



**HAL**  
open science

**Production, fonction et localisation d'Orchestine:  
calciprotéine spécifique de la matrice organique des  
structures minéralisées élaborées par le crustacé  
terrestre *Orchestia cavimana***

Arnaud Hecker

► **To cite this version:**

Arnaud Hecker. Production, fonction et localisation d'Orchestine: calciprotéine spécifique de la matrice organique des structures minéralisées élaborées par le crustacé terrestre *Orchestia cavimana*. Biologie cellulaire. Université de Bourgogne, 2002. Français. NNT : . tel-00003662

**HAL Id: tel-00003662**

**<https://theses.hal.science/tel-00003662v1>**

Submitted on 28 Oct 2003

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE DE BOURGOGNE**  
UFR Sciences de la Vie  
UMR CNRS 5548

## THESE

Présentée par

**Arnaud HECKER**

pour l'obtention du titre de

**Docteur de l'Université de Bourgogne**

Spécialité: Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

**Production, fonction et localisation d'Orchestine:  
calciprotéine spécifique de la matrice organique  
des structures minéralisées élaborées par  
le crustacé terrestre *Orchestia cavimana***

Soutenue le 13 Décembre 2002 devant la commission d'examen composée de:

Rapporteurs	Pr. Jean-Louis SAFFAR	Université Paris V
	Dr. Jean-Yves SIRE	DR CNRS - Paris VII
Examineurs	Dr. Jean DELACHAMBRE	DR CNRS - Dijon
	Dr. Frédéric MARIN	IsoTis - Bilthoven (Pays-Bas)
	Pr. Alain PUGIN	Université de Bourgogne
Directeur de thèse	Dr. Gilles LUQUET	Université de Bourgogne

*A mes Parents,*

*A mes Grands-Parents*

*Je tiens à remercier Rémy Brossut pour m'avoir accueilli au sein de l'Unité Mixte de Recherche 5548 CNRS/Université de Bourgogne "Développement-Communication chimique".*

*Je remercie Jean-Louis Saffar, Professeur à l'Université de Paris V et Jean-Yves Sire, Directeur de Recherches au CNRS d'avoir accepté de juger ce travail et d'en avoir été les rapporteurs.*

*Je remercie également Alain Pugin, Professeur à l'Université de Bourgogne et Jean Delachambre, Directeur de Recherches au CNRS ainsi que Frédéric Marin de la Société IsoTis pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail.*

*Je souhaiterais remercier Gilles Luquet sans qui ce travail n'aurait pu aboutir. Il a su encadrer et diriger ces recherches tout en me laissant liberté et autonomie. Merci à lui pour m'avoir transmis la passion qu'il porte pour les biominéralisations. Qu'il trouve ici toute ma reconnaissance et ma sympathie.*

*Je tiens également à remercier tout particulièrement Mr. le Professeur François Graf pour son soutien apporté tout au long de ce travail ainsi que pour ses précieux conseils et ses connaissances qu'il a bien voulu partager avec moi durant ces 4 années.*

*Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à Brigitte et André Quenedey sans qui la réalisation de toute la partie microscopie n'aurait pas été possible. Merci à eux pour leur patience, leur efficacité, leur dévouement et leur gentillesse.*

*Merci à Josianne Alabouvette pour son aide et pour sa gentillesse, à Eliane Dumas-Gaudot et Benoît Valot pour leur contribution apportée lors de la réalisation des électrophorèses bidimensionnelles, et à Claire Fernandez pour ses recherches bibliographiques.*

*Mes remerciements vont également à celles et ceux avec qui j'ai partagé joies et angoisses et qui m'ont supporté (dans les deux sens du terme). Ils et elles se reconnaîtront.*

*Enfin, je souhaiterais dédier ce travail et ces longues années d'études à mes parents et grands-parents qui ont toujours su me soutenir pendant les moments difficiles et sans qui cette aventure n'aurait pas été possible.*

# Abréviations

A	absorbance
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNg	ADN génomique
BET	bromure d'éthidium
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate
Brij 35	23 Lauryl éther
BSA	"bovine serum albumin", sérum-albumine bovine
CAPS	acide 3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonique
CHAPS	3-[(3-chloramidopropyl) diméthylammonio]-1-propane sulfonate
ddNTP	didésoxyribonucléoside triphosphate
dNTP	désoxyribonucléoside triphosphate
DMF	diméthylformamide
D.O.	densité optique
DTT	dithiothréitol
EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique (sel disodique)
IPTG	isopropyl- $\beta$ -thiogalactoside
kDa	kilo Dalton
LB	milieu de Luria-Bertani. Pour 1 litre: 10 g de NaCl, 10 g de Bacto-tryptone, 5 g d'extrait de levure
MEB	microscopie électronique à balayage
MET	microscopie électronique à transmission
MOPS	acide 3-(N-morpholino)-propanesulfonique
NBT	nitrobleu de tétrazolium
PAGE	"polyacrylamide gel electrophoresis", électrophorèse sur gel de polyacrylamide
pb	paire de bases
pBS	plasmide T-extension (Stratagène)
PCR	"polymerase chain reaction", réaction de polymérisation en chaîne
PFA	paraformaldéhyde
pGEM-T	plasmide T-extension (Promega)
pI	point isoélectrique

PMSF	phényl-méthyl-sulfonyl fluorure
pQE-30	vecteur plasmidique d'expression (Qiagen)
pREP-4	vecteur plasmidique auxiliaire de pQE-30
PVDF	polyvinylidène difluoride
RIA	"radio-immuno assay", dosage radio-immunologique
SDS	dodécyl sulfate de sodium
SSC	"sodium salt citrate", tampon citrate salin
Stains-all	1-éthyl-2-[3-(1-éthyl-napto[1,2d]thiazolin-2-ylidène)-2-méthylpropenyl] naphto[1, 2d] thiazolium bromide
TAE	Tris-acide acétique-EDTA
TBS	"Tris-buffered saline", tampon Tris salin
TBS-T	TBS-tween 20
TE	Tris-EDTA
TEN	Tris-EDTA-NaCl
Tris	tris-(hydroxyméthyl) amino méthane
Tween 20	polyoxyéthylènesorbitan monolaurate
V/V	volume à volume
U.V.	rayonnement ultraviolet
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside

## *Sommaire*

# Sommaire

<b>Introduction</b> .....	1
---------------------------	---

## Chapitre I: Revue des Connaissances

<b>I - Les biominéralisations</b> .....	3
A. Définitions.....	3
B. Les processus de formation des structures minéralisées.....	4
1. Minéralisations biologiquement induites.....	4
2. Minéralisations biologiquement contrôlées.....	4
2.1. La délimitation spatiale du site de minéralisation.....	5
2.2. La mise en place d'une matrice organique.....	5
2.3. La minéralisation.....	7
a. La constitution d'une solution saturée.....	7
b. La nucléation.....	8
c. La croissance du cristal.....	8
d. L'arrêt de la croissance du cristal.....	9
C. Les biominéralisations et leurs fonctions.....	9
<b>II - Les protéines de matrice organique caractérisées chez les Invertébrés</b> .....	10
A. Les Echinodermes.....	12
B. Les Mollusques.....	14
C. Les Arthropodes.....	17
<b>III - Description du modèle d'étude</b> .....	19
A. Cycle biologique.....	19
B. Les cæcums postérieurs: organes de stockage de calcium.....	21
C. Les échanges calciques au niveau de l'épithélium cæcal.....	25
D. Mise en évidence d'un marqueur protéique spécifique du stockage calcique.....	25

## Chapitre II: Matériel et Méthodes

<b>I - Matériel d'étude</b> .....	29
A. Conditions d'élevage.....	29
B. Datation des animaux.....	29
<b>II - Méthodes</b> .....	32
A. Méthodes relatives aux acides nucléiques.....	32
1. Détermination du nombre de copies du gène.....	32
1.1. Extraction d'ADN génomique.....	32
1.2. Digestion de l'ADN génomique.....	32
1.3. Transfert d'ADN (Southern blotting).....	32
1.4. Marquage des sondes par amorçage aléatoire.....	33
1.5. Hybridation et révélation du Southern blot.....	34



2. Clonage de l'ADNc relatif à Orchestine chez <i>E. coli</i> .....	34
2.1. Principe du système d'expression.....	34
2.2. Sous-clonage.....	34
a. Amplification de l'ADNc relatif à Orchestine par PCR.....	34
<i>Extraction de l'ADN plasmidique</i> .....	34
<i>Amplification de l'insert par PCR</i> .....	36
b. Préparation de l'insert et du vecteur d'expression pQE-30.....	36
c. Ligature.....	37
d. Préparation des cellules compétentes et transformation bactérienne.....	37
2.3. Sélection des clones recombinants.....	37
2.4. Séquençage du clone recombinant sélectionné.....	38
3. Expression, purification et clivage de la protéine recombinante.....	38
3.1. Expression de la protéine recombinante.....	38
3.2. Purification de la protéine recombinante.....	38
3.3. Clivage de la queue histidine.....	39
B. Méthodes relatives aux protéines.....	39
1. Extractions protéiques.....	39
1.1. Extraction des protéines de la matrice organique des concrétions calcaires élaborées dans les cæcums postérieurs.....	39
1.2. Extraction des protéines totales des cæcums postérieurs.....	39
2. Electrophorèse monodimensionnelle (SDS-PAGE).....	40
3. Electrophorèse bidimensionnelle.....	40
4. Transfert liquide des protéines.....	41
5. Immunodétection.....	41
6. Mise en évidence de calciprotéines.....	42
6.1. Marquage des calciprotéines au calcium 45 et autoradiographie.....	42
6.2. Coloration des calciprotéines au "Stains-all".....	42
7. Précipitation <i>in vitro</i> du carbonate de calcium (CaCO <sub>3</sub> ).....	42
7.1. Purification de la protéine Orchestine.....	42
7.2. Précipitation <i>in vitro</i> .....	43
8. Recherche de phosphoprotéines.....	43
9. Etude des phosphorylations portées par Orchestine.....	43
9.1. Hydrolyse acide des protéines.....	43
9.2. Séparation des produits de l'hydrolyse acide par chromatographie bidimen- sionnelle sur couche mince.....	43
9.3. Déphosphorylation des protéines de la fraction soluble des concrétions calcaires.....	44
9.4. Clivage enzymatique à partir de l'extrémité C-terminale des protéines de la fraction soluble.....	45
C. Méthodes relatives à la microscopie: localisation de la protéine Orchestine chez <i>Orchestia cavimana</i> .....	45
1. Production des anticorps polyclonaux: immunisation de lapins.....	45
2. Microscopie photonique.....	46
2.1. Réalisation des coupes.....	46
2.2. Révélation des coupes.....	46
3. Microscopie électronique.....	46
3.1. Réalisation des coupes.....	46
3.2. Révélation des coupes.....	47

# Chapitre III: Résultats et Discussion

## Première partie: Production d'un anticorps polyclonal spécifique d'Orchestine

<b>I - Résultats</b> .....	48
A. Détermination du nombre de copies du gène <i>orchestine</i> .....	48
B. Production d'une protéine recombinante relative à Orchestine.....	50
1. Sous-clonage.....	50
1.1. Stratégie de sous-clonage.....	50
1.2. Sélection des clones recombinants et séquençage.....	50
2. Expression et purification de la protéine.....	50
C. Production d'anticorps polyclonaux spécifiques d'Orchestine.....	52
1. Purification de l'antigène et immunisation.....	52
2. Contrôle de la spécificité de l'anticorps polyclonal anti-Orchestine.....	52
<b>II - Discussion</b> .....	53

## Deuxième partie: Etude de la fonction d'Orchestine

<b>I - Résultats</b> .....	55
A. Production d'une protéine recombinante relative à Orchestine.....	55
1. Sous-clonage.....	55
2. Expression et purification de la protéine recombinante.....	57
3. Clivage de la queue histidine portée par la protéine recombinante.....	57
B. Recherche des calciprotéines présentes dans la fraction soluble.....	57
C. Recherche des phosphoprotéines présentes dans la fraction soluble.....	59
D. Etude des phosphorylations portées par Orchestine.....	59
1. Mise en évidence des résidus phosphorylés.....	59
2. Etude de la fixation du calcium par Orchestine relativement à ses phosphorylations.....	61
2.1. Etude de la fixation du calcium après déphosphorylation totale.....	61
2.2. Etude de la fixation du calcium après déphosphorylation spécifique.....	61
2.3. Etude de la fixation du calcium après dégradation C-terminale.....	64
E. Précipitation <i>in vitro</i> du carbonate de calcium.....	64
<b>II - Discussion</b> .....	66

## Troisième partie: Immunolocalisation de la protéine Orchestine

<b>I - Résultats</b> .....	70
A. Expression temporelle de la protéine Orchestine au cours d'un cycle de mue.....	70
1. Contrôle de la spécificité de l'anticorps polyclonal anti-Orchestine sur des extraits protéiques totaux.....	70
2. Expression temporelle de la protéine Orchestine au cours d'un cycle de mue.....	72
B. Etude de la localisation de la protéine Orchestine.....	72
1. Période préexuviale.....	72
2. Période postexuviale.....	77
3. Intermue.....	80
<b>II - Discussion</b> .....	81

<b>Conclusions et Perspectives</b> .....	83
<b>Références Bibliographiques</b> .....	91
<b>Références Bibliographiques Personnelles</b> .....	109
<b>Liste des Figures et des Tableaux</b> .....	110

## *Introduction*

# Introduction

Les Crustacés, comme tous les Arthropodes, possèdent un exosquelette inextensible rigide, encore appelé cuticule, leur imposant un mode de croissance post-embryonnaire discontinu. La croissance de ces animaux est en effet associée au processus cyclique de la mue. Ce processus cyclique, à la base de toute la physiologie de ces animaux, conduit simultanément à l'édification d'une nouvelle cuticule et au rejet de l'ancienne devenue trop exigüe. La particularité inhérente à la plupart des Crustacés est que leur cuticule est durcie par calcification.

*Orchestia cavimana* (Heller) est un crustacé terrestre de la famille des Talitridés. Si les Crustacés aquatiques puisent dans l'eau le calcium nécessaire, *O. cavimana* a développé une remarquable adaptation à son mode de vie terrestre. En effet, cet animal stocke, en période préexuviale, du calcium provenant de la résorption partielle de l'ancienne cuticule et de la nourriture ingérée (Graf, 1974), calcium dont il aura besoin pour minéraliser sa nouvelle cuticule en période postexuviale. Ce stockage a lieu au niveau de diverticules de l'intestin moyen appelés cæcums postérieurs (Graf, 1962) sous la forme de concrétions calcaires.

Lors du processus de stockage, le calcium hémolympatique traverse l'épithélium cæcal sous forme ionique dans le sens baso-apical par le réseau extracellulaire dilaté (Graf, 1971 ; Graf et Meyran, 1983). La précipitation du calcium s'effectue dans la lumière cæcale au sein d'une matrice organique essentiellement sous forme de carbonate de calcium se trouvant à l'état amorphe (Raz *et al.*, 2002), conduisant à la formation de concrétions calcaires. La matrice organique associée à cette biominéralisation est constituée d'une fraction soluble (fraction S) et d'une fraction insoluble (fraction I) dans un tampon contenant de l'EDTA (Luquet *et al.*, 1996).

En période postexuviale, lors de la remobilisation du calcium, le transit calcique s'inverse et s'effectue sous forme de sphérules calciques (Graf, 1969, 1971 ; Graf et Michaut, 1977 ; Graf et Meyran, 1985). Ces structures élaborées dans un réseau extracellulaire sont également biphasiques, constituées d'une matrice organique et d'une phase minérale de carbonate et phosphate de calcium (Graf, 1967, 1969, 1971 ; Graf et Michaut, 1977).

Ces échanges calciques cycliques dont cet animal est l'objet s'avère d'un intérêt considérable du fait qu'il mime des processus de minéralisation/déminéralisation connus chez

les Vertébrés. Ainsi *O. cavimana* est un modèle biologique très approprié pour l'étude des processus de calcification, de transport calcique et de leurs régulations.

La recherche d'un marqueur période-spécifique s'est donc avérée cruciale afin d'étudier, dans un premier temps, le processus de stockage calcique et sa régulation hormonale. L'étude des constituants protéiques de la matrice organique des concrétions a permis de mettre en évidence une protéine fixant spécifiquement le calcium, d'une masse apparente de 23 kDa mais d'une masse théorique de 12,4 kDa pour 108 acides aminés. Cette calciprotéine, d'un pI acide (pI=4,4), est non glycosylée et fixe le calcium. Elle a été nommée Orchestine. De plus des résultats ont montré que la synthèse de cette protéine est sous contrôle indirect de la 20-hydroxyecdysone, hormone de mue des Arthropodes, et peut-être aussi de la calcitonine. Orchestine s'avère donc un excellent marqueur pour la compréhension du processus de stockage calcique et de sa régulation (Testenière, 1998 ; Testenière *et al.*, 2002).

Au cours de ce travail, nous nous sommes plus particulièrement attachés à l'étude des propriétés de ce marqueur protéique. Le premier objectif de ce travail a été de produire en grande quantité la protéine Orchestine à l'aide d'un système d'expression procaryote. L'obtention de cette protéine recombinante a présenté de multiples intérêts. Tout d'abord, elle a conduit à la production d'un anticorps polyclonal qui a été utilisé en western blotting sur des extraits protéiques d'*Orchestia* afin de vérifier sa spécificité puis sur des coupes de cæcums postérieurs afin de localiser, *in situ*, la protéine Orchestine. Dans un second temps, nous avons entrepris la caractérisation de la fonction de cette protéine en étudiant son aptitude à fixer le calcium relativement à ses phosphorylations et son aptitude à interférer dans la précipitation *in vitro* du carbonate de calcium.

## *Chapitre I*

### *Revue des Connaissances*

# Revue des Connaissances

## I - Les biominéralisations

### A. Définitions

Les biominéralisations désignent des formes minérales, résultant d'un passage d'ions de l'état soluble à l'état solide, produites par un organisme vivant par opposition aux formes inorganiques. Elles sont apparues chez les métazoaires au pré-Cambrien, il y a environ 544 millions d'années, puis se sont développées rapidement lors de l'explosion cambrienne avec l'apparition des principaux phylums (Kirschvink et Hagadorn, 2000) et des squelettes calcifiés (Bengtson, 1992), il y a 525 millions d'années environ. En l'espace de quelques millions d'années, ces animaux ont acquis la capacité de minéraliser, principalement en carbonate et phosphate de calcium, voire en silice.

Les biominéralisations sont actuellement des processus répandus dans au moins 55 phylums répartis sur les 5 règnes vivants: Procaryotes, Protistes, Champignons, Végétaux et Animaux (Lowenstam et Weiner, 1989). Actuellement, plus d'une soixantaine de formes minérales différentes sont caractérisées dans le monde vivant (Lowenstam et Weiner, 1989), alors qu'une dizaine seulement était répertoriée en 1963 et 30 en 1981 (Lowenstam, 1963, 1981). Les structures calcifiées les plus répandues sont sous la forme de carbonate ou de phosphate de calcium. Parmi ces minéralisations, 20% sont amorphes et 80% ont une structure cristalline identifiable par diffraction aux rayons X. Les cristaux au sein d'un organisme peuvent se retrouver sous 3 formes différentes: (1) l'état amorphe qui caractérise la silice, (2) l'état paracristallin dont la structure est constituée d'un seul cristal de grande taille comme c'est le cas des spicules des larves d'oursin et (3) l'état cristallin caractéristique des os et des dents, qui est un assemblage de cristaux individuels alignés dans une ou trois directions. La structure cristalline est la structure la plus répandue chez les animaux (Lowenstam, 1981). En fonction du processus employé pour leur formation, les biominéraux peuvent être répartis en 2 catégories: les biominéraux biologiquement induits (Lowenstam, 1981) et les biominéraux biologiquement contrôlés (Mann, 1983).



## **B. Les processus de formation des structures minéralisées**

### 1. Minéralisations biologiquement induites

Ces types de minéralisations sont retrouvés chez certaines bactéries et chez des algues vertes ou brunes. La formation des cristaux se fait de façon directe à partir d'une activité métabolique de l'organisme les produisant. L'accumulation d'anions issus de ce métabolisme et la présence de cations dans le milieu induisent la formation de cristaux au niveau extracellulaire ou intracellulaire. Ces cristaux forment ensuite des agrégats dont l'orientation est aléatoire et ne nécessite pas l'intervention d'une matrice protéique. Les formes minérales ainsi produites sont semblables aux minéraux inorganiques. Leur composition dépendra d'une part de la composition ionique de l'environnement et d'autre part de l'organisme produisant ces structures. Ce mécanisme semble correspondre à l'étape la plus primitive dans l'évolution de la formation des biominéralisations (Lowenstam, 1981).

### 2. Minéralisations biologiquement contrôlées

Le fossile d'un Porifère ou d'un Cnidaire à squelette minéralisé complexe et robuste vient d'être découvert en Namibie dans une couche fossilifère précambrienne datée de 549 millions d'années (Wood *et al.*, 2002). Cette découverte semble repousser très largement l'estimation de la date d'apparition du processus de minéralisation biologiquement contrôlé qui avait été estimé à 550 millions d'années par la découverte du fossile de l'invertébré *Cloudina* (Grant, 1990) dont le squelette est plus primitif.

Les biominéralisations contrôlées ou induites par une matrice organique sont aujourd'hui très répandues dans le monde vivant. Malgré la diversité des organismes produisant ces structures et la diversité des produits finis, il existe un certain nombre de caractéristiques communes dans les étapes conduisant à leur élaboration. En effet, contrairement à la minéralisation biologiquement induite, la minéralisation biologiquement contrôlée a lieu dans un espace bien délimité contenant une solution saturée en divers ions. Les ions présents dans cette solution sont accumulés activement au sein d'une matrice organique essentiellement protéique (Weiner, 1984) et vont précipiter pour conduire à la l'élaboration d'un cristal. Le cristal, ainsi formé, croît alors jusqu'à l'obtention d'une forme et d'une taille voulue par l'animal. De même, l'animal peut contrôler la nucléation au niveau temporel et spatial (Falini *et al.*, 1996).

## 2.1. La délimitation spatiale du site de minéralisation

Une des étapes importantes conduisant à la minéralisation est la création d'un espace clos délimité par une barrière (Mann, 1988) à travers laquelle les ions ne peuvent pas diffuser librement (Wilbur, 1984 ; Simkiss, 1986).

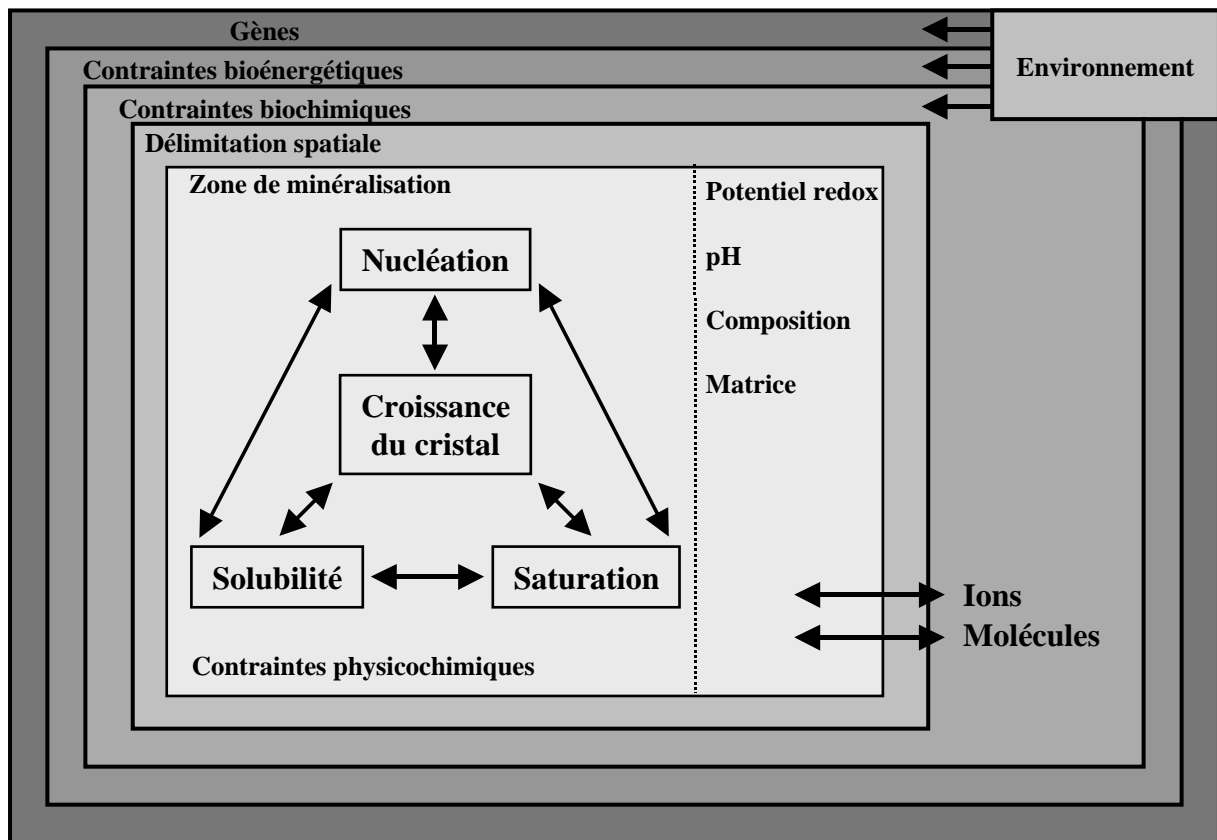
La délimitation de cet espace peut se présenter sous divers aspects. Les bicouches lipidiques situées soit au niveau de membranes cellulaires soit au niveau de vésicules intra ou extracellulaires sont les formes les plus couramment rencontrées. L'autre possibilité, dans une moindre part, est d'établir une barrière impénétrable à partir de macromolécules (protéines et/ou polysaccharides) polymérisées insolubles dans l'eau. La mieux connue de ces molécules est la périostracine (Waite *et al.*, 1979), principal constituant de la membrane organique externe de la coquille des mollusques. D'autres organismes élaborent, quant à eux, des espaces clos plus ou moins complexes à partir de membranes et de macromolécules.

Dans tous les cas, cette étape a pour fonction d'isoler l'espace de minéralisation de l'environnement extérieur mais aussi de permettre un contrôle cellulaire de la minéralisation. En effet, des cellules participeront aux échanges entre le milieu intérieur et le milieu extérieur et seront responsables de l'élaboration des constituants de la matrice organique, éléments essentiels permettant la formation d'une structure biominéralisée.

## 2.2. La mise en place d'une matrice organique

L'espace délimité par des cellules ou des macromolécules polymérisées est un lieu propice à la minéralisation. Les cellules délimitant cet espace sécrètent une batterie de macromolécules qui s'assemblent pour former un treillis moléculaire encore appelé matrice organique. La matrice organique, terme utilisé pour la première fois par Le Gros Clark (1945) dans une étude portant sur l'os, est un réseau tridimensionnel subdivisant l'espace précédemment délimité et catalysant la précipitation d'ions au sein de celle-ci.

La matrice organique de toute biominéralisation, dont la composition varie selon les espèces, est en général constituée de protéines, de glycoprotéines, de glycosaminoglycanes, d'hydrates de carbone ou encore de lipides. Après décalcification dans un tampon contenant de l'EDTA, il apparaît que la matrice organique est généralement constituée d'une fraction soluble et d'une fraction insoluble dans ce tampon (Weiner, 1979 ; Weiner *et al.*, 1983b). La fraction soluble est constituée de protéines acides, parfois glycosylées, dont certaines, riches en acides aspartique et glutamique, sont responsables de la chélation du calcium. Des fonctions aussi antagonistes que la nucléation de cristaux ou l'inhibition de la croissance des cristaux ont été attribuées à ces dernières (Weiner, 1979 ; Wheeler *et al.*, 1981). La fraction



**Figure n° 1:** La minéralisation biologiquement contrôlée (d'après Mann, 1988).

Chez les organismes contrôlant la minéralisation, ce processus a lieu dans un espace bien délimité et hautement régulé. En effet, au niveau de la zone de minéralisation, l'élaboration et la croissance de la biominéralisation sont sous la dépendance de nombreux facteurs physicochimiques (pH, solubilité, sursaturation...). A un niveau plus haut de l'organisation et en particulier au niveau de la cellule, la minéralisation est sous la contrainte de facteurs biochimiques et bioénergétiques mais aussi géniques. De plus, des interactions avec le milieu extérieur ont également lieu pour le bon déroulement de ce processus.

insoluble, quant à elle, constitue le treillis architectural de la matrice organique (Weiner et Traub, 1980 ; Weiner *et al.*, 1983a) et est composée de protéines riches en glycine, alanine, phénylalanine et tyrosine. Chez les Mollusques, par exemple, les constituants de la fraction insoluble constituent l'édifice architectural de la matrice organique des perles de nacre. Cet édifice comporte une sous-couche de chitine- $\beta$  recouverte de deux couches de protéines riches en glycine et alanine ayant une conformation en feuillet  $\beta$  prédominante se rapprochant des fibroïnes de soie (Weiner et Traub, 1980 ; Weiner *et al.*, 1983a). La surface de cette structure est recouverte à son tour par une fraction soluble de macromolécules hydrophiles riches en acide aspartique dont certaines sont en contact direct avec la phase minérale (Degens, 1976 ; Weiner 1986). Ces macromolécules hydrophiles interagissant spécifiquement avec la solution permettant la croissance *in vitro* des cristaux de calcite suggèrent qu'elles sont impliquées dans le processus de formation du cristal (Addadi *et al.*, 1987). Ce schéma d'organisation est aussi admis chez les Vertébrés (Glimcher, 1981 ; Veis *et al.*, 1981 ; Termine *et al.*, 1981). Le collagène de type I est le composant prédominant des matrices organiques des dents et des os, tandis que les collagènes de type II, IX et X ainsi que des protéoglycanes constituent la matrice organique des cartilages. Certaines fibres de collagène sont associées à d'autres protéines hydrophiles permettant la liaison au calcium et à l'hydroxyapatite. La matrice organique semble donc être au centre du processus de biominéralisation et avoir un rôle important de support orienté pour la minéralisation en favorisant la nucléation et l'élaboration du cristal.

### 2.3. La minéralisation

#### a. La constitution d'une solution saturée

La mise en place de la solution saturée est contrôlée par la cellule ou les cellules orchestrant le processus de minéralisation dans son entier. L'accumulation d'ions dans l'espace de minéralisation est effectuée soit par transport actif mettant en œuvre des pompes ioniques soit par diffusion passive d'ions spécifiques. Les cellules, par leurs pompes et ses canaux ioniques, participent aux échanges ioniques entre le milieu extérieur et le milieu intérieur et interviennent dans le contrôle de la composition ionique de la solution à l'origine de la biominéralisation. Ainsi de nombreux organismes sont capables de former, par une accumulation active d'ions, des biominéralisations dans des environnements plus ou moins hostiles ne permettant pas la formation de l'équivalent inorganique du cristal considéré. Un des exemples les mieux connus est celui du protiste *Acantharia*. Cet animal forme des biominéralisations constituées de célestite (sulfate de strontium) alors que l'océan est sous-

saturé en ces éléments (Odum, 1951). A la mort de l'animal, ces structures sont rapidement délitées, l'accumulation d'ions ne se faisant plus. D'autre part, les cellules peuvent également déterminer l'ordre dans lequel les ions seront introduits dans le compartiment où se produit la minéralisation. Un des exemples les plus frappants est le cas de la formation des cartilages endochondraux où le phosphore suit, après un laps de temps non négligeable, l'entrée du calcium dans la matrice extracellulaire (Shapiro et Boyde, 1984). A partir de cette étape, tous les acteurs nécessaires à la minéralisation sont présents, la formation du cristal peut alors débiter.

#### b. La nucléation

Le premier stade de la formation des cristaux est la nucléation. Dans une solution sursaturée, les molécules forment des agrégats. Chacun de ces agrégats peut soit être dissocié soit continuer à croître pour former un cristal. Les macromolécules présentes dans la solution peuvent favoriser la constitution d'un cristal en stabilisant les agrégats formés. Ce type de contrôle de la nucléation est une stratégie couramment employée, entre autres par les Mollusques lors de la formation de la couche de nacre de leur coquille.

#### c. La croissance du cristal

L'étape suivante dans la formation des cristaux est leur croissance jusqu'à atteindre la taille et la forme désirée. Les cristaux néo-formés croissent par addition progressive de molécules ou d'ions, la morphologie du cristal étant déterminée par la vitesse relative de croissance dans les différentes directions. Par exemple, au moment de la formation des spicules de l'oursin, les cristaux prennent une forme d'aiguille suite à l'ajout préférentiel selon un seul axe. La morphologie peut être également modifiée par des facteurs externes telles la température, la pression et la nature des molécules mais aussi par la présence d'impuretés dans le milieu de croissance. En effet, l'inclusion d'impuretés dans certaines directions d'un réseau cristallin perturbe la croissance du cristal selon ces directions (Addadi et Weiner, 1985). Des macromolécules biologiques peuvent influencer de manière similaire la croissance des cristaux et en particulier les protéines acides et les glycoprotéines qui modifient leur morphologie. Comme leur taille est nettement supérieure à celle du réseau cristallin, leur introduction dans le cristal se traduit par des dislocations qui peuvent être caractérisées par diffraction aux rayons X (Weiner et Addadi, 1997). Il semble donc que l'organisme soit capable, en disposant des macromolécules à des endroits déterminés, d'exercer un contrôle sur la forme du cristal.

#### d. L'arrêt de la croissance du cristal

La croissance du cristal est donc étroitement liée au microenvironnement où se déroule cette minéralisation. Dans le cas le plus simple, la croissance des cristaux se déroule à partir de centres de nucléation dans un milieu contenant uniquement les ions entrant dans la composition de la structure. De ce fait, les cristaux, ainsi formés, tendent alors à adopter la même morphologie que ceux obtenus dans un environnement inorganique. Aussi, l'arrêt de la croissance du cristal s'opère de différentes façons dans les systèmes biologiquement contrôlés. La croissance du cristal peut s'arrêter soit par manque d'espace, soit par rencontre avec un autre cristal comme c'est le cas des cristaux de calcite formant les coquilles d'œuf, ou des cristaux d'aragonite constituant les otolithes de poissons, soit par diminution progressive de l'apport de certains constituants tels les ions, ou soit enfin par l'apport dans le milieu de minéralisation de molécules inhibitrices.

### C. Les biominéralisations et leurs fonctions

Si les biominéralisations sont très largement diversifiées dans leurs structures et leurs compositions, elles ne le sont pas moins par leurs fonctions. En effet, il apparaît très clairement que la fonction première des biominéralisations est de participer à la rigidité des organismes. Cette fonction, la plus connue et la plus étudiée, concerne la formation du squelette interne chez les Vertébrés avec les os (dont une autre fonction est la mise en réserve de calcium et de phosphore) ou externe chez les Invertébrés comme c'est le cas par exemple des Mollusques avec leur coquille ou des Crustacés avec leur carapace.

En dehors de l'aspect structural, d'autres fonctions, d'apparence moins évidente, ont été attribuées aux biominéralisations. Certaines plantes, protozoaires et animaux sont capables de percevoir la gravité par des systèmes faisant intervenir des composants minéraux. Ces composés minéraux solides, d'origine calcique pour la plupart, sont insérés dans une cavité dont les cellules périphériques détectent les mouvements. Chez les Plantes, par exemple, il existe des senseurs, à l'origine du géotropisme, localisés au niveau du système racinaire (Rawitscher, 1932 ; Nemeč, 1964). Chez les Amphibiens et les Poissons, les otolithes, structures homologues de l'oreille interne des Vertébrés, remplissent ce rôle.

La magnétite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) a été initialement retrouvée dans les roches métamorphiques. La magnétite d'origine biologique, quant à elle, a été découverte pour la première fois par Lowenstam (1962) dans les dents de chitons (mollusques) sans que son rôle soit connu. Cette

découverte curieuse ne faisait pas l'unanimité de la communauté scientifique qui pensait que la magnétite ne pouvait se former aux températures et pressions biologiques. Depuis, cette forme minérale a été caractérisée sous forme de chaînes de cristaux intracellulaires constituant le magnétosome chez les bactéries magnétotactiques (Frankel *et al.*, 1979) permettant à celles-ci de s'orienter et de se déplacer le long des lignes du champ magnétique. Enfin, la magnétite est également retrouvée chez de nombreux animaux voyageurs tels le saumon (Kirschvink *et al.*, 1985) ou la tortue verte (Perry *et al.*, 1985) s'orientant grâce au champ magnétique terrestre.

Les biominéralisations ne sont pas des structures figées. Elles sont susceptibles d'évoluer au cours du temps dans des conditions physiologiques variées. Les modèles les plus connus à l'heure actuelle sont ceux des dents et des os qui montrent sans cesse des phases de minéralisation et de déminéralisation. Ces structures, en plus de leur rôle structural, participent à la physiologie de l'organisme les constituant puisqu'elles représentent des réserves non négligeables d'ions phosphate et calcium impliqués exclusivement dans de nombreuses voies métaboliques. D'autres structures minéralisées sont impliquées dans le stockage d'ions. Chez certains crustacés terrestres, s'opère un stockage calcique qui permet à ces animaux de durcir cycliquement par calcification leur cuticule (Graf, 1974, 1978). Un autre exemple de stockage, est celui du fer. La ferritine, complexe protéique constitué d'un assemblage de 24 sous-unités appelées apo-ferritine (Ford *et al.*, 1984), permet le piégeage d'ions fer sous forme paracrystalline (ferrihydrite) ou d'ions phosphate. Ce type de stockage temporaire au sein d'un complexe protéique est très répandu chez les Animaux, Champignons et Végétaux.

