



Université Mohamed Khider de Biskra  
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature  
et de la vie  
Département des sciences de la nature et de la vie

# MÉMOIRE DE

Domaine : Sciences de la nature et de la vie  
Entrer votre filière  
Entrer votre spécialité

Réf. : .....

---

Présenté et soutenu par :  
**Manel LAAMARI**

Le : mercredi 10 juillet 2019

## Thème

Caractérisation chimique et  
chromatographique des phosphonolipides  
chez la moule *Mytilus galloprovincialis*

### Jury :

Mme. Naoul BENHARZALLAH	MCB	Université de Biskra	Président
M. Ahmed ATHAMENA	M.C.B	Université de Biskra	Rapporteur
Mme. Fatima El Zohra BEN ABDALLAH	MAA	Université de Biskra	Examineur

**Année universitaire : 2018/2019**

## Remerciements

Avant toutes choses, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience pour réaliser ce mémoire.

Il m'est agréable ici de remercier toutes les personnes qui sont intervenues de façon plus ou moins importante dans ce travail.

Je tiens tout d'abord à remercier mon encadreur : **Mr Ahmed ATHAMENA** pour ses remarques toujours pertinentes, ses conciles, ses orientations, sa patience et la confiance qu'il m'a accordé m'ont permis de réaliser ce travail.

Je tiens à remercier les membres de jury **Naoul BEN HARZALLAH** comme **présidente** et **Fatima El Zohra BEN ABDELLAH** comme **examinatrice**, pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail.

Je tiens également à remercier les techniciens de laboratoire d'Elhadjeb (Madame **Mofida**).

## Dédicace

Je dédie ce modeste mémoire :

À mes très chers **parents** que je remercie Dieu de les avoir protégés pour être témoins de ma réussite.

A mes chers frères (**Imad et Farouk**) et à ma belle-sœur (**Amina**) qui ont été un soutien morale généreux et précieux pendant toutes mes années d'études.

A toute ma famille qui porte le nom **LAAMARI**.

À tous mes vrais amis qui ont répandues présent à chaque fois que j'avais besoin d'eux.

**(Zineb, Sara, Salssabil, Meriem, Hafida, Youssra, Rania, Amel, Nour El houda, Aicha, Romaiassa, Fatima, Narimane, Assil, Imane, Selma,Chahinez).**

En fin, toutes personnes qui m'ont aidée de près ou de loin dans l'élaboration et la finalisation de ce travail.

MANEL.

## Sommaire

Liste des Tableaux.....	I
Liste des Figures.....	II
Liste des abréviations .....	III
Introduction.....	1

### Partie bibliographique

#### Chapitre 1: présentation du modèle d'étude *Mytilus galloprovincialis*

1.1 Systématique.....	3
1.2 Anatomie.....	3
1.3 Alimentation .....	4
1.4 Mode respiratoire.....	5
1.5 Reproduction.....	5
1.6 Habitat.....	5

#### Chapitre 2: Généralité sur les phospholipides et les phosphonolipides

2. Définition des lipides.....	6
2.1 Les lipides complexes (les lipides polaires) .....	6
2.1.1 Les glycérophospholipides : .....	6
2.1.1.1 Structure des glycérophospholipides .....	7
2.1.2 Les sphingolipides : .....	8
2.2 Biosynthèse des glycérophospholipides .....	8
2.3 Les phosphonolipides .....	9
2.3.1 Classification.....	10
2.3.1.1 Glycérophosphonolipides .....	10
2.3.1.2 Sphingosylphosphonolipides.....	10
2.3.1.3 Phosphonosphingoglycolipides.....	11
2.3.2 Métabolisme des phosphonolipides.....	11
2.3.3 Rôle des phosphonolipides .....	12

### Partie expérimentale

#### Chapitre 3: Matériel et méthode

3.1 Matériel.....	13
3.1.1. Produits chimiques et matériel instrumental.....	13
3.1.2. Matériel biologique.....	13
3.2. Technique d'analyses biochimiques.....	14
3.2.1. Extraction des lipides totaux selon la méthode de Bligh et Dyer.....	14
3.2.1.1 Principe.....	15
3.2.1.2 Protocole expérimentale.....	16
3.2.2 Détermination de la quantité des lipides totaux.....	17
3.2.3 Dosage du phosphore lipidique.....	17
3.2.3.1 Principe.....	17
3.2.3.2 Protocole expérimental.....	18
3.2.4 Séparation de phospholipides par chromatographie sur couche bidimensionnelle.....	19
3.2.4.1 Principe.....	19
3.2.4.2 Dépôts.....	20
3.2.4.3 Systèmes des solvants utilisé.....	20
3.2.4.4 Révélation des phospholipides aux vapeurs d'iode.....	21
3.2.5 Tests de caractérisation des phosphonolipides.....	21
3.2.5.1 Méthanolyse alcaline.....	21
3.2.5.2 Test de Ninehydrine.....	22
3.4 Analyse statistique.....	23

#### **Chapitre 4: Résultats et discussion**

4.1. Teneur en lipides totaux dans les différents tissus de la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	24
4.2 Teneur en phospholipides totaux.....	25
4.3. Séparation des phospholipides par chromatographie sur couche mince bidimensionnelle.....	27
4.4.1 Test de saponification (méthanolyse alcaline).....	29
4.4.2 Test à la ninhydrine.....	30
<b>Conclusions</b> .....	32
<b>Références bibliographiques</b> .....	33

**Annexes**

**Résumé**

## Liste des Tableaux

<b>Tableau 1.</b> Systématique de la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i> (Jurd, 2000) .....	3
<b>Tableau 2.</b> Composition des systèmes de solvants utilisés pour la séparation des phospholipides par CCM bidimensionnelle (Bodennec et <i>al.</i> 2000). .....	21
<b>Tableau 3.</b> Composition relative en phospholipides des organes de la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i> Extrait de (Lubet et <i>al.</i> , 1985).....	28

# Liste des Figures

<b>Figure 1.</b> <i>Mytilus galloprovincialis</i> (I : morphologie externe ; II : anatomie interne) (Kaddour, 2006).....	4
<b>Figure 2.</b> Modes respiratoire et alimentaire chez la moule (Aquascope, 2000).....	5
<b>Figure 3.</b> Structure générale des glycérophospholipides(Université Joseph Fourier de Grenoble, 2012).....	7
<b>Figure 4.</b> Structure générale des sphingolipides (BN 'Bio, 2006).....	8
<b>Figure 5.</b> Structure des glcérophosphonolipides (Leray, 2010).....	10
<b>Figure 6.</b> Structure de Sphingophosphonolipide (Leray, 2010).....	11
<b>Figure 7.</b> Métabolisme des phosphonolipides (Spencer et al, 2013).....	12
<b>Figure 8.</b> Organes étudiés (Photo originale, 2018).....	13
<b>Figure 9.</b> Protocole général d'analyse des lipides.....	14
<b>Figure 10.</b> Etapes de l'extraction des lipides selon la méthode de Bligh et Dyer (Bligh and Dyer 1956).....	15
<b>Figure 11.</b> Décantation et formation des deux phases distinctes (photo originale, 2018).....	16
<b>Figure 12.</b> Minéralisation acide.....	18
<b>Figure 13.</b> Schéma d'une chromatographie bidimensionnelle.....	19
<b>Figure 14.</b> Schéma réactionnel entre la Ninhydrine et un acide aminé.....	22
<b>Figure 15.</b> Teneur en lipides totaux de chaque organe de la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	24
<b>Figure 16.</b> Droite d'étalonnage de dosage du phosphore lipidique.....	25
<b>Figure 17.</b> Teneurs en phospholipides totaux chez différents organes de la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	26
<b>Figure 18.</b> CCM bidimensionnelle des extraits de lipides totaux de la branchie après révélation par l'iode.....	27
<b>Figure 19.</b> Séparation CCM bidimensionnelle des lipides polaires de <i>Mytilus galloprovincialis</i> sur gel de silice (Kariotoglou et Mastronicolis, 1998).....	29
<b>Figure 20.</b> Séparation des lipides non saponifiés (alkali stable) par CCM-2D.....	30
<b>Figure 21.</b> Révélation des plaques CCM par la ninhydrine.....	31

# Liste des abréviations

**AEP** : aminoethylphosphonate

**CA2EP** : 2-céramideaminoethylephosphonique

**CCM-2D** : Chromatographie sur Couche Mince en deux dimensions

**DAG**: diacylglycérol

**DO**: Densité Optique

**Fig** : Figure

**GPnL** : Glycérophosphonolipides

**LN** : Lipides Neutres

**LPC** : Lyso Phosphatidyl Choline

**LT** : Lipides Totaux

**P. lip** : Phosphore Lipidique

**P**: Phosphore

**PC**: Phosphatidyl-Choline

**PE**: Phosphatidyl-Ethanolamine

**PF**: Poids frais

**PL** : Phospholipides

**PnL** : Phosphonolipides

**PS** : Phosphatidyl-Serine

**PSGL** : Phosphonosphingoglycolipides

**R2** : Coefficient de Corrélation

**SPnL** : Sphingosylphosphonolipides

## Introduction

La cellule est considérée comme étant l'unité structurelle et fonctionnelle de tout être vivant. Elle est délimitée par une membrane et contient un cytoplasme dans lequel baignent des organites, les membranes biologiques sont constituées de lipides, dont les propriétés permettent une organisation en bicouche de phospholipide. Cette bicouche constitue une barrière relativement imperméable de façon à isoler le compartiment interne du milieu environnant. Ces membranes sont constituées de lipides dominés principalement par des phospholipides, et dans lesquels sont incrustés des protéines qui participent aux différentes fonctions cellulaires. Par conséquent, et comme pour les protéines qui ont une multitude de fonctions cellulaires, les lipides membranaires ne présentent pas un simple rôle constitutif de base, ils ont des rôles fonctionnels importants (Fyfe *et al.* 2001).

Les phospholipides constituent une famille de molécules très diverses. Cette diversité vient de l'hétérogénéité des têtes polaires ainsi que des chaînes acyles qui constituent les espèces moléculaires et leur confèrent un caractère amphiphile. Contrôlant le déplacement des molécules entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule ou des organites (Stillwell and Wassall, 2003).

Certaines classes de phospholipides présentent des particularités structurales telles que la liaison éther et la liaison directe P-C ce qui leur donne des propriétés supplémentaires par rapport aux phospholipides classiques (Weil, 2006).

Les phosphonolipides sont des analogues de phospholipides dans lesquels l'acide phosphonique remplace l'acide phosphorique. Cette classe de lipide caractérisée par la présence d'une liaison phosphore-carbone (P-C), ce qui leur permet d'exécuter ses principales fonctions, ils portent un rôle structural comme les phospholipides tandis que leurs structures et leurs voies de métabolisme sont différentes (Weil, 2006).

Les phosphonolipides sont des molécules dont le rôle physiologique n'est pas encore très bien défini. Néanmoins, certains auteurs suggèrent que ces lipides, comme les phospholipides, sont des éléments structuraux dans la membrane cellulaire et soulignent leur rôle possible spécial de la perméabilité membranaire et de stabilisation, comme si les protéger de l'effet de l'hydrolyse des enzymes telles que la phospholipase et la phosphatase (Kariotoglou et Mastronicolis, 2003). Ils sont

largement distribuer chez les animaux aquatiques comme les anémones de mer, les méduses, les mollusques bivalves, et presque tous les invertébrés marins (Kariotoglou et Mastronicolis, 1998).

D'après la littérature, les proportions des phosphonolipides retrouvées chez les invertébrés variant de 6 % du total des phospholipides chez l'ormeau *Haliotis midae* à 20.2 % dans les érythrocytes de *Scapharca broughtonii* (Chelomin et Zhukova, 1981). Une étude a mis en évidence des variations importantes de teneur en phosphonolipides en fonction des espèces et des tissus étudiés, les plus fortes étant observés dans les branchies et les muscles de la moule *Crenomytilusgrayanus* (16.8 % dans les deux organes) (Kostetsky et Velansky, 2009).

Une espèce de classe de bivalves *Mytilus galloprovincialis* est originaire de la méditerranée. Il est toutefois raisonnable de penser que la moule *Mytilus galloprovincialis* exprime des composés de ce type comme il a été démontré chez d'autres bivalves d'origine marine. Dans ce contexte, ce travail a pour objectif principal de rechercher la présence éventuelle de phosphonolipides dans les différents tissus de la moule *Mytilus galloprovincialis*.

Les objectifs spécifiques de cette étude sont :

1. Évaluer la teneur en lipides totaux et en phospholipide totaux dans les différents tissus de la moule *Mytilus galloprovincialis*.
2. Caractériser partiellement la présence des phosphonolipides dans différents tissus de la moule *Mytilus galloprovincialis*.

## 1. Présentation du modèle biologique : *Mytilus galloprovincialis*

Notre étude a été menée sur une espèce de mollusques bivalves *Mytilus galloprovincialis*, dite la moule méditerranéenne (Lubet, 1959), est un mollusque marin, fait partie des animaux invertébrés, avec un corps mou, visqueux, non segmenté à symétrie bilatérale caractérisés par une coquille composée de deux valves calcifiées de forme convexes (Casas, 2007).

### 1.1 Systématique

L'espèce *Mytilus galloprovincialis* fait partie des métazoaires et en systématique on la classe comme c'est indiqué dans le tableau 1 :

**Tableau1.** Systématique de la moule *Mytilus galloprovincialis* (Jurd, 2000).

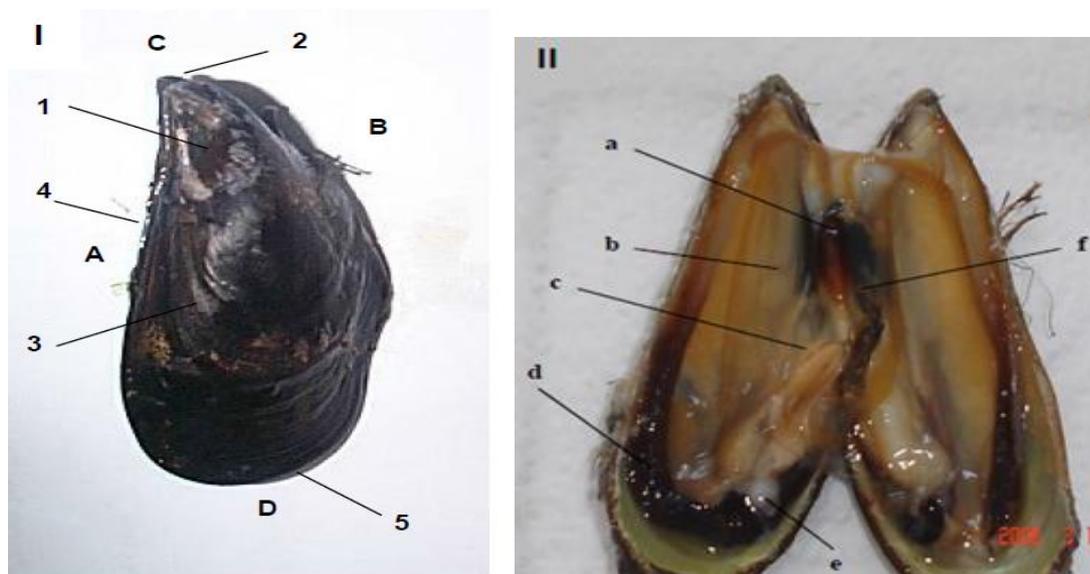
<b>Règne</b>	<b>Animalia</b>
<b>Embranchement</b>	Mollusca
<b>Classe</b>	Bivalvia
<b>Sous -classe</b>	Pteriomorphia
<b>Ordre</b>	Mytiloidea
<b>Famille</b>	Mytilidae
<b>Genre</b>	<i>Mytilus</i>
<b>Espèce</b>	<i>Mytilus galloprovincialis</i>

### 1.2 Anatomie

Les Mollusques possèdent un corps mou, qui est protégé par une coquille à deux valves reliées par une charnière, celles-ci présentent des stries concentriques, témoins de leur croissance (Fig. 1).

