]	*P. margaritifera*; ESM[f]; MC3T3-E1 and human osteoblasts; 21 days	ESM can restore the mineralisation capacity of osteoarthritis osteoblasts

[a]WSM: water soluble matrix.
[b]rBMSC: rat bone marrow stromal cells.
[c]MRC-5: human fetal lung tissue fibroblasts cell line.
[d]MC3T3-E1: murine calvaria pre-osteoblasts cell line.
[e]MG63: human osteosarcoma cell line.
[f]ESM: ethanol soluble matrix.
[g]ALP: alkaline phosphatase.

in vivo studies. As nacre is osteoinductive *in vivo* and manifests many great qualities as a bone graft substitute, it is important to determine the internal mechanisms of action and to identify the responsible signal molecules in the osteogenic process, before the routine use of nacre in clinics.

Biocompatibility, osteoinduction, osteoconduction of nacre, and the mechanisms of its action. When nacre chips were placed with human alveolar maxillary osteoblasts, without any regular chemical inducers to obtain bone mineralization *in vitro*, osteoblasts proliferated and were attracted by nacre chips. The osteoblasts surrounding the nacre chips mineralised preferentially, suggesting that nacre was biocompatible, osteoinductive and osteoconductive.[26] As a pioneering model, the studies were repeated,[37,39,40] and developed in order to explore the mechanisms of osteoinduction by nacre. Then the nacre chips were placed beside bone chips on a layer of human osteoblasts: a strong osteogenic effect of the nacre on the osteoblasts was observed. New bone formation occurred by growth on the existing bone and by the formation of mineralised nodules within the matrix adjacent to the bone explant.[37] This phenomenon confirmed the results observed in a study *in vivo*.[28] It's believed that nacre contains some signal molecules that are released when placed in living systems. Nacre could attract and activate both bone marrow stem cells and osteoblasts.[35] Related to nacre extracts, water soluble matrix (WSM), or a fraction thereof, was mostly tested. WSM can be extracted by water without decalcification. It was argued that osteoblastic cells from marrow or other bone surface-derived osteoblast stem cells had the inherent direct potential for osteogenesis.[38] Thus, rat bone marrow stomal cells (rBMSCs),[36,38,40,41] human fibroblast cell lines from fetal lung tissue (MRC-5),[38,40,41] a model of immature osteoblasts, human osteosarcoma cell lines (MG63),[41,42] and human bone marrow stomal cells (hBMSCs),[50] were used for evaluating the osteostimulatory effect of WSM in the early stages of cellular differentiation. The MC3T3-E1 pre-osteoblast cell line from mouse calvaria has also been widely used[17,41,42,47,49]: it can differentiate into osteoblasts and mineralize in the presence of β-glycerophosphate and ascorbic acid. WSM extensively enhanced the alkaline phosphatase (ALP) activity, an early marker of cellular osteogenic differentiation, in all cells tested,[36,38–40,42,46,49,50] but only in one study for MC3T3-E1.[17] Nacre also increased the osteocalcin levels in rBMSCs,[41] and Bcl-2 production in mature rat osteoblasts.[39] For the bone differentiation markers, WSM accelerated or increased the expression of *Collagen I, Osteocalcin, Runx2, Osteopontin* genes in MC3T3-E1,[46,47] *ALP* in hBMSC,[50] and *BMP-2* but not *Runx2* in rabbit BMSCs.[46] WSM accelerated the hydroxyapatite deposition in MC3T3-E1, supported by Von Kossa and Alizarin Red stainings,[17,41,46,47] confirmed by SEM observation and Raman spectroscopy.[47] Lately, it was proven that ESM (Ethanol soluble matrix) had a similarly osteoinductive effect in MC3T3-E1 and human osteoarthritis osteoblasts.[51,52]

Identification of active nacre compounds for osteogenesis. HPLC fractions of WSM, for example, p10 and p60, were demonstrated to have an osteostimulatory effect.[38,39,45,49] The nacre proteins were equally proven to play a primary role in controlling the formation of the interfacial structure and biocompatibility with bone as well as the stability of biogenic tissues.[53] It has been argued that the nacre molecules efficient in bone cell differentiation are probably more related to peptides.[17,47] Much effort is presently being made to discover the active compounds responsible for the osteogenic property of nacre.

Biodegradability of nacre. When human osteoclast precursors from blood, mouse osteoclast precursors from spleen and mature rabbit osteoclasts from long bones were cultured with nacre slices, osteoclast precursors differentiated into osteoclasts capable of resorbing nacre. But nacre resorption efficiency was always lower than that of bone and appeared to be a limited process.[44] Even more, WSM suppresses the osteoclast formation.[48] Thus, the cell-mediated absorption of nacre slices *in vitro* was limited.

DISCUSSION AND CONCLUSION

What might reasonably be seen as nacre's contribution to current orthopaedic clinics?

Having witnessed the various designs of nacre in *in vivo* studies, it is easy to envisage some specific uses of nacre in orthopaedic clinics. As blocks, pieces, chips or in the shape of bone devices, nacre can be used (i) to offer mechanical support at load-bearing sites, for example, at defects in major long bones and in the jaw bone and (ii) to fill large bone defects at no-load sites, for example, the cranial defect. Nacre can also be used to promote an intervertebral or interlaminar fusion when an open dissection is taken. Finally, nacre offers a permanent fixation between fractured bones and there is no need to remove it after an implant. Nacre's biocompatibility, osteoinductivity, osteoconductivity and its excellent mechanical properties all benefit from its large-scale availability. As no a powder, nacre can be used as an injectable material to fit certain mini-invasive surgery needs, particularly in spinal surgery. The injectable material may also have a better market for filling semi-closed bone defects caused by cyst or benign tumours than nacre pieces. Being added into other grafting biomaterials, nacre may improve the osteoinductivity and osteoconductivity. In addition, nacre powder may be used as a basal and machinable biomaterial in 3D printing, to make a personalized implant for nonload bearing bone defects.[54] Nacre extracts could be used as surface-coatings for different bone graft substitutes to improve the osteoinductivity,[55] by stimulating osteoblasts and suppressing osteoclasts. To date, it seems that no material is perfect for bone repair. The current strategies for bone graft substitutes are confronted with incredible complexity and difficulty, many of which could be avoided, by using nacre, an outstanding biomaterial. This natural marine biomaterial possesses many advantages, for example, low cost, sophisticated predesign of hierarchical structures and architectures for bio recognition, intrinsic biological

functions, possibility of low-level immunogenicity, low cytotoxicity, and easy safe storage.[56] Because of its remarkable mechanical properties and biological effects in the bone environment, nacre can be designed specifically to correspond to each of the multiple clinical needs for bone graft substitution or bone regeneration. Though further progress in our understanding must still be made, we fully believe that nacre has a revolutionary potential in the field of bone substitutes.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Dr. E. McRae for carefully reading over the manuscript.

REFERENCES

1. Graham SM, Leonidou A, Aslam-Pervez N, Hamza A, Panteliadis P, Heliotis M, Mantalaris A, Tsiridis E. Biological therapy of bone defects: The immunology of bone allo-transplantation. Expert Opin Biol Ther 2010;10:885–901.
2. Laurencin C, Khan Y, El-Amin SF. Bone graft substitutes. Expert Rev Med Dev 2006;3:49–57.
3. Hollister SJ, Murphy WL. Scaffold translation: Barriers between concept and clinic. Tissue Eng Part B Rev 2011;17:459–474.
4. Brydone AS, Meek D, Maclaine S. Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. Proc Inst Mech Eng 2010;224:1329–1343.
5. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. Eur Spine J 2001;10:S96–101.
6. Yuan H, De Bruijn JD, Zhang X, Van Blitterswijk CA, De Groot K. Use of an osteoinductive biomaterial as a bone morphogenetic protein carrier. J Mater Sci Mater Med 2001;12:761–766.
7. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: Recent advances and challenges. Crit Rev Biomed Eng 2012; 40:363–408.
8. O'Keefe RJ, Mao J. Bone tissue engineering and regeneration: From discovery to the clinic—An overview. Tissue Eng B Rev 2011;17:389–392.
9. Lafage-Proust M-H, Prisby R, Roche B, Vico L. Bone vascularization and remodeling. Joint Bone Spine 2010;77:521–524.
10. Bellaaj-Zouari A, Dkhili S, Gharsalli R, Derbali A, Aloui-Bejaoui N. Shell morphology and relative growth variability of the invasive pearl oyster Pinctada radiata in coastal Tunisia. J Mar Biol Assoc UK 2012;92:553–563.
11. Nudelman F, Shimoni E, Klein E, Rousseau M, Bourrat X, Lopez E, Addadi L, Weiner S. Forming nacreous layer of the shells of the bivalves *Atrina rigida* and *Pinctada margaritifera*: An environmental- and cryo-scanning electron microscopy study. J Struct Biol 2008;162:290–300.
12. Watabe N. Studies on shell formation: XI. Crystal—Matrix relationships in the inner layers of mollusk shells. J Ultrastruct Res 1965;12:351–370.
13. Rousseau M, Lopez E, Stempflé P, Brendlé M, Franke L, Guette A, Naslain R, Bourrat X. Multiscale structure of sheet nacre. Biomaterials 2005;26:6254–6262.
14. Currey JD, Zioupos P, Peter D, Casinos A. Mechanical properties of nacre and highly mineralized bone. Proc R Soc B Biol Sci 2001; 268:107–111.
15. Song F, Soh AK, Bai YL. Structural and mechanical properties of the organic matrix layers of nacre. Biomaterials 2003;24:3623–3631.
16. Marin F, Le Roy N, Marie B. The formation and mineralization of mollusk shell. Front Biosci 2012;4:1099–1125.
17. Rousseau M. The water-soluble matrix fraction from the nacre of Pinctada maxima produces earlier mineralization of MC3T3-E1 mouse pre-osteoblasts. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 2003;135:1–7.
18. Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. Nature 2003;423:332–336.
19. Zioupos P, Currey JD, Hamer AJ. The role of collagen in the declining mechanical properties of aging human cortical bone. J Biomed Mater Res 1999;45:108–116.
20. Bobbio A. The first endosseous alloplastic implant in the history of man. Bull Hist Dent 1972;20:1–6.
21. Camprasse S, Camprasse G, Pouzol M, Lopez E. Artificial dental root made of natural calcium carbonate (Bioracine). Clin Mater 1990;5:235–250.
22. Lamghari M, Huet H, Laurent A, Berland S, Lopez E. A model for evaluating injectable bone replacements in the vertebrae of sheep: Radiological and histological study. Biomaterials 1999;20: 2107–2114.
23. Atlan G, Delattre O, Berland S, LeFaou A, Nabias G, Cot D, Lopez E. Interface between bone and nacre implants in sheep. Biomaterials 1999;20:1017–1022.
24. Rousseau M, Delattre O, Gillet P, Lopez E. Subchondral nacre implant in the articular zone of the sheep's knee: A pilot study. Biomed Mater Eng 2012;22:227–234.
25. Pascaretti-Grizon F, Libouban H, Camprasse G, Camprasse S, Mallet R, Chappard D. The interface between nacre and bone after implantation in the sheep: A nanotomographic and Raman study: Bone–nacre interface. J Raman Spectrosc 2014;45:558–564.
26. Lopez E, Vidal B, Berland S, Camprasse S, Camprasse G, Silve C. Demonstration of the capacity of nacre to induce bone formation by human osteoblasts maintained in vitro. Tissue Cell 1992;24: 667–679.
27. Camprasse G, Camprasse S, Gill GA. Substitution of the dental root by aquatic invertebrate skeletons in animals and man. C R Acad Sci III Sci Vie 1988;307:485–491.
28. Atlan G, Balmain N, Berland S, Vidal B, Lopez E. Reconstruction of human maxillary defects with nacre powder: Histological evidence for bone regeneration. C R Acad Sci III Sci Vie 1997;320: 253–258.
29. Liao H, Brandsten C, Lundmark C, Wurtz T, Li J. Responses of bone to titania–hydroxyapatite composite and nacreous implants: A preliminary comparison by in situ hybridization. J Mater Sci Mater Med 1997;8:823–827.
30. Liao H, Mutvei H, Sjöström M, Hammarström L, Li J. Tissue responses to natural aragonite (Margaritifera shell) implants in vivo. Biomaterials 2000;21:457–468.
31. Lamghari M, Berland S, Laurent A, Huet H, Lopez E. Bone reactions to nacre injected percutaneously into the vertebrae of sheep. Biomaterials 2001;22:555–562.
32. Lamghari M, Antonietti P, Berland S, Laurent A, Lopez E. Arthrodesis of lumbar spine transverse processes using nacre in rabbit. J Bone Miner Res 2001;16:2232–2237.
33. Berland S, Delattre O, Borzeix S, Catonné Y, Lopez E. Nacre/bone interface changes in durable nacre endosseous implants in sheep. Biomaterials 2005;26:2767–2773.
34. Asvanund P, Chunhabundit P. Alveolar bone regeneration by implantation of nacre and B-tricalcium phosphate in guinea pig. Implant Dent 2012;21:248–253.
35. Westbroek P, Marin F. A marriage of bone and nacre. Nature 1998;392:861–862.
36. Lamghari M, Almeida MJ, Berland S, Huet H, Laurent A, Milet C, Lopez E. Stimulation of bone marrow cells and bone formation by nacre: in vivo and in vitro studies. Bone 1999;25:91S–94S.
37. Silve C, Lopez E, Vidal B, Smith DC, Camprasse S, Camprasse G, Couly G. Nacre initiates biomineralization by human osteoblasts maintained in vitro. Calcif Tissue Int 1992;51:363–369.
38. Almeida MJ, Pereira L, Milet C, Haigle J, Barbosa M, Lopez E. Comparative effects of nacre water-soluble matrix and dexamethasone on the alkaline phosphatase activity of MRC-5 fibroblasts. J Biomed Mater Res 2001;57:306–312.
39. Moutahir-Belqasmi F, Balmain N, Lieberrher M, Borzeix S, Berland S, Barthelemy M, Peduzzi J, Milet C, Lopez E. Effect of water soluble extract of nacre (*Pinctada maxima*) on alkaline phosphatase activity and Bcl-2 expression in primary cultured osteoblasts from neonatal rat calvaria. J Mater Sci Mater Med 2001;12:1–6.
40. Mouriès LP, Almeida M-J, Milet C, Berland S, Lopez E. Bioactivity of nacre water-soluble organic matrix from the bivalve mollusk Pinctada maxima in three mammalian cell types: Fibroblasts,

bone marrow stromal cells and osteoblasts. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 2002;132:217–229.
41. Lopez E, Milet C, Lamghari M, Pereira Mouries L, Borzeix S, Berland S. The Dualism of Nacre. Key Eng Mater 2003;254–256: 733–736.
42. Milet C, Berland S, Lamghari M, Mouries L, Jolly C, Borzeix S, Doumenc D, Lopez É. Conservation of signal molecules involved in biomineralisation control in calcifying matrices of bone and shell. Comptes Rendus Palevol 2004;3:493–501.
43. Zhang C, Li S, Ma Z, Xie L, Zhang R. A novel matrix Protein p10 from the Nacre of Pearl Oyster (*Pinctada fucata*) and its effects on both $CaCO_3$ crystal formation and mineralogenic cells. Mar Biotechnol 2006;8:624–633.
44. Duplat D, Chabadel A, Gallet M, Berland S, Bédouet L, Rousseau M, Kamel S, Milet C, Jurdic P, Brazier M, Lopez E. The in vitro osteoclastic degradation of nacre. Biomaterials 2007;28:2155–2162.
45. Lao Y, Zhang X, Zhou J, Su W, Chen R, Wang Y, Zhou W, Xu Z-F. Characterization and in vitro mineralization function of a soluble protein complex P60 from the nacre of *Pinctada fucata*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 2007;148:201–208.
46. Wang J, Chen J, Yang C. Effects of soluble matrix of nacre on bone morphogenetic protein-2 and Cbfa1 gene expressions in rabbit marrow mesenchymal stem cells. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao 2007;27:1838–1840.
47. Rousseau M, Boulzaguet H, Biagianti J, Duplat D, Milet C, Lopez E, Bédouet L. Low molecular weight molecules of oyster nacre induce mineralization of the MC3T3-E1 cells. J Biomed Mater Res A 2008;85A:487–497.
48. Kim H, Lee K, Ko C-Y, Kim H-S, Shin H-I, Kim T, Lee SH, Jeong D. The role of nacreous factors in preventing osteoporotic bone loss through both osteoblast activation and osteoclast inactivation. Biomaterials 2012;33:7489–7496.
49. Chaturvedi R, Singha PK, Dey S. Water soluble bioactives of nacre mediate antioxidant activity and osteoblast differentiation. PLoS One 2013;8:e84584.
50. Green DW, Kwon H-J, Jung H-S. Osteogenic potency of nacre on human mesenchymal stem cells. Mol Cells 2015;38:267–272.
51. Zhang G, Willemin AS, Brion A, Piet MH, Moby V, Bianchi A, Mainard D, Galois L, Gillet P, Rousseau M. A new method for the separation and purification of the osteogenic compounds of nacre ethanol soluble matrix. J Struct Biol 2016. [Epub ahead of print].
52. Brion A, Zhang G, Dossot M, Moby V, Dumas D, Hupont S, Piet MH, Bianchi A, Mainard D, Galois L, Gillet P, Rousseau M. Nacre extract restores the mineralization capacity of subchondral osteoarthritis osteoblasts. J Struct Biol 2015;192:500–509.
53. Kim Y-W, Kim J-J, Kim YH, Rho J-Y. Effects of organic matrix proteins on the interfacial structure at the bone–biocompatible nacre interface in vitro. Biomaterials 2002;23:2089–2096.
54. Silva DN, Gerhardt de Oliveira M, Meurer E, Meurer MI, Lopes da Silva JV, Santa-Bárbara A. Dimensional error in selective laser sintering and 3D-printing of models for craniomaxillary anatomy reconstruction. J Cranio-Maxillofac Surg 2008;36:443–449.
55. Curran D, Maravic M, Kiefer P, Tochon V, Fardellone P. Epidemiology of osteoporosis-related fractures in France: A literature review. Joint Bone Spine 2010;77:546–551.
56. Green D, Lai W-F, Jung H-S. Evolving marine biomimetics for regenerative dentistry. Drugs 2014;12:2877–2912.

Objectifs de travail

Au vu des effets de la nacre sur les os, il est intéressant de se demander quels sont les éléments de la nacre qui ont ce pouvoir ostéogénique, autrement dit, l'identification des composés ostéogéniques de la nacre. À partir de l'ESM (éthanol soluble matrice), dont l'extraction est effectuée avec la poudre de nacre de la coquille d'huître perlière *Pinctada margaritifera*, nous avons essayé plusieurs méthodes ou approches pour séparer et purifier les composés de la nacre, par exemple, le gel d'exclusion CLHP, C8 CLHP, C18 CLHP, l'échange d'anions CLHP, la dialyse membranaire et l'extraction organique avec différents solvants. Malheureusement, les résultats n'ont pas été concluants. Finalement, 2 approches se sont révélées faisables, et ont permis d'avancer sur l'identification des composés ostéogéniques de la nacre: 1) Approche utilisant 2 modèles cellulaires de minéralisation; 2) Approche utilisant les gènes rapporteurs.

Par l'approche utilisant 2 modèles cellulaires de minéralisation, nous avons voulu tester 2 types cellulaires, les ostéoblastes arthrosiques (OA) sous-chondraux qui présentent un défaut de minéralisation, et la lignée cellulaire pré-ostéoblastique MC3T3 qui a la capacité de minéralisation et a déjà démontré un effet ostéogénique sous l'induction de l'extrait de nacre. Si l'ESM peut restaurer la capacité de minéralisation des ostéoblastes OA, le couplage des 2 types de cellules va permettre de tester et valider l'effet ostéogénique des fractions ou des composés d'ESM. En même temps, l'ESM sera confirmé comme une source de composés ostéogéniques.

L'approche utilisant les gènes rapporteurs aide à développer un outil de criblage des composés ostéogéniques beaucoup plus efficace que le couplage des ostéoblastes OA et MC3T3. On a tout d'abord créé une lignée contenant le gène de rapport, ensuite, la lignée a été testée avec les fractions d'ESM pour cribler les composés ostéogéniques. Les composés démontrés ostéogéniques ont été identifiés par LC-MS.

Chapitre 1. Approche utilisant 2 modèles cellulaires

1.1 Validation de l'effet pro-ostéogénique d' ESM (éthanol soluble molécules)

Publication N°2
Manuscrit résumé en français

L'extrait de nacre restaure la capacité de minéralisation des ostéoblastes de l'os sous-chondrale de patients arthrosiques

Brion A.§, Zhang G.§, Dossot M., Moby V., Dumas D., Hupont S., Piet M.H., Bianchi A., Mainard D., Galois L., Gillet P., Rousseau M.

§ Ces auteurs ont également contribué à cette étude.

L'arthrose (OA) est la cause la plus fréquente de la douleur chronique commune et implique l'ensemble des articulations. Les ostéoblastes arthrosiques sous-chondraux présentent un défaut de minéralisation. On sait que l'extrait de nacre contient des molécules ostéogéniques qui ont démontré leurs activités notamment sur la lignée cellulaire pré-ostéoblastique MC3T3, qui a la capacité de minéraliser sous une induction ostéogénique. Dans ce contexte, nous avons testé pour la première fois l'effet de l'extrait de nacre sur la capacité de minéralisation des ostéoblastes de patients arthrosiques (OA).

Dans ce but, les molécules ont été extraites de la nacre (ESM, Éthanol Soluble Matrix). L'extraction est effectuée à partir de la poudre de nacre de la coquille d'huître perlière *Pinctada margaritifera* en suivant une procédure de non-décalcification. La poudre de nacre est obtenue par ponçage de la coquille puis la nacre est concassée et ensuite réduite en poudre. L'ESM est ensuite testé sur les ostéoblastes de l'os sous-chondral de patients OA subissant un remplacement total du genou et sur des cellules MC3T3. Deux concentrations dux concen0 ationllules MC3T3.mplacement total ous avons choisi d'étudier la minéralisation par la coloration au rouge d'alizarine (traitement après 7, 14 et 21jours) et par l'étude de la structure et de la composition de la matrice extracellulaire (MEC). De façon complémentaire, la structure de la matrice extracellulaire sécrétée pendant la phase de minéralisation a été étudiée en utilisant la génération de second harmonique (SHG) et la spectrométrie Raman. De plus, nous avons observé les modifications de l'expression des marqueurs osseux tels que le collagène de type I, l'ostéocalcine, l'ostéopontine et le Runx2 en présence d'ESM. Tous les tests ont été répétés 3 fois.

L'extrait de nacre a été capable d'induire la présence précoce (après 7 jours) de calcium précipité dans les cellules MC3T3 et même dans les ostéoblastes OA. La spectroscopie Raman et la microscopie électronique ont montré la présence de

nanoparticules d'une forme cristalline précoce de phosphate de calcium dans la MEC des ostéoblastes OA et l'hydroxyapatite dans la MEC de MC3T3. Le signal des fibres de collagène SHG était présent dans les deux types cellulaires, mais plus faible pour les ostéoblastes OA. L'expression de marqueurs osseux tels que Runx2, Osteopontine et Ostéocalcine a augmenté au cours du processus de minéralisation. Nos résultats indiquent que l'ESM est susceptible de contenir des facteurs diffusibles qui sont solubles dans l'éthanol et peuvent stimuler MC3T3-E1 et les ostéoblastes OA *in vitro*. Ces données suggèrent que l'action stimulatrice de l'ESM sur la formation osseuse se passe en aidant le processus de formation de la matrice ostéoblastique et le dépôt minéral.

En conclusion, l'extrait de nacre a été capable de restaurer rapidement la capacité de minéralisation des ostéoblastes de patients arthrosiques, confirmant ainsi son potentiel (notamment ESM) comme une source de composés ostéogéniques. L'effet d'ESM dans les ostéoblastes arthrosiques est bien corrélé avec celui dans MC3T3. De plus, l'ESM montre un effet dose-dépendant favorisant l'ostéogenèse. Par la coloration au rouge d'alizarine, le couplage des ostéoblastes OA et de MC3T3 sera un outil utile pour tester et valider la capacité ostéogénique des molécules de la nacre.

Journal of Structural Biology 192 (2015) 500–509

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Structural Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yjsbi

Nacre extract restores the mineralization capacity of subchondral osteoarthritis osteoblasts

A. Brion [a,1], G. Zhang [a,1], M. Dossot [b], V. Moby [a], D. Dumas [c], S. Hupont [c], M.H. Piet [a], A. Bianchi [a], D. Mainard [a], L. Galois [a], P. Gillet [a], M. Rousseau [a,*]

[a] IMoPA, UMR 7365 CNRS Université de Lorraine, 9 av. de la forêt de Haye, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France
[b] LCPME, UMR 7564 CNRS Université de Lorraine, 405 rue de Vandoeuvre, 54601 Villers-lès-Nancy, France
[c] PTIBC IBISA – FR 3209 UMR 7365 CNRS Université de Lorraine, 9 av. de la Foret de Haye, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 30 June 2015
Received in revised form 15 October 2015
Accepted 16 October 2015
Available online 20 October 2015

Keywords:
Bone
Mother-of-pearl
Biomineralization

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is the most common cause of joint chronic pain and involves the entire joints. Subchondral osteoarthritic osteoblasts present a mineralization defect and, to date, only a few molecules (Vitamin D3 and Bone Morphogenetic Protein2) could improve the mineralization potential of this cell type. In this context, we have tested for the first time the effect of nacre extract on the mineralization capacity of osteoblasts from OA patients. Nacre extract is known to contain osteogenic molecules which have demonstrated their activities notably on the MC3T3 pre-osteoblastic cell line.

For this goal, molecules were extracted from nacre (ESM, Ethanol Soluble Matrix) and tested on osteoblasts of the subchondral bone from OA patients undergoing total knee replacement and on MC3T3 cells for comparison. We chose to investigate the mineralization with Alizarin Red staining and with the study of extracellular matrix (ECM) structure and composition. In a complementary way the structure of the ECM secreted during the mineralization phase was investigated using second harmonic generation (SHG).

Nacre extract was able to induce the early presence (after 7 days) of precipitated calcium in cells. Raman spectroscopy and electron microscopy showed the presence of nanograins of an early crystalline form of calcium phosphate in OA osteoblasts ECM and hydroxyapatite in MC3T3 ECM. SHG collagen fibers signal was present in both cell types but lower for OA osteoblasts.

In conclusion, nacre extract was able to rapidly restore the mineralization capacity of osteoarthritis osteoblasts, therefore confirming the potential of nacre as a source of osteogenic compounds.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Osteoarthritis (OA), the most common form of joint disease, affects mainly the hips, knees, hands and feet, leading to severe disability and loss of quality of life, particularly in the elderly population. OA is characterized by cartilage degradation and loss, synovial inflammation, osteophytes formation, and bone alteration with subchondral bone sclerosis (Hilal et al., 1998; Couchourel et al., 2009; Ferrándiz et al., 2014). Moreover, it has been established that osteoarthritic osteoblasts present a mineralization defect (Couchourel et al., 2009). OA affects millions of people worldwide (Pereira et al., 2015). The WHO Scientific Group on Rheumatic Diseases has estimated that 10% of the population, aged 60 years and older, has significant clinical problems that can be attributed to OA (Woolf and Pfleger, 2003). For many years, pharmaceutical therapies for OA were focused on cartilage. However, it has been found that bone changes such as increased bone volume fraction and decreased bone matrix mineralization may play an important role in the initiation and pathogenesis of OA as well (Cox et al., 2012).

Conventional treatments of OA patients have demonstrated only modest clinical benefits and are mostly limited to the use of simple analgesics alleviating the symptoms (pain, inflammation...) rather than modifying the disease process (Gallagher et al., 2014). To date, only a few molecules have been studied such as Vitamin D3, Bone Morphogenetic Protein2 and Cobalt Protoporphyrin which are thought to improve the mineralization potential of OA osteoblasts (Couchourel et al., 2009; Clérigues et al., 2012; Corrado et al., 2013). The progressive understanding of the physiopathology of OA, the perception that the process is not purely mechanical and/or due to aging and the clarification of the

* Corresponding author.
E-mail addresses: marthe.rousseau@univ-lorraine.fr, rousseam@gmx.net (M. Rousseau).
[1] These authors contributed equally to this study.

http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2015.10.012
1047-8477/© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

involved mineralization defect and inflammation has led to the search for some new experimental approaches.

Nacre, or mother of pearl, is a calcified structure widely found in the internal layer of many mollusc shells. The micro-architecture of nacre has been classically illustrated as a "brick-and-mortar" arrangement consisting of calcium carbonate crystals organized in multiple layers of thin tablets of aragonite (97%) and surrounded by an organic matrix (3%) mostly composed of proteins and polysaccharides (Bevelander and Nakahara, 1969; Schäffer et al., 1997; Weiss et al., 2000; Luz and Mano, 2009). Apart from decorative usage, the outstanding properties (worldwide availability, low cost, mechanical resistance, osteogenic feature...) of this biological material have gained widespread interest in bone regeneration. Indeed, nacre was able to increase the cell osteogenic activity without any apparent toxicity (Lopez et al., 1992; Green et al., 2015). In addition, the existence of some active molecules within the nacre matrix and their effects on the *in vitro* and *in vivo* activation of osteoblasts were previously reviewed by Westbroek and Marin (1998). This activity is thought to be due to the similarity between the growth proteins present in nacre and those in bone (Chen et al., 2013). Based on these findings, organic nacre extract appears to be an interesting and potentially successful candidate in the case of pathologies affecting mineralization such as OA.

For two decades, nacre has emerged as an osteogenic material (Lamghari et al., 2001; Rousseau et al., 2008). The major advantage of this natural biomaterial is its properties of biocompatibility, biodegradability, tissue remodeling, cell adhesion, proliferation and differentiation, and also less toxicity (Chaturvedi et al., 2013). Therefore, we tried to evaluate, *in vitro*, the impact of nacreous molecules, on the mineralization capacity of human osteoblasts from OA patients. For many years, the MC3T3-E1 cell line, a pre-osteoblastic lineage deriving from newborn mouse calvarias (Wang et al., 2011), has been widely used in the literature to mimic osteoblast behavior in the context of differentiation studies. In this study we used the MC3T3-E1 cell line as a positive control after the addition of nacre extract. We investigated the possibility that nacre extract is able to restore the mineralization capacity of OA osteoblasts.

2. Material and methods

2.1. Nacre extract

Nacre powder (particle size 50–100 μm) was isolated from *Pinctada margaritifera* oyster shell. Nacre part was isolated from shells of pearl oysters from French Polynesia as a by-product of the pearl culture industry. In this case contrary to our previous work (Rousseau et al., 2008), we extracted the molecules directly with ethanol and not with water. Nacre powder (250 g) was stirred with 500 ml of ethanol for 24 h at 40 °C at 100 rpm. The suspension was then centrifuged (20 min at 3000 rpm) and filtered (0.2 μm) before being evaporated in order to obtain the nacre extract known as "Ethanol Soluble Matrix" (ESM). This extract was then solubilized in culture medium.

2.2. Cell culture

2.2.1. Osteoblasts

Human primary osteoblastic cells were isolated as previously described (Hilal et al., 1998; Lajeunesse et al., 1991, 1996). Briefly, broken subchondral bone from OA patients was minced into small pieces (2 mm^2). These pieces were then digested with collagenase B (2 mg/ml, Roche) (4 h at 37 °C). Osteoblastic cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM/F12, Gibco) supplemented with 10% decomplemented Fetal Bovine Serum (FBS, Dutscher) and 1% penicillin/streptomycin antibiotics (100 U/ml/100 μg/ml, Gibco) and maintained in a humidified atmosphere of 5% CO_2 at 37 °C with a medium change twice a week until use at the 1st passage (P1).

2.2.2. MC3T3-E1 cell line

MC3T3-E1 cells, a clonal preosteoblastic cell line originated from newborn mouse calvarias, were provided from the European Collection of Cell Cultures (Sigma Aldrich, 99072810). Cells were cultured in alpha-Minimal Eagle Medium (αMEM, Gibco) supplemented with 10% FBS and penicillin/streptomycin antibiotics (1%, Gibco) and maintained in a humidified atmosphere of 5% CO_2 at 37 °C with a medium change every two or three days until their use, as described in the literature (Takeuchi et al., 1990; Luppen et al., 2003).

2.2.3. Tests

Confluent osteoblasts and MC3T3-E1 cells were trypsinized and plated in 48 well plates at a density of 14,000 cell/cm^2 and 25,000 cell/cm^2 respectively. Osteoblasts and MC3T3-E1 cells were then treated for 21 days with nacre extract, at two concentrations 100 and 200 μg/ml and maintained in a complete 10% FBS DMEM/F12 and 10% FBS αMEM medium respectively. These concentrations were chosen after the results obtained in previous studies (Rousseau et al., 2003, 2008) and in a manner that it does not present any toxic effect. Both culture media were supplemented with ascorbic acid (50 μg/ml, Sigma) and β-glycerophosphate (10 mM, Sigma). Untreated and dexamethasone treated cells (100 nM, Sigma), from both types, were used as controls. The treatment was repeated every two days as previously described (Rousseau et al., 2003, 2008).

2.3. Alizarin Red staining

In order to visualize cell mineralization capacity, Alizarin Red staining was performed according to Stanford et al. (1995). After 7, 14 and 21 days, cells were fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma), stained with Alizarin Red (1% w/v, Sigma) for 5 min, then washed with distilled water and finally air-dried at room temperature. The stained cells were imaged with a LEICA microscope (M80, obj 1×). To quantify the degree of staining, cultures were destained with acetic acid (800 μl, 10% v/v) for 30 min under stirring at room temperature, as previously described (Gregory et al., 2004). The monolayer was scraped off, heated at 85 °C for 10 min then cooled with ice for 5 min and centrifuged at 20,000*g* for 15 min. The resultant supernatant (500 μl) was finally removed and pH adjusted (pH 4.1–4.5) with hydroxide ammonium (200 μl, 10% v/v). Alizarin Red Staining concentrations, in each sample, were determined by absorbance measurement at 405 nm.

2.4. Real-time quantitative polymerase chain reaction

Total RNA from treated and untreated osteoblasts and MC3T3-E1 cells was isolated using the RNeasy Kit (Qiagen®). The first strand cDNA synthesis reaction was performed using 500 ng total RNA with a cDNA synthesis mix containing 200 U of MMLV Reverse Transcriptase (Gibco), 1× RT buffer, 5 mM of dNTPs, 200 mM of DTT and 3 μg hexaprimers (100 pmol/μl). qPCR was carried out using SYBR Green qPCR Master Mix (Bio-Rad®) and home-designed primers for GAPDH and the ribosomal protein S29 (RP29), bone markers such as Osteocalcin, Osteopontin and Runx2 and bone matrix markers such as Collagen type I (Col1) (Eurogentec) with the use of the StepOne™ system (Applied Biosystems) and results were treated with the StepOne™ software (Table 1). These primers were specifically chosen and are presented in Table 1. Cycling parameters were 15 min at 95 °C (initial denaturation);

Table 1
Mouse and human gene PCR primer sequences (5′–3′).