## **II - Les protéines de matrice organique caractérisées chez les Invertébrés**

Comme nous venons de le voir dans le chapitre précédent, les structures minéralisées des organismes vivants contrôlant la minéralisation sont constituées de matériaux composites contenant habituellement des quantités variables de glycoprotéines acides et de protéoglycanes environnant ou formant ces structures. Il est maintenant connu que le matériel organique, encore appelé matrice organique et qui constitue le biominéral, change les propriétés physiques du minéral au niveau de sa texture, de sa dureté et de sa flexibilité

Protéines	Organisme	MM prot. (SDS-PAGE)	Localisation	Références	
Echinodermes	HSM41 <sup>(a)</sup>	41 kDa	spicules de larve d'oursin	Katoh-Fukui et al. (1992)	
	LMS34 <sup>(a)</sup>	34 kDa	spicules de larve d'oursin	Livingston et al. (1991) Peled-Kamar et al. (2002)	
	PM27	27 kDa	spicules de larve d'oursin	Harkey et al. (1995)	
	SM30	30,6 <sup>(b)</sup> / 43-46 kDa	spicules de larve d'oursin	George et al. (1991)	
	SM37	37 kDa	spicules de larve d'oursin	Lee et al. (1999)	
Mollusques	SM50	50 kDa	spicules de larve d'oursin	Sucov et al. (1987) Katoh-Fukui et al. (1991)	
	Lustrine A	116 kDa <sup>(b)</sup>	nacre de coquille et de perle	Shen et al. (1997)	
	MS131	31 kDa	couche prismatique de coquille	Sudo et al. (1997)	
	MS160	60 kDa	nacre de coquille	Sudo et al. (1997)	
	MSP-1	97, 72 ou 49 kDa (?)	couche prismatique de coquille	Sarashina et Endo (1998)	
	Mucoperline	66,7 <sup>(b)</sup> / 55 kDa	nacre de coquille	Marin et al. (2000)	
	N14	13,7 kDa <sup>(b)</sup> / 14 kDa	nacre de coquille	Kono et al. (2000)	
	N16-1, -2, -3	16 kDa	nacre de perle	Samata et al. (1999)	
	N66	59,8 kDa <sup>(b)</sup> / 66 kDa	nacre de coquille	Kono et al. (2000)	
	Nacréine	59,8 <sup>(b)</sup> / 60 kDa	nacre de perle	Miyamoto et al. (1996)	
	Perline <sup>(c)</sup>	12,8 kDa <sup>(b)</sup> / 15 kDa	nacre de perle	Miyashita et al. (2000)	
	Perlucine	17 kDa	nacre de coquille	Mann et al. (2000) Weiss et al. (2000)	
	Perlustrine	13 kDa	nacre de coquille	Weiss et al. (2000, 2001)	
	Arthropodes	CAP-1	8,7 kDa <sup>(b)</sup>	exosquelette	Inoue et al. (2001)
		DD4	57 kDa <sup>(b)</sup> / 55,5 kDa <sup>(b)</sup>	exosquelette	Endo et al. (2000)
DD5		136 kDa <sup>(b)</sup>	exosquelette	Ikeya et al. (2001)	
DD9A		13,8 kDa <sup>(b)</sup> / 12,5 kDa <sup>(b)</sup>	exosquelette	Watanabe et al. (2000)	
DD9B		13,8 kDa <sup>(b)</sup> / 12,5 kDa <sup>(b)</sup>	exosquelette	Watanabe et al. (2000)	
GAMP		50,5 kDa <sup>(b)</sup> / 94 kDa	gastrolithes	Ishii et al. (1996, 1998) Tsutsui et al. (1999) Takagi et al. (2000)	

(a) orthologue de SM50 (Strongylocentrotus purpuratus )

(b) masse déduite de la séquence de l'ADNC

(c) séquence en acides aminés de la protéine identique à celle de N16-3 excepté le résidu 58

(d) masse déduite de la séquence de l'ADNC dépourvue de celle du peptide signal

**Tableau n° 1: Liste récapitulative des protéines de matrice organique des structures minéralisées caractérisées chez les Invertébrés.**



(Lowenstam et Weiner, 1989). A l'instar des Mammifères chez qui les os et les dents sont des modèles de choix, les Oiseaux et les Poissons avec respectivement, la coquille de l'oeuf (Hincke *et al.*, 1995, 1999 ; Gautron *et al.*, 2001 ; Lakshminarayaman *et al.*, 2002) et l'otolithe (Borelli *et al.*, 2001 ; Murayama *et al.*, 2000, 2002) et également de nombreux Invertébrés constituent des modèles pour l'étude des structures biominéralisées. Actuellement, plus d'une vingtaine de protéines ont été caractérisées essentiellement chez les Echinodermes, les Mollusques et les Arthropodes (Tableau n° 1).

### **A. Les Echinodermes**

Les Echinodermes forment un groupe à part dans le règne animal. En effet, leur parenté évolutive avec les autres groupes est incertaine. Ce phylum compte aujourd'hui trois sous-embranchements qui regroupent environ 6000 espèces au total. Une des caractéristiques de ces animaux est la présence d'un endosquelette d'origine dermique constitué de plaques calcaires juxtaposées (calcites et  $MgCO_3$ ) et, dans certains cas, fusionnées pour former une coque rigide, le test. Le modèle oursin, largement étudié en biologie du développement depuis plusieurs décennies, apparaît comme l'animal le mieux caractérisé dans les mécanismes conduisant à l'élaboration des structures calcifiées.

Chez la larve *pluteus* de cet animal, l'endosquelette est formé par 32 (ou plus chez certaines espèces d'oursins) cellules mésenchymateuses primaires (CMP) qui résultent de cinq micromères générés à la 5<sup>ème</sup> division cellulaire. Les spicules de l'endosquelette des larves sont composées de calcite (carbonates de calcium et de magnésium), d'une matrice extracellulaire environnante et d'une faible quantité de protéines et d'hydrates de carbones dont 0,1% de glycoprotéines (Benson *et al.*, 1987). A ce jour, sur plus de 40 protéines solubles constitutives de la matrice organique des spicules de la larve de l'oursin *Strongylocentrotus purpuratus* (Killian et Wilt, 1996), seules quatre d'entre elles ont été bien caractérisées. Il s'agit de SM50, SM37, PM27 et SM30 (revue in Wilt, 1999).

Chez *S. purpuratus*, la matrice extracellulaire entourant les spicules minéralisés contient au moins 2 protéines, SM50 et PM27 (Wilt, 1999). Alors que la plupart des protéines de matrice de spicules sont acides et glycosylées, SM50, la première protéine dont le gène a été séquencé (Sucov *et al.*, 1987 ; Katoh-Fukui *et al.*, 1991) et dont la fonction a été étudiée en détail, est basique, non glycosylée et présente des séquences répétées en tandem (14 à 29 fois selon les espèces) du motif PGXG dans sa partie C-terminale (Killian et Wilt, 1996). SM50 est retrouvée au niveau des membranes de l'appareil de Golgi et dans la matrice extracellulaire

qui entoure les spicules. Des orthologues de SM50, LSM34 (Livingston *et al.*, 1991) et HSM41 (Kato-Fukui *et al.*, 1992) ont été mis en évidence chez *Lytechinus pictus* et *Hemicentrotus pulcherrimus* respectivement. Après injection d'oligonucléotides antisens dans l'embryon d'oursin, une chute du taux de LSM34 apparaît et entraîne l'arrêt immédiat du processus de biominéralisation au niveau des spicules (Peled-Kamar *et al.*, 2002). *LSM34* et *SM50* sont exprimées seulement au niveau des cellules primaires mésenchymateuses de l'embryon d'oursin.

Le gène *SM37* qui est lié à une distance de 12 kb au gène *SM50* présente 30% d'homologie avec lui. La protéine *SM37* possède une région répétée en tandem, riche en glycine similaire à *SM30*. L'expression de ce gène semble régulée de façon conjointe à *SM50*. La localisation de la protéine n'est pas encore connue mais *SM37* aurait des fonctions similaires à celles de *SM50* (Lee *et al.*, 1999).

*PM27*, une autre protéine des CMP, a des homologies de séquences avec *SM30* et *SM50*. *PM27* possède des répétitions PGMG (et PGXG) et un domaine lectine de type C. Cependant son expression, au cours du développement, et sa localisation sont très similaires à celles retrouvées pour *SM50* (Harkey *et al.*, 1995), sa fonction l'est probablement aussi.

*SM30*, dont l'ADNc a été isolé, est une glycoprotéine acide typique des tissus biominéralisés relativement à sa composition en acides aminés (George *et al.*, 1991). Il semble qu'il existe deux isoformes de cette protéine chez la larve *pluteus* de *S. purpuratus*, de masse apparente de 43 kDa et 41 kDa (Killian et Wilt, 1996). *SM30*, dont le gène correspondant a été caractérisé (Akasaka *et al.*, 1994), présente des homologies de séquence avec des protéines de la famille des lectines de type C (comme *SM50*) et en particulier avec les lithostatines de Mammifères, protéines prévenant la formation de calculs (CaCO<sub>3</sub>) pancréatiques (De Caro *et al.*, 1988 ; Killian et Wilt, 1996).

L'expression, la régulation et l'organisation de ces gènes ainsi que la localisation des produits de ceux-ci au niveau des CMP et des spicules sont très différentes. *SM50* et *SM37* (et peut-être *PM27*) joueraient donc un rôle au niveau de l'espace extracellulaire, dans lequel la croissance du cristal s'effectue, en provoquant un environnement propice à la minéralisation. Quant à *SM30*, elle serait directement impliquée dans le processus de sécrétion et précipitation du calcium et/ou dans l'organisation des spicules (Urry *et al.*, 2000).

## B. Les Mollusques

Les Mollusques constituent un ensemble très diversifié par la dissemblance de leur morphologie, par leur organisation interne, leur habitat, leur mode de vie et même leur dimension. Le phylum des Mollusques comprend 6 classes totalisant pas moins de 130.000 espèces qui se retrouvent au niveau des zones tempérées et tropicales. Le corps du Mollusque est mou et non segmenté. Il comprend trois parties fondamentales: une tête, un pied et une masse viscérale enveloppée dans un manteau qui sécrète une coquille.

Chez ces animaux, les biominéralisations sont largement étudiées et en particulier chez les coquillages bivalves. En effet, les coquilles des mollusques bivalves sont des structures minéralisées très rigides constituées de carbonate de calcium sous la forme d'aragonite et/ou de calcite et de polymères organiques. Souvent, ces minéraux sont observés au sein d'une même coquille. A une couche interne constituée de fines tablettes de nacre aragonitique s'imbriquant (couche d'environ 400 nm sur 5 à 10 µm enveloppée d'une fine couche de matrice organique de 30 nm d'épaisseur) se superpose une couche externe de prismes calcitiques. Ces deux couches aragonitique et calcitique sont séparées par une couche organique appelée périostracum, ce dernier recouvrant également la coquille extérieurement (Shen *et al.*, 1997 ; Checa, 2000). Au sein de ces deux polymorphes les plus stables du carbonate de calcium (aragonite et calcite), on trouve environ 5% de matrice organique constituée de glycoprotéines et de polysaccharides dont la sécrétion est effectuée par le manteau. Les perles, quant à elles, résultent de l'introduction d'un corps étranger entre le manteau et la couche nacrée. Elles sont d'une organisation plus simple et correspondent à la couche interne de nacre des coquilles composée de cristaux d'aragonite et d'une matrice organique. Ainsi, par la simplicité de son organisation, ce matériel est très adapté pour l'étude de la formation des couches de nacre. Plusieurs protéines de matrices organiques ont été mises en évidence au niveau de coquilles ou de perles de Mollusques (Tableau n° 1).

La première séquence en acides aminés d'une protéine de matrice organique de Mollusque rapportée est la Nacréine (Miyamoto *et al.*, 1996). Cette protéine de 60 kDa, extraite des perles élaborées par l'huître *Pinctada fucata*, possède un domaine de type anhydrase carbonique subdivisé en deux sous-domaines avec insertion entre les deux d'un autre domaine acide riche en répétition Gly-Xaa-Asn (Xaa = Asp, Asn ou Glu) envisagé comme pouvant lier le calcium. Il semble alors que cette protéine, aux multiples propriétés, ait un rôle à la fois structural et fonctionnel participant à la production d'ions bicarbonates par son activité anhydrase carbonique et à la nucléation de cristaux d'aragonite.

Par la suite, deux protéines insolubles de 60 et 31 kDa ont été isolées du même animal. MSI60 (Matrix Shell Insoluble protein), retrouvée dans la couche de nacre, contient 11 motifs poly-alanine et 2 domaines riches en alanine intercalés avec des régions riches en poly-glycine. Cette protéine adopte une conformation en feuillets  $\beta$  antiparallèles rappelant la structure de la soie. MSI30, quant à elle, est retrouvée dans la couche prismatique et possède dans sa partie N-terminale 10 séquences répétées poly-glycine (de 3 à 5 résidus chacune) et dans sa partie C-terminale un grand domaine acide composé de 6 motifs consécutifs ESEEDX qui pourraient lier le calcium. Ces deux protéines participeraient à l'élaboration du treillis matriciel (calcitique et aragonitique) et interagiraient avec les constituants solubles telles des glycoprotéines riches en Asp et la Nacréine respectivement (Sudo *et al.*, 1997).

Toujours chez la même huître, *Pinctada fucata*, des équipes japonaises ont caractérisé la famille des protéines N16 (Samata *et al.*, 1999) avec N16-1, N16-2 et N16-3 et la perline (Miyashita *et al.*, 2000) dans la nacre des perles. Il est cependant à noter que la protéine N16-3 a la même séquence en acides aminés que la Perline, à l'exception d'un résidu. Ces 4 protéines, dont la séquence ne diffère l'une de l'autre que par quelques acides aminés, appartiennent à une famille de glycoprotéines acides, sont potentiellement phosphorylées et affines du calcium, et sont riches en glycine, tyrosine, asparagine et en motifs répétés NG. A ce jour, leurs fonctions et leurs rôles respectifs au sein de la matrice organique restent encore mal définis. Enfin chez une autre espèce d'huître, *Pinctada maxima*, les protéines N14 (orthologue de la famille N16) et N66 (orthologue de la Nacréine) ont été également identifiées mais à partir des composants matriciels de la nacre de coquille (Kono *et al.*, 2000).

Chez *Pinna nobilis*, la Mucoperline, protéine apparentée aux mucines (vaste famille de protéines entrant dans la composition du mucus chez les Métazoaires), possède 13 répétitions en tandem de 31 résidus hautement conservés. Elle a été identifiée au niveau des jonctions des tablettes d'aragonite constitutives de la couche de nacre de la coquille (Marin *et al.*, 2000). De par son lien de parenté avec la famille des protéines "mucin-like", la découverte de cette protéine conforte la théorie de l'"anticalcification" qui met en avant que certains constituants des matrices organiques des premiers squelettes robustes (coraux et mollusques) auraient dérivé, par évolution, d'un produit de sécrétion ancestral de type mucus produit par un ancêtre non calcifié vivant au Protérozoïque. Initialement, ce type de mucus aurait eu un rôle inhibiteur de la minéralisation protégeant les tissus mous contre toute incrustation minérale dans un océan sursaturé en calcium et carbonate. A la transition avec le Cambrien, les mêmes molécules auraient été recrutées comme constituants des matrices et auraient joué le rôle de nucléateur (Marin *et al.*, 1996).

Chez le gastéropode *Haliotis rufescens* (ormeau rouge), la Lustrine A (116 kDa), extraite de la fraction insoluble de la matrice organique de perle, aussi retrouvée dans la couche nacréée de la coquille, montre une structure modulaire et multifonctionnelle (Shen *et al.*, 1997). En effet, la séquence de la protéine, déduite de l'ADNc, possède 10 domaines très conservés riches en cystéine, alternant avec 8 domaines riches en proline et un domaine proche de la région C-terminale riche en glycine et sérine. L'alternance des domaines riches en cystéine et en proline ressemble, de manière frappante, aux frustrulines, famille de glycoprotéines de la matrice extracellulaire entourant les frustules situées à base de silice élaborées par les diatomées. La région N-terminale est constituée par un domaine basique suivi de 45 résidus qui montrent des homologues de séquence avec des inhibiteurs de protéases connus. Cette protéine, aux multiples propriétés, serait à l'origine d'une certaine résistance élastique de la structure multilamellaire de la coquille par son rôle structural au sein de la matrice, et serait également à l'origine d'une protection contre la dégradation des composants protéiques matriciels. Des protéines extraites de la nacre de coquilles d'un autre ormeau, *Haliotis laevigata*, telles la Perlucine (Mann *et al.*, 2000 ; Weiss *et al.*, 2001) et la Perlustrine (Weiss *et al.*, 2001) ont été caractérisées. La Perlucine, protéine de 17 kDa, possède un domaine fonctionnel de type lectine C affiné du D-galactose ou du D-mannose/D-glucose, domaine que l'on retrouve aussi dans les protéines de matrice de spicules d'oursin SM50 (Sucov *et al.*, 1987), SM30 (George *et al.*, 1991) et PM27 (Harkey *et al.*, 1995), dans la lithostatine présente dans les calculs pancréatiques des Mammifères (De Caro *et al.*, 1988), et dans l'ovocléidine 17 présente dans la coquille de l'œuf d'oiseau (Hincke *et al.*, 1995). La Perlustrine, d'une masse de 13 kDa, possède quelques homologues de séquence avec la Nacréine et de fortes homologues avec des facteurs appartenant à la famille des IGF-BPs (Insulin-like Growth Factor Binding Proteins), facteurs ostéogéniques que l'on retrouve dans la nacre de coquilles (Lopez *et al.*, 1992 ; Silve *et al.*, 1992) et dans l'os des Vertébrés (Mohan et Baylink, 1999).

Enfin, MSP-1 (Mollusc Shell Protein-1), une glycoprotéine acide partiellement séquencée (436 acides aminés parmi lesquels 31% de sérine, 25% de glycine et 20% d'acide aspartique) dont la fonction n'est pas encore déterminée précisément à l'heure actuelle, a été isolée de la nacre de coquille Saint-Jacques *Patinopecten yessoensis* (Sarashina et Endo, 1998). Cette protéine comporte un domaine basique dans sa partie N-terminale et au moins deux domaines riches en Asp hautement conservés encadrés de 3 domaines riches en sérine et glycine. Elle pourrait intervenir dans la formation du minéral par sa probable aptitude à fixer le calcium.

### C. Les Arthropodes

L'embranchement des Arthropodes est de loin le plus important du règne animal: il représente 80% des espèces connues (4,3% pour les Vertébrés) dont environ 1,2 million d'Insectes. Les Arthropodes sont des animaux pourvus d'un squelette externe (ou cuticule) sécrété par des cellules épidermiques. Le corps est segmenté et présente une métamérisation plus ou moins nette. Primitivement, chaque métamère porte une paire d'appendices servant à la nutrition et/ou à la locomotion. L'articulation des différentes parties du corps, les attaches des appendices et les divers segments des appendices peuvent se mouvoir les uns par rapport aux autres car la cuticule reste souple à certains niveaux. La forme et la disposition des appendices permettent de séparer les Arthropodes actuels en trois groupes: les Crustacés, les Chélicérates et les Uniramés.

Chez ces animaux, plusieurs protéines intervenant dans des biominéralisations ont été caractérisées et en particulier chez les Crustacés. En effet, ces derniers sont les seuls à durcir leur cuticule par calcification (Stevenson, 1985 ; Simkiss et Wilbur, 1989) contrairement aux Insectes dont la cuticule est durcie par tannage.

Le groupe de Nagasawa a extrait et caractérisé, chez une écrevisse, une protéine acide (Ishii *et al.*, 1996 ; Ishii *et al.*, 1998) appelée GAMP (GAstrolith Matrix Protein) extraite de la fraction insoluble de la matrice organique des gastrolithes. Les gastrolithes sont des disques calcifiés pairs se formant en période préexuviale sur la paroi antérieure de l'estomac de quelques Décapodes (Travis, 1960) tels que les écrevisses et certains crabes terrestres. Ces structures, formées de carbonate de calcium amorphe au sein d'une matrice protéique sécrétée par les cellules épithéliales stomacales d'origine ectodermique, correspondent à une mise en réserve de calcium en période préexuviale. Ce stockage ne représente qu'une faible fraction du calcium (4 à 7%) nécessaire à la minéralisation de la nouvelle cuticule en période postexuviale. L'essentiel de cette réserve calcique semble surtout contribuer à la minéralisation du moulin gastrique et au maintien de la calcémie après exuviation de l'animal (Chaisemartin, 1967 ; Greenaway, 1985). La protéine GAMP, la plus abondante des gastrolithes, est une protéine acide de 94 kDa en SDS-PAGE (50,5 kDa d'après la séquence de l'ADNc) possédant deux séquences répétées dont l'une présente des similitudes avec l'involucrine, protéine synthétisée par les kératinocytes humains. Cette protéine est suspectée de se lier à la chitine, polysaccharide entrant dans la composition de la cuticule et/ou d'intervenir dans le processus de calcification de ces structures de stockage (Takagi *et al.*, 2000). Le gène correspondant a été caractérisé et son expression est stimulée par la 20-hydroxyecdysone (Tsutsui *et al.*, 1999), l'hormone de mue de la majorité des Arthropodes. La

protéine est retrouvée au niveau des gastrolithes mais aussi au niveau de l'une des couches cuticulaires où précipite le carbonate de calcium, l'exocuticule, et plus faiblement dans l'endocuticule et au niveau de l'épiderme sous-jacent. Ce même groupe a également mis en évidence une autre protéine acide nommée CAP-1 (Calcification-Associated Peptide-1) chez ce même animal (Inoue *et al.*, 2001). Cette protéine possède une séquence de type Rebers-Riddiford (Rebers et Riddiford, 1988), retrouvée dans de nombreuses protéines cuticulaires d'Arthropodes. Cette protéine interviendrait au niveau de l'élaboration de l'exosquelette du fait de son aptitude à fixer la chitine et à interférer dans la précipitation *in vitro* du carbonate de calcium.

L'équipe de Watanabe, quant à elle, a mis en évidence, chez la crevette *Penaeus japonicus*, 4 espèces d'ADNc codant des protéines exprimées en postmue constitutives de l'exosquelette. Il s'agit de *DD4* (Endo *et al.*, 2000), *DD5* (Ikeya *et al.*, 2001), *DD9A* et *DD9B* (Watanabe *et al.*, 2000). Les protéines correspondantes, dont la séquence primaire a été déduite des ADNc, présentent toutes un caractère acide et des séquences répétées en tandem. La séquence consensus de Rebers-Riddiford est retrouvée sous forme d'un variant chez *DD5*, *DD9A* et *DD9B*. *DD4* est riche en proline (14%) et présente des homologies de séquence avec la calphotine, calciprotéine exprimée dans les cellules photoréceptrices de l'œil de drosophile. Cette protéine, du fait de ses propriétés, aurait un rôle dans la minéralisation par calcification de la cuticule.

Si au cours des années 80, les recherches dans le domaine des biominéralisations se sont plutôt axées sur la caractérisation biochimique des constituants matriciels dans leur ensemble, depuis le milieu des années 90, la caractérisation des protéines de matrice, aussi bien chez les Vertébrés que chez les Invertébrés, représente un domaine en pleine expansion. En effet, avec l'avancée des techniques de biochimie des protéines et de biologie moléculaire, les recherches se sont orientées plus particulièrement vers une étude plus approfondie des constituants protéiques et de leur(s) éventuelle(s) fonction(s) au sein des structures minéralisées. Actuellement, le domaine des biominéralisations présente un intérêt grandissant puisqu'il ouvre de nombreuses perspectives très prometteuses. L'étude des biominéralisations a des applications potentielles dans le domaine des biomatériaux (Heuer *et al.*, 1992 ; Weiner et Addadi, 1997) avec la conception de matériaux reproduisant les propriétés structurales des biominéralisations, dans le domaine biomédical avec le développement d'implants osseux et dentaires de substitution (Mann, 1997 ; Petite, 2001, 2002 ; Petite *et al.*, 2000) mais aussi dans le domaine des matériaux composites.

### III - Description du modèle d'étude

Les Crustacés, comme tous les Arthropodes, possèdent un exosquelette (ou cuticule) inextensible rigide imposant au cours de leur développement un mode de croissance discontinu. En effet, leur croissance est associée au processus cyclique de la mue impliquant la formation d'un nouvel exosquelette couplée à des mécanismes de résorption partielle de l'ancien qui est rejeté lors de l'exuviation. En période postexuviale, la cuticule néoformée est durcie par l'apport de calcium provenant de l'environnement ou mis en réserve avant l'exuviation sous diverses formes: granules (dans l'hépatopancréas et l'hémolymphe de certains Décapodes), gastrolithes (dans la paroi stomacale d'autres Décapodes), plaques sternales (au niveau de certains sternites des Isopodes) ou concrétions (dans les cæcums postérieurs des Amphipodes, Graf, 1974, 1978). Les structures calcifiées des Crustacés sont principalement constituées de carbonate de calcium plus ou moins cristallisé en vaterite, en calcite ou à l'état amorphe et, dans une moindre proportion, de phosphate de calcium.

Ainsi les Crustacés semblent constituer des modèles appropriés pour une étude approfondie des mécanismes impliqués dans les phénomènes de calcification.

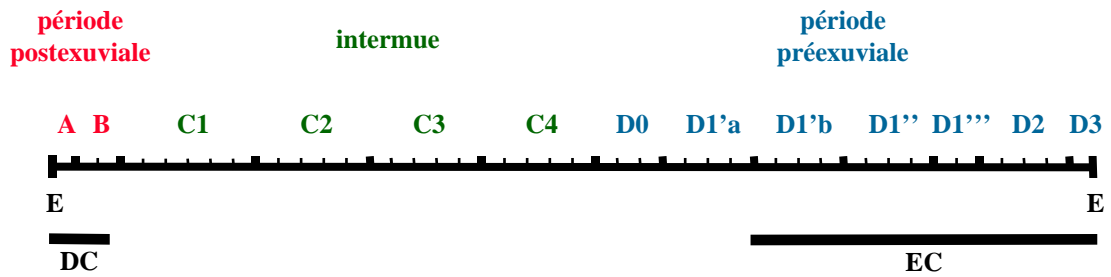
#### A. Cycle biologique

*Orchestia cavimana* (Heller) est un crustacé amphipode terrestre de la famille des Talitridés (fig. n° 2). Cet animal peut être considéré comme une espèce rare en France. Elle n'a été retrouvée qu'au niveau de quelques stations isolées telles que Chinon au bord de la Vienne, Nantes, Cambrai au bord du canal de Saint-Quentin, Epinay-sur-Seine au bord d'un lac, Nancy le long du canal de la Marne au Rhin, Strasbourg sur les berges du même canal, Vitry-Châtillon en bordure d'anciennes sablières mais aussi au bord de la mer à Banyuls et à l'embouchure de la Seine (revue in Graf, 1969). *O. cavimana* est également présente en région Bourgogne puisqu'elle peut être retrouvée à Montceau-les-Mines sur les bords du canal du centre (Testenièrre, 1998) et à Saint-Jean-de-Losne sur les bords de la Saône (observations personnelles). Cet animal présente un mode de croissance discontinu comme tous les Arthropodes. Cette croissance est associée au phénomène cyclique de la mue. Le cycle de mue d'*O. cavimana* se déroule sur 46 jours pour des spécimens adultes de 18 à 20 mm de long (fig. n° 3). Ce cycle comporte 5 périodes principales subdivisées en 14 stades: (A-B) période





**Figure n° 2:** *Orchestia cavimana* (Heller). Spécimen mâle adulte (20 mm en extension). Cliché: F. Graf.



**Figure n° 3:** Subdivision en périodes (A, B, C, D, E) et stades du cycle de mue d'*O. cavimana* mâle adulte d'une taille d'environ 18 à 20 mm de long. Une unité de graduation représente un jour. E: Exuviation ; EC: Elaboration des concrétions ; DC: Dissolution des concrétions.



**Figure n° 4:** Radiographie montrant *in situ* les cæcums postérieurs (→) chargés de concrétions calcaires juste après l'exuviation (d'après Graf et Meyran, 1983).

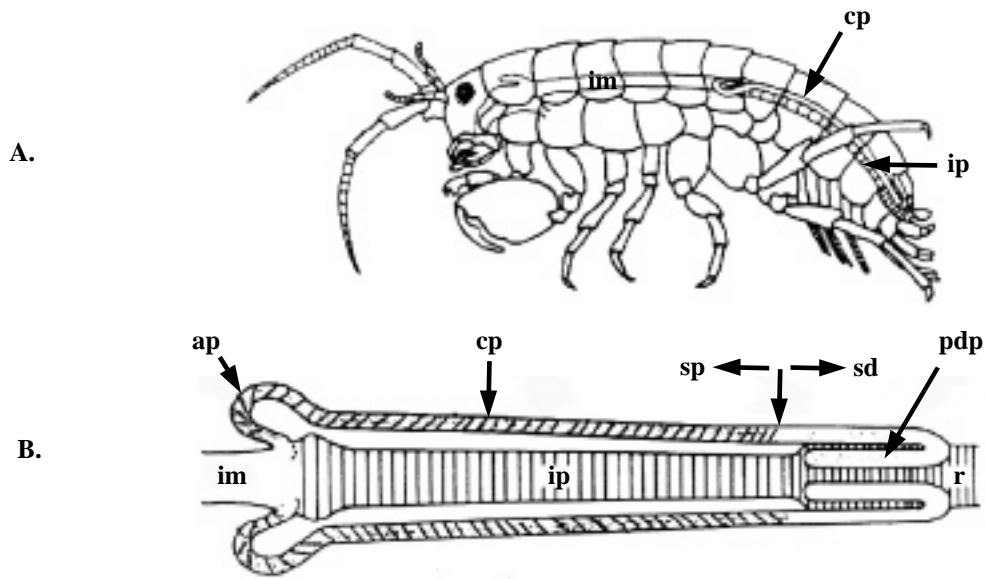
postexuviale où la nouvelle cuticule est en fin d'élaboration et sera calcifiée, (C) période d'intermue qui correspond à un état stable de la cuticule, (D) période préexuviale qui permet à l'animal de constituer une partie de la nouvelle cuticule sous l'ancienne, (E) exuviation, instant où l'animal rejette son ancienne cuticule et laisse ainsi apparaître la cuticule néoformée en période D. Du fait du mode de vie terrestre d'*Orchestia*, l'origine du calcium nécessaire au durcissement de la nouvelle cuticule est à la fois endogène et exogène. Le calcium provient en effet de la résorption partielle de celui de l'ancienne cuticule se produisant en période préexuviale et de la nourriture ingérée par l'animal (Graf, 1974). Avant l'exuviation, le calcium est stocké sous forme de concrétions calcaires dans des diverticules de l'intestin moyen (fig. n° 4) appelés cæcums postérieurs (Graf, 1962).

### **B. Les cæcums postérieurs: organes de stockage de calcium**

La première description des cæcums postérieurs a été réalisée chez les Amphipodes par Bate en 1856. En 1880, Nebeski a publié une importante étude relative à ces organes, alors appelés "tubes urinaires" car il leur attribuait une fonction d'excrétion. Il estimait, en effet, que le dépôt calcaire parfois observé ne devait pas être considéré comme un phénomène pathologique mais comme un mode normal d'excrétion.

En 1962, F. Graf démontre, chez *Orchestia cavimana* et *Niphargus virei* (Gammaridé hypogé), que ces organes sont responsables de la mise en réserve de calcium avant la mue en relation avec le mode de vie du crustacé et qu'ils participent activement au métabolisme calcique. Il préfère alors retenir le terme "cæcums postérieurs" (Della Valle, 1893) ou plus précisément "cæcums postérieurs de l'intestin moyen". Les appellations "organes, tubes ou glandes urinaires" ou autres, proposées jusqu'alors laissent, quant à elles, trop préjuger d'une fonction qui n'est pas établie.

Les cæcums postérieurs d'*Orchestia cavimana* sont constitués de deux tubes d'environ 10 mm de long (pour un animal adulte) situés de chaque côté du tube digestif et s'abouchant à l'extrémité postérieure de l'intestin moyen (fig. n° 5). Provenant de la région terminale de l'intestin moyen, les deux cæcums postérieurs se dirigent dans un premier temps vers l'avant sur une courte distance puis se recourbent vers l'arrière pour former une anse. Ils longent ensuite l'intestin postérieur puis le rectum où, ils reviennent vers l'avant en devenant nettement dorsaux par rapport au tube digestif (Graf, 1969). Les cæcums postérieurs entourés d'une tunique musculaire et d'une séreuse conjonctive sont constitués d'un épithélium unistratifié constitué de cellules principales de plusieurs types et de cellules secondaires

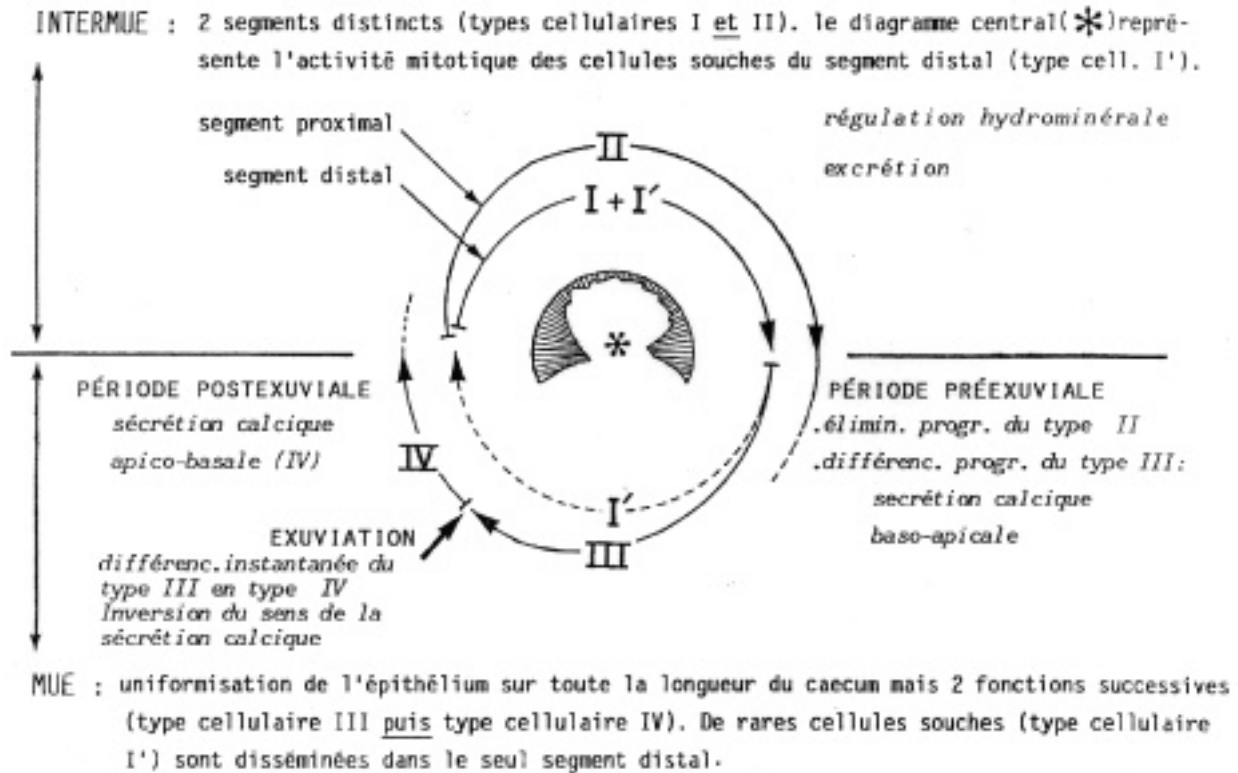


**Figure n° 5:** Localisation et organisation des cæcums postérieurs chez *O. cavimana* en intermue (d'après Graf et Michaut, 1980).

**A.** Localisation des cæcums postérieurs, diverticules postérieurs de la région terminale de l'intestin moyen.

**B.** Vue dorsale des cæcums postérieurs montrant leur relation avec le tube digestif.

**ap:** anse proximale ; **cp:** cæcum postérieur ; **im:** intestin moyen ; **ip:** intestin postérieur ; **pdp:** portion distale procurrente ; **r:** rectum ; **sd:** segment distal (type cellulaire I) ; **sp:** segment proximal (type cellulaire II).



**Figure n° 6:** Représentation dynamique des différenciations des cellules cæcales au cours d'un cycle de mue d'*O. cavimana* (d'après Michaut et Graf, 1990).

d'autres types telles que les cellules paracrines (Graf, 1982) et les cellules nerveuses (Graf et Meyran, 1992).

Au cours de chaque cycle de mue, l'épithélium cæcal est remanié à trois reprises par la succession de quatre types cellulaires au niveau des cellules principales (fig. n° 6). En intermue, les cæcums montrent deux segments distincts: un segment distal caractérisé par le type cellulaire I et un segment proximal constitué par le type cellulaire II (Graf, 1969 ; Graf et Michaut, 1980). En période de mue, l'épithélium s'uniformise sur toute la longueur du cæcum et apparaît progressivement, de la région distale vers la région proximale antérieure, le type cellulaire III, responsable de l'édification de concrétions calcaires intraluminales (Graf, 1969 ; Graf et Meyran 1983). Au cours de l'exuviation, un nouveau type cellulaire, le type IV, apparaît d'emblée sur toute la longueur du cæcum. Il est caractéristique de la période postexuviale (Graf, 1969 ; Graf et Meyran, 1985) et est responsable de la solubilisation des concrétions et de leur résorption sous forme de sphérules. A l'intermue suivante, le cæcum présente à nouveau les deux types cellulaires I et II et commence un nouveau cycle.

Le remaniement de l'épithélium cæcal est le résultat de différenciations cellulaires accompagnées ou non du renouvellement des cellules qui le composent (Michaut et Graf, 1990). Le renouvellement cellulaire est assuré par deux crises mitotiques survenant durant la période d'intermue au niveau des cellules de type I du segment distal des cæcums. Néanmoins, si toutes les cellules de type I sont aptes à se diviser, seules certaines disséminées dans le segment distal le font: ces cellules appelées I' sont équivalentes à des cellules souches. La première crise mitotique survient en tout début d'intermue et a pour effet une poussée des cellules I' du segment distal vers le segment proximal où elles se différencient en cellules de type II. La deuxième crise mitotique débute en fin d'intermue et se termine au début de la période préexuviale, la division des cellules I' est alors suivie de leur différenciation en cellules de type III. Dans un premier temps, uniquement localisées au niveau du segment distal, ces cellules progressent vers la région proximale et reconstituent l'épithélium cæcal sur toute la longueur du cæcum. Ainsi, les différenciations cellulaires de type I' en II et I' en III résultent de mitoses et s'étendent sur plusieurs jours. La différenciation cellulaire du type III en type IV lors de l'exuviation est, au contraire des deux précédentes, instantanée et sans mitoses. Cette dynamique épithéliale fait ressortir le fait que certains types cellulaires ont une durée de vie inférieure à celle du cycle de mue. C'est le cas des cellules du type II apparaissant et disparaissant durant la période d'intermue et de celles des types III et IV apparaissant en début de période préexuviale et disparaissant en fin de période postexuviale (Michaut et Graf, 1988, 1990).

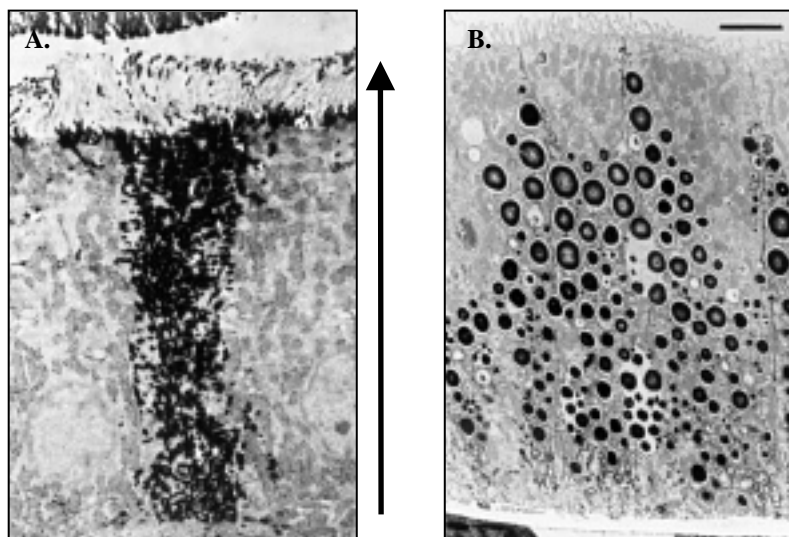
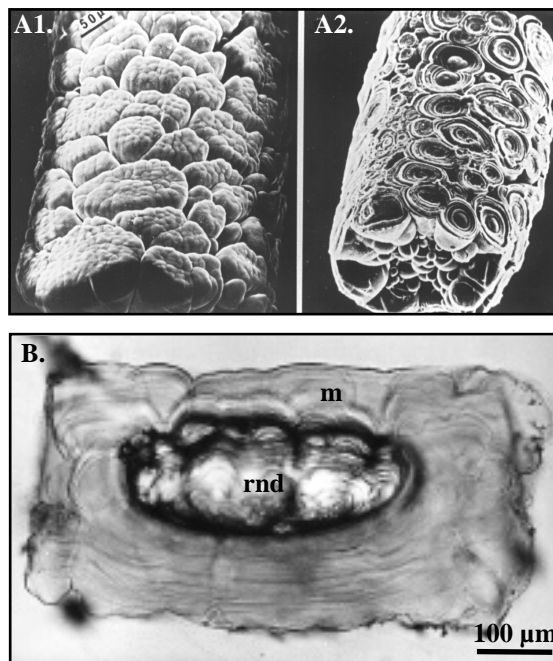
**Figure n° 7:** Aspect et structure des sphérolithes.