Le corps mou de la moule est enveloppé par le **manteau** dont les deux lobes sont soudés dorsalement près de la bouche, constituant de la cavité palléale (Ruppert et *al.* 2004). La moule possède un **piéd** linguiforme, leur permettent le déplacement, à la base de pied se trouve une glande qui synthétise des filaments (le **byssus**), qui par leur solidification au

contact de l'eau de mer, assure la fixation de la moule à son substrat. Deux bandes blanchâtres représentent les **muscles adducteurs** postérieurs et antérieurs, ces muscles servent à l'ouverture et à la fermeture de la coquille. **Le système digestif** est composé de la bouche, l'œsophage, l'estomac, la gland digestive, l'intestin, le rectum et l'anus, l'estomac est pourvu d'un caecum postérieur long (Jurd, 2000). La moule possède deux paires de **branchies** assurant double fonction la respiration par la filtration d'eau de mer qui contient O<sub>2</sub> dissous et de la nutrition, les branchies sont lamellaires et constituées de filaments ciliés, elles sécrètent aussi un mucus piégeant les particules alimentaires qui sera dirigée vers la bouche par des cils vibratiles et par l'intermédiaires des palpes labiaux (Jurd, 2000).



A : face ventral ; B : face dorsal

C : côté antérieur ; D côté postérieure

1 : valve gauche ; 2 : crochet ;

3 : strie d'accroissement

4 : Byssus ; 5: Bord manteau

a : pied ; b : branchies ; c : gonades ; d : manteau

e : muscle adducteur postérieur ; f : glande

digestif

**Figure 1.** *Mytilus galloprovincialis* (I : morphologie externe ; II : anatomie interne)

(Kaddour, 2006).

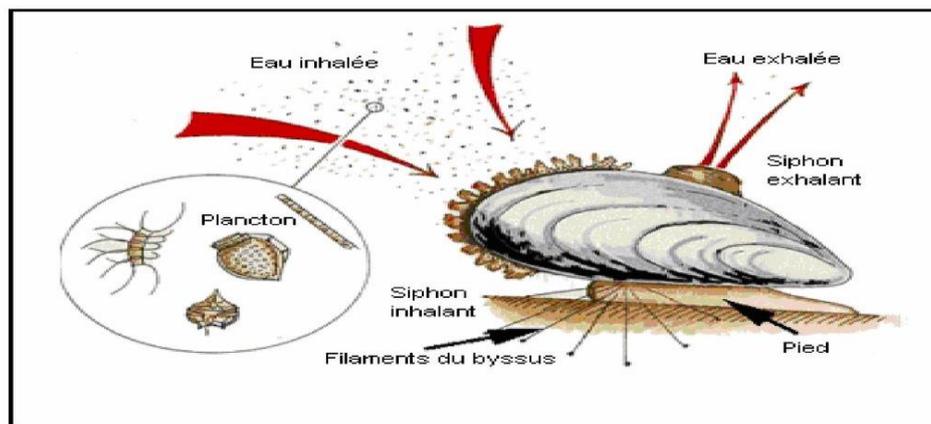
### 1.3 Alimentation

La moule *Mytilus galloprovincialis* est un consommateur microphage omnivore. Cela signifie qu'elle se nourrit de petites particules en suspension dans l'eau de mer. Pour se nourrir, la moule filtre jusqu'à 100 litres d'eau par jour à travers ses branchies et récupère les

particules alimentaires qui y sont retenues. Ce sont les algues microscopiques, le phytoplancton, bactérie et débris organiques qui constituent l'essentielle de sa nourriture (Bouchard, 2004).

#### 1.4 Mode respiratoire

Les échanges d'oxygène se font par l'intermédiaire des branchies. L'eau chargée en oxygène dissout pénètre dans la cavité palléale via le siphon inhalant. Elle est filtrée par les filaments des deux paires de branchies lamelleuses avant d'être évacuée par le courant exhalant (Fig.2) L'oxygène ainsi capté pénètre dans l'hémolymphe pour être distribué dans tout l'organisme. Lorsque la moule se retrouve à l'air libre, elle ferme sa coquille et passe à une respiration anaérobie (respiration réalisée par certains organismes en l'absence d'oxygène) (Cahen, 2006).



**Figure 2.** Modes respiratoire et alimentaire chez la moule (Aquascope, 2000).

#### 1.5 Reproduction

La moule est sexuellement différenciée. Pendant la période de reproduction, les ovules de la femelle sont libérés dans la cavité palléale où ils sont fécondés par les spermatozoïdes. Ces derniers, déversés dans l'eau par les individus mâles, sont entraînés dans la cavité de la femelle par la circulation d'eau entrante. La fécondation est donc externe. Les œufs très nombreux (environ 500000) donnent deux stades larvaires successifs : trochophore et véligère. La larve trochophore se transforme en larve véligère en 24h. Celle-ci se fixe sur un substrat après 2 à 3 semaines, se métamorphose en jeune moule et devient adulte au bout de 2 ans (Cahen, 2006).

#### 1.6 Habitat

La moule vit principalement dans la zone des marées (dans les zones abritées ou sur les côtes rocheuses exposées), mais peut aussi se rencontrer à plus grande profondeur.

## **2. Définition des lipides**

Les lipides sont des composés biologiques définis en fonction d'une propriété physique : la solubilité. Ils présentent en effet une solubilité nulle ou faible dans l'eau mais élevée dans les solvants organiques tels que le méthanol, le chloroforme, le cyclohexane, l'éther éthylique ou l'acétone. Formés principalement de longues chaînes composées de carbone et d'hydrogène, ils peuvent également contenir d'autres éléments comme l'oxygène, le phosphore, le soufre ou l'azote. Les lipides sont des molécules biologiques ayant des structures et des fonctions diverses, pouvant par exemple être impliqués dans la défense immunitaire (cas des eicosanoïdes), la constitution de réserves énergétiques (triglycérides et esters de stérol) ou la structuration des membranes (phospholipides et stérols) (Dudognon ,2013).

### **2.1 Les lipides complexes (les lipides polaires)**

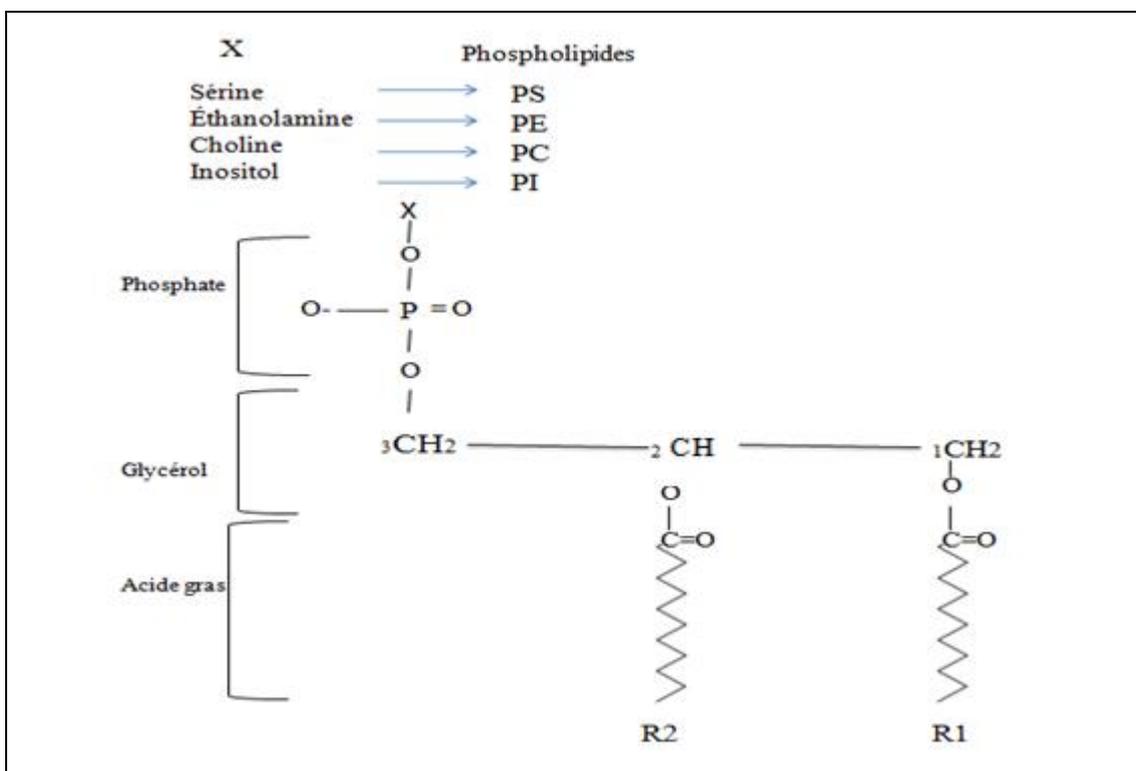
Les lipides dits « polaires », comprenant les phospholipides, les glycolipides et les sphingolipides, sont composés d'une tête polaire, hydrophile (comprenant un groupement polaire dont la nature définit la classe du lipide, un groupement phosphate et un glycérol), liée à une queue fortement apolaire, hydrophobe, constituée en général de deux acides gras .Ce caractère amphiphile permet aux lipides polaires de s'agréger spontanément, de façon à mettre leurs têtes polaires en contact avec l'eau et en isoler leurs chaînes hydrophobes, conduisant ainsi à la formation de structures telles que les micelles, les liposomes ou les bicouches lorsqu'ils se trouvent en milieu aqueux .Les bicouches lipidiques sont à l'origine de la formation des membranes biologiques et les lipides polaires représentent les constituants majoritaires, l'ossature, des membranes cellulaires dans lesquelles sont insérées des protéines. La structure des membranes cellulaires dépend donc à la fois des propriétés des acides gras formant la queue hydrophobe, et de la nature du groupe polaire (Dudognon, 2013).

On trouve deux types de PL : les glycérophospholipides et les sphingophospholipides.

#### **2.1.1 Glycérophospholipides**

Les glycérophospholipides sont les principaux constituants des lipides membranaires des organismes vivants où ils sont organisés en une bicouche lipidique (Delaunay, 2007). Les glycérophospholipides, se répartissent de manière asymétrique entre les deux couches de la membrane dans les cellules vivantes. Ainsi les

glycolipides, les phospholipides à choline, phosphatidylcholine (PC) et sphingomyéline (SPH) sont surtout localisés dans le feuillet externe alors que les phospholipides aminés, phosphatidyléthanolamine (PE) et phosphatidylsérine (PS) ainsi que le phosphatidylinositol (PI) sont concentrés dans le feuillet interne (Higgins et Evans, 1978).



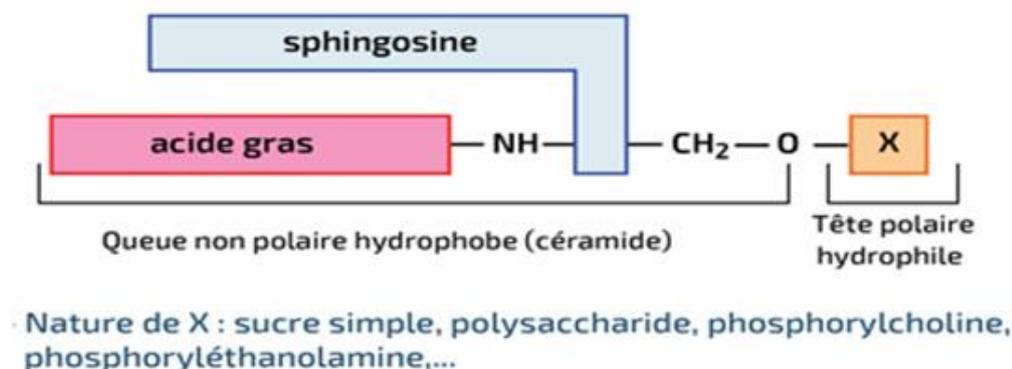
**Figure 3.** Structure générale des glycérophospholipides (Université Joseph Fourier de Grenoble, 2012).

### 2.1.1.1 Structure des glycérophospholipides

Tous les glycérophospholipides connus sont constitués d'acide phosphatidique qui représente la base structurale de cette classe lipidique. La plus part des phospholipides ont un acide gras saturé sur le carbone sn-1 et un acide gras insaturé sur le carbone sn-2 du glycérol. Le groupement phosphate sur le carbone 3 du glycérol peut être lié à différents bases (fig.3) qui selon la nature définissent un group particulier de phospholipides. Ainsi, l'acide phosphatidique peut être lié avec la sérine, l'éthanolamine, de la choline ou de l'inositol donnant lieu respectivement à la PS, PE, PC et PI qui forment les groupes des glycérophospholipides les plus abondants chez les mollusques.

### 2.1.2 Les sphingolipides

Ils constituent le deuxième groupe de lipides membranaires, dérivent des céramides. Ces composés ont pour squelette, non pas le glycérol mais un aminoalcool à longue chaîne insaturée, la sphingosine. Lorsqu'un acide gras acidifie la sphingosine, il en résulte une céramide dont dérivent diverses sous-classes de sphingolipides. Ainsi, dans les sphingomyélines, l'hydroxyle en C-1 de la sphingosine est estérifié par la phosphoéthanolamine ou la phosphorylcholine qui constituent des têtes polaires ; elles sont donc structurellement analogues à la **phosphatidyléthanolamine** et à la **phosphatidylcholine** et se présentent, elles aussi, comme des molécules amphipathiques. Les sphingomyélines sont présentes dans les membranes plasmiques des cellules animales et tout particulièrement dans les gaines de myéline qui entourent et isolent les axones de certains neurones (Weinman et Mehul, 2004).



**Figure 4.** Structure générale des sphingolipides (Université Joseph Fourier 2007).

### 2.2 Biosynthèse des glycérophospholipides

La biosynthèse des phospholipides est commencée par la synthèse de glycérol 3 phosphate formé essentiellement par réduction du dihydroxyacétone phosphate et, à un moindre degré, par phosphorylation du glycérol (Legrandois, 2009). L'acide phosphatidique (diacylglycérol 3 phosphate) est obtenu par deux acylations successives catalysées par un glycérol phosphate acyl transférase. La chaîne en position *sn*-1 est généralement saturée et celle en *sn*-2 insaturée.