	Mouse gene		Human gene	
	5′-Forward-3′-primer	5′-Reverse-3′-primer	5′-Forward-3′-primer	5′-Reverse-3′-primer
GAPDH	GTCGGTGTGAACGGATTTG	TCAATGAAGGGGTCGTTGAT	–	
RP29	–		AAGATGGGTCACCAGCAGCTCTACTG	AGACGCGGCAAGAGCGAGAA
Osteocalcin	CCGGGAGCAGTGTGAGCTTA	GTGCAGAGTCCAGCAAAGGT	GTGCAGAGTCCAGCAAAGGT	TCAGCCAACTCGTCACAGTC
Osteopontin	TTCACAGCCACAAGGACAAG	GCCGAGGTGATAGTGTGGTT	GCCGAGGTGATAGTGTGGTT	ATTCAACTCCTCGCTTTCCA
Runx2	AAATGCCTCCGCTGTTATGAA	GCTGTTATGAAAAACCAAGT	GCTGTTATGAAAAACCAAGT	GGGAGGATTTGTGAAGAC
Col1	GCAAAGGCAACAGTCGCT	AGGTGCTGATGGCTCTCCT	AGGTGCTGATGGCTCTCCT	GGACCACTTTCACCCTTGT

35 cycles of 10 s at 95 °C (denaturation), 20 s at a specific temperature for each primer (hybridization) and 15 s at 72 °C (elongation). Gene expression was determined in three separate experiments and normalized using RP29 and GAPDH then compared against a control gene. Analyses and fold differences were determined using the comparative C_T method. Fold change was calculated from the $\Delta\Delta C_T$ values with the formula $2^{-\Delta\Delta CT}$ and data were relative to control values (at day 1) (Livak and Schmittgen, 2001).

2.5. Scanning electron microscopy (SEM)

Treated and untreated cells were fixed for 30 min with 70% ethanol then progressively dehydrated in successive baths of ethanol–water 80% (3×), 90% (3×) and 100% (3×) for one hour each. For scanning electron microscopy, dehydrated cells were observed as follows: SE mode; 5 kV; 250 Pa. Yttrium aluminum garnet (YAG) scintillator for backscattered electrons (BSE) is a particular detection mode of the SEM which permitted the use of low accelerating voltages of <5 kV on biological samples which substantially reduces radiation damage to the specimen.

2.6. Raman spectroscopy

In order to confirm the presence of calcium phosphate (hydroxyapatite and other possible mineral phases), Raman spectroscopy analyses and Raman mapping experiments were performed. The spectra were obtained using a Jobin–Yvon T64000 triple-monochromator set-up (Horiba-Jobin Yvon, France, T64000 model) equipped with a confocal microscope, a N_2-cooled CCD detector, a 1800 grooves/mm grating, a frequency-doubled Nd:YAG laser with a wavelength of 532.8 nm. The spectral resolution was 1 cm^{-1}, the laser irradiance was kept below 5 kW/cm^2 to avoid heating of the sample. The back-scattered configuration was used with a 50× microscope objective (0.55 of numerical aperture). Raman mapping was realized on a Witec alpha 300 S set-up (Witec, Germany, alpha 300 model) equipped with a cooled CCD detector, a frequency-doubled Nd:YAG laser with a wavelength of 532.8 nm and a 600 grooves/mm grating. The spectral resolution was 4 cm^{-1} and the reproducibility better than 0.5 cm^{-1}. The back-scattered configuration was used with a 100× long working distance microscope objective (0.90 of numerical aperture). The spatial resolution reached the diffraction limit and was estimated to be around 350 nm.

2.7. Second harmonic generation in Macroscopy (SHG)

For the two photon excitation system, a femtosecond oscillator (Mira 900F from 600 to 1100 nm, Coherent), pumped with a solid laser (Verdi 8 W, Coherent) was used to generate some ultrashort infrared pulses (120 fs, 76 MHz) at λ = 800 nm. An EOM (Electro Optical Modulator LM 0202 P 5 W – n°21181, EO-Crystal KD*P 3 × 3 mm^2, 5 W, 660–1050 nm, transmission 90.1%, ratio 1/254, gain 57%) enabled controlling the excitation power (2.5 nJ per pulse at 76 MHz in a 40× objective NA.0.8).

With a scan head specially dedicated to NLO, CFS-DM6000 (Leica Microsystems Manheim, Germany) this multiphoton source was injected into a macro-zoom (MacroFluo™ Z6 APO A, Leica Microsystems Manheim, Germany) to realize the first prototype of SHG-Macroscope (Dumas and Hupont, 2013).

The second harmonic signal was collected in the reflected light channel (Non Descanned PMT hybrid detector, gain 500) through a 5× dry objective (NA 0.5), at half the excitation wavelength (λ/2 = 400 nm). All image acquisition procedures were performed at an excitation wavelength of 800 nm, with the pinhole fully opened (8.41 AU); a band-pass filter enabled selecting the detection spectral range (400/25 nm center wavelength/bandwidth), and rejecting the infrared excitation beam (BM690). The image control parameters were defined for trabecular bone (depth 102.75 μm in 5 plans). For the cells, images were obtained for 4 accumulations during 800 s (MC3T3 and OB OA, first raw) or 10 accumulations (OB OA second raw) at the surface and stored as z-stack image sequences (step size of 60 μm along the *z*-axis). The acquired image size with a macrozoom of 275.5-fold was 512 × 512 pixels for a scan field of 461.31 μm × 461.31 μm (1.109 μm/pixel), 8 bits in depth, at 100 Hz for each experiment. Simple image processing, i.e. three-dimensional (3D), rendering was performed using the LAS AF ver. 2.7 software package (Leica).

2.8. Statistical analysis

Data are presented as mean ± SEM (standard error of the mean) for each condition. Each experiment was repeated independently three times (n = 3). One factor-analysis of variance (ANOVA) was performed to evaluate the effect of each variable on two or more independent groups. For comparison between two group means, in which the response was affected by a single variable, an impaired *t*-test was performed. Any differences with a probability value less than 0.05 was considered statistically significant. All analyses were conducted using SPSS version 14.0 software (SPSS, Chicago, IL).

3. Results

3.1. ESM increases mineralization capacity of OA osteoblast and MC3T3-E1 lineage

Alizarin Red staining was applied in order to examine the mineralization capacity of OA osteoblasts and MC3T3-E1, in the presence of ESM, and to visualize bone nodule formation. After 14 days of treatment with ESM 100 μg/ml, Alizarin Red staining demonstrated the presence of precipitated calcium in osteoblasts and MC3T3-E1 cells (Fig. 1A and B). Moreover, increasing the concentration of ESM treatment (200 μg/ml) induced the formation of precipitated calcium after only 7 days (Fig. 1A and B). In osteoblasts and MC3T3-E1 cells, Alizarin Red assay showed a significant difference between controls (dexamethasone treated and

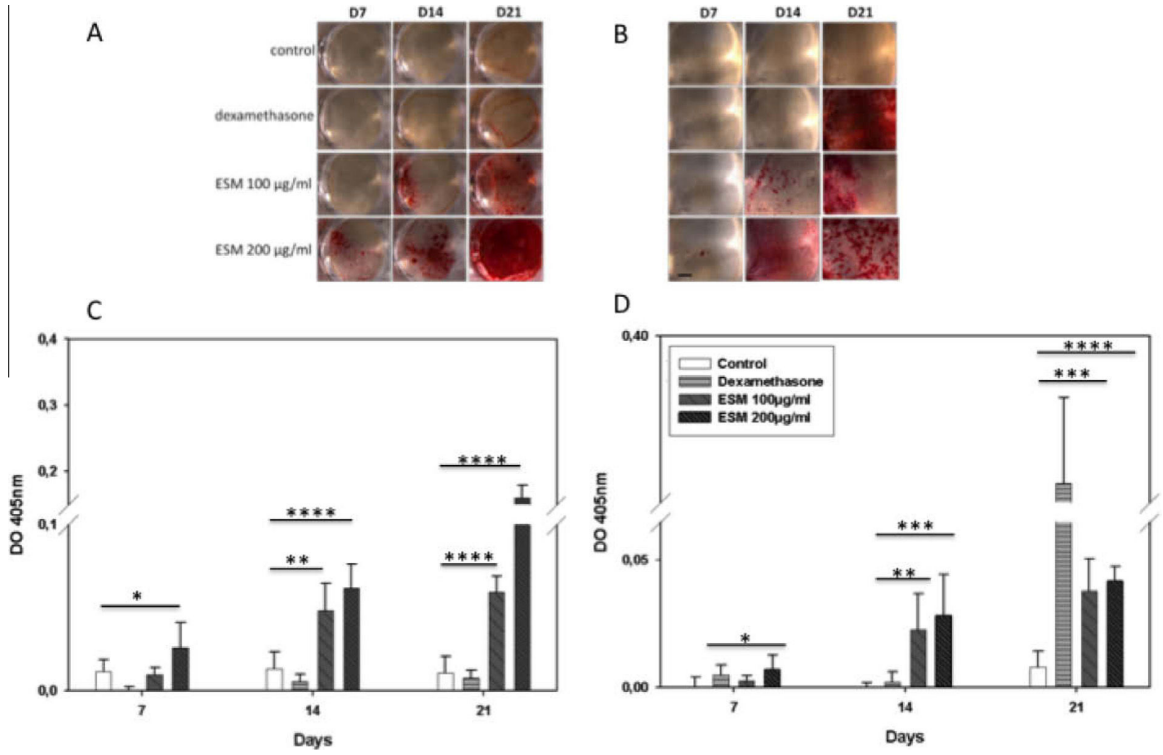


Fig. 1. Nacre extract (ESM) increases mineralization of human OA osteoblast and MC3T3-E1 cell line. Osteoblasts (A) and MC3T3-E1 (B) were treated for 7, 14 and 21 days with ESM (100 µg/ml or 200 µg/ml) or dexamethasone to induce mineralization or not treated (control), fixed, stained by Alizarin Red and observed by optical microscopy. Scale bar 2 mm. Alizarin Red assay of osteoblasts (C) and MC3T3-E1 (D) measured at 405 nm. *t*-test: $^{*}p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$; $^{****}p < 0.0001$.

untreated cells) and ESM (200 µg/ml) treated cells at D7, and for both concentrations at D14 (Fig. 1C and D). Related to dexamethasone treatment, precipitated calcium was only observed after 21 days of treatment in MC3T3-E1 culture, with a significant difference with the other conditions (Fig. 1B and D).

3.2. Scanning electron microscopy characterized nanograins

After 21 days of ESM treatment, SEM observations revealed the formation of aggregated structures, sized approximately 1–2 µm in OA osteoblasts and nanograins in MC3T3-E1 cultures (Fig. 2A and B, black arrows). We chose to observe the cells treated with ESM 200 µg/ml, which present the maximal staining with Alizarin Red (Fig. 1). The use of the specific detector YAG BSE (Fig. 2A) revealed the presence of microgranules inside the extracellular matrix of OA osteoblasts. EDS (Energy Dispersive Spectrometry) allowed us to confirm the presence of P and Ca in this matrix (data not shown). We chose to pursue the investigations by Raman spectroscopy to specify the mineral form of the newly formed nanograins.

3.3. RAMAN spectra characterized nanograins

Raman spectroscopy was used to demonstrate the presence of calcium phosphate (hydroxyapatite). The presence of PO_4^{3-} crystalline hydroxyapatite is usually detected with a sharp peak at 960–965 cm^{-1} while a disordered hydroxyapatite phase or an apatitic phosphate form are found in the range of 945–950 cm^{-1} or 956–957 cm^{-1} respectively (Tarnowski et al., 2002; Ghita et al., 2014). In our case, the bone control, composed of pure hydroxyapatite, gave us a typical spectrum of crystalline hydroxyapatite with a peak at 961 cm^{-1} (Fig. 3, c spectrum). The peak is broader than artificially synthesized hydroxyapatite but very common for bone material. The Raman analysis revealed the presence of hydroxyapatite (Fig. 3, b spectrum) in MC3T3-E1 treated cells (crystalline hydroxyapatite specific peak, 961 cm^{-1}). Our analysis with the T64000 spectrometer on the OA osteoblast samples also showed a small and broad peak centered around 961 cm^{-1} (Fig. 3b). However, one should note that for the MC3T3-E1 treated sample, the obtention of a Raman spectrum like that reported in Fig. 3b was often the case, whereas the detection of hydroxyapatite for the OA sample was very rare. As we suspected some spatial dispersion of the phosphate phases in the matrix for these samples, we thus chose to use another set-up (Witec α-300S confocal microscope) to obtain Raman maps of the spatial distribution of phosphate phases in the extracellular matrix of OA osteoblasts.

Fig. 4 reports two typical Raman spectra of areas in which phosphate species can be detected for the MC3T3-E1 and OA cells treated by ESM at 200 µg/ml. The intensity of the spectrum for OA cells has been multiplied by a factor 2 to increase the visibility of the phosphate peak at 948 cm^{-1}. The inset of Fig. 4 focuses on the phosphate spectral region between 800 and 1000 cm^{-1}. The complete spectrum between 500 and 3000 cm^{-1} for OA cells mostly shows the organic peaks associated with the organic matrix. A sharp peak at 1004 cm^{-1} can be attributed to phenylalanine amino acids, as confirmed by the other sharp peak at 620 cm^{-1} and the aromatic C–H elongation around 3070 cm^{-1}. The peak at 1466 cm^{-1} and the set of peaks between 2830 and 2980 cm^{-1} correspond respectively to the C–H deformation and C–H elongations of the alkyl parts of the biomolecules present in the matrix. The peak around 1660 cm^{-1} can be assigned to the amide I band of the matrix proteins and may indicate the presence of biomolecule, other proteinic structures are present, also indicated by the complex signal between 1200 and 1400 cm^{-1} (Gelder et al., 2007). The signal from the organic matrix is considerably reduced in the case of the MC3T3-E1 cells since the corresponding spectrum has

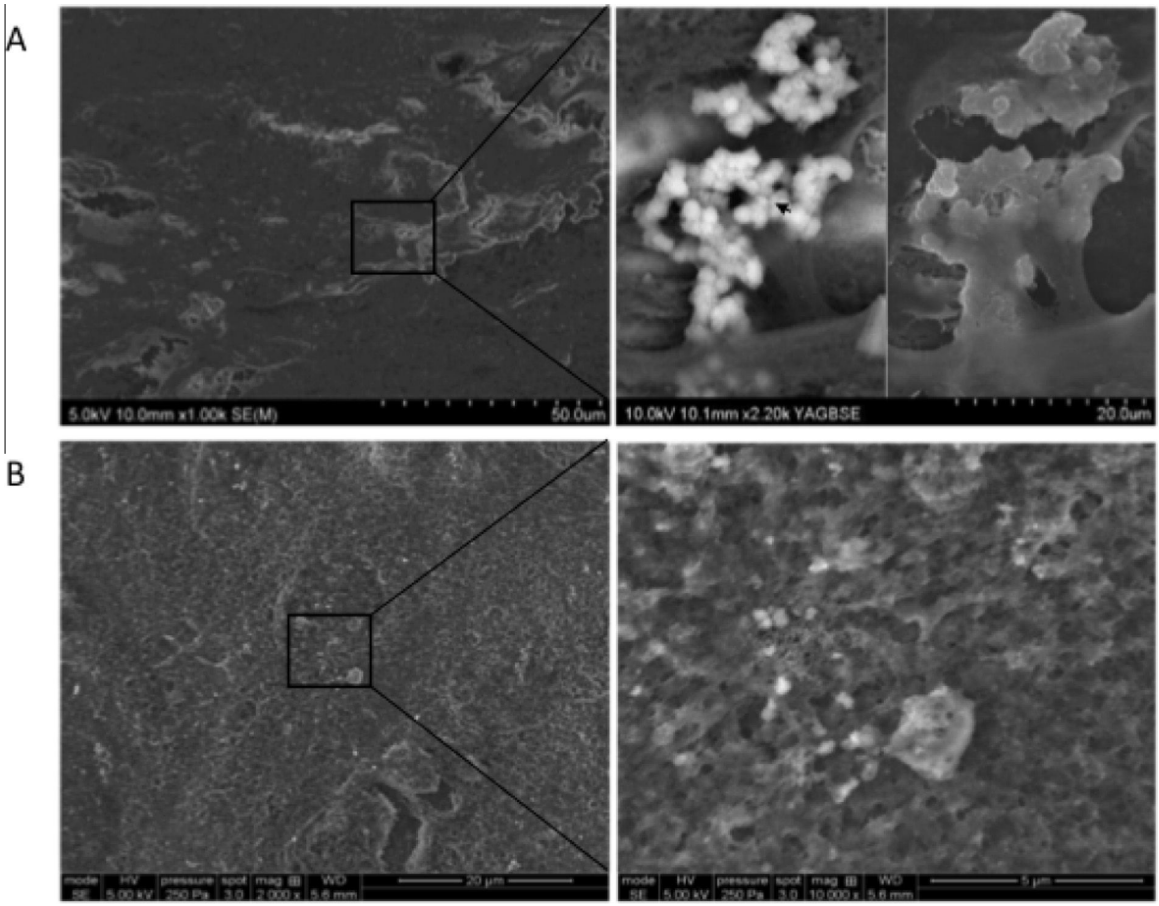


Fig. 2. Characterization of nodules by scanning electron microscopy (SEM). OA osteoblasts and MC3T3-E1 were treated for 21 days with ESM (200 μg/ml) to induce mineralization, fixed, dehydrated and observed by SEM. Detections of nanograins of phosphate (black arrows) in OA osteoblasts (A) and MC3T3-E1 pre-osteoblasts (B).

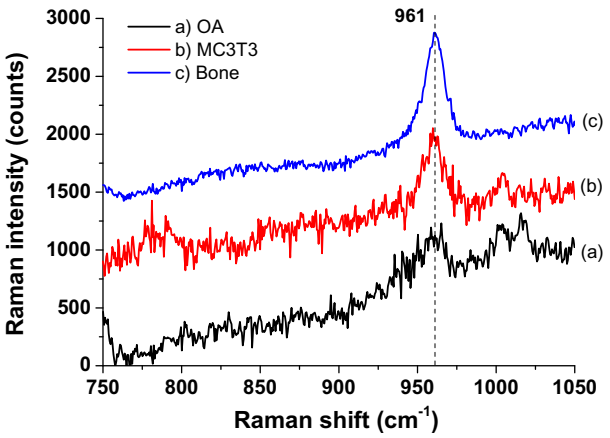


Fig. 3. Characterization of nodules by Raman spectroscopy. OA osteoblasts and MC3T3-E1 were treated for 21 days with ESM (200 μg/ml) to induce mineralization, fixed, dehydrated. Characterization of phosphate nanograins by RAMAN spectroscopy in OA osteoblasts (a), MC3T3-E1 pre-osteoblasts (b) and bone (c).

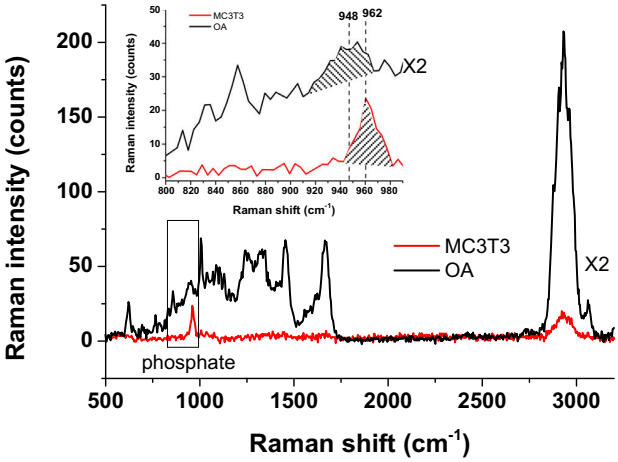


Fig. 4. Raman spectra obtained using the Witec α-300S confocal microscope using a laser at 532 nm for the two kinds of cells (OA and MC3T3-E1) treated with 200 μg/mL of ESM. The spectrum for OA cells has been multiplied by a factor of two to increase the visibility of the peak at 948 cm^{-1}. The inset shows the detailed region between 800 and 1000 cm^{-1} corresponding to phosphate species of interest. Dashed areas correspond to integrated areas of the corresponding peaks.

been taken in an area rich in phosphate species. These mineral species overlay the organic matrix, and only the C–H elongations between 2830 and 2980 cm^{-1} are clearly visible in this case. The phosphate species are particularly visible for the MC3T3-E1 cells treated by ESM, with a sharp peak at 962 cm^{-1} (see the inset) but also two shoulders around 955 cm^{-1} and 970 cm^{-1}. This is certainly a mixture of octacalcium phosphate (OCP, at 955 cm^{-1}), hydroxyapatite (960–962 cm^{-1}) and beta-tricalcium phosphate

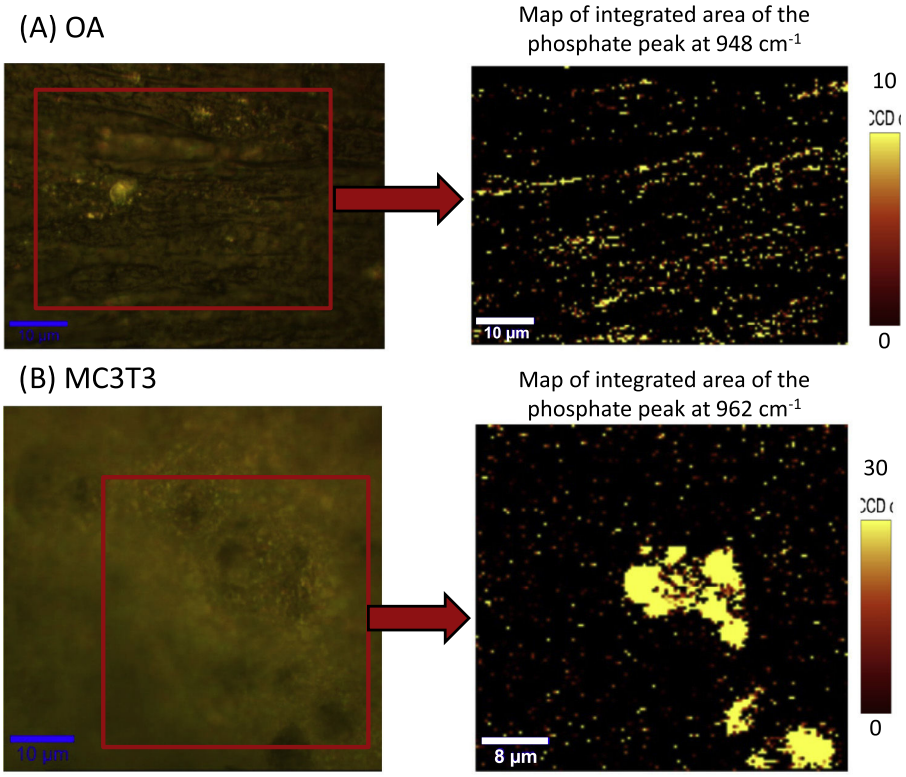


Fig. 5. Reflected-light images (left) and Raman maps of the phosphate species (right) for (A) OA cells and (B) MC3T3-E1 cells, both treated by 200 µg/ml of ESM.

(Ghita et al., 2014; Crane et al., 2006). For OA cells, a less intense and broader peak, centered at 948 cm^{-1}, is visible. It can be assigned to a mixture of amorphous calcium phosphate (ACP) and OCP (Crane et al., 2006) with possibly a small shoulder at 962 cm^{-1} assigned to hydroxyapatite in agreement with the spectrum shown in Fig. 3a. This broad and shifted phonon band is therefore the spectral signature of a less advanced mineralization process than the one observed for MC3T3-E1 cells.

The integrated areas of the peaks corresponding to phosphate species have been used to create Raman maps of the samples. The results are given in Fig. 5. For OA cells treated by ESM (200 µg/ml), the phosphate species are much diluted inside the organic matrix and only small dots are visible in the map in comparison with that of MC3T3 cells. This explains why it was so difficult to find a good spectrum of phosphate species for this sample using point-by-point Raman analysis with the T64000 set-up. Raman mapping is the solution of choice to identify very small mineral particles and finally obtain a satisfying spectrum with acceptable signal-to-noise ratio by focusing the laser spot in an area containing such a particle. One should note that the mineralized particles, mainly containing ACP and OCP compounds, are not completely randomly distributed in the matrix. The cell matrix seems to favor the mineralization in a certain direction, mostly horizontal lines in the case of Fig. 5A. It follows the cellular organization in the sample, as shown by comparing the Raman map (right) and the reflected light image of the same region (left).

For MC3T3-E1 cells, the image shows some bright areas, with some thickness of several micrometers. The plot of the integrated areas of the phosphate species vs. spatial location created a Raman map that indicates a clear mineralization process, with agglomerated particles of several micrometers in diameters. Both the Raman spectrum (Fig. 4) and the Raman map (Fig. 5) are consistent with the synthesis of big particles of hydroxyapatite and OCP, with also some contribution of MC3T3-E1 cells, the image shows some bright areas, with some thickness to envisage a statistical analysis of the data and a spatial plot of the individual phosphate species. Further work will be done on a more advanced set-up to try to obtain information about the spatial organization of these species.

3.4. SHG

We used SHG to characterize the collagen part of the ECM. Fig. S1 shows SHG on trabecular bone as an example. Collagen fibers can be observed around the osteocytes as previously reported (Dumas et al., 2014). We used the same technology to characterize the mineralized ECM. After 28 days of culture, the collagen fibers are present around the MC3T3 cells for the three conditions (control, Dexamethasone and ESM 200 µg/ml) and an SHG signal was detectable after 4 accumulations. For OA osteoblasts ten accumulations were necessary to observe a smooth SHG signal (Fig. 6) and only when cells were treated with ESM 200 µg/ml for 28 days. The accumulation allows the increase of the signal appropriate to the collagen. This is understandable by the organization of fibers and their orientation on one hand and on the other hand by their greater density.

3.5. ESM leads bone and matrix marker gene expression changes within OA osteoblasts and MC3T3-E1 cell line

Osteocalcin gene level expression presents a significant increase at day 7 (D7) for OA osteoblasts and MC3T3-E1 treated with ESM (2-fold and 300-fold, respectively) in comparison with controls before decreasing rapidly to the level of the control for MC3T3-E1 at day 14 (Figs. 7 and 8). In osteoblasts, the dexamethasone treatment seems to inhibit this gene expression in comparison with the control whereas an increased expression is obtained after

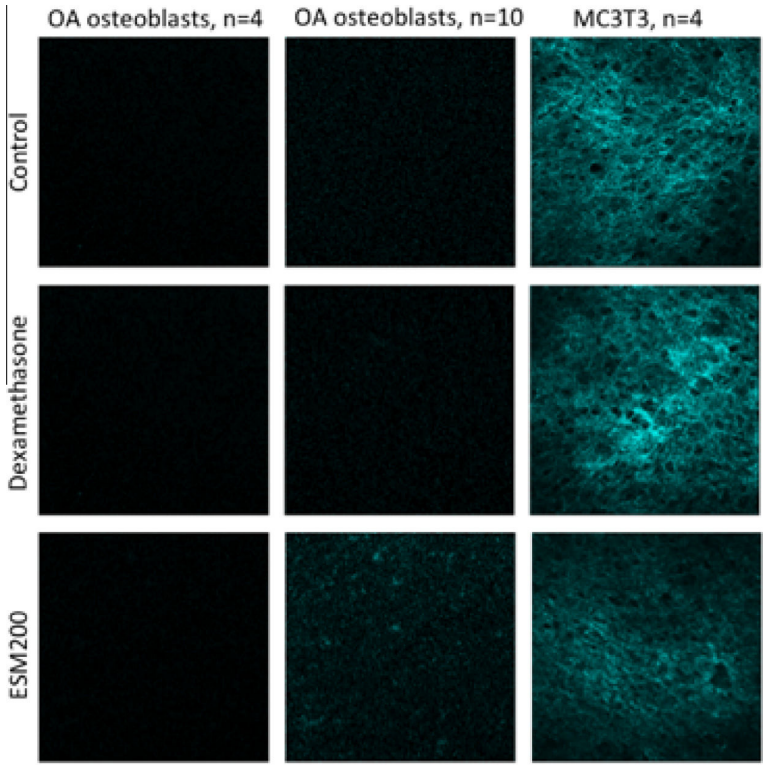


Fig. 6. SHG imaging of the OA osteoblasts and MC3T3-E1 cells after 28 days of culture in the presence of dexamethasone or ESM 200 μg/ml (size of the images: 461.31 μm × 461.31 μm). *n*: number of accumulations.

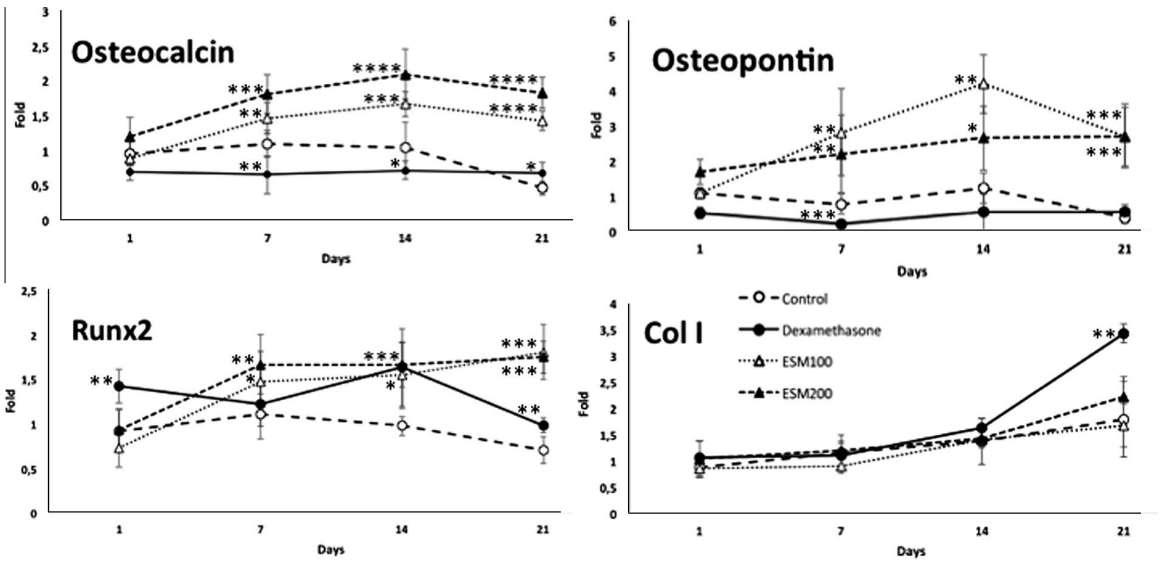


Fig. 7. Gene expression levels of bone and matrix markers after cell treatments. Osteoblasts were treated for 1, 7, 14 and 21 days with ESM (100 μg/ml, or 200 μg/ml) or dexamethasone (positive control) to induce mineralization or not treated (control). Col I, Osteopontin, Osteocalcin and Runx2 gene expression were determined by qPCR in osteoblasts. The values are normalized to 1 against control at D1. The statistical analysis is performed on the control (*t*-test; $p < 0.05^{*}$; $p < 0.01^{**}$; $p < 0.001^{***}$; $p < 0.0001^{****}$).

14 days of treatment in MC3T3-E1. Concerning *Osteopontin* expression, a significantly increased level is observed from D1 till D14 in OA osteoblasts (5-fold) and MC3T3-E1 (40-fold) further to ESM treatment, whereas dexamethasone inhibits this expression in osteoblasts. The impact of ESM on *Runx2* in both cell types appears more moderate than in the case of the previous genes, but an increased expression of this gene is observed from D7 till D14 in contrast to controls. The dexamethasone treatment increased significantly *Runx2* gene expression at D7 but less than with ESM treatment. On the whole, a stronger effect of ESM on the MC3T3-E1 cells is notable compared to osteoblasts for these bone markers. The positive control, dexamethasone, did not have any significant

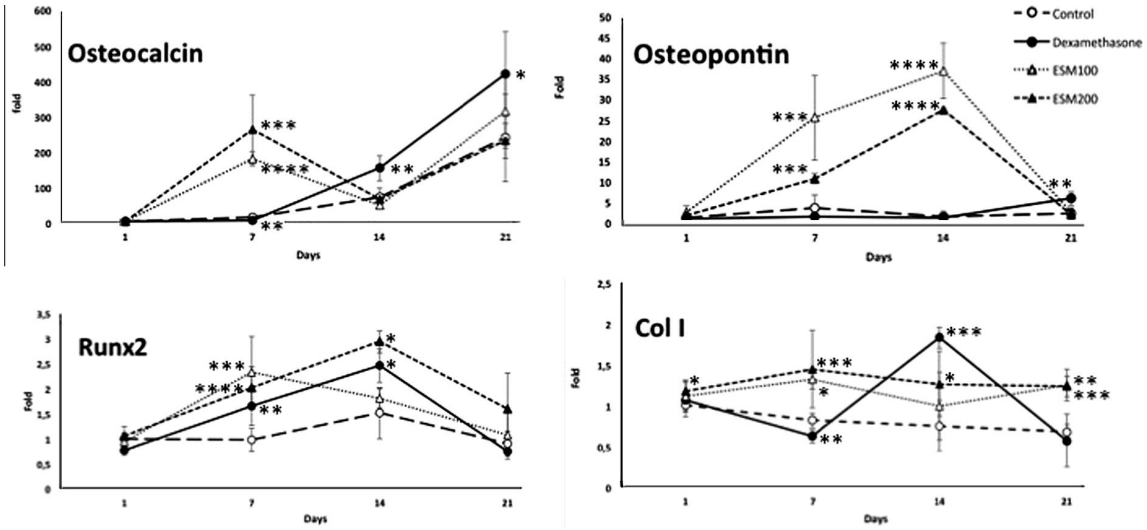


Fig. 8. Gene expression levels of bone and matrix markers after cell treatments. MC3T3-E1 were treated for 1, 7, 14 and 21 days with ESM (100 μg/ml, or 200 μg/ml) or dexamethasone (positive control) to induce mineralization or not treated (control). Col I, Osteopontin, Osteocalcin and Runx2 gene expression were determined by qPCR in MC3T3-E1 cell line. The values are normalized to 1 against control at D1. The statistical analysis is performed on the control (*t*-test; $p < 0.05^{*}$; $p < 0.01^{**}$; $p < 0.001^{***}$; $p < 0.0001^{****}$).

impact on MC3T3-E1 gene expressions and inhibited osteoblast gene expressions in comparison with controls. *Collagen type 1* has a slightly increased gene expression following treatment of MC3T3-E1 by ESM (1.5-fold) from D7 on. The impact of ESM on *Col1* expression of osteoblasts does not appear significantly different in comparison with controls. Dexamethasone, as a positive control, has a significant positive impact at D14 and D21 for MC3T3 and osteoblasts, respectively.