**A.** Micrographie d'un sphérolithe complexe (MEB) constitué par la coalescence de sphérolithes simples (d'après Graf et Meyran, 1983).

1. Juste avant l'exuviation: le stockage calcique est à son maximum.
2. 10 heures après l'exuviation: la réabsorption du calcium est en cours.

**B.** Sphérolithe complexe après décalcification partielle dans une solution d'EDTA. Notez la présence de couches successives d'accroissement de la concrétion, même en son sein (d'après Graf, 1967).

**m:** matrice organique ; **rnd:** région non décalcifiée.



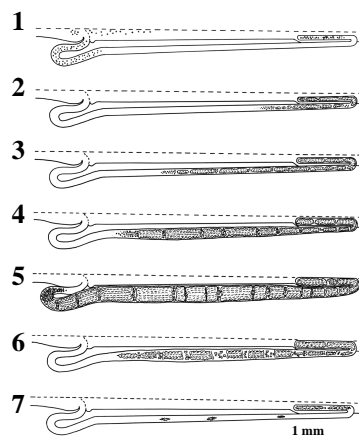
**Figure n° 8:** Micrographie (MET) montrant le transit calcique au niveau de l'épithélium cæcal s'effectuant essentiellement par la voie extracellulaire. La flèche indique le sens du transit calcique. Echelle : 2,5 µm.

**A.** Durant la période préexuviale, le calcium transite dans le sens baso-apical sous la forme ionique dans l'espace intercellulaire (d'après Graf, 1971).

**B.** Durant la période postexuviale, le calcium transite dans le sens apico-basal sous la forme de sphérules calciques (carbonate et phosphate de calcium précipités au sein d'une matrice organique) élaborées puis cheminant dans un réseau extracellulaire et enfin solubilisées dans le même réseau à l'approche de la basale (d'après Graf et Meyran, 1985).

**Figure n° 9:** Evolution des cæcums au cours d'un cycle de mue montrant l'élaboration puis la régression des concrétions calcaires (d'après Graf et Meyran, 1983).

- 1: Intermue (période C).
- 2, 3 et 4: Période préexuviale (période D).
- 5: Exuviation (période E).
- 6 et 7: Période postexuviale (périodes A et B).



### **C. Les échanges calciques au niveau de l'épithélium cæcal**

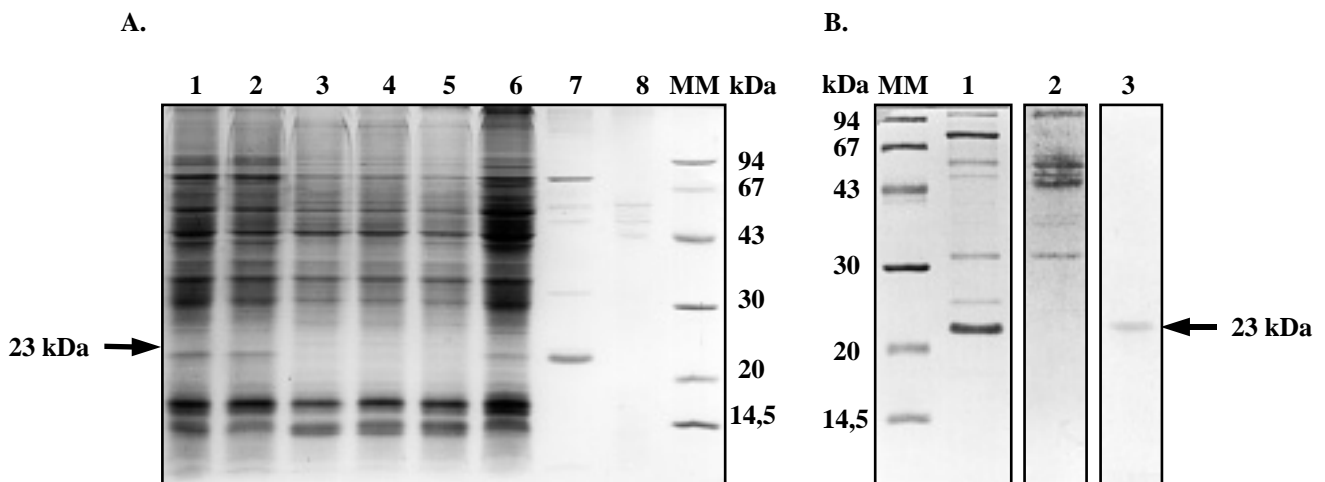
Le stockage calcique nécessaire au durcissement de la nouvelle cuticule s'effectue en période préexuviale dans la lumière cæcale sous forme de concrétions calcaires (fig. n° 7 A). Après exuviation, ces concrétions sont solubilisées et le calcium est réutilisé pour la minéralisation de la nouvelle cuticule (fig. n° 7 A). Des expériences d'homotransplantation et de scellage de cæcums chez *O. cavimana* ont permis de démontrer que les mécanismes d'élaboration et de dissolution des concrétions calcaires sont assurés par l'épithélium cæcal lui-même (Graf, 1964, 1966).

Lors du processus de stockage (fig n° 8 A), le calcium hémolympatique traverse l'épithélium cæcal sous forme ionique dans le sens baso-apical au niveau des espaces intercellulaires dilatés en réseau extracellulaire (Graf, 1971 ; Graf et Meyran, 1983). La précipitation du calcium s'effectue dans la lumière cæcale au sein d'une matrice organique (fig. n° 7 B), essentiellement sous forme de carbonate de calcium à l'état amorphe stabilisé (Raz *et al.*, 2002), conduisant à la formation de sphérolithes simples et complexes. En période postexuviale (fig. n° 8 B), le calcium réabsorbé transite dans le sens apico-basal sous la forme de sphérules calciques (carbonate et phosphate de calcium précipités au sein d'une matrice organique) élaborées dans un réseau extracellulaire (Graf et Michaut, 1977 ; Graf et Meyran, 1985). Si le transport sous forme ionique du calcium pour conduire à l'élaboration de concrétions calcaires s'effectue en période préexuviale en une quinzaine de jours, après exuviation il se fait en moins de 48 heures sous forme de sphérules aboutissant en fin de période postexuviale à des cæcums vides (fig. n° 9). Ainsi l'épithélium cæcal possède la faculté d'une double polarité mettant en jeu des cellules qui vont présenter deux différenciation successives (cellules de type III pour le stockage calcique et cellules de type IV pour la résorption calcique).

Le turnover calcique dont cet animal est l'objet s'avère d'un intérêt considérable du fait qu'il mime des processus de minéralisation/déminéralisation connus chez les Vertébrés. Ainsi *O. cavimana* semble être un modèle biologique très approprié pour l'étude des processus de calcification, de transport calcique et de leurs régulations.

### **D. Mise en évidence d'un marqueur protéique spécifique du stockage calcique**

Afin d'étudier tout d'abord le processus de stockage calcique, la recherche d'un marqueur stade-spécifique s'est avérée cruciale. Par une analyse comparative des profils électrophorétiques des protéines néosynthétisées par les cæcums durant un cycle de mue et



**Figure n° 10:** Mise en évidence et caractérisation d'un marqueur période-spécifique (d'après Luquet *et al.*, 1996).

**A.** Profils électrophorétiques (SDS-PAGE) des polypeptides extraits :

- des cæcums postérieurs à différents stades du cycle de mue: **1-** début de période postexuviale ; **2-** fin de période postexuviale ; **3-** intermue ; **4-** début de période préexuviale ; **5-** milieu de période préexuviale ; **6-** fin de période préexuviale.

- de la matrice organique des concrétions calcaires: **7-** fraction soluble ; **8-** fraction insoluble.

**B.** Caractérisation de la fraction soluble de la matrice des concrétions calcaires.

**1-** Coloration au bleu de Coomassie ; **2-** Mise en évidence des glycoprotéines par un test à l'APS ;

**3-** Détection des calciprotéines par marquage au  $^{45}\text{Ca}$ .

**MM:** marqueurs de masse moléculaire.

des protéines extraites de la matrice organique des concrétions, une protéine spécifique de masse apparente de 23 kDa a pu être mise en évidence (Luquet *et al.*, 1996 ; Testenièrè, 1998). Les séquences du gène et de l'ADNc correspondant ont été obtenues (fig. n° 11). Cependant la masse de la protéine calculée par rapport à la séquence déduite du gène n'est que de 12,4 kDa pour 108 acides aminés. Ceci peut s'expliquer soit par une dimérisation, soit par la composition particulière en acides aminés de ce polypeptide et par l'existence de modifications post-traductionnelles. En effet, cette protéine, d'un pI théorique acide (pI=4,4), est constituée d'environ 30% d'acides aminés acides (16,7% de résidus acide aspartique et 13% de résidus acide glutamique). D'autre part, elle fixe le calcium mais elle ne semble pas glycosylée bien qu'elle possède un site putatif de glycosylation (Testenièrè, 1998 ; Testenièrè *et al.*, 2002). Cette calciprotéine, de 23 kDa, a été nommée Orchestine. Les diverses propriétés, ainsi mises en évidence, laissent supposer que Orchestine pourrait jouer un rôle important dans le processus de stockage calcique.

L'étude de l'expression spatio-temporelle du gène a révélé que le gène est exprimé uniquement dans les cæcums postérieurs avec un taux croissant en période préexuviale mais aussi en moindre proportion en période postexuviale. Des résultats de dosage de type RIA ont suggéré la présence d'hormones de type 20-hydroxyecdysone (Graf et Delbecque, 1987) et de type calcitonine (Graf *et al.*, 1989) chez *Orchestia*. L'étude de la régulation hormonale d'*orchestine* a montré que la synthèse de la protéine correspondante est sous le contrôle indirect de la 20-hydroxyecdysone en période préexuviale et pourrait également être dépendante d'une calcitonine-like après l'exuviation (Testenièrè, 1998 ; Testenièrè *et al.*, 2002).

D'après ces premiers résultats, Orchestine s'avère donc être un excellent marqueur pour la compréhension du processus de stockage calcique et de sa régulation.



```

-1130                                     CAGGTCAACGGATCATCAACATTC
-1106 ACTAACATTACATGATCATTAATATTCCCAAACATTACATGATCATAACATTACATGATCATTAAAC
-1027 ATTCACAAATATTACATGACTATTAACATTCACAAACATCCACATGATCATTAGCATTACACAAACATTACATGATCAT
-948 TAGCATTACACAAACATTTACATGATCATTAACATTCACAAACATTACAGTGATCGTCAACATACGATATCGCGCTCGTT
-869 AGCTGGAAACTCAGGATGGTATGCAAGACTGCATGAGAGACGGGCTACGGTGGCCGCAACACACACCCACAATACGCAG
-790 ATCTTCCATTGCGTTGGTTACAGTCAATTCAAGCTTTAATCCCTTTCCAACAATTTTTTTGCGGAAAATGCACATTTTG
-711 AGACGACTTTATATGCTTGAGGTTTCATGAACATACTCAGGAATGGTCACCTCATACCGAGAGAAGTCAAGGAAGGAAGA
-632 GTAAACTAGCGTCAAGGTTTTTTTTTTGAAGGAAGAGTAAACTAGCGTCAAGGTTTTTTTTTTGTTTTAAAATCGAGCAT
-553 TTTTGACCAGCTCCCTCGTACAAAGTTGAAAAATTCGAGTTAGGTAATTACGAGTTAACTCGTCTTGACCAGGAAGGGA
-474 CACTCCGGGCTGTAACCTTGCTCTCGACAGAACGCTGATCTCCTGGCCTTAAAACGAGAACATCAGAGGATTTTGGAG
-395 CTTGGAAGGCAGTAGCAAGATTCTCGATGAATGTGAATTGTAGAAATCTCTTTTTGTCAGCCTATTTCCCTCGTTATA
-316 TGTTTGAAAAACTCGCATCTATCTTAAACTGTTTGTAGTTCTCCTGAAAGTAGAGAATTTTTCTTTTACCGAACGTTTTT
-237 TCTCTCTATTTCAAGATTTGTAATTCATCACATAAGAAATATACTTACAGCTGATTTTTGAAATTTGAGGTGAAACACA
-158 TATTATATGTACAAGCAGAAGCAAGCATTATTCATATCAGTGTTTTATCACCAGAACTTAAAAGCCCTTGCACTGAAA
-79 CATCAGTGATGGCCATAAACCTGTATTGATAGGAAGAATCCCGCATTATAGAAAGCCAAGCTCGAGCTCTGAAATACC
+1 AGTCATCAAGAAGCCTTGCAACAGGAAGTATTGCAGCACCATTTCTCCCTGAATATTAAGTCACCTTACATTTCTTGA
+80 GTAGAGCATCGTAGTTGCAAAG ATG AAC AAG GTC TTC ATC ATT GGT GTG TGT CTC TTC ATC GTC
+1 M N K V F I I G V C L F I V

+144 TCT CAA GCG GTC CTC GCG GTG CCG TGG GAC AGC GAC GAG TCG TCA GAC GAG CGC TTG AGT
+15 S Q A V L A V P W D S D E S S D E R L S

+204 GAC CGG AGC GAC GAG TCG AGG GAG GAG CCC AGG AAA TTG GTC GTG TCC GAT GAT GAC TCT
+35 D R S D E S R E E P R K L V V S D D D S

+264 CGA GAA GAC AGC AAC GAG TCA GCA GAG GTG AGG CGA AGA GAC GAC AGC CGA GAG TCA GAA
+55 R E D S N E S A E V R R R D D S R E S E

+324 GAG GAA CCT AGA AAG TTG TCT GCC GAT ACC TCT GAT GAA GAC TCG GAT GAC TCG CAG GAG
+75 E E P R K L S A D T S D E D S D D S Q E

+384 AGC CCA CTT GAT CTC TTC TTC AAG ACC CTC CGA GAT TCC AAG ATC AGT CGC GCC CAG CGA
+95 S P L D L F F K T L R D S K I S R A Q R

+444 GCT GCG CTG CTC AAG GCG TTA TTG AGC CGC TAC GCT GGC TAC TGA GCACTCACCTAGCGCGTG
+115 A A L L K A L L S R Y A G Y *

+507 TGCAATAGGAGACCGCCAGAATAACGTGAGTAAAGCTGACCAATCTATGAAATGAAGTTTATTCATATAAGGCGTACGGT
+586 GAGCTCCTCGAGTGTATTTAGCTGCATATTTGGAGTAAAACCTGAACGCGCTTGAGGTCGTTCTGTGATCCAAGCAGAAT
+665 TTGCGCATTTCTTAAAGTTTTACGTACCGATTTAATATGATTTAATATTCATGAAATAAAGTTACAAAGTTAAAATA
+744 GTTTTTTACAGGCAATAGTGTGTGTTTTGTACATCTTGACTTTATTTTTGCAGGTGTAACGGTGAAGAACCCTGXTGACAA
+823 GTTTATGTTGCGGAAGCATCTCCTGCGACCTTATGCTGGCGATATCCAACTTGTGCCGTGGCTGTATTATGGTATAGA
+902 AATGTACAGCTTAGTGAATACCATTGTGCTATTTATTTATCTACCCAGAAAAAATGGGCGTGTTCGTATCTCGATAA
+981 GCTTAATGTATTCTGCCATTCAATTCTGTATTAACACTATATGATTAATATGTAGTGAAGACGAGGTTAGAATGCTC
+1060 TTAAATTTCTCCCTCTTATTTCTCCGTGCTTTTGCCTTGAATTTCCAAGTGTTTTTGCTGATAATTAAGCAAATTTG
+1139 CCATGTTACAGCTTAAATTTTTCTAGGGACTGCTAACATTTCTTCACTTATTTTGCTTTGCATGTTCTTGAGGCACC
+1218 TAGATGTAAGATAGCATCTTCCACTAAGTGTCAAATTCATAGAAGCAAATAAATCGCAAATTTATCTACTGCTAAAAT
+1297 TATTTCCCTCATGGTCTTCTATTTACCAACATCAAATTCATTAACCTACAGCTATTAATTCCTCCATCAACAAGAAGT
+1376 TCCCAATTCAAAACATAATCAAAGATTCGCCATCATAGTGAGTCGTA 1421

```

**Figure n° 11:** Séquence du gène *orchestine*, de l'ADNc correspondant et de la séquence protéique déduite. Les nucléotides sont numérotés à partir du site d'initiation de la transcription (+1). La séquence de l'ADNc est en gras. X<sup>+816</sup> est une guanosine ou une cytidine. La séquence en italique correspond à l'intron. La boîte TATA et le site putatif de polyadénylation sont soulignés. La séquence en acides-aminés déduite de la séquence nucléotidique est indiquée avec la nomenclature à une lettre et le peptide signal apparaît en grisé. Le codon stop (TGA) est représenté par un astérisque.

## *Chapitre II*

### *Matériel et Méthodes*

# Matériel et Méthodes

## I - Matériel d'étude

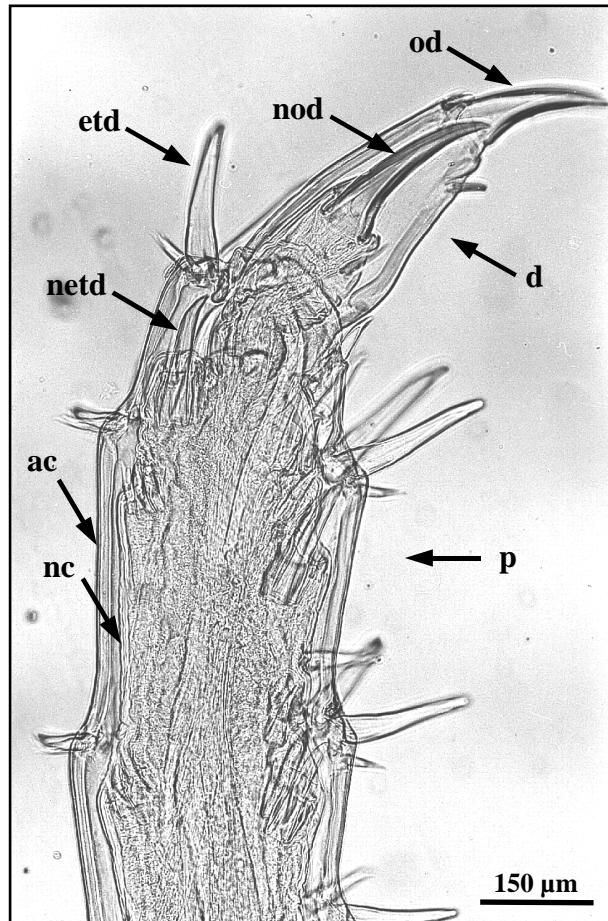
Le modèle *Orchestia cavimana* a été initialement introduit à l'Université de Dijon par F. Graf au début des années 1960 pour l'étude des concrétions calcaires, réserves de calcium stockées temporairement dans les cæcums postérieurs (Graf, 1962), et de leur rôle au niveau de la physiologie de l'animal.

### A. Conditions d'élevage

Tous les animaux nécessaires à la réalisation de ce travail proviennent d'un élevage conduit directement au laboratoire à partir de spécimens récoltés à Nancy. L'élevage des *Orchestia* est réalisé sur des terrariums subaquatiques édifiés dans des bacs en ciment de 120 cm de long par 80 cm de large et 100 cm de profondeur. Les terrariums sont constitués d'un monticule de terre recouvert de mousses naturelles et d'une hauteur de 50 cm dont 20 sont immergés sur une assise de pierres disposée de telle sorte que l'eau puisse circuler, mimant ainsi les berges d'un canal, biotope d'*Orchestia*. Les terrariums sont éclairés artificiellement 12 heures sur 24 et maintenus à une température de 18°C pendant l'été alors que pendant l'hiver, ils ne sont éclairés que 8 heures sur 24 à une température de 15°C (Graf, 1969). Au départ, les animaux, de régime détritivore, étaient nourris avec des algues placées sous la mousse. Actuellement, ils le sont avec des courgettes et des flocons de céréales mais il est cependant à noter qu'*Orchestia* s'accommode aussi de pain, de viande, de larves de chironome ou de moules qu'elle apprécie tout particulièrement (Graf, 1969).

### B. Datation des animaux

Comme tous les Crustacés, *Orchestia cavimana* possède une croissance discontinue et présente des cycles de mue durant toute sa vie qui s'étend de 18 à 20 mois. La durée du cycle de mue varie surtout en fonction de l'âge de l'animal. En effet, il est d'environ 4 jours à l'éclosion et peut atteindre 46 jours pour un animal adulte de grande taille (environ 20 mm en extension). Le cycle de mue d'*O. cavimana*, centré sur l'exuviation, comprend cinq périodes notées A, B, C, D et E que l'on retrouve habituellement chez tous les Crustacés (Drach, 1939, 1944) et 14 stades. La datation des animaux au cours de leur cycle de mue peut être



**Figure n° 12:** Extrémité du péréiopode 3 d'*O. cavimana* mâle adulte parvenu au stade D<sub>3</sub> du cycle de mue (d'après Graf, 1986).

**ac:** ancienne cuticule ; **d:** dactylopodite ; **etd:** épine tergo-distale ; **nc:** nouvelle cuticule ; **netd:** nouvelle épine tergo-distale ; **nod:** nouvel ongle dactylien ; **od:** ongle dactylien ; **p:** propodite.

déterminée simplement et rapidement par observation au microscope photonique d'après la cuticulogénèse et la morphogénèse du dactylopodite et du propodite du 3<sup>ème</sup> périopode (fig. n° 12 ; Graf, 1969, 1986) selon une méthode adaptée de celle de Drach et Tchernigovtzeff (1967). Pour ce faire, l'extrémité du 3<sup>ème</sup> périopode d'un animal vivant est prélevée puis montée entre lame et lamelle dans du liquide physiologique (NaCl 9 g/l) et observée au microscope photonique. Les périodes A et B sont déterminées par l'observation de l'épaisseur de la cuticule du périopode qui, en début de la période A, représente 1/3 de l'épaisseur définitive pour atteindre les 2/3 à la fin de cette période. Il faut noter que les animaux, mous et gluants durant cette période, sont facilement identifiables par la visualisation à travers leur cuticule peu pigmentée des cæcums chargés en concrétions et par l'absence de pigmentation au niveau de leurs pattes et de leurs antennes. La pigmentation de ces appendices débute avec la période B au cours de laquelle la cuticule poursuit son épaissement pour atteindre en fin de cette période les 8/9<sup>ème</sup> de son épaisseur définitive. La datation durant la période C est basée sur la formation du nouvel ongle du dactylopodite. Au début de cette période la cavité interne du dactylopodite est totalement remplie par les tissus ayant sécrété cet ongle. L'épiderme adhère intimement à la cuticule qui a atteint son épaisseur définitive (la pigmentation est terminée sur l'ensemble du corps de l'animal). La formation de l'ongle du futur dactylopodite débute par l'apolyse dactylienne, correspondant au décollement de l'épiderme qui va alors reconstituer la matrice du futur dactylopodite. Elle est totalement achevée à la fin de cette période C. La période D débute avec l'apolyse généralisée correspondant alors au décollement de l'épiderme de la cuticule sur pratiquement l'ensemble du corps de l'animal, ce qui précède la sécrétion de la nouvelle cuticule. Ce phénomène est particulièrement visible chez *Orchestia* au niveau de la région tergo-distale du propodite. Durant cette période, la datation est basée dans un premier temps sur la formation de l'épine tergo-distale puis dans un deuxième temps, pour la fin de cette période, sur l'épaisseur de la future cuticule en formation par rapport à son épaisseur définitive. Enfin, la période E, qui correspond à l'exuviation, dure une dizaine de minutes durant lesquelles l'animal s'extrait de son ancienne cuticule qui devient l'exuvie. Cette méthode de datation (Graf, 1969, 1986), sommairement décrite ici, permet d'évaluer la situation d'un animal dans son cycle de mue avec grande précision. Ainsi, un animal adulte peut être daté à 12 heures près sur un cycle de 46 jours ce qui représente un atout très important pour l'étude physiologique de cet animal.

## II - METHODES

### A. Méthodes relatives aux acides nucléiques

#### 1. Détermination du nombre de copies du gène

##### 1.1. Extraction d'ADN génomique

A l'aide d'un homogénéiseur de Potter, un animal adulte débarrassé de ses intestins est broyé dans 2 ml de tampon de lyse (Tris-HCl 0,1 M pH 9 ; EDTA 0,1 M pH 8 ; SDS 1% ; protéinase K 0,1%), placé à 65°C pendant 30 min. puis à 4°C pendant 30 min. après l'ajout de 300 µl d'acétate de potassium 8 M. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 10000 g pendant 10 min. Les ADN contenus dans le surnageant sont ensuite précipités une nuit à -20°C (ou 10 min. à -70°C) par l'ajout de 1 ml d'isopropanol. Après centrifugation à 10 000 g pendant 10 min., le culot d'ADN obtenu est lavé 2 fois à l'éthanol à 70% conservé à -20°C, séché sous vide et repris dans 100 µl de TE-RNase (Tris-HCl 10 mM pH 7,5 ; EDTA 1 mM pH 8 ; RNase 100 µg/ml) puis conservé à 4°C. Les acides nucléiques sont dosés par mesure de l'absorbance à 260 nm (1 unité d'absorbance correspondant à une concentration en ADN de 50 µg/ml) et leur pureté est estimée par le rapport  $A_{260nm}/A_{280nm}$  qui doit être supérieur à 1,8 pour une purification correcte.

##### 1.2. Digestion de l'ADN génomique

L'ADN est digéré par différentes endonucléases dans un volume de réaction de 300 µl. L'ADN génomique (25 µg) est mis en contact du tampon de digestion adéquat selon les recommandations du fournisseur (Life Technologies) additionné de spermidine 2,5 mM pendant 16 heures à 4°C. Les enzymes de restriction (75 U, Life Technologies) sont ajoutées 2 fois de suite à 30 min. d'intervalle et la digestion est conduite 4 heures à 37°C. Après digestion, les ADN sont précipités par 0,25 M d'acétate de potassium dans 2 volumes d'éthanol absolu froid. Après centrifugation, le culot ainsi obtenu est lavé 2 fois par 1 ml d'éthanol à 70%, séché puis repris dans 20 µl d'eau ultra pure.

##### 1.3. Transfert d'ADN (Southern blotting)

Afin de localiser les fragments d'ADN génomique contenant des séquences correspondant à *orchestine*, un transfert des produits de digestion sur une membrane de nylon est réalisé selon la méthode décrite par Southern (1975).

Après séparation des produits de digestion par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% en tampon TAE (Tris-acétate 40 mM pH 8 ; EDTA 1 mM) et visualisation par coloration au bromure d'éthidium, l'ADN est dénaturé puis neutralisé en submergeant le gel, 2 X 15 min. et sous agitation douce, successivement dans la solution de dénaturation (NaOH 0,5 M ; NaCl 1,5 M) et dans la solution de neutralisation (Tris-HCl 0,5 M pH 7,5 ; NaCl 3 M). Le transfert par capillarité de l'ADN du gel sur la membrane de nylon s'effectue grâce au flux de tampon SSC 10X (SSC 20X : NaCl 3M, citrate de sodium 0,3M, pH 7) durant 16 heures à 4°C. A la fin du transfert, les fragments d'ADN sont liés irréversiblement à la membrane par irradiation aux U.V. (0,12 J/cm<sup>2</sup>).

#### 1.4. Marquage des sondes par amorçage aléatoire

Cette méthode, mise au point par Feinberg et Vogelstein (1983), est basée sur la copie par le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I d'*E. coli* (sans activité exonucléase 5'-3') d'un brin d'ADN à partir d'amorces hexanucléotidiques de composition aléatoire en présence de désoxyribonucléotides radioactifs.

L'ADNc (environ 25 ng) est préalablement dénaturé 5 min. à 95°C. Le marquage est réalisé dans 50 µl de tampon de marquage (Tris-HCl 50 mM pH 8 ; MgCl<sub>2</sub> 5 mM ; DTT 2 mM, HEPES 200 mM pH 6,6 ; BSA 0,04%) complété en dATP, dTTP, dGTP à 20 µM chacun, en [ <sup>32</sup>P]dCTP à 333 nM (111 TBq/mmol, NEN) et en hexanucléotides de synthèse. La réaction est effectuée à température ambiante avec 5 U de fragment de Klenow (Promega) puis stoppée après 1 heure d'incubation par ajout de 2 µl d'EDTA 0,5 M et chauffage 2 min. à 95°C.

L'étape de purification des sondes permet d'éliminer les nucléotides radioactifs, non incorporés lors de l'étape de marquage, par gel filtration et d'augmenter ainsi l'activité spécifique des sondes produites.

La solution de sondes, complétée à 100 µl par l'ajout de TEN 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8 ; EDTA 1 mM pH 8 ; NaCl 100 mM) est déposée sur une seringue de 1 ml remplie par 0,9 ml de résine (Sephadex<sup>®</sup> G50, Sigma) préalablement équilibrée par du tampon TEN 1X. La colonne est centrifugée 4 min. à 1600 g puis l'éluat, correspondant aux sondes radioactives débarrassées des nucléotides marqués non incorporés, est conservé à -80°C jusqu'à utilisation. L'activité de la solution de sondes est mesurée au compteur à scintillation avant emploi.

### 1.5. Hybridation et révélation du Southern blot

Les membranes sont préhybridées 4 heures à 65°C dans le tampon d'hybridation (SSC 6X ; Denhardt 5X ; SDS 0,5% ; ADN de sperme de saumon 0,1 mg/ml). L'hybridation avec les sondes ADNc est ensuite menée durant 16 heures à 65°C dans le même tampon mais additionné du produit de marquage (10<sup>6</sup> cpm/ml de tampon) dénaturé. Les membranes subissent ensuite 3 rinçages de 20 min. à 20°C par une solution de SSC 2X, SDS 0,1% puis 2 rinçages de 30 min. à 65°C par une solution de SSC 0,2X, SDS 0,1%. La membrane est ensuite égouttée, enveloppée dans un film plastique puis autoradiographiée 16 heures à -80°C.

## 2. Clonage de l'ADNc relatif à Orchestine chez *E. coli*

### 2.1. Principe du système d'expression

Le vecteur utilisé pour le sous-clonage de la séquence codant Orchestine est le plasmide pQE-30 (Qiagen). Celui-ci possède le promoteur du phage T5 (reconnu par l'ARN polymérase de *E. coli*), l'opérateur *lac*, un gène de résistance à l'ampicilline et une séquence codant 6 histidines en amont du site de multiclonage. Parallèlement au vecteur pQE-30, la bactérie hôte (*E. coli* M15) possède le plasmide pREP-4 qui comporte un gène de résistance à la kanamycine et le répresseur *lac* (*lac I*). Ceci permettra après induction par l'IPTG de lever l'inhibition portée sur l'opérateur *lac* par la protéine *lac I* et d'induire la synthèse d'une protéine recombinante. La protéine recombinante produite possèdera une séquence N-terminale de 6 histidines permettant sa purification sur une colonne d'affinité contenant une matrice couplée à l'acide nitrilo-triacétique saturée en ions nickel (Ni-NTA) (fig. n° 13).

### 2.2. Sous-clonage

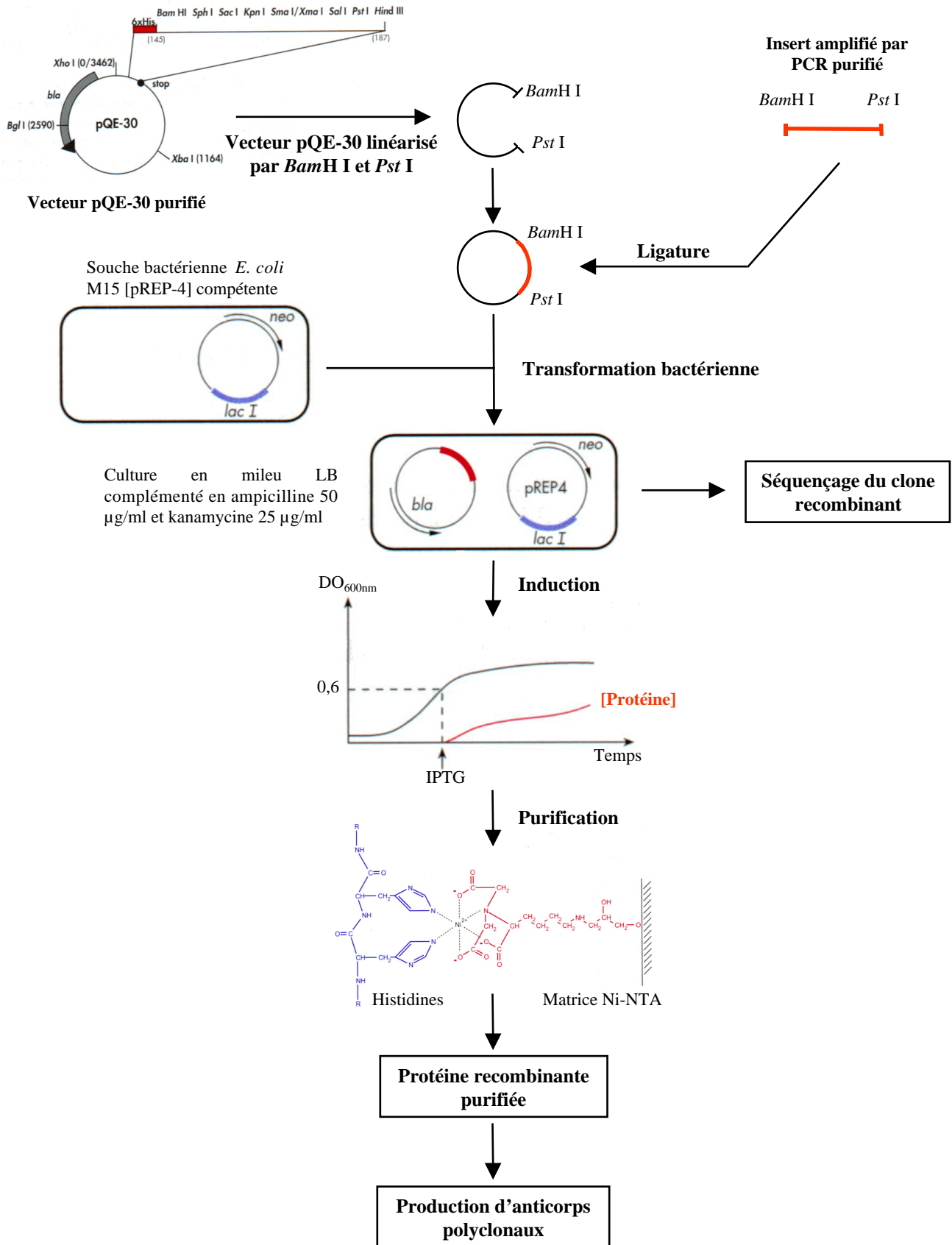
#### a. Amplification de l'ADNc relatif à Orchestine par PCR

##### *Extraction de l'ADN plasmidique (Birnboim et Doly, 1979)*

Nous disposons au laboratoire d'une souche bactérienne *E. coli* JM109 transformée par un vecteur pBS (Stratagène) contenant un fragment de restriction (*EcoR I/Sal I*) de 2,5 kb contenant le gène *Orchestine* (Testenière, 1998).

Une colonie bactérienne *E. coli* JM109 transformée par ce plasmide pBS est mise en culture dans 5 ml de LB liquide complétement par de l'ampicilline (50 µg/ml) pendant une nuit à 37°C sous agitation (180 tours/min.). Après centrifugation à 10000 g pendant 15 min., le culot bactérien est solubilisé dans 100 µl d'une solution de glucose 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0 puis les bactéries sont lysées par addition de 200 µl d'une solution de





**Figure n° 13:** Stratégie utilisée pour la production de la protéine recombinante puis des anticorps polyclonaux.

NaOH 0,2 N, SDS 1%. Le mélange est agité doucement puis les débris cellulaires et l'ADN chromosomique sont précipités par 150 µl d'une solution d'acétate de potassium 3 M puis d'acide acétique glacial 2 M. Après centrifugation (10000 g, 5 min., 4°C), le surnageant contenant l'ADN plasmidique est déprotéinisé par 1 volume de "phénol" (phénol/chloroforme/alcool isoamylique 25/24/1 : v/v/v, saturé en Tris-HCl 1M pH 9,5) puis par 1 volume de "phénol"/"chloroforme" (1/1 : v/v) et enfin par 1 volume de "chloroforme" (chloroforme/alcool isoamylique 24/1 : v/v) pour éliminer les dernières traces de phénol. L'ADN est précipité par 0,25 M d'acétate de sodium dans 2,2 volumes d'éthanol absolu froid puis centrifugé (10000 g, 5 min., 4°C). Le culot ainsi obtenu est lavé par 1 ml d'éthanol à 70% puis repris dans 50 µl d'eau bidistillée contenant 50 µg/ml de RNase A et conservé à -20°C.

#### *Amplification de l'insert par PCR*

La séquence correspondant à la séquence codante d'Orchestine, déléetée de la séquence signal contenue dans le plasmide pBS, est amplifiée par PCR en utilisant l'amorce Sc01 (5'-GATCCGTGCCGTGGGACAGCGAC-3') comprenant un site de restriction BamH I ou Sc01bis (5'-GGATCCGATGACGATGACAAGGTGCCGTGGGACAGCGAC-3') contenant un site de restriction BamH I et une séquence codant un site reconnu par l'entérokinase bovine et l'amorce Sc02 (5'-TGCACTGCAGCACGCGCTAGGTGAGTGC-3') possédant, quant à elle, un site de restriction Pst I. Après avoir fait varier les concentrations des différents composants de la réaction, la PCR est réalisée dans 50 µl d'un tampon de réaction (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 ; KCl 50 mM ; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM) additionné de 100 pmoles de chacune des 2 amorces, 10 nmoles de chaque dNTP et 5 U de *Taq* polymérase (Life Technologies). Le mélange réactionnel est soumis à une dénaturation à 94°C pendant 3 min. L'amplification est conduite pendant 30 cycles selon les conditions suivantes : 1 min. à 94°C, 1 min. à 60°C et 1 min. à 72°C, suivis d'une élongation finale de 15 min. à 72°C. Après amplification, les produits de PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% en tampon TAE (Tris-acétate 40 mM pH 8, EDTA 1 mM) et visualisés par coloration au bromure d'éthidium. Le fragment d'intérêt est extrait du gel par le kit "Qiaquick" (Qiagen), purifié par extraction phénolique et sous-cloné directement dans le vecteur pGEM-T (pGEM-T Vector Systems, Promega).

#### b. Préparation de l'insert et du vecteur d'expression pQE-30

Les plasmides pGEM-T recombinants et pQE-30 sont respectivement extraits des bactéries JM109 et XL1 Blue, purifiés et digérés par les endonucléases de restriction *BamH I*

(0,5 U) et *Pst* I (0,5 U) permettant de libérer l'insert et de linéariser le vecteur d'expression pQE-30. Les produits de digestion sont séparés sur gel d'agarose 0,8% en tampon TAE, colorés au BET. Les fragments d'intérêts sont extraits par le kit "Qiaquick" (Qiagen) puis purifiés par extraction phénolique.

#### c. Ligature

L'insert (50 ng) est ligaturé au vecteur plasmidique (50 ng) par 1 U Weiss d'ADN ligase de T4 (Promega) dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, BSA 3% additionné de DTT 1 mM et d'ATP 0,1 mM pendant 16 heures à 16°C.