L'acide phosphatidique est un intermédiaire commun à la synthèse des phosphoglycérides et des triglycérides. Dans la synthèse des triglycérides, l'acide

phosphatidique est hydrolysé pour donner du diacylglycérol, pouvant être réacylé en triglycérides par une diacylglycéride acyl transférase. La biosynthèse de novo de la PI commence par la formation de CDP-diacylglycérol (cytidine diphosphodiacylglycérol). Cette forme activée réagit avec l'inositol pour former la phosphatidylinositol (PI). La phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidyléthanolamine (PE) peuvent être synthétisées par une voie qui utilise la choline (alimentaire) et l'éthanolamine. La phosphatidylsérine (PS) provient d'une réaction directe entre la (PE) ou la (PC) et la sérine. La phosphatidyléthanolamine (PE) peut être reformée par décarboxylation de la phosphatidylsérine (PS). La phosphatidylcholine (PC) peut être également formée à partir de la phosphatidyléthanolamine (PE) par transméthylation (Voet et Judith, 2005), (Voir annexe 4).

### 2.3 Les phosphonolipides

On appelle phosphonates des composés qui possèdent une liaison covalente phosphore - carbone (P-C). La démonstration de l'existence de phosphonates naturels remonte seulement à 1959, lorsque Horiguchi et Kandatsu ont isolés, par chromatographie d'un hydrolysate de protozoaires du rumen, un composé phosphoré résistant à l'hydrolyse chlorhydrique et révélablé par la ninhydrine (Horiguchi et Kandatsu, 1959). Il a été nommé "ciliatine" cette nouvelle substance a été identifié à l'acide 2 aminoéthylphosphonique (2-AEP). Depuis cette date, le 2-AEP a été mise en évidence dans un grand nombre d'organismes (Tamari *et al*, 1976). Parmi ces phosphonates on trouve les phosphonolipides (Engel, 1977). Les phosphonolipides sont des analogues de phospholipides dans lesquels l'acide phosphonique remplace l'acide phosphorique. Cette classe de lipide caractérisée par la présence d'une liaison directe phosphore-carbone (P-C) au lieu d'une liaison phospho-di-ester (P-O-C) (Ferguson *et al.*, 1982). Les phosphonolipides sont des molécules dont le rôle physiologique n'est pas encore très bien défini. Ils ont été identifiés dans certains tissus animaux et végétaux. Pour citer quelques exemples, on les retrouve chez certains invertébrés marins comme les anémones (*Anemone*), les huitres (*Ostrea*), les mollusques bivalves mais aussi chez certaines méduses (*Pelagia noctiluca*). Il est aussi décrit dans la littérature que ces phosphonolipides sont aussi présents dans le jaune d'oeuf, le sperme humain, le foie de rat et le cerveau de mouton. En ce qui concerne les végétaux, des auteurs décrivent la présence des ces composés dans les graines de

coton et d'abricot. Comme mentionné précédemment, les rôles biologiques des phosphonolipides ne sont pas encore très bien connus. Néanmoins, certains auteurs suggèrent qu'ils pourraient jouer un rôle particulier dans la perméabilité et la stabilisation membranaire (Kariotoglou et Mastronicolis, 2003).

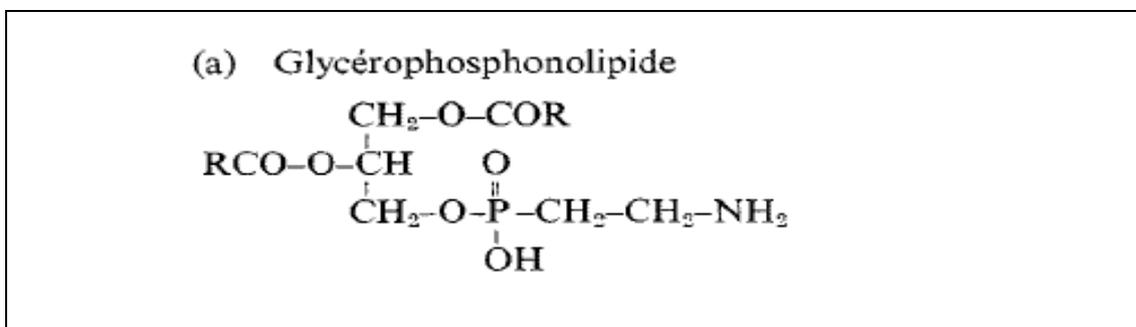
### 2.3.1 Classification

Les phosphonolipides sont classés en trois groupes en fonction de leurs structures :

#### 2.3.1.1 Glycérophosphonolipides (GPnL)

Un analogue des diacylphosphatidyléthanamines avec une liaison P-C au lieu d'une liaison P-O-C a été décrit pour la première fois en 1966 chez le protozoaire *T. pyriformis* qui est le phosphonolipide principal (Leray, 2010). On l'a également trouvé dans plusieurs autres espèces de protozoaires et à de faibles concentrations dans certaines espèces végétales, dans divers tissus de bovins et même dans l'aorte humaine, et il peut exister sous les formes diacyle, alkylacyle et alcénylacyle.

La résistance de ces lipides, et plus particulièrement les dialkylés synthétiques aux actions enzymatiques, les a désignés comme un précieux substitut du surfactant pulmonaire (Leray, 2010).



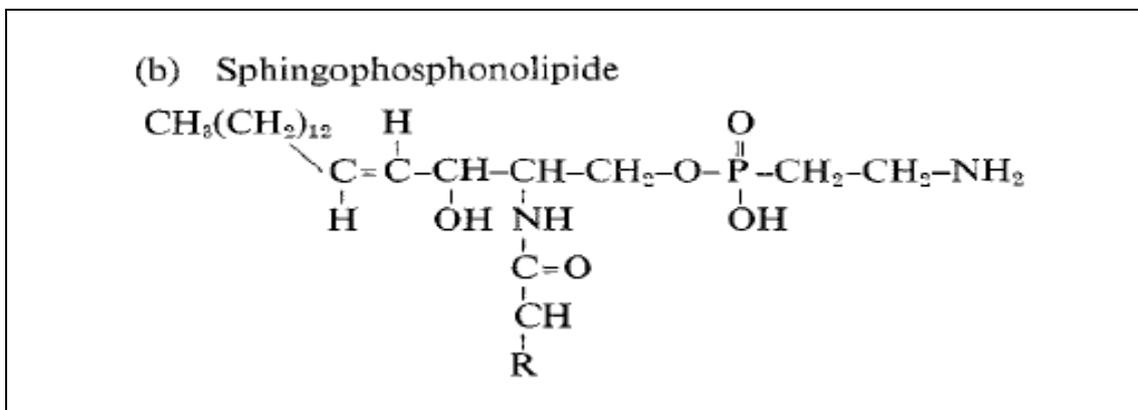
**Figure 5.** Structure des glcérophosphonolipides (Leray, 2010).

#### 2.3.1.2 Sphingosylphosphonolipides (SPnL)

Un analogue du céramidephosphoryléthanolamine avec une liaison P-C au lieu d'une liaison P-O-C a été décrit pour la première fois en 1963 chez une anémone de mer (*Anthropleura elegantissima*) (Leray, 2010).

La partie céramide est composée le plus souvent de sphingosine liée à un acide gras (R) saturé de 16, 17 ou 18 carbones. Ces composés ont été décrits jusqu'à présent chez des bactéries, des protozoaires, des cinidaires (*Pelagia*, *Aurelia*, *Pyllorhiza*) et des mollusques (huitres) pu ils peuvent atteindre des proportions importantes (45% des phosphonolipides totaux). Un dérivé méthylé sur l'amine terminale (le ceramide

méthylaminoéthylphosphonate) a même été isolé du protozoaires, *Tetrahymena pyriforms*. Ce dernier composé, provenant de l'huitre *Crassostrea virginica*, pourrait avoir un grand intérêt dans le traitement du cancer depuis que M.Chintalapatia mis en évidence en 2009 ses activités anti-angiogéniques et inhibitrices des cellules cancéreuses du sein (Leray, 2010).



**Figure 6.** Structure de Sphingophosphonolipide (Leray, 2010).

### 2.3.1.3 Phosphosphingoglycolipides (PSGL)

Sont une classe de phosphonolipide contenant l'AEP et une chaîne d'oligosaccharides il est répondu chez l'escargot marin (Hawthorne et Ansell, 1982).

### 2.3.2 Métabolisme des phosphonolipides

On connaît plus d'une voie pour la biosynthèse du 2-aminoéthylphosphonate, mais la plus simple nécessite trois enzymes et utilise le phosphoénolpyruvate comme précurseur clé, comme illustré (fig.7).

À l'exception des phosphotripeptides apparentés K-26 et I5B2 (figure7 a, bleu clair), la première étape de toutes les voies de biosynthèse des phosphonates connues sont les conversions réversible du phosphoénolpyruvate (PEP) en phosphonopyruvate (PnPy) par PEP mutase (PepM) (Figure 7a). Parce que l'équilibre d'isomérisation favorise grandement le PEP, la formation de PnPy est toujours reliée à une deuxième étape essentiellement irréversible. Une stratégie consiste à ajouter un anion acétate équivalent à la cétone de PnPy lors de la biosynthèse de FR-900098 et la voie de biosynthèse de la fosfomycine dans les pseudomonades (figure 7 b). Une deuxième stratégie, plus courante implique la décarboxylation de PnPy par le phosphonopyruvate décarboxylase (ppd) pour produire du phosphonoacétaldéhyde (PnAA), qui est ensuite fonctionnalisé dans une myriade (figure 7c). Ces transformations comprennent réduction par les alcools déshydrogénases métal-

dépendants (AD) pour générer du 2-hydroxyéthyl phosphonate (2-HEP) et transamination pour produire le groupe de tête polaire pour les phosphonoglycanes ou les phosphonolipides (figure 7 c) (Spencer et al, 2013).

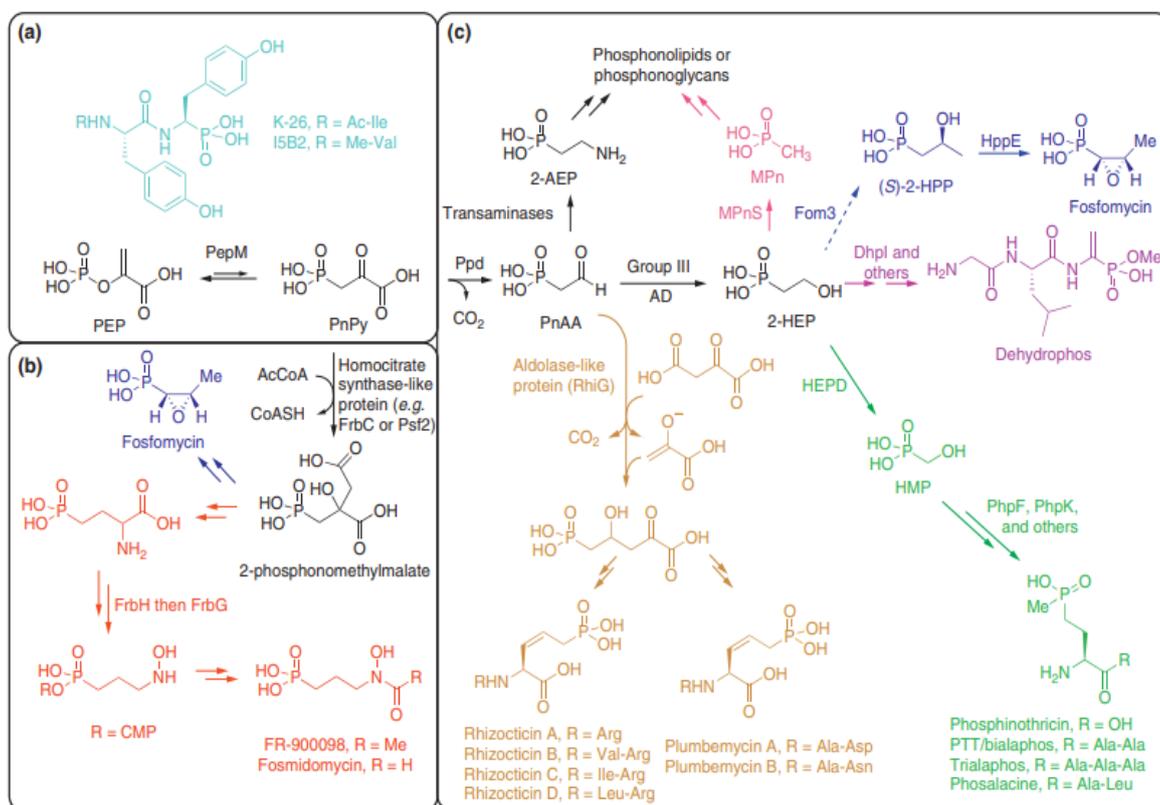


Figure 7. Metabolisme des phosphonolipides (Spencer et al, 2013).

### 2.3.4 Rôle des phosphonolipides

Bien qu'il y ait eu quelques spéculations, on en sait peu sur la fonction des phosphonolipides. Ils sont supposés être des composants de la membrane et ils sont connus pour être résistants à l'action des phospholipases endogènes. Par conséquent, ils peuvent jouer un rôle dans la protection des membranes cellulaires contre les attaques d'enzymes ou des conditions environnementales difficiles, ou ils peuvent simplement contribuer à la conservation de l'élément essentiel phosphore (Christie, 2010).