4. Discussion

Although cartilage degradation is the hallmark of OA, other joint tissues also show abnormal processes during the disease evolution. In addition to cartilage, the mineralization potential decreases and the ECM suffers from a progressive degeneration. The subchondral bone remodeling appears to be a key component in the development and progression of OA (Tat et al., 2011) and alterations in this tissue were demonstrated to be due, at least in part, to abnormal osteoblast metabolism (Hilal et al., 1998).

In the context of mineralization defect and nacre properties, we investigated whether this biomaterial could be a source of active compounds against OA. In this study, we therefore aimed at assessing the impact of nacre extract on MC3T3-E1 and OA osteoblast mineralization and ECM.

Low molecular weight molecules ranging from 50 to 235 Da and relatively high molecular weight organic matrix proteins present in nacre have thus been found to promote osteogenesis both directly through stimulation of the osteoblast function and indirectly by inducing the synthesis of fibrous matrix proteins including type I collagen by fibroblasts (Lopez et al., 1992, 2000; Rousseau et al., 2003, 2008; Bédouet et al., 2007). Although the osteoinductive potential of nacre and water-soluble matrix (WSM) from nacre are well known (Chaturvedi et al., 2013; Kim et al., 2012), the literature does not mention the effects of ESM extract on cell mineralization. Our recent research work shows that ESM is not only composed of peptides but also of lipids and sugars (unpublished data).

Studies concerning nacre extract have demonstrated that WSM induced mineralized bone nodule formation in MC3T3-E1 treated with 0.025% (w/v) of WSM after 9 days of treatment (Chaturvedi et al., 2013). Furthermore, in healthy osteoblast cultures exposed to WSM at 0.05% (w/v), a marked increase in the extent of calcification, when compared with control, has been shown after 6 days of treatment (Kim et al., 2012). In our work, with regard to bone nodule formation, similar results were obtained. Indeed, Alizarin Red staining highlights the capacity of ESM to promote mineralization process compared to the positive control (dexamethasone) not only on MC3T3-E1 but also on OA osteoblasts after 7 days of treatment. The behavior of MC3T3-E1, concerning the mineralization process, appeared comparable to that of osteoblasts, so this lineage is positioned as an early model of these cells to test effects of nacre extracts. Moreover, the Alizarin Red coloration of osteoblasts is exclusively obtained thanks to the ESM treatment and not with dexamethasone treatment. This staining also highlights the impact of the dose of extract used on the intensity of mineralization. The highest dose of ESM leads to an earlier and more intense mineralization than with the lowest dose.

Essential for its strength and hardness, bone mineralization involves a well orchestrated process in which calcium phosphate crystals are produced by bone-forming cells and laid down in precise amounts within the bone fibrous matrix. Thus, the restriction of mineral deposition to bone tissues and the regulation of the mineralization process are crucial in maintaining and optimize the bone health (Harmey et al., 2004). Moreover, extracellular matrix (ECM) mineralization in bone is a physiological process but it could be easily disrupted during diseases characterized by decreased bone mineralization such as OA (Murshed et al., 2005). However, the precise molecular mechanisms accounting for physiological or pathological ECM mineralization are not fully understood. To date, it has been generally accepted that ECM mineralization in bone involves at least in part the osteoblast-specific gene products that initiate and regulate the formation of hydroxyapatite crystals. This mineral form contains calcium and inorganic phosphate ions and is deposited within and between collagen fibrils (Bachra and Fischer, 1968; Glimcher, 1998).

Raman spectroscopy confirms these results for MC3T3-E1 cells but tempers the assessment for osteoblasts. Indeed, the phosphate produced by day 21 by these cells is not yet hydroxyapatite, but an early form of phosphate (Tarnowski et al., 2002; Ghita et al., 2014).

The next question to answer was if the presence of a transient mineral phase in the extracellular matrix of OA osteoblasts is linked with the organic composition of this ECM. Our results suggest that the collagen content in the extracellular matrix of OA osteoblasts seems to be lower than that of MC3T3 cells. Not only the mineralization capacity of OA osteoblasts seems to be incomplete, but also the matrix production.

Consequently, ESM seems to be able to initiate the re-establishment of the mineral capacity of OA osteoblasts after 21 days of treatment. In the literature, this phenomenon is indicated as occurring after 30 days of BMP2 treatment with 10 ng/ml of BMP2 or Vitamin D3 treatment at 50 nM (Couchourel et al., 2009) and after 10 days of treatment with 10 μM of cobalt protoporphyrin (Clérigues et al., 2012). Thus, ESM treatment seems able to equal the performance of these molecules. Furthermore, despite the incapacity of ESM to fully restore the mineralization capacity, the osteogenic molecules of nacre are able to stimulate the production of the extracellular matrix of the OA osteoblasts, which are known to modify the ratio of collagen I α1 and α2 chains (Couchourel et al., 2009).

Afterwards, we looked at the gene expression levels of *Osteocalcin*, *Osteopontin* and *Runx2* in MC3T3-E1 and OA osteoblasts treated or not with ESM. Both cell types are of different origin, one cannot be substituted for another, and so, although a trend is maintained, variabilities appear in gene response. *Osteopontin*, a multifunctional phosphorylated glycoprotein secreted by osteoblasts and a bone adhesion protein linking hydroxyapatite and bone cells, has been suggested to occur at an early stage of the mineralization process (Jankovska et al., 2009). *Osteocalcin*, a predominant noncollagenous protein of bone, is a marker of bone formation produced by osteoblasts (Jankovska et al. 2009; Boskey et al., 1998). *Runx2*, a transcription factor that is first expressed in early osteoblast-lineage cells and represents a primary determinant of osteoblastogenesis, is known to be able to up-regulate the expression of *osteocalcin* (Komori, 2010; Tsai et al., 2011). In our case, ESM treatment played a dual role on gene expression and could act directly or not. Indeed, on MC3T3-E1 cells, ESM induced an increased expression of *Osteocalcin* till D7, then a maximal expression of *Runx2* at D14, that could lead to the re-induction of *Osteocalcin* expression observed at D21. Data showed that expression levels of these osteogenic markers are overexpressed after ESM treatment and more moderately after dexamethasone treatment. However, the concentration of ESM seems important in the expectancy of gene effect. Indeed, a higher dose of ESM appears to allow stimulation of the expression of osteogenic markers faster and more durable than a lower dose. Our results refer to those published by Chaturvedi et al. (2013) and Rousseau et al. (2008) demonstrating the stimulating impact of WSM and ESM on the expression of *Osteocalcin*, *Osteopontin* and *Runx2* genes. Nevertheless, gene expression profile differences can be observed between these publications and could be attributed to the origin and variability of composition of nacre extracts. While here, the ESM was extracted directly from the nacre powder for better performance and faster production, in Rousseau et al. (2008), ESM was extracted on the WSM. A variability of composition may then be speculated, explaining the differences of gene responses.

However, the lineage mineralization due to ESM treatment is earlier but lower than dexamethasone. For OA osteoblasts controls, cell mineralization was not induced contrary to our nacre extract treatment. Moreover, expression of osteogenic markers is important to link with ECM markers. Indeed, bone resorption is well known to go along with the degradation of extracellular matrix components, including *collagen type 1*, in OA patients (Tat et al., 2010). *Collagen type 1* is the most abundant protein in the extracellular matrix of bone (Stange et al., 2013). Our obtained data showed that *collagen type 1* expression level was increased in MC3T3-E1 and OA osteoblasts till day 7.

Our results indicate that ESM is likely to contain ethanol-soluble diffusible factors that can stimulate MC3T3-E1 and OA osteoblasts *in vitro*. Taken together, the stimulatory action of ESM on bone formation is believed to help the serial process of osteoblastic matrix formation and mineral deposition.

In conclusion, nacre extract was able to restore a physiological phenomenon and induce mineralization of osteoarthritis osteoblasts. The increased mineralization activity observed on MC3T3-E1 cells was also observed on OA osteoblasts, thus confirming the potential of nacre extract as a marine biosource of osteogenic compounds.

Acknowledgments

We thank BPI France, the Region Lorraine and European Union (FEDER) for funding of the program *Maturation Nacre extracts*. Thanks for the China Scholarship Council (award to Ganggang Zhang for 4 years' PhD study abroad at the Université de Lorraine). We would like to thank Dr. Hassan RAMMAL for the review of the manuscript. We thank the Common Facilities of Electron Microscopy of the Université de Lorraine and the SMI (Spectroscopies and Microscopies at Interfaces) platform of Institut Jean Barriol for access to both Raman set-ups. The authors are grateful to Dr. E. McRae for carefully reading over the manuscript.

Authors' roles: AB, GZ, DM, VM, DD, SH, MHP, AB, DM, LG, PG and MR designed and performed the experiments. AB and MR wrote the manuscript. MR accept responsibility for the integrity of the data analysis.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2015.10.012.

References

Bachra, B.N., Fischer, H.R., 1968. Recalcification of decalcified bone collagen in vitro as a model for biologic calcification. Calcif. Tissue Res., Suppl: 7

Bédouet, L., Duplat, D., Marie, A., Dubost, L., Berland, S., Rousseau, M., Milet, C., Lopez, E., 2007. Heterogeneity of proteinase inhibitors in the water-soluble organic matrix from the oyster nacre. Mar. Biotechnol. (NY) 9 (4), 437–449.

Bevelander, G., Nakahara, H., 1969. An electron microscope study of the formation of the nacreous layer in the shell of certain bivalve molluscs. Calcif. Tissue Res. 3 (1), 84–92.

Boskey, A.L., Gadaleta, S., Gundberg, C., Doty, S.B., Ducy, P., Karsenty, G., 1998. Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin. Bone 23 (3), 187–196.

Chaturvedi, R., Singha, P.K., Dey, S., 2013. Water soluble bioactives of nacre mediate antioxidant activity and osteoblast differentiation. PLoS ONE 8 (12), 1–10.

Chen, J.C., Kung, J.C., Hsieh, C.H., Hou, M.J., Shih, C.J., Hung, C.C., 2013. Mineralisation and osteoblast cells response of nanograde pearl powders. J. Nanomater. Article ID 752863.

Clérigues, V., Guillén, M.I., Castejón, M.A., Gomar, F., Mirabet, V., Alcaraz, M.J., 2012. Heme oxygenase-1 mediates protective effects on inflammatory, catabolic and senescence responses induced by interleukin-1â in osteoarthritic osteoblasts. Biochem. Pharmacol. 83 (3), 395–405.

Corrado, A., Neve, A., Macchiarola, A., Gaudio, A., Marucci, A., Cantatore, F.P., 2013. RANKL/OPG ratio and DKK-1 expression in primary osteoblastic cultures from osteoarthritic and osteoporotic subjects. J. Rheumatol. 40 (5), 684–694.

Couchourel, D., Aubry, I., Delalandre, A., Lavigne, M., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J. P., Lajeunesse, D., 2009. Altered mineralization of human osteoarthritic osteoblasts is attributable to abnormal type I collagen production. Arthritis Rheum. 60 (5), 1438–1450.

Cox, L.G., van Donkelaar, C.C., van Rietbergen, B., Emans, P.J., Ito, K., 2012. Decreased bone tissue mineralisation can partly explain subchondral sclerosis observed in osteoarthritis. Bone 50 (5), 1152–1161.

Crane, N.J., Popescu, V., Morris, M.D., Steenhuis, P., Ignelzi, M.A., 2006. Raman spectroscopy evidence for octacalcium phosphate and other transient mineral species deposited during intramembranous mineralization. Bone 39, 434–442.

Dumas, D., Hupont, S., Improved biomedical imaging with multiphoton excitation. WO 2012160312 A3, Patent published in 2013.

Dumas, D., Werkmeister, E., Hupont, S., Huselstein, C., De Isla, N., Rousseau, M., Menu, P., Mainard, D., 2014. Non-invasive Second Harmonic Generation (SHG) in Macroscopy (MacroSHG) as bio-diagnosis to image collagen network organization in extracellular matrix. Engineering 6, 485–490.
Ferrándiz, M.L., Terencio, M.C., Ruhí, R., Vergés, J., Montell, E., Torrent, A., Alcaraz, M. J., 2014. Influence of age on osteoarthritis progression after anterior cruciate ligament transaction in rats. Exp. Gerontol. 55, 44–48.
Gallagher, B., Tjoumakaris, F.P., Harwood, M.I., Good, R.P., Ciccotti, M.G., Freedman, K.B., 2014. Chondroprotection and the prevention of osteoarthritis progression of the knee: a systematic review of treatment agents. Am. J. Sports Med. [Epub ahead of print]
Gelder, J.D., Gussem, K.D., Vandenabeele, P., Moens, L., 2007. Reference database of Raman spectra of biological molecules. J. Raman Spectrosc. 38 (9), 1133–1147.
Ghita, A., Pascut, F.C., Sottile, V., Notingher, I., 2014. Monitoring the mineralisation of bone nodules in vitro by space- and time-resolved Raman micro-spectroscopy. Analyst 139 (1), 55–58.
Glimcher, M.J., 1998. The nature of mineral phase in bone, biological and clinical implications. In: Avioli, L.V., Krane, S.M. (Eds.), Metabolic Bone Disease and Clinically Related Disorders. Academic Press, London, UK, pp. 23–46.
Green, D.W., Kwon, H.-J., Jung, H.-S., 2015. Osteogenic potency of nacre on human mesenchymal stem cells. Mol. Cells. http://dx.doi.org/10.14348/molcells.2015.2315.
Gregory, C.A., Gunn, W.G., Peister, A., Prockop, D.J., 2004. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. Anal. Biochem. 329 (1), 77–84.
Harmey, D., Hessle, L., Narisawa, S., Johnson, K.A., Terkeltaub, R., Millán, J.L., 2004. Concerted regulation ofinorganicpyrophosphateandosteopontinbyakp2, enpp1, and ank: an integrated model of the pathogenesis of mineralization disorders. Am. J. Pathol. 164 (4), 1199–1209.
Hilal, G., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P., Ranger, P., Lajeunesse, D., 1998. Osteoblast-like cells from human subchondral osteoarthritic bone demonstrate an altered phenotype in vitro: possible role in subchondral bone sclerosis. Arthritis Rheum. 41, 891–899.
Jankovska, I., Pilmane, M., Urtane, I., 2009. Osteopontin and Osteocalcin in Maxilla Tissue of Skeletal Class III Patients. Stomatologija, Baltic Dental and Maxillofacial J. 11, 125–128.
Kim, H., Lee, K., Ko, C.Y., Kim, H.S., Shin, H.I., Kim, T., Lee, S.H., Jeong, D., 2012. The role of nacreous factors in preventing osteoporotic bone loss through both osteoblast activation and osteoclast inactivation. Biomaterials 33 (30), 7489–7496.
Komori, T., 2010. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. Cell Tissue Res. 339, 189–195.
Lajeunesse, D., Busque, L., Menard, P., Brunette, M.G., Bonny, Y., 1996. Demonstration of an osteoblast defect in two cases of human malignant osteopetrosis: correction of the phenotype after bone marrow transplant. J. Clin. Invest. 98, 1835–1842.
Lajeunesse, D., Kiebzak, G.M., Frondoza, C., Sacktor, B., 1991. Regulation of osteocalcin secretion by human primary bone cells and by the human osteosarcoma cell line MG-63. Bone Miner. 14, 237–250.
Lamghari, M., Berland, S., Laurent, A., Huet, H., Lopez, E., 2001. Bone reactions to nacre injected percutaneously into the vertebrae of sheep. Biomaterials 22, 555–562.
Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(−Delta Delta C(T)) method. Methods 25, 402–408.
Lopez, E., Le Faou, A., Borzeix, S., Berland, S., 2000. Stimulation of rat cutaneous fibroblasts and their synthetic activity by implants of powdered nacre (mother of pearl). Tissue Cell 32 (1), 95–101.
Lopez, E., Vidal, B., Berland, S., Camprasse, S., Camprasse, G., Silve, C., 1992. Demonstration of the capacity of nacre to induce bone formation by human osteoblasts maintained in vitro. Tissue Cell 24 (5), 667–679.
Luppen, C., Smith, E., Spevak, L., Boskey, A., Frenkel, B., 2003. Bone morphogenetic protein-2 restores mineralization in glucocorticoid-inhibited MC3T3-E1 osteoblast cultures. J. Bone Miner. Res. 18 (7), 1186–1197.
Luz, G.M., Mano, J.F., 2009. Biomimetic design of materials and biomaterials inspired by the structure of nacre. Philos. Trans. A Math. Phys. Eng. Sci. 367 (1893), 1587–1605.
Murshed, M., Harmey, D., Millán, J.L., McKee, M.D., Karsenty, G., 2005. Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. Genes Dev. 19 (9), 1093–1104.
Pereira, D., Ramos, E., Branco, J., 2015. Osteoarthritis. Acta Med. Port. 28 (1), 99–106.
Rousseau, M., Boulzaguet, H., Biagiani, J., Duplat, D., Milet, C., Lopez, E., Bedouet, L., 2008. Low molecular weight molecules of oyster nacre induce mineralization of the MC3T3-E1 cells. J. Biomed. Mater. Res. A 85 (2), 487–497.
Rousseau, M., Pereira-Mouries, L., Almeida, M.J., Milet, C., Lopez, E., 2003. The water soluble matrix fraction from the nacre of *Pinctada maxima* produces earlier mineralization of MC3T3-E1 mouse pre-osteoblasts. Comp. Biochem. Physiol. B 135, 1–7.
Schäffer, T.E., Ionescu-Zanetti, C., Proksch, R., Fritz, M., Walters, D.A., Almquist, N., Zaremba, C.M., Belcher, A.M., Smith, B.L., Stucky, G.D., Morse, D.E., Hansma, P.K., 1997. Does abalone nacre form by heteroepitaxial nucleation or by growth through mineral bridges? Chem. Mater. 9, 1731–1740.
Stanford, C.M., Jacobson, P.A., Eanes, E.D., Lembke, L.A., Midura, R.J., 1995. Rapidly forming apatitic mineral in an osteoblastic cell line (UMR 106-01 BSP). J. Biol. Chem. 270 (16), 9420–9428.
Stange, R., Kronenberg, D., Timmen, M., Everding, J., Hidding, H., Eckes, B., Hansen, U., Holtkamp, M., Karst, U., Pap, T., Raschke, M.J., 2013. Age-related bone deterioration is diminished by disrupted collagen sensing in integrin $\alpha 2\beta 1$ deficient mice. Bone 56 (1), 48–54.
Takeuchi, Y., Matsumoto, T.T., Ogata, E., Shishiba, Y., 1990. Isolation and characterization of proteoglycans synthesized by mouse osteoblastic cells in culture during the mineralization process. Biochem. J. 266, 15–24.
Tarnowski, C.P., Ignelzi Jr., M.A., Morris, M.D., 2002. Mineralization of developing mouse calvaria as revealed by Raman microspectroscopy. J. Bone Miner. Res. 17 (6), 1118–1126.
Tat, S.K., Lajeunesse, D., Pelletier, J.P., Martel-Pelletier, J., 2010. Targeting subchondral bone for treating osteoarthritis: what is the evidence? Best Pract. Res. Clin. Rheumatol. 24 (1), 51–70.
Tat, S.K., Pelletier, J.P., Mineau, F., Caron, J., Martel-Pelletier, J., 2011. Strontium ranelate inhibits key factors affecting bone remodeling in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts. Bone 49 (3), 559–567.
Tsai, M.T., Lin, Y.S., Chen, W.C., Ho, C.H., Huang, H.L., Hsu, J.T., 2011. Runx2 and Osterix gene expression in human bone marrow stromal cells are mediated by far-infrared radiation. In: Proceedings of the World Congress on Engineering 2011 Vol III WCE July 6–8, 2011, London, U.K.
Wang, X., Liu, S., Xie, L., Zhang, R., Wang, Z., 2011. Pinctada fucata mantle gene 3 (PFMG3) promotes differentiation in mouse. Comp. Biochem. Physiol. B 158, 173–180.
Weiss, I.M., Kaufmann, S., Mann, K., Fritz, M., 2000. Purification and characterization of Perlucin and Perlustrin, two new proteins from the shell of the mollusk *Haliotis laevigata*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 267, 17–21.
Westbroek, P., Marin, F., 1998. A marriage of bone and nacre. Nature 392 (6679), 861–862.
Woolf, A.D., Pfleger, B., 2003. Burden of major musculoskeletal conditions. Bull. World Health Organ. 81 (9), 646–656.

Chapitre 1. Approche utilisant 2 modèles cellulaires

1.2 Tests de minéralisation avec diverses fractions d'ESM

Publication N°3
Manuscrit résumé en français

Une nouvelle méthode pour la séparation et la purification des composés ostéogéniques de l' Ethanol Soluble Matrix de la nacre

Zhang G., Willemin A.S., Brion A., Piet M.H., Moby V., Bianchi A., Mainard D., Galois L., Gillet P., Rousseau M.

La nacre est capable d'induire la minéralisation des cellules formant l'os, ce qui souligne son intérêt dans la régénération osseuse. Cependant, les composés ostéoinducteurs ne sont pas encore identifiés. L'ESM (Ethanol Soluble Matrix), un extrait de la poudre de nacre de la coquille d'huître perlière *Pinctada margaritifera*, a d'abord montré sa capacité à induire la minéralisation et de restaurer le défaut de minéralisation *in vitro*. Il convient de traiter l'ESM comme une source de composés ostéogéniques. Ici, nous développons une nouvelle méthode pour séparer et purifier l'extrait de nacre par une approche ionique.

Dans un premier temps, l'ESM cationique (ESMc) et l'ESM anionique (ESMa) ont été obtenus en utilisant la résine échangeuse d'anions et de cations respectivement. Les molécules fixées sur la résine de cations sont récupérées par du chlorure de sodium et de l'éthanol, nommé comme l'ESME. Ensuite, l'ESM a été séparé et recueilli par chromatographie échangeuse de cations selon un programme développé au laboratoire. La microscopie électronique à balayage couplée à la spectrométrie de rayons X à dispersion énergétique (EDS) a été utilisée pour révéler la présence des éléments concentrés dans les fractions d'ESM. Le couplage de la lignée MC3T3 et les ostéoblastes arthrosiques a été utilisé pour tester les fractions d'ESM obtenues par les résines et par la chromatographie. La coloration au rouge d'alizarine a été réalisée et quantifiée pour évaluer le niveau de minéralisation.

L'observation par microscopie électronique à balayage de l'ESM a tout d'abord confirmé que le processus de l'extraction est non-décalcifiant. Les résultats de la chromatographie montrent que l'ESMc, l'ESMa et l'ESME sont bien cohérents avec l'ESM. L'ESMc et l'ESME sont très semblables selon les profils de chromatographie et selon les observations en microscopie électronique. L'ESMc et l'ESME ont stimulé la minéralisation dans des deux types cellulaires. L'ESMa n'a pas de capacité ostéogénique. Aucune interaction entre l'ESMc et l'ESMa n'est observée. Parmi les

10 fractions cationiques d'ESM, F5 et F6 représentent la majorité en masse. Les 2 fractions ont démontré leurs propriétés ostéogéniques selon la coloration. L'EDS a démontré la présence abondante de calcium et de chlorure dans les fractions ostéogéniques. Ensuite, le $CaCl_2$ pur a été testé et a démontré avoir un effet ostéogénique dans les deux types de cellules, mais moins stable que l'ESM. Les nodules de minéralisation induits par les fractions d'ESM et $CaCl_2$ différaient dans les deux types de cellules.

En conclusion, malgré le fait que nous n'avons pas séparé absolument tous les composés de la nacre, une nouvelle méthode a été développée pour séparer et purifier primairement l'extrait de nacre par une approche ionique. Les composés ostéogéniques de l'ESM se sont révélés cationiques, et la présence de calcium dans l'ESM a été démontrée et joue un rôle dans l'induction de la minéralisation cellulaire. Le calcium semble être incorporé dans des molécules organiques, précisément, dans les parties cationiques.

Journal of Structural Biology 196 (2016) 127–137

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Structural Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yjsbi

A new method for the separation and purification of the osteogenic compounds of nacre Ethanol Soluble Matrix

G. Zhang, A.S. Willemin, A. Brion, M.H. Piet, V. Moby, A. Bianchi, D. Mainard, L. Galois, P. Gillet, M. Rousseau *

IMoPA, UMR 7365 CNRS Université de Lorraine, 9 av. de la forêt de Haye, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 14 December 2015
Received in revised form 19 February 2016
Accepted 16 March 2016
Available online 16 March 2016

Keywords:
Nacre
Ethanol Soluble Matrix
MC3T3-E1 cells
Osteoarthritis osteoblasts
Biomineralization

ABSTRACT

Nacre is able to induce bone-forming cells mineralization, and gains widely interest in bone regeneration. While, the osteoinductive compounds are not yet identified. ESM (Ethanol Soluble Matrix), a nacre extract from powder of *Pinctada margaritifera* pearl oyster shell, has been firstly proven having the capacity to induce mineralization and to restore mineralization defect *in vitro*. It is suitable to treat ESM as a source of osteoinductive compounds. Herein, we develop a new method for separating and purifying nacre extracts by an ionic approach.

At first, cationic ESM (ESMc) and anionic ESM (ESMa) were achieved with ion-exchange resin. Then, ESM was separated and collected on cation exchange HPLC. Scanning Electron Microscopy coupled with Energy Dispersive X-ray Spectrometry (EDS) was used to reveal the concentrated elements in ESM fractions. A coupled cell models were used to test the ESM fractions. Alizarin Red staining was performed and quantified to evaluate the mineralization level.

ESMc and 2 HPLC fractions stimulated the mineralization in both cells. EDS demonstrated the abundant presence of calcium and chloride in the osteogenic fractions. To validate, pure $CaCl_2$ was tested and proven having an osteogenic effect in both cells, but less stable than ESM. The mineralization nodules induced by ESM fractions and $CaCl_2$ differed in both cells.

In conclusion, a new method was developed for separating and purifying nacre extracts by an ionic approach. By which, the osteoinductive compounds in ESM were proven cationic, and calcium in ESM was demonstrated to play a role in inducing the cell mineralization.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Nacre, or mother of pearl, is a calcified structure widely found in the internal layer of many mollusk shells, composed of aragonite (97%) and organic matrix (3%). Due to the worldwide availability, low cost, mechanical resistance, biocompatibility, biodegradability, opaque to X-rays and osteogenic feature (Chaturvedi et al., 2013), the natural material gains widespread interest in bone regeneration, as candidate for bone graft substitutes (Atlan et al., 1999, 1997; Meriem Lamghari et al., 2001; Rousseau et al., 2012), or in the case of pathologies affecting mineralization such as osteoporosis and osteoarthritis (Brion et al., 2015; M. Lamghari et al., 2001).

Nacre was demonstrated to be able to induce bone forming cells mineralization, by attaching directly osteoblasts (Atlan et al., 1997), or stimulating cells from bone marrow stromal cell to pre-osteoblastic cell toward osteogenic differentiation (Green et al., 2015; Milet et al., 2004), and was believed to contain some signal molecules in the organic matrix. The molecules could be released when nacre was implanted in bone environment, and induced osteogenesis (Atlan et al., 1997).

As reviewed, the organic matrix of nacre is a mixture of proteins, peptides, glycoproteins, chitin, lipids, pigments (Marin et al., 2012). To reveal the mechanism of nacre-driven mineralization, nacre extract was studied to identify the osteoinductive compounds. The most studied extract was WSM (Water Soluble Matrix). WSM from different species, were demonstrated osteoinductive in various cell models (Lopez et al., 2003; Milet et al., 2004). The nacre proteins were equally proven to play a primary role in controlling the formation of interfacial structure and biocompatibility with bone as well as the stability of biogenic tissues (Kim et al., 2002). While, it was also argued that the nacre molecules efficient in bone cell differentiation were probably more related to peptides (Rousseau et al., 2008; Rousseau, 2003). To

* Corresponding author.
E-mail address: marthe.rousseau@univ-lorraine.fr (M. Rousseau).

http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2016.03.016
1047-8477/© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

date, more than 50 proteins and 50 peptides from nacre have been identified (UniProt protein database, see www.uniprot.org).

Though, the nacre osteoinductive compounds have not yet been identified. Ethanol extraction process for biomolecules has been involved previously (Huebner and Bietz, 1993; Esen, 1986; Colvin, 1961), but very recently, ESM (Ethanol Soluble Matrix), an organic extract from nacre powder of *Pinctada (P.) margaritifera* pearl oyster shell, has been firstly proven having the capacity to induce mineralization in mouse pre-osteoblastic cell line MC3T3-E1, and also the capacity to restore mineralization defect in human subchondral osteoarthritic (OA) osteoblasts (Brion et al., 2015). It is suitable to treat ESM as a source of osteoinductive compounds. For many years, the MC3T3-E1 cell line, deriving from newborn mouse calvarias (Wang et al., 2011), has an inherent potential to mineralize, and is widely used in the literature to mimic osteoblast behavior in the context of differentiation studies. While, human osteoarthritic osteoblasts present a mineralization defect (Couchourel et al., 2009). Thus, the coupled *in vitro* cell models are picky but practical for the validation of osteogenic effect.

To date, ESM seems to be a most active osteogenic matrix from nacre, and offers a good opportunity to identify the osteoinductive compounds. Herein, we developed a new method to separate and purify the matrix. The method is emphasized at an ionic approach, by using the ion resin to get a primary result and then ion-exchange HPLC as a secondary procedure to obtain the active molecules, toward the direction of identification. All the ionic fractions of ESM, prepared by ion resin or collected from HPLC, were tested onto the coupled cell models for confirming their osteogenic activity.

2. Material and methods

2.1. Nacre extract

Nacre powder was isolated from the *P. margaritifera* pearl oyster. ESM was extracted with ethanol as described previously (Brion et al., 2015). Precisely, nacre powder (250 g) was stirred with 500 ml of ethanol absolute anhydrous (CARLOERBA, Cat. 4127012) containing 0.1% HCl (VWR, Cat. 20252) for 24 h at 40 °C at 100 rpm by Rotavapor (Heidolph, Hei-Vap). The suspension was then centrifuged (20 min, 3000 rpm, 4 °C) and filtered (0.22 μm, Millipore) before being evaporated. The nacre extract was known as "Ethanol Soluble Matrix" (ESM).

2.2. Preparation of cationic ESM (ESMc), anionic ESM (ESMa) and ESME

Generally, the chemical extraction was done according to Fig. 1.

From the results of pre-tests by Alizarin Red staining, ESMc had an osteoinductive effect on OA osteoblasts, but not for ESMa. Then, we tried to recycle the active cations (ESME) from the cation exchange resin. That's why ESME was prepared, and no similar fraction from anion exchange resin was done simultaneously.

2.2.1. ESMc

100 mg ESM was weighed and solubilized in 50 ml water (milli-Q) to obtain a 2 mg/ml solution, then regenerated 50 ml anion exchange resin (SIGMA–ALDRICH, DOWEX$_{22}$ CL, Cat. 436623) by 200 ml 1 M NaCl in a conical flask and removed NaCl; The resin should be rinsed with 300 ml water (milli-Q) for 5 times in total and the washing water was removed each time; Then the ESM solution was added into the resin, and the flask was shaken manually to facilitate the ion-exchange before the exchanged solution being recycled; Afterwards, the resin was rinsed two times with 50 ml water (milli-Q), and the washed water should be pooled with the exchanged solution before being filtered (0.22 μm, Millipore), frozen at −20 °C and lyophilized to get ESMc.

2.2.2. ESMa and ESME

ESMa was extracted similarly as ESMc, but using cation exchange resin (GE Healthcare Life Sciences, SP Sepharose High Performance, Cat. 17–1087-01). As for ESME, the extraction followed closely the preparation of ESMa. After the lavation for getting ESMa, 50 ml 1 M NaCl was added into the resin, the flask was shaken manually to facilitate the ion-exchange before recycling the exchanged solution; The solution was frozen and lyophilized to get a dried mixture of NaCl and ESME; Then ESME was extracted from the mixture by 3 lavation of 100 ml ethanol absolute anhydrous (CARLOERBA, Cat. 4127012); The extracted solvent was filtered (0.22 μm, Millipore) and evaporated at 40 °C, 200mBar at 100 rpm by Rotavapor (Heidolph, Hei-Vap) to get ESME.

2.3. Separation and collection on cation exchange HPLC

2.3.1. Equipment of HPLC, column and general information for injection

The HPLC chain was products of WATERS. Interchim Column UP5SCX-250/046, a strong cation exchange column, was used for the separation of cationic molecules. For mobile phase, an ERLIC (electrostatic repulsion–hydrophilic interaction chromatography) method was adopted (Alpert, 2008), and developed. The column was conditioned with acetonitrile, and then in gradient mode, the phase mobile was followed the Table 1. The solvents at different channels were indicated as follows: Channel A, water (milli-Q); Channel B, ammonium acetate (MERCK, Cat. A135416836) 30% and acetonitrile (Sigma–Aldrich, Cat. 34851) 70%, pH 6.05; Channel C, acetonitrile (Sigma–Aldrich, Cat. 34851).

2.3.2. Separation and comparison of ESM, ESMc, ESMa and ESME

ESM, ESMc, ESMa and ESME were solubilized in water (milli-Q) respectively to get a solution at 10 mg/ml, and filtered (0.22 μm, Millipore). 100 μl of samples were injected, detected by a 2998 Photodiode Array detector (WATERS), and compared at 254 nm and 215 nm.

2.3.3. Collection of ESM

ESM was prepared at 25 mg/ml, 100 μl per-injection for the collection. The fractions were collected according to the profile of elution at 254 nm and 215 nm. The collection included the whole elution.

2.4. Scanning Electron Microscopy (SEM) coupled with Energy Dispersive X-ray Spectrometry (EDS)

Nacre powder and nacre extract were prepared onto a carbon coated metal device (specific for SEM), then the samples were desiccated and metalized. Metallographic observations were performed using a field emission gun scanning electron microscope (FEG-SEM JEOL7600F) equipped with an energy dispersive X-ray spectroscopy system (EDS-Oxford).

2.5. Cell culture and mineralization tests

This part was previously described (Brion et al., 2015) and adopted strictly. Some details and modification were indicated below.