#### d. Préparation des cellules compétentes et transformation bactérienne

Des bactéries (*E. coli* JM109 ou M15) sont cultivées dans 100 ml de LB contenant de l'ampicilline (100 µg/ml) ou de la kanamycine (25 µg/ml), centrifugées (4000 g, 5 min., +4°C) puis resuspendues dans 30 ml de tampon Tfb I (RbCl 100 mM ; MnCl<sub>2</sub> 50 mM ; acétate de potassium 30 mM ; CaCl<sub>2</sub> 10 mM ; glycérol 15% ; pH 5,8). Les cellules sont à nouveau centrifugées puis resuspendues dans 4 ml de tampon Tfb II (MOPS 10 mM ; RbCl 10 mM ; CaCl<sub>2</sub> 75 mM ; glycérol 15% ; pH 8), conservées en fractions aliquotes à -80°C.

La transformation bactérienne consiste en la modification du patrimoine génétique des bactéries par introduction d'une information génétique exogène. Les produits de ligature sont ajoutés à 200 µl de cellules compétentes JM109 ou XL1-blue. Après incubation 30 min. sur de la glace, l'ensemble subit un choc thermique de 45 sec à 42°C provoquant l'entrée de l'ADN dans les bactéries. Le mélange est ensuite additionné de 500 µl de milieu liquide de Luria-Bertani (LB) et incubé 1 h à 37°C sous agitation à 250 tours/min. Les bactéries seront étalées à la surface de LB gélosé complémenté par 100 µg/ml d'ampicilline et/ou 25 µg/ml de kanamycine et selon le cas imprégné d'isopropyl-β-thiogalactoside (ITPG) inactivant le répresseur de l'opéron lactose, et de XGal, substrat chromogène de la β-galactosidase. Après incubation une nuit à 37°C, les bactéries transformées par un plasmide recombiné seront lac<sup>-</sup> et conduiront à des colonies blanches, alors que les bactéries transformées par un plasmide non recombiné seront lac<sup>+</sup> et les colonies seront bleues.

### 2.3. Sélection des clones recombinants

Après culture sur boîtes de Pétri, 10 clones sont prélevés et analysés par restriction. Les colonies sont cultivées dans 10 ml de milieu LB complémenté en ampicilline (100 µg/ml) et

en kanamycine (25 µg/ml). Après extraction, les ADN plasmidiques sont digérés par *Bam*H I et/ou *Pst* I. Les produits de digestion sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%.

#### 2.4. Séquençage du clone recombinant sélectionné

En vue du séquençage, les ADN plasmidiques du clone recombinant choisi sont purifiés par l'utilisation du kit "midi" (Qiagen). Le séquençage a été réalisé par la société MWG-Biotech (Ebersberg, Allemagne).

La séquence nucléotidique de l'insert présent dans le vecteur pQE-30 est déterminée selon la technique enzymatique de Sanger (1977) à l'aide d'un séquenceur automatique (373 XL Applied Biosystems, Perkin-Elmer). La réaction de séquençage est réalisée en présence de didésoxynucléotides couplés à des fluorochromes en 3' selon la technique "Dye Terminator" (Perkin-Elmer), en utilisant l'amorce conseillée, pQE-30rev (5'-GTTCTGAGGTCATTACTG G-3'), et 1 µg d'ADN plasmidique par réaction.

### 3. Expression, purification et clivage de la protéine recombinante

#### 3.1. Expression de la protéine recombinante

Une colonie de bactéries M15 [pREP-4] transformées par le plasmide pQE-30 recombinant est cultivée (37°C, 180 tours/min.) dans du milieu LB complété en ampicilline (50 µg/ml) et en kanamycine (25 µg/ml) jusqu'à l'obtention d'une D.O. à 600 nm de 0,5-0,7. L'expression de la protéine est induite par l'apport d'IPTG à une concentration finale de 1 mM et la culture est incubée dans les mêmes conditions pendant 4 heures. Un témoin sans apport d'IPTG est réalisé.

#### 3.2. Purification de la protéine recombinante

Après induction, les bactéries sont centrifugées à 10000 g pendant 20 min. puis lysées par un tampon dénaturant (urée 8 M ; phosphate de sodium monosodique 0,1 M ; Tris-HCl 10 mM pH 8) pendant 1 heure à température ambiante. Les débris bactériens sont éliminés par centrifugation (10000 g, 20 min., 4°C). Le surnageant contenant les protéines totales bactériennes est passé sur une colonne contenant une résine Ni-NTA préalablement équilibrée avec du tampon de lyse. La résine est ensuite lavée par le tampon de lyse ajusté à pH 6,3 puis la protéine recombinante est éluée par le même tampon ajusté à pH 5,9 puis à pH 4,5. Les fractions d'éluion collectées sont analysées par électrophorèse (SDS-PAGE) sur gel d'acrylamide 12%, dialysées contre une solution de Tris-HCl 20 mM pH 7,4 puis quantifiées par la méthode de Bradford (1976).

### 3.3. Clivage de la queue histidine

La protéine recombinante purifiée (50 µg), possédant le site (Asp)<sub>4</sub>Lys reconnu par l'entérokinase bovine, est clivée par 0,05 U d'enzyme (Novagen) dans le tampon de réaction (Tris-HCl 20 mM pH 7,4 ; NaCl 50 mM ; CaCl<sub>2</sub> 2 mM) pendant 16 heures à 21°C puis analysée par électrophorèse sur gel d'acrylamide de type SDS-PAGE.

## **B. Méthodes relatives aux protéines**

### 1. Extractions protéiques

L'animal, décapité et incisé dorsalement, est placé dans du liquide physiologique (NaCl 0,9%). Le prélèvement des cæcums s'effectue à l'aide de pinces fines sous la loupe binoculaire. Les cæcums postérieurs prélevés sont rincés dans du liquide physiologique puis, conservés dans l'azote liquide.

#### 1.1. Extraction des protéines de la matrice organique des concrétions calcaires élaborées dans les cæcums postérieurs

L'extraction des protéines est réalisée à partir d'environ 50 paires de cæcums chargés en concrétions d'animaux situés en fin de période préexuviale ou au moment de l'exuviation. Les cæcums placés dans 2 ml de tampon de lyse (Tris-HCl 50 mM pH 7,5 ; SDS 1% ; β-mercapto-éthanol 1% ; PMSF 10 µg/ml ; pepstatine 1 µg/ml ; leupeptine 0,5 µg/ml) sont soniqués durant 1 min. en présence de 5% d'eau de Javel. L'épithélium étant totalement délité, les concrétions calcaires libérées sont reprises et abondamment rincées puis solubilisées dans 2 ml du même tampon de lyse mais sans SDS et additionné de 10% d'EDTA. Après solubilisation complète des concrétions calcaires, la solution est centrifugée 30 min. à 18000 g. Le surnageant contenant la fraction soluble (fraction S) est prélevé puis diafiltré sur filtre Centricon<sup>TM</sup> 10, lyophilisé et conservé à -20°C.

#### 1.2. Extraction des protéines totales des cæcums postérieurs

A l'aide d'un homogénéiseur de Potter, 10 paires de cæcums (vides ou chargés de concrétions) d'animaux de même stade sont broyées dans 1 ml de tampon de lyse (Tris-HCl 50 mM pH 7,5 ; SDS 1% ; β-mercapto-éthanol 1% ; PMSF 10 µg/ml ; pepstatine 1 µg/ml ; leupeptine 0,5 µg/ml) additionné de 10% d'EDTA. Les débris cellulaires sont éliminés par

centrifugation (5000 g, 10 min.) et le surnageant est diafiltré sur filtre Centricon™ 10, lyophilisé et conservé à -20°C.

## 2. Electrophorèse monodimensionnelle (SDS-PAGE)

La séparation des polypeptides par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyle sulfate de sodium a été décrite par Laemmli en 1970 (technique dite SDS-PAGE). Le SDS, agent dénaturant, se lie aux protéines et leur confère une charge négative. Le gel de polyacrylamide jouant le rôle de tamis moléculaire, les polypeptides sont séparés en fonction de leur encombrement stérique et donc indirectement de leur masse moléculaire sous l'action d'un courant électrique continu. La comparaison des distances de migration de ces polypeptides à celles d'un mélange de protéines de masse moléculaire connue permet la détermination de la masse moléculaire des polypeptides d'intérêt.

Les protéines lyophilisées sont solubilisées et dénaturées dans un tampon d'échantillon (Tris-HCl 60 mM pH 6,8 ; glycérol 5% ; SDS 0,4% ;  $\beta$ -mercapto-éthanol 0,02% ; bleu de bromophénol 0,1%). La séparation des polypeptides est effectuée sur un gel de séparation à 12,5% ou 15% de polyacrylamide. Ce dernier est surmonté d'un gel de concentration à 3%, permettant aux polypeptides de se concentrer. Après séparation, les bandes polypeptidiques sont révélées soit par une solution de bleu de Coomassie (bleu de Coomassie R 250 0,1% ; méthanol 50% ; acide acétique 10%), soit par coloration à l'argent selon la méthode de Wray *et al.* (1981).

## 3. Electrophorèse bidimensionnelle

Une électrofocalisation suivie d'une électrophorèse de type SDS-PAGE permet de séparer les polypeptides en fonction de leur point isoélectrique (pI) dans une première dimension puis de leur masse moléculaire dans une deuxième.

Des boudins de première dimension précoulés (pH linéaire 4-7, Amersham Biosciences) sont réhydratés dans 260  $\mu$ l de tampon urée 8 M, CHAPS 2%, DTT 20 mM, IPG buffer pH 4-7 2% (v/v) ; bleu de bromophénol. Les protéines de la fraction soluble (60  $\mu$ g par gel), solubilisées dans un tampon urée 9,5 M, CHAPS 2%, Triton X-100 0,5%, DTT 0,1 M, IPG buffer pH 4-7 2% (v/v), sont déposées à l'extrémité du gel de première dimension du côté cathodique. L'électrofocalisation est conduite à 20°C sous une tension de 150 V pendant 3 heures puis, accrue graduellement de 300 à 3500 V pendant 5 heures et finalement stabilisée à 3500 V pendant 12 heures. Après électrofocalisation, les gels de première dimension sont soit stockés à -80°C soit immédiatement équilibrés dans un tampon urée 6 M, glycérol 30%, SDS

2%, DTT 1%, iodoacétamide 5%, bleu de bromophénol (Görg *et al.*, 1987) puis déposés à la surface d'un gel d'acrylamide 12% de seconde dimension. L'électrophorèse de deuxième dimension (SDS-PAGE) est réalisée à 10°C pendant une heure à 35 V puis à 40 mA par gel jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel. Après migration, les gels obtenus sont soit colorés au bleu de Coomassie colloïdal (Neuhoff *et al.*, 1988), soit transférés.

#### 4. Transfert liquide des protéines (western blotting)

Les protéines sont électrotransférées du gel de polyacrylamide sur une membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF) suivant le principe de Towbin *et al.* (1979) modifié par Matsudaira (1987). Les protéines chargées négativement et soumises à un champ électrique migrent de la cathode vers l'anode, c'est-à-dire du gel vers la membrane.

Le gel d'électrophorèse est équilibré 15 min. dans le tampon de transfert (acide 3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonique (CAPS) 10mM ; méthanol 10 % pH 11,0). Une membrane de PVDF (Immobilon<sup>TM</sup>-P, Millipore ou ProBlott<sup>TM</sup>, Applied Biosystems) est découpée à la taille du gel et immergée quelques secondes dans du méthanol pur. Après rinçage dans le tampon de transfert, elle est mise au contact du gel et le transfert est conduit de 45 min. à 1 heure (selon la concentration du gel en acrylamide) à 100 V. A l'issue du transfert, la membrane est abondamment rincée à l'eau ultra-pure, séchée et conservée à -20°C.

#### 5. Immunodétection

Afin d'éviter la fixation aspécifique des anticorps, la membrane est incubée dans un tampon de saturation (Tris-HCl 10 mM pH 7,5 ; NaCl 0,9% ; Tween-20 0,05% ; lait écrémé 5%) pendant 16 heures. La membrane, après un rinçage abondant par du tampon TBS-T (Tris-HCl 10 mM pH 7,5 ; NaCl 0,9% ; Tween-20 0,05%), est incubée en présence de l'anticorps primaire (Ig G de souris anti-résidu histidine dilué au 1/3000<sup>e</sup>, Pharmacia, ou sérum de lapin dilué à différentes concentrations) dans du TBS-T contenant 10% de tampon de saturation pendant 45 min. à température ambiante. Après 4 rinçages dans du TBS-T, la membrane est incubée pendant 45 min. avec un anticorps secondaire (Ig G de lapin anti-Ig de souris dilué au 1/1000<sup>e</sup>, DAKO, ou Ig G de chèvre anti-Ig G de lapin dilué au 1/30000<sup>e</sup>, Sigma), couplé à la phosphatase alcaline, dans du TBS-T contenant 5% de tampon de saturation. Après 5 rinçages au TBS-T et un rinçage au TBS (Tris-HCl 10 mM pH 7,5 ; NaCl 0,9%), l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline est révélée par une solution de Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, BCIP 0,3 mg/ml et NBT 0,15 mg/ml. Après révélation, la

membrane est rincée au TBS puis plongée dans une solution d'arrêt (Tris-HCl 20 mM pH 2,9 ; EDTA 1 mM). Un témoin sans anticorps primaire ainsi qu'un témoin utilisant à la place de l'anticorps primaire un sérum préimmun non dilué sont réalisés.

## 6. Mise en évidence de calciprotéines

### 6.1. Marquage des calciprotéines au calcium 45 et autoradiographie (Maruyama *et al.*, 1984)

Après transfert, la membrane de PVDF est incubée 3 x 20 min. dans un tampon imidazole-HCl 10 mM, pH 6,8, KCl 60 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM (permettant de saturer de cations bivalents les sites de fixation non spécifiques du calcium) puis 10 min. dans le même tampon supplémenté de calcium 45 (37 MBq/l soit 1,36 10<sup>-3</sup> mM). Elle est ensuite rincée à l'éthanol 50% (3 x 5 min.) et séchée à l'air. Elle est alors soumise à une autoradiographie. La révélation est faite 3 à 7 jours plus tard.

### 6.2. Coloration des calciprotéines au "Stains-all" (Campbell *et al.*, 1983)

Après migration des protéines d'intérêt sur gel d'acrylamide, celles-ci sont fixées par une solution d'isopropanol 25% pendant 16 heures. Les protéines sont ensuite colorées, à l'abri de la lumière, au "Stains-all" (Stains-all 0,0025%, isopropanol 25%, formamide 7,5%, Tris-base 30 mM pH 8,8) pendant 48 heures.

## 7. Précipitation *in vitro* du carbonate de calcium (CaCO<sub>3</sub>)

### 7.1. Purification de la protéine Orchestine (Boyle *et al.*, 1991)

Après séparation par électrophorèse dénaturante (SDS-PAGE) des protéines de la fraction soluble, la bande polypeptidique correspondant à Orchestine est excisée du gel, découpée en petits morceaux puis broyée dans 1 ml d'une solution fraîchement préparée de bicarbonate d'ammonium 50 mM, β-mercapto-éthanol 2%, SDS 0,1%. La solution obtenue est alors mélangée vigoureusement, placée 2 min. à 95°C puis 30 min. à 37°C et enfin centrifugée 5 min. à 3000 g. Le surnageant obtenu est conservé et le culot dissous dans le même tampon. L'extraction est répétée 3 fois dans les mêmes conditions. Après extraction, les différents surnageants sont collectés puis diafiltrés contre de l'eau ultra-pure sur filtre Nanosep<sup>TM</sup> 10K (Pall Filtron Corporation) afin de concentrer la protéine et d'éliminer les dernières traces de SDS et de β-mercapto-éthanol.



## 7.2. Précipitation *in vitro*

La précipitation du carbonate de calcium est réalisée par la diffusion lente de vapeur de carbonate d'ammonium dans une solution de chlorure de calcium (Addadi et Weiner, 1985). Le système utilisé est composé d'une boîte de Pétri, de 50 mm de diamètre contenant 5 ml de carbonate d'ammonium 25 mM, surmontée d'une plaque de culture cellulaire de 60 puits d'une contenance de 20 µl (NUNC ) contenant 20 µl d'une solution de chlorure de calcium 25 mM dans laquelle est diluée la protéine Orchestine. Le passage des vapeurs de carbonate d'ammonium entre les deux enceintes hermétiquement fermées se fait par des orifices préalablement percés. La réaction est conduite 24 heures à 20°C puis les cristaux obtenus sont lavés à l'eau ultra pure, déposés sur des plots, recouverts par une fine pellicule de carbone puis observés au microscope électronique à balayage (JEOL 6400F).

## 8. Recherche de phosphoprotéines

Un lot de 20 animaux au stade D1<sup>'''</sup> a reçu une première injection de [ <sup>32</sup>P]ATP ou de <sup>32</sup>Pi (74 kBq/animal, 185 TBq/mmol, NEN), suivie d'une seconde trois jours plus tard. Après exuviation des animaux, les cæcums sont prélevés puis la fraction soluble des concrétions est extraite. Les polypeptides de la fraction soluble sont séparés par électrophorèse SDS-PAGE et transférés sur membrane de PVDF. Après transfert, la membrane est autoradiographiée une nuit.

## 9. Etude des phosphorylations portées par Orchestine

### 9.1. Hydrolyse acide des protéines

L'hydrolyse acide est réalisée à partir de la fraction soluble totale. Environ 15 µg de protéines marquées radioactivement au <sup>32</sup>P sont hydrolysés en présence de 200 µl d'HCl 6N pendant 1h30 à 110°C (Cooper *et al.*, 1983) sous une atmosphère inerte de diazote afin d'éviter une oxydation des produits radioactifs pendant l'incubation. Cette opération permet de libérer les acides aminés parmi lesquels certains sont potentiellement phosphorylés. Après incubation en milieu acide, les protéines hydrolysées sont lyophilisées puis conservées à -20°C jusqu'à emploi.

### 9.2. Séparation des produits de l'hydrolyse acide par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince

Les protéines hydrolysées obtenues précédemment sont solubilisées dans 10 µl d'HCl 0,1 N puis déposées goutte à goutte (d'environ 0,25 µl) avec séchage entre chaque dépôt, sur

une plaque de chromatographie composée d'une plaque de verre recouverte d'une phase stationnaire de silice de 250 µm d'épaisseur (Merck). La migration bidimensionnelle des acides aminés déposés sur la plaque s'effectue dans une cuve de développement close saturée en solvants (Muños et Marshall, 1990). La chromatographie de première dimension est effectuée en présence de chloroforme/méthanol/ammoniaque 17% (2/2/1 : v/v/v) et la seconde en présence de n-butanol/acide acétique/eau (3/1/1 : v/v/v) (Randerath, 1964). Les substances déposées sur la phase stationnaire de silice sont alors entraînées à des vitesses différentes. La séparation ainsi obtenue peut être provoquée par des phénomènes d'adsorption, de partage ou d'échange d'ions, ou encore par une combinaison de ces différentes possibilités. Après migration, la plaque de chromatographie est séchée puis soumise à une autoradiographie pendant 16 heures.

Il est également à noter qu'une plaque témoin sur laquelle est déposée une solution contenant les acides aminés sérine, thréonine et tyrosine phosphorylées est réalisée en parallèle. Après séparation, les acides aminés phosphorylés témoins sont révélés par une pulvérisation de ninhydrine 0,2% dans de l'alcool absolu (Sigma) puis la plaque chromatographique est placée à 60°C jusqu'au développement de la coloration.

### 9.3. Déphosphorylation des protéines de la fraction soluble des concrétions calcaires

La déphosphorylation complète d'Orchestine est réalisée sur la totalité des protéines constituant la fraction soluble par la phosphatase du phage Lambda (Biolabs Inc.). 400 unités d'enzyme sont incubées 1h30 à 30°C avec 15 µg de protéines en présence de Tris-HCl 50 mM pH 7,5, Na<sub>2</sub>EDTA 0,1 mM, DTT 5 mM, Brij 35 0,01% et MnCl<sub>2</sub> 2 mM dans un volume final de 20 µl.

La déphosphorylation spécifique des sérines et des thréonines est réalisée avec la phosphatase 1 (PP1, Protein Phosphatase 1, protéine phosphatase 1 extraite du muscle squelettique de lapin ; Biolabs Inc.) dans les mêmes conditions que celles utilisées dans la réaction avec la phosphatase du phage lambda mais à une concentration de 2.5 unités/réaction. La déphosphorylation spécifique des tyrosines est conduite avec une tyrosine phosphatase extraite de levure (YOP-PTP, YOP Protein Tyrosine Phosphatase, produit du gène *Yop51* de *Yersinia enterocolitica* ; Biolabs Inc.) à 50 unités/réaction ou une tyrosine phosphatase transmembranaire de leukocyte (LAR-PTP, transmembrane Leukocyte Antigen Related-Protein Tyrosine Phosphatase ; Biolabs Inc.) à 5 unités/réaction ou par une tyrosine phosphatase extraite des cellules T humaines (TC-PTP, T-Cell Protein Tyrosine Phosphatase

; Biolabs Inc) à 10 unités/réaction dans un tampon de réaction Tris-HCl 50 mM pH 7,0, NaCl 100 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 2 mM, DTT 5 mM, Brij 35 0,01% et BSA 1 mg/ml.

Des traitements effectués avec PP1 puis avec une des 3 tyrosine-phosphatases (YOP, LAR ou TC-PTP) ont été également réalisés.

#### 9.4. Clivage enzymatique à partir de l'extrémité C-terminale des protéines de la fraction soluble

La dégradation enzymatique de la partie N-terminale de la protéine Orchestine est réalisée directement à partir de la fraction soluble par une peptidyl-L-lysine[L-arginine] hydrolase, la carboxypeptidase B. Environ 30 µg de protéines sont incubés dans un volume de 16 µl en présence de 0,4 µg (0,07 unités) de carboxypeptidase B (sigma). Après 2 min. 30 à 20 min. d'incubation, la réaction est arrêtée par l'ajout de Na<sub>2</sub>EDTA 0,5 mg/ml, de bestatine 40 µg/ml et de tampon d'échantillon (Tris-HCl 12 mM pH 6,8 ; glycérol 10% ; SDS 0,4% ; β-mercapto-éthanol 2,88 mM ; bleu de bromophénol 0,02%) et par chauffage pendant 10 min. à 95°C. Les 25 µl d'hydrolysats obtenus sont ensuite analysés par électrophorèse de type SDS-PAGE.

### **C. Méthodes relatives à la microscopie: localisation de la protéine Orchestine chez *Orchestia cavimana***

#### 1. Production des anticorps polyclonaux: immunisation de lapins

La production d'anticorps polyclonaux de lapin a été réalisée par la société Eurogentec (Belgique). Le programme d'immunisation comprend 4 injections de 100 µg de protéine recombinante sur 56 jours. L'antigène est émulsifié dans de l'adjuvant complet de Freund pour la première immunisation et dans de l'adjuvant incomplet pour les autres. Des prélèvements sanguins sont réalisés avant l'injection (sérum préimmun) et aux 38<sup>e</sup> et 66<sup>e</sup> jours après la première injection. L'animal est sacrifié 80 jours après la première injection. Le sang prélevé à la veine marginale de l'oreille est laissé à coaguler pendant 30 à 60 min. à 37°C, puis est conservé à 4°C pendant la nuit. Le caillot formé est éliminé après une centrifugation de 15 min. à 1000 g à 4°C. Le sérum est à nouveau centrifugé pour éliminer les dernières impuretés puis stocké à -20°C.

## 2. Microscopie photonique

### 2.1. Réalisation des coupes

Des cæcums postérieurs d'animaux de stade B, C, et D2 sont prélevés, immédiatement fixés dans une solution de cacodylate 0,08 M pH 7,4, glutaraldéhyde 3%, PFA 2% pendant 1 heure puis décalcifiés pendant 16 heures dans le même tampon complété par de l'EDTA 4%. Ils sont ensuite déshydratés par 3 bains d'éthanol de concentration croissante (50°, 75°, 95°) et inclus dans la paraffine (Martoja et Martoja-Pierson, 1967). Des coupes sériées de 5 µm d'épaisseur sont placées sur des lames préalablement gélatinées. Après séchage à l'étuve à 40°C, les coupes sont déparaffinées au toluène et réhydratées par des bains d'alcool de concentration décroissante (95°, 75°, 50°) puis d'eau bidistillée.

### 2.2. Révélation des coupes

L'activité des phosphatases endogènes est inhibée par incubation des coupes dans une solution d'acide acétique 15% pendant 10 min. Après un rinçage à l'eau bidistillée, les coupes sont saturées par du tampon TBS-T/BSA (Tris-HCl 10 mM pH 7,5 ; NaCl 0,9% ; Tween-20 0,05% ; BSA 3%) pendant une nuit à 4°C en chambre humide. Le protocole de révélation des coupes est identique à celui utilisé lors de la révélation des membranes (western blots). Les dilutions d'anticorps utilisées, réalisées dans du tampon TBS-T, BSA 3%, ont été de 1/750° pour l'anticorps primaire (anti-Orchestine de lapin) et de 1/250° pour l'anticorps secondaire (anti-Ig G de lapin, Sigma). Lors de la révélation, la coloration est visualisée au microscope et stoppée lorsque son intensité est jugée satisfaisante. Les coupes sont alors déshydratées à l'éthanol (50°, 75° puis 95°) puis au toluène et montées entre lame et lamelle au Merckoglas® (Merck). Un témoin sans anticorps primaire ainsi qu'un témoin effectué avec le sérum préimmun dilué au 1/750° sont réalisés.

## 3. Microscopie électronique

### 3.1. Réalisation des coupes

Après dissection, des cæcums postérieurs extraits d'animaux de stade B, C, D1" et D2 sont fixés dans une solution de cacodylate de sodium 0,08 M pH 7,4, glutaraldéhyde 3%, PFA 2% jusqu'à décalcification naturelle complète.

Après déshydratation partielle dans du DMF (50, 70 puis 90%), les pièces sont incubées dans du Lowicryl K4M, DMF 1/2 (v/v) puis 1/1 (v/v) puis dans du Lowicryl K4M pur. L'inclusion est réalisée en capsule BEEM par polymérisation de la résine K4M aux U.V.

(280 nm) pendant 1 heure à 4°C. Des coupes sériées de 200 à 300 nm d'épaisseur sont placées sur des grilles de nickel préalablement collodionnée.

### 3.2. Révélation des coupes

Le protocole utilisé pour la révélation des coupes est le même que celui utilisé pour la révélation des coupes pour la microscope photonique. L'anticorps primaire de lapin anti-Orchestine est utilisé au 1/25<sup>e</sup> et l'anticorps secondaire de chèvre anti-lapin couplé à l'or colloïdal (15 nm, BBI) est dilué au 1/50<sup>e</sup>. Après incubation, les grilles sont rincées à l'eau puis les coupes sont contrastées par une solution d'éthanol 50% saturée en acétate d'uranyle. Les observations sont réalisées avec un microscope électronique à transmission Hitachi H-600.

## *Chapitre III*

### *Résultats et Discussion*

*Première partie:*

*Production d'un anticorps polyclonal  
spécifique d'Orchestine*

# Production d'un anticorps polyclonal spécifique d'Orchestine

Au cours de cette première partie, nous nous sommes attachés à produire une protéine recombinante relative à Orchestine à l'aide d'un système d'expression procaryote (*E. coli*). Après expression et purification, cette protéine recombinante a été utilisée pour la production d'un anticorps polyclonal spécifique d'Orchestine.

## I - Résultats

### A. Détermination du nombre de copies du gène *orchestine*

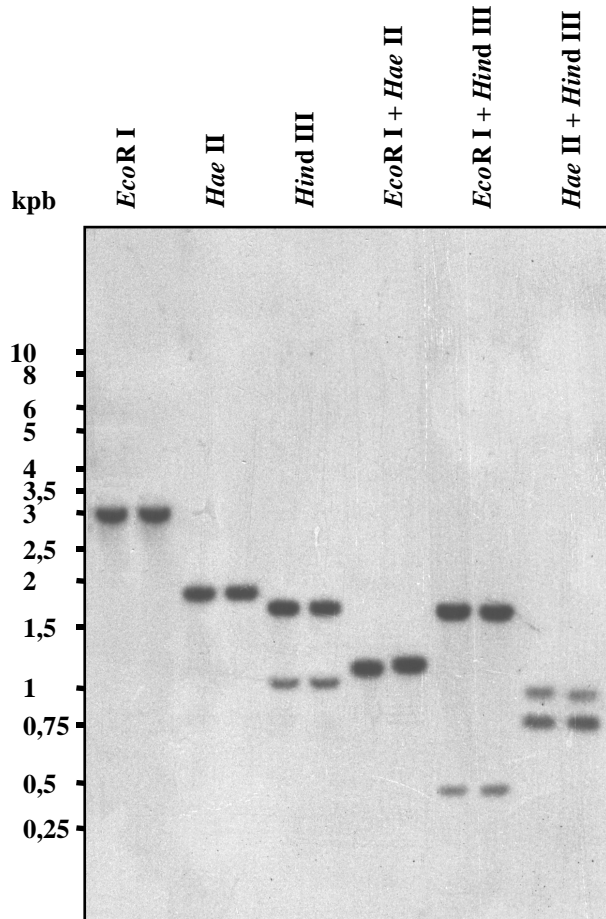
Des résultats précédents (Testenièrre, 1998) ont montré que le gène codant Orchestine est constitué de deux exons de 531 pb et 486 pb et d'un intron unique de 264 pb. Ce gène possède un cadre de lecture ouvert de 384 pb flanqué par un UTR-5' de 101 pb et un UTR-3' de 530 pb. Si le gène possède une boîte TATA à 33 pb en amont du site d'initiation de la transcription, aucune boîte GC ou CATT n'a été mise en évidence.

L'ADN génomique, extrait indépendamment de 2 animaux, a été digéré par une ou deux endonucléases de restriction (voir p. 32). Les fragments obtenus ont été transférés sur membrane de nylon puis hybridés avec une sonde ADNg (*Hae* II-*Eco*R I) marquée au <sup>32</sup>P (fig. n° 14 A). L'analyse du Southern blot ainsi obtenu a permis d'établir une carte de restriction et une seule pour ce gène (fig. n° 14 C). L'hypothèse la plus vraisemblable est que le génome d'*O. cavimana* ne contienne qu'une seule copie du gène *orchestine*. La faiblesse des signaux obtenus pour les fragments se situant dans la partie 3' du gène est peut-être due à une activité spécifique plus faible de la sonde pour ces fragments ou à une hybridation moins efficace au niveau de cette région non codante riche en adénosine et thymidine.

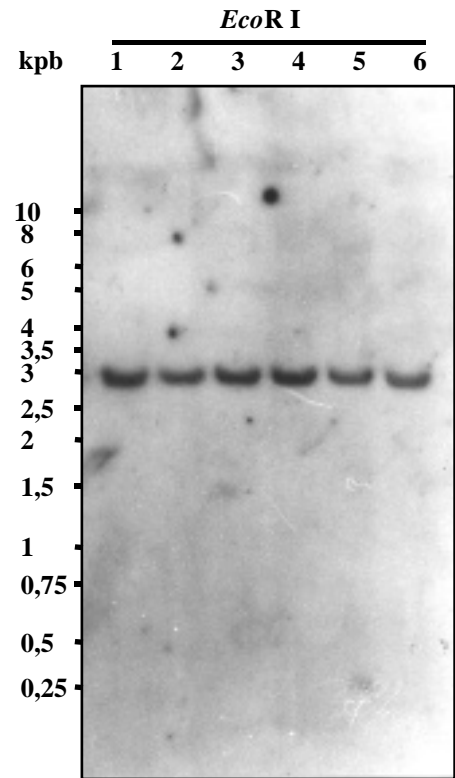
De même, une analyse du Southern blot obtenu après digestion par *Eco*R I de l'ADN génomique extrait indépendamment de 6 animaux a permis de montrer que le profil de restriction obtenu est identique entre chaque individu (fig. n° 14 B). Il montre en effet un



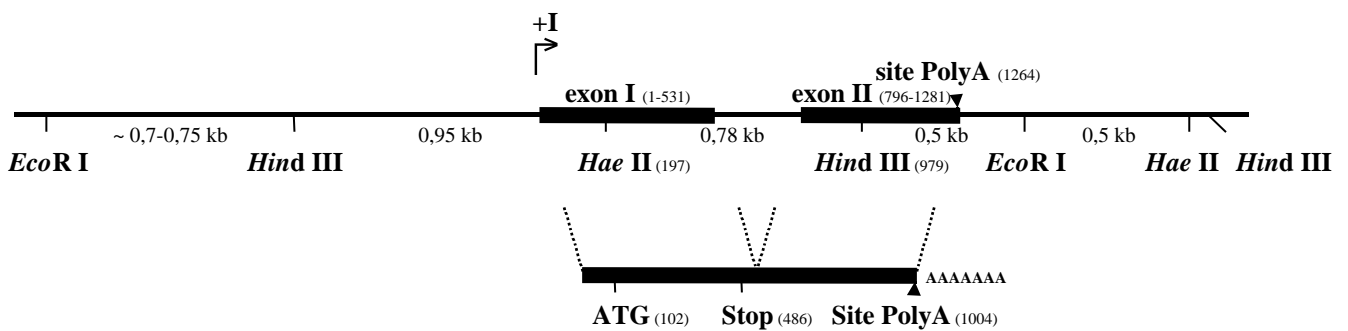
A.



B.



C.



**Figure n° 14:** Analyse du nombre de copies et étude du polymorphisme du gène *orchestine* par Southern blotting/hybridation.

**A.** Hybridation, par la sonde *HaeII-EcoRI*, des fragments d'ADN génomique obtenus après simple et double digestion (chaque digestion est réalisée avec de l'ADN génomique extrait indépendamment de 2 animaux).

**B.** Hybridation, par la sonde *HaeII-EcoRI*, des fragments d'ADN génomique extraits indépendamment de 6 animaux adultes après digestion par *EcoRI* (Testenière, 1998).

**C.** Carte de restriction de la région génomique contenant le gène *orchestine* et structure du transcrit mature d'*orchestine*.

fragment unique de 2,8 kb chez chaque individu. Il s'avère donc que le gène *orchestine* ne présente pas de polymorphisme.

## **B. Production d'une protéine recombinante relative à Orchestine**

### 1. Sous-clonage

#### 1.1 Stratégie de sous-clonage

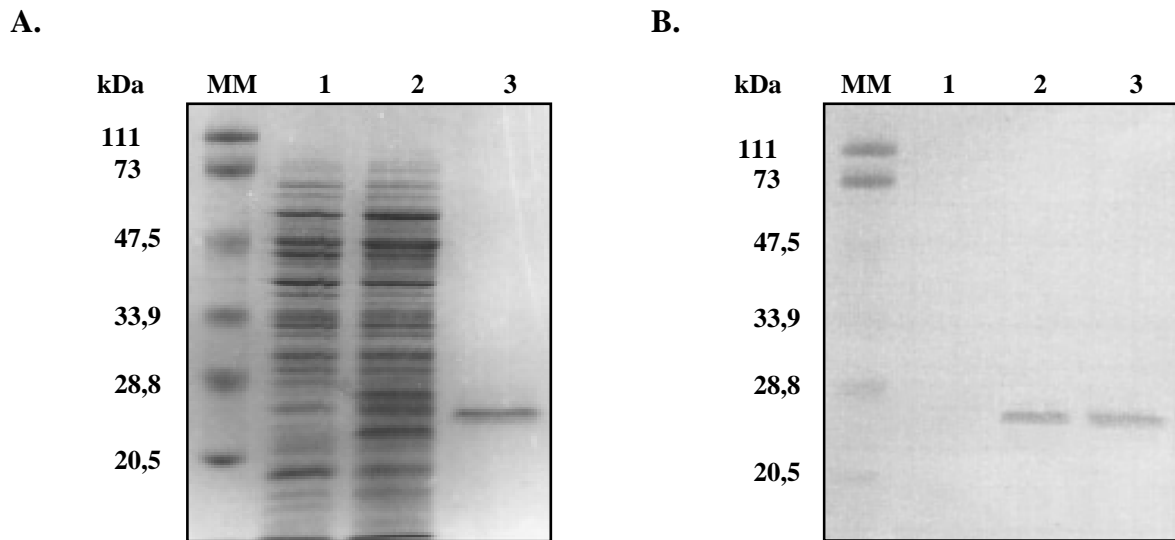
A partir d'un fragment de restriction de 2,5 kb contenant le gène *orchestine* complet, cloné dans le vecteur pBS (clone 23G ; Testenière, 1998), un fragment de 340 pb contenant la séquence codante du gène (dépourvue de la séquence signal) a été amplifié par PCR en utilisant les amorces spécifiques Sc01 et Sc02. Cette amplification a permis d'insérer des sites de restriction compatibles avec les sites du vecteur d'expression pQE-30. Le fragment amplifié finalement obtenu, de 355 pb, possédant un site *BamH* I et un site *Pst* I en 3' a été directement sous-cloné dans le vecteur T-extension pGEM-T. Le choix de deux sites de restriction différents (*BamH* I et *Pst* I) permet un sous-clonage dirigé et évite la circularisation du vecteur en absence d'insert pendant l'étape de ligature. Après préparation de l'insert par les enzymes de restriction *BamH* I et *Pst* I, celui-ci peut être ligaturé dans le plasmide d'expression pQE-30 (voir p. 35).

#### 1.2. Sélection des clones recombinants et séquençage

Après transformation des bactéries *E. coli* M15 [pREP-4] compétentes par le plasmide pQE-30 contenant l'insert puis sélection sur milieu gélosé en présence d'ampicilline et de kanamycine, une dizaine de clones a été prélevée et analysée par restriction. Pour ce faire, nous avons extrait et digéré les plasmides des colonies prélevées par *BamH* I seul, par *Pst* I seul puis par *BamH* I et *Pst* I. Les résultats ainsi obtenus ont permis de mettre en évidence 9 clones sur 10 possédant l'insert. L'un des clones nommé pQE-30 [Orchestine] a été choisi pour une analyse plus approfondie en vue du séquençage afin de vérifier que le cadre de lecture de la séquence est en phase et que l'insert ne possède aucune mutation qui aurait pu survenir au cours de l'étape d'amplification par PCR.

### 2. Expression et purification de la protéine

L'expression de la protéine recombinante a été réalisée à partir du clone recombinant pQE-30 [Orchestine], dans des conditions standard, par l'apport d'IPTG (1 mM) dans le milieu

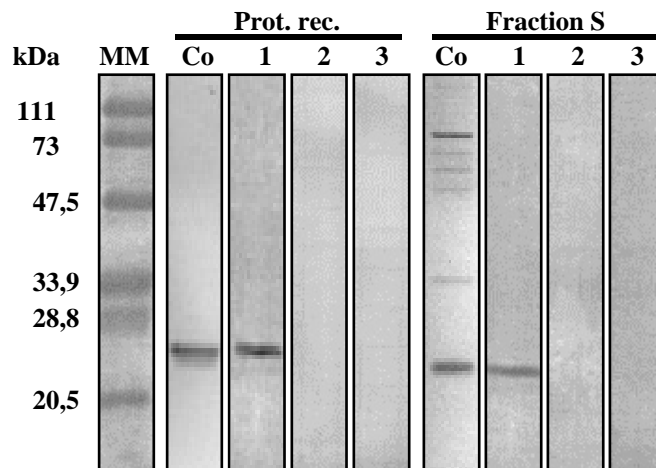


**Figure n° 15:** Analyse de l'expression du clone pQE-30 [Orchestine] par SDS-PAGE 12%.

**A.** Coloration au bleu de Coomassie.

**B.** Immunorévélation, après transfert, par l'anticorps anti-Histidine.

**1-** extrait protéique bactérien où l'expression de la protéine recombinante n'a pas été induite ; **2-** extrait protéique bactérien où l'expression de la protéine a été induite pendant 4 h ; **3-** fraction d'élution à pH 4,5. **MM:** marqueurs de masse moléculaire.