### 3.1 Matériel

#### 3.1.1. Produits chimiques et matériel instrumental

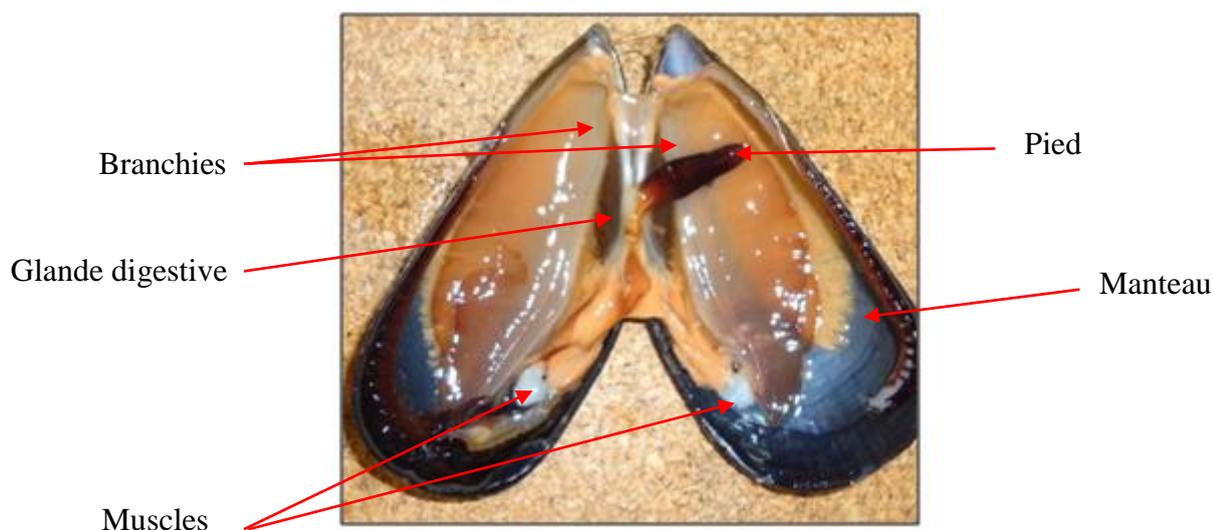
Les produits utilisés dans la partie « analyse biochimique » sont de grade analytique proviennent chez Sigma-Aldrich (Spruce- street, St Louis, USA et Biochemchermopharm). Touts les plaques de chromatographie sur couche mince (CCM) de taille 20\*20cm (support en aluminium souple) en gel de silice non modifie G60 avec un liant polymérique (l'épaisseur du gel est 200µm et la taille des particules 10-12µm). Parmi l'appareillage utilisé dans cette étude : spectrophotomètre UV visible (UVmini1240SHIMADZU), centrifugeuse (Sigma-Aldrich), rotavapeur (Heidolph), étuve de séchage (Memmert, Germany).

#### 3.1.2. Matériel biologique

Le modèle biologique utilisé pour cette étude : le mollusque bivalve *Mytilus galloprovincialis*. Une espèce largement répandue dans la zone de méditerranée (Lubet, 1976). Un échantillonnage des moules a été effectué par des étudiantes de l'année précédente pendant le mois de Décembre 2018. Les moules ont été procurées aux prés de l'entreprise Orca Marine, dont le siège est situé à Aïn Taya (Alger).

##### 3.1.2.1 Nature des tissus et organes étudiés

Notre étude sur la moule *Mytilus galloprovincialis* a porté sur les extraits de lipides totaux des tissus suivants: glande digestive, branchies et muscle (fig. 8).



**Figure 8.** Organes étudiés (Photo originale, 2018).

### 3.2. Technique d'analyses biochimiques

L'extraction, purification et les analyses biochimiques des lipides sont réalisées selon le protocole suivant (fig. 9).

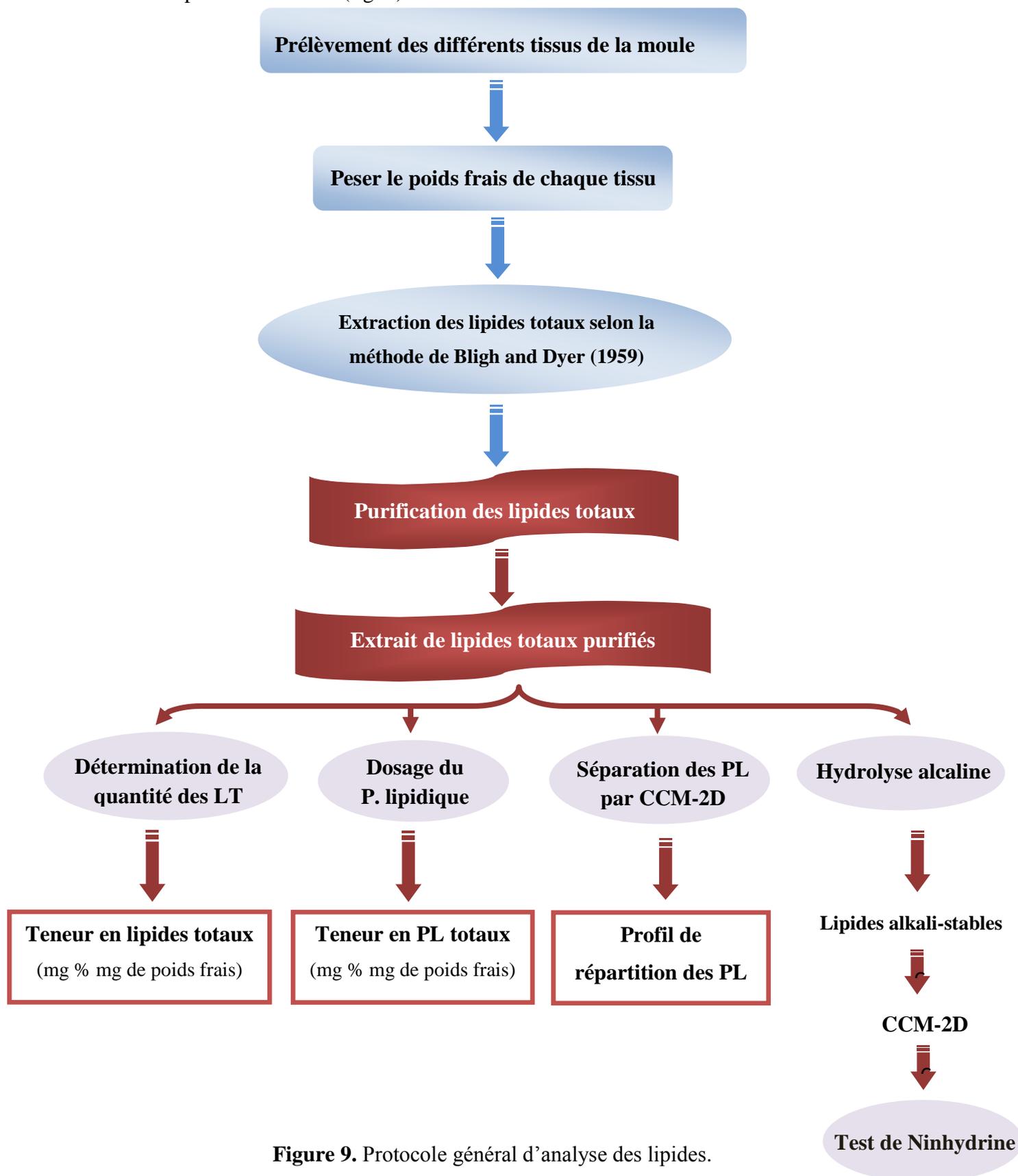
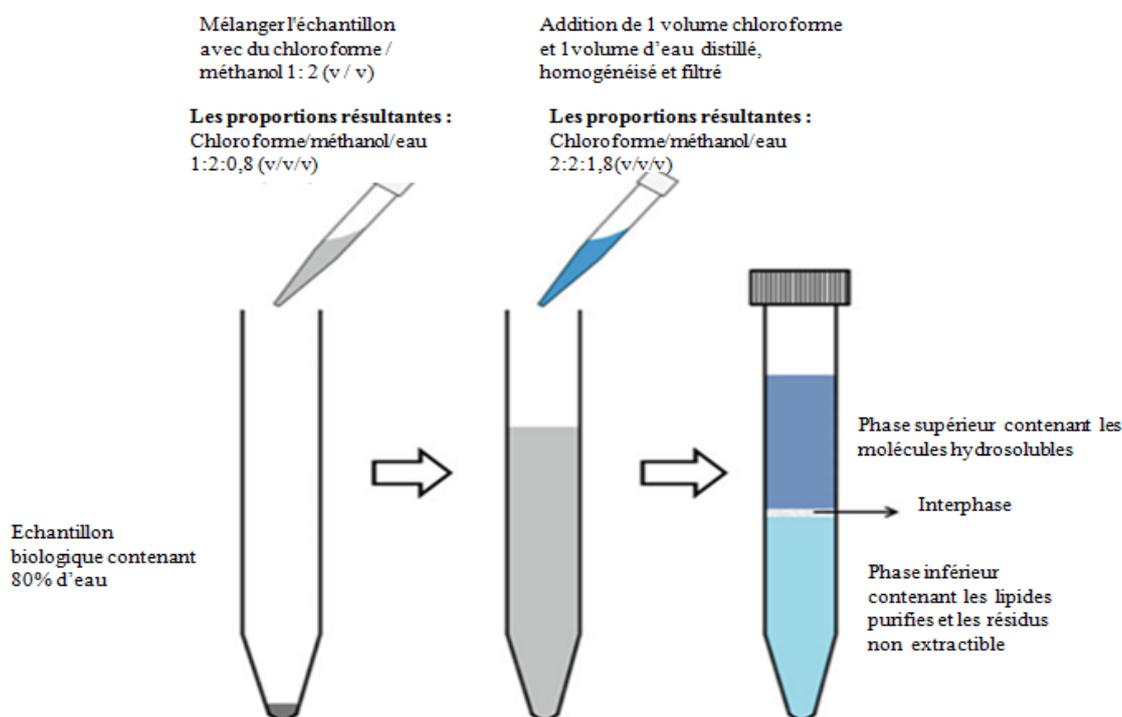


Figure 9. Protocole général d'analyse des lipides.

### 3.2.1. Extraction des lipides totaux selon la méthode de Bligh et Dyer

#### 3.2.1.1 Principe

Cette technique dérive de la méthode de Bligh and Dyer (1959) qui est considérée comme la méthode de référence pour l'extraction des lipides. Cette méthode est basée sur l'extraction de la plupart des composés lipidiques présents dans les tissus d'animaux par un mélange de solvants chloroforme /méthanol monophasique dont les proportions 1 : 2 (V/V), ensuite la séparation des phases est réalisée par addition d'un volume de chloroforme et un volume d'eau, donc après dilution les volumes de chloroforme, méthanol et d'eau sont maintenus dans les proportions 2/2/1,8 (V/V/V) et on obtient un mélange diphasique (Fig. 10). Après élimination de la phase supérieure, les lipides sont quantifiés dans la phase chloroformique.



**Figure10.** Etapes de l'extraction des lipides selon la méthode de Bligh et Dyer (Bligh and Dyer 1956).

### 3.2.1.2 Protocole expérimental

Environ 4 à 5 g de chaque tissu de la moule sont pesés directement dans des flacons en verre de 250 mL. L'extraction est réalisée par homogénéisation des tissus en présence d'un mélange binaire monophasique composée de chloroforme/méthanol, dans les proportions 1/2 (V/V) ce qui est obtenu par addition de 5 mL de chloroforme et 10 mL de méthanol. On agite pendant 2 minutes (l'homogénat obtenu est composé d'une seule phase). On ajoute ensuite 5 mL de chloroforme puis 5 mL d'eau, chacun de ces ajouts étant suivi d'une période d'agitation de 30 secondes. Les trois solvants sont alors dans les proportions 2/2/1,8 (V/V/V) et on obtient un mélange diphasique.

Cette suspension est ensuite filtrée sur un papier filtre à flux moyen, et après une courte période de décantation, le filtrat est complètement séparé en deux phases distinctes :

- La phase inférieure, chloroformique, contenant les lipides purifiés.
- La phase supérieure contenant l'eau, le méthanol et les molécules polaires (hydrosolubles) tels que les acides aminés, les sucres, les sels...etc. Cette dernière phase est éliminée par aspiration à la pompe à vide.



**Figure 11.** Décantation et formation des deux phases distinctes (photo originale, 2018).

Bligh et Dyer ont signalé qu'une étape d'extraction supplémentaire des résidus de filtration en utilisant du chloroforme devrait être réalisée afin d'obtenir un meilleur rendement pour les lipides non polaires tels que les triacylglycérols.

### 3.2.2 Détermination de la quantité des lipides totaux

La phase chloroformique qui contient les lipides purifiés est transférée dans des ballons rodés 250 mL préalablement pesé et les solvants sont évaporés à 50°C sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif (Büchi). Une 2<sup>ème</sup> évaporation avec 10 mL d'éthanol absolu permettant l'élimination de l'eau résiduelle par formation d'un azéotrope (éthanol-eau).

La quantité totale des lipides purifiés est finalement déterminée, après équilibration thermique à la température ambiante. Les ballons sont à nouveau pesés et par la différence on obtient le poids de lipides totaux extraits des tissus qui sont exprimés en mg% mg PF.

Les lipides sont ensuite dissous dans un mélange de [benzène-méthanol 1:1(v/v)], qui permet une conservation sous congélation à -30°C pendant de longues durées, cette étape de manipulation doit être effectuée sous la hotte.

### 3.2.3 Dosage du phosphore lipidique

#### 3.2.3.1 Principe

Ce dosage est basé sur la quantification par méthode colorimétrique du phosphore lipidique préalablement libéré par minéralisation acide dans un mélange d'acide perchlorique (1vol), acide sulfurique (2vol), tétrahydroxyde de vanadium (1g/L de mélange acide). Elle comprend deux étapes :

- La libération du phosphore lié aux lipides, par minéralisation acide.
- Le dosage proprement dit du phosphore minéral.

L'absorbance est mesurée à 830 nm contre une gamme étalon comportant 0 à 9µg de phosphore (solution standard de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  à 6 µg de P/50 µL d'eau distillée) qui servira à quantifier le phosphore, elle sera traitée dans les mêmes conditions que les échantillons lipidiques. Cette méthode est mise au point par Fisk et Subbarow, (1925), puis elle a été modifiée par (Brichon, 1984).

#### 3.2.3.2 Protocole expérimental

##### a) Minéralisation

Le réactif de minéralisation est ajouté à chaque échantillon de lipides totaux et de gamme d'étalon, à raison de 0,25 mL par tube. La minéralisation acide s'effectue par chauffage sur bec bunsen sous la hotte jusqu'à l'obtention de fumées blanches.



Adition de réactif de minéralisation et chauffage des tubes au bec bunsen

**Figure 12.** Minéralisation acide.

NB : il faut penser impérativement à évaporer le benzène : méthanol dans lequel sont conservés les lipides totaux, avant la minéralisation.

Après minéralisation et refroidissement, on ajoute à chaque tube 5 mL de réactif ANSA donnant avec le phosphore en milieu sulfurique une coloration bleue spécifique (bleu de molybdène) après 10 minutes de chauffage dans le bain marie à 100°C, les tubes sont à nouveau vortexés et l'intensité de la couleur bleue est mesurée au spectrophotomètre à 830 nm.

Les proportions pour 100 mL de réactif :

- Mélange ANSA (0.63 g).
- Heptamolybdate d'ammonium (0.2 g).
- H<sub>2</sub>O 100 mL.

La teneur en phosphore lipidique des échantillons sont alors calculées à partir de l'équation de la droite d'étalonnage. Les résultats sont ramenés au volume total de

l'échantillon (phosphore lipidique total) puis en mg %mg de poids frais. Les teneurs en phospholipides totaux sont déduites du phosphore lipidique en utilisant la relation suivante :

$$\text{Phospholipides totaux (mg)} = \text{phosphore lipidique total (mg)} * 27$$

NB : ce facteur de 27 correspond aux animaux d'eau de mer (Brichon, 1984).