2.5.1. Cell culture

Human osteoarthritic osteoblasts was achieved from the subchondral bone from OA patients undergoing total knee replacement (cooperation with Nancy Central Hospital, France), and

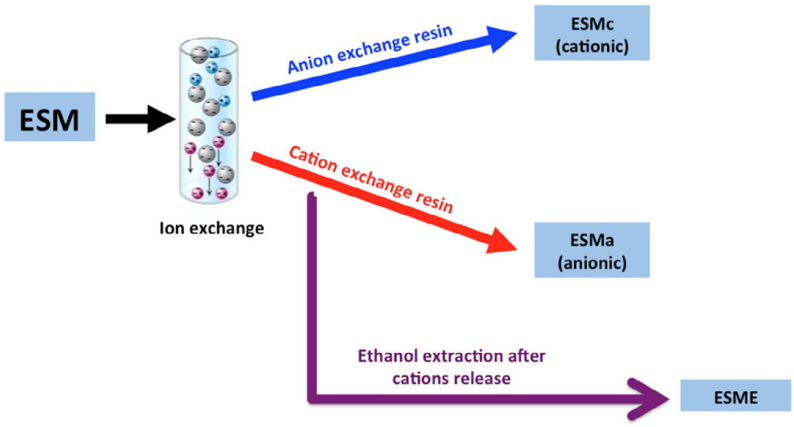


Fig. 1. Schema for the preparation of cationic ESM (ESMc), anionic ESM (ESMa) and the losed cationic part (ESME) during the preparation of ESMa.

Table 1
Mobile phase of elution program on cation exchange HPLC.

Time (min)	Flow rate (ml/min)	Channel A (%)	Channel B (%)	Channel C (%)
0	0.5			100
0.1	0.5			100
25	0.5		100	
40	0.5		100	
41	0.5	100		
71	0.5	100		
72	0.5			100
102	0.5			100

used at the 1st passage; mouse MC3T3-E1 cell line were provided from the European Collection of Cell Cultures (Sigma Aldrich, 99072810).

2.5.2. Treatment

ESM fractions and the identified compound were solubilized in culture medium and sterilized by filtration (0.22 μm, Millipore) before the treatment. OA osteoblasts and MC3T3-E1 cells were seeded in triplicate onto 48-well plates at 14,000 cell/cm^2 and 25,000 cell/cm^2 respectively. 10% FBS DMEM/F12 and 10% FBS αMEM medium were respectively used. After adherence, the cells were treated with ESM fractions at 200 μg/ml (except noted as 100 μg/ml) for 7, 14, 21 days in OA osteoblasts, and 7, 10, 12, 14 days in MC3T3-E1 cells. Ascorbic acid (50 μg/ml, Sigma) and β-glycerophosphate (10 mM, Sigma) were added into both culture media, used as control. Dexamethasone treated cells (100 nM, Sigma) were used as positive control.

2.5.3. Alizarin Red staining

The mineralization in extracellular matrix (ECM) was visualized by Alizarin Red staining, as the deposited calcium appeared red (Stanford et al., 1995). The stained cells were imaged with a LEICA microscope (M80, obj ×1) to get a general view of mineralization or an observation of mineralization nodules in detail. To quantify the degree of mineralization, the stained cultures were destained and the Alizarin Red concentrations in each well were determined by absorbance measurement at 405 nm, as previously described (Gregory et al., 2004).

2.6. Statistical analysis

Data was presented as mean ± standard error of the mean for each condition. Each experiment was repeated independently three times ($n = 3$). One factor-analysis of variance (ANOVA) was performed to evaluate the effect of each variable on two or more independent groups. For comparison between two group means, in which the response was affected by a single variable, an impaired *t*-test was performed. Any difference with a probability value less than 0.05 were considered statistically significant.

3. Results and discussion

3.1. Scanning Electron Microscopy reveals the ethanol extraction procedure as a moderate process for nacre extraction

Previously, the mostly tested WSM, as a major type of nacre extract, was extracted by water without decalcification (Rousseau et al., 2008). While, it has been long to believe that the osteoinductive compounds in nacre extract are referred to some organic molecules. Thus, it appears more reasonable to perform the extraction with an organic solvent, to avoid the interference of minerals and to get a higher concentrated organic matrix. The ethanol is chosen. As ESM is a very pioneering matrix for the research of nacreous osteoinductive compounds (Brion et al., 2015), it is necessary to confirm that the new procedure is also of no-decalcification.

For this purpose, the pre-extraction and post-extraction nacre powders are well desiccated, then observed under SEM. The observation is in SEI (secondary electron in-lens) mode at 4 kV. Before (Fig. 2a and c) or after the extraction (Fig. 2b and d), the characteristic brick-and-mortar structure of nacre is always sustained, and no trace of modification to the microstructure is observed. In addition, at the same scale, the organic matrix at lateral surface (arrow in Fig. 2a) and frontal surface (arrow in Fig. 2c) of nacre tablet decreased obviously (arrow in Fig. 2b and d), leaving a much smoother surface for the post-extraction powder. Directly and indirectly, the observation suggests that the ethanol extraction is a moderate process, which takes place only at the exposed surface and non-invasion into the crystal tablet, confirming that the process is without decalcification.

3.2. ESM is separated and purified as ESMc, ESMa and ESME by using ion-exchange resin

To investigate the osteoinductive compounds in ESM, we try this time an ionic approach. The first question to respond is that the osteoinductive compounds are cationic, anionic or neuter. Thus, as described above, the cations and anions in ESM are removed respectively by using ion-exchange resin to get anionic

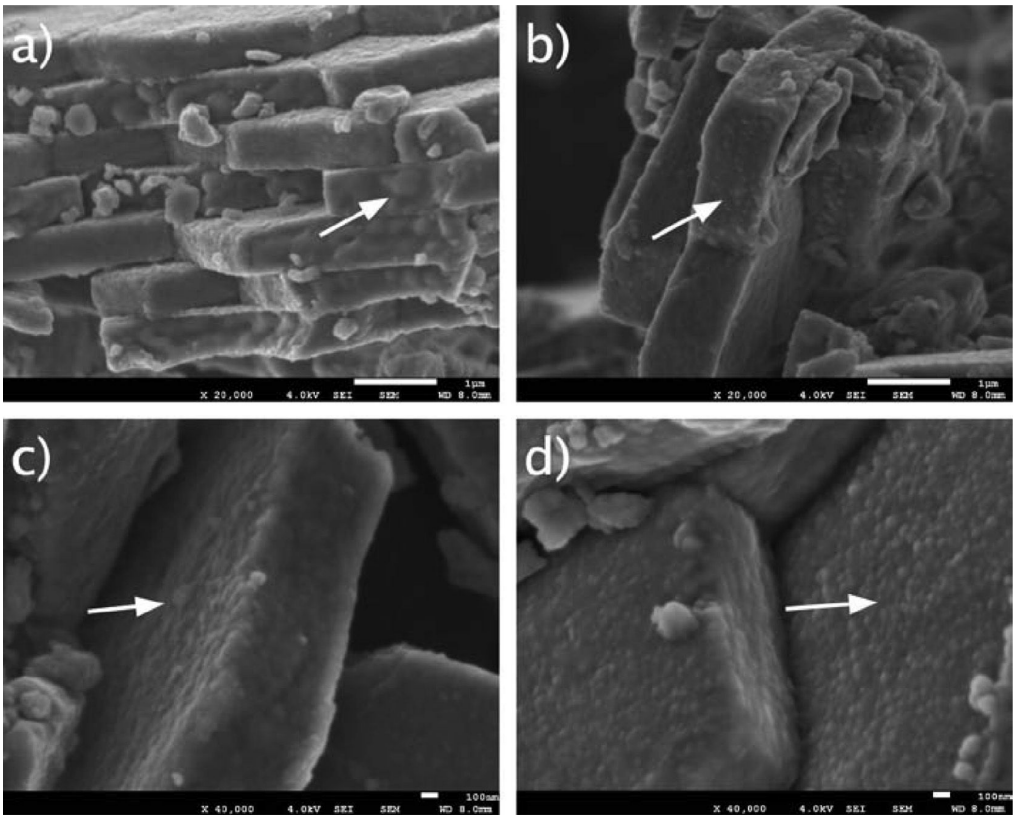


Fig. 2. SEM micrographs of the pre-extraction (a, c) and post-extraction (b, d) nacre powder, SEI mode, 4 kV. The organic matrix at lateral surface (arrow in a and b) and frontal surface (arrow in c and d) of nacre tablet is extracted by ethanol (b and d), without modification to nacre micro-architected structures. Scale bar corresponds to 1 μm (a, b) and 100 nm (c, d) respectively.

ESM and cationic ESM. From the results of pre-tests by Alizarin Red staining (data not shown), ESMc has an osteoinductive effect on OA osteoblasts, but not for ESMa. So, it is supposed that the osteoinductive compounds are cationic, and cation exchange resin has effectively caught the cations in ESM, which makes ESMa inactive for the osteoinduction in OA osteoblasts. To validate this hypothesis, it is no better than recycling the active cations from the cation exchange resin. That's why ESME is prepared, and no similar fraction from anion exchange resin is done simultaneously.

When the extractions are completed, i.e., after the lyophilization, the powders are scraped to pool into a glass flacon, and some optical micrographs are performed *in situ*. As shown in Fig. 3, generally, ESM, ESMc and ESME, which contain cations (excepting for Sodium), share a green appearance, while ESMa appears canary, totally different from the other ones. Compared to ESM, the 3 fractions have a more uniform color, implying that the complexity of ESM is decreased after a second extraction with water, as the substances which are indissolvable into water have been removed during the filtration. Besides, ESMc and ESMa look much finer than ESM, which could be regarded as a sign of purification. While, in ESME, many chunks are easily observed, which imply the presence of NaCl crystals, as ethanol has a considerable solubility for NaCl.

3.3. Pro-osteogenic effect of ESM relies on the cations

The ionic fractions of ESM are then tested in MC3T3-E1 cells and OA osteoblasts to verify the previous hypothesis. Besides, we wonder if there were an interaction between ESMc and ESMa, thus, an extra condition is added, for which the cells are treated with both ESMc and ESMa at the dose as treated respectively. The results of Alizarin Red staining and Alizarin Red assay are shown in Fig. 4 for MC3T3-E1 cells, and in Fig. 5 for OA osteoblasts.

3.3.1. Tests on MC3T3-E1 cells

In MC3T3-E1 cells, ESM, ESMc, ESME and ESMc + ESMa induce a cell mineralization from 7 days of treatment, and the mineralization increase with the time of treatment till the end of test. It seems that the mineralization by ESMc + ESMa is not stronger than that by individual ESMc. Dexamethasone has also an osteogenic effect for this cell line, but from 12 days, later than ESM fractions. The mineralization in control group is visualized from 12 days due to the two osteoinducers, ascorbic acid and β-glycerophosphate, and the mineralization in ESMa group belongs to this type.

The different mineralization degrees between the ESM fractions and control are so obvious that we could even determine visually, while, there is a significant difference only between ESMc and control at 10 days (Fig. 4b). But it is not hard to notice that the doses of Alizarin Red for each condition correspond very well to the staining in Fig. 4a, and all doses from 10 days have a wide standard error of the mean. Thus, the disaccord between the staining and assay is comprehensible. Because, although MC3T3-E1 is a mature cell line, as the passage of cells increases, the cells mineralize faster than those in earlier passage in the presence of osteoinducers.

3.3.2. Tests on OA osteoblasts

The human OA osteoblasts are tested as the MC3T3-E1 cells, but the staining is performed at 7, 14 and 21 days (Fig. 5a). The staining results are extremely similar to those in MC3T3-E1. ESM, ESMc, ESME and ESMc + ESMa induce a cell mineralization from 7 days of treatment, which increase with the time of treatment till the end of

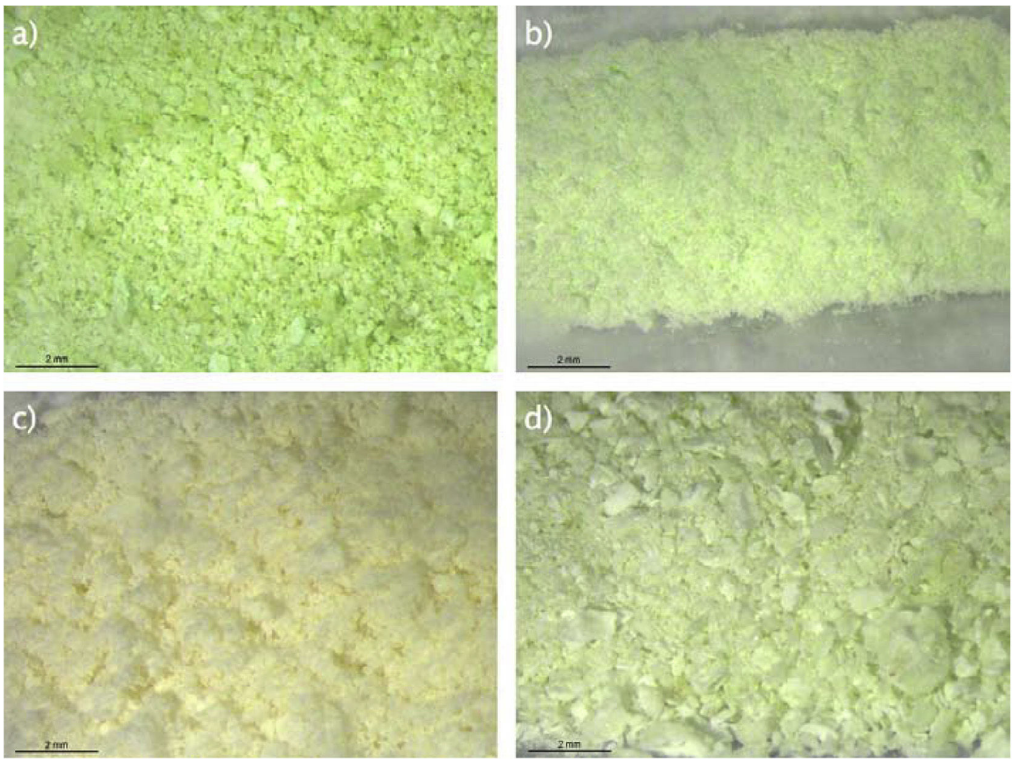


Fig. 3. Optical micrographs: (a) ESM, (b) ESMc, (c) ESMa and (d) ESME. ESM, ESMc and ESME share a green appearance, while ESMa appears canary. ESMc and ESMa present a finer appearance than ESM. LEICA microscope (M80, obj ×1). Scale bar corresponds to 2 mm.

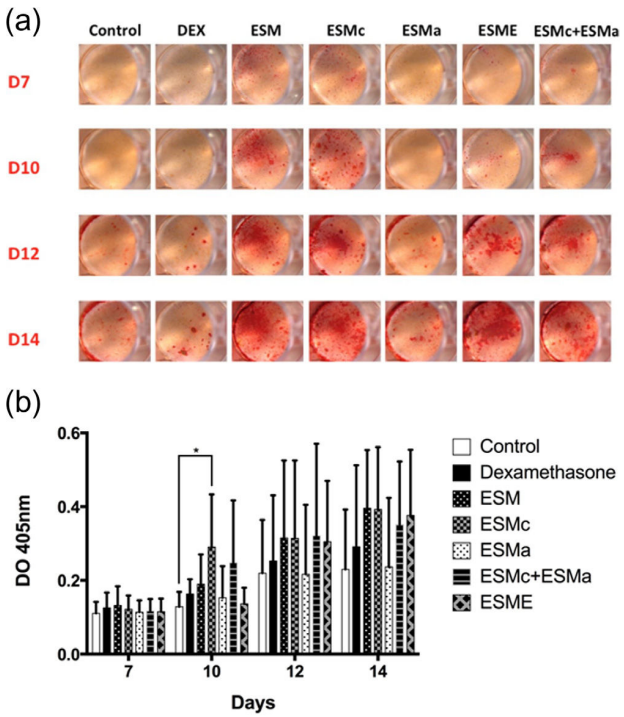


Fig. 4. ESMc increases mineralization of MC3T3-E1 cells. The cells (a) were treated with ESM (200 μg/ml) and ESM fractions (200 μg/ml) to induce mineralization. Cells not treated or treated with dexamethasone (100 nM) were used as control and positive control respectively. The cells were stained by Alizarin Red after 7, 10, 12 and 14 days of treatment and observed by optical microscopy (LEICA, M80, obj ×1). Scale bar is 2 mm. Alizarin Red assay (b) measured at 405 nm. *t*-Test: $^{*}P < 0.05$.

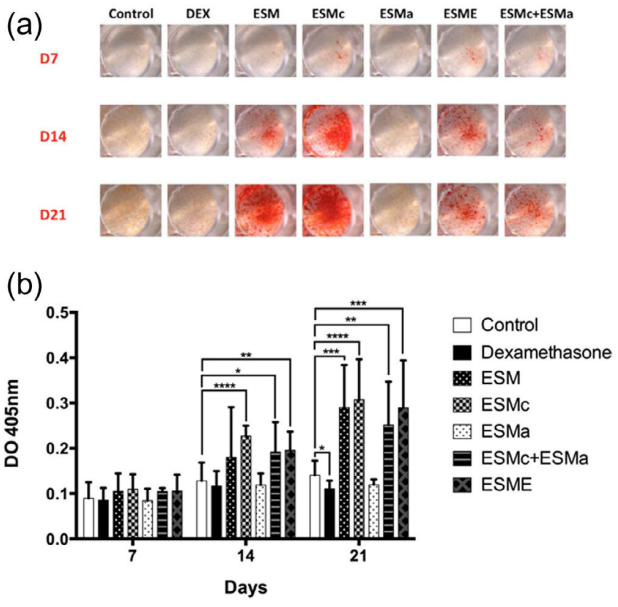


Fig. 5. ESMc increases mineralization of human OA osteoblasts. The cells (a) were treated with ESM (200 μg/ml) and ESM fractions (200 μg/ml) to induce mineralization. Cells not treated or treated with dexamethasone (100 nM) were used as control and positive control respectively. The cells were stained by Alizarin Red after 7, 14 and 21 days of treatment and observed by optical microscopy (LEICA, M80, obj ×1). Scale bar is 2 mm. Alizarin Red assay (b) measured at 405 nm. *t*-Test: $^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$; $^{****}P < 0.0001$.

test. No mineralization induced by ESMa is observed. While, dexamethasone has no osteogenic effect for OA osteoblasts, even in our previous study, the mineralization induced by dexamethasone in OA osteoblasts is scarcely observed, as in control. This confirms the results observed in the previous study (Brion et al., 2015).

When compared to control (Fig. 5b), ESMc, ESME and ESMc + ESMa have a higher degree of mineralization from 14 days, also for ESM but from 21 days, no significant difference for ESMa, and a lower degree of mineralization for dexamethasone at 21 days. Similarly, the non-significance between ESM and control at 14 days may relate to the wide standard error of the mean of ESM, in combining with the results of other ESM fractions as the significance is found in the later study (Fig. 10b). As for the significance between control and dexamethasone at 21 days, a larger sample number may be needed to validate the effect, as the difference here is rather subtle, and opposite to the later study (Fig. 10b). No significant difference is observed between ESM and ESMc, ESMc and ESMc + ESMa. ESM and ESM fractions have a stronger osteoinduction capacity than dexamethasone, sooner or later during the 21 days of treatment (not shown in figure).

Taking together the results in both cells, we believe that the hypothesis mentioned above is confirmed, the ESMc is responsible for the osteoinduction capacity of ESM, and no interaction with ESMa is observed. The lost cations are recycled as ESME and demonstrated active. Thus, the cations in ESM need to be investigated further to approach the nacreous osteoinductive compounds.

3.4. Being separated by cation exchange HPLC, ESMc, ESMa and ESME are coherent with ESM

To continue, we try to use HPLC to separate ESM. In consideration of the characters of osteoinductive compounds in ESM, precisely, being organic molecules and positive charge, a cation exchange HPLC chain is chosen. As described in Section 2, based on the ERLIC method (Alpert, 2008), we develop a new program for cation exchange HPLC (Table 1), which permits to separate the solutes in ESM by the difference in polarity and positive charge. The more polar and charged a solute, the later it elutes. As the organic molecules is widely supposed to be proteins or peptides (see Section 1), the detection is done at 215 nm and at 254 nm for the detection of single bonds for double bonds respectively. Then the graphs of ESM, ESMc, ESMa and ESME are compared respectively at 215 nm (Fig. 6a) and 254 nm (Fig. 6b).

At 215 nm (Fig. 6a), 10 peaks are visually separated in ESM, respectively at 9.4, 10.8, 11.3, 23.9, 24.1, 36.1, 43.5, 56.1, 58.0 and 86.6 min of elution. All the peaks observed in ESMc, ESMa and ESME could be found in ESM, suggesting that the ESM fractions are all origin from ESM and no contamination of organic molecules occurs during the multi-procedure extraction. When compared to ESM, the peaks in ESMc and ESMa are complementary, the peaks disappear in ESMc (peak at 10.8 and 24.1 min) can be found in ESMa, and the peak which has a poor absorbance (peak at 36.1 min) has a more intense absorbance in ESMc, and so as to the peak at 9.4 and 11.3 min but in contrary. In addition, ESME corresponds strictly with ESMc, and present a higher absorbance. While, the last 3 peaks, precisely, the peak at 56.1, 58.0 and 86.6 min, are found also in injection of control (with water, data not shown), thus, the peaks are from the mobile phase, explaining their appearance in all the four samples and the rare difference among them. The graphs at 254 nm (Fig. 6b), supports completely the observation and discussion at 215 nm, but the absorbance decreases enough that the peak at 23.9 and 24.1 min could not be visual. However, in ESME, the peak at 11.3 min is less intense than in ESMc, in contrary, the peak at 43.5 min in ESME is very outstanding in all 4 samples, suggesting that the peak at 43.5 min is more complex in composition than the other compounds, as peptide or protein. Compared to ESM, a new peak appears at 40.0 min in ESMc and the absorbance increases in ESME, while looking back at 254 nm, ESME has a tiny absorbance at 40.0 min, thus, we believe the peak at 40 min is from ESM but not visual due to a low absorbance in ESM.

The results demonstrate that ESME is certainly a mixture of ESMc and NaCl. As ESME is totally from the cation exchange resin, conversely, it proves that ESMc is composed absolutely of a cationic part of ESM, and the anion exchange with resin by using the current protocol is efficiency and credible. Although the absorbance of peak at 11.3 and 24.1 min is also important in ESMa, that is not obliged to conclude that the cation exchange with resin is not credible, as organic molecule, the conditions of charge are sometimes complex and even ambident. Even though, there is still a preference of ionization, acid or basic, for these molecules, that's why the peaks appearing in ESMc and in ESMa are all complementary. For the instance, the ambident ionization does not matter the research of active compounds in ESM, as the cation exchange resin has well caught the cationic and active compounds. Anyway, the peak at 23.9, 36.1, 40.0 and 43.5 min deserve more attention for the identification of osteoinductive compounds in ESM, because a relative concentration in ESMc and ESME is observed when compared to ESMa.

3.5. Collection of ESM on cation exchange HPLC

As the solvent and buffer solution used in mobile phase are all volatile during a lyophilization, a collection of ESM is performed under the same conditions subsequent to the separation. The schema for collection is presented below (Fig. 7).

The elution of ESM is fractioned to collect in combining with the absorbance at 254 nm and 215 nm, with the purpose of collecting peak by peak. As the peak at 9.4, 10.8 and 11.3 min, and the peak at 23.9 and 24.1 min are too close, the peaks are collected as a group of peaks. The collection for the peak at 23.9, 36.1, 40.0 and 43.5 min is well considered, initially, they should be collected respectively. But, the peak at 40.0 min is close to both the peak at 36.1 min and at 43.5 min, and more than a hundred of injections are predicted for the full collection. To avoid a possible contamination between the fractions, also considering the mobile phase has changed from 40.0 min, the peak is finally collected together with the peak at 36.1 min as F5 (Fraction 5). The peak at 23.9 min and at 43.5 min is collected respectively as F4 and F6. The collection includes the whole elution to avoid any possible loss of molecules. Finally, 10 fractions are collected, pooled and evaporated respectively before the lyophilization. The evaporation is performed at 40 °C, 235 mBar at 100 rpm by Rotavapor (Heidolph, Hei-Vap).

The results of collection are listed in Table 2, and some optical micrographs of the fractions *in situ* after the lyophilization are supplied as Supplementary Data 1. 10 fractions, F1 to F10, most of which have a poor proportion in ESM, only about 1% for each, including F4, while, F5 and F6, take the major proportion, 30.4% and 60.7% respectively. The recovery rate indicates that ESMc may make up the major part of ESM in mass, as F5 and F6 are concentrated in ESMc. While, F7 to F10, collected during the washing period, have also a proportion, confirming that the normal elution time is not enough to elute all the molecules in ESM and a washing program is needed to well condition the column before a new injection. In addition, the collection is demonstrated effective, as the proportion of F7 to F10 is poor, the needed fractions are well collected.

Then the fractions are prepared to test their osteoinductive capacity in cells. But an obvious concern is that, excepting for F5 and F6, the most of the fractions have not an enough quantity for even one test at a classic dose, thus, to avoid the unequal dose between the fractions, also a consideration of possible

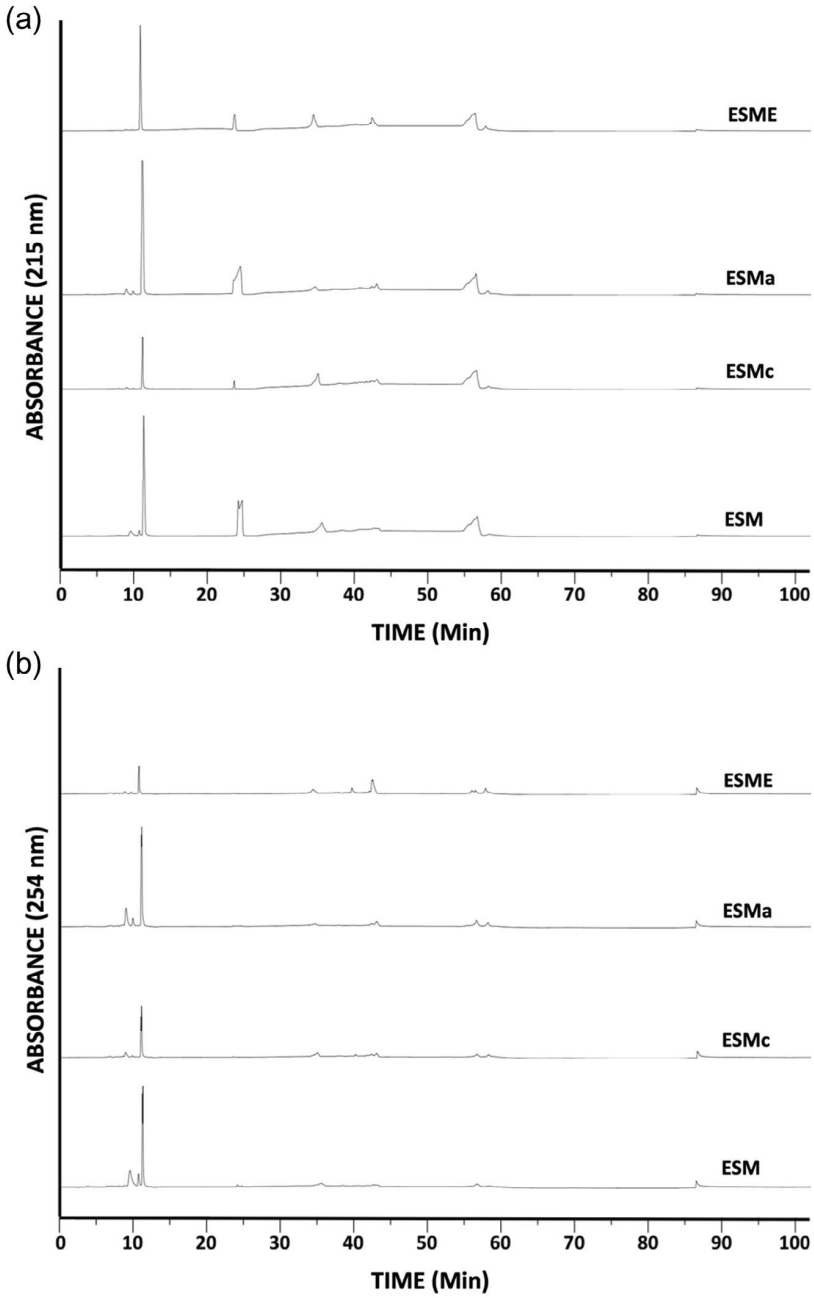


Fig. 6. Comparison between ESM and ESM fraction by cation exchange HPLC at 215 nm (a) and 254 nm (b). Interchim Column UP5SCX-250/046 is used, in gradient mode, with a personal developed program (see Table 1) to separate the samples. At both wavelengths, the peaks appearing in ESMc, ESMa and ESME are all observed in ESM, but the absorbance intensity of each peak depend on the samples.

toxicity, the solution of each fraction is prepared by imitating their dose in ESM. In the future, we will have to develop a more sensitive activity-screening tool to test the compounds present in small amount. A pre-test is firstly conducted in MC3T3-E1 cells. F5 and F6 are observed to have induced a formation of mineralization nodules (data not shown). Afterwards, F5 and F6 are prepared at classic concentration and treated onto the two cell models systematically to validate their osteoinductive capacity (see Section 3.6). Before that, some observations of the purified ESM fractions under Scanning Electron Microscopy are performed (see Section 3.5).

3.6. A SEM observation into the ESM fractions and elemental analysis by EDS

ESM, and the most important ESM fractions, ESMc, ESMa and F6, are observed under SEM, with the purpose to compare the exterior appearance at micro scale, revealing directly or indirectly some characters of the osteoinductive compounds. Simultaneously, the topical elemental analysis at several positions of the samples is performed by EDS to supply a view on the chemical composition of ESM fractions. The SEM micrographs are presented in Fig. 8. The results of EDS analysis is shown as Supplementary Data 2.

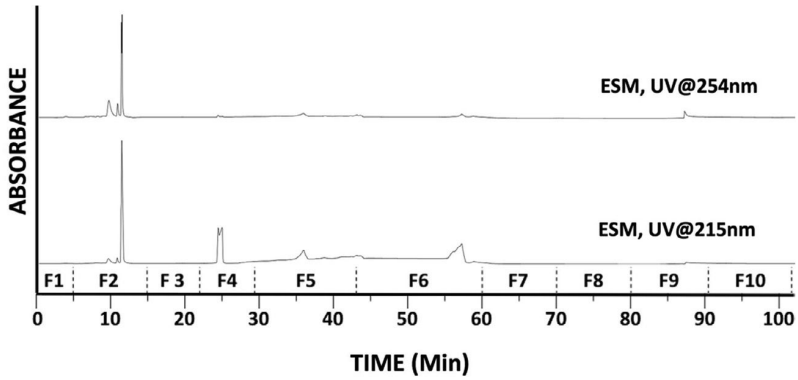


Fig. 7. 10 HPLC fractions of ESM are collected in combining with the absorbance at 254 nm and 215 nm. A cation exchange column (Interchim Column UP5SCX-250/046) is used, in gradient mode, with a developed program (see Table 1) to separate the samples. Note that the collection included the whole elution, and the graphs at 254 nm and 215 nm are not at the same absorbance scale.

Table 2
Recovery rate of 10 HPLC fractions of ESM.

Fraction	Time of collection (min)	Mass (mg)	Percentage (%)
F1	0.00–5.00	2.0	0.4
F2	5.02–15.00	6.1	1.1
F3	15.02–22.00	2.5	0.5
F4	22.02–29.00	5.3	1.0
F5	29.02–43.00	169	30.4
F6	43.02–60.00	342.7	61.7
F7	60.02–70.00	8.7	1.6
F8	70.02–80.00	7.0	1.3
F9	80.02–91.00	5.6	1.0
F10	91.02–102.00	6.2	1.1
		555.1 (total)	100 (total)

SEM images (Fig. 8) show that ESM, ESMc and F6 are all a mixture of organic matrix and mineral crystals (Fig. 8a, c, and g), but organized differently. In ESM, the crystals are embedded into the organic matrix, but easily recognized (Fig. 8b), while in ESMc, the crystals are separated with the matrix (Fig. 8d), what's more, in F6, the organic matrix is even loose and fiber-like, and the crystals are very irregular (Fig. 8g and h), suggesting that the crystals are formed in a different solution environment from ESM and ESMc. After all, the micrographs of F6 present an evidence of purification, as the organic part exists in a certain form. The most interesting discovery is that, ESMa is nearly composed of pure and regular crystals, no matrix is observed (Fig. 8e and f).

Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) allows one to identify what those particular elements are and their relative proportions in atomic% or in mass%, which gives a possibility to infer the composition of molecules. The results show that, all the crystals observed in Fig. 8, are of NaCl crystals, as Na and Cl make up the majority of the crystals in mass and with a 1:1 atomic percentage, suggesting that ESMa is almost composed of NaCl. In addition, the abundant presence of calcium and chloride is observed in ESM, ESMc, F5, and especially in F6. While, it is not obliged to verdict that the two elements formed always $CaCl_2$, as the atomic percentage between them varies a lot, it could be 2:1, also 1:0, or 0:1. But certainly, no calcium is detected in ESMa. Thus, it is necessary to test $CaCl_2$ on the cell models to determine the effect of the sensitive element on cell mineralization (see Section 3.6).

The results herein may explain some questions hidden above. As for the proportion of HPLC fractions, F4 to F6, which is concentrated in ESMc and ESME, make up in total 92.1% of ESM, implying that the cationic part of ESM (pure cations) takes certainly more than 46% of mass. As we know here, ESMa is almost composed of NaCl, demonstrating that the anionic part of ESM is almost chloride anion. Surely, the anions in ESMc are all chloride anion, suggesting that ESMc makes directly about 92% of ESM. This is meaningful to explain the results of staining in Section 3.3, why there is no significant difference between ESM and ESMc on the osteoinductive capacity; the reason is that, the proportions of osteoinductive compounds in the two active matrices are too close. And, in F5 and F6, there is no crystal being composed of calcium, suggesting that the calcium should be incorporated into organic molecules and the molecules are charged generally positive. In this way, the calcium is eluted, collected and present in the cationic fractions, F5 and F6.

3.7. Pro-osteogenic effet of HPLC fractions of ESM and of free calcium

In this section, we test F5 and F6 on the two cell models to validate their osteoinductive capacity, as discussed in Section 3.4. For $CaCl_2$ (VWR. PROLABO. Cat.22328.262), the dose of treatment is yet to decide. The primary concern is the tolerance for the cells. A quantitative analysis of mineral elements on total ESM shows that the calcium takes 16.8% of the mass (data not shown), based on which, we calculate the dose of $CaCl_2$ by imitating the proportion of Ca in ESM; finally, the dose of $CaCl_2$ for the cells is about 100 μg/ml ($CaCl_2$ 100). While, as the dose is not far away from the classic dose 200 μg/ml ($CaCl_2$ 200), we test the two doses on the cells to facilitate some possible comparisons.