**Figure n° 16:** Contrôle de la spécificité de l'anticorps polyclonal anti-Orchestine.

Etude de la spécificité de l'anticorps sur la protéine recombinante extraite du clone pQE-30 [Orchestine] et sur la fraction soluble de la matrice des concrétions calcaires.

**Co:** gel coloré au bleu de Coomassie. Western blots révélés par **(1)** l'anticorps anti-Orchestine dilué au 1/500, **(2)** par le sérum préimmun pur et **(3)** par l'anticorps secondaire seul. **MM:** marqueurs de masse moléculaire.

de culture. Après 4 heures d'expression, le milieu de culture est éliminé par centrifugation et la protéine recombinante purifiée sur colonne Ni-NTA après lyse des bactéries et extraction des protéines totales bactériennes (voir p. 38).

Le profil électrophorétique obtenu (fig. n° 15 A) montre une bande majoritaire d'une masse apparente d'environ 25 kDa présente dans l'extrait protéique bactérien où l'expression de la protéine recombinante a été induite mais absente du profil où l'expression de la protéine recombinante n'a pas été induite. De plus, cette protéine est également reconnue par l'anticorps anti-histidine en immunoblotting (fig. n° 15 B) et montre ainsi que la protéine produite correspond à la protéine recombinante fusionnée avec une queue histidine.

### **C. Production d'anticorps polyclonaux spécifiques d'Orchestine**

#### 1. Purification de l'antigène et immunisation

Afin de produire un anticorps polyclonal dirigé contre Orchestine, nous avons purifié sur colonne d'affinité la protéine recombinante relative à Orchestine. La production des sérums immuns a été réalisée chez un lapin par 4 injections d'environ 100 µg de protéine recombinante purifiée (voir p. 45).

#### 2. Contrôle de la spécificité de l'anticorps polyclonal anti-Orchestine

Le western blotting permet notamment de visualiser une réaction antigène-anticorps et donc de tester la spécificité de reconnaissance des anticorps utilisés (voir p. 41). C'est pourquoi la protéine recombinante ainsi que la fraction soluble de la matrice des concrétions calcaires ont été séparées sur gel d'électrophorèse en condition dénaturante, transférées sur membrane de nitrocellulose puis révélées par l'anticorps polyclonal anti-Orchestine produit à partir de la protéine recombinante. Les résultats obtenus (fig. n° 16) avec les divers extraits protéiques testés montrent que l'anticorps polyclonal reconnaît normalement la protéine recombinante relative à Orchestine (de 25 kDa) mais aussi la protéine Orchestine native (de 23 kDa) issue de la fraction soluble de la matrice des concrétions calcaires et uniquement cette protéine.

## II - Discussion

Après avoir vérifié que le gène susceptible de coder Orchestine n'était présent qu'en un seul exemplaire dans le génome d'*O. cavimana*, nous nous sommes proposés de produire une protéine recombinante relative à ce gène dans un système d'expression procaryote (*E. coli*). La protéine native étant difficile à obtenir en quantité importante, la protéine recombinante nous permettait, entre autres, de produire un anticorps polyclonal dirigé contre cette protéine.

Ces deux types de molécules, anticorps et protéine recombinante, nous ont permis tout d'abord d'établir la correspondance entre le gène séquencé et la protéine Orchestine. En effet, la masse moléculaire du polypeptide déduite de la séquence de l'ADNc supposé coder cette protéine avait été évaluée à 12,4 kDa (Testenière, 1998) ce qui est approximativement la moitié de celle d'Orchestine qui est de 23 kDa en électrophorèse dénaturante. Deux hypothèses pour expliquer cette divergence avaient alors été avancées par Testenière (1998).

L'une de ces deux hypothèses reposait sur l'existence possible d'une dimérisation. Cependant, les profils obtenus en électrophorèses mono- et bidimensionnelle des polypeptides de la fraction soluble de la matrice des concrétions calcaires n'ont jamais révélé un polypeptide de masse moléculaire inférieure à 23 kDa. De plus un traitement à l'urée 8M suivi d'un chauffage ou un traitement par un agent réducteur n'affecte pas la mobilité électrophorétique d'Orchestine, ce qui est en accord avec l'absence de cystéine dans sa séquence et donc de ponts disulfures. D'autres liaisons covalentes telle la liaison histidino-alanine, comme c'est le cas de certaines protéines extraites de la coquille de bivalves (Sass et Marsh, 1983 ; Marsh, 1986), pourraient être également impliquées dans une dimérisation par liaison covalente. Cependant Orchestine ne possède pas de résidus histidine.

L'autre hypothèse envisageait la richesse en acides aminés acides et en groupements phosphates de cette protéine lui conférant une mobilité électrophorétique particulière. En effet, certaines protéines acides peuvent lier du SDS de façon atypique et provoquer une diminution de la mobilité électrophorétique (Duncker et Rueckert, 1969 ; Geisler *et al.*, 1984 ; Wang et Chait, 1994 ; Kollberg *et al.*, 1995). Par conséquent, la masse apparente observée en SDS-PAGE de ces protéines, du fait d'un déficit de liaison au SDS (Duncker et Rueckert, 1969) et de leurs caractéristiques physico-chimiques intrinsèques particulières, est surestimée et peut atteindre et parfois même dépasser les 100% (Beavis *et al.*, 1992 ; Chait et Kent, 1992). De même, les modifications post-traductionnelles, telles les glycosylations et/ou les

phosphorylations peuvent modifier le comportement électrophorétique des protéines (Weber *et al.*, 1972). Des protéines cuticulaires d'insectes, par exemple, sont connues pour présenter fréquemment des divergences de masses pouvant avoisiner les 30 à 40% (Andersen *et al.*, 1995 ; Kollberg *et al.*, 1995). La Nacréine, une des protéines constituant la matrice organique des perles d'huître, possède cette particularité. En effet, la masse apparente de cette protéine en SDS-PAGE est de 60 kDa alors que la masse déduite de sa séquence primaire est de 48 kDa (Miyamoto *et al.*, 1996). Un autre exemple est celui de la protéine GAMP (Gastrolith Matrix Protein), une protéine acide extraite de la matrice organique des gastrolithes, qui possède une masse électrophorétique apparente de 94 kDa contre seulement 50,5 kDa en spectrométrie de masse (Ishii *et al.*, 1998).

La protéine recombinante migrant à 25 kDa de masse théorique 13,8 kDa et l'anticorps produit contre cette protéine reconnaissant la protéine native de 23 kDa (et elle seule), nous pouvons en conclure que le gène codant la protéine de 12,4 kDa et séquencé par O. Testenièrre (1998) est bien le gène correspondant à la protéine extraite de la matrice des concrétions et dont la masse apparente en SDS-PAGE est de 23 kDa. La présence de la queue histidine n'est pas suffisante pour expliquer la différence de masse moléculaire (entre 23 et 25 kDa) qui est alors attribuable à la présence de modifications post-traductionnelles (phosphorylations et glycosylations notamment) dont la protéine recombinante est dépourvue.

L'une des deux hypothèses émises par Testenièrre (1998) envisageant la dimérisation par liaison covalente pour expliquer la divergence de masses moléculaires observée (12,4 kDa pour 23 kDa) est donc désormais à écarter au profit de l'autre hypothèse évoquant la richesse en acides aminés acides et en groupements phosphates de cette protéine lui conférant une mobilité électrophorétique particulière. Il en résulte donc, d'après ces résultats, que le polypeptide (Orchestine) migrant à 23 kDa en SDS-PAGE est clairement codé par le gène codant une protéine de masse théorique de 12,4 kDa. Nous pouvons désormais affirmer que le gène séquencé par Testenièrre (1998) est bien le gène codant la protéine Orchestine migrant à 23 kDa. Ce gène, dont nous avons établi la carte de restriction, peut donc être appelé sans ambiguïté *orchestine*.

*Deuxième partie:*

*Etude de la fonction d'Orchestre*

# Etude de la fonction d'Orchestine

La seconde partie du travail a porté sur l'étude de la fonction d'Orchestine. Nous avons pour cela commencé par produire une protéine recombinante dans laquelle nous avons introduit un site de clivage permettant d'éliminer la queue histidine (utile à la purification) et d'obtenir une protéine comparable à Orchestine à la seule exception des modifications post-traductionnelles. Nous avons alors recherché, chez Orchestine, la présence d'éventuelles modifications post-traductionnelles et notamment les phosphorylations et avons étudié les éventuelles relations pouvant exister entre phosphorylations et activité de fixation du calcium dans une étude comparative utilisant la nouvelle protéine recombinante produite.

## I - Résultats

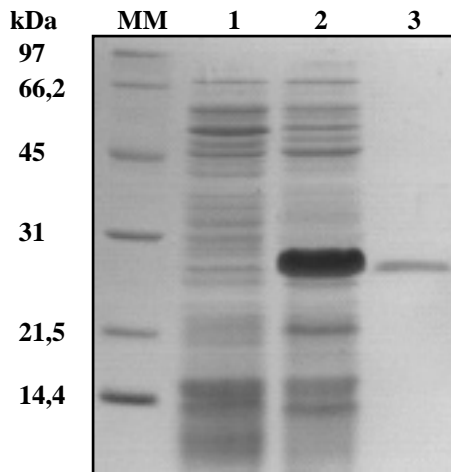
### A. Production d'une protéine recombinante relative à Orchestine

#### 1. Sous-clonage

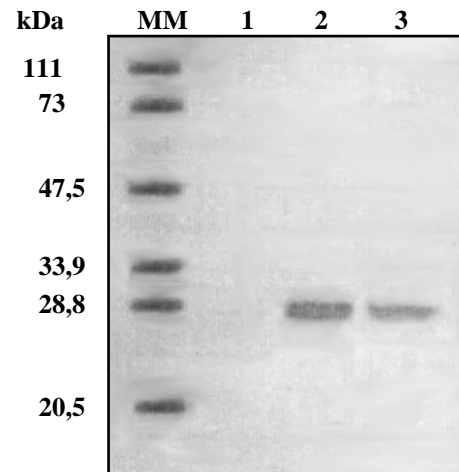
A partir d'un fragment de restriction de 2,5 kb contenant le gène *orchestine* complet, cloné dans le vecteur pBS (clone 23G ; Testenière, 1998), un fragment de 340 pb contenant la séquence codante du gène (dépourvue de la séquence signal) a été amplifié par PCR comme précédemment (cf. première partie) mais en utilisant les amorces spécifiques Sc01bis et Sc02. Cette amplification a permis d'insérer des sites de restriction compatibles avec les sites du vecteur d'expression pQE-30. Le fragment amplifié finalement obtenu, de 370 pb, possédant un site *BamH* I ainsi qu'une séquence codant un site spécifique  $(Asp)_4Lys$  reconnu par l'entérokinase bovine en 5' et un site *Pst* I en 3' a été directement sous-cloné dans le vecteur T-extension pGEM-T. L'originalité dans ce sous-clonage est l'introduction d'un site codant une séquence reconnue par l'entérokinase. Ceci permettra, après expression et purification de la protéine recombinante, de cliver sa queue histidine et d'obtenir ainsi une protéine recombinante identique à la protéine native à l'exception des modifications post-traductionnelles. L'ADNc ainsi amplifié est digéré par les enzymes *BamH* I et *Pst* I puis ligaturé au plasmide d'expression pQE-30 préalablement digéré par les mêmes enzymes.



**A.**



**B.**

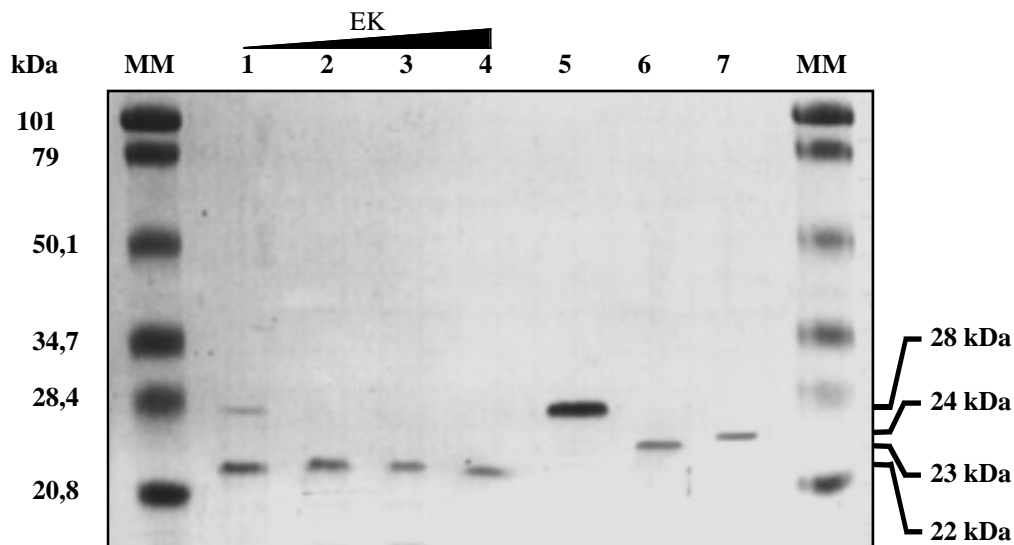


**Figure n° 17:** Analyse de l'expression du clone pQE-30 [(Asp)<sub>4</sub>Lys-Orchestine] par SDS-PAGE 12%.

**A.** Coloration au bleu de Coomassie.

**B.** Immunorévélation, après transfert, par l'anticorps anti-Histidine.

1- extrait protéique bactérien où l'expression de la protéine recombinante n'a pas été induite, 2- extrait protéique bactérien où l'expression de la protéine a été induite pendant 4 h, 3- fraction d'élution à pH 4,5. MM: marqueurs de masse moléculaire.



**Figure n° 18:** Analyse électrophorétique (SDS-PAGE) du clivage de la queue histidine portée par la protéine recombinante produite par le clone pQE-30 [(Asp)<sub>4</sub>Lys-Orchestine].

1-4- Clivage enzymatique de la protéine recombinante par l'entérokinase bovine (0,01 ; 0,02 ; 0,05 et 0,1 unité) ; 5- protéine recombinante purifiée ; 6- Orchestine native purifiée ; 7- Orchestine native déphosphorylée. MM: marqueurs de masse moléculaire. EK: entérokinase bovine.

Après transformation des bactéries *E. coli* M15 [pREP-4], les colonies recombinantes sont sélectionnées sur milieu gélosé en présence d'ampicilline et de kanamycine (voir p. 35).

### 2. Expression et purification de la protéine recombinante

L'expression de la protéine recombinante a été réalisée à partir du clone recombinant pQE-30 [(Asp)<sub>4</sub>Lys-Orchestine], dans des conditions standard, par l'apport d'IPTG (1 mM) dans le milieu de culture. Après 4 heures d'expression, le milieu de culture est éliminé par centrifugation et la protéine recombinante purifiée sur colonne Ni-NTA après lyse des bactéries et extraction des protéines totales bactériennes (voir p. 38).

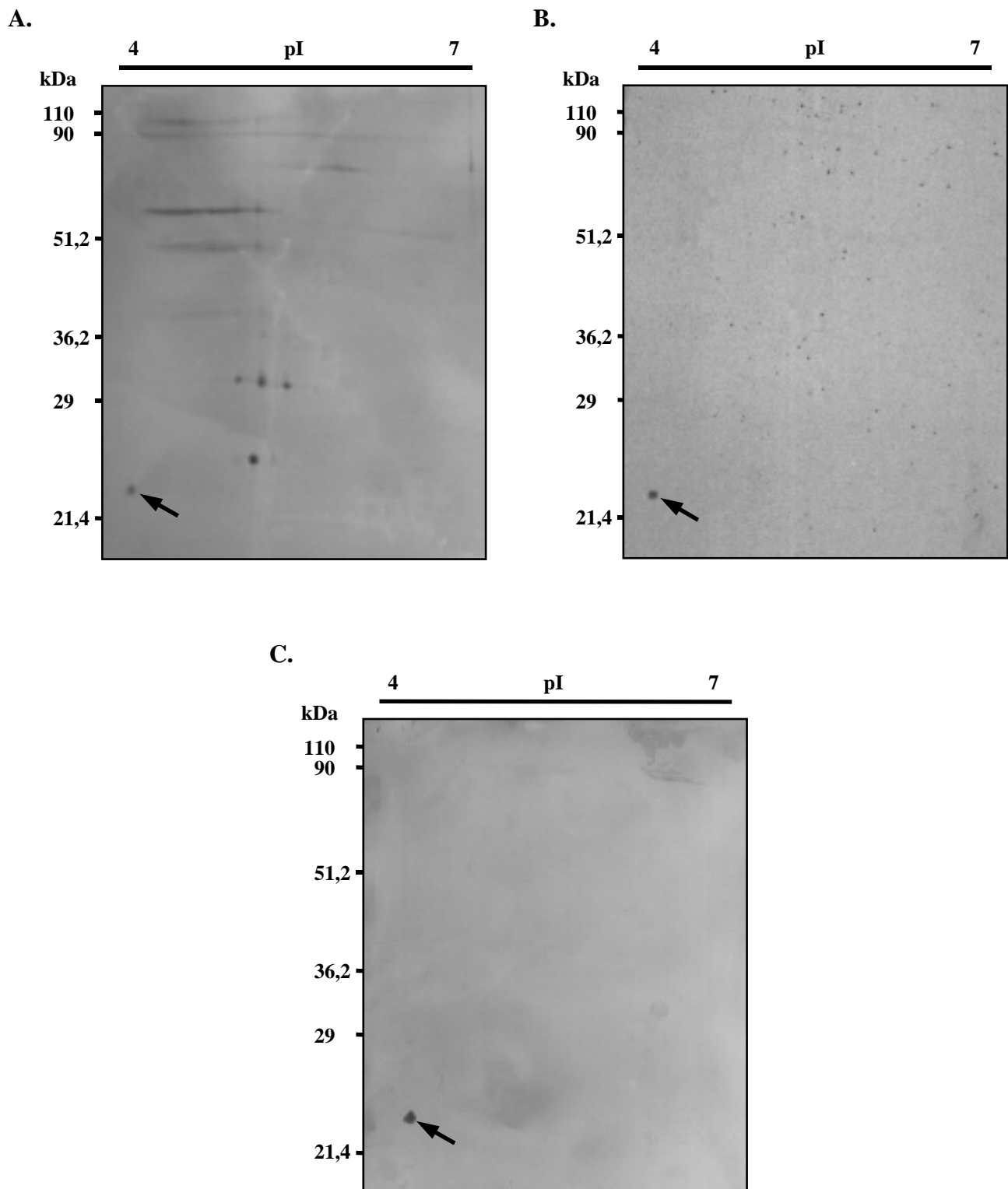
Le profil électrophorétique obtenu (fig. n° 17 A) montre une bande majoritaire d'une masse apparente d'environ 28 kDa présente dans l'extrait protéique bactérien où l'expression de la protéine recombinante a été induite mais absente du profil où l'expression de la protéine recombinante n'a pas été induite. De plus, cette protéine est également reconnue par l'anticorps anti-histidine en immunoblotting (fig. n° 17 B) et montre ainsi que la protéine produite correspond à la protéine recombinante fusionnée avec une queue histidine.

### 3. Clivage de la queue histidine portée par la protéine recombinante

La protéine recombinante produite à partir du clone pQE-30 [(Asp)<sub>4</sub>Lys-Orchestine] possède une queue histidine permettant sa purification sur colonne Ni-NTA ainsi qu'une séquence (Asp)<sub>4</sub>Lys reconnue spécifiquement par l'entérokinase bovine. Le clivage de la queue histidine portée par la protéine recombinante a été réalisé en présence de concentrations croissantes d'entérokinase bovine (fig. n° 18 ; voir p. 39). Après incubation, les produits obtenus ont été analysés sur gel en conditions dénaturantes et ont montré que la protéine recombinante a une masse moléculaire d'environ 22 kDa. L'obtention de cette protéine recombinante clivée est d'un grand intérêt puisqu'elle correspond exactement à la protéine Orchestine native dépourvue de toutes ses modifications posttraductionnelles.

## **B. Recherche des calciprotéines présentes dans la fraction soluble**

Nous avons testé l'aptitude à fixer le calcium des protéines de la fraction soluble après les avoir séparées par électrophorèse puis transférées sur membrane de PVDF. L'équivalent de 2 ou 15 paires de cæcums chargés de concrétions a été utilisé pour réaliser cette étude en électrophorèse mono- (fig. n° 22 A ; voir p. 40) et bidimensionnelle (fig. n° 19 A ; voir p. 40) respectivement. Après transfert, la membrane est incubée dans une solution contenant du



**Figure n° 19:** Carte des polypeptides de la fraction soluble des concrétions calcaires séparés par électrophorèse bidimensionnelle (→: flèche montrant la protéine Orchestine).

A. Révélation des polypeptides au bleu de Coomassie.

B. Révélation des calciprotéines par marquage au <sup>45</sup>Ca.

C. Immunorévélation d'Orchestine.

calcium 45 ainsi qu'un autre cation divalent, le magnésium, ayant le rôle de compétiteur (voir p. 42). Après autoradiographie, la révélation des films montre que seule la protéine Orchestine reconnue par l'anticorps polyclonal (fig. n° 19 C ; fig. n° 22 C) est apte à fixer le calcium (fig. n° 19 B ; fig. n° 22 B). Cependant, l'absence de marquage au niveau des autres polypeptides n'exclut pas qu'ils puissent posséder cette aptitude. En effet, seules les molécules capables de se renaturer après électrophorèse et transfert sont décelables par cette technique (Hincke, 1988).

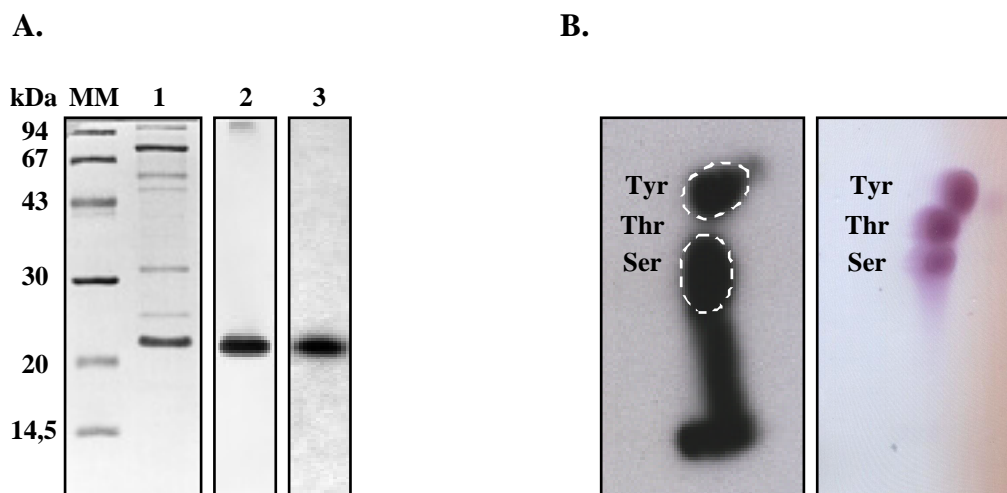
### **C. Recherche des phosphoprotéines présentes dans la fraction soluble**

Par des injections de [ $^{32}\text{P}$ ]ATP, Testenière (1998) a montré que parmi toutes les bandes polypeptidiques composant le profil électrophorétique de la fraction soluble seule la bande à 23 kDa relative à Orchestine est phosphorylée. Afin de vérifier ces résultats et avant d'étudier les éventuelles fonctions de ces phosphorylations sur l'activité de la protéine, nous avons à nouveau injecté deux fois à trois jours d'intervalle du [ $^{32}\text{P}$ ]ATP ou de l'orthophosphate [ $^{32}\text{P}$ ] inorganique (Pi) à un lot d'animaux en fin de période préexuviale (voir p. 43). Après exuviation, les polypeptides de la fraction soluble des concrétions sont purifiés puis séparés par électrophorèse de type SDS-PAGE. Les résultats obtenus dans les deux cas sont identiques et en accord avec les résultats de Testenière. Ils montrent qu'Orchestine est la seule protéine phosphorylée (fig. n° 20 A) de la fraction soluble.

### **D. Etude des phosphorylations portées par Orchestine**

#### 1. Mise en évidence des résidus phosphorylés

L'analyse qualitative des résidus potentiellement phosphorylés portés par Orchestine a été effectuée par une hydrolyse acide partielle de la fraction soluble marquée radioactivement au  $^{32}\text{P}$  suivie d'une analyse des résidus phosphorylés libérés par chromatographie sur couche mince (voir p. 43). Les résultats obtenus montrent qu'Orchestine est phosphorylée sur des résidus sérine et tyrosine (fig. n° 20 B).

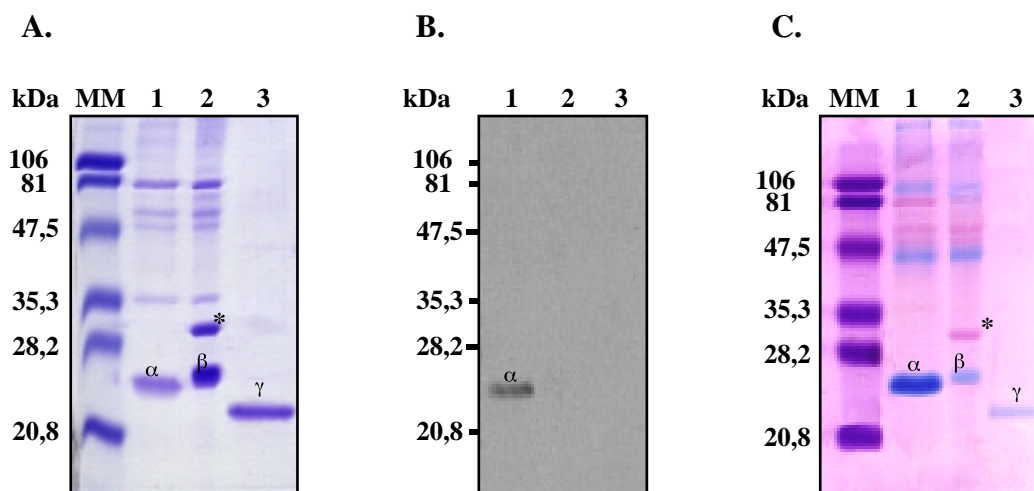


**Figure n° 20:** Etude des phosphorylations portées par la protéine Orchestine.

**A.** Mise en évidence des phosphoprotéines de la fraction soluble extraite de la matrice des concrétions calcaires élaborées par *O. cavimana*.

**1-** Profil électrophorétique de la fraction soluble (SDS-PAGE) ; **2-3-** Autoradiographie après transfert des protéines solubles marquées après injection *in vivo* de **2-**  $^{32}\text{P}$ -ATP et de **3-**  $^{32}\text{Pi}$ . **MM:** marqueurs de masse moléculaire.

**B.** Détermination des résidus phosphorylés d'Orchestine par chromatographie sur couche mince après marquage *in vivo* au  $^{32}\text{Pi}$ , extraction et hydrolyse acide partielle (**Thr:** Thréonine, **Tyr:** Tyrosine, **Ser:** Sérine). Les acides aminés phosphorylés témoins sont présentés à droite (révélation à la ninhydrine).



**Figure n° 21:** Etude de l'aptitude à fixer le calcium des protéines Orchestine native ( $\alpha$ ), Orchestine déphosphorylée ( $\beta$ ) et de la protéine recombinante clivée ( $\gamma$ ).

**A.** Révélation des profils électrophorétiques (SDS-PAGE) par le bleu de Coomassie.

**B.** Autoradiogramme après transfert des protéines et marquage au  $^{45}\text{Ca}$ .

**C.** Révélation des profils électrophorétiques (SDS-PAGE) par le "Stains-all".

**1-** fraction soluble extraite de la matrice des concrétions calcaires élaborées par *O. cavimana* ; **2-** fraction soluble traitée par la phosphatase du phage lambda ( \* ) ; **3-** protéine recombinante produite à partir du clone pQE-30 [(Asp) $_4$ Lys-Orchestine]. **MM:** marqueurs de masse moléculaire.

## 2. Etude de la fixation du calcium par Orchestine relativement à ses phosphorylations

### 2.1. Etude de la fixation du calcium après déphosphorylation totale

Après avoir mis en évidence la présence de résidus phosphorylés chez Orchestine, il devenait intéressant d'étudier la fonction de la protéine relativement à ces modifications postraductionnelles. Nous avons alors entrepris de déphosphoryler la protéine native et d'effectuer une étude comparative sur les trois types de protéine: native, native déphosphorylée et recombinante dépourvue de sa queue histidine (clivage par l'entérokinase bovine). Nous avons tout d'abord analysé sur gel d'acrylamide (fig. n° 21 A) les profils de migration obtenus pour les trois types d'extraits : fraction S native, fraction S après traitement par la phosphatase du phage lambda (Sérine/Thréonine/Tyrosine phosphatase) et protéine recombinante. La comparaison des profils des 2 types de fraction S montre que seule la protéine d'intérêt présente une différence de migration électrophorétique. La protéine déphosphorylée présente, en effet, un retard sur gel d'environ 1-1,5 kDa par rapport à la protéine native.

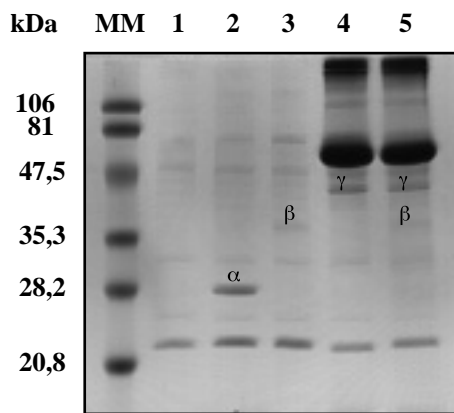
A partir de ces résultats préliminaires, nous avons entrepris l'étude de la fixation du calcium selon deux méthodes différentes. Nous avons tout d'abord mis en évidence les protéines calcaïfines par une méthode directe mettant en jeu un marquage par du calcium 45 (Maruyama *et al.*, 1984 ; voir p. 42) après transfert des protéines d'intérêt sur membrane de PVDF. Ensuite nous avons réalisé une méthode, quant à elle indirecte, impliquant une coloration du gel d'électrophorèse par le "Stains-all", colorant de la famille des carbocyanines connu pour révéler les calciprotéines par une coloration bleu spécifique présentant un pic d'absorption maximale à 600 nm (Campbell *et al.*, 1983 ; voir p. 42).

Les résultats obtenus avec la technique de marquage au calcium 45 nous montrent que la protéine Orchestine native présente dans la fraction S non déphosphorylée est la seule protéine apte à fixer le calcium selon le test utilisé (fig. n° 21 B). Par contre, la protéine Orchestine déphosphorylée ainsi que la protéine recombinante (non phosphorylée du fait de sa production en bactérie *E. coli*) ne semblent pas interagir avec les ions calcium. Les résultats obtenus après coloration au "Stains-all" corroborent les résultats précédents car seule la protéine Orchestine native apparaît avec une coloration bleue intense spécifique des calciprotéines (fig. n° 21 C).

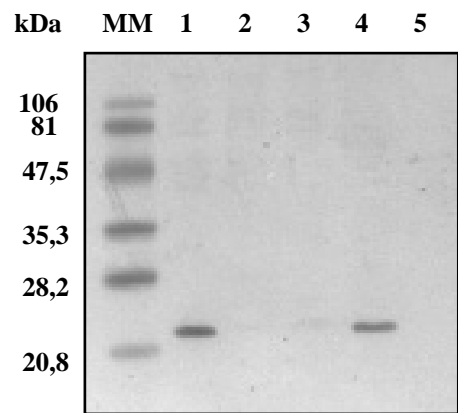
### 2.2. Etude de la fixation du calcium après déphosphorylation spécifique

Après avoir mis en évidence qu'Orchestine était phosphorylée au niveau de résidus sérine et thréonine, nous avons entrepris de déphosphoryler Orchestine à l'aide de

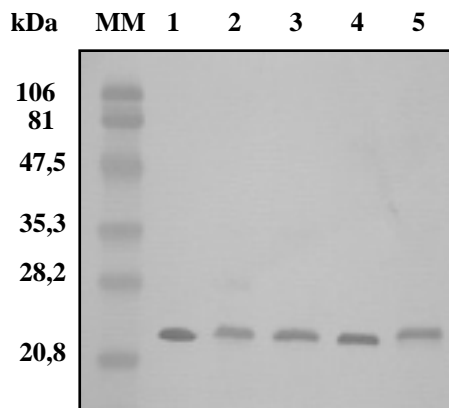
**A.**



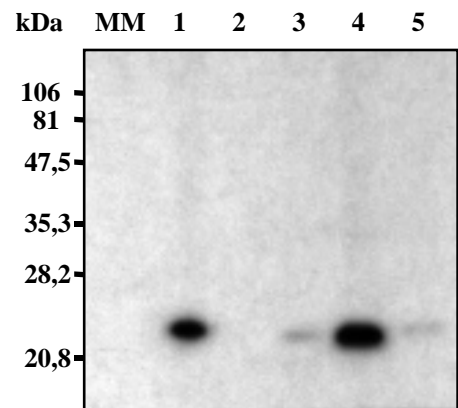
**B.**



**C.**



**D.**



**Figure n° 22:** Etude de l'aptitude à fixer le calcium par la protéine Orchestine après déphosphorylation.

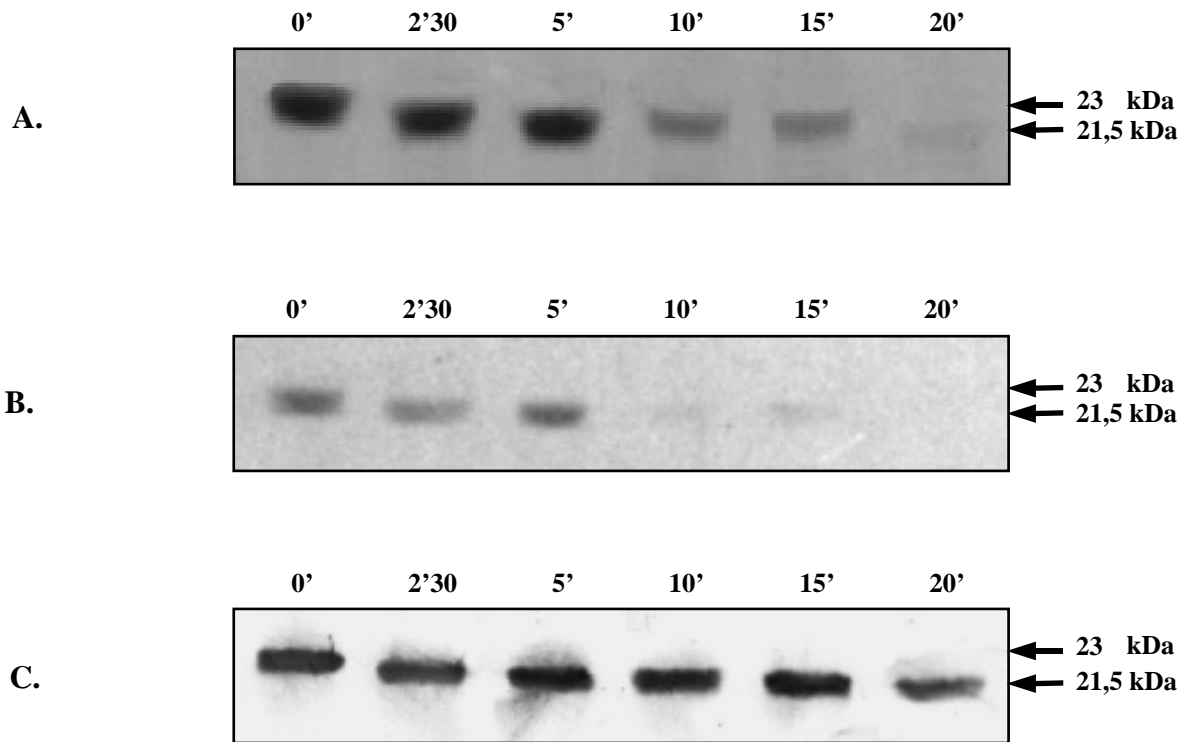
**A.** Révélation des profils électrophorétiques (SDS-PAGE) par le bleu de Coomassie.

**B.** Autoradiogramme après transfert des protéines et marquage au  $^{45}\text{Ca}$ .

**C.** Immunorévélation des protéines par l'anticorps anti-orchestine.

**D.** Autoradiogramme après transfert des protéines marquées au  $^{32}\text{P}$  (contrôle de déphosphorylation).

**1-** fraction soluble extraite de la matrice des concrétions calcaires élaborées par *O. cavimana* ; **2-** traitée par la phosphatase du phage lambda (Ser/Thr/Tyr-phosphatase,  $\alpha$ ) ; **3-** traitée par la protéine phosphatase 1, PP1 (Ser/Thr-phosphatase,  $\beta$ ) ; **4-** traitée par la tyrosine phosphatase, YOP ( $\gamma$ ) ; **5-** traitée par la protéine phosphatase 1 et par la tyrosine phosphatase ( $\beta$ ,  $\gamma$ ). **MM:** marqueurs de masse moléculaire.

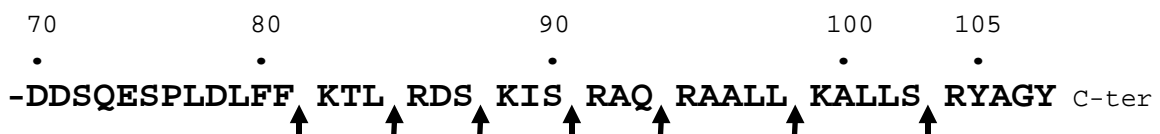


**Figure n° 23:** Cinétique de dégradation de la protéine Orchestine par la carboxypeptidase B.

**A.** Révélation des profils électrophorétiques (fraction soluble extraite des concrétions calcaires élaborées par *O. cavimana*) par le bleu de Coomassie (SDS-PAGE 15%) après dégradation enzymatique. Les temps d'incubation de l'enzyme avec les protéines sont indiqués en haut de chaque piste.

**B.** Autoradiogramme après transfert des protéines et marquage au  $^{45}\text{Ca}$ .

**C.** Immunodétection de la protéine Orchestine après transfert des protéines.



**Figure n° 24:** Sites de clivage par la carboxypeptidase B (peptidyl-L-lysine (L-arginine) hydrolase) présents dans la région C-terminale d'Orchestine.



phosphatases spécifiques (Sérine/Thréonine phosphatase et Tyrosine phosphatase) seule ou en combinaison (fig. n° 22 A) et de tester l'aptitude de la protéine déphosphorylée à fixer le calcium (voir p. 44).