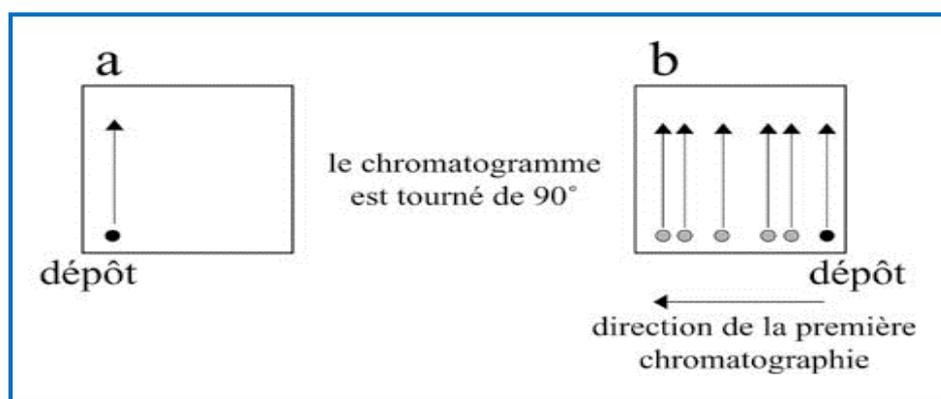
### 3.2.4 Séparation de phospholipides par chromatographie sur couche bidimensionnelle

#### 3.2.4.1 Principe

La séparation des PL est réalisée par chromatographie sur couche mince bidimensionnelle (CCM-2D) selon la méthode décrite par (Bodonnec et al, 2000). Cette chromatographie liquide solide est basée sur la distribution des solutés entre l'adsorbant fixe et la phase liquide mobile.

Chacun des solutés est soumis à une force de rétention (par adsorption) et une force d'entraînement par la phase mobile. L'équilibre qui en résulte aboutit à une migration différentielle des solutés de l'échantillon à analyser, ce qui permet leur séparation.

On réalise une première chromatographie à l'aide d'un système de solvants puis une deuxième à l'aide d'un second système de solvants, dans une direction perpendiculaire à la première (Fig. 13).



**Figure 13.**Schéma d'une chromatographie bidimensionnelle.

**a)** première chromatographie ; **b)** deuxième chromatographie

### 3.2.4.2 Dépôts

Après concentration éventuelle des lipides par évaporation, le dépôt est réalisé avec une micropipette de 10  $\mu\text{L}$  dans un angle de la plaque à 1.5 cm environ de chacun des bords. Il est effectué sous courant d'air tiède. La séparation des PL est réalisée par CCM-2D, ces plaques permettant de déposer en moyenne entre 300-500  $\mu\text{g}$  de PL ou 15 à 25  $\mu\text{g}$  de phosphore lipidique.

### 3.2.4.3. Systèmes des solvants utilisés

La séparation des divers phospholipides met en jeu 3 systèmes successifs de solvants dont la composition est résumée sur le (tab. 2).

#### ▪ Premier système

Ce solvant est éther diisopropylique seul (qu'on remplacé par l'éther diéthylique. Cette première migration permet de séparer les lipides neutres (qui migrent au front) et des phospholipides (qui restent au dépôt). La migration est poussée jusqu'à environ 1cm du bord supérieur de la plaque.

#### ▪ Second système (mélange basique $\text{OH}^-$ )

Cette seconde migration s'effectue de long d'un axe perpendiculaire au premier et elle est réalisée après séchage rapide des plaques issues du solvant N°=I.

#### ▪ Troisième système (mélange acide $\text{H}^+$ )

Avant passage dans le système N°=III les plaques sont séchées. La migration s'effectue selon le même axe que pour l'éther di-éthylique, jusqu'à 0.5 cm environ du bord supérieur de la plaque.

**Tableau 2.** Composition des systèmes de solvants utilisés pour la séparation des phospholipides par CCM bidimensionnelle (Bodennec et *al.* 2000).

<b>Système</b>	<b>Compositions</b>	<b>Proportion volumes respectifs</b>
<b>I. Ether diéthylique</b>	100%	100
<b>II. Mélange OH<sup>-</sup></b>	Tétrahydrofurane	50
	Acétone	20
	Méthanol	40
	Eau distillée	6
<b>III. Mélange acide H<sup>+</sup></b>	Chloroforme	50
	Acétone	20
	Méthanol	10
	Acide acétique	15
	Eau distillée	5

#### **3.2.4.4. Révélation des phospholipides aux vapeurs d'iode**

C'est une technique non destructive, après contact avec une atmosphère saturée en vapeurs d'iode des plaques obtenues de la migration, les phospholipides se révèlent en jaune plus ou moins intense par fixation réversible de l'Iode (I<sub>2</sub>) sur les doubles liaisons. La coloration est labile et disparaît après élimination des vapeurs d'Iode.

#### **3.2.5 Tests de caractérisation chimique des phosphonolipides**

##### **3.2.5.1 Test de saponification (la méthanolyse alcaline)**

###### **a) Principe**

La soude NaOH par son pouvoir à hydrolyser chimiquement les esters de glycérol permet de saponifier les phospholipides classiques, ils sont éliminés au cours des lavages, seul les molécules non saponifiables restent dans la phase chloroformique (Vance et Sweeley, 1967).

###### **b) Protocole expérimentale**

On prélève un volume de chaque extrait de lipides totaux qui correspond à une masse de 7 mg, puis on élimine les solvants par évaporation dans l'étuve à 50 C°. Les

lipides totaux secs sont résuspendus dans 2 mL de chloroforme et 2 mL de solution de soude méthanolique à (0.6 N). Après une agitation des tubes au vortex, on les laisse réagir pendant 1 heure à la température de laboratoire, puis on ajoute 0,23 mL d'acide chlorhydrique concentrer (pour neutraliser la solution) et on attend de 10 à 20 minutes ensuite 2 mL chloroforme et 1,3 mL d'eau distillée sont ajoutés.

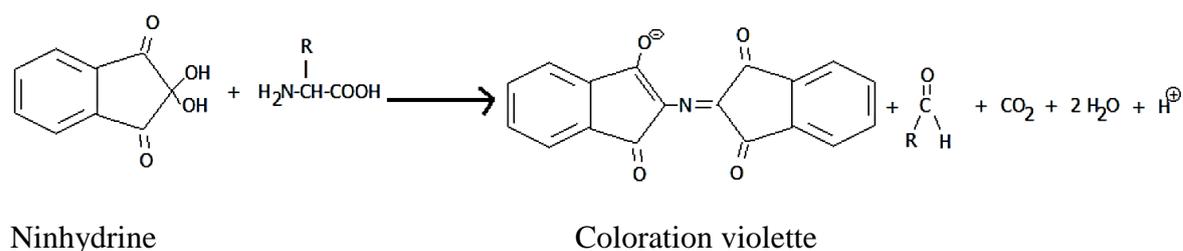
On vortex à nouveau les tubes puis on les centrifuge à 1500 tpm pendant 10 minutes afin d'accélérer la séparation des 2 phases. On élimine la phase supérieure à l'aide d'une pipette pasteur et la phase inférieure est lavée 2 fois par 2mL méthanol et 1,5 mL d'eau distillée (on centrifuge et on élimine la partie supérieure à chaque fois)

On évapore la phase chloroformique contenant les lipides non saponifiés puis on la résuspendre dans 60µL de chloroforme – méthanol 2 :1 (v/v) et on dépose 20 µL sur la plaque.

### 3.2.5.2 Test à la ninhydrine

#### a) Principe

La **ninhydrine** (2,2-dihydroxyindan-1,3-dione) est un composé aromatique possède la particularité de former un produit coloré avec les acides aminés (la tache révélée est souvent violette), cette réaction se fait à chaud. Ce réactif est utilisé comme révélateur des fonctions aminées libres et permet de visualiser les phospholipides aminés, tel que la PS, PE et leurs dérivés lyso (LPS et LPE). Voici le schéma réactionnel de cette réaction (fig. 14).



**Figure 14.** Schéma réactionnel entre la Ninhydrine et un acide aminé

#### a) Préparation de la solution de ninhydrine :

Ce réactif est obtenu après dissolution de 0,3 g de ninhydrine dans 100 mL N-Butanol contenant 3 mL d'acide acétique galcial, après pulvérisation des plaques de CCM par le réactif de la ninhydrine il faut ensuite les chauffés dans l'étuve à 110 °C pendant 3 minutes, ce réactif présente l'avantage de donner une coloration qui disparaît spontanément après quelques heures (Brichon, G 1984).

### 3.4 Analyse statistique

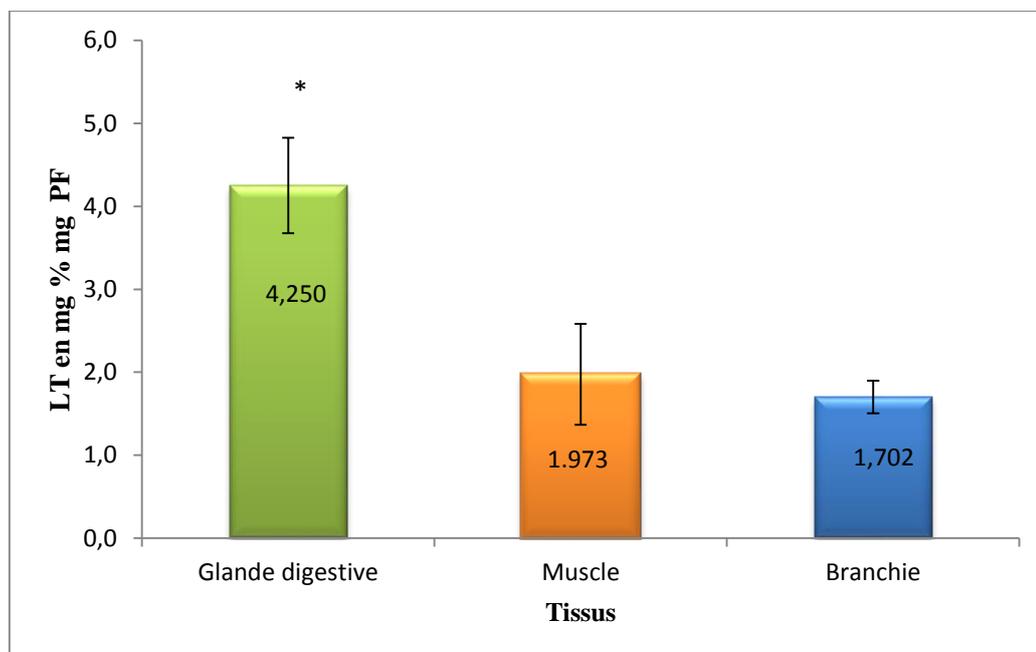
Toutes les valeurs présentées dans les histogrammes sont exprimées en moyenne  $\pm$  erreur de standard de la moyenne des trois répétitions (moyenne  $\pm$  SEM). Pour comparer les moyennes des différents organes, le test le plus approprié est le test d'ANOVA à un facteur. Ces analyses ont été effectuées en utilisant le logiciel XLSTAT version 2009.

La signification de la différence est résumée comme suit :

- (0,05<sig) indique que la différence n'est pas significative.
- (0.05 > sig) indique que la différence est significative.
- (sig<0,01) indique que la différence est hautement significative.
- (sig<0,001) indique que la différence très hautement significative.

#### 4.1. Teneur en lipides totaux dans les différents tissus de la moule *Mytilus galloprovincialis*.

La figure ci-dessous montre la distribution des lipides totaux (LT) dans les différents tissus de la moule *Mytilus galloprovincialis*, exprimés en mg % mg de poids frais.



**Figure15.** Teneur en lipides totaux de chaque organe de la moule *Mytilus galloprovincialis*

Les résultats sont exprimés en (moyenne  $\pm$ SEM) pour (n=3) répétitions.

Le symbole (\*) indique que la différence est significative ( $0.05 > \text{sig}$ ) donnée par le test d'ANOVA pour la teneur en LT entre les différents organes.

Les lipides des différents tissus (glande digestive, muscle et branchie) ont été extraits et purifiés selon la méthode de Bligh and Dyer comme décrit dans la partie matériel et méthodes. Les résultats obtenus ont révélé que la glande digestive est l'organe le plus riche en lipides totaux ( $4,250 \pm 0,576 \text{ mg \% mg poids frais}$ ) par contre le muscle et la branchie montrent des teneurs les plus faibles en lipides totaux (il n'y a pas une différence significative ( $\text{sig} > 0,05$ ), elles sont comprises entre  $1,973 \pm 0,608$  et  $1,702 \pm 0,196 \text{ mg \% mg de poids frais}$ , respectivement). Ces résultats sont obtenus sur plusieurs moules répartis en 3 groupes, et l'analyse statistique montre qu'il existe une différence significative entre la glande digestive et les deux derniers organes ( $\text{sig} < 0,05$ ).

Nos résultats sont similaires à ceux qui ont été trouvés dans la littérature, d'après Lubet et *al*, (1985) ont montré que la teneur en lipides peut atteindre (9,7 mg %mg de poids frais) dans la glande digestive et dans la branchie ont trouvé (1.73 mg %mg de poids frais).

La différence dans la teneur en LT entre la glande digestive et les deux organes (la branchie et le muscle) est due essentiellement au rôle physiologique de la glande digestive qui est l'organe impliqué dans la production et le stockage des lipides. (La glande digestive est l'organe équivalent de foie chez les poissons et les crustacés). Par ailleurs Delaport et *al*, (2007) ; Gonzalez-Araya et *al*, (2011) ont confirmés que l'alimentation influence beaucoup sur la quantité et la composition lipidique du tissu, d'autre part Pazos et *al*, (1997) ; Berthelin et *al*, (2000) ; Ojea et *al.*, (2004) ont précisés que les conditions environnements du milieu (notamment la température la salinité et la richesse trophique) et la physiologie des bivalves (notamment la croissance et la reproduction) qui déterminent la nature et disponibilité de la nourriture.

#### 4.2 Teneur en phospholipides totaux

Une gamme d'étalonnage a été établie à partir d'une solution mère de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (6 $\mu\text{g}$  de P/50 $\mu\text{L}$  d'eau distillé), à des quantités comprises entre 0 et 9 $\mu\text{g}$ . On trace la droite d'étalonnage (qui représente la variation de la densité optique obtenue en fonction de la quantité du phosphore) (Fig14). Et on déduit par interpolation la quantité du phosphore lipidique dans les différents tissus étudiés.