3.7.1. Tests on MC3T3-E1 cells

The results are shown in Fig. 9. On the staining (Fig. 9a), an easily visual mineralization is firstly observed in the cells treated by $CaCl_2$ 100 at 7 days, then ESM and $CaCl_2$ 200 at 10 days, dexamethasone and F6 at 12 days, F5 and control at 14 days. After the Alizarin Red assay, generally, the results correspond well to that of staining. When compared to control, $CaCl_2$ 100 from 7 days, ESM from 10 days, $CaCl_2$ 200 from 12 days and dexamethasone from 14 days have a significant difference on the absorbance of Alizarin Red. No significant difference between F5 and control is observed. A significant difference between F6 and control at 7 days is observed, which did not correspond to the staining, because there is a well very intensely but abnormally stained. When compared to ESM, $CaCl_2$ 200 has a significant difference only from 12 days, and $CaCl_2$ 100 at 14 days (not shown in figure). No significant difference between the two doses of $CaCl_2$. To note here, the $CaCl_2$ 200 induces a later mineralization than $CaCl_2$ 100, and both the two conditions have a large standard error of the mean from 10 days when compared to the other conditions.

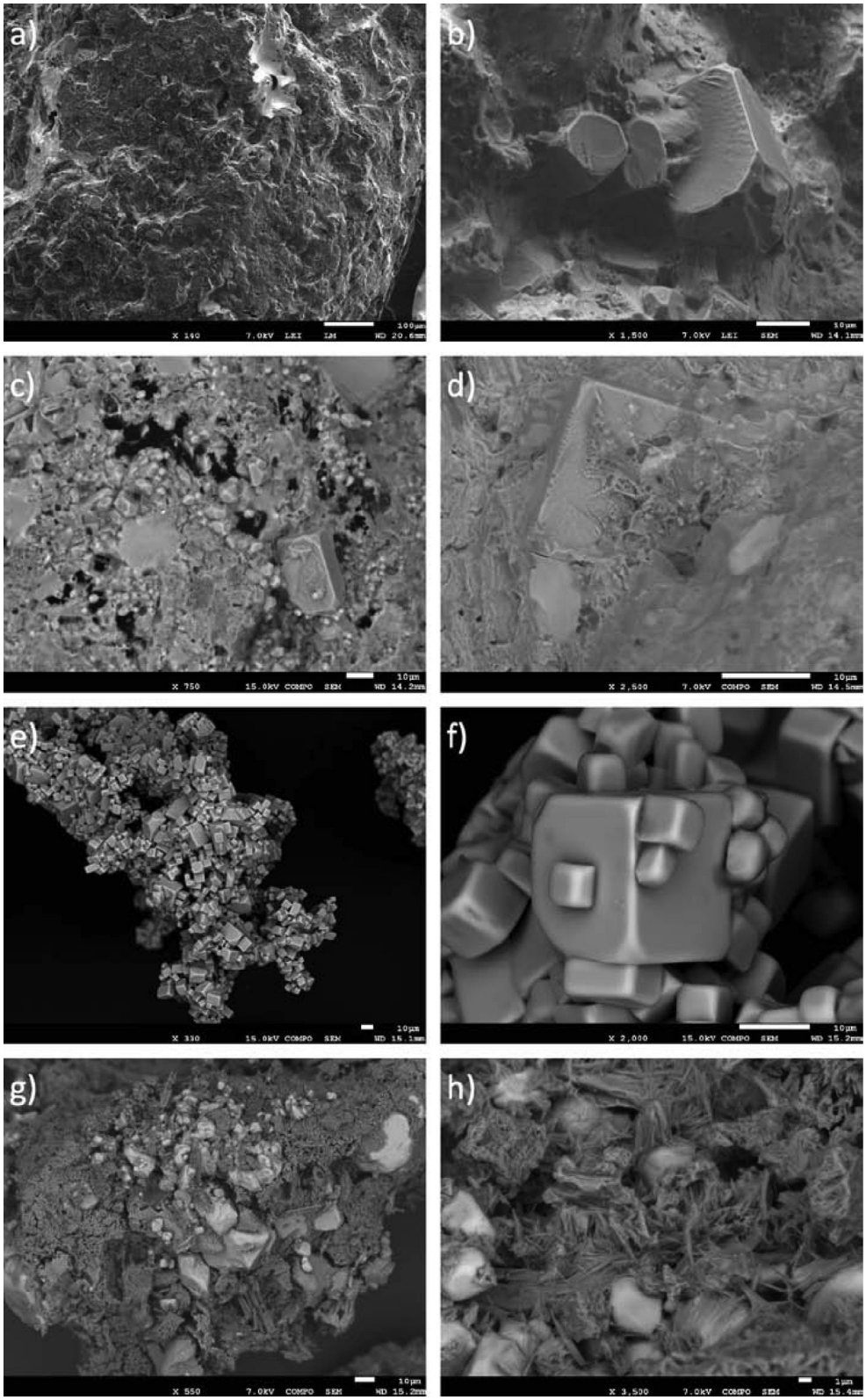


Fig. 8. SEM micrographs of (ab) ESM, (cd) ESMc, (ef) ESMa and (gh) F6. (a) ESM is a mixture of organic matrix and mineral crystals, (b) and the crystals are embedded into the organic matrix, but easily recognized; (c) ESMc is also a mixture like ESM, but the crystals are separated with the matrix, (d) when focused onto the matrix, the crystals are difficult to recognize; (e, f) ESMa is nearly composed of pure and regular crystals, no matrix is observed; (g, h) F6 is majorly made of organic matrix, loose and fiber-like, separated with the very irregular crystals. Photograph conditions: (a) LEI mode for (a, b), COMPO mode for (c to h), 7.0 kV for (a, b, d, g, h), 15.0 kV for (c, e, f), scale bars correspond to 100 μm (a), 10 μm (b–g) and 1 μm (h) respectively.

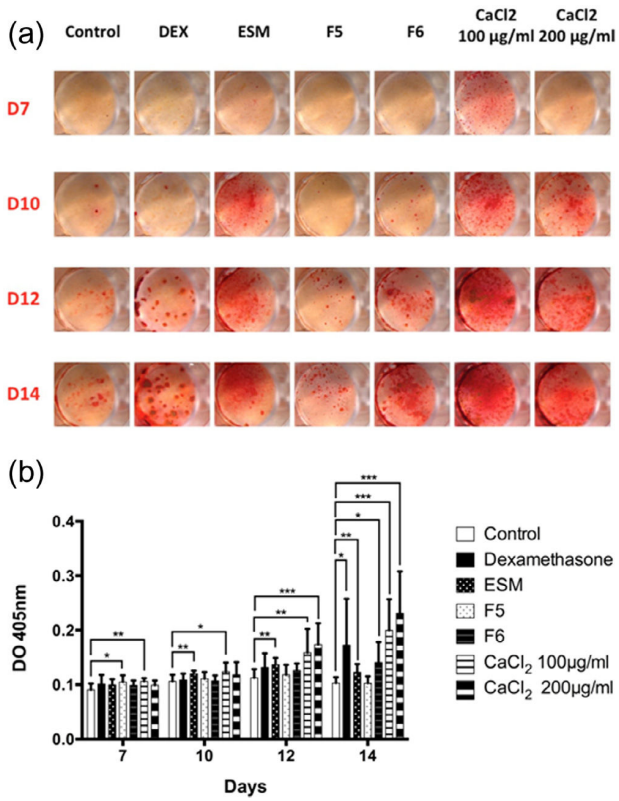


Fig. 9. F6 and $CaCl_2$ increased mineralization of MC3T3-E1 cells. The cells (a) were treated with HPLC fractions of ESM (200 µg/ml) and $CaCl_2$ (100 µg/ml and 200 µg/ml) to induce mineralization. Cells not treated or treated with dexamethasone (100 nM) were used as control and positive control respectively. The cells were stained by Alizarin Red after 7, 10, 12 and 14 days of treatment and observed by optical microscopy (LEICA, M80, obj ×1). Scale bar is 2 mm. Alizarin Red assay (b) measured at 405 nm. *t*-Test: $^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$.

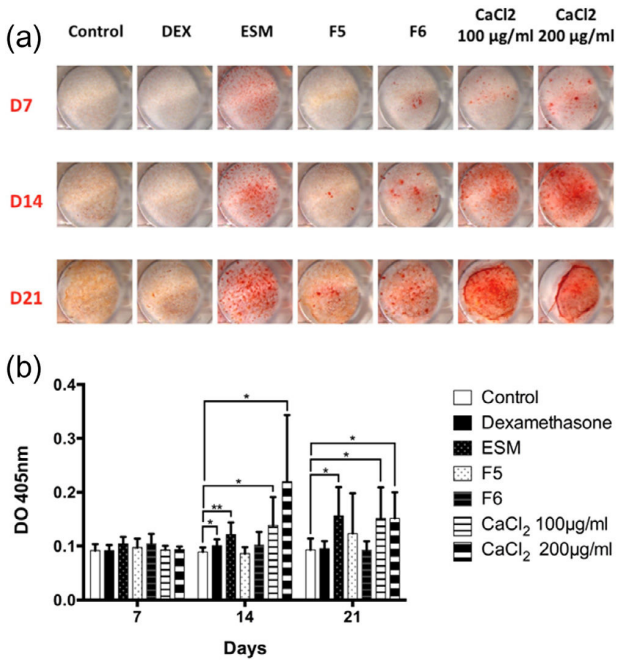


Fig. 10. $CaCl_2$ increased mineralization of human OA osteoblasts. The cells (a) were treated with HPLC fractions of ESM (200 µg/ml) and $CaCl_2$ (100 µg/ml and 200 µg/ml) to induce mineralization. Cells not treated or treated with dexamethasone (100 nM) were used as control and positive control respectively. The cells were stained by Alizarin Red after 7, 14 and 21 days of treatment and observed by optical microscopy (LEICA, M80, obj ×1). Scale bar is 2 mm. Alizarin Red assay (b) measured at 405 nm. *t*-Test: $^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$.

3.7.2. Tests on OA osteoblasts

The results are shown as Fig. 10. In the staining part (Fig. 10a), the mineralization is visually from 7 days by ESM, F6, $CaCl_2$ 100 and $CaCl_2$ 200, from 14 days for F5, no mineralization is observed in the two controls. Note that the mineralized cell layers treated with $CaCl_2$ have a tendency to detach from the dish. As for the assay (Fig. 10b), when compared to control, ESM, $CaCl_2$ 100 and $CaCl_2$ 200 have a significant difference from 14 days, F6 has no significant difference, while, dexamethasone has a significant difference at 14 days, as discussed in Section 3.3, it is not credible. In addition, ESM has a significant difference over both dose of $CaCl_2$ at 7 days (not shown in figure). No significant difference between the two doses of $CaCl_2$. Note the large standard error of the mean for $CaCl_2$ 100 and $CaCl_2$ 200 from 14 days.

Taking together the tests of mineralization on MC3T3-E1 cells and OA osteoblasts, we have a impression that F5 and F6 have an osteoinductive capacity, but not stable enough, giving scarcely a significant difference for the mineralization compared to control. A further study may be needed to adjust the collection conditions to test the possible interaction between the cationic fractions.

The mineralization and assay related to $CaCl_2$ are outstanding, even induces a stronger mineralization than ESM. While, there is no difference between the two doses, in contrary, at early days of treatment, $CaCl_2$ even inhibits the mineralization to an extent. And the mineralization induced by $CaCl_2$ seems also less stable than ESM, as the absorbance of Alizarin Red is frequently seen at a large standard error of the mean. Also, the tests on OA osteoblasts are initially designed as long as 28 days, but the cells treated with $CaCl_2$ have an obvious tendency to proliferate rather than to differentiate when compared to the other cells, resulting in a severe detachment at 28 days and impossible to perform the assay and comparison. What's more, when looking into the mineralization nodules at a higher magnificence under optical microscopy, we find that the nodules induced by ESM and $CaCl_2$ are similar but not completely the same (shown as Supplementary Data 3), which needs to be analyzed by using Raman spectroscopy.

(Mahamid et al., 2011) demonstrate that, *in vivo* osteoblasts actively produce disordered mineral packets within intracellular vesicles for mineralization of the extracellular developing bone tissue, and the phosphate entities are first formed and thereafter gradually sequester calcium within the vesicles. This mode of mineral deposition into collagen matrices, is namely that an amorphous mineral precursor is transiently formed and deposited within the gap zones inside the collagen fibril, followed by crystallization into hydroxyapatite (Mahamid et al., 2010; Olszta et al., 2007; Weiner, 2008). This strategy is widely employed by many invertebrates for the formation of their calcium carbonate mineralized tissues (Weiner et al., 2009). Our *in vitro* results on $CaCl_2$ confirm this study and an *in vitro* study in osteoblastic ROS17/2.8 cells (Matsuoka et al., 1999), as the free Ca induces cell mineralization by a supply of calcium. But the free Ca is not the best source for bone mineralization. As revealed by Hamdi et al. (2015), although $CaCl_2$ has a highest solubility at different pH, but has a lower osteoinduction capacity than limestone and fat-encapsulated tricalcium phosphate in broiler chickens, implying that some other molecules are involved to regulate the process. To date, the regulating molecules are supposed to be proteins or peptides (Rousseau et al., 2008; Rousseau, 2003). Calcium is also proven promoting cell proliferation (Takita et al., 2006), and osteoblastic differentiation (Matsumoto et al., 2013), even at 0.35 mmol/l, corresponding to our observations.

4. Conclusion

We have developed a new method for separating and purifying the nacre extracts by an ionic approach. By this method, we prove that the pro-osteogenic effect of ESM relies on the cationic part, without interaction with the anionic part. The osteoinductive compounds we seek may supply a regulating signal to make the process moderate and correct. The calcium in ESM is demonstrated to play a role in inducing the mineralization, and should be incorporated into organic molecules, precisely, into the cationic parts. Interactions between the cationic fractions are possible.

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

Thanks for the China Scholarship Council (award to Ganggang Zhang for 4 years' PhD study abroad at the Université de Lorraine). We would like to thank Madame Sandrine MATHIEU and her laboratory (University of Lorraine, GeoRessources 7359 research unit, 54500 Vandoeuvre) for the help on SEM imaging and analysis.

Authors' roles: GZ, ASW, AB, MHP, VM, AB, DM, LG, PG and MR designed and performed the experiments. GZ and MR wrote the manuscript. MR accepts responsibility for the integrity of the data analysis.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2016.03.016.

References

Alpert, A.J., 2008. Electrostatic repulsion hydrophilic interaction chromatography for isocratic separation of charged solutes and selective isolation of phosphopeptides. Anal. Biochem. 80, 62–76.
Atlan, G., Balmain, N., Berland, S., Vidal, B., Lopez, E., 1997. Reconstruction of human maxillary defects with nacre powder: histological evidence for bone regeneration. C. R. Acad. Sci. III 320, 253–258.
Atlan, G., Delattre, O., Berland, S., LeFaou, A., Nabias, G., Cot, D., Lopez, E., 1999. Interface between bone and nacre implants in sheep. Biomaterials 20, 1017–1022.
Brion, A., Zhang, G., Dossot, M., Moby, V., Dumas, D., Hupont, S., Piet, M.H., Bianchi, A., Mainard, D., Galois, L., Gillet, P., Rousseau, M., 2015. Nacre extract restores the mineralization capacity of subchondral osteoarthritis osteoblasts. J. Struct. Biol. 192, 500–509.
Chaturvedi, R., Singha, P.K., Dey, S., 2013. Water soluble bioactives of nacre mediate antioxidant activity and osteoblast differentiation. PLoS One 8 e84584.
Colvin, J.R., 1961. Synthesis of cellulose from ethanol-soluble precursors in green plants. Can. J. Biochem. Physiol. 39, 1921–1926.
Couchourel, D., Aubry, I., Delalandre, A., Lavigne, M., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.-P., Lajeunesse, D., 2009. Altered mineralization of human osteoarthritic osteoblasts is attributable to abnormal type I collagen production. Arthritis Rheum. 60, 1438–1450.
Esen, A., 1986. Separation of alcohol-soluble proteins (zeins) from maize into three fractions by differential solubility. Plant Physiol. 80, 623–627.
Green, D.W., Kwon, H.-J., Jung, H.-S., 2015. Osteogenic potency of nacre on human mesenchymal stem cells. Mol. Cells 38, 267–272.
Gregory, C.A., Grady Gunn, W., Peister, A., Prockop, D.J., 2004. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. Anal. Biochem. 329, 77–84.
Hamdi, M., Solà-Oriol, D., Davin, R., Perez, J.F., 2015. Calcium sources and their interaction with the different levels of non-phytate phosphorus affect performance and bone mineralization in broiler chickens. Poult. Sci. 94, 2136–2143.
Huebner, F.R., Bietz, J.A., 1993. Improved chromatographic separation and characterization of ethanol-soluble wheat proteins. Cereal Chem. 70, 506.
Kim, Y.-W., Kim, J.-J., Kim, Y.H., Rho, J.-Y., 2002. Effects of organic matrix proteins on the interfacial structure at the bone-biocompatible nacre interface in vitro. Biomaterials 23, 2089–2096.
Lamghari, M., Antonietti, P., Berland, S., Laurent, A., Lopez, E., 2001. Arthrodesis of lumbar spine transverse processes using nacre in rabbit. J. Bone Miner. Res. 16, 2232–2237.
Lamghari, M., Berland, S., Laurent, A., Huet, H., Lopez, E., 2001. Bone reactions to nacre injected percutaneously into the vertebrae of sheep. Biomaterials 22, 555–562.
Lopez, E., Milet, C., Lamghari, M., Pereira Mouries, L., Borzeix, S., Berland, S., 2003. The dualism of nacre. Key Eng. Mater. 254–256, 733–736.
Mahamid, J., Aichmayer, B., Shimoni, E., Ziblat, R., Li, C., Siegel, S., Paris, O., Fratzl, P., Weiner, S., Addadi, L., 2010. Mapping amorphous calcium phosphate transformation into crystalline mineral from the cell to the bone in zebrafish fin rays. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107, 6316–6321.
Mahamid, J., Sharir, A., Gur, D., Zelzer, E., Addadi, L., Weiner, S., 2011. Bone mineralization proceeds through intracellular calcium phosphate loaded vesicles: a cryo-electron microscopy study. J. Struct. Biol. 174, 527–535.
Marin, F., Le Roy, N., Marie, B., 2012. The formation and mineralization of mollusk shell. Front. Biosci. 4, 1099–1125.
Matsumoto, S., Hayashi, M., Suzuki, Y., Suzuki, N., Maeno, M., Ogiso, B., 2013. Calcium ions released from mineral trioxide aggregate convert the differentiation pathway of C2C12 cells into osteoblast lineage. J. Endod. 39, 68–75.
Matsuoka, H., Akiyama, H., Okada, Y., Ito, H., Shigeno, C., Konishi, J., Kokubo, T., Nakamura, T., 1999. In vitro analysis of the stimulation of bone formation by highly bioactive apatite- and wollastonite-containing glass-ceramic: released calcium ions promote osteogenic differentiation in osteoblastic ROS17/2.8 cells. J. Biomed. Mater. Res. 47, 176–188.
Milet, C., Berland, S., Lamghari, M., Mouries, L., Jolly, C., Borzeix, S., Doumenc, D., Lopez, É., 2004. Conservation of signal molecules involved in biomineralisation control in calcifying matrices of bone and shell. C.R. Palevol. 3, 493–501.
Olszta, M.J., Cheng, X., Jee, S.S., Kumar, R., Kim, Y.-Y., Kaufman, M.J., Douglas, E.P., Gower, L.B., 2007. Bone structure and formation: a new perspective. Mater. Sci. Eng. R. Rep. 58, 77–116.
Rousseau, M., 2003. The water-soluble matrix fraction from the nacre of Pinctada maxima produces earlier mineralization of MC3T3-E1 mouse pre-osteoblasts. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 135, 1–7.
Rousseau, M., Boulzaguet, H., Biagianti, J., Duplat, D., Milet, C., Lopez, E., Bédouet, L., 2008. Low molecular weight molecules of oyster nacre induce mineralization of the MC3T3-E1 cells. J. Biomed. Mater. Res. A 85, 487–497.
Rousseau, M., Delattre, O., Gillet, P., Lopez, E., 2012. Subchondral nacre implant in the articular zone of the sheep's knee: a pilot study. Biomed. Mater. Eng. 22, 227–234.
Stanford, C.M., Jacobson, P.A., Eanes, E.D., Lembke, L.A., Midura, R.J., 1995. Rapidly forming apatitic mineral in an osteoblastic cell line (UMR 106–01 BSP). J. Biol. Chem. 270, 9420–9428.
Takita, T., Hayashi, M., Takeichi, O., Ogiso, B., Suzuki, N., Otsuka, K., Ito, K., 2006. Effect of mineral trioxide aggregate on proliferation of cultured human dental pulp cells. Int. Endod. J. 39, 415–422.
Wang, X., Liu, S., Xie, L., Zhang, R., Wang, Z., 2011. Pinctada fucata mantle gene 3 (PFMG3) promotes differentiation in mouse osteoblasts (MC3T3-E1). Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 158, 173–180.
Weiner, S., 2008. Biomineralization: a structural perspective. J. Struct. Biol. 163, 229–234.
Weiner, S., Mahamid, J., Politi, Y., Ma, Y., Addadi, L., 2009. Overview of the amorphous precursor phase strategy in biomineralization. Front. Mater. Sci. China 3, 104–108.

Chapitre 2. Approche utilisant les gènes rapporteurs

Publication N°4
Manuscrit résumé en français
«Zhang et al, 2017» en préparation, et 2 déclarations d'invention en cours

Invention 1 : Outil de détection de l'activité ostéogénique

Invention 2 : Peptides ostéogéniques issus de la nacre

L'identification des composés ostéogéniques de la nacre par l'approche de gène rapporteur

Zhang G, Brion A, Piet MH, Bianchi A, Paris C, Gillet P, Rousseau M

1. Introduction.

La nacre se situe dans la couche interne de la coquille des mollusques. Sa disponibilité vaste et étendue, son coût compétitif, l'opacité aux rayons X, la structure hiérarchique unique, sa complexité chimique et ses propriétés mécaniques exceptionnelles font de la nacre un biomatériau naturel et multi-usage comme substitut de greffe osseuse[1]. Des études *in vitro* et *in vivo* ont révélé que la nacre est ostéogénique, ostéoconductrice, biocompatible et biodégradable. 10 mois après l'implantation d'une pièce de nacre dans le fémur de mouton, la nacre s'intègre dans l'os sans réaction inflammatoire ni formation fibreuse [2]. Six mois après l'implantation de la poudre de nacre dans l'os maxillaire humain, on trouve que la nacre est ostéogénique, elle stimule la formation osseuse en attirant et activant les cellules souches de la moelle osseuse et les ostéoblastes [3]. Ainsi, il est supposé que la nacre contient des molécules « signal » qui sont libérées lorsque la nacre est placée dans l'os. Pour le développement de la nacre comme substituts de greffe osseuse, il est nécessaire de comprendre le mécanisme d'action des composés ostéogéniques de la nacre sur les cellules formatrices de l'os. Et jusqu'à présent, les composés ostéogéniques de la nacre restent inconnus.

La nacre est constituée de 97% de carbonate de calcium sous forme d'aragonite et de 3% de matrice organique. La composition de la matrice est complexe. C'est un mélange de protéines, de peptides, d'acides aminés libres, de polysaccharides, de lipides, de pigments [4], et des éléments minéraux. A ce jour, en cherchant « nacre »

dans la base de données protéines (UniProt, voir www.uniprot.org), 94 protéines et 42 peptides fragments de nacre ont été identifiés et révisés, 73 molécules sont originaires de la nacre de *Pinctada* [5][6]. Quantitativement, les polysaccharides représentent la deuxième classe de macromolécules importantes, après les protéines. Ils peuvent être divisés approximativement en deux groupes: la chitine et les polymères acides solubles [4]. Les lipides ont été peu étudiés, et le rôle des lipides dans la minéralisation de la coquille est inconnu. Pour ailleurs, divers éléments sont détectés dans *Pinctada* nacre [7][8]. En outre Ca et Na, qui ont une présence d'importante, il y a aussi Mn, Ti, Zn, Mg et Sr [8]. L'eau dans la nacre est mesurée à 0,34% en poids [7]. Les études *in vitro* montrent que l'extrait aqueux de nacre (WSM) [9][10], et l'extrait 'éthanol' (ESM) [11][12], ont un effet ostéogénique sur divers types de cellules de mammifères pré-ostéogéniques. Il est supposé que ces composés ostéogéniques sont davantage des peptides et des petites molécules [10]. Et l'extrait ESM est estimé une meilleure source des composés pour identifier les molécules ostéogéniques de la nacre, car l'ESM peut restaurer la minéralisation des ostéoblastes humains arthrosiques et représente un extrait plus raffiné que le WSM [11][12].

Les méthodes classiques pour tester la capacité ostéogénique des molécules comportent principalement l'expression génique des marqueurs osseux par PCR et Western-blot, les tests de minéralisation par divers types de coloration en visualisant les nodules de minéralisation, et l'observation de la formation de l'os par la microscopie optique ou la spectroscopie de Raman après l'ostéoinduction. Selon notre expérience, ces méthodes nécessitent souvent une culture cellulaire longue, 3 à 4 semaines pour la lignée MC3T3-E1 et au moins 2 mois pour les ostéoblastes humains de l'entretien à la fin du traitement. Une longue période de culture implique un risque de contamination, une faible répétition subjectivement ou objectivement, et d'autres facteurs imprévus provoquant des interférences sur les résultats finaux. La composition de l'extrait de nacre est complexe. Avant de tester leur capacité ostéogénique, il faut effectuer la séparation, la purification, et finalement l'identification des composés qui dérivent de nombreuses fractions. Il est presque impossible de tester ces fractions avec les méthodes classiques qui permettent des essais de faible flux et ont besoin d'une grande masse d'échantillons. Pour réduire la difficulté des recherches, nous avons besoin d'un outil efficace qui nous permet de

cribler les fractions ostéogéniques avant de valider ces découvertes positives par les méthodes classiques.

Sur le marché actuel, il n'y a pas d'outil ou kit qui s'accorde à nos besoins. En revanche, la technologie des gènes rapporteurs peut être un choix. Un gène rapporteur est un gène dont le produit (protéine) possède une caractéristique lui permettant d'être observé en laboratoire (fluorescence, activité enzymatique détectable). Les gènes rapporteurs sont utilisés pour permettre de visualiser ou mesurer l'expression d'un gène d'intérêt, pour cela le gène rapporteur peut être fusionné au gène étudié, ou mis sous le contrôle du promoteur de ce dernier. Donc, si on peut créer une lignée stable contenant un gène rapporteur ostéogénique, ce sera efficace pour cribler les composés ostéogéniques de la nacre.

Dans ce contexte, nous avons tout d'abord développé un outil de criblage, ici à l'aide d'un gène rapporteur. Ensuite, nous avons extrait et purifié les lipides, sucres et peptides d'ESM. Finalement, nous avons criblé les fractions ostéogéniques parmi celles d'ESM avec cet outil pour l'identification des composés ostéogéniques de la nacre.

2. Méthodes et matériels.

2.1. L'extraction d'ESM et les fractions cationiques d'ESM.

L'ESM est extrait à partir de la poudre de nacre de *Pinctada margaritifera* avec de l'éthanol. Les procédures d'extraction d'ESM, la préparation de F5 et F6, 2 fractions cationiques d'ESM sont indiquées précédemment [12].

2.2. Extraction et séparation des lipides, sucres et peptides d'ESM.

2.2.1. Lipides

Les lipides d'ESM sont extraits par de l'éthanol anhydre et séparés par une migration sur les plaques de couches minces. La migration est réalisée en deux phases mobiles, les échantillons sont séparés premièrement en moitié des plaques utilisant le solvant Hexane/Diethylether/Acide acétique (60, 25, 15, v/v/v) puis migrés dans un deuxième temps au fond des plaques en utilisant l'Hexane. Quatre plaques sont mises en migration à la fois. A la fin de la migration, 3 plaques sont gardées et 1 est colorée

avec la solution de sulfate de cuivre en pulvérisant (pour environ 50 ml de révélateur: Sulfate de cuivre/Eau osmosée /Éthanol/Acide phosphorique 5g/34,5ml/11,5ml/4ml) [13]. En fonction des traces des lipides sur la plaque colorée, on récupère respectivement les lipides aux niveaux différents des plaques non colorées avec de l'éthanol et nous les rassemblons.

2.2.2. Sucres

Les sucres sont obtenus comme les lipides. Cependant, la migration se fait directement au fond des plaques utilisant le solvant Butan-2-one/Méthanol/Acide acétique (60, 20, 20, v/v/v) comme phase mobile. Le révélateur est préparé en mélangeant extemporanément la solution A (Aniline/Diphénylamine/Éthanol, 0,5ml/0,5g/25ml) et B (Acide phosphorique 85%/Ethanol, 5ml/25ml).

2.2.3. Peptides

Les peptides présents dans l'ESM sont précipités par du TCA 100% (Acide trichloracétique, dissoudre 500 g de TCA dans 350 ml de l'eau distillée). La précipitation est réalisée selon les procédures suivantes: (1) ajouter 1 volume de stock de TCA à 4 volumes d'échantillon (100mg/ml d'ESM, solubilisé dans l'eau), p. ex., dans un tube de 1,5 ml, ajouter 250 ul de TCA à 1,0 ml d'échantillon. (2) incuber 10 min à 4 °C. (3) centrifuger à 14K rpm, 5 min. (4) enlever le surnageant, en laissant le culot de peptides intact. (5). Laver le culot avec 200 µl d'acétone froide (4 °C). (6) Centrifuger 14K rpm, 5min. (7) Répéter les étapes 4-6 pour un total de 2 lavages à l'acétone. (8) Ajouter 500 µl de l'eau distillée, congeler et lyophiliser.

2.3. Clonage (collaboration avec M. Arnaud BIANCHI au laboratoire IMoPA à Nancy)

2.3.1. Culture cellulaire

La lignée cellulaire ATDC5 (Sigma, ECACC) est une lignée cellulaire pré-chondrogènique dérivante de cellules de téracarcinome AT805 murines. La lignée ATDC5 a montré une transition séquentielle de phénotype *in vitro*. Les cellules ATDC5 sont entretenues à 37°C 5% CO_2. Le milieu est changé tous les 2 à 3 jours avec du milieu complet DMEM-F12, nommé comme le milieu TS dont la

composition est indiquée dans le **Tableau 1**. Selon les manipulations différentes, le milieu TS est modifié partiellement pour favoriser l'ostéoinduction, la transfection ou le test de luminescence.

Tableau 1. Composition du milieu de culture des cellules ATDC5

	Milieu de culture des cellules ATDC5 (milieu DMEM/F12 TS)
Composition des milieux	*Milieu DMEM/F12 (Dubelcco's Modified Eagle's Medium 1X)* (Gibco) + 5% SVF (Dominique Dutscher) + 1% L-Glutamine 200 mM 100X (Gibco) (2 mM final) + 20 µg/mL Transférine (Sigma) + 3.10^{-8} M Sélénite de sodium (Sigma)
Antibiotiques	1% PenStrep (10000 U/mL Pénicilline, 10000 µg/mL Streptomycine) (Gibco)

2.3.2. Test de minéralisation.

Le test de minéralisation sur ATDC5 est réalisé par la coloration au rouge alizarine qui permet de visualiser les dépôts de calcium dans la matrice extracellulaire. Les traitements sont indiqués dans le **Tableau 2**. Les procédures de coloration sont listées précédemment [12].

Tableau 2. Composition des traitements réalisés sur les cellules ATDC5

Traitements	**Compositions**
TS	Milieu de culture des cellules ATDC5
ITS	Milieu TS + 10 µg/mL d'insuline (Sigma)
ITS +AA + GP	Milieu ITS + 50 µg/mL d'acide ascorbique + 10 mM de β-glycérophosphate
ITS + ESM 200	Milieu ITS + 200 µg/mL d'ESM
ITS + ESM 200 + AA+ GP	Milieu ITS + 50 µg/mL d'acide ascorbique + 10 mM de β-glycérophosphate + 200 µg/mL d'ESM

2.3.3. Quantitative PCR (Réaction quantitative en chaîne de la polymérase en temps réel)

L'expression génétique de collagène de type X dans ATDC5 est évaluée selon les méthodes décries par Brion *et coll* [11]. Le gène RPS29 code stablement 40S protéine

ribosomale S29, qui est composant structurel du ribosome. Ainsi, le gène RPS29 est utilisé comme gène de ménage. Les séquences des amorces et leur température d'hybridation sont indiquées dans le tableau 3.

Tableau 3. Température d'hybridation des amorces utilisées

Gènes	Orientations	Séquences de 5' vers 3'	Température d'hybridation (°C)
Col X A1	Sens	TTCATCCCATACGCCATAAAG	58
	Anti-sens	AGGGACCTGGGTGTCCTC	
RPS29	Sens	GGAGTCACCCACGGAAGTT	60
	Anti-sens	GCCTATGTCCTTCGCGTACT	

2.3.4. Gène rapporteur

Notre outil de criblage des composés ostéogéniques est une lignée cellulaire portant de manière stable un plasmide (ici: pMetluc2 reporter, Clontech) contenant un gène rapporteur (ici: Luciférase) en aval du promoteur du gène d'intérêt (ici: Promoteur Col X). Le principe de l'outil de criblage repose sur le fait que si un composé d'ESM active le promoteur, cela entraîne l'expression de la luciférase (ici sécrétée dans le milieu extracellulaire). Il est alors facile de doser la luciférase exprimée dans le milieu (c'est à dire dans le surnageant de culture) (**Figure 1**). Les cellules peuvent être utilisées en plaque 96 puits et réutilisées pour tester différents composés.

En effet, nous avons essayé de construire les plasmides contenant le promoteur de Collagène type 1, ostéocalcine et ostéopontine pour créer des lignées à partir des cellules MC3T3, mais les essais de construction sont sans succès. Heureusement, nous arrivons à créer une lignée contenant le promoteur de Col X à partir des cellules ATDC5. Le promoteur du collagène de type X est activé au cours de l'ossification endochondrale, qui a lieu au cours de la croissance des os longs, mais également au cours de la réparation osseuse. Cette lignée nous permet aussi de tester les molécules ostéogéniques, et en premier temps, nous permet de caractériser l'outil de gène rapporteur sur le criblage des molécules ostéogéniques.