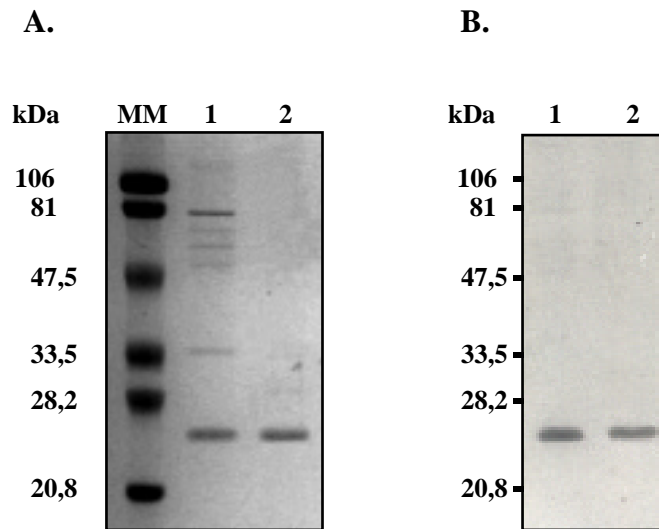
Les résultats, obtenus après transfert des produits de digestion sur membrane de PVDF et incubation au calcium 45, indiquent que les phosphorylations des résidus sérines sont fondamentales dans l'aptitude d'Orchestine à fixer le calcium (fig. n° 22 B). L'immunoblot (fig. n° 22 C) révélé par l'anticorps polyclonal anti-Orchestine est un contrôle permettant de vérifier l'uniformité des dépôts ainsi que d'identifier la protéine Orchestine dans chaque profil électrophorétique. Cependant, une ambiguïté subsiste quant au rôle des tyrosines phosphorylées situées en position C-terminale dans cette propriété car nous ne sommes pas certains d'avoir déphosphorylé complètement ces tyrosines (fig. n° 22 D) malgré l'utilisation de plusieurs tyrosine-phosphatases.

### 2.3. Etude de la fixation du calcium après dégradation C-terminale

Afin de déterminer si les tyrosines phosphorylées ont ou non un rôle dans l'aptitude d'Orchestine à lier le calcium, nous avons alors entrepris une dégradation C-terminale d'Orchestine par une peptidyl-L-lysine (L-arginine) hydrolase, la carboxypeptidase B (voir p. 45). L'analyse des produits de digestion (fig. n° 23 A) nous montre l'apparition d'une différence de migration dès 2 min. 30 d'incubation permettant de conclure à la dégradation C-terminale et à la libération du pentapeptide (site 104-108, -RYAGY) C-terminal contenant les 2 seules tyrosines potentiellement phosphorylées (fig. n° 24). La diminution de l'intensité de la coloration au bleu de Coomassie est probablement due à une diminution de l'affinité de la protéine pour ce colorant. En effet, l'immunoblot montre une uniformité des dépôts (fig. n° 23 C). L'incubation de la membrane au calcium 45 sur laquelle ont été transférés ces produits de digestion montre un marquage après 2 min. 30 et 5 min. de dégradation enzymatique (fig. n° 23 B). La perte de la partie C-terminale de la protéine comprenant les tyrosines potentiellement phosphorylées (-RYAGY) ne semble donc pas affecter l'aptitude de la protéine à fixer le calcium. Les tyrosines ne sont donc pas impliquées dans cette aptitude.

### **E. Précipitation *in vitro* du carbonate de calcium**

Afin de cerner plus précisément le rôle d'Orchestine dans l'élaboration des concrétions calcaires, nous avons étudié l'aptitude de cette protéine à interférer dans la cristallisation du carbonate de calcium *in vitro*. L'effet d'Orchestine sur la cristallisation du carbonate de

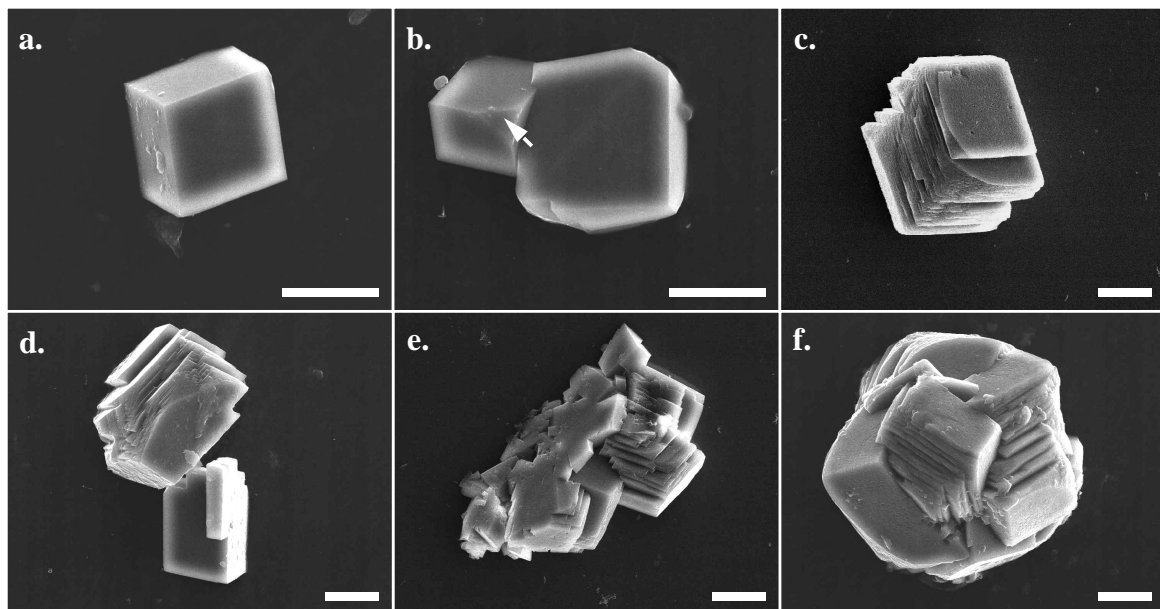


**Figure n° 25:** Contrôle de l'aptitude à fixer le calcium de la protéine Orchestine après purification.

**A.** Révélation des profils électrophorétiques (SDS-PAGE) par le bleu de Coomassie.

**B.** Autoradiogramme après transfert des protéines et marquage au  $^{45}\text{Ca}$ .

**1-** fraction soluble extraite des concrétions calcaires élaborées par *O. cavimana* ; **2-** Orchestine purifiée. **MM:** marqueurs de masse moléculaire.



**Figure n° 26:** Etude de l'effet de la protéine Orchestine purifiée sur la précipitation *in vitro* du carbonate de calcium.

**a.** cristal de calcite témoin (sans Orchestine) ; **b.-f.** croissance de cristaux de calcite en présence d'Orchestine à **b.)** 0,5 µg/ml, **c.)** 1 µg/ml, **d.)** 5 µg/ml, **e.)** 10 µg/ml, **f.)** 20 µg/ml. Echelle: 10 µm.

La flèche montre la formation d'une nouvelle face cristalline.

calcium a été testé par l'introduction de concentrations variées de la protéine purifiée (dont le maintien de l'aptitude à fixer le calcium a été vérifiée après purification, fig. n° 25) dans une solution de chlorure de calcium saturée en ions carbonates (voir p. 43). Dans chaque cas, le matériel obtenu apparaît biréfringent en lumière polarisée. Les cristaux formés en présence d'Orchestine montrent clairement une morphologie différente de celle observée en son absence (fig. n° 26 a) avec notamment apparition de nouvelles faces (fig. n° 26 b, ), de feuilletage (fig. n° 26 c), de marches (fig. n° 26 d), ainsi que l'agrégation et la fusion de cristaux (fig. n° 26 e-f) comme il a été montré précédemment avec d'autres extraits (Addadi et Weiner, 1985 ; Berman *et al.*, 1988 ; Addadi *et al.*, 1989 ; Albeck *et al.*, 1993, 1996 ; Aizenberg *et al.*, 1995 ; Gautron *et al.*, 1996). Nous observons de plus une augmentation de la taille et une diminution du nombre de cristaux avec l'augmentation de la concentration en Orchestine. Ces résultats montrent qu'Orchestine interfère avec la croissance des cristaux de calcite.

## II - Discussion

Les résultats obtenus précédemment en électrophorèse de type SDS-PAGE ne permettaient pas de conclure définitivement à l'identité de la protéine fixant le calcium avec Orchestine du fait de l'absence de cette propriété pour la protéine recombinante selon le test de Maruyama *et al.* (1984). En effet, nous ne pouvions pas exclure le fait qu'Orchestine majoritaire puisse être co-purifiée avec une autre protéine minoritaire affine de calcium. C'est pourquoi nous avons entrepris de vérifier qu'il s'agissait d'une seule et même protéine par l'utilisation combinée de la technique d'électrophorèse bidimensionnelle, de la technique de Maruyama *et al.* et de celle du western blotting. L'électrophorèse bidimensionnelle a été conduite en réalisant une isoélectrofocalisation en première dimension (selon Görg *et al.*, 1987), l'emploi d'immobilines permettant de stopper la migration des protéines dès qu'elles atteignent leur pI. Après séparation en deuxième dimension selon la technique classique du SDS-PAGE, nous avons soit coloré le gel au bleu de Coomassie (fig. n° 19 A), soit transféré les protéines sur membrane de PVDF et identifié les calciprotéines potentielles (fig. n° 19 B) selon Maruyama *et al.* (1984), ou immunorévéla la (ou les) protéine(s) reconnue(s) par l'anticorps anti-Orchestine (fig. n° 19 C). Nos résultats montrent clairement qu'une seule et même protéine, d'un pI de 4,3 et migrant à 23 kDa, est révélée par l'anticorps et fixe le

calcium. Il est à noter que des résultats obtenus précédemment (Testenière, 1998 ; Luquet *et al.*, 1996) en utilisant la technique d'électrophorèse bidimensionnelle combinant les techniques d'électrophorèse en gradient de pH non équilibré (NEpHGE ; O'Farrell, 1975) et dénaturante (SDS-PAGE) avaient conduit à suggérer que la protéine d'intérêt correspondait à un spot migrant vers 23 kDa avec un pI de 5,5. A l'époque, l'inexistence de l'anticorps polyclonal anti-Orchestine n'avait pas permis de vérifier ce résultat. Nos résultats montrent que ce spot ne correspond pas à Orchestine mais au spot situé à 25 kDa pour un pI de 5,5 (fig. n° 19 A). La vérification de l'unicité de la protéine séquencée avec celle fixant le calcium nous permettait alors d'envisager d'étudier le rôle potentiel des modifications post-traductionnelles que présente Orchestine relativement à son aptitude à fixer le calcium.

Pour cela, l'obtention de la protéine recombinante a présenté un autre intérêt, en plus de son utilisation pour produire un anticorps polyclonal dirigé contre Orchestine. En effet, cette protéine recombinante, dépourvue de toute modification post-traductionnelle et de sa queue histidine, ne possède pas cette aptitude à fixer le calcium selon le test de Maruyama *et al.* (1984) et ne prend pas la coloration spécifique des calciprotéines après coloration au "Stains-all". D'une manière générale, alors que la majorité des protéines se colore en rouge en présence du "Stains-all", une coloration bleue métachromatique est obtenue par la formation d'un complexe entre ce colorant et des sites polyanioniques divers tels que des résidus acides (aspartate et glutamate), des groupements phosphorylés ou glycosylés. Il n'est donc pas surprenant de voir que d'autres protéines apparaissent bleutées du fait de la présence probable de sites polyanioniques réactifs dans leur composition. Cependant, cette coloration d'une nuance plus pâle ne correspond pas au bleu caractéristique des calciprotéines. C'est le cas de la protéine native déphosphorylée et recombinante, la richesse en acides aminés acides (d'environ 30%) pouvant, à elle seule, expliquer l'obtention de cette teinte.

La présence de motifs EF-hand incomplets (site 32-44 : 89% d'identité et site 63-75 : 80% d'identité) ainsi qu'une proportion importante (environ 30%) de résidus acides (aspartique et glutamique) ne permettent donc pas à elles seules d'expliquer l'aptitude d'Orchestine à fixer le calcium. Si les groupements carboxyles peuvent être impliqués dans la liaison aux ions calcium (Simkiss et Wilbur, 1989), les groupements phosphates sont aussi suspectés d'intervenir dans de telles interactions (George *et al.*, 1996).

Le nombre de sites potentiellement phosphorylés par les kinases les plus communes est important puisque la prédiction selon NetPhos 2.0 (Blom *et al.*, 1999) nous a donné 18 sites sérine ainsi que 2 sites thréonine potentiels. Cependant ces prédictions sont à prendre avec précautions. En effet, de nombreuses séquences possédant des sites ne correspondant pas aux

séquences consensus reconnues par des kinases sont phosphorylées au niveau de ces séquences et *vice-versa*. Il est également à noter que des essais infructueux ont été réalisés avec des anticorps spécifiques des résidus phosphorylés afin de mettre en évidence les résidus potentiellement phosphorylés. Certaines protéines connues pour posséder des acides aminés phosphorylés dans leur séquence ne sont pas reconnues par ces anticorps du fait de la présence d'un encombrement stérique au niveau du site de reconnaissance (Arad-Dann *et al.*, 1993 ; Abu-Lawi et Sultzer, 1995).

Contrairement à cette prédiction, nous avons montré qu'Orchestine était une protéine phosphorylée sur des résidus sérine et tyrosine et non pas sur des résidus sérine et thréonine. Nous avons alors entrepris de vérifier le rôle relatif de chacun de ces 2 types de résidus phosphorylés portés par Orchestine sur son aptitude à fixer le calcium. C'est pourquoi nous avons utilisé des phosphatases spécifiques de ces résidus phosphorylés. D'après nos résultats, il est clair que cette aptitude est notamment dépendante des groupements phosphates présents plus particulièrement au niveau des résidus sérine.

Il est à noter que, en plus des phosphorylations, la protéine Orchestine est susceptible de porter d'autres modifications postraductionnelles. En effet, nous avons montré qu'il existe une différence de masse moléculaire d'environ 2 kDa entre la protéine native déphosphorylée (24 kDa) et la protéine recombinante clivée (22 kDa). Cette différence de masse moléculaire pourrait être notamment attribuée à la présence d'autres modifications post-traductionnelles car seules les phosphorylations (injection d'ATP ou de Pi marqué) et glycosylations (test à l'APS) ont été testées.

Si nous étudions la répartition des acides aminés le long de la séquence primaire de cette protéine nous pouvons distinguer deux régions au sein de celle-ci: l'une représentant les 3/4 de la séquence à partir de l'extrémité N-terminale est constituée de résidus acides et de sérines phosphorylées impliquées dans la liaison au calcium, l'autre représentant le dernier 1/4 jusqu'à l'extrémité C-terminale est constituée de résidus neutres hydrophobes et de tyrosines phosphorylées non impliquées dans la liaison au calcium. En effet, une digestion enzymatique réalisée par une exopeptidase C-terminale (la carboxypeptidase B) suivie du test de Maruyama a permis de montrer que la protéine dépourvue de ces tyrosines phosphorylées continuait à fixer le calcium. Les phosphorylations sur les tyrosines ne sont donc pas associées à la fonction affine du calcium de la protéine. La partie C-terminale pourrait constituer un domaine de liaison, par l'intermédiaire de tyrosines phosphorylées, avec d'autres protéines plus hydrophobes présentes dans la fraction insoluble de la matrice dont il faut rappeler que la fonction est en général de fournir un substrat, un cœur matriciel

enveloppé par les constituants solubles, acteurs du processus de minéralisation (Weiner et Traub, 1980 ; Weiner *et al.*, 1983a).

Toutes les caractéristiques qui viennent d'être évoquées nous laissent penser qu'Orchestine joue un rôle primordial dans l'élaboration des structures calcifiées élaborées par *Orchestia* ce qui nous amène à émettre une hypothèse quant à l'intervention de cette protéine au sein de la matrice organique constitutive des concrétions calcaires ainsi que dans le processus de biominéralisation. Rappelons ici que les concrétions calcaires d'*Orchestia* sont formées d'une alternance de couches minéralisées et non minéralisées et d'une matrice organique. Il est envisageable qu'Orchestine soit en relation d'une part avec le minéral et d'autre part avec le reste du treillis moléculaire notamment avec les protéines hydrophobes. D'autre part, nous avons montré qu'Orchestine est une protéine qui interfère *in vitro* dans la croissance des cristaux de calcite. Cependant malgré le fait que cette protéine ait *in vitro* un effet plutôt inhibiteur et donc de contrôle de la croissance du minéral, il faut rester prudent sur son rôle interférentiel au sein de la matrice des concrétions calcaires. En effet, si un constituant matriciel peut avoir un effet inhibiteur du processus de minéralisation quand il se trouve en solution, il peut se révéler nucléant s'il est fixé sur un support (Addadi et Weiner, 1985 ; Kono *et al.*, 2000).

*Troisième partie:*

*Immunolocalisation de la protéine Orchestine*

# Immunolocalisation de la protéine Orchestine

Grâce à l'obtention d'un anticorps polyclonal spécifique d'Orchestine dont la production a été décrite dans la première partie de ce manuscrit, nous nous proposons ici de localiser la protéine Orchestine sur des coupes de cæcums postérieurs tout d'abord en microscopie photonique puis plus finement en microscopie électronique par la technique d'immunogold, afin d'essayer de mieux comprendre sa fonction.

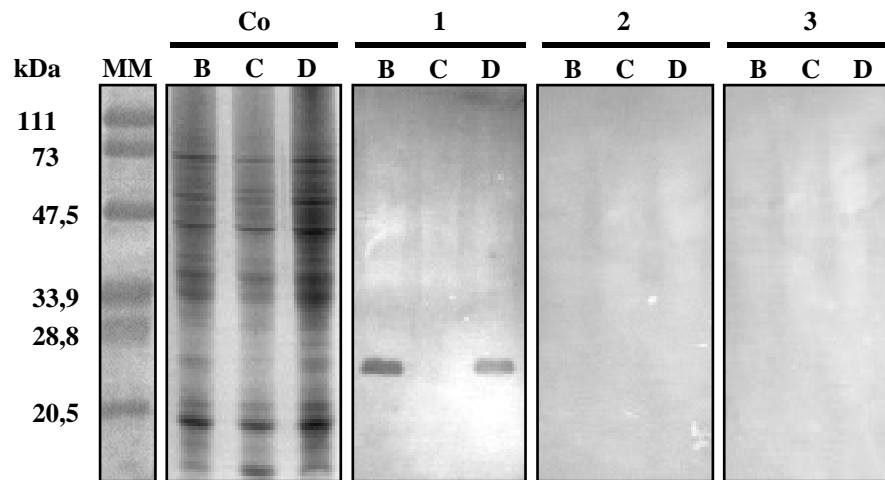
## I - Résultats

### A. Expression temporelle de la protéine Orchestine au cours d'un cycle de mue

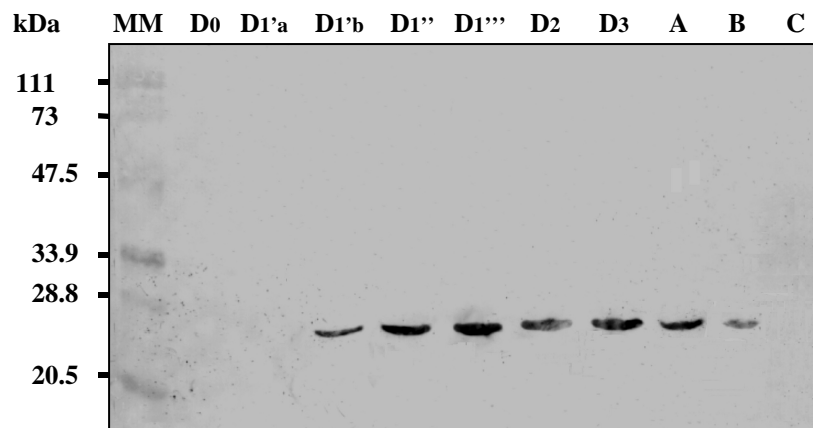
#### 1. Contrôle de la spécificité de l'anticorps polyclonal anti-Orchestine sur des extraits protéiques totaux

Après avoir produit un anticorps polyclonal à partir d'une protéine recombinante, nous avons vérifié que cet anticorps était spécifique d'Orchestine. Une première investigation n'avait porté que sur un nombre restreint de protéines en l'occurrence la fraction soluble de la matrice des concrétions calcaires. Nous avons alors séparé par électrophorèse puis transféré sur membrane de nitrocellulose des extraits protéiques totaux de cæcums postérieurs d'animaux en période B (période postexuviale), C (intermue) et D (période préexuviale) (fig. n° 27). Les témoins négatifs réalisés avec le sérum préimmun et l'anticorps secondaire seul permettent d'affirmer que l'immunoréactivité est liée à l'anticorps primaire uniquement. La révélation immunologique a mis en évidence dans les extraits protéiques totaux une bande unique à 23 kDa correspondant à la protéine Orchestine en période préexuviale (période D) ainsi qu'en période postexuviale (période B) et aucune en période d'intermue (période C). L'anticorps polyclonal produit contre la protéine recombinante est donc bien spécifique d'Orchestine et de cette seule protéine.





**Figure n° 27:** Etude de la spécificité de l'anticorps sur les protéines totales des cæcums postérieurs d'animaux situés (B) en période postexuviale, (C) en intermue ou (D) en période préexuviale. Co: gel coloré au bleu de Coomassie. Western blots révélés (1) par l'anticorps anti-Orchestine dilué au 1/500, (2) par le sérum préimmun pur et (3) par l'anticorps secondaire seul. MM: marqueurs de masse moléculaire.



**Figure n° 28:** Expression temporelle de la protéine Orchestine au cours d'un cycle de mue. Western blot révélé par l'anticorps anti-Orchestine dilué au 1/500. D0-D3: période préexuviale, A-B: période postexuviale, C: intermue. MM: marqueurs de masse moléculaire.

## 2. Expression temporelle de la protéine Orchestine au cours d'un cycle de mue

Disposant d'un anticorps spécifique d'Orchestine, nous avons alors analysé l'expression de la protéine Orchestine durant un cycle de mue (fig. n° 28). La protéine Orchestine, absente en période d'intermue, est retrouvée en période préexuviale à partir du stade D<sub>1</sub><sup>b</sup> où commence à être visible l'élaboration des concrétions calcaires (phase de stockage calcique) et en période postexuviale (phase de remobilisation du calcium) mais en moindre quantité. Ces résultats corroborent ceux obtenus par Testenière (1998) qui avait étudié l'expression temporelle du gène *orchestine* et montré que le taux de transcrits négligeable en intermue et en début de période préexuviale augmente à partir du stade D<sub>1</sub><sup>b</sup> pour culminer en D<sub>3</sub> et chute durant la période postexuviale pour revenir à un taux de base négligeable en début d'intermue.

### **B. Etude de la localisation de la protéine Orchestine**

Les anticorps produits contre Orchestine, dont la spécificité vient d'être vérifiée, ont été utilisés pour l'étude de la localisation de la protéine Orchestine sur des coupes transversales de cæcums postérieurs en microscopie photonique puis en microscopie électronique. Les organes chargés ou non de concrétions calcaires ont été décalcifiés et fixés à l'aide d'un tampon contenant de l'EDTA pour les études immunohistochimiques en microscopie photonique afin de conserver la structure de l'épithélium (voir p. 46). Le fait de ne pas décalcifier provoque la rupture de l'épithélium lors de la coupe, la concrétion étant trop dure. Cependant le traitement à l'EDTA altère la structure matricielle des concrétions calcaires. Afin de préserver cette matrice organique, *in situ*, lors de l'étude en microscopie électronique, la décalcification n'a pas été réalisée. Il est à noter que le fixateur à base de paraformaldéhyde et de glutaraldéhyde possède un effet décalcifiant ménagé ce qui permet d'envisager l'obtention de coupes intactes.

#### 1. Période préexuviale

Les témoins négatifs réalisés d'une part avec le sérum préimmun (fig. n° 29 A<sub>2</sub>) et d'autre part avec l'anticorps secondaire seul (fig. n° 29 A<sub>3</sub>) nous ont permis de conclure à la spécificité de la révélation immunologique observée sur la figure n° 29 A<sub>1</sub>.

La vue générale d'une coupe transversale d'un cæcum en période préexuviale, après révélation par l'anticorps anti-Orchestine, montre un marquage des villosités de la cellule mais aussi un marquage de la région sous-nucléaire (fig. n° 30 A), ce qui est plus surprenant. Une

**Figure n° 29:** Immunolocalisation de la protéine Orchestine dans des cæcums postérieurs d'*O. cavimana* prélevés à différents stade du cycle de mue. Observations en microscopie photonique.

**A:** Période préexuviale (stade D2).

**B:** Période postexuviale (stade B).

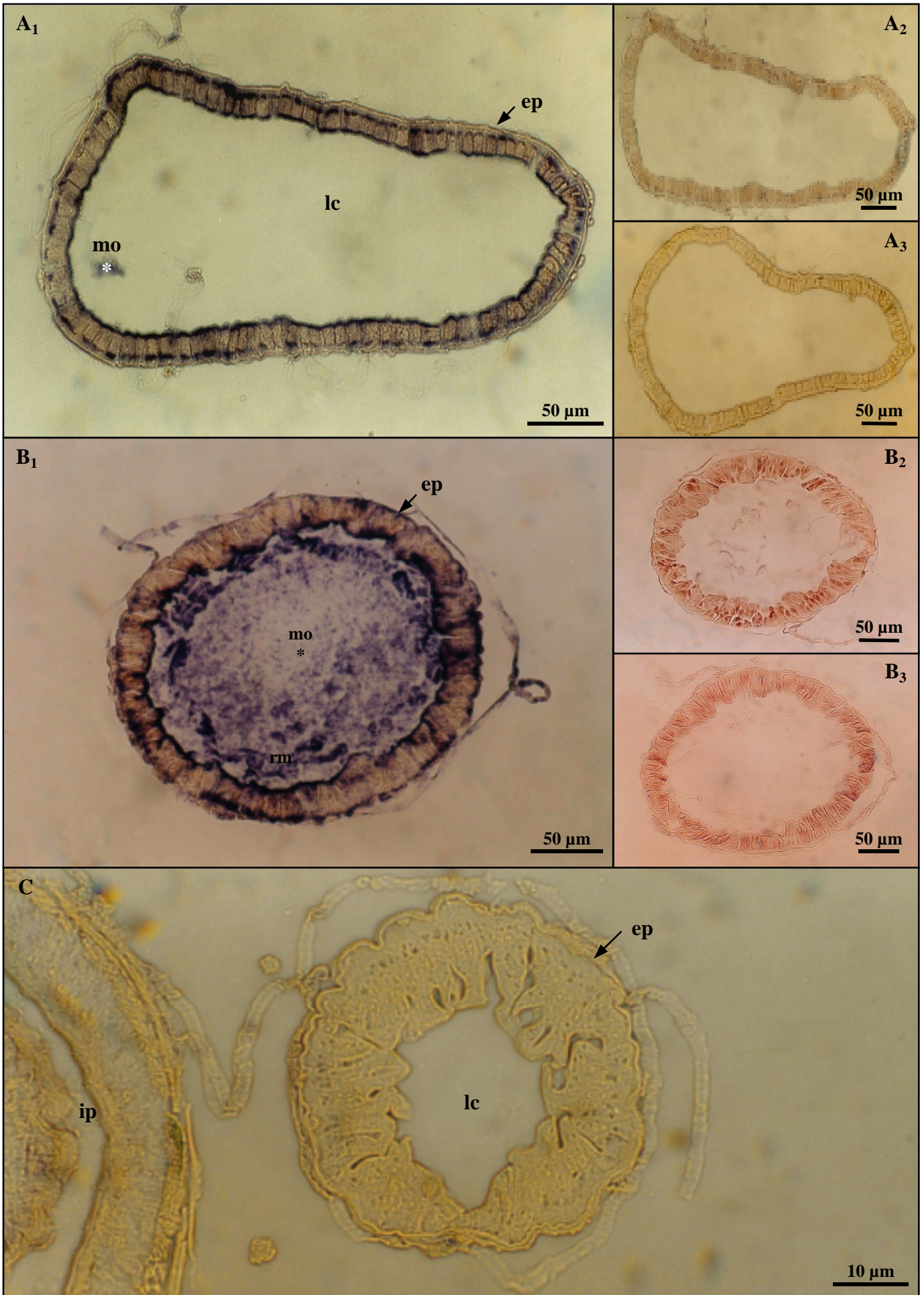
**C:** Période d'intermue (stade C2).

**1:** Coupe transversale de cæcum traité par l'anticorps polyclonal anti-Orchestine.

**2:** Témoin négatif révélé par le sérum préimmun.

**3:** Témoin négatif révélé par l'anticorps secondaire seul.

**ep:** épithélium ; **ip:** intestin postérieur ; **lc:** lumière cæcale ; **mo:** matrice organique ; **rm:** résidu matriciel.



**Figure n° 30:** Immunolocalisation de la protéine Orchestine dans des cæcums postérieurs d'*O. cavimana* prélevés en période préexuviale (stade D2). Observations en microscopie photonique et en microscopie électronique à transmission.

**A:** Détail de **A<sub>1</sub>** (figure n° 29, page 74) montrant un marquage sous-nucléaire et des microvillosités de l'épithélium cæcal pendant la phase de mise en réserve du calcium (→ sens de transit du calcium).

**B:** Zone de jonction entre deux cellules cæcales en fin de période préexuviale montrant un marquage des microvillosités et du réseau extracellulaire dilaté.

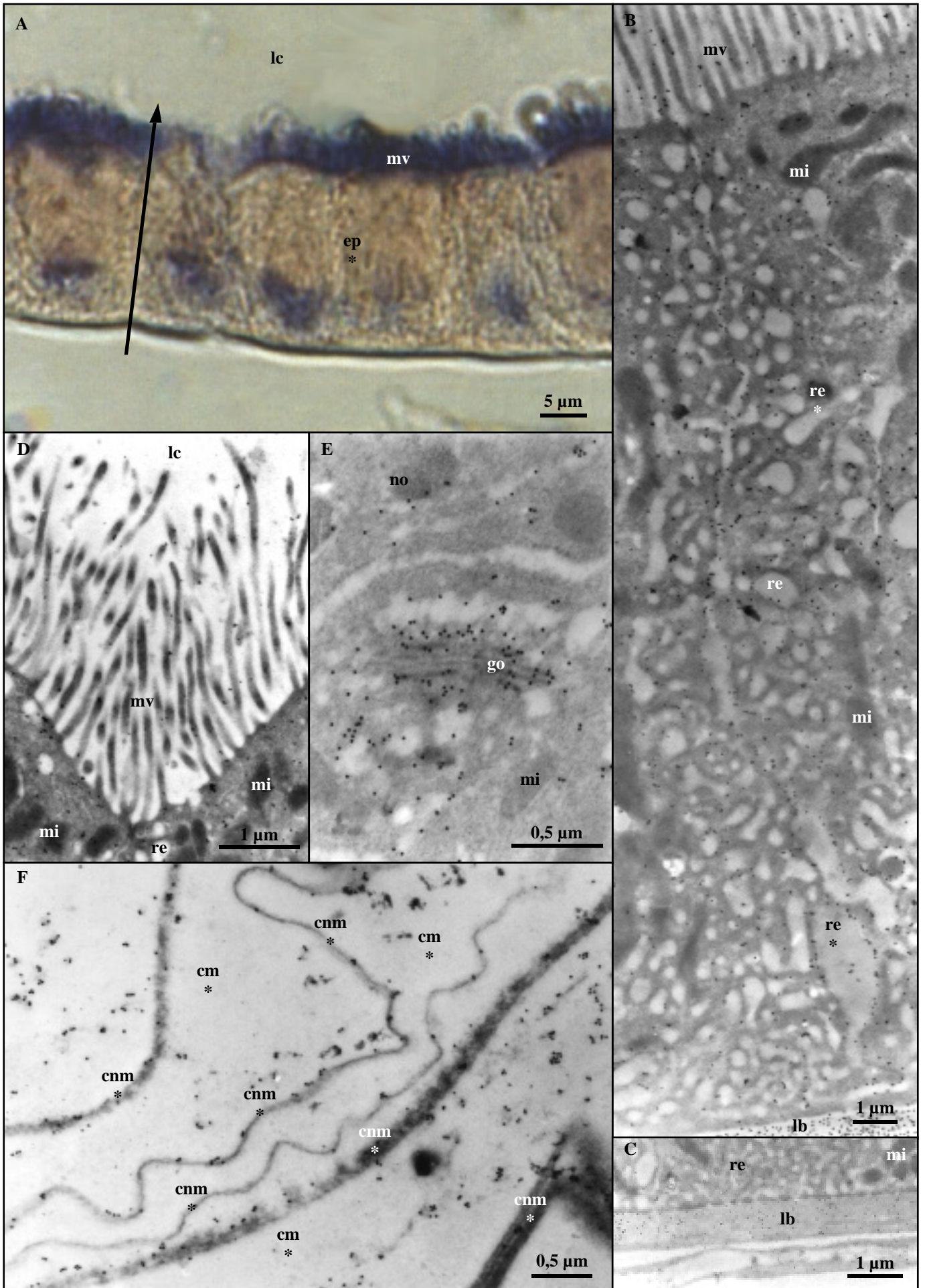
**C:** Témoin montrant l'immunoréactivité de l'anticorps secondaire couplé à l'or avec la lame basale.

**D:** Apex de deux cellules cæcales séparées par le réseau extracellulaire montrant un marquage abondant au niveau des microvillosités.

**E:** Marquage de saccules golgiens sous-nucléaires.

**F:** Alternance de couches de matrice organique marquées en bordure de concrétion.

**cm:** couche minéralisée ; **cnm:** couche non minéralisée ; **ep:** épithélium ; **go:** appareil de Golgi ; **lb:** lame basale ; **lc:** lumière cæcale ; **mi:** mitochondrie ; **mo:** matrice organique ; **mv:** microvillosités ; **no:** noyau ; **re:** réseau extracellulaire.



étude plus fine en microscopie électronique par la technique d'immunogold confirme le marquage des villosités (fig. n° 30 B ; fig. n° 30 D) et montre aussi un marquage abondant du réseau extracellulaire (fig. n° 30 B), du réticulum endoplasmique et des saccules golgiens (fig. n° 30 E), ce qui pourrait expliquer le marquage sous-nucléaire. Il est à noter que le marquage de la lame basale (fig. n° 30 B) est non spécifique, il correspond à l'immunoréactivité de l'anticorps secondaire pour cette dernière (fig. n° 30 C).

A ce stade, la totalité de la lumière cæcale où se logent les concrétions devrait apparaître marquée mais seul un reliquat de matrice est révélé (fig. n° 29 A<sub>1</sub>, \*). En effet pour des raisons purement techniques, la préservation du matériel intraluminal est difficile. Les concrétions calcaires (et donc la matrice), dont la structure est en pleine élaboration à ce stade, se délitent facilement et ne supportent pas les traitements réalisés lors de la fixation et lors de la confection des coupes. Cependant en microscopie électronique, la structure des concrétions calcaires est mieux conservée et montre une alternance de couches de matrice non calcifiées denses aux électrons et marquées, et de couches claires moins marquées correspondant à des zones où a lieu la précipitation du carbonate de calcium (fig. n° 30 F).

## 2. Période postexuviale

Les témoins réalisés avec le sérum préimmun (fig. n° 29 B<sub>2</sub>) ou l'anticorps secondaire seul (fig. n° 29 B<sub>3</sub>) étant négatifs permettent de conclure à la spécificité de la révélation immunologique observée sur la figure n° 29 B<sub>1</sub>.

La vue générale de la coupe transversale d'un cæcum (fig. n° 29 B<sub>1</sub>), après révélation par l'anticorps anti-Orchestine, montre un marquage au niveau de l'apex et de la base des cellules cæcales (fig. n° 31 A) pouvant s'expliquer par la présence de sphérules (fig. n° 31 B) dont la structure est concentrique (fig. n° 31 C) mais aussi au niveau de la matrice organique présente dans la lumière cæcale, marquage qui s'intensifie à proximité de l'apex des cellules cæcales. Le marquage uniforme de la matrice observable du centre à la périphérie de la concrétion suggère l'implication continue d'Orchestine durant les 15 jours de la période d'élaboration des concrétions. En microscopie électronique, cette matrice organique présente le même aspect que celui observé en période préexuviale. On note une alternance de couches, d'une part marquées et denses aux électrons et, d'autre part plus claires moins marquées que ce soit au cœur (fig. n° 31 D), au milieu (fig. n° 31 E) ou en périphérie (\*, fig. n° 31 F) de la concrétion. Nous pouvons de plus noter que la matrice organique semble former des agrégats (zones plus denses, fig. n° 31 G) à proximité et au contact de la région apicale des cellules (fig. n° 31 A). Nous devons rappeler que ce cæcum est celui d'un animal en période postexuviale et qui se

**Figure n° 31:** Immunolocalisation de la protéine Orchestine dans des cæcums postérieurs d'*O. cavimana* prélevés en période postexuviale (stade B). Observation en microscopie photonique et en microscopie électronique à transmission.

**A:** Détail de **B<sub>1</sub>** (figure n° 29, page 74) montrant la matrice organique décalcifiée et l'épithélium cæcal chargé de sphérules calciques pendant la phase de réabsorption du calcium (→ sens de transit du calcium).

**B:** Détail de **A** montrant des sphérules calciques immunomarquées.

**C:** Détail de sphérules calciques montrant les couches concentriques de matrice organique, coloration à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb (d'après Graf et Meyran, 1985).

**D:** Coupe tangentielle du cœur d'une concrétion calcaire montrant l'alternance de couches de matrice organique.

**E:** Couches de matrice organique marquées au milieu d'une concrétion calcaire.

**F:** Visualisation du résidu matriciel correspondant à de la matrice organique naturellement décalcifiée lors de la phase de réabsorption du calcium et des couches de matrice organique encore non décalcifiées (\*).

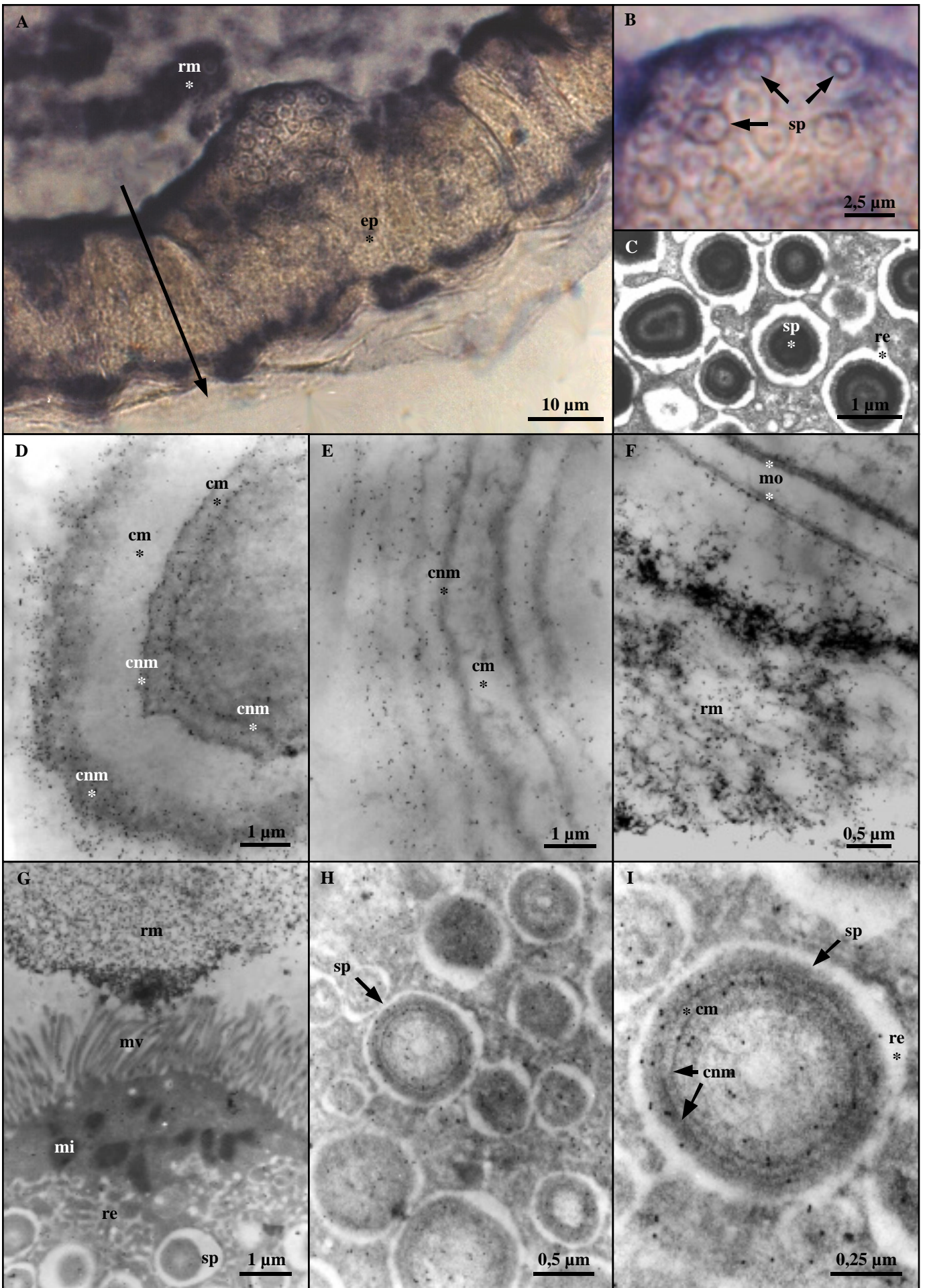
**G:** Apex d'une cellule cæcale en contact avec de la matrice naturellement décalcifiée fortement marquée lors de la phase de réabsorption. Notez l'absence du marquage des microvillosités.