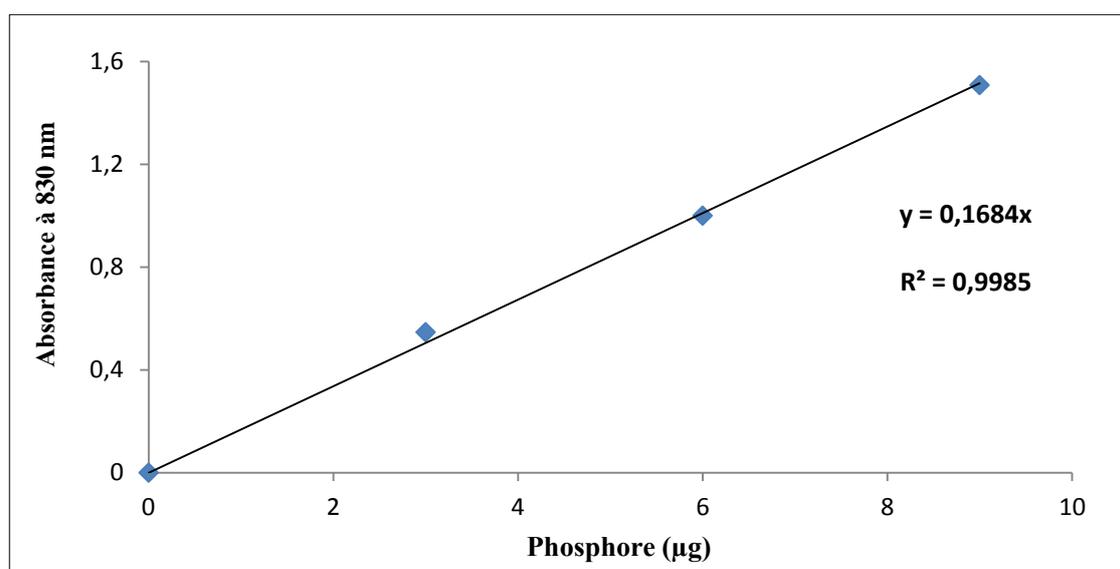
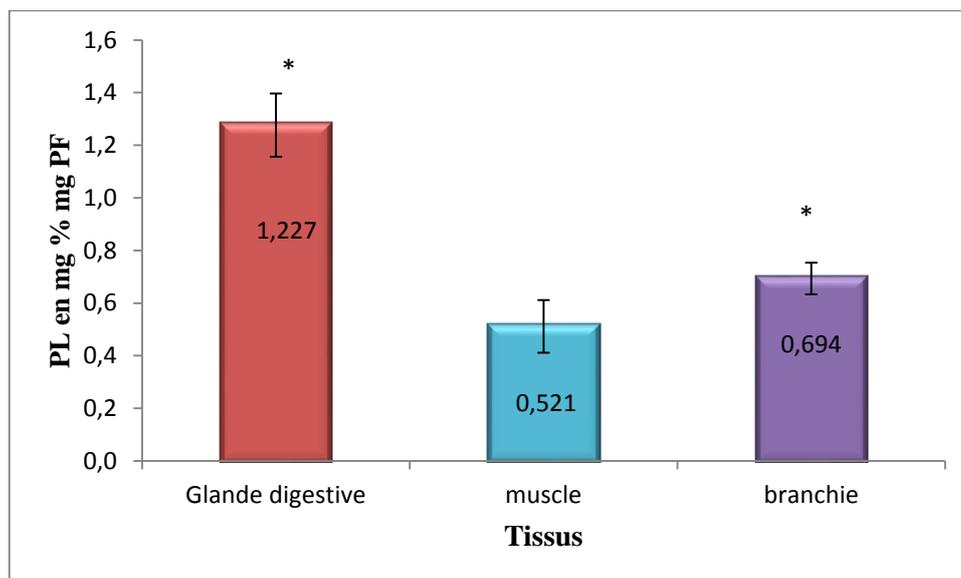


Figure 16. Droite d'étalonnage de dosage du phosphore lipidique.

Y : l'équation de la droite exprimant l'absorbances en fonction des quantités du phosphore ( $\mu\text{g}$ ).  
 $R^2$  : Coefficient de corrélation.



**Figure17.** Teneurs en phospholipides totaux chez différents organes de la moule *Mytilus galloprovincialis*.

Le symbole (\*) indique que la différence est significative ( $0.05 > \text{sig}$ ) donnée par le test d'ANOVA pour la teneur en PL entre les différents organes.

Les résultats sont exprimés en (moyenne $\pm$ SEM) pour (n=3) répétitions

La conversion du phosphore lipidique en phospholipides totaux (figure. 17) montre que dans la branchie et le muscle les valeurs exprimées en mg pour cent mg de tissu sont très comparables ( $0,694 \pm 0,06$  et  $0,512 \pm 0,1$  respectivement) Les deux tissus sont  $0.05 < \text{Sig}$  indique que les deux échantillons sont homogènes est la différence n'est pas significative.

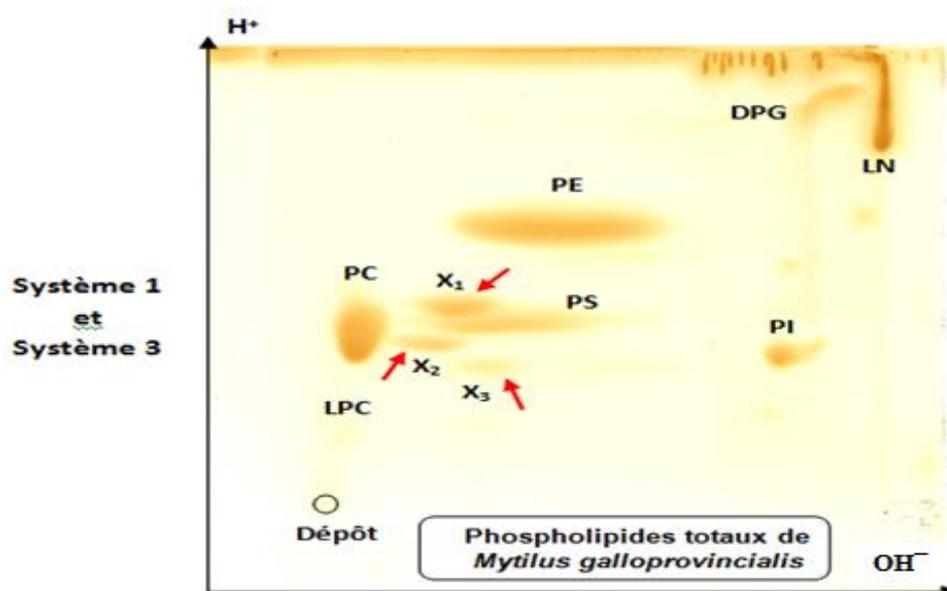
Les teneurs les plus élevées se retrouvent là encore dans la glande digestive ( $1,277 \pm 0,12$ ). L'étude statistique des teneurs en phospholipides totaux entre la branchie, muscle et la glande digestif montre que les valeurs sont très hautement significativement différent ( $\text{sig} < 0,001$ ).

Lubet et al (1985) à montré que le teneur en PL est relativement stable dans la branchie et le manteau (organe pas étudiée), il à trouvé des valeurs comprise entre (1,05 et 1,01 % du poids frais). la teneur la plus élevés en PL est mesurée à 1,69% du poids frais dans la glande digestif.

Le rapport PL/LT montre que c'est la branchie qui est l'organe le plus riche en PL (41% contre 25% et 30% pour le muscle et la glande digestif). Cela est dû à la structure des branchies et l'anatomie de la branchie consiste en quatre paires de demi-branchies (branchies avec filaments branchiaux sur un côté seulement) les filaments riches en membranes alors la teneur en PL est augmentée (Wilaiwan 1986).

#### 4.3. Séparation des phospholipides par chromatographie sur couche mince bidimensionnelle

Un aliquote de lipides totaux de la branchie est déposé sur la plaque qui correspond à 15 µg du phosphore lipidique. Les lipides sont successivement séparés dans les systèmes de solvant 1, 2 et 3, Les phospholipides sont révélés par l'Iode (I<sub>2</sub>).



**Figure 18.** CCM bidimensionnelle des extraits de lipides totaux de la branchie après révélation par l'iode.

LN : ensemble de tous les lipides neutres ; PC : Phosphatidylcholine ; PE : Phosphatidylethanolamine ; PS : Phosphatidylsérine ; LPC : Lysophosphatidylcholine ; DPG : Diphosphatidylglycérol ou cardiolipine.

$H^+$  et  $OH^-$  sont les deux axes de migration :  $H^+$  dans le système acide et  $OH^-$  dans le système basique.

La figure (voir annexe 3) montre la plaque standard de profil de répartition des lipides (Bodonnec, 2000) et par comparaison avec la plaque de (figure. 18) on trouve que la séparation chromatographique sur couche mince bidimensionnelle des extraits de lipides totaux permet de montrer que les principales classes de phospholipides, PC, PE (PL majoritaires), PI, PS et DPG (PL minoritaires) observées chez les

mammifères, les poissons ou les crustacés sont également retrouvées chez le mollusque bivalve *Mytilus galloprovincialis*. Néanmoins, il existe des variations selon les espèces (Vaskovsky, 1989) et au niveau des organes différenciés (Lubet et al, 1985) (Table. 2). Les facteurs qui influencent la composition en phospholipides peuvent être endogènes (sexe, reproduction) ou exogènes (salinité, température, saison, nutrition) (Vaskovsky, 1989).

Contrairement aux mammifères et aux poissons, la sphingomyéline (SPH) n'existe pas chez les bivalves à quelques exceptions près (Sargent, 1989). Cependant, la présence d'autres sphingolipides, notamment les phosphonolipides a été mise en évidence chez la moule *Mytilus galloprovincialis* (Lubet et al, 1985) et chez beaucoup d'espèces d'invertébrés (Joseph, 1982; Vaskovsky, 1989).

**Tableau 3.** Composition relative en phospholipides des organes de la moule *Mytilus galloprovincialis* Extrait de (Lubet et al, 1985).

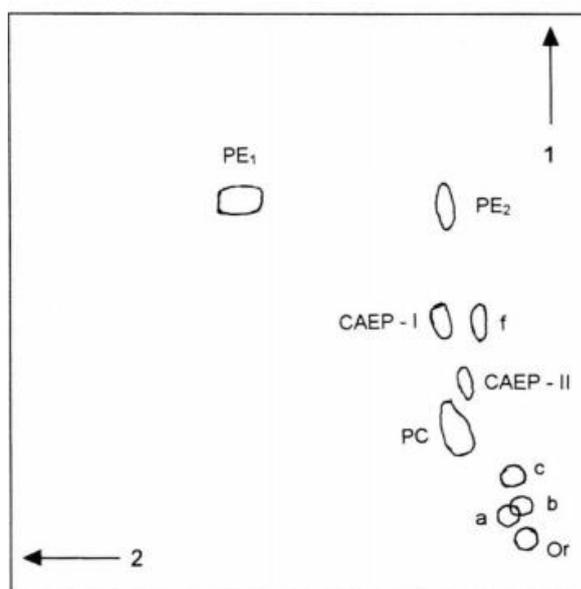
	Branchies	Manteau	Glande digestif
Phospholipides	pourcentage de P.Lip	pourcentage de P.Lip	pourcentage de P.Lip
Phosphonolipides		1,3±0,6	1,5±0,7
X	1,0±0,7	7,8±2,0	5,2±0,3*
Y	9,3±0,6		
Phospholipides		tr	3,2±0,2
LPC	2,7±0,6	42,3±2,8	49,2±1,1*
PC	387,0±1,5	7,4±1,1	2,7±0,8**
PS	3,7±1,0	6,8±0,6	7,0±0,9
PI	5,9±0,6	31,9±1,6*	22,1±1,9**
PE	37,2±0,2	4,2±0,6	6,4±1,8
DPG	2,2±1,3	tr	0,5±0,2
PA	tr		

Les résultats sont exprimés en (moyenne±SEM)

(tr) traces; (\*) Valeur significativement différente des branchies; (\*\*) valeur significativement différente du manteau

Les phosphonolipides ont été trouvés également dans les résultats obtenus par (Kariotoglou et Mastronicolis, 1998) sur les lipides polaires de la moule *Mytilus galloprovincialis*, leur plaque CCM 2D a donné presque les mêmes molécules.

Kariotoglou et Mastronicolis ont confirmé leurs travaux en 2003 sur la composition et la diversité en sphingophosphonolipides des mollusques comestibles (*Mytilus galloprovincialis* et *Eobania vermiculata*). Ils ont trouvé que chez la moule *M. galloprovincialis* les quantités de CAEP-I et CAEP- II étaient 11,2 et 2,8% des PL totaux respectivement, Or ces valeurs chez *E. vermiculata* sont le (CAEP- I) =  $7.6 \pm 0.3$  % avec  $1.5 \pm 0.1$ % pour le (CAEP-II).



**Figure 19.** Séparation CCM bidimensionnelle des lipides polaires de *Mytilus galloprovincialis* sur gel de silice (Kariotoglou et Mastronicolis, 1998).

1 et 2 sont les deux axes de migration : 1 dans le système acide et 2 dans le système basique  
Les CAEP I et CAEP II : correspond aux phosphonolipides de la classe des sphingophosphonolipides.

PE : deux espèces moléculaires différentes de phosphatidyléthanolamine.

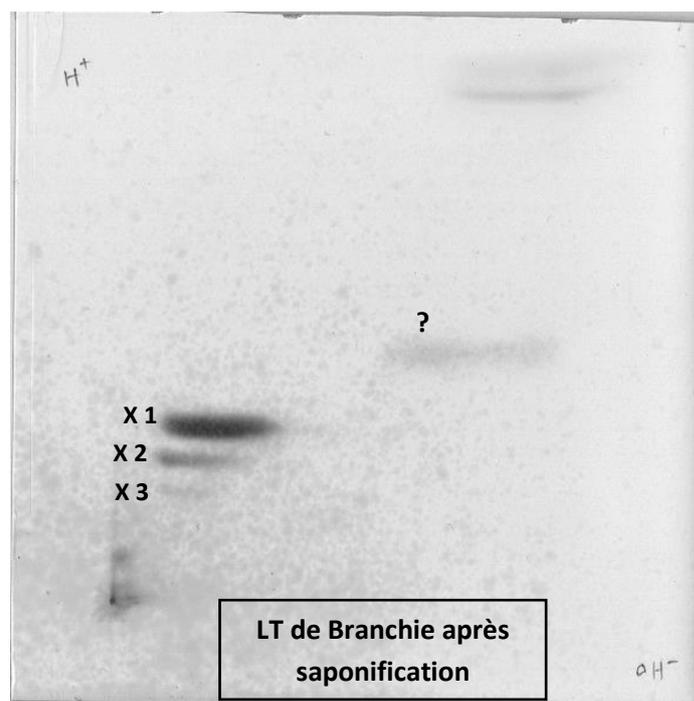
Les lettres : a, b, c, f et Origine (Or) désignent le reste des composants lipidiques polaires de *Mytilus*.

Sens (1) : chloroforme/méthanol / acide acétique / eau (50: 25: 6: 2, en vol) et dans le sens( 2) avec chloroforme / méthanol / eau (65: 20: 3, par vol).

#### 4.4.1 Test de saponification (methanolysse alcaline)

La Figure 18 Montre la plaque obtenue avec les LT de la branchie, qui contient les glycérophospholipides PC, PE, PI et PS ainsi que les composés (X1, X2 et X3).