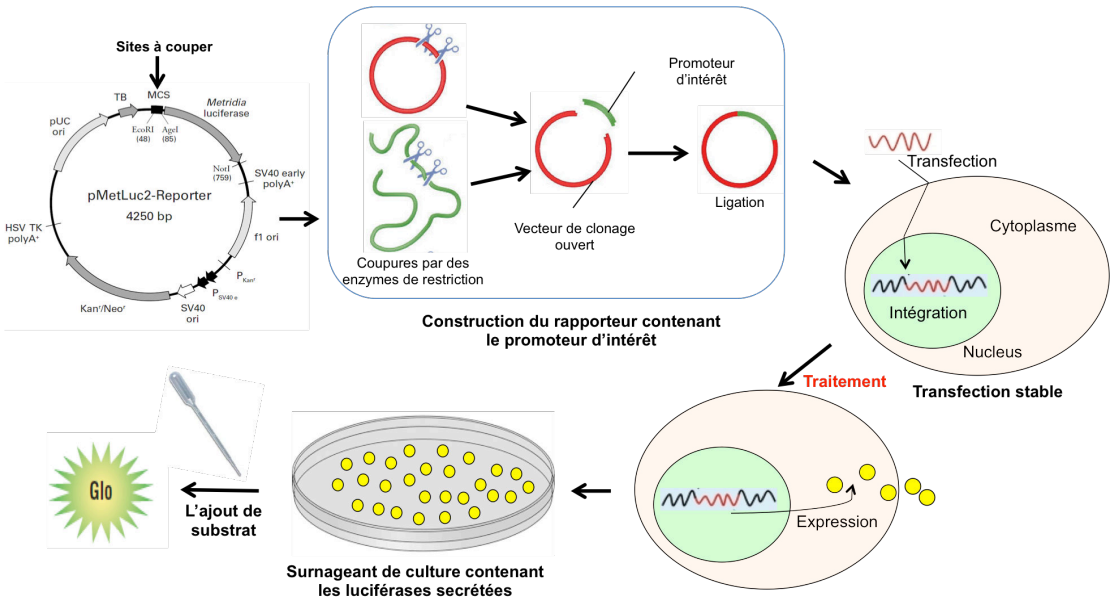


Figure 1. Schéma montrant les principes du gène rapporteur pMetLuc2 ColX.



Figure 2. Les étapes majeures de la construction du plasmide contenant le promoteur de gène d'intérêt.

Les étapes majeures de la construction du plasmide contenant le promoteur du gène

d'intérêt sont indiquées dans la **Figure 2**. Une fois le promoteur cloné dans le plasmide, le plasmide a été séquencé afin de vérifier que la séquence du promoteur cloné était correcte. Après des essais de transfection transitoire et la mesure de la luminescence induite, une transfection stable a été réalisée. Ensuite, il a fallu sélectionner les clones cellulaires sous pression antibiotique (ici: néomycine), qui permet de ne sélectionner que les cellules qui ont été transfectées). Ces clones cellulaires ont ensuite été testés à l'aide du test de minéralisation afin de vérifier que la transfection n'a pas endommagé la physiologie cellulaire. Un test de luminescence a été réalisé afin de vérifier la réponse à la stimulation du gène rapporteur.

2.4. Identification des molécules ostéogéniques présentes dans l'ESM par LC-MS (Collaboration avec M. Cédric PARIS au laboratoire LiBio à Nancy).

Les fractions ostéogéniques d'ESM, criblé par le gène rapporteur, ont été passées en LC-MS pour l'identification des molécules présentes. La séparation des échantillons est réalisée en colonne C18 et avec les phases mobiles A= eau+TFA (0.1%) et B=ACN+TFA (0.1%). Avec un gradient linéaire de 30 minutes allant de 5% B à 98% B, la détection est réalisée à UV 215nm / 280nm. Ensuite, une fragmentation générale est effectuée pour identifier des zones contenant des composés. Par rapport aux aires des pics de la chromatographie liquide, les zones d'intérêt font l'objet d'une fragmentation spécifique pour identifier leur composition. Les molécules identifiées seront synthétisées (Gene Cust) pour permettre de les tester sur le gène rapporteur.

Selon une étude sur la WSM[14], le traitement à 50μg/ml est nécessaire pour stimuler l'activité ostéogénique et la dose optimale est 100μg/ml. Donc, pour la dose de l'ESM lors des tests de minéralisation ou des tests sur le gène rapporteur, nous commençons par 100μg/ml. Les fractions de l'ESM et les composés identifiés de l'ESM sont tous testés à 100μg/ml. Dans le cas des fractions une activité augmentée par rapport à l'ESM est attendue.

3. Résultats

3.1. Tests d'ESM sur ATDC5 avant la transfection transitoire.

Au départ, nous avons évalué l'effet d'ESM sur la lignée ATDC5. Les tests comportent le test de minéralisation qui nous permet de connaître l'effet d'ESM sur la

capacité de minéralisation de ATDC5, et le test de qPCR pour savoir l'effet d'ESM sur l'expression du gène Col X. Les résultats montrent que l'ESM peut favoriser le dépôt de calcium dans ATDC5 à J7 et J14, et avec un effet dose-dépendant. L'ESM a augmenté l'expression de Col X dans ATDC5 après 11 jours de traitement (**Figure 3**). Ainsi, le promoteur de Col X est choisi pour être inséré dans le plasmide pMetLuc2 reporter vers la création du gène rapporteur. La lignée ATDC5 est choisie comme hôte de transfection.

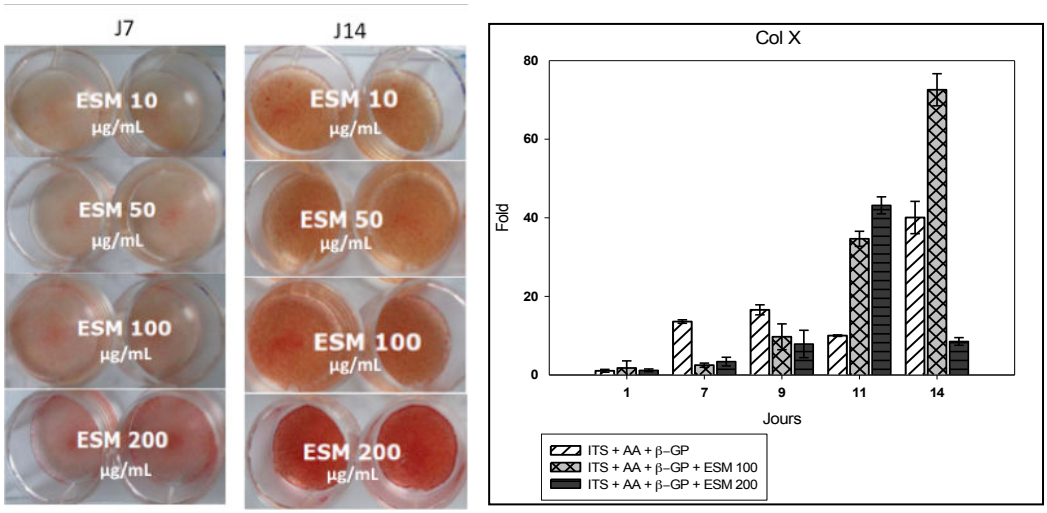


Figure 3. Effet de l'ESM sur des cellules ATDC5 en culture : la coloration au rouge alizarine (minéralisation) à gauche et l'expression du gène Col X par qPCR à droite. Les résultats sont présentés en moyenne±SEM. L'ESM a favorisé le dépôt de calcium au cours du temps et avec un effet dose-dépendant. L'ESM a augmenté l'expression de Col X dans ATDC5 après 11 jours de traitement.

3.2. Les essais de transfection transitoire.

Le clonage du promoteur du gène Col X a été réalisé. Il a fallu ensuite effectuer des transfections pour mesurer par luminescence l'effet d'ESM sur les cellules ATDC5 grâce aux enzymes sécrétées. Il y a deux types de transfection: la transfection transitoire et la transfection stable. La manipulation de la transfection transitoire est rapide, mais les cellules qui contiennent le gène rapporteur après la transfection se dégradent avec la réplication. La transfection stable prend du temps et risque d'échouer à récupérer les clones idéaux. Mais si on réussit, les clones stables vont

permettre d'entretenir les cellules pour effectuer des tests au moment souhaité. Donc, notre stratégie a été d'évaluer tout d'abord l'effet d'ESM sur le promoteur de Col X dans le système de transfection transitoire; si l'ESM peut activer le promoteur de Col X, continuer à sélectionner des clones stables via la transfection stable.

Les cellules ATDC5 sont ensemencées sur les plaques de 12 puits, et toutes les conditions sont en triplicat. La transfection transitoire est réalisée à l'aide du transfectant *Trans*IT-X2 (Mirus®) selon la fiche technique concernée. Le plasmide pMetLuc2 vide permet de vérifier que le plasmide lui-même n'exprime pas la luciférase. Le plasmide pSEAP vide, qui est systématiquement transfecté avec les autres plasmides permet de normaliser l'efficacité de la transfection. En effet SEAP est produit de manière constante et permet donc de connaître l'efficacité de sa transfection et donc de celle de pMetLuc2Col X. Le dosage de SEAP et de la luciférase sont faits selon la fiche technique du kit Ready-To-Glow™ Dual Secreted Reporter Assay (Clontech).

Pour observer l'expression cinétique de la luciférase, on a effectué 2 essais de transfection transitoire, dont une cinétique longue et une cinétique courte. Les résultats montrent que les cellules transfectées avec pMetLuc2ColX ou pSEAP ont toujours une expression de luciférase ou SEAP (**Figure 4**), et l'expression peut continuer au moins pendant 72h post-traitement. Les cellules non transfectées et transfectées avec le plasmide pMetLuc2 reporter vide ne produisent pas de luciférase ou SEAP. Donc, on peut dire que la transfection est efficace. Kaempferol, qui est reporté comme pouvant activer directement le promoteur de Col X [15], sert de témoin positif à une concentration de 5μM, mais sans effet par rapport au témoin (cellules transfectées mais sans traitement) dans ces tests. Selon le test de cinétique longue, l'effet ostéogénique d'ESM (par rapport au témoin) est plus significatif vers 24h post-traitement que 48h et 72h. Il nous semble qu'il n'y a pas de différence entre l'ESM 100 μg/ml et 200 μg/ml. Selon le test de cinétique courte, l'effet ostéogénique d'ESM est observé à partir de 6h post-traitement. Par rapport à l'ESM 50 μg/ml, l'ESM 100 μg/ml est nécessaire et suffisant pour donner significativement un effet ostéogénique sur les cellules ATDC5.

Ainsi, on peut dire que le plasmide est bien construit et que le système de transfection

est efficace. Le plus important, l'ESM peut activer le promoteur de Col X. On peut continuer à créer une lignée stable contenant le plasmide pMetLuc2 ColX par la transfection stable.

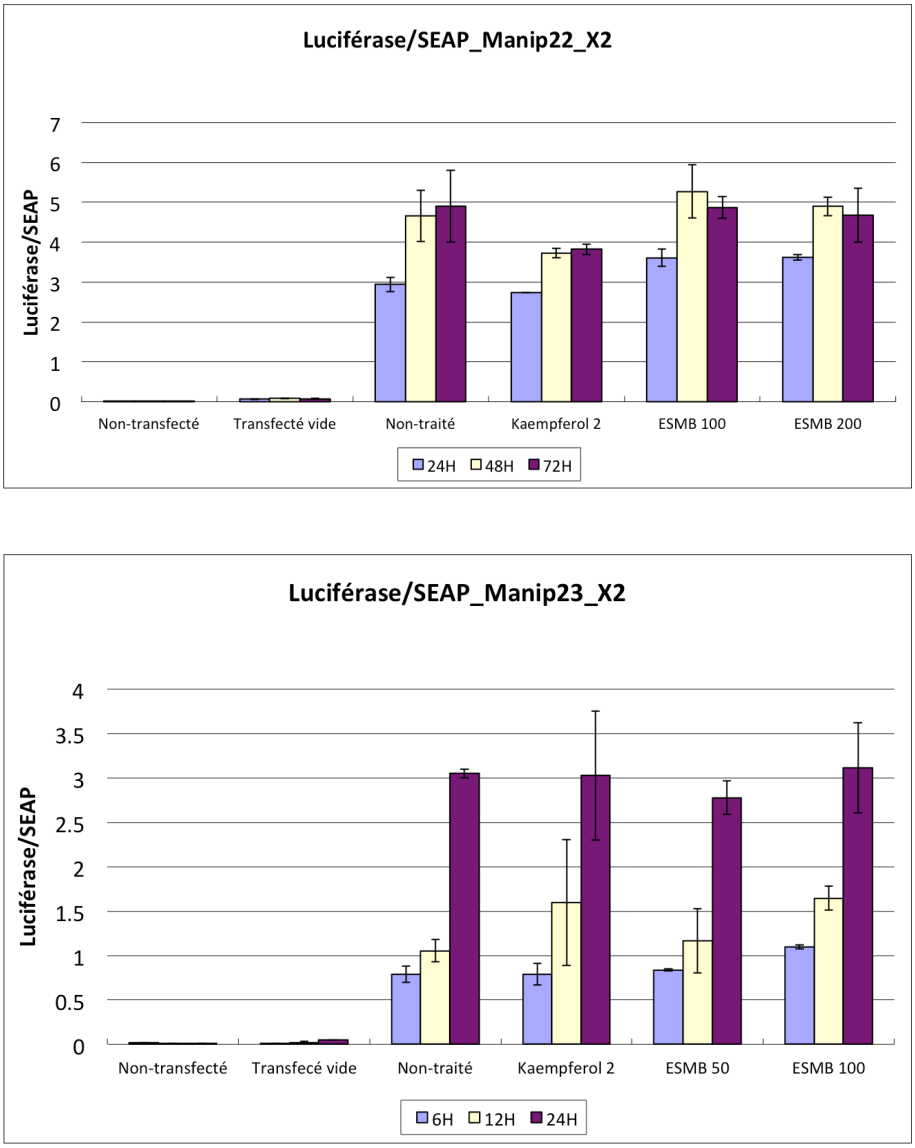


Figure 4. Dosage de Luciférase/SEAP après la transfection transitoire de pMetLuc2 ColX dans ATDC5, cinétique longue au-dessus et cinétique courte au-dessous. Le kaempferol sert de témoin positif. Les résultats sont présentés en moyenne ±SEM.

3.3. Transfection stable.

La transfection stable est commencée par une transfection transitoire, mais justement avec le plasmide pMetLuc2 ColX, car la normalisation par SEAP n'est plus nécessaire pour éliminer l'effet d'efficacité de transfection. Les cellules transfectées sont diluées à la limite pour proliférer et former des clones isolés. Les clones sont

cultivés dans du milieu conditionné des cellules ATDC5 non transfectées, et sélectionnés sous la pression de l'antibiotique Néomycine à 400 µg/ml. Finalement, nous avons obtenu des clones. Parmi ceux-ci, les clones C8 et C9 sont très remarqués lors de test de luminescence, ils répondent fortement à l'ESM. Ensuite, un test de minéralisation est réalisé sur C8 et C9 (**Figure 5**). La coloration montre que C8 peut minéraliser aussi bien que les cellules ATDC5 non transfectées (voir **Figure 3**). Par contre, la minéralisation de C9 n'est pas idéale après le traitement d'ESM. On a donc choisi C8 pour valider l'effet ostéogénique d'ESM (**Figure 6**).

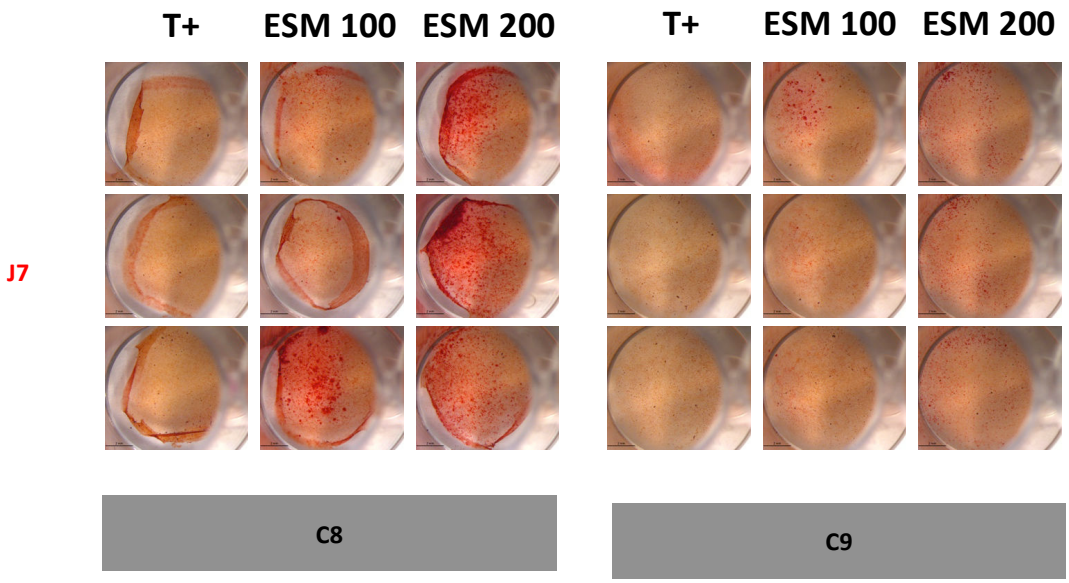


Figure 5. Test de minéralisation sur les clones C8 et C9. C8 minéralise bien après 7 jours de traitement avec l'ESM, et C9 minéralise légèrement.

Pour valider l'effet ostéogénique d'ESM sur C8 par les tests de luminescence, les cellules C8 sont ensemencées sur les plaques 96 puits (8 puits par condition). Le dosage de luminescence est réalisé après 24h de traitement. Les statistiques sont faites à l'aide de N=3 selon un test ANOVA par rapport au contrôle (témoin). Les résultats montrent que l'ESM 100µg/ml active de manière significative le promoteur de ColX, et Kaempferol n'a pas d'effet sur le promoteur de Col X (**Figure 6**).

Donc, la stimulation de la minéralisation observée sur les cellules ATDC5 et l'expression du collagène X (**Figure 3**) sont corrélés avec la stimulation du promoteur de ColX et la luminescence mesurée, sécrétée par le clone C8. Ainsi, nous avons créé une lignée cellulaire exprimant de manière stable un plasmide contenant un gène

rapporteur ATDC5 pMetLuc2 ColX promoter, outil efficace nous permettant de faire les tests subséquents de criblage.

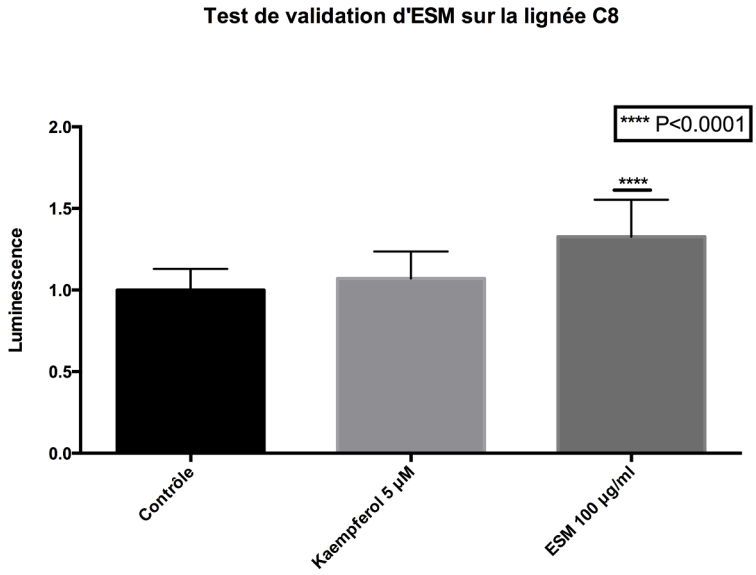


Figure 6. Test de luminescence sur le clone C8. Les statistiques sont faites lors de N=3 (3 manipulations en triplicat) selon un test ANOVA par rapport au contrôle. L'ESM 100 µg/ml active de manière significative le promoteur de ColX, et Kaempferol n'a pas d'effet sur le promoteur de Col X. Les résultats sont présentés en moyenne ±SEM.

3.4. Séparation et collection de lipides, sucres et peptides dans l'ESM.

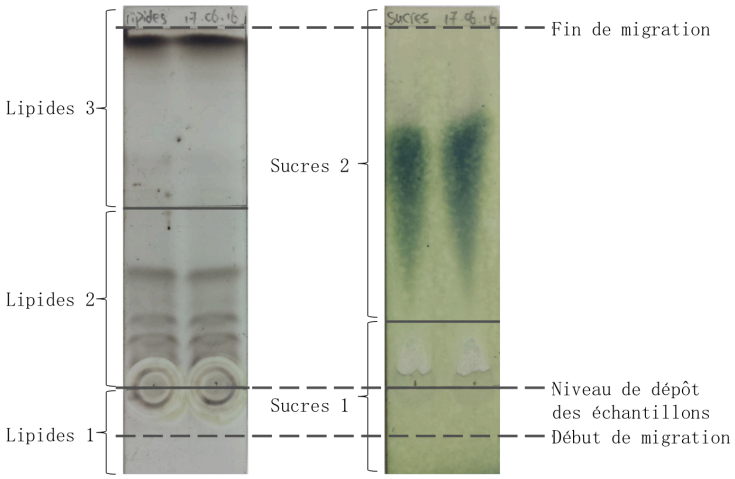


Figure 7. Analyses des lipides (à gauche) et des sucres (à droite) présentes dans l'ESM par les plaques de couches minces. 20 µl d'ESM à 100mg/ml (solubilisé dans

l'éthanol) par dépôt, et 2 dépôts par plaque. Toutes les bandes et tâches bilatérales sont des lipides ou des sucres selon les plaques. 3 fractions de lipides et 2 fractions de sucres sont récupérées en fonction des traces révélées.

Suivant la **Figure 7**, dans l'ESM, il y a finalement 3 fractions de lipides et 2 fractions de sucres présents qui sont récupérées en fonction des traces révélées. Les peptides précipités à partir d'ESM sont nommés l'ESM_TCA.

3.5. Criblage des composés ostéogéniques d'ESM par le gène rapporteur.

3.5.1. Test des fractions cationiques d'ESM.

Au début du criblage, nous avons testé les fractions cationiques d'ESM, F5 et F6, qui sont démontrées ostéogéniques par le test de minéralisation [12]. $CaCl_2$ est aussi testé. Leur effet sur le gène rapporteur est positif pour tous (**Figure 8**). F5, F6 et $CaCl_2$ peuvent tous activer le promoteur de ColX. Ces résultats sont donc cohérents avec ceux de minéralisation. Mais, quelle est la relation entre les molécules ostéogéniques de la nacre et Ca? Car F5 et F6 ont un effet similaire à celui de Ca, il existe peut être des interactions. Dans ce but, nous avons aussi testé à la fois ESM et $CaCl_2$, mais les résultats sont négatifs (résultats non montrés).

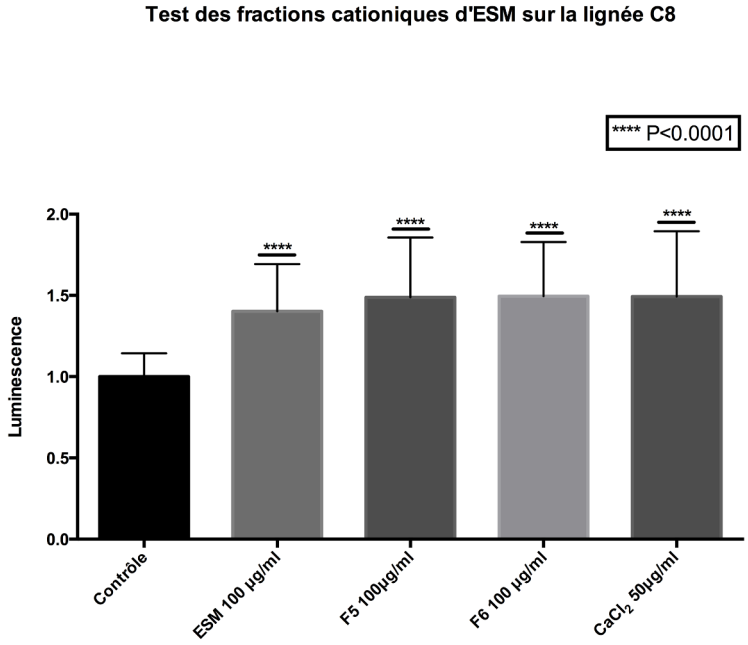


Figure 8. Test des fractions cationiques d'ESM sur la lignée C8. Les dosages des traitements sont tous normalisés par ceux de Contrôle (ANOVA, N=3). Les résultats

sont présentés en moyenne ±SEM.

3.5.2. Test des peptides, lipides, sucres d'ESM

Ici, les traitements comportent les peptides ESM_TCA, lipides L1, L2, L3, sucres S1 et S2. Tous les traitements sont effectués à une concentration de 100 μg/ml. Pour complètement solubiliser les fractions des lipides et sucres, du DMSO (10%, v/v) est utilisé, qui est prouvé sans effet sur le dosage de luminescence. Les résultats montrent que l'ESM_TCA, L3, S1 et S2 sont ostéogéniques, et l'ESM_TCA est la fraction plus active parmi ces fractions organiques (**Figure 9**).

Ainsi, on trouve par le gène rapporteur que F5, F6 et ESM_TCA sont les fractions les plus actives d'ESM. De plus, parmi les molécules de grande classe, ce sont les peptides les plus actifs. Donc, il est intéressant d'explorer la composition de F5, F6 et ESM_TCA par LC-MS.

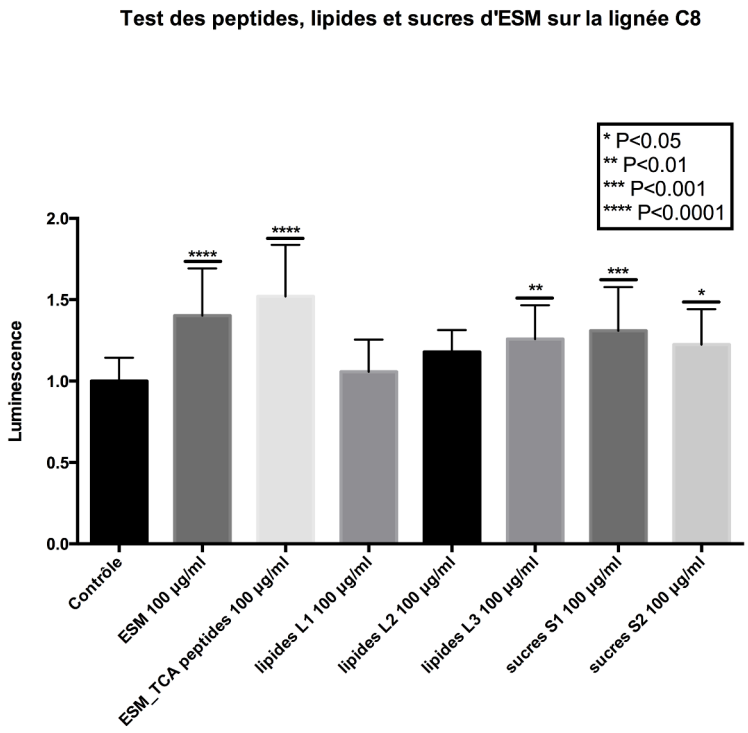


Figure 9. Test des peptides (ESM_TCA), lipides, sucres d'ESM sur la lignée C8. Les dosages des traitements sont tous normalisés par ceux de Contrôle. Parmi les fractions, ESM_TCA est le plus active (ANOVA, N=3). Les résultats sont présentés en moyenne ±SEM.

3.6. Identification des composés ostéogéniques par LC-MS.

Pour identifier la composition de F5, F6 et ESM_TCA, on a tout d'abord vérifié la présence d'acides aminés dans l'ESM (technique automatisée clé en main: dérivation des acides aminés en ligne, séparation sur C18 et détection par fluorimétrie de la vingtaine d'acides aminés existants; résultats non montrés). Ensuite, le profil d'ESM sur la chromatographie est comparé avec celui d'un mix de dopage (8 peptides utilisés: des "petits" et des "gros" pour couvrir le chromatogramme et aussi couvrir une gamme convenable en m/z) pour confirmer qu'il y a vraiment des peptides existants dans l'ESM (résultats non montrés). A partir d'ici, nous avons commencé le travail d'identification des peptides d'ESM.

En effet, sauf les lipides, les sucres et les peptides, nous avons effectué d'autres types d'extraction, par exemple, avec du DMSO, du propanol, de l'acétone et du charbon actif, qui permet aussi d'extraire partiellement les molécules organiques d'ESM. Selon les analyses sur LC-MS, la composition d'ESM est complexe. Cependant, parmi presque toutes ces fractions, on a observé la présence d'un composé à 539.5 Da (**Figure 10a**). Ce composé est aussi bien observé dans ESM_TCA (**Figure 10b**). Nous pouvons aussi dire que ce composé est présent dans toutes les fractions ostéogéniques. Ainsi, ce composé est fragmenté spécifiquement par la spectrométrie de masse pour révéler sa composition.

Le schéma de fragmentation du composé M=539.5 a été explicité de la manière suivante sur la base du spectre de fragmentation MS2 (271): par exemple celui d'ESM-Acétone Culot **(Figure 10c**).

nb: m/z=271 correspond à l'ion dichargé du composé M=539.5 (car c'est toujours sur les ions dichargés que l'on a obtenu les profils MS2 les plus interprétables)

MS2 (271)=426 + 313 d'où 540-426=114....soit [N-18], soit [GG-18] comme explication de la perte neutre (M Asparagine = M Glycine-Glycine = 132) d'où 426-313=113....soit [L-18], soit [I-18] comme explication de la perte de neutre (M Méthionine = 149)

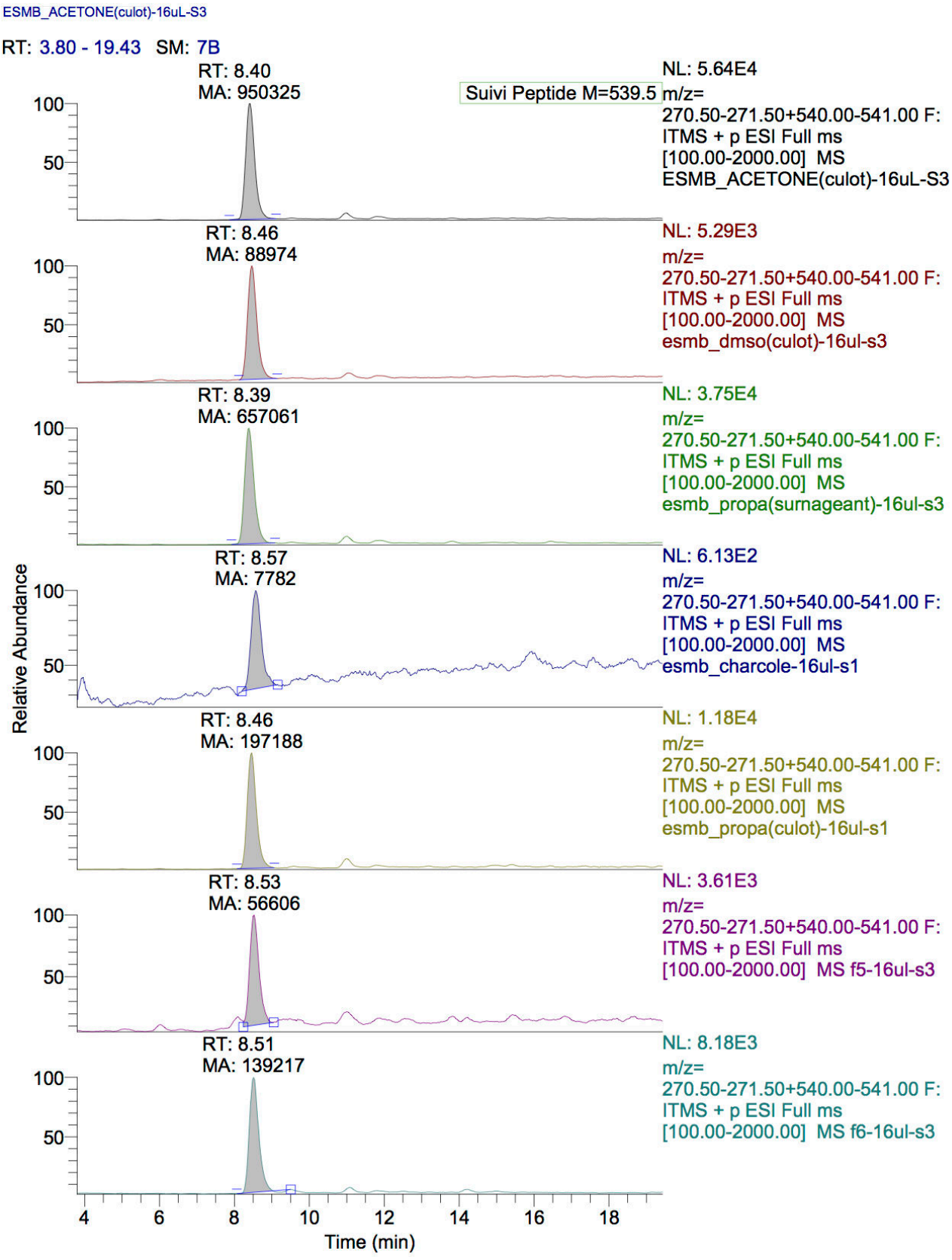
MS3 (271, 313)=182 d'où 313-182=131 ....soit [M-18] comme explication de la perte de neutre (M Méthionine = 149)

Et on aurait donc l'acide aminé Y côté NH2 terminal (M Tyrosine = 181).