**H:** Groupement de sphérules calciques.

**I:** Détail de **H** montrant l'alternance de couches denses marquées et de couches claires non marquées au niveau d'une sphérule.

**cm:** couche minéralisée ; **cnm:** couche non minéralisée ; **ep:** épithélium ; **lc:** lumière cæcale ; **mi:** mitochondrie ; **mo:** matrice organique ; **mv:** microvillosités ; **re:** réseau extracellulaire ; **rm:** résidu matriciel ; **sp:** sphérule.





trouve donc en phase de réabsorption du calcium (cf. sens de transit du calcium désigné par une flèche sur la figure n° 31 A). La zone de contact entre la matrice organique et l'apex des cellules épithéliales correspond donc à la zone de solubilisation et de réabsorption du calcium stocké (fig. n° 31 A ; fig. n° 31 G). Afin de distinguer plus précisément la matrice naturellement décalcifiée de la matrice organique enclavée dans la concrétion, nous avons choisi de la nommer "résidu matriciel". De plus, contrairement à ce qui a pu être observé en période préexuviale, les villosités n'apparaissent pas marquées ce qui indique que la protéine Orchestine ne semble ni sécrétée ni réabsorbée pendant cette période.

Le marquage de l'apex des cellules cœcales (fig. n° 31 A-B ; fig. n° 31 G), quant à lui, peut s'expliquer par la présence de sphérules. Rappelons ici que les sphérules sont des structures concentriques calcifiées (pourvues également d'une matrice organique, fig. n° 31 C) qui permettent le transport du calcium par un réseau extracellulaire (fig. n° 31 H). Les sphérules apparaissent marquées après révélation immunologique et montrent également une alternance de couches non minéralisées marquées et denses aux électrons et, de couches minéralisées plus claires (fig. n° 31 I) comme nous l'avons montré au niveau des concrétions calcaires (fig. n° 30 F ; fig. n° 31 D-E). Après avoir été élaborées à l'apex des cellules dans le réseau extracellulaire, les sphérules transitent par ce même réseau et sont résorbées à la base des cellules. Le calcium ainsi transporté se retrouve alors à l'état ionique dans la circulation hémolympatique. Le marquage observé à la base des cellules (fig. n° 31 A) correspond donc à la matrice organique des sphérules qui, décalcifiée naturellement, forme des zones de substances denses à l'instar de celles observées dans la zone de solubilisation des concrétions. L'observation d'un marquage basal régionalisé est en accord avec le mode de réabsorption qui s'effectue par pulses de décharges calciques et de manière non uniforme sur toute la périphérie des cœcums.

### 3. Intermue

La période d'intermue, a été également étudiée. La révélation immunologique montre une absence de marquage au niveau de la lumière cœcale vide et donc dépourvue de matrice organique mais aussi une absence de marquage au niveau de l'épithélium cœcal (fig. n° 29 C). Ces derniers résultats sont en accord avec les résultats obtenus en western blotting sur des extraits protéiques totaux de cœcums mais aussi avec la physiologie de l'animal. En effet, la période d'intermue correspond à une étape de stabilité cuticulaire apparente et donc de repos dans le métabolisme calcique correspondant.

## II - Discussion

Cette étude histologique nous révèle qu'Orchestine est non seulement impliquée dans l'élaboration des concrétions calcaires, mais est aussi un constituant de la matrice organique des sphérules calcifiées permettant le transit apico-basal du calcium en période postexuviale.

En période préexuviale, la protéine Orchestine apparaît en bordure du réseau extracellulaire où s'effectue le transit calcique sous forme ionique. Cette observation suggère une possible prise en charge du calcium ionique par Orchestine pendant le transit baso-apical, soit à des fins de transport, soit pour préserver la cellule d'une pénétration intracellulaire de calcium pouvant être toxique à haute dose. Pour ce qui est de la matrice organique des concrétions calcaires, nos résultats indiquent que le marquage ne se situe que dans des couches bien individualisées. Le marquage apparaît essentiellement au niveau de couches fines bien délimitées qui seraient des couches non minéralisées, c'est-à-dire les couches dépourvues de carbonate de calcium. En période préexuviale, le flux de calcium à travers l'épithélium semblant continu, de même que le réseau matriciel dans les concrétions, l'alternance de couches non minéralisées et de couche minéralisées pourrait être associée à une production cyclique d'ions carbonate grâce à une activité anhydrase carbonique, déjà mise en évidence par des travaux précédents (Meyran *et al.*, 1987), jusqu'à obtenir des conditions favorables à la précipitation de carbonate de calcium. Cette alternance de couches non minéralisées pourrait survenir suite à une diminution de la concentration en ions carbonate qui provoquerait un ralentissement de la précipitation du carbonate de calcium et donc une accumulation de matrice provoquant ainsi la génération d'une couche non minéralisée jusqu'à l'obtention de conditions plus favorables. Il en résulte qu'Orchestine pourrait être impliquée dans la chélation du calcium pendant les périodes pauvres en ions carbonate au niveau des couches de matrice non minéralisées. D'autre part, Orchestine pourrait être liée à la surface d'une couche de matrice insoluble non minéralisée initiant de proche en proche la précipitation du carbonate de calcium qui serait à la base de la formation d'une nouvelle couche minéralisée.

En période postexuviale, lors de la remobilisation du calcium, Orchestine semble également entrer dans la composition des sphérules calciques qui sont des structures biphasiques constituées d'une matrice organique et d'une phase minérale. Ces résultats soulèvent alors l'hypothèse de l'éventuelle réutilisation des (ou du moins de certains) constituants de la matrice des concrétions dans la formation de la matrice organique des

sphérules. Cependant, nos résultats indiquent que la protéine Orchestine est abondamment sécrétée en période préexuviale lorsque s'effectue la mise en réserve du calcium du fait de la présence d'un marquage des villosités apicales, mais ne l'est pas au cours de la période postexuviale lorsque s'effectue la remobilisation du calcium du fait d'une absence de marquage de ces mêmes villosités. Ces résultats montrent également qu'Orchestine présente dans la matrice organique en cours de décalcification et de compactage, n'est probablement pas réutilisée lors de l'élaboration des sphérules calcifiées. Orchestine serait probablement éliminée avec le résidu matriciel *via* l'intestin auquel les cæcums sont abouchés. Cependant des résultats précédents concernant une étude de l'expression temporelle du gène ont montré un taux de transcrits non négligeable en période postexuviale (Testenière, 1998 ; Testenière *et al.*, 2002). La protéine Orchestine, nouvellement synthétisée, serait alors sécrétée non pas dans la lumière cæcale par l'intermédiaire des villosités apicales mais dans le réseau extracellulaire dilaté afin de permettre l'élaboration des structures calcifiées de transport que sont les sphérules calciques.

Il ressort clairement de ces observations qu'Orchestine est un constituant non seulement de la matrice des concrétions élaborées en période préexuviale mais également de la matrice des sphérules postexuviales.

## *Conclusions et Perspectives*

## Conclusions et Perspectives

L'étude de la matrice organique des concrétions calcaires élaborées par le crustacé terrestre *Orchestia cavimana* avait permis de mettre en évidence une protéine, marqueur potentiel du processus de stockage calcique (Testenière, 1998 ; Testenière *et al.*, 2002). Cette protéine migrant à 23 kDa en SDS-PAGE s'est avérée acide (pI de 4,4), riche en acide aminés acides (Asp 16,7% et Glu 13%) et en sérine (18,5%). De plus, elle s'est révélée non glycosylée et apte à fixer le calcium. Elle a été nommée Orchestine.

Nous avons dans un premier temps poursuivi la caractérisation de cette protéine d'intérêt en montrant qu'Orchestine est phosphorylée (ce qui avait été prédit de l'analyse de sa séquence primaire). De plus nous avons précisé que ces phosphorylations étaient portées par des résidus sérine et tyrosine (et non sérine et thréonine selon les prédictions). Afin d'étudier les relations entre ces phosphorylations et l'aptitude de la protéine à fixer le calcium, il nous est apparu fondamental de produire une protéine recombinante en vecteur d'expression procaryote. L'originalité de la stratégie de production de cette protéine a reposé sur l'introduction d'un site de clivage permettant d'éliminer la queue histidine ayant servi à sa purification. De ce fait, nous avons obtenu une protéine identique à la protéine native mais dépourvue de toute modification post-traductionnelle. La comparaison de l'aptitude à fixer le calcium de la protéine native, de cette même protéine totalement déphosphorylée et de la protéine recombinante a permis de conclure à l'importance fondamentale de ces modifications post-traductionnelles dans cette fonction (selon deux méthodes, l'une directe utilisant du calcium 45, l'autre indirecte, utilisant la réaction colorimétrique au "Stains-all"). Nous avons ensuite affiné ce résultat en précisant que seules les phosphorylations sur les sérines étaient impliquées dans cette fonction, les tyrosines déphosphorylées ou supprimées de la séquence n'altérant pas la fixation du calcium. De plus nous avons montré que la protéine native interfère dans la croissance *in vitro* de cristaux de carbonate de calcium.

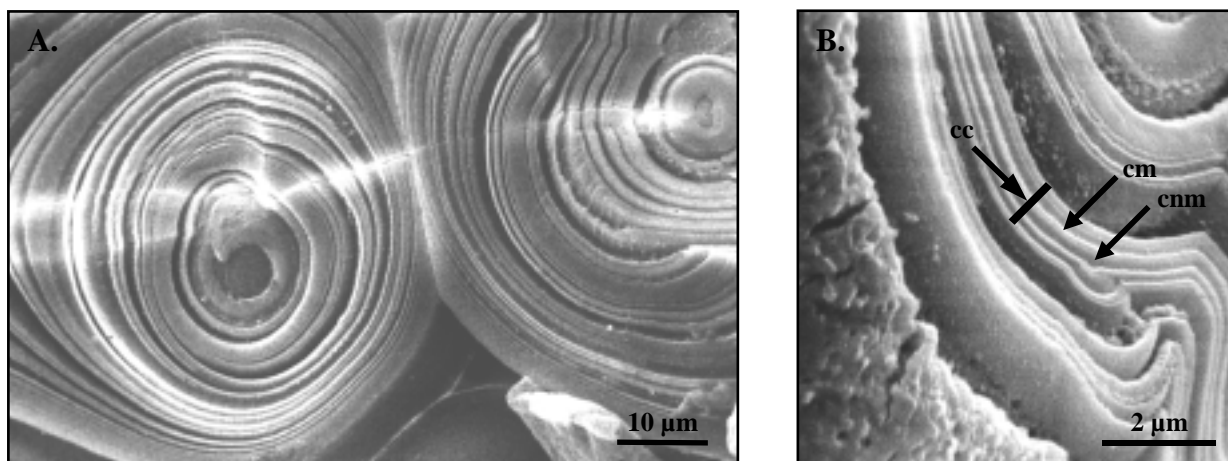
La protéine recombinante a présenté un autre intérêt. En effet, elle a permis de lever l'ambiguïté de la divergence existant entre la masse moléculaire de la protéine observée en électrophorèse dénaturante (de 23 kDa) et celle déduite (de 12,4 kDa) de la séquence du gène supposé coder cette protéine et donc de conclure à la correspondance gène *orchestine*-protéine Orchestine.

Cette protéine recombinante ne migrant pas au même niveau que la protéine native totalement déphosphorylée, cela nous a amené à conclure à l'existence d'autres modifications post-traductionnelles portées par Orchestine dont la nature reste à l'heure actuelle encore indéterminée.

Si nous avons mis en évidence la nature des résidus phosphorylés, la technique utilisée n'a pas permis de déterminer précisément les sites phosphorylés. La localisation de ces sites pourrait alors se faire par digestion enzymatique de la protéine suivie d'une chromatographie ("peptide mapping") ou par analyse en spectrométrie de masse, associées à un séquençage. Concernant son aptitude à fixer le calcium, Orchestine ne présente pas de motif consensus (du type "EF-Hand") liant le calcium avec une haute affinité mais une faible capacité ce qui induirait plutôt, dans ce dernier cas, un effet inhibiteur de la nucléation. Leur absence laisse donc envisager un rôle activateur potentiel de la nucléation et donc de la précipitation du minéral. Afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse, il serait important de déterminer la cinétique de fixation du calcium par Orchestine puis d'évaluer la constante d'affinité ainsi que le nombre de sites affins de calcium. Ceci suppose la mise au point d'une technique de purification permettant d'obtenir des rendements convenables, ce qui n'est pas le cas de la technique utilisée lors de ce travail.

Enfin la protéine recombinante a été utilisée pour la production d'un anticorps polyclonal afin de localiser précisément *in situ* Orchestine dans les structures biominéralisées (concrétions et sphérules) élaborées par *O. cavimana* lors de son cycle de mue. Orchestine semble non seulement localisée dans les couches non minéralisées des concrétions calcaires (structures élaborées pour la mise en réserve du calcium, fig. n° 32) mais aussi dans celles des sphérules calciques (structures permettant la remobilisation du calcium, fig. n° 33). Il semblerait qu'elle puisse aussi être utilisée à des fins de transport du calcium ou de protection de la cellule vis-à-vis du calcium en période préexuviale. Il s'avère donc qu'Orchestine est non seulement un constituant de la matrice des concrétions préexuviales mais est également un constituant de la matrice des sphérules calciques de réabsorption postexuviales. Ce n'est donc pas un réel marqueur de la période de stockage mais plutôt un marqueur de l'élaboration de structures calcifiées élaborées transitoirement par *O. cavimana*.

Bien qu'Orchestine ne possède aucune homologie de séquence avec d'autres protéines connues à ce jour, ses caractéristiques physico-chimiques (protéine acide phosphorylée apte à lier le calcium) l'apparentent à certaines protéines connues impliquées dans d'autres biominéralisations. Chez les Invertébrés, si aucune phosphoprotéine ayant des aptitudes à



**Figure n° 32:** Coupes de sphérolithes simples d'*Orchestia cavimana* (MEB).

**A.** Alternance de couches concentriques calcifiées et non calcifiées.

**B.** Les couches calcifiées sont composées de plusieurs couches élémentaires minéralisées séparées entre elles par des couches non minéralisées.

**cc:** couche composée ; **cnm:** couche élémentaire non minéralisée ; **cm:** couche élémentaire minéralisée.

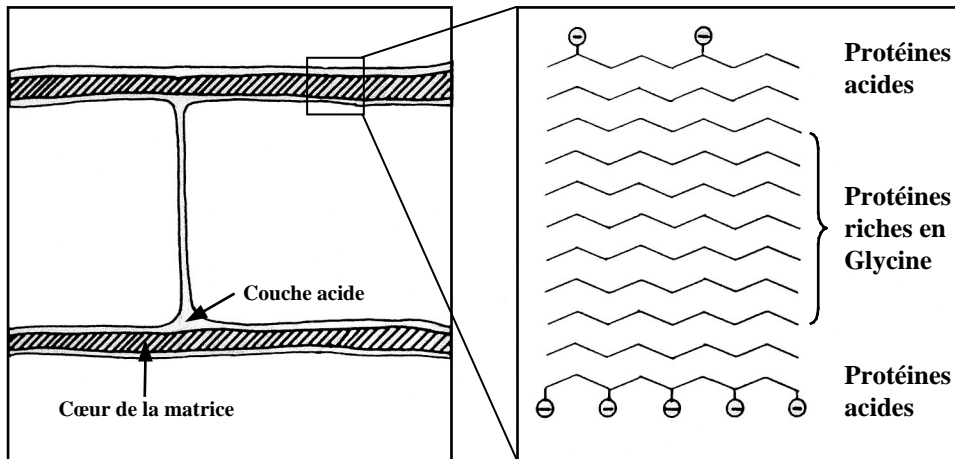


**Figure n° 33:** Micrographie (électronique) de sphérules calciques.

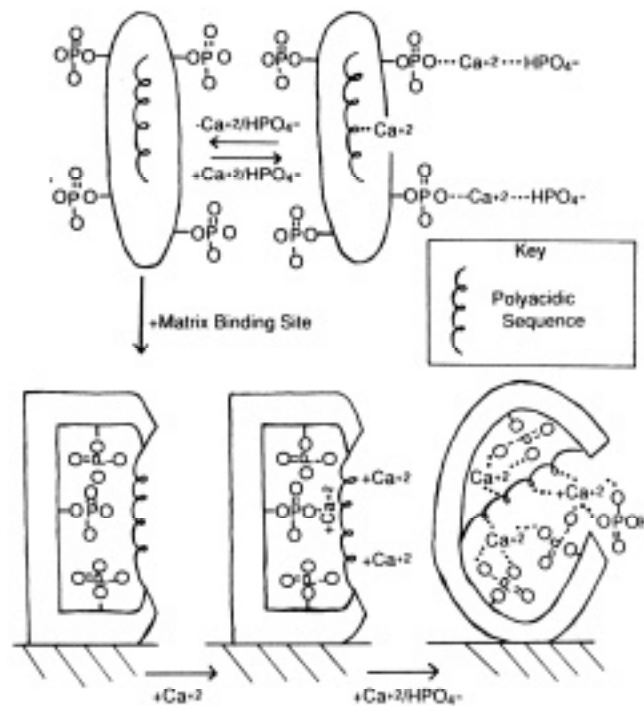
Notez la présence de couches concentriques montrant des intensités différentes.



fixer le calcium n'a encore été identifiée, des phosphoprotéines ont déjà été mises en évidence dans les coquilles de Mollusques (Rusenko *et al.*, 1991 ; Bordas *et al.*, 1991 ; Halloran et Donachy, 1995) ainsi que dans les dents de l'oursin adulte *Lytechinus variegatus* (Veis *et al.*, 1986). Il est à noter que l'analyse globale des acides aminés constitutifs des protéines de la matrice de ces dents révèle qu'elles sont, comme Orchestine, riches en acide aspartique et qu'elles comportent des phosphosérines. D'autre part, les caractéristiques physico-chimiques d'Orchestine évoquent les phosphoprotéines acides des Vertébrés constitutives de la matrice de l'os et de la dentine, tissu dur proche de l'os. Ces protéines, constituants de la matrice extracellulaire, sont synthétisées et sécrétées par les odontoblastes et ostéoblastes matures et sont à l'origine de l'initiation ou de l'inhibition de la minéralisation au sein de cette matrice. Si les fibres de collagène représentent le constituant majoritaire de l'os ou de la dentine en participant à leur architecture et au dépôt de cristaux d'hydroxyapatite, les constituants de la fraction non-collagénique, ne représentant que 10% des composants protéiques, sont supposés initier la minéralisation et contrôler la croissance des cristaux d'apatite. A côté du collagène de type I, de nombreuses protéines telles l'ostéonectine/SPARC, l'ostéocalcine/BGP ("bone gla protein"), l'ostéopontine (OPN), la bone sialoprotéine (BSP), la bone acidic glycoprotéine-75 (BAG-75) et deux protéoglycannes: le biglycane (PGI) et la décorine (PGII) (Butler, 1998 ; Qin *et al.*, 2001) ont été retrouvés conjointement dans l'os et la dentine. Seules la DPP ("dentin phosphoprotein" ou "phosphophoryn") encore appelée Dmp2 (Veis et Perry, 1967) et la DSP ("dentin sialoprotein") (Butler 1987 ; Butler *et al.*, 1992) seraient spécifiques de la dentine. La Dmp1 (dentin matrix protein 1 ou AG1) initialement trouvée dans la dentine de rat (George *et al.*, 1993) et que l'on a longtemps considéré comme spécifique de cette dernière interviendrait également dans la formation de l'os (MacDougall *et al.*, 1998). Les DPP (ou Dmp2), riches en sérines phosphorylées (S\*) contiennent de nombreuses répétitions de type DS\*S\* et S\*D, au niveau desquelles se formeraient des ponts entre groupements phosphates et groupements carboxyliques impliqués aussi bien dans la fixation aux fibres de collagène que dans l'initiation de la cristallisation et dans le contrôle de la forme et de la taille du minéral (George *et al.*, 1996 ; Butler, 1998). Si des motifs de ce type sont également trouvés chez Orchestine (en moindre quantité), sa composition en acides aminés la rapproche davantage des Dmp1 que des DPP (revue in Ritchie et Wang, 1996). Les Dmp1 comme les DPP, protéines de matrice acides, sont non seulement riches en acide aspartique et en phosphosérine mais également aptes à fixer le calcium. Elles sont considérées comme jouant un rôle activateur du processus de minéralisation osseuse ou dentaire.



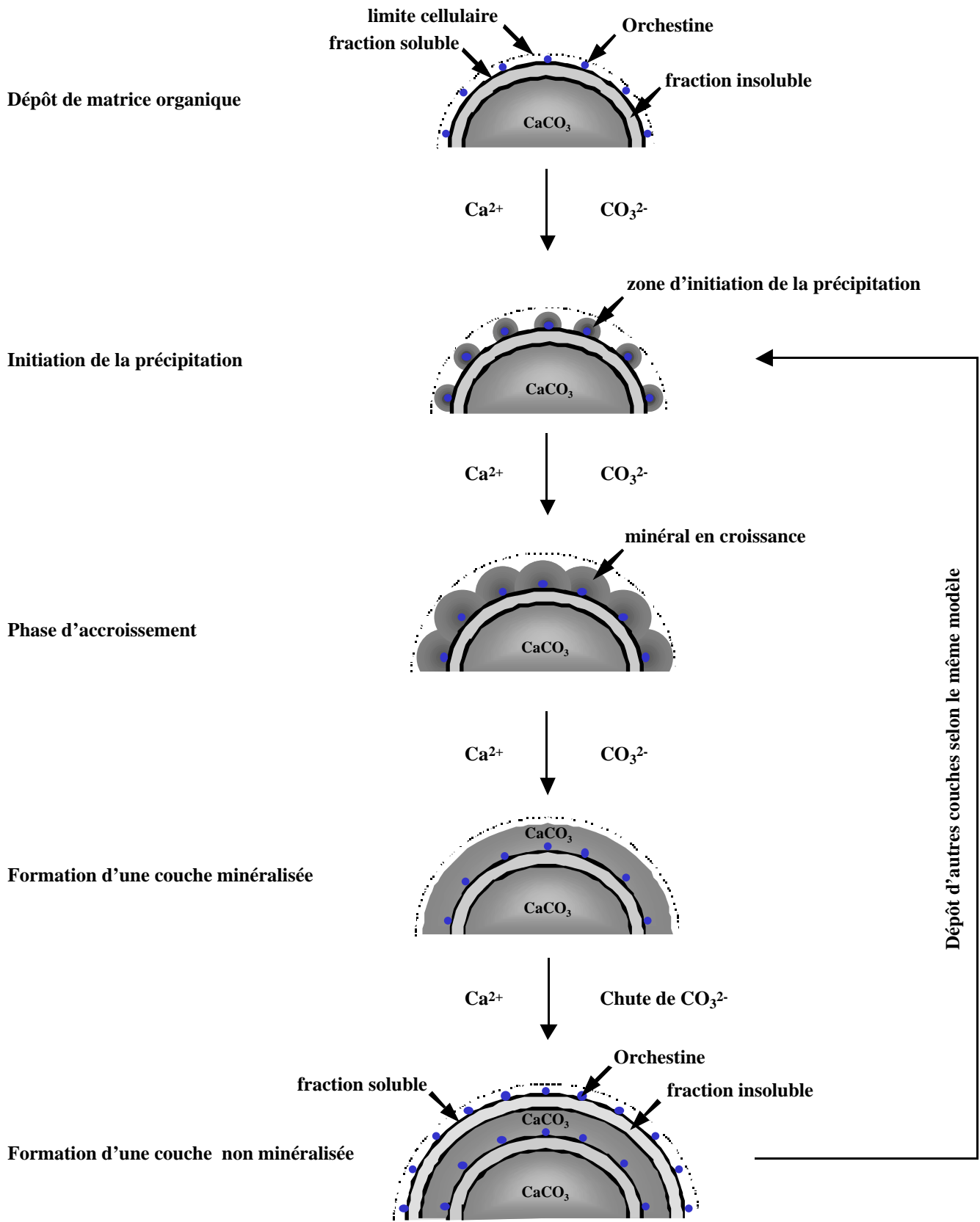
**Figure n° 34:** Représentation schématique d'une section de matrice organique de mollusque montrant le cœur de la matrice recouverte d'une couche constituée de protéines acides (D'après Weiner et Traub, 1980 ; Weiner *et al.*, 1983a).



**Figure n° 35:** Représentation schématique du modèle conformationnel à deux états ("Two State Model") des calciprotéines de la matrice organique de l'os (D'après Gorski, 1992).

En 1980, Weiner et Traub proposent un premier modèle concernant l'organisation de la matrice organique de la coquille chez les Mollusques (fig. n° 34), modèle confirmé depuis par de nombreux travaux portant sur la matrice organique de Mollusques. Ces auteurs suggèrent que des protéines de la fraction soluble, essentiellement riches en acide aspartique, seraient fixées à la surface de protéines insolubles, parmi lesquelles des protéines riches en résidus glycine, formant un cœur de fibres matricielles responsables des propriétés mécaniques de la coquille. Les protéines acides de surface constituant la fraction soluble de l'édifice seraient responsables de l'initiation de la précipitation ainsi que de la croissance des cristaux de calcite et/ou d'aragonite. En 1992, Gorski propose à son tour un modèle conformationnel à 2 états ("two-state model") pour expliquer le mécanisme d'action des protéines de l'os affines du calcium (fig. n° 35) telles que Ostéopontine, BSP et BAG-75. Ce modèle indique que ces protéines présentent à l'état monomérique une flexibilité conformationnelle qui leur permet d'adopter une conformation  $\beta$  lorsqu'elles sont précipitées avec du calcium. A l'état monomérique, ces protéines agiraient comme localisateurs régionaux de calcium. La forme complexée, obtenue après fixation à des fibres de collagène ou à d'autres constituants matriciels, induirait une diminution de la flexibilité de la protéine et provoquerait l'orientation des groupements polyanioniques du côté de l'entrée d'une poche dans laquelle des phosphosérines seraient distribuées tout autour de la paroi interne de cette poche. Les ions calcium seraient alors attirés puis fixés par des groupements électronégatifs polyacides. La formation de liaisons avec d'autres sites de la protéine tels les groupements phosphate s'en suivrait, progressivement et coopérativement, augmentant ainsi la constante d'affinité pour le calcium.

En combinant ces deux modèles et les diverses propriétés d'Orchestine, nous pouvons proposer le modèle fonctionnel suivant: la protéine serait localisée à la surface de chaque couche de matrice non minéralisée en contact avec le treillis moléculaire et plus particulièrement avec les constituants de la fraction insoluble par l'intermédiaire de sa région C-terminale neutre et hydrophobe contenant les résidus tyrosine phosphorylée. Le reste de la molécule, acide et polyanionique serait, quant à lui, orienté à l'opposé de ce treillis moléculaire et serait à l'origine de la précipitation du carbonate de calcium (fig. n° 36). Nous avons d'ailleurs montré qu'Orchestine interfère dans la précipitation *in vitro* du carbonate de calcium. Il serait souhaitable de poursuivre les investigations dans ce domaine en effectuant le même genre d'expériences après avoir déphosphorylé totalement ou partiellement Orchestine. Compte tenu de ces observations, chez *O. cavimana* la précipitation du carbonate de calcium s'effectuerait donc en présence d'Orchestine (seule ou en combinaison avec d'autres



**Figure n° 36:** Proposition de modèle expliquant la formation des couches concentriques des concrétions calcaires

constituants matriciels) de proche en proche à partir de ces sites initiateurs, permettant l'édification d'une nouvelle couche minéralisée concentrique jusqu'à appauvrissement du milieu en ions (particulièrement en ions carbonates). Durant cette période, Orchestine pourrait chélater les ions calcium présents dans le milieu et ainsi constituer une couche plus mince non minéralisée. Ce type de mécanisme pourrait être également applicable aux sphérules calciques, structures minéralisées permettant la remobilisation du calcium en période postexuviale.

Orchestine, calciprotéine phosphorylée, apparaît comme étant une molécule de choix pour l'étude de l'élaboration des structures minéralisées transitoires constituées en l'occurrence majoritairement de carbonate de calcium amorphe. Son gène pourrait s'avérer un bon marqueur pour l'étude de la régulation hormonale de ces processus. Cet aspect a déjà été abordé par la mise en évidence d'une stimulation indirecte du gène *orchestine* par la 20-hydroxyecdysone, hormone de mue des Crustacés (Testenière 1998 ; Testenière *et al.*, 2002). Il serait intéressant de poursuivre cette étude par la recherche du récepteur hétérodimérique (EcR ou Ultraspiracle = USP ; Yao *et al.*, 1993), puis de rechercher le ou les intermédiaires existant entre le complexe hormone-récepteur (20E/EcR-USP) et le gène *orchestine*. Enfin, l'implication d'autres hormones intervenant dans le métabolisme calcique d'Invertébrés et de Vertébrés tels le CGRP, la calcitonine voire la vitamine D pourrait être testée.

Si l'étude moléculaire des constituants matriciels issus des concrétions calcaires s'est orientée plus particulièrement vers ce marqueur protéique de 23 kDa majoritaire, la recherche d'autres marqueurs pourrait s'avérer d'un intérêt crucial pour la compréhension des mécanismes conduisant à l'élaboration puis à la déstabilisation de structures minéralisées. Aussi cette recherche s'effectuerait par la caractérisation des autres protéines présentes dans la fraction hydrosoluble mais aussi par celle des autres constituants de la fraction insoluble (selon des techniques de microséquençage et de clonage des ADNc correspondants). Une autre approche consisterait à rechercher des ADNc exprimés dans les cæcums postérieurs, spécifiques des périodes préexuviale et postexuviale, par des techniques de biologie moléculaire tel le "Differential Display" (Liang et Pardee, 1992) ou l'hybridation soustractive suppressive ("Suppression Subtractive Hybridization" ; Diatchenko *et al.*, 1996).

Enfin, à plus long terme, l'étude du métabolisme calcique pourrait être poursuivie au niveau de la cuticule durcie par calcification en période postexuviale et qui correspond à la destination finale du calcium stocké.

## *Références Bibliographiques*

## Références Bibliographiques

**Abu-Lawi, K. I. and Sultzer B. M.** (1995). Induction of serine and threonine protein phosphorylation by endotoxin-associated protein in murine resident peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* **63**, 498-502.

**Addadi, L. and Weiner, S.** (1985). Interactions between acidic proteins and crystals: Stereochemical requirements in biomineralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 4110-4114.

**Addadi, L., Moradian, J., Shai, E., Maroudas, N. and Weiner, S.** (1987). A chemical model for the cooperation of sulfates and carboxylates in calcite crystal nucleation: relevance to biomineralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 2732-2736.

**Addadi, L., Berman, A., Moradian Oldak, J. and Weiner, S.** (1989). Structural and stereochemical relations between acidic macromolecules of organic matrices and crystals. *Connect. Tissue Res.* **21**, 127-135.

**Aizenberg, J., Hanson, J., Ilan, M., Leiserowitz, L., Koetzle, T. F., Addadi, L. and Weiner, S.** (1995). Morphogenesis of calcitic sponges spicules : a role for specialized proteins interacting with growing crystals. *FASEB J.* **9**, 262-268.

**Akasaka, K., Frukadis, T. N., Killian, C. E., George, N. C., Yamasu, K., Khaner, O. and Wilt F. H.** (1994). Genomic organization of a gene encoding the spicule matrix protein SM30 in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *J. Biol. Chem.* **269**, 20592-20598.

**Albeck, S., Aizenberg, J., Addadi, L. and Weiner, S.** (1993). Interactions of various skeletal intracrystalline components with calcite crystals. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 11691-11697.

**Albeck, S., Addadi, L. and Weiner, S.** (1996). Regulation of calcite crystal morphology by intracrystalline acidic proteins and glycoproteins. *Connect. Tissue Res.* **35**, 365-370.

**Andersen, S. O., Hojrup, P. and Roepstorff, P.** (1995). Insect cuticular proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **25**, 153-176.

**Arad-Dann, H., Beller, U., Haimovitch, R., Gavrieli, Y. and Ben-Sasson, S. A.** (1993). Immunohistochemistry of phosphotyrosine residues: identification of distinct intracellular patterns in epithelial and steroidogenic tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **41**, 513-519.

**Bate, C. S.** (1856). On the British Edriophtalma. *Rep. Brit. Assoc.*, 48-51.

**Beavis, R. C., Chait, B. T., Creel, H. S., Fournier, M. J., Masson, T. L. and Tirrell, D. A.** (1992). Analysis of artificial proteins by matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 7584-7585.

**Bengston, S.** (1992). In: *The Proterozoic Earth: a Multidisciplinary Study*. Schopf, J. W. and Klein, C. (eds.). *Cambridge University Press*, Cambridge, pp. 397-411.

**Benson, S., Sucov, H., Stephens, L., Davidson, E. and Wilt, F.** (1987). A lineage-specific gene encoding a major matrix protein of the sea urchin embryo spicule. I. Authentication of the cloned gene and its developmental expression. *Dev Biol.* **120**, 499-506.

**Berman, A., Addadi, L. and Weiner, S.** (1988). Interactions of sea-urchin skeleton macromolecules with growing calcite crystals - a study of intracrystalline proteins. *Nature* **331**, 546-548.

**Birnboim, H. and Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.

**Blom, N., Gammeltoft, S. and Brunak, S.** (1999). Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* **294**, 1351-1362.

**Bordas, J. E., Wheeler, A. P. and Sikes, C. S.** (1991). Molluscan shell matrix phosphoproteins: Correlation of degree of phosphorylation to shell mineralized microstructure and to *in vitro* regulation of mineralization. *J. Exp. Zool.* **258**, 1-13.

**Borelli, G., Mayer-Gostan, N., De Pontual, H., Boeuf, G. and Payan, P.** (2001). Biochemical relationships between endolymph and otolith matrix in the trout (*Oncorhynchus mykiss*) and turbot (*Psetta maxima*). *Calcif Tissue Int.* **69**, 356-364.

**Boyle, W. J., van der Geer, P. and Hunter, T.** (1991). Phosphopeptide mapping and phosphoamino acid analysis by two-dimensional separation on thin-layer cellulose plates. *Methods Enzymol.* **201**, 110-149.



**Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of the protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

**Butler, W. T.** (1987). Dentin specific proteins. *Methods Enzymol.* **145**, 290-303.

**Butler, W. T.** (1998). Dentin matrix proteins. *Eur. J. Oral. Sci.* **106**, 204-210.

**Butler, W. T., Bhowan, M., D'Souza, R. N., Farach-Carson, M. C., Happonen, R.-P., Schrohenloher, R. E., Seyer, J. M., Somerman, M. J., Foster, M. J., Tomana, M. and van Dijk, S.** (1992). Isolation, characterization and immunolocalization for a 53-kDa dentin sialoprotein. *Matrix* **12**, 343-351.

**Campbell, K., MacLennan, D. and Jorgensen, A.** (1983). Staining of the Ca<sup>2+</sup>-binding proteins, calsequestrin, calmodulin, troponin C, and S-100, with the cationic carbocyanine dye "Stains-all". *J. Biol. Chem.* **258**, 11267-11273.

**Chaisemartin, C.** (1967). Contribution à l'étude de l'économie calcique chez les *Astacidae*. Influence du milieu de vie. *Thèse Doct. Sci. Nat. Poitiers, Arch. Orig. Cent. Document. CNRS n° 1220*, 1-160.

**Chait, T. B. and Kent, S. B. H.** (1992). Weighing naked proteins : practical, high-accuracy mass measurement of peptides and proteins. *Science* **257**, 1885-1894.

**Checa, A.** (2000). A new model for periostracum and shell formation in Unionidae (Bivalvia, Mollusca). *Tissue Cell* **32**, 405-416.

**Cooper, J. A., Sefton, B. M. and Hunter, T.** (1983). Detection and quantification of phosphotyrosine in proteins. *Methods Enzymol.* **99**, 387-402.

**De Caro, A., Multigner, L., Dagorn, J. C. and Sarles, H.** (1988). The human pancreatic stone. *Biochimie* **70**, 1209-1214.

**Degens, E. T.** (1976). Molecular mechanisms of calcium phosphate and silica deposition in the living cell. *Top. Curr. Chem.* **64**, 1-112.

**Della Valle, A.** (1893). Gammarini del golfo di Napoli. *Zool. Stat. z. Neapel, Fauna und Flora*, 20 Mon., Friedländer, Berlin, pp. 116-133.

**Diatchenko, L., Chris Lau, Y. F., Campbell, A. P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D. and Siebert, P. D.** (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 6025-6030.

**Drach, P.** (1939). Mue et cycle d'intermue chez les Crustacés Décapodes. *Ann. Inst. Oceanogr.* **19**, 103-391.

**Drach, P.** (1944). Etude préliminaire sur le cycle d'intermue et son conditionnement hormonal chez *Leander serratus* Pennant. *Bull. Biol.* **78**, 40-62.

**Drach, P. et Tchernigovtzeff, C.** (1967). Sur la méthode de détermination des stades d'intermue et son application générale aux Crustacés. *Vie et milieu* **18**, 595-609.

**Duncker, A. K. and Rueckert, R. R.** (1969). Observations on molecular weight determinations on polyacrylamide gel. *J. Biol. Chem.* **244**, 5074-5080.

**Endo, H., Persson, P. and Watanabe, T.** (2000). Molecular cloning of the crustacean DD4 cDNA encoding a Ca<sup>2+</sup>-binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276**, 286-291.

**Falini, G., Albeck, S., Weiner, S. and Addadi, L.** (1996). Control of aragonite or calcite polymorphism by mollusk shell macromolecules. *Science* **271**, 67-69.

**Feinberg, A. P. and Vogelstein, B.** (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6-13.

**Ford, G. C., Harrison, P. M., Rice, D. W., Smith, J. M. A., Treffrey, A., White, J. L. and Yariv, J.** (1984). Ferritin: Design and formation of an iron-storage protein. *Phil. Trans. R. Soc. London* **304B**, 551-565.

**Frankel, R. B., Blakemore, R. P. and Wolfe, R. S.** (1979). Magnetite in freshwater magnetotactic bacteria. *Science* **203**, 1355-1356.

**Gautron, J., Bain, M., Solomon, S. E. and Nys, Y.** (1996). Soluble matrix of hen's eggshell extracts changes *in vitro* the rate of calcium carbonate precipitation and crystal morphology. *Br. Poult. Sci.* **37**, 853-866.