Après saponification douce par NaOH méthanolique (Figure. 20) il y a disparition des spots correspondant aux phospholipides PC, PE, PI et PS (puisque le traitement par NaOH rompt les liaisons esters et détruit les glycérophospholipides) et seules demeurent les tâches correspondant aux fractions X1, X2 et X3 (ces composés sont caractérisés par une liaison directe C-P qui n'est pas hydrolysé par NaOH). Ce résultat confirme, au moins en partie, la nature phosphonolipide de ces composants.



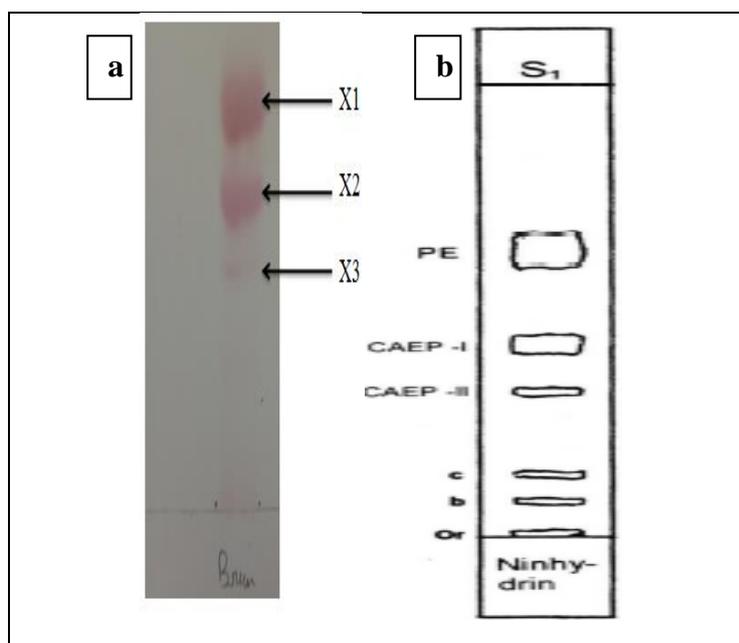
**Figure 20.** Séparation des lipides non saponifiés (alkali stable) par CCM-2D

IL a été rapporté par Lubet et *al*, 1985 que la présence des phosphonolipides dans les différents tissus de la moule *Mytilus galloprovincialis* a été confirmé par le test de Stillway (Stillway et Harmon, 1980) qui consiste à pulvériser la plaque de CCM avec le réactif de Dittmer et Lester (qui colore les lipides phosphorés en bleu) après carbonisation à 100°C pendant 15 minutes et refroidissement de la plaque, les spots correspondant à X1 et X2 redeviennent bleus alors que toutes les autres tâches restent gris noir, indiquant que ces deux composés X1 et X2 appartenant au groupe des phosphonolipides (liaison directe -C-P- et non -C-O-P- comme dans le cas des phospholipides), malheureusement on n'a pas pu réaliser ce dernier test en raison de la non-disponibilité des produits pour préparer le réactif de Dittmer et Lester .

#### 4.4.2 Test à la ninhydrine

Ces constituants, indiqués X1, X2 et X3, encadrent la PS dans le système de

separation bidimensionnel utilisé (figure18). Ils sont révélables par pulvérisation de réactif à la ninhydrine, ils ont donc au moins une fonction aminée libre caractéristique de la structure de l' aminoethylphosphonate (AEP), un composé présent dans tous les phosphonolipides. Ces composés ont été mis en évidence pour la première fois chez les bivalves par Matsubara (Matsubara and Hayashi, 1973) dans *C. gigas*.



**Figure 21.** Révélation des plaques CCM par la ninhydrine.

Les résultats présentés dans la (figure 21.a) sont en accord avec les travaux de (Kariotoglou et Mastronicolis, 1998) ont été trouvé 2 phospholipides (CAEP I et CAEP II) réagir positivement avec la ninhydrine ils étaient comporté comme des phosphonolipides (ceramide aminoethylphosphonic) (figure 21.b) et que certain PL aminés comme la PE et la PS réagir positivement à ce réactif.

Le diagramme S1 montre l'échantillon après la pulvérisation de réactif à la ninhydrine.

PE ; phosphatidyléthanolamine; PC, phosphatidylcholine. Or, origine; CAEP I et II, sphingophosphonolipides majeurs et mineurs de *Mytilus* respectivement. Les lettres a, b, c et origine désignent également des composants lipidiques polaires.

## Conclusion

Dans ce travail nous avons procédé à caractérisé chimiquement et chromatographiquement des phospholipides particuliers (les phosphonolipides) chez la moule *Mytilus galloprovincialis*.

Au cours de notre étude, nous avons pu mettre en évidence les principaux points suivants :

- ❖ Tous les tissus ne possèdent pas la même quantité en LT, la glande digestive est l'organe le plus riche en LT, par contre la branchie et le muscle sont les plus pauvres.
- ❖ Concernent les teneurs en phospholipides totaux des tissus de la moule on trouve que les valeurs dans le muscle et la branchie sont relativement stable alors que la teneur le plus élevée est encore dans la glande digestif.
- ❖ La CCM 2D montre que tous les phospholipides observés chez les mammifères, PC, PE, PI et PS, DPG ainsi que le lysophosphatides LPC est également présents chez la moule en plus des phospholipides particulière X1, X2 et X3.
- ❖ Le traitement de phospholipides totaux par la méthanolyse alcaline à révèlé que les molécules X1, X2 et X3 sont alkali stable (c'est-à-dire résiste la saponification).
- ❖ Ces constituants X1, X2 et X3, sont révélables par pulvérisation de réactif à la ninhydrine, ils ont donc au moins une fonction aminée libre. Ces résultats confirment, au moins en partie, la nature phosphonolipide de ces composants.
- ❖ En fin pour mieux caractérisé les phosphonolipides il faut établir d'autres tests supplémentaires comme test de stelwey qui permet de caractérisé la liaison phoshonate et aussi de quantifiée les composées X1, X2 et X3 pour déterminer leurs teneurs par rapport aux phospholipides individuels.

## Références bibliographiques

- Aquascope. (2000). Tjarno Marine Biological Laboratory, Stromstad, Sweden.
- Banni M., Negri A., Mignone F., Boussetta H., Viarengo A., Dondero F. 2011 Geneexpression rhythms in the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) across an annual cycle. PLoS One 6(5): e18904.
- Bear E., Stanace N.Z. 1964. Phosphonolipids. The jornal of biological chemistary, 240, 1, pp 44-48.
- Berthelin C., Kellner K., Mathieu M. 2000. Storage metabolism in the pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). Comparative Biochemistry and Physiology 125B : 359-36.
- Biochem Lubet P., Brichon G., Besnard J.Y., Zwingelstein G. 1986. Sexual differences in the composition and metabolism of lipids in the mantle of mussel *Mytilus galloprovincialis* LMK (Mollusca : Bivalvia). Comp. Biochem Physiol 84B: 279- 285Physiol 82B: 424-431.
- Bligh, E., & W, J. D. ( 1959). a rapid methode of total lipid extraction . *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* , p37.
- Bouchard, P. & Bouchard, N. (2004), La sexualisation précoce des filles peut accroître leur vulnérabilité, Sisyphé : P6.
- Brichon G. 1984. Régulation écophysologique du métabolisme des glycérophospholipides azotés chez l'anguille européenne. Effet de l'adaptation en eau douce et eau de mer à deux températures (12 et 22°C). Thèse de doctorat d'état, université Claude Bernard Lyon1.
- Bodennec, J., Gerard, B., Omanand, K., El Babili, M., & Zwingelstein, G. (1997). A two-dimensional thin-layer chromatography procedure for simultaneous separation of ceramideand diacylglycerol species. *Journal of Lipid Research* ,p 38.
- Bodennec J., Koul O, Aguado I., Brichon G., Zwingelstein G., Portoukalian J. 2000. procedure for fractionation of sphingolipid classes by solid-phase extraction on aminopropyl cartridges. *Journal of Lipid Research* 41 :1524-1531.

Cahen D. 2006. Dossier didactique, Moules natures, Muséum des Sciences naturelles.

Casas S. 2007. Modélisation de la bioaccumulation des contaminants organiques (PCB, DDT et HAP) chez la moule *Mytilus galloprovincialis* en milieu méditerranéen. Ifremer. P 241.

Christie, W.W. and Han, X. Lipid Analysis - Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis (4th edition), 446 pages (Oily Press, Woodhead Publishing and now Elsevier) (2010) - see Science Direct.

Chelomin et Zhukova. 1981. Compositions en phospholipides et en acides gras du crustacé amphipode endémique *Issycogammarus bergi* du lac de montagne saumâtre Issyk-Kul (Tian Shan, Asie centrale). P.331-336.

Delaporte M., Chuf L., Langdon C., Moal J., Lambert C., Samain J.F., Delaunay F., Marty Y., Samain J.F. 2007. The effect of monospecific algal diets on growth and fatty acid composition of *Pecten maximus* (L) larvae. *J Exp Mar Biol Ecol* 173:163-179.

Dellali M., Romeo M., Aissa P. 2001. Suivi annuel de l'activité catalase chez des moules et des palourdes originaires de la lagune de Bizerte. *Oceanologica* 24, 263-271.

Delaunay F., Marty Y., Moal J., Samain JF .1993. The effect of monospecific algal diets on growth and fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) larvae. *J Exp Mar Biol Ecol* 173:163-179.

Dudognon T. 2013. Relations entre la structure des lipides membranaires de mitochondries et l'activité d'enzymes associées chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Thèse doctorat, Université de Bretagne Occidentale., pp24-25

Engel R., 1977. Phosphonates as Analogues of Natural Phosphates. *Chemical Reviews*, 77, 3, pp 349- 367.

Evans, W. H. & Gurd, J. W. (1972) *Biochem. J.* 128, 691-700.

Evans, W. H. & Gurd, J. W. (1973) *Biochem. J.* 133, 189-199.

Facchini L., Losito I., Cataldi T.R.I., Palmisano F. 2017. Seasonal variations in the profile of main phospholipids in *Mytilus galloprovincialis* mussels: A study by hydrophilic interaction liquid chromatography–electrospray ionization Fourier transform mass spectrometry. *Mass spectrometry*. 53:1–20

François L., 2007. Biochimie structurale-Biochimie de lipides, Université Joseph Fourier., pp 7-34.

Ferguson A. J., Anthony K., Snary D., 1982. The detection of phospholipids in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.*, 207, pp171-174.

Fernández-Reiriz M.J., Labarta U. Babarro J.M.F. 1996. Comparative allometries in growth and chemical composition of mussel (*Mytilus galloprovincialis*, Lmk.) cultured in two zones in the Ría Sada (Galicia, NW Spain). *J. Shellfish Res.*, 15: 349–353.

Fernández-Reiriz M.J., Labarta U., Albentosa M. PérezCamacho A. 1998. Effect of microalgal diets and commercial wheatgerm flours on the lipid profile of *Ruditapes decussatus* spat. *Comp. Biochem. Physiol.*, 119: 369–377.

Fiski C., Subbarow Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66: 375-400.

Florin-Christensen J, Knudsen J., and Rasmussen L., 1986. Phospholipases and phospholipids in a ciliate : an attack and defence system. *TIBS* 11, pp 354-355.

Fyfe P.K., Mc Auley K.E., Roszak A.W., Isaacs N.W., Cogdell R.J., Jones M.R. 2001. Probing the interface between membrane proteins and membrane lipids by X-ray crystallography. *Trends Biochem Sci* 26:106–112.

González-Araya R., Quéau I., Quéré C., Moal J., Robert R. 2011. A physiological and biochemical approach to selecting the ideal diet for *Ostrea edulis* (L.) broodstock conditioning (part A). *Aquac Res* 42:710–726.

Hawthorne JN., ANSELL G.B., 1982. Phospholipids. Elsevier, new York, 99 p.

Horiguchi M. Kandatsu M., 1959. Isolation of 2-Aminoethanephosphonic acid from rumen protozoa. *Nature*, 184, pp 901-902.

Higgins et Evans. 1978. Transverse Organization of Phospholipids across the Bilayer of Plasma-Membrane Subfractions of Rat Hepatocytes. *Biochem. J.* (1978) 174, 563-567

Higgins, J. A. & Dawson, R. M. C. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 470, 342-356

Incorporation de l'acide 2-aminoéthylphosphonique dans les lipides tissulaires de rat. *Eur. J. Biochem.*, 42, pp 129-134.

Jurd RD. 2000. Instant notes in animal *biology* .*Scientific Publisher*.pp110-260.

Hawthorne JN., Ansell G.B., 1982. Phospholipids. Elsevier, new York, 99 p.

Hayashi,A., and Mastubara, F.,T., 2-hydroxy fatty acid and phtosphingosine-containing ceramide 2-N-ceramide methylaminoethylphosphonate from *Turbo cortnus*, *Chem ,Lipids , Lipides* .10-51,1973.

Horiguchi M. Kandatsu M., 1959.Isolation of 2-Aminoethanephosphoniqueacidfrom rumen protozoa. *Nature*, 184, pp 901-902.

Higgins et Evans. 1978. Transverse Organization ofPhospholipids across the Bilayer of Plasma-Membrane Subfractions of Rat Hepatocytes. *Biochem. J.* (1978) 174, 563-567

Higgins, J. A. & Dawson, R. M. C. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 470, 342-356

Kaddour., A., 2006 Mise en évidence du stress environnemental et effet génotoxique chez la moule *Mytillus galloprovincialis* de la coté occidental algérienne par l'évaluation de la stabilité de la membrane lysosomal et la détermination de la fréquence des micronoyaux, pp17-20

Kariotoglou., D.M., Mastronicolis S.K., 2003. Sphingophosphonolipid molecular species from edible mollusks and a jellyfish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 136, pp 27–44.

Kariotoglou., Kariotoglou., D.M., Mastronicolis S.K., 1998. Phosphonolipids in the Mussel *M ytilus galloprovincialis*.pp. 888-896.

E. Ya. Kostetsky and P. V. Velansky.2009. Phospholipids of Sea Worms, Mollusks, and Arthropods. pp. 187–199.

Koul, O., Aguado, I., Bodonnec, J., Brichon, G., Zwingelstein, G., & Portoukalian, j. (2000).

Le Grand F., 2012. Etude des relations entre compositions membranaires lipidiques et fonctions cellulaires : Cas des hémocytes de bivalves atteints de

néoplasie disséminée, Préparée à l'UFR Sciences et Techniques de Brest. Université de Bretagne occidentale, Bretagne ; P330.

Legrandois J. 2009. Caractérisation et stabilité de sources de phospholipides polyinsaturés à intérêts nutritionnels. Thèse de doctorat, Université de Strasbourg, pp 16-23.

Leray C. 2010. Lipides dans le monde vivant. Introduction à la lipidomique, Lavoisier. pp173-200.

Lubet, P. (1959). Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les mytilidés et les pectinidés (Moll. Bival). Rev. Trav. Inst. Pêche Marit. 23, 4, pp. 389-548.