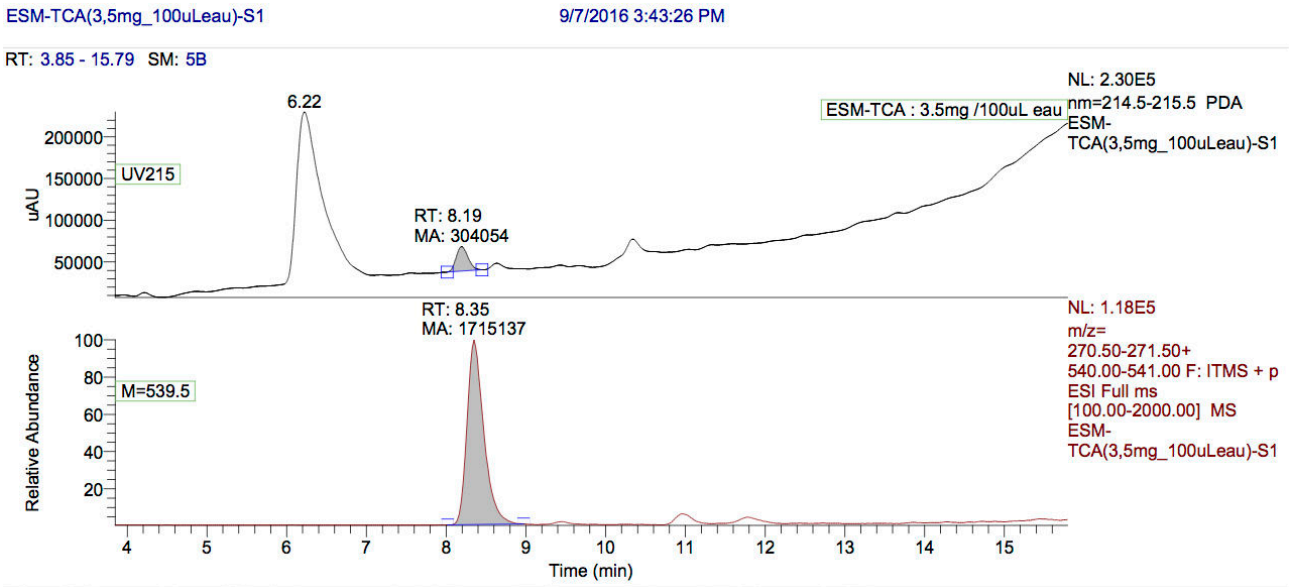
Ce qui donne les séquences possibles suivantes: Y-M-L-N (YN4)/ Y-M-L-G-G (YG5)/ Y-M-I-N (YN4 bis) / Y-M-I-G-G (YG5 bis).

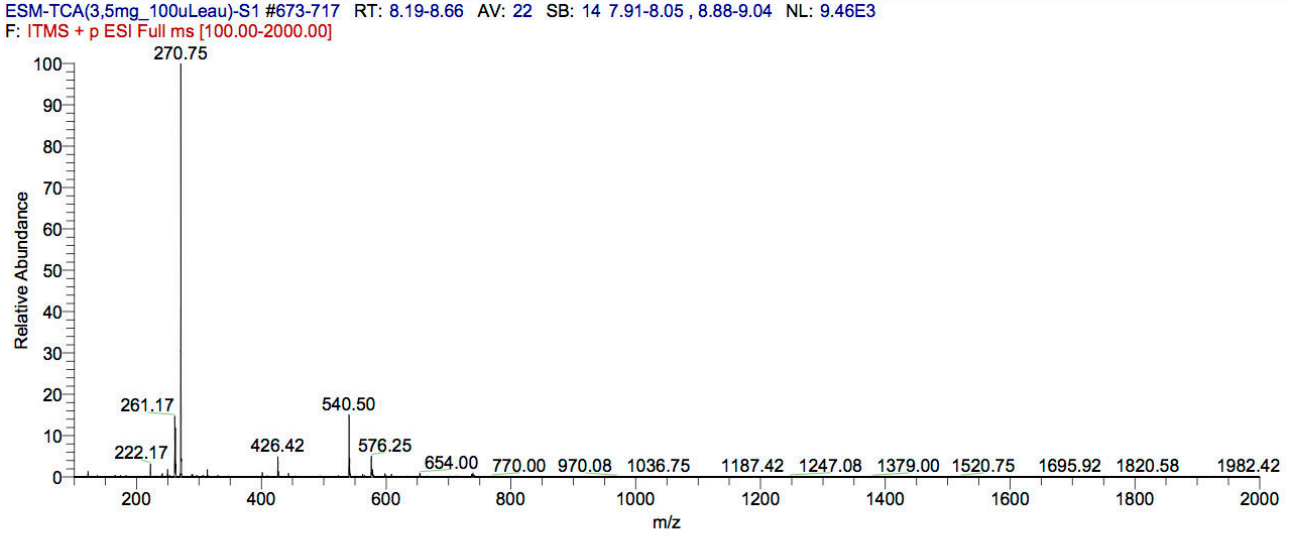
Ensuite, nous avons fait synthétiser les 4 peptides pour faire des tests sur le gène rapporteur afin de déterminer leur capacité ostéogénique.

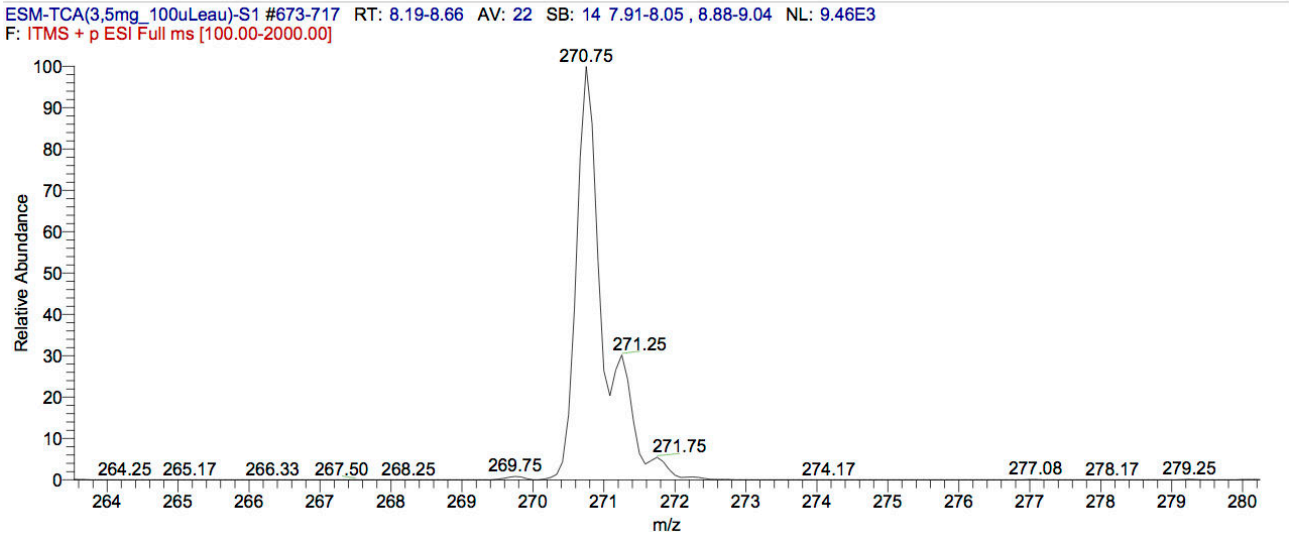
a)


ESMB_ACETONE(culot)-16uL-S3
RT: 3.80 - 19.43 SM: 7B
RT: 8.40
MA: 950325
Suivi Peptide M=539.5
NL: 5.64E4
m/z=
270.50-271.50+540.00-541.00 F:
ITMS + p ESI Full ms
[100.00-2000.00] MS
ESMB_ACETONE(culot)-16uL-S3
RT: 8.46
MA: 88974
NL: 5.29E3
m/z=
270.50-271.50+540.00-541.00 F:
ITMS + p ESI Full ms
[100.00-2000.00] MS
esmb_dmso(culot)-16ul-s3
RT: 8.39
MA: 657061
NL: 3.75E4
m/z=
270.50-271.50+540.00-541.00 F:
ITMS + p ESI Full ms
[100.00-2000.00] MS
esmb_propa(surnageant)-16ul-s3
RT: 8.57
MA: 7782
NL: 6.13E2
m/z=
270.50-271.50+540.00-541.00 F:
ITMS + p ESI Full ms
[100.00-2000.00] MS
esmb_charcole-16ul-s1
RT: 8.46
MA: 197188
NL: 1.18E4
m/z=
270.50-271.50+540.00-541.00 F:
ITMS + p ESI Full ms
[100.00-2000.00] MS
esmb_propa(culot)-16ul-s1
RT: 8.53
MA: 56606
NL: 3.61E3
m/z=
270.50-271.50+540.00-541.00 F:
ITMS + p ESI Full ms
[100.00-2000.00] MS f5-16ul-s3
RT: 8.51
MA: 139217
NL: 8.18E3
m/z=
270.50-271.50+540.00-541.00 F:
ITMS + p ESI Full ms
[100.00-2000.00] MS f6-16ul-s3
Relative Abundance
100
50
4
6
8
10
12
14
16
18
Time (min)

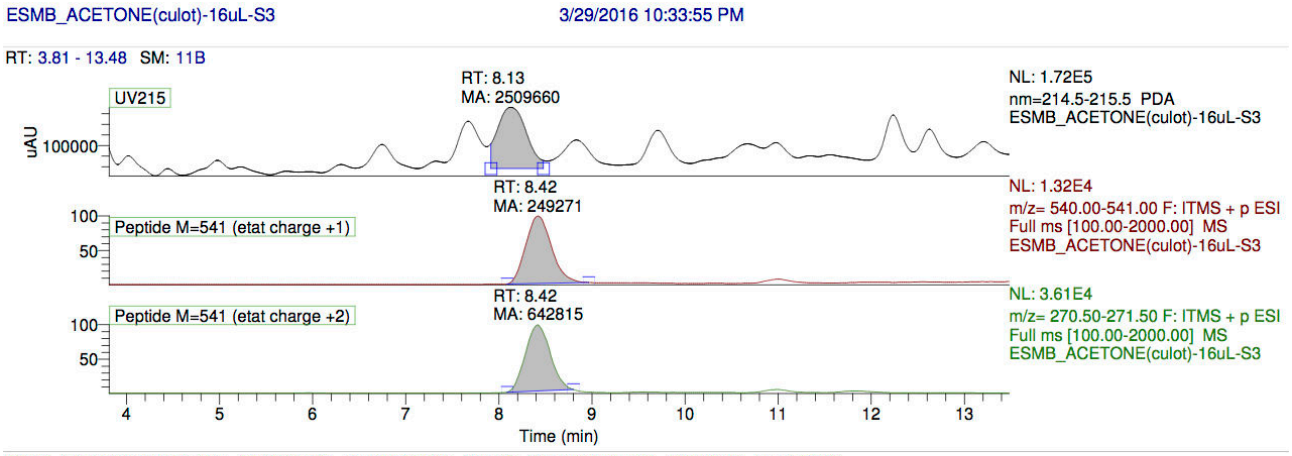
b)

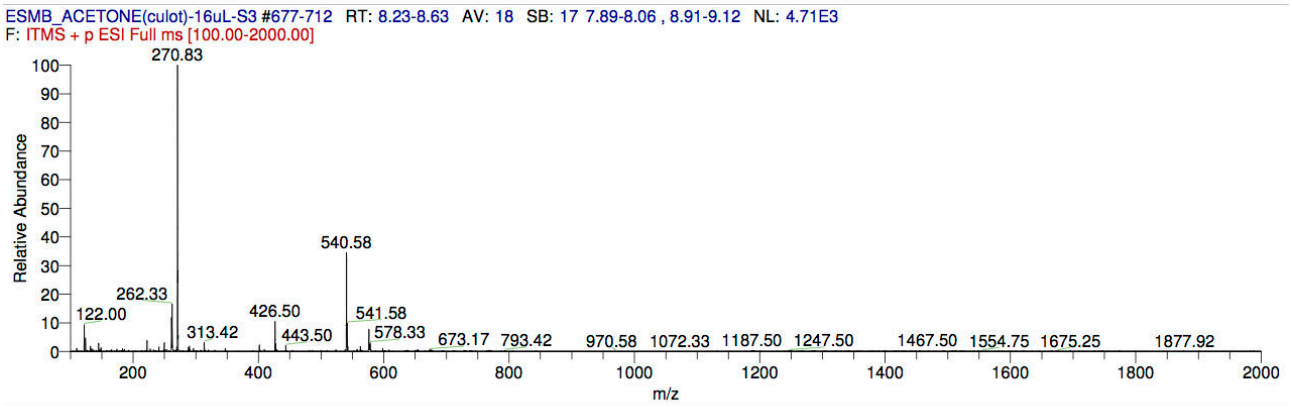

ESM-TCA(3,5mg_100uLeau)-S1
9/7/2016 3:43:26 PM
RT: 3.85 - 15.79 SM: 5B
6.22
ESM-TCA : 3.5mg /100uL eau
NL: 2.30E5
nm=214.5-215.5 PDA
ESM-
TCA(3,5mg_100uLeau)-S1
UV215
uAU
RT: 8.19
MA: 304054
RT: 8.35
MA: 1715137
NL: 1.18E5
m/z=
270.50-271.50+
540.00-541.00 F: ITMS + p
ESI Full ms
[100.00-2000.00] MS
ESM-
TCA(3,5mg_100uLeau)-S1
M=539.5
Relative Abundance
Time (min)

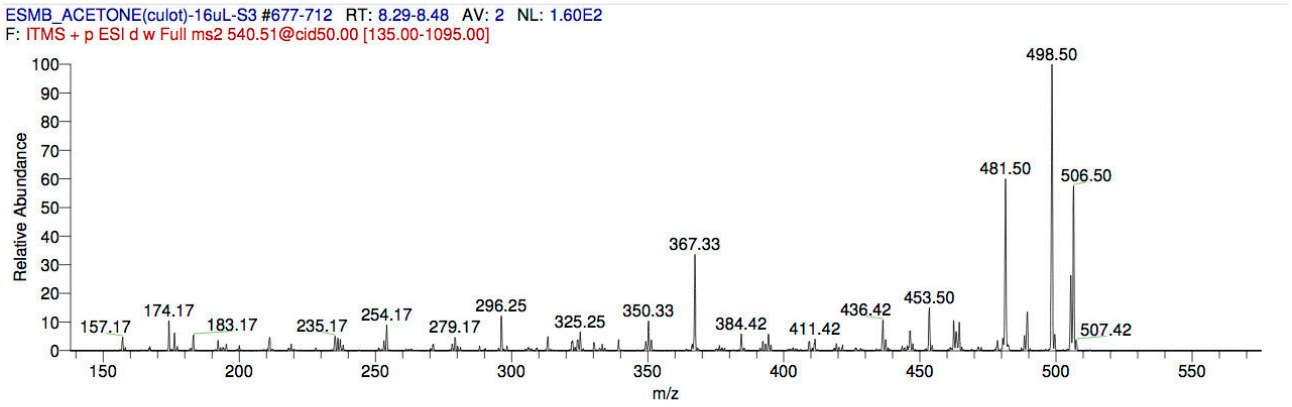

ESM-TCA(3,5mg_100uLeau)-S1 #673-717 RT: 8.19-8.66 AV: 22 SB: 14 7.91-8.05 , 8.88-9.04 NL: 9.46E3
F: ITMS + p ESI Full ms [100.00-2000.00]
270.75
261.17
540.50
222.17
426.42
576.25
654.00
770.00
970.08
1036.75
1187.42
1247.08
1379.00
1520.75
1695.92
1820.58
1982.42
Relative Abundance
m/z


ESM-TCA(3,5mg_100uLeau)-S1 #673-717 RT: 8.19-8.66 AV: 22 SB: 14 7.91-8.05 , 8.88-9.04 NL: 9.46E3
F: ITMS + p ESI Full ms [100.00-2000.00]
270.75
271.25
271.75
264.25
265.17
266.33
267.50
268.25
269.75
274.17
277.08
278.17
279.25
Relative Abundance
m/z

c)


ESMB_ACETONE(culot)-16uL-S3 3/29/2016 10:33:55 PM
RT: 3.81 - 13.48 SM: 11B
UV215
RT: 8.13
MA: 2509660
NL: 1.72E5
nm=214.5-215.5 PDA
ESMB_ACETONE(culot)-16uL-S3
uAU
Peptide M=541 (etat charge +1)
RT: 8.42
MA: 249271
NL: 1.32E4
m/z= 540.00-541.00 F: ITMS + p ESI
Full ms [100.00-2000.00] MS
ESMB_ACETONE(culot)-16uL-S3
Peptide M=541 (etat charge +2)
RT: 8.42
MA: 642815
NL: 3.61E4
m/z= 270.50-271.50 F: ITMS + p ESI
Full ms [100.00-2000.00] MS
ESMB_ACETONE(culot)-16uL-S3
Time (min)


ESMB_ACETONE(culot)-16uL-S3 #677-712 RT: 8.23-8.63 AV: 18 SB: 17 7.89-8.06 , 8.91-9.12 NL: 4.71E3
F: ITMS + p ESI Full ms [100.00-2000.00]
Relative Abundance
m/z
270.83
540.58
262.33
122.00
313.42
426.50
443.50
541.58
578.33
673.17
793.42
970.58
1072.33
1187.50
1247.50
1467.50
1554.75
1675.25
1877.92


ESMB_ACETONE(culot)-16uL-S3 #677-712 RT: 8.29-8.48 AV: 2 NL: 1.60E2
F: ITMS + p ESI d w Full ms2 540.51@cid50.00 [135.00-1095.00]
Relative Abundance
m/z
498.50
481.50
506.50
367.33
157.17
174.17
183.17
235.17
254.17
279.17
296.25
325.25
350.33
384.42
411.42
436.42
453.50
507.42

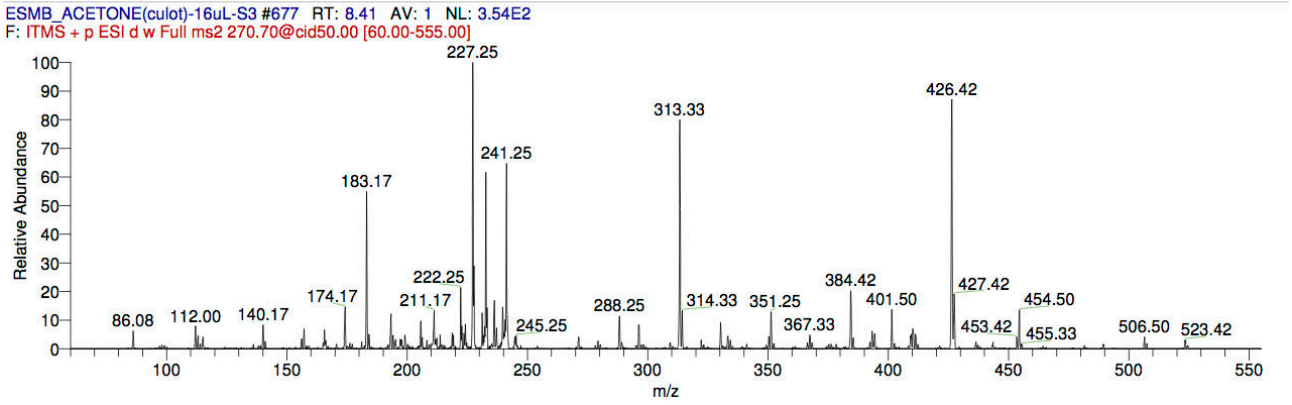

ESMB_ACETONE(culot)-16uL-S3 #677 RT: 8.41 AV: 1 NL: 3.54E2
F: ITMS + p ESI d w Full ms2 270.70@cid50.00 [60.00-555.00]
Relative Abundance
m/z
227.25
426.42
313.33
241.25
183.17
222.25
211.17
174.17
86.08
112.00
140.17
245.25
288.25
314.33
351.25
367.33
384.42
401.50
427.42
453.42
454.50
455.33
506.50
523.42

Figure 10. L'identification des peptides d'ESM à 539.5 Da par LC-MS. a) la présence d'un composé à 539.5 est observée dans toutes les fractions d'ESM; b) Ce composé est aussi bien observé dans ESM_TCA; c) La fragmentation spécifique du composé 539.5 Da.

3.7. Test des peptides synthétisés par le gène rapporteur.

Les 4 peptides sont testés alors par le gène rapporteur à 2 doses, 10 µg/ml et 100 µg/ml. Même à 10 µg/ml, les 4 peptides peuvent activer le promoteur de ColX (**Figure 11**). En premier, on peut dire que ces peptides sont ostéogéniques, et on arrive à identifier des composés ostéogéniques de l'extrait de la nacre par l'approche du gène rapporteur.

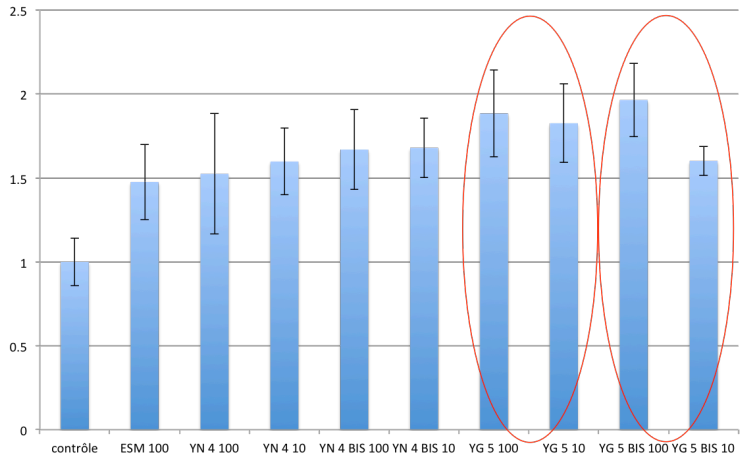


Figure 11. Test des peptides synthétisés par le gène rapporteur. 4 peptides sont testés à 2 doses, 10 µg/ml et 100 µg/ml. YG5 et YG5 BIS (zones rouges) ont un effet plus fort que YN4 et YN4 BIS. Les résultats sont présentés en moyenne ±SEM.

4. Conclusion

Pour améliorer l'efficacité des travaux d'identification des composés ostéogéniques de la nacre, nous avons créé une lignée cellulaire exprimant de manière stable un plasmide contenant un gène rapporteur ostéogénique (ATDC5 pMetLuc2 ColX promoter). Grâce à cette lignée, nous avons trouvé que les lipides et les sucres présents dans l'ESM ont un effet ostéogénique. Les peptides précipités par TCA sont aussi démontrés ostéogéniques, et ont conduit à l'identification des composés

ostéogéniques de la nacre par LC-MS. Finalement, 4 peptides variants de 539.5 Da sont identifiés, synthétisés et démontrés ostéogéniques par le gène rapporteur. Avec ces avancements, nous pensons que le gène rapporteur va contribuer efficacement aux recherches de molécules ostéogéniques. De plus, ces résultats nous permettent d'avancer plus loin et plus rapidement vers l'identification des composés ostéogéniques de la nacre et vers les applications de la nacre en chirurgie orthopédique.

Références

[1] Zhang G, Brion A, Willemin A-S, Piet M-H, Moby V, Bianchi A, et al. Nacre, a natural, multi-use, and timely biomaterial for bone graft substitution. J Biomed Mater Res A 2017;105:662–71. doi:10.1002/jbm.a.35939.

[2] Atlan G, Delattre O, Berland S, LeFaou A, Nabias G, Cot D, et al. Interface between bone and nacre implants in sheep. Biomaterials 1999;20:1017–22.

[3] Westbroek P, Marin F. A marriage of bone and nacre. Nature 1998;392:861–2.

[4] Marin F, Le Roy N, Marie B. The formation and mineralization of mollusk shell. Front Biosci 2012;4:1099–125.

[5] The UniProt Consortium. UniProt: a hub for protein information. Nucleic Acids Res 2015;43:D204–12. doi:10.1093/nar/gku989.

[6] Poux S, Magrane M, Arighi CN, Bridge A, O'Donovan C, Laiho K, et al. Expert curation in UniProtKB: a case study on dealing with conflicting and erroneous data. Database 2014;2014:bau016–bau016. doi:10.1093/database/bau016.

[7] Zouari AB. Characterization of mineral and organic phases in nacre of the invasive pearl oyster *Pinctada radiata* (Leach, 1814). Cah Biol Mar 2011:337–48.

[8] Farre B, Brunelle A, Laprévote O, Cuif J-P, Williams CT, Dauphin Y. Shell layers of the black-lip pearl oyster *Pinctada margaritifera*: Matching microstructure and composition. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 2011;159:131–9. doi:10.1016/j.cbpb.2011.03.001.

[9] Rousseau M. The water-soluble matrix fraction from the nacre of *Pinctada maxima* produces earlier mineralization of MC3T3-E1 mouse pre-osteoblasts. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 2003. doi:10.1016/S1096-4959(03)00032-0.

[10] Rousseau M, Boulzaguet H, Biagianti J, Duplat D, Milet C, Lopez E, et al. Low molecular weight molecules of oyster nacre induce mineralization of the MC3T3-E1 cells. J Biomed Mater Res A 2008;85:487–97. doi:10.1002/jbm.a.31553.

[11] Brion A, Zhang G, Dossot M, Moby V, Dumas D, Hupont S, et al. Nacre extract restores the mineralization capacity of subchondral osteoarthritis osteoblasts. J Struct Biol 2015. doi:10.1016/j.jsb.2015.10.012.

[12] Zhang G, Willemin AS, Brion A, Piet MH, Moby V, Bianchi A, et al. A new method for the separation and purification of the osteogenic compounds of nacre Ethanol Soluble Matrix. J Struct Biol 2016. doi:10.1016/j.jsb.2016.03.016.

[13]Rousseau M, Bédouet L, Lati E, Gasser P, Le Ny K, Lopez E. Restoration of stratum corneum with nacre lipids. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 2006;145:1–9. doi:10.1016/j.cbpb.2006.06.012.
[14]Moutahir-Belqasmi F, Balmain N, Lieberrher M, Borzeix S, Berland S, Barthelemy M, et al. Effect of water soluble extract of nacre (*Pinctada maxima*) on alkaline phosphatase activity and Bcl-2 expression in primary cultured osteoblasts from neonatal rat calvaria. J Mater Sci Mater Med 2001;12:1–6.
[15]Nepal M, Li L, Cho HK, Park JK, Soh Y. Kaempferol induces chondrogenesis in ATDC5 cells through activation of ERK/BMP-2 signaling pathway. Food Chem Toxicol 2013;62:238–45. doi:10.1016/j.fct.2013.08.034.

Discussion générale

1. Méthodologie sur les tests d'activité ostéogénique.

Avec les recherches d'identification des composés de la nacre, la méthodologie progresse. Mais actuellement, il n'y a pas de kit de criblage des molécules ostéogéniques à petite ou moyenne échelle. Les kits que nous avons trouvés sur le marché sont principalement : des kits avec des cellules MC3T3-E1 (In vitro osteogenesis assay kit de Millipore), qui nécessitent 21 jours de culture et une coloration au rouge alizarine; des kits d'activité de la phosphatase alcaline qui nécessitent également un temps long de culture cellulaire; des kits Élisa de dosage de l'ostéocalcine qui nécessitent également un temps long de culture cellulaire; des kits d'évaluation de l'expression des marqueurs ostéoblastiques (par exemple osteogenesis RT Profiler PCR array de Qiagen) qui sont onéreux (Qiagen : 2500€).

Nos travaux ont renouvelé la méthodologie sur la recherche des molécules ostéogéniques présentes dans la nacre. Autrement dit, nous disposons d'une lignée cellulaire exprimant de manière stable un plasmide contenant un gène rapporteur (ATDC5 pMetLuc2 ColX promoter). Le promoteur du collagène de type X est activé au cours de l'ossification endochondrale, qui a lieu au cours de la croissance des os longs, mais également au cours de la réparation osseuse. A l'aide de gène rapporteur, après ensemencement des cellules sur les plaques de 96 puits, le test donne des résultats en 3 jours. En combinant la manipulation de pipettes multicanaux, et éventuellement l'utilisation d'un robot, l'outil sera efficace et robuste statistiquement. La masse d'échantillons pour réaliser un test en huit duplicats est faible, et ne nécessite qu'une quantité de 160it pour une concentration de 100té de dans les puits. De plus, le traitement des échantillons dure 24h, les échantillons à tester n'ont pas besoin d'être filtrés pour stérilisation, ce qui permet aussi d'économiser des échantillons.

Cet outil nous donne beaucoup de possibilités pour mettre au point les tests: Premièrement, on peut mesurer de la luminescence au cours d'une cinétique, car la luciférase est sécrétée dans le surnageant de culture. Le surnageant peut être prélevé sans endommager les cellules. On peut ensuite poursuivre la cinétique. Deuxièmement, on peut imaginer tester plusieurs composés de suite en remplaçant le surnageant et ajoutant une étape de 'lavage'. Troisièmement, le test peut être réalisé à

l'aide d'un robot, car les cellules peuvent être cultivées en 96 puits et la mesure de la luminescence se fait également en 96 puits. Toutes les manipulations présentent une grande répétabilité. Si cet outil peut être mis sur le marché, il permettra tout d'abord de faire un test ostéogénique rapide en tout cas, et le plus important, nous pensons que cela va faire avancer l'état de la recherche des molécules ostéogéniques dans le domaine de la nacre ou d'autres domaines où le criblage des molécules ostéogéniques est nécessaire et difficile, par exemple, le domaine de la découverte de médicaments. Il pourra être utilisé pour cribler des chimiothèques.

Inspiré par l'efficacité de cet outil, il sera aussi encourageant de développer d'autres gènes rapporteurs contenant des promoteurs différents des marqueurs ostéogéniques, par exemple, le promoteur de Collagène type I, Ostéopontine, Ostéocalcine, Runx2, etc. Si ces gènes rapporteurs sont tous disponibles, le criblage des molécules ostéogéniques serait plus crédible par une authentification complémentaire des gènes rapporteurs. Cet ensemble de gènes rapporteurs joue aussi un rôle dans les études des mécanismes d'action des composés ostéogéniques de la nacre.

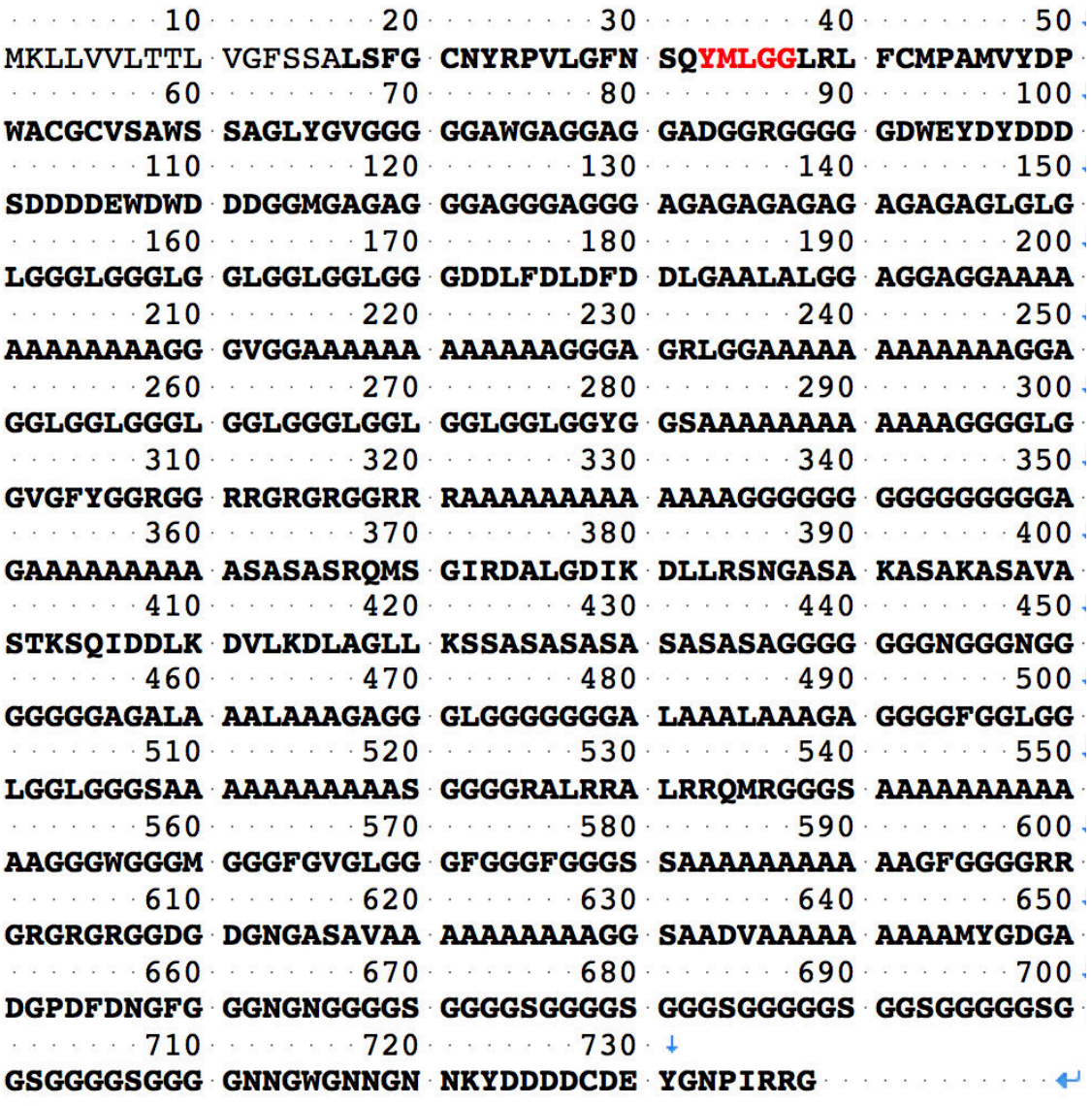
2. Les composés de la nacre et l'effet pro-ostéogénique.

Les protéines ou peptides, les sucres et les lipides, sont les 3 grandes familles de molécules biologiques, dans lesquelles nous avons recherché les composés ostéogéniques de la nacre. Pour étudier ces composés, la première étape est l'extraction à partir de la poudre de la nacre. L'extraction à l'eau (WSM) [46][47][48], ou à l'éthanol (ESM)[49][50], présente plusieurs caractéristiques intéressantes par rapport à l'extraction de l'acide ou d'EDTA, qui nécessite une étape de dialyse pour éliminer les sels [46]. La récupération de toutes les molécules ne nécessite qu'une étape de lyophilisation et évite la perte de molécules de bas poids moléculaire [47]. L'analyse de la WSM a montré que la WSM est très différente de l'extraite EDTA. La WSM, extraite aqueux sans décalcification est hydrophobe et la fraction protéique principale a des propriétés semblables à la soie, tandis que la matrice soluble extraite avec décalcification par l'EDTA est en grande partie très hydrophile [38]. Parmi les extraits, la WSM et l'ESM sont tous prouvées ostéogéniques [49][50][51][52]. Le rendement pour les deux extractions est 0.24% et 0.16% respectivement. Dans la WSM, des protéines, des peptides et plus des 110 métabolites de bas poids

moléculaires allant de 100 à 700 Da ont été identifiés [46][47], 15% des molécules >8000Da dont 83% protéines et 75% des molécules <500Da, dont 11% peptides. L'ESM est aussi obtenue selon une extraction sans décalcification par éthanol. Par rapport à l'eau, l'éthanol permet de récupérer des molécules polaires et apolaires, autrement dit, des molécules hydrophobes et hydrophiles. La présence des peptides, sucres, lipides, même des éléments minéraux (Ca, Na, Mg, K, Mn, Fe, Cu, Zn) est observée. Par LC-MS, 20 molécules sont identifiées dont les poids moléculaires allant de 137 à 832 Da. Ainsi, il faut être attentif au fait que l'extraction avec différents solvants ou méthodes donne des matrices de molécules très différentes. L'ESM est une source de molécules mixtes et de poids moléculaire faible dont il faut à exploiter les composés ostéogéniques.