**Gautron, J., Hincke, M. T., Mann, K., Panhéleux, M., Bain, M., McKee, M. D., Solomon, S. E. and Nys, Y.** (2001). Ovocalyxin-32, a novel chicken eggshell matrix protein. *J. Biol. Chem.* **276**, 39243-39252.

**Geisler, N., Fischer, S., Vandekerckhove, J., Plessmann, U. and Weber, K.** (1984). Hybrid character of a large neurofilament protein (NF-M): intermediate filament type sequence followed by a long and acidic carboxy-terminal extension. *EMBO J.* **11**, 2701-2706.

**George, A., Sabsay, B., Simonian, P. A. L. and Veis, R.** (1993). Characterization of a novel dentin matrix acidic phosphoprotein. *J. Biol. Chem.* **268**, 12624-12630.

**George, A., Bannon, L., Sabsay, B., Dillon, J. W., Malone, J., Veis, A., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J. and Copeland, N. G.** (1996). The carboxyl-terminal domain of phosphophoryn contains unique extended triplet amino acid repeat sequences forming ordered carboxyl-phosphate interaction ridges that may be essential in the biomineralization process. *J. Biol. Chem.* **271**, 32869-32873.

**George, N., Killian, C. and Wilt, F.** (1991). Characterization and expression of a gene encoding a 30.6-kDa *Strongylocentrotus purpuratus* spicule matrix protein. *Dev. Biol.* **147**, 334-342.

**Glimcher, J. M.** (1981). On the form and the function of the bone: from molecules to organs. In: *The Chemistry and Biology of Mineralized Connective Tissues*. Veis, A. (ed.). Elsevier, New York and Amsterdam, 617-673.

**Görg, A., Postel, W., Weser, J., Günther, S., Strahler, J. R., Hanash, S. M. and Somerlot, L.** (1987). Horizontal two-dimensional electrophoresis with pH gradients in the first dimension in the presence of nonionic detergent. *Electrophoresis* **8**, 45-51.

**Gorski, J. P.** (1992). Acidic phosphoproteins from bone matrix, a structural rationalization of their role in biomineralization. *Calcif. Tissue Int.* **50**, 391-396.

**Graf, F.** (1962). Mise en réserve de calcaire avant la mue chez les crustacés amphipodes. *C. R. Acad. Sci. Paris* **255**, 1191-1193.

**Graf, F.** (1964). Homotransplantation de cæcum de l'intestin moyen chez *Orchestia gamarella* Pallas (Crustacé Amphipode). *C. R. Acad. Sci. Paris* **259**, 1242-1244.

**Graf, F.** (1966). Preuve expérimentale de la sécrétion de concrétions calcaires et de leur dissolution par les cæcums postérieurs d'*Orchestia* (Crustacé Amphipode). Hypothèse de réabsorption. *C. R. Acad. Sci. Paris* **263**, 173-176.

**Graf, F.** (1967). Réabsorption intensive par l'épithélium cæcal du calcium stocké dans les cæcums postérieurs d'*Orchestia*. *C. R. Acad. Sci. Paris* **264**, 2211-2213.

**Graf, F.** (1969). Le stockage de calcium avant la mue chez les Crustacés Amphipodes *Orchestia* (Talitridé) et *Niphargus* (Gammaridé hypogé). Thèse Doc. Sci. Nat. Dijon, n°105. Impr. Berthier, Arch. Orig., Cent. Document. CNRS n°**2690**, 1-260.

**Graf, F.** (1971). Dynamique du calcium dans l'épithélium des cæcums postérieurs d'*Orchestia cavimana* Heller (Crustacé, Amphipode). Rôle de l'espace intercellulaire. *C. R. Acad. Sci. Paris* **273**, 1828-1831.

**Graf, F.** (1974). Quelques aspects du métabolisme du calcium chez les Crustacés. In: *Physiologie comparée des échanges calciques*, SIMEP-Editions, pp. 13-22.

**Graf, F.** (1978). Les sources de calcium pour les Crustacés venant de muer. *Arch. Zool. Exp. Gen.* **119**, 143-161.

**Graf, F.** (1982). Les cellules paracrines des cæcums postérieurs de Crustacés: un nouveau type cellulaire du système endocrine diffus du tube digestif. *C.R. Acad. Sci. Paris* **294**, 319-324.

**Graf, F.** (1986). Fine determination of the molt cycle stages in *Orchestia cavimana* Heller (Crustacea : Amphipoda). *J. Crust. Biol.* **6**, 666-678.

**Graf, F. and Delbecq, J. P.** (1987). Ecdysteroid titers during the molt cycle of *Orchestia cavimana* (Crustacea, Amphipoda). *Gen. Comp. Endocrinol.* **65**, 23-33.

**Graf, F. and Meyran, J. C.** (1983). Premolt calcium secretion in the midgut posterior cæca of the crustacean *Orchestia* : ultrastructure of the epithelium. *J. Morphol.* **177**, 1-23.

**Graf, F. and Meyran, J. C.** (1985). Calcium reabsorption in the posterior cæca of the midgut in a terrestrial crustacean, *Orchestia cavimana*. *Cell Tissue Res.* **242**, 83-95.

**Graf, F. and Meyran, J. C.** (1992). Neurosecretory cells in the posterior cæca of amphipods *Orchestia* and *Niphargus*: ultrastructural characterization. *Boll. Zool.* **59**, 49-55.

**Graf, F. et Michaut, P.** (1977). Les sphérules calciques de l'épithélium cæcal d'*Orchestia* (Crustacé, Amphipode), forme de transport du calcium dans le sens apico-basal. *C. R. Acad. Sci. Paris* **284**, 49-52.

**Graf, F. and Michaut, P.** (1980). Fine structure of the midgut posterior cæca in the crustacean *Orchestia* in intermolt : recognition of two distinct segments. *J Morphol.* **165**, 261-284.

**Graf, F., Fouchereau-Péron, M., Van-Vormhoudt, A. and Meyran, J.-C.** (1989). Variations of calcitonin-like immunoreactivity in the crustacean *Orchestia cavimana* during a molt cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **73**, 80-84.

**Grant, S. W. F.** (1990). Shell structure and distribution of *Cloudina*, a potential index fossil for the terminal Proterozoic. *Am. J. Sci* **290A**, 261-294.

**Greenaway, P.** (1985). Calcium balance and moulting in the crustacea. *Biol. Rev.* **60**, 425-454.

**Halloran, B. A. and Donachy, J. E.** (1995). Characterization of organic matrix macromolecules from the shells of the Antarctic scallop, *Adamussium colbecki*. *Comp. Biochem. Physiol.* **111B**, 221-231.

**Harkey, M., Kleug, K., Sheppard, P. and Raff, R.** (1995). Structure, expression, and extracellular targeting of PM27, a skeletal protein associated specifically with growth of the sea urchin larval spicule. *Dev. Biol.* **168**, 549-566.

**Heuer, A. H., Fink, D. J., Laraia, V. J., Arias, J. L., Calvert, P. D., Kendall, K., Messing, G. L., Blackwell, J., Rieke, P. C., Thompson, D. H., Wheeler, A. P., Veis, A. and Caplan, A. I.** (1992). Innovative materials processing strategies: a biomimetic approach. *Science* **255**, 1098-1105.

**Hincke, M. T.** (1988). Conditions for improved adsorption of calmodulin to nitrocellulose: detection by <sup>45</sup>Ca binding. *Electrophoresis* **9**, 303-306.

**Hincke, M. T., Tsang, C. P. W., Courtney, M., Hill, V. and Narbaitz, R.** (1995). Purification and immunochemistry of a soluble matrix protein of the chicken eggshell (Ovocleidin 17). *Calcif. Tissue Int.* **56**, 578-583.

**Hincke, M. T., Gautron, J., Tsang, C. P. W., McKee, M. D. and Nys, Y.** (1999). Molecular cloning and ultrastructural localization of the core protein of an eggshell matrix proteoglycan, Ovocleidin-116. *J. Biol. Chem.* **274**, 32915-32923.

**Ikeya, T., Persson, P., Kono, M. and Watanabe, T.** (2001). The *DD5* gene of the decapod crustacean *Penaeus japonicus* encodes a putative exoskeletal protein with a novel tandem repeat structure. *Comp. Biochem. Physiol.* **128B**, 379-388.

**Inoue, H., Ozaki, N. and Nagasawa, H.** (2001). Purification and structural determination of a phosphorylated peptide with anti-calcification and chitin-binding activities in the exoskeleton of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 1840-1848.

**Ishii, K., Yanagisawa, T. and Nagasawa, H.** (1996). Characterization of a matrix protein in the gastroliths of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**, 1479-1482.

**Ishii, K., Tsutsui, N., Watanabe, T., Yanagisawa, T. and Nagasawa, H.** (1998). Solubilization and chemical characterization of an insoluble matrix protein in the gastroliths of a crayfish, *Procambarus clarkii*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 291-296.

**Katoh-Fukui, Y., Noce, T., Ueda, T., Fujiwara, Y., Hashimoto, N., Higashinakagawa, T., Killian, C., Livingston, B., Wilt, F., Benson, S., Sucov, H. and Davidson, E.** (1991). The corrected structure of the SM50 spicule matrix protein of *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev. Biol.* **145**, 201-202.

**Katoh-Fukui, Y., Noce, T., Ueda, T., Fujiwara, Y., Hashimoto, N., Tanaka, S. and Higashinakagawa, T.** (1992). Isolation and characterization of cDNA encoding a spicule matrix protein in *Hemicentrotus pulcherrimus* micromeres. *Int. J. Dev. Biol.* **36**, 353-361.

**Killian, C. and Wilt, F.** (1996). Characterization of the proteins comprising the integral matrix of *Strongylocentrotus purpuratus* embryonic spicules. *J. Biol. Chem.* **271**, 9150-9159.

**Kirschvink, J. L. and Hagadorn, J. W.** (2000). A grand unified theory of biomineralization. In: *Biomineralization*. Bäuerlein E. (ed.). Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, pp. 139-150.

**Kirschvink, J. L., Walker, M. M., Chang, S. B., Dizon, A. E. and Peterson, K. A.** (1985). Chains of single-domain magnetite crystals in chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *J. Comp. Physiol.* **157A**, 375-381.

**Kollberg, U., Obermaier, B., Hirsch, H., Kelber, G. and Wolbert, P.** (1995). Expression cloning and characterization of a pupal cuticle protein cDNA of *Galleria mellonella* L. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **25**, 355-363.

**Kono, M., Hayashi, N., and Samata, T.** (2000). Molecular mechanism of the nacreous layer formation in *Pinctada maxima*. *Biochem Biophys. Res. Commun.* **269**, 213-218.

**Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 799-806.

**Lakshminarayanan, R., Kini, R. K. and Valiyaveetil, S.** (2002). Investigation of the role of ansocalcin in the biomineralization in goose eggshell matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 5155-5159.

**Lee, Y., Britten, R., and Davidson, E.** (1999). SM37, a skeletogenic gene of the sea urchin embryo linked to the SM50 gene. *Dev. Growth Differ.* **41**, 303-312.

**Le Gros Clark, W.** (1945). *The Tissues of the Body*. Oxford Univ. Press, Oxford.

**Liang, P., Pardee, A. B.** (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**, 967-71.

**Livingston, B., Shaw, R., Bailey, A. and Wilt, F.** (1991). Characterization of a cDNA encoding a protein involved in formation of the skeleton during development of the sea urchin *Lytechinus pictus*. *Dev. Biol.* **148**, 473-480.

**Lopez, E., Vidal, B., Berland, S., Camprasse, S., Camprasse, G. and Silve, C.** (1992). Demonstration of the capacity of nacre to induce bone formation by human osteoblasts maintained *in vitro*. *Tissue Cell* **24**, 667-679.

**Lowenstam, H. A.** (1962). Magnetite in denticle capping in recent chitons (Plyplacophora). *Bull. Geol. Soc. Am.* **73**, 435-438.

**Lowenstam, H. A.** (1963). Biologic problems relating to the composition and diagenesis of sediments. In: *The Earth Sciences / Problems and Progress in Current Research*. Donnelly, T. W. (ed.). *Univ. of Chicago Press*, Chicago, 137-195.

**Lowenstam, H. A.** (1981). Minerals formed by organisms. *Science* **211**, 1126-1131.

**Lowenstam, H. A. and Weiner S.** (1989). On biomineralization. *Oxford University Press*, New York, pp. 1-324.

**Luquet, G., Testeniere, O. and Graf, F.** (1996). Characterization and N-terminal sequencing of a calcium binding protein from the calcareous concretion organic matrix of the terrestrial crustacean *Orchestia cavimana*. *Biochim Biophys Acta.* **1293**, 272-276.

**MacDougall, M., Gu, T. T., Luan, X., Simmons, D. and Chen, J.** (1998). Identification of a novel isoform of mouse Dentin matrix protein 1: Spatial expression in mineralized tissues. *J. Bone Miner. Res.* **13**, 422-431.

**Mann, K., Weiss, I., André, S., Gabius, H.-J. and Fritz, M.** (2000). The amino-acid sequence of the abalone (*Haliotis laevigata*) nacre protein Perlucin. *Eur. J. Biochem.* **267**, 5257-5264.

**Mann, S.** (1983). Mineralization in biological systems. *Struct. Bondi.* **54**, 125-174.

**Mann, S.** (1988). Molecular recognition in biomineralization. *Nature* **332**, 119-124.

**Mann, S.** (1997). The biomimetics of enamel: a paradigm for organized biomaterials synthesis. *Ciba Found. Symp.* **205**, 261-269.

**Marin, F., Smith, M., Isa, Y., Muyzer, G. and Westbroek, P.** (1996). Skeletal matrices, mucin, and the origin of invertebrate calcification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 1554-1559.



- Marin, F., Cortjens, P., de Gaulejac, B., de Vrind-De Jong, E. and Westbroek, P.** (2000). Molecular characterization of Mucoperlin, a novel Mucin-like protein from the nacreous shell layer of the fan mussel *Pinna Nobilis* (Bivalvia, Pteriomorpha). *J. Biol. Chem.* **275**, 20667-20675.
- Marsh, M. E.** (1986). Histidinoalanine, a naturally occurring cross-link derived from phosphoserine and histidine residues in mineral-binding phosphoproteins. *Biochemistry* **25**, 2392-2396.
- Martoja, R. et Martoja-Pierson, M.** (1967). Initiation aux techniques de l'histologie animale. *Masson et Cie.*, Paris, pp. 1-345.
- Maruyama, K., Mikawa, T. and Ebashi, S.** (1984). Detection of the calcium binding proteins by <sup>45</sup>Ca. Autoradiography on nitrocellulose membrane after sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis. *J. Biochem.* **95**, 511-519.
- Matsudaira, P.** (1987). Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* **262**, 10035-10038.
- Meyran, J.-C., Graf, F. and Fournié, J.** (1987). Carbonic anhydrase activity in a calcium-mobilizing epithelium of the crustacean *Orchestia cavimana* during molting. *Histochemistry* **87**, 419-429.
- Michaut, P. et Graf, F.** (1988). Dynamique de l'épithélium des cæcums postérieurs d'*Orchestia cavimana* (Crustacé, Amphipode). I. Croissance. *Ann. Sci. nat. Zool.* **9**, 67-76.
- Michaut, P. et Graf, F.** (1990). Dynamique de l'épithélium des cæcums postérieurs d'*Orchestia cavimana* (Crustacé, Amphipode). II. Renouvellement cellulaire. *Ann. Sci. nat. Zool.* **11**, 17-28.
- Miyamoto, H., Miyashita, T., Okushima, M., Nakano, S., Moritza, T. and Matsushiro, A.** (1996). A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 9657-9660.

**Miyashita, T., Takagi, R., Okushima, M., Nakano, S., Miyamoto, H., Nishikawa, E. and Matsushiro, A.** (2000). Complementary DNA cloning and characterization of Pearlin, a new class of matrix protein in the nacreous layer of oyster pearls. *Mar. Biotechnol.* **2**, 409-418.

**Mohan, S. and Baylink, D.J.** (1999). In: *The IGF system. Molecular Biology, Physiology and Medical Applications*. Rosenfeld, R. G. and Roberts, C. T. (eds.). *Humana Press*, Totowa, NJ, pp. 457-496.

**Muños, G. and Marshall, S. H.** (1990). An alternative method for a fast separation of phosphotyrosine. *Anal. Biochem.* **190**, 233-237.

**Murayama, E., Okuno, A., Ohira, T., Takagi, Y. and Nagasawa, H.** (2000). Molecular cloning and expression of an otolith matrix protein cDNA from the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp Biochem. Physiol.* **126B**, 511-520.

**Murayama, E., Takagi, Y., Ohira, T., Davis, J. G., Greene, M. I. and Nagasawa, H.** (2002). Fish otolith contains a unique structural protein, otolin-1. *Eur. J. Biochem.* **269**, 688-696.

**Nebeski, O.** (1880). Beiträge zur Kenntniss der Amphipoden der Adria. *Arb. Zool. Inst. Univ. Wien.* **3**, 1-48.

**Nemec, B.** (1964). Georeceptors in plants. *Int. Bot. Congr. 10<sup>th</sup>*, Edinburgh, 194 Abstr.

**Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. and Ehrhardt, W.** (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**, 255-262.

**Odum, H. T.** (1951). Notes on the strontium content of seawater, celestite radiolaria and strontianite snail shells. *Science* **114**, 211-213.

**O'Farrell, P. H.** (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007-4021.

**Peled-Kamar, M., Hamilton, P. and Wilt, F.** (2002). Spicule matrix protein LSM34 is essential for biomineralization of the sea urchin spicule. *Exp. Cell Res.* **272**, 56-61.

**Perry, A., Bauer, G. B. and Dizon, A. E.** (1985). Magnetoreception and biomineralization of magnetite in amphibians and reptiles. In: *Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organisms. A new Biomagnetism*. J. L. Kirschvink, D. S. Jones and B. J. MacFadden (eds.). Plenum Press, New York, pp. 439-453.

**Petite, H.** (2001). La bio-ingénierie de la régénération osseuse. *Biofutur* **211**, *Le Technoscope* n°133, 1-7.

**Petite, H.** (2002). La bio-ingénierie de la régénération osseuse. *Médecine Sciences* **18**, 995-1002.

**Petite, H., Viateau, V., Bensaid, W., Meunier, A., de Pollak, C., Bourguignon, M., Oudina, K., Sedel, L. and Guillemin, G.** (2000). Tissue-engineered bone regeneration. *Nat. Biotechnol.* **18**, 959-963

**Qin, C., Brunn, J. C., Jones, J., George, A., Ramachandran, A., Gorski, J. P. and Butler, W. T.** (2001). A comparative study of sialic acid-rich proteins in rat bone and dentin. *Eur. J. Oral. Sci.* **109**, 133-141.

**Randerath, K.** (1964). Chromatographie sur couches minces. *Gauthier-Villars*, Paris, pp. 111-131.

**Rawitscher, F.** (1932). *Der Geotropismus der Pflanzen*. Gustav Fisher, Jena.

**Raz, S., Testeniere, O., Hecker, A., Weiner, S., and Luquet, G.** (2002). Stable amorphous calcium carbonate is the main component of the calcium storage structures of the crustacean *Orchestia cavimana*. *Biol. Bull.* (sous presse).

**Rebers, J. and Riddiford, L.** (1988). Structure and expression of a *Manduca sexta* larval cuticule gene homologous to *Drosophila* cuticle genes. *J. Mol. Biol.* **203**, 411-423.

**Ritchie, H. H. and Wang, L.-H.** (1996). Sequence determination of an extremely acidic rat dentin phosphoprotein. *J. Biol. Chem.* **271**, 21695-21698.

- Rusenko, K. W., Donachy, J. E. and Wheeler, A. P.** (1991). Purification and characterization of a shell matrix phosphoprotein from the American oyster. In: *Surface Reactive Peptides and Polymers: Discovery and Commercialization*. Sikes, C. S. and Wheeler, A. P. (eds.). *ACS Books*, Washington, DC, pp. 108-124.
- Samata, T., Hayashi, N., Kono, M., Hasegawa, K., Horita, C. and Akera, S.** (1999). A new matrix protein family related to the nacreous layer formation of *Pinctada fucata*. *FEBS Lett.* **462**, 225-229.
- Sanger, F. S., Nicklen, S. and Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 5463-5467.
- Sarashina, I. and Endo, K.** (1998). Primary structure of a soluble matrix protein of scallop shell: implication for calcium carbonate biomineralisation. *Am. Mineral.* **83**, 1510-1515.
- Sass, R. L. and Marsh, M. E.** (1983). N and N histidinoalanine: naturally occurring cross-linking amino acids in calcium-binding phosphoproteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **114**, 304-309.
- Shapiro, I. M. and Boyde, A.** (1984). Microdissection-elemental analysis of the mineralizing growth cartilage of the normal and rachitic chick. *Metab. Bone Disc. Relat. Res.* **5**, 317-326.
- Shen, X., Belcher, A., Hansma, P., Stucky, G. and Morse, D.** (1997). Molecular cloning and characterization of Lustrin A, a matrix protein from shell and pearl nacre of *Haliotis rufescens*. *J. Biol. Chem.* **272**, 32472-32481.
- Silve, C., Lopez, E., Vidal, B., Smith, D. C., Camprasse, G., Camprasse, S. and Couly, G.** (1992). Nacre initiates biomineralization by human osteoblasts maintained in vitro. *Calcif. Tissue Int.* **51**, 363-369.
- Simkiss, K.** (1986). The processes of biomineralization in lower plants and animals - an overview. In: *Biomineralization in Lower Plants and Animals*. Leadbeater, B. S. C. and Riding, R. (eds.). *Clarendon Press*, Oxford, pp. 19-37.

**Simkiss, K. and Wilbur, K.** (1989). Crustacea. The dynamics of epithelial movements. In: *Biomineralization. Cell Biology and Mineral Deposition. Academic Press, San Diego, CA*, pp. 205-229.

**Stevenson, J.** (1985). Dynamics of the integument. In: *The biology of Crustacea, 9. Academic Press, San Diego, CA*, pp. 1-42.

**Southern, E.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-507.

**Sucov, H., Benson, S., Robinson, J., Britten, R., Wilt, F. and Davidson, E.** (1987). A lineage specific gene encoding a major matrix protein of the sea urchin embryo spicule. II. Structure of the gene and derived sequence of the protein. *Dev. Biol.* **120**, 507-519.

**Sudo, S., Fujikawa, T., Nagakura, T., Ohkubo, T., Sakaguchi, K., Tanaka, M. and Nakashima, K.** (1997). Structures of mollusc shell framework proteins. *Nature* **387**, 563-564.

**Takagi, Y., Ishii, K., Ozaki, N. and Nagasawa, H.** (2000). Immunolocalization of gastroliths matrix protein (GAMP) in the gastroliths and exoskeleton of crayfish, *Procambarus clarkii*. *Zool. Sci.* **17**, 179-184.

**Termine, J. D., Kleinman, H. D., Whiston, W. S., Conn, K. M., McGarvey, M. L. and Martin, G. R.** (1981). Osteonectin, a bone specific-protein linking mineral to collagen. *Cell* **26**, 99-105.

**Testenièrè, O.** (1998). Caractérisation d'une calciprotéine du crustacé *Orchestia cavimana*. Etude de l'expression spatio-temporelle et de la régulation hormonale du gène. Thèse de Doctorat de l'Université de Bourgogne, 1-131.

**Testenièrè, O., Hecker, A., Le Gurun, S., Quennedey, B., Graf, F. and Luquet, G.** (2002). Characterization and spatiotemporal expression of *orchestin*, a gene encoding an ecdysone-inducible protein from a crustacean organic matrix. *Biochem. J.* **361**, 327-335.

**Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfert of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 4350-4354.

**Travis, D. F.** (1960). The deposition of skeletal structures in the crustacea. I. The histology of the gastrolith skeletal tissue complex and the gastrolith in the crayfish, *Orconectes* (*Cambarus*) *virilis* Hagen-Decapoda. *Biol. Bull.* **118**, 137-149.

**Tsutsui, N., Ishii, K., Takagi, Y., Watanabe, T. and Nagasawa, H.** (1999). Cloning and expression of a cDNA encoding an insoluble matrix protein in the gastroliths of a crayfish, *Procambarus clarkii*. *Zool. Sci.* **16**, 619-628.

**Urry, L., Hamilton, P., Killian, C. and Wilt, F.** (2000). Expression of spicule matrix proteins in the sea urchin embryo during normal and experimentally altered spiculogenesis. *Dev. Biol.* **225**, 201-213.

**Veis, R. and Perry, A.** (1967). The phosphoprotein of the dentin matrix. *Biochemistry* **6**, 2409-2416.

**Veis, A., Stetler-Stevenson, W., Tagagi, Y, Sabsay, B. and Furlerton, R.** (1981). The nature and localisation of the phosphorylated proteins of mineralized dentin. In: *The Chemistry and Biology of Mineralized Connectives Tissues*. Veis, A. (ed.). Elsevier, New York and Amsterdam, 377-387.

**Veis, D. J., Albinger, T. M., Clohisy, J., Rahima, M., Sabsay, B. and Veis, A.** (1986). Matrix proteins of the teeth of the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *J. Exp. Zool.* **240**, 35-46.

**Waite, J. H., Saleuddin, A. S. M. and Anderson, S. O.** (1979). Periostracin - a soluble precursor of sclerotized periostracum in *Mytilus edulis* L. *J. Comp. Physiol.* **130**, 301-307.

**Wang, R. and Chait, B. T.** (1994). High-accuracy mass measurement as a tool for studying proteins. *Curr. Op. Biotech.* **5**, 77-84.

**Watanabe, T., Persson, P., Endo, H. and Kono, M.** (2000). Molecular analysis of two genes *DD9A* and *B*, which are expressed during the postmolt stage in the decapod crustacean *Penaeus japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol.* **125B**, 127-136.

**Weber, K., Pringle, J. R. and Osborn, M.** (1972). Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gel. *Methods Enzymol.* **26**, 3-27.

**Weiner, S.** (1979). Aspartic-acid rich proteins: Major components of the soluble organic matrix of mollusk shells. *Calcif. Tissue Int.* **29**, 163-167.

**Weiner, S.** (1984). Organization of organic matrix components in mineralized tissues. *Amer. Zool.* **24**, 945-951.

**Weiner, S.** (1986). Organization of extracellularly mineralized tissues: A comparative study of biological crystal growth. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **20**, 163-167.

**Weiner, S. and Addadi, L.** (1997). Design strategies in mineralized biological materials. *J. Mater. Chem.* **7**, 689-702.

**Weiner, S. and Traub, W.** (1980). X-Ray diffraction study of the insoluble organic matrix of mollusk shells. *FEBS Lett.* **111**, 311-316.

**Weiner, S., Talmon, Y. and Traub, W.** (1983a). Electron diffraction of mollusk shell organic matrices and their relationship to the mineral phase. *Int. J. Biol. Macromol.* **5**, 325-328.

**Weiner, S., Traub, W. and Lowenstam, H. A.** (1983b). Organic matrix in calcified exoskeletons. In: *Biom mineralization and Biological Metal Accumulation*. Westbroek, P. and De Jong, E. W. (eds.). pp. 205-224.

**Weiss, I. M., Kaufmann, S., Mann, K. and Fritz, M.** (2000). Purification and characterization of Perlucin and Perlustrin, two new proteins from the shell of the mollusc *Haliotis laevigata*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **267**, 17-21.

- Weiss, I. M., Göhring, W., Fritz, M. and Mann, K.** (2001). Perlustrin, a *Haliotis laevigata* (abalone) nacre protein is homologous to the insulin-like growth factor binding protein N-terminal module of Vertebrates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**, 244-249.
- Wheeler, A. P., George, J. W. and Evans, C. A.** (1981). Control of calcium carbonate nucleation and crystal growth by soluble matrix of oyster shell. *Science* **212**, 1397-1398.
- Wilbur, K. M.** (1984) Many minerals, several phyla and a few considerations. *Am. Zool.* **24**, 839-845.
- Wilt, F.** (1999). Matrix and mineral in the sea urchin larval skeleton. *J. Struct. Biol.* **12**, 216-226.
- Wood, R., Grotzinger, J. P. and Dickson, J. A. D.** (2002). Proterozoic modular biomineralized metazoan from the Nama group, Namibia. *Science* **296**, 2383-2386.
- Wray, W., Boulikas, T., Wray, V. P. and Hancock, R.** (1981). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **118**, 197-203.
- Yao, T. P., Forman, B. M., Jiang, Z., Cherbas, L., Chen, J. D., McKeown, M., Cherbas, P. and Evans, R. M.** (1993). Functional ecdysone receptor is the product of *EcR* and *Ultraspiracle* genes. *Nature* **366**, 476-479.



## *Références Bibliographiques Personnelles*

## Références Bibliographiques Personnelles

**Testenière, O., Hecker, A., Le Gurun, S., Quenedey, B., Graf, F. and Luquet, G.** (2002). Characterization and spatiotemporal expression of *orchestin*, a gene encoding an ecdysone-inducible protein from a crustacean organic matrix. *Biochem. J.* **361**, 327-335.

**Raz, S., Testenièrè, O., Hecker, A., Weiner, S., and Luquet, G.** (2002). Stable amorphous calcium carbonate is the main component of the calcium storage structures of the crustacean *Orchestia cavimana*. *Biol. Bull.* **203**, 269-274.

**Hecker, A., Testenière, O., Marin, F. and Luquet, G.** (2003). Phosphorylation of serine residues is fundamental for the calcium-binding ability of Orchestin, a soluble matrix protein from crustacean calcium storage structures. *FEBS Lett.* **535**, 49-54.

**Hecker, A., Quenedey, B., Quenedey, A., Testenière, O., Graf, F. and Luquet, G.** Orchestin, a calcium-binding phosphoprotein is a matrix component of two successive transitory calcified biomineralizations elaborated cyclically by a terrestrial crustacean (sommise).

## *Liste des Figures et des Tableaux*

## Listes des Figures et des Tableaux

**Figure n° 1:** La minéralisation biologiquement contrôlée (page 6)

**Figure n° 2:** *Orchestia cavimana* (page 20)

**Figure n° 3:** Subdivision en périodes et stades du cycle de mue d'*O. cavimana* mâle adulte (page 20)

**Figure n° 4:** Radiographie montrant *in situ* les cæcums postérieurs chargés de concrétions calcaires juste avant l'exuviation (page 20)

**Figure n° 5:** Localisation et organisation des cæcums postérieurs chez *O. cavimana* en intermue (page 22)

**Figure n° 6:** Représentation dynamique des différenciations des cellules cæcales au cours d'un cycle de mue d'*O. cavimana* (page 22)

**Figure n° 7:** Aspect et structure des sphérolithes (page 24)

**Figure n° 8:** Micrographie (MET) montrant le transit calcique au niveau de l'épithélium cæcal s'effectuant essentiellement par la voie extracellulaire (page 24)

**Figure n° 9:** Schéma montrant l'évolution des cæcums au cours d'un cycle de mue avec l'élaboration puis la régression des concrétions calcaires (page 24)

**Figure n° 10:** Mise en évidence et caractérisation d'un marqueur période-spécifique (page 26)

**Figure n° 11 :** Séquence du gène *orchestine*, de l'ADNc correspondant et de la séquence en acides-aminés déduite (page 28)

**Figure n° 12:** Extrémité du périopode 3 d'*O. cavimana* mâle adulte parvenu au stade D<sub>3</sub> du cycle de mue (page 30)

**Figure n° 13:** Stratégie utilisée pour la production de la protéine recombinante puis des anticorps polyclonaux (page 35)

**Figure n° 14:** Analyse du nombre de copies et étude du polymorphisme du gène *orchestine* par Southern blotting/hybridation (page 49)

**Figure n° 15:** Analyse de l'expression du clone pQE-30 [Orchestine] par SDS-PAGE 12% (page 51)

**Figure n° 16:** Contrôle de la spécificité de l'anticorps polyclonal anti-Orchestine (page 51)

**Figure n° 17:** Analyse de l'expression du clone pQE-30 [(Asp)<sub>4</sub>Lys-Orchestine] par SDS-PAGE 12% (page 56)

**Figure n° 18:** Analyse électrophorétique (SDS-PAGE) du clivage de la queue histidine portée par la protéine recombinante produite par le clone pQE-30 [(Asp)<sub>4</sub>Lys-Orchestine] (page 56)

**Figure n° 19:** Carte des polypeptides de la fraction soluble des concrétions calcaires séparés par électrophorèse bidimensionnelle (page 58)

**Figure n° 20:** Etude des phosphorylations portées par la protéine Orchestine (page 60)

**Figure n° 21:** Etude de l'aptitude à fixer le calcium des protéines Orchestine native, Orchestine déphosphorylée et de la protéine recombinante clivée (page 60)

**Figure n° 22:** Etude de l'aptitude à fixer le calcium par la protéine Orchestine après déphosphorylation (page 62)

**Figure n° 23:** Cinétique de dégradation de la protéine Orchestine par la carboxypeptidase B (page 63)

**Figure n° 24:** Région C-terminale d'Orchestine et sites de clivage par la carboxypeptidase B (peptidyl-L-lysine (L-arginine) hydrolase) (page 63)

**Figure n° 25:** Contrôle de l'aptitude à fixer le calcium de la protéine Orchestine après purification (page 65)

**Figure n° 26:** Etude de l'effet de la protéine Orchestine purifiée sur la précipitation *in vitro* du carbonate de calcium (page 65)

**Figure n° 27:** Etude de la spécificité de l'anticorps sur les protéines totales des cæcums postérieurs d'animaux situés en période postexuviale, en intermue ou en période préexuviale. (page 71)

**Figure n° 28:** Expression temporelle de la protéine Orchestine au cours d'un cycle de mue (page 71)

**Figure n° 29:** Immunolocalisation de la protéine Orchestine dans des cæcums postérieurs d'*O. cavimana* prélevés à différents stades du cycle de mue (MO) (pages 73 et 74)

**Figure n° 30:** Immunolocalisation de la protéine Orchestine dans des cæcums postérieurs d'*O. cavimana* prélevés en période préexuviale (MO et MET) (pages 75 et 76)

**Figure n° 31:** Immunolocalisation de la protéine Orchestine dans des cæcums postérieurs d'*O. cavimana* prélevés en période postexuviale (MO et MET) (pages 78 et 79)

**Figure n° 32:** Coupes de sphérolithes simples d'*Orchestia cavimana* (MEB) (page 85)

**Figure n° 33:** Coupes de sphérules calciques (MET) (page 85)

**Figure n° 34:** Représentation schématique d'une section de matrice organique de mollusque montrant le cœur de la matrice recouverte d'une couche constituée de protéines acides (page 87)

**Figure n° 35:** Représentation schématique du modèle conformationnel à deux états ("Two State Model") des calciprotéines de la matrice organique de l'os (page 87)

**Figure n° 36:** Proposition de modèle expliquant la formation des couches concentriques des concrétions calcaires (page 89)

**Tableau n° 1:** Liste récapitulative des protéines de matrice organique caractérisées chez les Invertébrés (page 11)

## Résumé

Comme la plupart des Crustacés, *Orchestia cavimana* possède un exosquelette minéralisé qu'il renouvelle cycliquement. Du fait des mœurs terrestres de cet animal, ces cycles de mue sont associés à des processus de stockage et de résorption de calcium. Le stockage a lieu sous forme de concrétions calcaires au niveau de diverticules de l'intestin moyen appelés cæcums postérieurs. Les concrétions calcaires sont essentiellement constituées de carbonate de calcium amorphe précipité au sein d'une matrice organique comprenant une fraction protéique soluble et une autre insoluble dans un tampon contenant de l'EDTA. Des résultats précédents ont permis de mettre en évidence, parmi les constituants de la fraction soluble, une protéine acide de masse apparente en SDS-PAGE de 23 kDa qui a été appelée Orchestine. Cette protéine, dont le gène a été cloné et séquencé, n'est pas glycosylée et fixe le calcium.

Le but de ce travail a été de poursuivre la caractérisation de ce marqueur protéique. Pour ce faire, nous avons montré qu'Orchestine est phosphorylée sur des résidus sérine et tyrosine. Afin d'étudier les relations entre ces phosphorylations et l'aptitude de la protéine à fixer le calcium, nous avons produit une protéine recombinante dépourvue de toute modification post-traductionnelle. La comparaison de l'aptitude à fixer le calcium des protéines native, native déphosphorylée par diverses phosphatases spécifiques, et recombinante nous a permis de conclure à l'importance fondamentale des sérines dans cette aptitude. De plus, Orchestine interfère dans la croissance *in vitro* de cristaux de carbonate de calcium. D'autre part, la protéine recombinante nous a permis de lever l'ambiguïté de la divergence de masse moléculaire de la protéine observée en SDS-PAGE (de 23 kDa) et de celle déduite de la séquence (de 12,4 kDa) et de conclure à la correspondance gène *orchestine*-protéine Orchestine. Enfin la protéine recombinante a été utilisée pour la production d'un anticorps polyclonal afin de localiser Orchestine dans les structures biominéralisées élaborées par *O. cavimana* lors de son cycle de mue. Orchestine semble non seulement localisée dans les couches non minéralisées des concrétions calcaires (structures de réserve du calcium) mais aussi dans celles des sphérules calciques (structures permettant la remobilisation du calcium).

Les propriétés ainsi mises en évidence nous conduisent à envisager qu'Orchestine est une molécule-clé dans la formation des structures de stockage et déstockage élaborées de manière cyclique par *O. cavimana*.

Biominéralisation, Calciprotéine, Métabolisme calcique, *Orchestia cavimana*, Orchestine, Phosphorylations

## Abstract

As most Crustaceans, *Orchestia cavimana* possesses a mineralized exoskeleton which is periodically replaced. Because of the terrestrial behaviours of this animal, this molting cycle is related to calcium storage and resorption processes. Calcium storage occurs, as calcareous concretions, in diverticula of the midgut called posterior cæca. Calcareous concretions are essentially composed of amorphous calcium carbonate precipitated within a proteinaceous organic matrix composed of a soluble fraction and an insoluble one in an EDTA-buffer. Among the soluble components of the organic matrix, a previous study led to characterize a polypeptide of 23 kDa in SDS-PAGE called Orchestin. This protein, whose gene has been cloned and sequenced, is unglycosylated and binds calcium.

The aim of this work was to further characterize this protein marker. The results obtained demonstrated that Orchestin is phosphorylated on serine and threonine residues. In order to study the relation between these phosphorylations and the calcium-binding ability of this protein, we produced a recombinant protein devoid of post-translational modification. The comparison of the calcium-binding ability of the native, dephosphorylated (by specific phosphatases) and recombinant proteins led us to show that phosphorylations on the serine residues are of great importance in this ability. Moreover, Orchestin interacts with calcite crystal growth in an *in vitro* precipitation experiment. On the other hand, the recombinant protein permitted us to explain the discrepancy of molecular masses observed between the native (23 kDa) and sequence deduced (12,4 kDa) proteins. We could thus conclude to the correspondence between the gene *orchestin* and the protein Orchestin. Finally the recombinant protein was used to produce antibodies in order to locate Orchestin in the biomineralized structures elaborated by *O. cavimana* during its molting cycle. Orchestin is not only located in the non-mineralized layers of the calcareous concretions (storage structures) but also in the same layers of the calcified spherules (mineralized structures elaborated after ecdysis to resorb the stored calcium).

The physical-chemical features exhibited by Orchestin strongly suggest that this calcium-binding phosphoprotein is a key-molecule in the formation of the storage and reabsorption mineralized structures cyclically elaborated by *O. cavimana*.

Biomineralization, Calciprotein, Calcium metabolism, *Orchestia cavimana*, Orchestin, Phosphorylations