Lubet P., Brichon G., Besnard J.Y., Zwingelstein G. 1985. Composition and metabolism of lipids in some tissues of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. (Moll. Bivalvia) In vivo and in vitro incorporation of 1(3)-[3H]-glycerol. Comp.

Lubet P. 1976. Dynamique d'une population de moules, *Mytilus galloprovincialis* (Lmk.), vivant sur la côte atlantique marocaine, 21, pp. 43-50.

Masato et al. 1976. Bungakusha no sekim .ed., Sengu Bungaku ronso ,vol. 1 ,Bancho shobo, 55-51

Moschidis M. C., 1985. Phosphonolipids. Prog. Lip.Res., 23, pp 223-246.  
Mukhamedonak. S., Gluchenkova A. I., 2000. Natural phosphonolipids. Chemistry of Natural Compounds, 36, 4, pp 329 -341.

MPO (Ministère des Pêches et des Océans), Février 2003, Direction des politiques et des services économique. Région du Golf, Profil de la moule bleue (*Mytilus edulis*).Pêche et Océans Canada : 59.

Okumus I. Stirling H.P. 1998. Seasonal variations in the weight, condition index and biochemical composition of mussels (*Mytilus edulis* L.) in suspended culture in two Scottish sea lochs. Aquaculture, 159: 249–261.

Ojea J., Pazos AJ., Martinez D., Novoa S., Sanchez JL & Abad M .2004. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissues of *Ruditapes decussatus* in relation to the gametogenic cycle. Aquaculture, 238: 451-468.

Pazos A.J., roman G., Acosta C.P., Sanchez J.L ., Abad M. 1997. Lipid classes and fatty acid composition in the female gonad of pecten maximus in relation to reproductive cycle and environmental variables. Comparative biochemistry and physiology, 117B : 393-402.

Quéméneur, M.; (1995) Contrat de prestation IFREMER n° 95/2/435401/DEL 1<sup>er</sup> état d'avancement des travaux, pp 10.

Spencer C Peck., Wilfred A van der Donk., 2013. Phosphonate biosynthesis and catabolism: a treasure trove of unusual enzymology., 2.pp 581-582.

Stillwell W., Wassall S.R. 2003. Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. Chem Phys Lipids 126, 1-27.

Tamari M., Ogawa M., HasegawaS., 1976. Etudes sur les Phosphonolipides de la Bile de Boeuf. Agr. BioI. Chem., 40 (10), pp 2057 – 2062.

Their fatty acids using gas chromatography. J. Chromatogr. B 673, 15-26. Université de Genève, pp.10.

Université Joseph Fourier de Grenoble., 2012. Les lipides complexes Les glycérophospholipides - Les sphingolipides. Isabelle Hininger-Favier.,

Vance D.E., Sweeley C.C., 1967. Quantitative determination of the neutral glycosylceramides in human blood. J Lipid Res., 8, pp 621-630.

Vaskovsky V.E. 1989. Phospholipids. In: Ackman, R.G. (Ed.), Marine Biogenic Lipids, Fats and Oils. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 199-242.

Voet D., Judith G. 2005. Biochimie 2ème édition De Boeck Université, Biosynthèse des diacylglycérophospholipides, pp. 970-971.

Weinman S. et Mehul P. 2004. Toute la biochimie. Dunod, Paris, 84-85 p ; ISBN 2 10006734 6.

Wilaiwan B., 1986. Ecophysiologie de mytilus edulus L. Dans les bassins de marennes-oléron Alimentation et bilan d'énergie, 1, pp4-5.

Weil J.H., 2006. Biochimie générale.10 edit., Dunod, France .

Zotés chez l'anguille européenne. Effet de l'adaptation en eau douce et eau de mer à deux températures (12 et 22°C). Thèse de doctorat d'état, université Claude Bernard Lyon1 .P.2003-300.726 p.



**Annexe 01. Test d'A NOVA (Variable LT mg% mg PF)**

Descriptives								
Lipide totaux								
	N	Moyenn e	Ecart- type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95% pour la moyenne		Minimum	Maximum
					Borne inférieure	Borne supérieure		
1,00	3	4,2502	,99859	,57654	1,7696	6,7309	3,34	5,32
2,00	3	1,9736	1,05473	,60895	-,6464	4,5937	,97	3,07
3,00	3	1,7020	,34093	,19684	,8551	2,5489	1,31	1,94
Total	9	2,6420	1,42311	,47437	1,5481	3,7359	,97	5,32

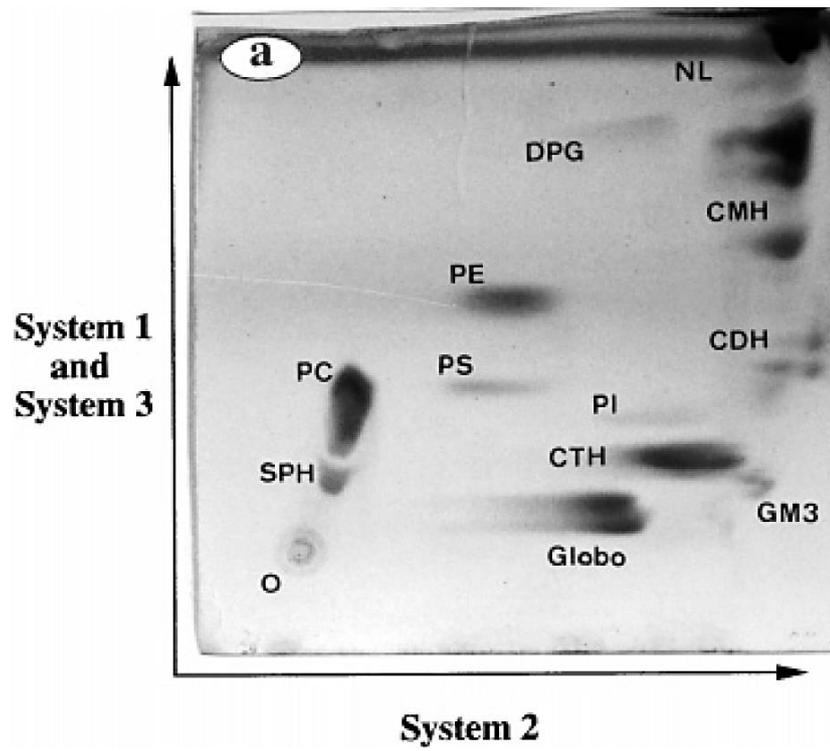
ANOVA à 1 facteur					
Lipide totaux					
	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Significatio n
Inter- groupes	11,750	2	5,875	7,918	,021
Intra- groupes	4,452	6	,742		
Total	16,202	8			

**Annexe 02. Test d'ANOVA (Variable PL mg% mg PF)**

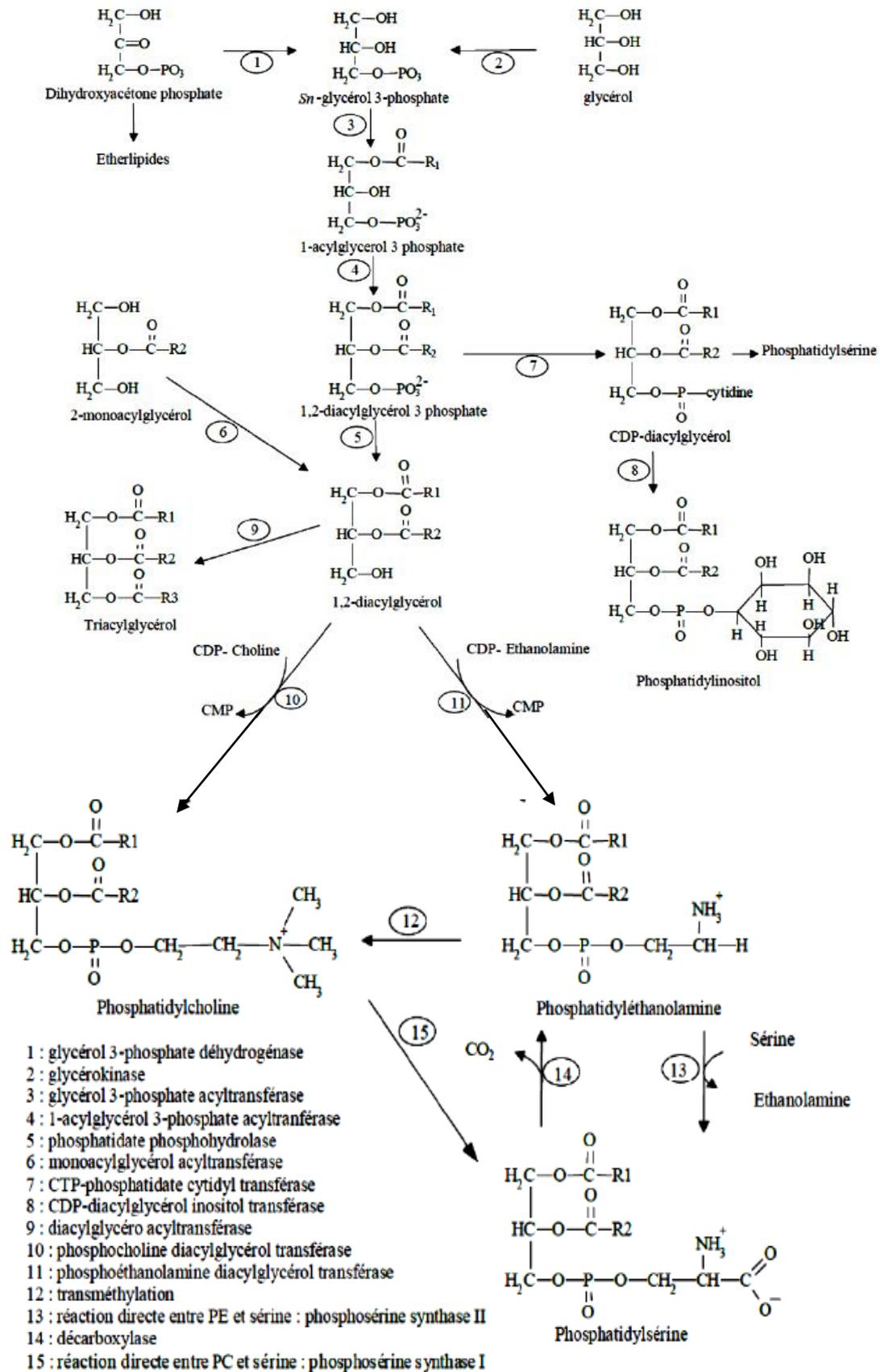
Descriptives								
Phosphlipides								
	N	Moyenn e	Ecart- type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95% pour la moyenne		Minimum	Maximum
					Borne inférieure	Borne supérieure		
1,00	3	1,2770	,12831	,07408	,9583	1,5957	1,17	1,42
2,00	3	,5123	,17859	,10311	,0687	,9560	,38	,72
3,00	3	,6940	,06605	,03814	,5299	,8581	,64	,77
Total	9	,8278	,36453	,12151	,5476	1,1080	,38	1,42

ANOVA à 1 facteur					
Phosphlipides					
	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Significatio n
Inter- groupes	,958	2	,479	27,245	,001
Intra- groupes	,105	6	,018		
Total	1,063	8			

**Annexe 3.** La plaque CCM 2D standard (Bodnec, 2000).



## Annexe 4 : Biosynthèse des glycérophospholipides (Dudognon, 2013).





## ملخص

ركزت دراستنا على تحديد الفوسفونوليبيدات و هي فئة معينة من الفوسفوليبيدات في مختلف أنسجة بلح البحر ( ميتيليس جالوبروفانسيليس)، (الخباشيم والغدد الهضمية والعضلات). حيث أن نسبة الدهون الإجمالية في كل الأنسجة من ميتيليس استخرجت ثم حددت الكمية. أظهرت النتائج أن الأنسجة المختلفة لبلح البحر ( ميتيليس جالوبروفانسيليس) لا تحتوي على نفس الكميات من الدهون الإجمالية. ولقد تم تحديد الفوسفوليبيد بعد الفصل الكروماتورافي ثنائي الأبعاد حيث تبين أن PL المعتادة (PC, PE, PI, DPG) و LPC موجودة أيضًا في بلح البحر إضافة إلى المركبات X1 و X2 و X3. يظهر علاج الفوسفوليبيد الكلي بواسطة ميتانوليز الكالين أن المركبات X1 و X2 و X3 مستقرة، وأن الكشف عن هذه الجزيئات بواسطة الكاشف نينهيدرين إيجابي. هذا يشير إلى أن هذه الجزيئات قد تكون فوسفونوليبيدات.

الكلمات المفتاحية: بلح البحر (ميتيليس جالوبروفانسيليس)، إجمالي الدهون، الفسفوليبيد، الفوسفونوليبيد

## Résumé

Notre travail à porté sur une espèce de mollusques bivalves *Mytilus galloprovincialis*. Au cours de cette étude on s'est intéressé à caractérisé des phosphonolipides une classe particulière de phospholipides dans différents tissus de la moule (Glande digestif, branchie et muscle). Pour cela les lipides totaux de chaque tissu de la moule ont été extraits puis quantifiés. Les résultats montrent que les différents tissus de la moule *Mytilus galloprovincialis* ne contiennent pas les mêmes quantités de lipides totaux, les variations de teneur en lipides totaux dans la glande digestif est 4,25 contre 1,9 et 1,7 mg% mg PF dans muscle et branchie. Les phospholipides ont été identifiés après séparation par chromatographie sur couche mince en deux dimensions (CCM-2D) montre que les PL habituelle (PC, PE, PI et PS, DPG et LPC) existé également chez la moule *M.galloprovincilais* en plus des composés X1, X2 et X3. La methanolyse alcaline des PL totaux montre que les molécules X1, X2 et X3 sont alkali stable et la révélation de ces molécules par le réactif ninhydrine est positive. Ceci laisse penser que ces molécules peuvent être des phosphonolipides.

**Mots clés :** la moule (*Mytilus galloprovincialis*), lipides totaux, les phospholipides, phosphonolipides.

## Abstract

Our work focused on a species of bivalve molluscs *Mytilus galloprovincialis*. During this study we were interested in characterizing phosphonolipids, a particular class of phospholipids in different tissues of the mussel (digestive gland, gill and muscle). For this, the total lipids of each tissue of the mussel were extracted and then quantified. The results show that the different tissues of the *Mytilus galloprovincialis* mussel do not contain the same amounts of total lipids, the variations in total lipid content in the digestive gland is 4.25 versus 1.9 and 1.7 mg% mg FW in muscle and gill. The phospholipids were identified after separation by two-dimensional thin layer chromatography (TLC-2D) shows that the usual PL (PC, PE, PI and PS, DPG and LPC) also existed in the *M.galloprovincilais* mussel in addition to the compounds X1, X2 and X3. The alkaline methanolysis of total PL shows that the molecules X1, X2 and X3 are stable alkali and the revelation of these molecules by the reagent ninhydrin is positive. This suggests that these molecules may be phosphonolipids.

**Keywords:** *Mytilus galloprovincialis*, phospholipids, totals lipids, phosphonolipides.