2.1. Nos peptides identifiés.

Grâce au test sur le gène rapporteur, on a montré que les 4 peptides synthétisés peuvent activer le promoteur de Col X. Ces peptides pourraient résoudre les problèmes d'ossification et de réparation osseuse. Ces composés sont capables de stimuler la formation osseuse dans deux types d'ossification: ossification endochondrale et ossification membranaire. Col X est un marqueur d'hypertrophie, donc de remodelage osseux. En cas de fracture on refait de l'os par une phase d'hypertrophie (ossification endochondrale). La recherche d'homologie de séquences a permis de montrer qu'un des peptides, YN4 bis, présente une forte homologie avec une protéine décrite comme insoluble dans la nacre de l'huître perlière *Pinctada fucata*. Résultat sur la recherche de séquence du peptide YN4 bis sur le site UNIPROT:



Entry & Position(s) O02402[17 - 738]

Description Insoluble protein, *Pinctada fucata*

Feature key Chain

Feature identifier PRO_5004157526

Mais la fonction de cette protéine n'est pas encore identifiée, autrement dit, sa présence est prouvée uniquement au niveau de la transcription. Pour déterminer quels acides aminés sont critiques pour l'effet ostéogénique du peptide YMLGG, il faut continuer à tester les peptides en remplaçant, par exemple, un acide aminé à chaque fois.

Il y a deux protéines de la nacre de *Pinctada fucata* qui sont identifiées et prouvées

ostéogéniques, p10 à 10kDa extraite par 2 mM Na2HPO4-KH2PO4 [50], et P60 à 60kDa extraite par 33% acide acétique [53]. p10 est testée à différentes concentrations allant de 0 à 50 μg/ml sur les cellules MRC-5 et MC3T3-E1 pendant 7 jours pour évaluer l'activité d'ALP, en trouvant que p10 à 10 μg/ml peut donner un effet maximum à l'activité d'ALP. P60 est testée à 100 μg/ml sur les cellules CSM et MC3T3-E1 pendant 8 jours pour réaliser une coloration au Von Kossa en visualisant des nodules minéralisés. Dans l'ESM, nous avons montré qu'il n'y a que des peptides et des acides aminés, mais pas de protéines. Les composés ostéogéniques dans l'ESM ne sont donc ni p10 ni P60.

Alors, d'où vient le peptide YMLGG? Est-ce un produit de dégradation d'une protéine, par exemple, la protéine insoluble hydrophobe de réf. SwissProt O02402? Ou bien ce peptide est-il sécrété au moment de la minéralisation? Comment faire pour tracer ce peptide (et ceux qui lui ressemblent) depuis les cellules du manteau jusqu'à la coquille? Toutes ces questions restent ouvertes. L'activité fonctionnelle pro-ostéogénique de nos peptides doit aussi être validée par les tests sur la lignée MC3T3-E1 (test de minéralisation) et les ostéoblastes humains arthrosiques. L'activité sur l'ossification endochondrale doit être testée sur la lignée ATDC5. En même temps, il faut continuer à identifier d'autres peptides dans la nacre pour connaître au maximum les composés ostéogéniques, qui sont sans doute importants pour comprendre leurs mécanismes d'action pendant l'activité pro-ostéogénique, car l'interaction ou la synergie entre les composés ostéogéniques de la nacre reste à préciser. En effet, nous avons effectué des tests à cet effet. Par exemple, lors de test de minéralisation, nous avons testé l'ESMc et l'ESMa ensemble pour voir s'il y a une interaction entre l'ESMc et l'ESMa par rapport à l'ESMc unique[54]. Des tests similaires sont aussi réalisés, par exemple, tester les fractions de l'ESM avec $CaCl_2$. Lors de test du gène rapporteur, nous avons testé les peptides identifiés avec $CaCl_2$ pour voir s'il y a de l'interaction entre les molécules ostéogéniques de l'ESM et Ca. Malheureusement, les résultats ne sont pas concluants.

2.2. Les sucres et les lipides.

Mentionnés dans la partie « Introduction », les sucres dans la nacre peuvent exister sous forme de chitine, polysaccharide, glycoprotéine et protéoglycanne. Les lipides

sont un mélange d'acides gras, de triglycérides, de cholestérol et de céramides, selon une extraction totale à partir de la poudre de la nacre de *Pinctada margaritifera* avec chloroforme/méthanol (2:1) dont le rendement est 0.54% (p/p). L'ESM est une matrice des molécules de poids moléculaire faible qui comportement partiellement des lipides et des sucres selon les analyses sur les plaques de couches minces. Ainsi, on suppose que les sucres dans l'ESM sont probablement des monosaccharides neutres, et les lipides peuvent exister sous tous types.

Nous avons réalisé des essais de double coloration sur les plaques de couches minces en support d'Aluminium pour voir si il y a des lipoglycannes ou glycolipides dans l'ESM. Précisément, on a séparé l'ESM par la phase mobile des sucres, mais révélé la plaque par la révélation des lipides (sucres/lipides), ou soit à l'inverse (lipides/sucres). Ces analyses montrent que les lipides ne migrent pas sur ces plaques et les sucres qui migrent en général complètement sur les plaques plastiques ne migrent qu'une petite partie. Et ces sucres migrés peuvent être révélés aussi par la solution de révélation des lipides (Résultats non montrés). Donc, nous pensons qu'il y a des lipoglycannes dans l'ESM. En outre, à l'aide de la collaboration avec M. Michel LINDER au laboratoire LiBio à Nancy, nous avons aussi utilisé IATROSCAN New MK-5 analyser (masse détectable au minimum : 1 ng) pour explorer la composition des lipides dans l'ESM. L'ESM est solubilisé dans solvant Chloroform/méthanol (v/v, 2/1) à 50mg/ml pour déposer sur les plaques de silice, ensuite une migration est réalisée utilisant Hexane/diethyl éther/acide formique (v/v/v, 80/20/0.2) comme phase mobile. Cette manipulation permet de déterminer s'il y a des lipides neutres (TAG) présents dans l'ESM. La réponse est négative. Aucun lipide neutre n'est observé dans l'ESM. Ensuite, une deuxième migration des mêmes plaques est réalisée en utilisant chloroform/méthanol/25% ammonium hydroxide (v/v/v, 65/35/5) comme phase mobile pour détecter les phospholipides. La réponse est positive (Résultats non montrés). Nous sommes sûrs maintenant selon ces analyses qu'il y a des phospholipides, mais sans lipides neutres dans l'ESM. Il faut continuer à identifier la composition de ces phospholipides.

L'effet pro-ostéogénique des lipides ou sucres de la nacre est très peu étudié. Nous avons montré à l'aide du gène rapporteur de ColX qu'il y a des lipides et sucres qui sont ostéogéniques, notamment les sucres (voir Publication No°4). En outre, nous

avons prouvé qu'entre l'ESMc et l'ESMa, c'est l'ESMc qui est ostéogénique [54]. En effet, selon les analyses sur les plaques de couches minces ou CLHP, l'ESMc ressemble plus à l'ESM et contient beaucoup plus des sucres par rapport à l'ESMa. Pour les lipides, il n'y a pas de grande différence entre l'ESMc et l'ESMa. Donc, nous pensons que ce sont plutôt les sucres qui jouent un rôle dans l'activité ostéogénique d'ESM par rapport aux lipides. Cette hypothèse reste à valider. Il faudrait extraire les lipides et sucres en grande masse pour réaliser des tests de minéralisation.

Nous avons démontré que Ca^{2+} favorise la minéralisation des ostéoblastes humains arthrosiques et MC3T3-E1, et la présence de Ca dans l'ESM est importante[54]. Il est possible que d'autres éléments minéraux dans l'ESM aient aussi un effet ostéogénique. Bien qu'il ait été supposé pendant longtemps que les composés ostéogéniques de la nacre soient davantage des peptides, il ne faut pas ignorer les rôles des lipides, des sucres et les éléments inorganiques. Les relations entre les peptides, les lipides, les sucres et les éléments inorganiques, en structure ou en fonction, restent à révéler dans le futur.

3. Les possibles mécanismes d'action des composés de nacre pendant l'activité ostéogénique.

Cette partie est très rarement étudiée. On ne sait presque rien sur les voies de signalisation ou les facteurs de transcription impliqués dans l'activité ostéogénique stimulée par la nacre. Les recherches centrées sur l'effet pro-ostéogénique de la nacre s'arrêtent souvent au test de minéralisation, l'évaluation de l'activité de phosphate alcaline ou l'expression des marqueurs ostéogéniques des cellules traitées par l'extrait ou les pièces de la nacre. Même pour les composés ostéogéniques identifiés, uniquement les protéines p10 et P60, les mécanismes d'action discutés concernent le rôle de ce composé pendant la minéralisation de la nacre mais pas pendant la formation osseuse [50][53].

La nacre peut promouvoir la formation osseuse en activant directement les cellules mésenchymateuses et les ostéoblastes, à la fois limitant l'activité des ostéoclastes [55]. Ainsi, l'ossification intramembranaire et l'ossification endochondrale sont possiblement impliquées pendant la formation osseuse stimulée par la nacre. Les ostéoclastes présents dans l'os sont capables de dégrader la nacre, comme démontré *in*

vitro par Duplat [56]. Ce processus conduit à la délivrance et à la diffusion des molécules bioactives présentes dans la matrice de la nacre. La présence de l'ossification endochondrale est observée lors de la réparation de l'os par la nacre chez le lapin [57], ainsi que chez le mouton [58]. L'interface entre la nacre et l'os, latéralement par rapport à la trochlée en nacre, présente des îlots typiques de l'ossification endochondrale. Une séquence complète de la différenciation des cellules, de la nacre à l'os hôte, est observée. Les molécules présentes dans la nacre stimulent rapidement les premières étapes de la différenciation osseuse en activant l'expression de Runx2 et de Col I puis induisent les étapes tardives en activant la transcription de l'ostéopontine, qui est une protéine d'adhérence du tissu osseux, et la formation de matrice extracellulaire [59]. La nacre peut aussi augmenter l'expression de Col X [60], et l'ostéocalcine [49].

Il est supposé que l'avancement des travaux sur l'identification des composés ostéogéniques de la nacre permettra d'engager les études sur les mécanismes d'action de la nacre dans l'os.

4. L'application de la nacre dans l'innovation thérapeutique et les substituts osseux.

A présent, très peu de composés ostéoinducteurs sont disponibles sur le marché. Les BMPs travaillent à promouvoir l'ostéoinduction en se liant à des récepteurs transmembranaires spécifiques sur les cellules souches mésenchymateuses, les ostéoblastes, et les chondrocytes matures [61]. BMP-2 (rhBMP-2, Medtronic, Minneapolis, MN) et BMP-7 (OP-1™ ou rhBMP-7, Stryker Biotech, Hopkinton, MA) sont démontrés à la fois ostéoinductives et angiogeniques, approuvés par la Food and Drug administration (FDA) aux États-Unis. BMP-2 et BMP-7 sont les seuls composés ostéoinductifs disponibles dans le commerce aujourd'hui. Les utilisations cliniques de BMP-2 qui ont l'approbation de la FDA, comprennent son utilisation dans une cage de titane-conique pour une fusion de l'intervertébrale lombaire antérieure, dans la phase aiguë d'une fracture tibiale ouverte, dans l'augmentation du niveau du sinus maxillaire et la crête alvéolaire. BMP-7 a reçu l'approbation pour une pseudarthrose de l'os long et la révision des fusions lombaires postérieures sous l'exception de FDA humanitaire dispositif (HDE) [5][62]. La demi-vie de la rhBMP-2 est d'environ 6,7 min chez les

primates non humains en raison de la dégradation enzymatique et du taux de clairance rapide. Pour augmenter son efficacité de guérison des pseudarthroses, les rhBMPs sont souvent combinés avec des vecteurs biocompatibles tels que des éponges de collagène absorbables. Mais, les coûts médicaux des éponges chargées de BMP-2 (€ 7.911- € 9.291) ont largement dépassé le coût de leur production (€ 2.260- € 2.970) [63]. L'utilisation de rhBMP-2 pour le rachis a pu provoquer une importante formation osseuse ectopique dans le canal rachidien qui peut conduire à des douleurs importantes et invalidantes [64]. En prenant en compte les utilisations hors AMM de BMP-2 et BMP-7, les complications sont plus fréquemment impliquées[62]. Les coûts croissants des BMPs limitent leur usage en clinique, notamment dans les pays où le système d'assurance maladie n'est pas optimal. De plus, les indications étroites des BMPs ne satisfont pas les divers cas de l'orthopédie clinique.

Les peptides ostéogéniques que nous avons identifiés dans la nacre sont des candidats médicaments. Leurs séquences sont plus courtes par rapport à celles des protéines p10, P60 ou les BMPs. Ces peptides dans la nacre sont stables à la température ambiante, sont hydrosolubles et libérés graduellement après l'implantation de la nacre en pièces ou en poudre. Autrement dit, la poudre ou la pièce de la nacre est naturellement un dispositif contrôlant la libération des peptides ostéogéniques. Ces avantages vont sûrement réduire les coûts pendant la synthèse, le stockage, le transport et l'utilisation, qui conduit ensemble à la fin un coût acceptable pour le marché. Ces peptides pourront être utilisés dans la chirurgie réparatrice osseuse comportant la chirurgie orthopédique et la chirurgie maxillo-faciale, comme les BMPs mais avec des indications plus générales, ou pourront être utilisés comme revêtements de surface des substituts de greffon osseux pour améliorer leur ostéoinductivité. Ces peptides ont aussi du potentiel pour traiter des maladies ostéopéniantes, comme par exemple, l'ostéoporose, en stimulant les ostéoblastes et en limitant l'activité des ostéoclastes.

Après avoir vu les différents modèles d'implants de nacre dans les études *in vivo*[55], il est facile d'envisager des utilisations spécifiques de la nacre en chirurgie orthopédique. Si développée sous la forme des dispositifs d'os, pièces, blocs, plaques, tiges, vis, etc., la nacre peut être utilisée (i) pour offrir un soutien mécanique à des sites porteurs, par exemple, à des défauts dans les grands os longs et dans l'os de la mâchoire et (ii) pour remplir de grands défauts osseux aux sites non porteurs, par

exemple, le défaut crânien. La nacre peut également être utilisée comme une cage pour promouvoir la fusion intervertébrale ou interlaminaire si l'instabilité intervertébrale existe. Enfin, la nacre offre une fixation permanente entre les os fracturés et il n'est pas nécessaire de l'enlever après la guérison de fracture. En poudre, la nacre peut être utilisée comme un matériau injectable pour répondre à certains besoins de la chirurgie mini-invasive, en particulier en chirurgie du rachis. Le matériau injectable peut également avoir des propriétés plus intéressantes que des morceaux de nacre, pour remplir les défauts osseux semi-fermés causés par des kystes ou des tumeurs bénignes. Étant ajoutée dans d'autres biomatériaux de greffe, la nacre peut améliorer leur ostéoinductivité et ostéoconductivité. Enfin, la poudre de nacre peut être utilisée comme base de biomatériau usinable dans l'impression 3D, afin de faire un implant personnalisé pour pallier les défauts osseux.

Bien que de nouveaux progrès doivent encore être faits, nous pensons pleinement que la nacre a un potentiel révolutionnaire dans le domaine des substituts osseux.

Conclusions

A partir d'ESM, j'ai participé à un programme de recherches comprenant séparation et synthèse, tests et validation, biochimie et biologie, méthodologie et analyse chimique, pour cibler et identifier les composés ostéogéniques de la nacre.

J'ai tout d'abord validé l'effet pro-ostéogénique d'ESM sur 2 types de cellules, les MC3T3-E1 et les ostéoblastes humains arthrosiques. A partir de là, j'ai considéré l'ESM comme la source des composés ostéogéniques de la nacre. Grâce au couplage de MC3T3 et OB arthrosique, nous avons pu tester et valider l'activité ostéogénique des fractions d'ESM. Nous avons démontré que la partie cationique d'ESM est ostéogénique, sans interaction avec la partie anionique. Le Calcium joue un rôle dans l'activité ostéogénique d'ESM.

Ensuite, pour améliorer l'efficacité des travaux d'identification des composés ostéogéniques de la nacre, nous avons créé une lignée cellulaire exprimant de manière stable un plasmide contenant un gène rapporteur ostéogénique (ATDC5 pMetLuc2 ColX promoter). Grâce à cette lignée, nous avons trouvé que les lipides et les sucres présents dans l'ESM ont un effet ostéogénique. Les peptides précipités par TCA sont aussi démontrés ostéogéniques, et ont conduit à l'identification des composés ostéogéniques de la nacre par LC-MS.

Finalement, une base de données des peptides présents dans l'ESM a été créée. 4 peptides variants de 539.5 Da (YN4 et bis, YG5 et bis), sont identifiés et synthétisés. Les tests sur le gène rapporteur montrent que tous les 4 peptides sont actifs.

Ces résultats nous permettent d'avancer plus loin et plus rapidement vers l'identification des composés ostéogéniques dans la nacre et vers les applications de la nacre en chirurgie orthopédique.

Références

[1] Mackiewicz Z, Niklińska WE, Kowalewska J, Chyczewski L. Bone as a source of organism vitality and regeneration. Folia Histochem Cytobiol 2011;49:558–69.

[2] Compton JT, Lee FY. A review of osteocyte function and the emerging importance of sclerostin. J Bone Joint Surg Am 2014;96:1659–68. doi:10.2106/JBJS.M.01096.

[3] Knothe Tate ML, Adamson JR, Tami AE, Bauer TW. The osteocyte. Int J Biochem Cell Biol 2004;36:1–8.

[4] Ulstrup AK. Biomechanical concepts of fracture healing in weight-bearing long bones. Acta Orthop Belg 2008;74:291–302.

[5] Fillingham Y, Jacobs J. Bone grafts and their substitutes. Bone Jt J 2016;98:6–9.

[6] Oryan A, Monazzah S, Bigham-Sadegh A. Bone injury and fracture healing biology. Biomed Environ Sci BES 2015;28:57–71. doi:10.3967/bes2015.006.

[7] Kwong FNK, Harris MB. Recent developments in the biology of fracture repair. J Am Acad Orthop Surg 2008;16:619–25.

[8] Goldhahn J, Féron J-M, Kanis J, Papapoulos S, Reginster J-Y, Rizzoli R, et al. Implications for fracture healing of current and new osteoporosis treatments: an ESCEO consensus paper. Calcif Tissue Int 2012;90:343–53. doi:10.1007/s00223-012-9587-4.

[9] Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. Semin Cell Dev Biol 2008;19:459–66. doi:10.1016/j.semcdb.2008.07.004.

[10] Khan SN, Cammisa FP, Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM. The biology of bone grafting. J Am Acad Orthop Surg 2005;13:77–86.

[11] Fillingham YA, Lenart BA, Gitelis S. Function after injection of benign bone lesions with a bioceramic. Clin Orthop 2012;470:2014–20. doi:10.1007/s11999-012-2251-5.

[12] Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. J Orthop Trauma 1989;3:192–5.

[13] Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. J Bone Joint Surg Am 2002;84-A:454–64.

[14] Roberts TT, Rosenbaum AJ. Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics: the bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing. Organogenesis 2012;8:114–24. doi:10.4161/org.23306.
[15] De Long WG, Einhorn TA, Koval K, McKee M, Smith W, Sanders R, et al. Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis. J Bone Joint Surg Am 2007;89:649–58. doi:10.2106/JBJS.F.00465.
[16] Kurien T, Pearson RG, Scammell BE. Bone graft substitutes currently available in orthopaedic practice: the evidence for their use. Bone Jt J 2013;95-B:583–97. doi:10.1302/0301-620X.95B5.30286.
[17] Healy KE, Guldberg RE. Bone tissue engineering. J Musculoskelet Neuronal Interact 2007;7:328–30.
[18] McNamara I, Deshpande S, Porteous M. Impaction grafting of the acetabulum with a mixture of frozen, ground irradiated bone graft and porous synthetic bone substitute (Apapore 60). J Bone Joint Surg Br 2010;92:617–23. doi:10.1302/0301-620X.92B5.23044.
[19] Aulakh TS, Jayasekera N, Kuiper J-H, Richardson JB. Long-term clinical outcomes following the use of synthetic hydroxyapatite and bone graft in impaction in revision hip arthroplasty. Biomaterials 2009;30:1732–8. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.12.035.
[20] Yukihira H, Klumpp D, Lucas JS. Effects of body size on suspension feeding and energy budgets of the pearl oysters *Pinctada margaritifera* and *P. maxima*. Mar Ecol Prog Ser 1998;170:119–30.
[21] Bellaaj-Zouari A, Dkhili S, Gharsalli R, Derbali A, Aloui-Bejaoui N. Shell morphology and relative growth variability of the invasive pearl oyster Pinctada radiata in coastal Tunisia. J Mar Biol Assoc U K 2012;92:553–63. doi:10.1017/S0025315411001925.
[22] Nudelman F, Shimoni E, Klein E, Rousseau M, Bourrat X, Lopez E, et al. Forming nacreous layer of the shells of the bivalves Atrina rigida and *Pinctada margaritifera*: An environmental- and cryo-scanning electron microscopy study. J Struct Biol 2008;162:290–300. doi:10.1016/j.jsb.2008.01.008.
[23] Watabe N. Studies on shell formation: XI. Crystal-matrix relationships in the inner layers of mollusk shells. J Ultrastruct Res 1965;12:351-70.
[24] Rousseau M, Lopez E, Couté A, Mascarel G, Smith DC, Naslain R, et al. Sheet

nacre growth mechanism: a Voronoi model. J Struct Biol 2005;149:149–57. doi:10.1016/j.jsb.2004.09.005.
[25] Rousseau M, Lopez E, Stempflé P, Brendlé M, Franke L, Guette A, et al. Multiscale structure of sheet nacre. Biomaterials 2005;26:6254–62. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.03.028.
[26] Currey JD, Zioupos P, Peter D, Casinos A. Mechanical properties of nacre and highly mineralized bone. Proc R Soc B Biol Sci 2001;268:107–11. doi:10.1098/rspb.2000.1337.
[27] Song F, Soh AK, Bai YL. Structural and mechanical properties of the organic matrix layers of nacre. Biomaterials 2003;24:3623–31. doi:10.1016/S0142-9612(03)00215-1.
[28] Marin F, Le Roy N, Marie B. The formation and mineralization of mollusk shell. Front Biosci 2012;4:1099–125.
[29] Mount AS, Wheeler AP, Paradkar RP, Snider D. Hemocyte-mediated shell mineralization in the eastern oyster. Science 2004;304:297–300. doi:10.1126/science.1090506.
[30] Zouari AB. Characterization of mineral and organic phases in nacre of the invasive pearl oyster *Pinctada radiata* (Leach, 1814). Cah Biol Mar 2011:337–48.
[31] Farre B, Brunelle A, Laprévote O, Cuif J-P, Williams CT, Dauphin Y. Shell layers of the black-lip pearl oyster *Pinctada margaritifera*: Matching microstructure and composition. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 2011;159:131–9. doi:10.1016/j.cbpb.2011.03.001.
[32] Pourang N, Richardson CA, Chenery SRN, Nasrollahzedeh H. Assessment of trace elements in the shell layers and soft tissues of the pearl oyster *Pinctada radiata* using multivariate analyses: a potential proxy for temporal and spatial variations of trace elements. Environ Monit Assess 2014;186:2465–85. doi:10.1007/s10661-013-3553-0.
[33] Blackwelder PL, Weiss RE, Wilbur KM. Effects of calcium, strontium, and magnesium on the coccolithophorid Cricosphaera (Hymenomonas) carterae. I. Calcification. Mar Biol 1976;34:11–6. doi:10.1007/BF00390781.
[34] Verma D, Katti K, Katti D. Nature of water in nacre: A 2D Fourier transform infrared spectroscopic study. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc 2007;67:784–8. doi:10.1016/j.saa.2006.08.033.

[35] The UniProt Consortium. UniProt: a hub for protein information. Nucleic Acids Res 2015;43:D204–12. doi:10.1093/nar/gku989.
[36] Poux S, Magrane M, Arighi CN, Bridge A, O'Donovan C, Laiho K, et al. Expert curation in UniProtKB: a case study on dealing with conflicting and erroneous data. Database 2014;2014:bau016–bau016. doi:10.1093/database/bau016.
[37] Bédouet L, Duplat D, Marie A, Dubost L, Berland S, Rousseau M, et al. Heterogeneity of proteinase inhibitors in the water-soluble organic matrix from the oyster Nacre. Mar Biotechnol 2007;9:437–49. doi:10.1007/s10126-007-7120-y.
[38] Pereira-Mouriès L, Almeida M-J, Ribeiro C, Peduzzi J, Barthélemy M, Milet C, et al. Soluble silk-like organic matrix in the nacreous layer of the bivalve *Pinctada maxima*: A new insight in the biomineralization field. Eur J Biochem 2002;269:4994–5003. doi:10.1046/j.1432-1033.2002.03203.x.
[39] Levi-Kalisman Y, Falini G, Addadi L, Weiner S. Structure of the Nacreous Organic Matrix of a Bivalve Mollusk Shell Examined in the Hydrated State Using Cryo-TEM. J Struct Biol 2001;135:8–17. doi:10.1006/jsbi.2001.4372.
[40] Addadi L, Joester D, Nudelman F, Weiner S. Mollusk shell formation: a source of new concepts for understanding biomineralization processes. Chem Weinh Bergstr Ger 2006;12:980–7. doi:10.1002/chem.200500980.
[41] Marie B, Luquet G, Bédouet L, Milet C, Guichard N, Medakovic D, et al. Nacre calcification in the freshwater mussel Unio pictorum: carbonic anhydrase activity and purification of a 95 kDa calcium-binding glycoprotein. Chembiochem Eur J Chem Biol 2008;9:2515–23. doi:10.1002/cbic.200800159.
[42] Dauphin Y, Marin F. The compositional analysis of recent cephalopod shell carbohydrates by Fourier transform infrared spectrometry and high performance anion exchange-pulsed amperometric detection. Experientia 1995;51:278–83. doi:10.1007/BF01931112.
[43] Addadi L, Moradian J, Shay E, Maroudas NG, Weiner S. A chemical model for the cooperation of sulfates and carboxylates in calcite crystal nucleation: relevance to biomineralization. Proc Natl Acad Sci 1987;84:2732–6.
[44] Rousseau M, Bédouet L, Lati E, Gasser P, Le Ny K, Lopez E. Restoration of stratum corneum with nacre lipids. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 2006;145:1–9. doi:10.1016/j.cbpb.2006.06.012.
[45] Bobbio A. The first endosseous alloplastic implant in the history of man. Bull

Hist Dent 1972;20:1–6.
[46] Bédouet L, Rusconi F, Rousseau M, Duplat D, Marie A, Dubost L, et al. Identification of low molecular weight molecules as new components of the nacre organic matrix. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 2006;144:532–43. doi:10.1016/j.cbpb.2006.05.012.
[47] Bédouet L, Marie A, Dubost L, Péduzzi J, Duplat D, Berland S, et al. Proteomics analysis of the nacre soluble and insoluble proteins from the oyster *Pinctada margaritifera*. Mar Biotechnol 2007;9:638–49. doi:10.1007/s10126-007-9017-1.
[48] Duplat D, Gallet M, Berland S, Marie A, Dubost L, Rousseau M, et al. The effect of molecules in mother-of-pearl on the decrease in bone resorption through the inhibition of osteoclast cathepsin K. Biomaterials 2007;28:4769–78. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.07.036.
[49] Brion A, Zhang G, Dossot M, Moby V, Dumas D, Hupont S, et al. Nacre extract restores the mineralization capacity of subchondral osteoarthritis osteoblasts. J Struct Biol 2015. doi:10.1016/j.jsb.2015.10.012.
[50] Zhang C, Li S, Ma Z, Xie L, Zhang R. A novel matrix protein p10 from the nacre of pearl oyster (*Pinctada fucata*) and its effects on both CaCO3 crystal formation and mineralogenic cells. Mar Biotechnol 2006;8:624–33. doi:10.1007/s10126-006-6037-1.
[51] Mouriès LP, Almeida M-J, Milet C, Berland S, Lopez E. Bioactivity of nacre water-soluble organic matrix from the bivalve mollusk *Pinctada maxima* in three mammalian cell types: fibroblasts, bone marrow stromal cells and osteoblasts. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 2002;132:217–29.
[52] Rousseau M, Pereira-Mouriès L, Almeida MJ, Milet C, Lopez E. The water-soluble matrix fraction from the nacre of *Pinctada maxima* produces earlier mineralization of MC3T3-E1 mouse pre-osteoblasts. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 2003;135:1–7.
[53] Lao Y, Zhang X, Zhou J, Su W, Chen R, Wang Y, et al. Characterization and in vitro mineralization function of a soluble protein complex P60 from the nacre of *Pinctada fucata*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 2007;148:201–8. doi:10.1016/j.cbpb.2007.05.010.
[54] Zhang G, Willemin AS, Brion A, Piet MH, Moby V, Bianchi A, et al. A new method for the separation and purification of the osteogenic compounds of nacre

Ethanol Soluble Matrix. J Struct Biol 2016. doi:10.1016/j.jsb.2016.03.016.
[55] Zhang G, Brion A, Willemin A-S, Piet M-H, Moby V, Bianchi A, et al. Nacre, a natural, multi-use, and timely biomaterial for bone graft substitution. J Biomed Mater Res A 2017;105:662–71. doi:10.1002/jbm.a.35939.
[56] Duplat D, Chabadel A, Gallet M, Berland S, Bédouet L, Rousseau M, et al. The in vitro osteoclastic degradation of nacre. Biomaterials 2007;28:2155–62. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.01.015.
[57] Lamghari M, Antonietti P, Berland S, Laurent A, Lopez E. Arthrodesis of lumbar spine transverse processes using nacre in rabbit. J Bone Miner Res 2001;16:2232–7.
[58] Rousseau M, Delattre O, Gillet P, Lopez E. Subchondral nacre implant in the articular zone of the sheep's knee: a pilot study. Biomed Mater Eng 2012;22:227–34. doi:10.3233/BME-2012-0712.
[59] Rousseau M, Boulzaguet H, Biagianti J, Duplat D, Milet C, Lopez E, et al. Low molecular weight molecules of oyster nacre induce mineralization of the MC3T3-E1 cells. J Biomed Mater Res A 2008;85A:487–97. doi:10.1002/jbm.a.31553.
[60] Flausse A, Henrionnet C, Dossot M, Dumas D, Hupont S, Pinzano A, et al. Osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in hydrogel containing nacre powder. J Biomed Mater Res A 2013:n/a – n/a. doi:10.1002/jbm.a.34629.
[61] Kloen P, Di Paola M, Borens O, Richmond J, Perino G, Helfet DL, et al. BMP signaling components are expressed in human fracture callus. Bone 2003;33:362–71.
[62] Lo KW-H, Ulery BD, Ashe KM, Laurencin CT. Studies of bone morphogenetic protein-based surgical repair. Adv Drug Deliv Rev 2012;64:1277–91. doi:10.1016/j.addr.2012.03.014.
[63] Alt V, Donell ST, Chhabra A, Bentley A, Eicher A, Schnettler R. A health economic analysis of the use of rhBMP-2 in Gustilo-Anderson grade III open tibial fractures for the UK, Germany, and France. Injury 2009;40:1269–75. doi:10.1016/j.injury.2009.02.007.
[64] Smoljanovic T, Bojanic I, Delimar D. Adverse effects of posterior lumbar interbody fusion using rhBMP-2. Eur Spine J Off Publ Eur Spine Soc Eur Spinal Deform Soc Eur Sect Cerv Spine Res Soc 2009;18:920–3; author reply 924. doi:10.1007/s00586-009-0959-z.

Résumé

Avec de nombreuses qualités exceptionnelles (biocompatible et ostéogénique), la nacre représente un biomatériau naturel comme substitut osseux. Mais les composés ostéogéniques dans la nacre ne sont pas encore connus. Nos travaux visent à l'identification des composés ostéogéniques de la nacre. L'ESM (éthanol soluble matrix) est un extrait de la nacre qui est démontré ostéogénique. A partir d'ESM, nous avons essayé plusieurs approches pour cibler et identifier ces composés. Grâce au couplage des cellules MC3T3-E1 et d'ostéoblastes humains arthrosiques, nous avons démontré que la partie cationique d'ESM est ostéogénique, sans interaction avec la partie anionique. Le calcium joue un rôle dans l'activité ostéogénique d'ESM. Ensuite, nous avons créé une lignée cellulaire exprimant de manière stable un plasmide contenant un gène rapporteur ostéogénique (ATDC5 pMetLuc2 ColX promoteur). Grâce à cette lignée, nous avons découvert que les lipides et les sucres présents dans l'ESM ont un effet ostéogénique. Les peptides précipités par TCA sont aussi démontrés ostéogéniques, et ont conduit à leur identification partielle par LC-MS. Ces résultats nous permettent d'avancer plus loin et plus rapidement vers l'identification des composés ostéogéniques de la nacre et vers les applications de la nacre en orthopédie clinique.

Mots clés : Nacre, substitut osseux, éthanol soluble matrix, modèle cellulaire *in vitro*, gène rapporteur

Abstract

With many exceptional qualities (biocompatible and osteogenic), nacre represents a natural biomaterial as a bone substitute. However, the osteogenic compounds in nacre are not yet known. Our work aims at the identification of the osteogenic compounds in nacre. The ESM (soluble ethanol matrix) is an extract of nacre that is shown to be osteogenic. From the ESM, we have tried several approaches to target and identify these compounds. Thanks to the coupling of MC3T3-E1 cells and the human osteoarthritis osteoblasts, we demonstrated that the cationic part of the ESM is osteogenic, without interaction with the anionic part. Calcium plays a role in the osteogenic activity of the ESM. Then, we created a cell line stably expressing a plasmid containing an osteogenic reporter gene (ATDC5 pMetLuc2 ColX promoter). Thanks to this cell line, we found out that the lipids and sugars in the ESM have an osteogenic effect. The peptides precipitated by TCA are also demonstrated to be osteogenic, which have led to their partial identification by LC-MS. These results allow us to move farther and faster towards the identification of osteogenic compounds in nacre and the applications of nacre in clinical orthopaedics.

Key words: Nacre, bone substitute, ethanol soluble matrix, *in vitro* cellular model, gene reporter