



Evolution des biominéralisations nacrées chez les mollusques : caractérisation moléculaire des matrices coquillières du céphalopode nautiloïde *Nautilus macromphalus* et du bivalve paléohétérodonte *Unio pictorum*

Benjamin Marie

► **To cite this version:**

Benjamin Marie. Evolution des biominéralisations nacrées chez les mollusques : caractérisation moléculaire des matrices coquillières du céphalopode nautiloïde *Nautilus macromphalus* et du bivalve paléohétérodonte *Unio pictorum*. Interactions entre organismes. Université de Bourgogne, 2008. Français. NNT : . tel-00463355

HAL Id: tel-00463355

<https://theses.hal.science/tel-00463355>

Submitted on 11 Mar 2010

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.

Université de Bourgogne – Dijon

UMR 5561/CNRS – Biogéosciences

École doctorale ED n°490

THÈSE DE DOCTORAT

Présentée par

Benjamin MARIE

Pour l'obtention du titre de :

Docteur de l'Université de Bourgogne

En Biologie Évolutive

**Évolution des biominéralisations nacrées chez les mollusques :
caractérisation moléculaire des matrices coquillières du
céphalopode nautiloïde *Nautilus macromphalus* et du bivalve
paléohétérodonte *Unio pictorum***

Soutenue le 14 Mai 2008

MEMBRES DU JURY

Mr J.-M. LEBEL	Professeur	Université de Caen	Rapporteur
Mr C. MILET	MCU	Muséum National d'Histoire Naturelle	Rapporteur
Mr D. ALLEMAND	Professeur	Université de Nice	Examineur
Mr P. NEIGE	Professeur	Université de Bourgogne	Examineur
Mr G. LUQUET	MCU	Université de Bourgogne	Directeur
Mr F. MARIN	CR1	CNRS/Université de Bourgogne	Co-directeur

Tout d'abord, un grand merci au Docteur Frédéric Marin et au Docteur Gilles Luquet (UMR 5561 CNRS) qui m'ont permis d'entreprendre ce travail de thèse et qui l'ont attentivement dirigé durant ces trois années. Merci pour votre enseignement scientifique, pour m'avoir fait découvrir le monde des biominéralisations, ainsi que pour vos qualités humaines, et pour m'avoir porté jusqu'ici.

J'exprime toute ma gratitude au Professeur Jean-Marc Lebel (UMR 100 IFREMER) et au Docteur Christian Milet (UMR 5178 CNRS/MNHN) qui m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de ma thèse. Je tiens également à remercier chaleureusement le Professeur Denis Allemand (Centre scientifique de Monaco) et le Professeur Pascal Neige (UMR 5561 CNRS) pour avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.

Je tiens également à remercier pour leur accueil au sein de leur laboratoire, les Professeurs Bruno David et Pascal Neige, directeurs successifs de l'UMR CNRS 5561, Biogéosciences.

Je voudrais tout spécialement remercier le Docteur Arul Marie, Lionel Dubost (Département RDDM MNHN) et le Docteur Jean-Paul Pais de Barros (U 498 INSERM) pour m'avoir si amicalement accueilli dans leurs laboratoires, pour leurs enseignements et leurs expertises scientifiques.

J'adresse aussi mes sincères remerciements au Docteur Laurent Bédouet (UMR 5178 CNRS/MNHN) pour son aide et ses conseils, ainsi que pour sa lecture attentive et critique de mes travaux.

Je remercie le Professeur Danielle Ballivet-Tkatchenko et le Docteur Laurent Plasseraud (UMR 5188 CNRS), pour leur accueil, leur aide pour mesurer les spectres d'infrarouges et pour le temps qu'ils m'ont toujours si gentiment accordé.

Many thanks to the Professor Davorin Medakovic (Center for Marine Research Rovinj) for inviting me in his laboratory and for the abundant and always enthusiastic discussions we had in Rovinj or in Dijon.

Je tiens à remercier le Docteur Danièle Gaspard (Université Paris-Sud) sans qui la partie de ce travail sur les brachiopodes n'aurait pu se réaliser.

Je remercie vivement le Docteur Christophe Fleury et le Docteur Antoine Serpentine (UMR 100 IFREMER) pour m'avoir permis de participer à leurs travaux.

Mes remerciements vont également au Professeur Gérard Alcaraz et à Sylvain Morel (UPSP PROXISS ENESAD) pour leur aide et leur participation à ce travail.

Je voudrais également remercier Nathalie Guichard (UMR 5561 CNRS) pour son aide précieuse et pour ses nombreuses contributions techniques à mes travaux.

Merci également au Docteur Loïc Bollache (UMR 5561 CNRS) pour l'intérêt qu'il a toujours montré pour mon travail, ainsi que pour son aide lors des parties de chasse aux Unios.

Merci au Docteur Jean Lévêque et au Docteur Olivier Mathieu (UMR 5561 CNRS) pour leur contribution apportée aux mesures biogéochimiques. Merci à Claudie Josse (Laboratoire de Réactivité des Solides, UB) pour son aide précieuse pour la manipulation du MEB.

Un énorme merci à Manon Quiquand (Université de Genève), qui telle la providence, a su penser à son bon vieux pote à un moment si opportun et pour un séjour si agréable.

Merci également au Docteur Brigitte Gaillot (Université de Genève) pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour avoir accepté de signer la lettre sans laquelle je n'aurais pu entamer ce travail.

Merci à tous mes collègues de l'UB, ceux qui ont partagé avec moi leur bureau, leurs repas, leurs soirées et d'autres moments agréables... Merci tout spécial à Vincent, ne change rien.

Je voudrais dédier ce travail à toute ma famille qui, sans condition, a toujours soutenu mes choix et m'a toujours encouragé à développer ma curiosité pour les petites bestioles... Merci à mes parents, sans vous, je n'aurais jamais su appréhender la liberté, mais aussi la rigueur nécessaire à cette aventure.

Je dédie également ces quelques lignes à Melvil, qui a su transformer les longues soirées de rédaction en moments si délectables et à qui j'espère la lecture (prochaine) de ce manuscrit inspirera une soif toujours insatiable de découvertes et d'émerveillements.

Mathilde, merci pour TOUT

Liste des publications et communications

Revues à comité de lecture :

Marie B., Luquet G., Pais De Barros J.-P., Guichard N., Morel S., Alcaraz G., Bollache L. & Marin F. (2007) The shell matrix of the Unionoid freshwater mussel *Unio pictorum*: Acidic polysaccharides of matrix glycoproteins involves in mineralization of nacre. *FEBS J.* **274**, 2933-2945.

Marin F., Luquet G., Marie B. & Medakovic D. (2008) Molluscan shell proteins: primary structure, origin and evolution. *Cur. Top. Dev. Biol.* **80**, 209-276.

Gaspard D., Marie B., Marin F. & Luquet G. (2008) Biochemical characteristics of the soluble organic matrix from the shell of three recent Terebratulid Brachiopod species. *Fossils & Strata* **54**, 269-275.

Fleury C., Marin F., Marie B., Luquet G., Thomas G., Josse C., Serpentine A. & Lebel J.-M. (2008) Shell repair process in the green ormer *Haliotis tuberculata*: a histological and microstructural study. *Tissue Cell* **40**, 207-218.

Marie B., Marin F., Marie A., Bédouet L., Dubost L., Alcaraz G., Milet C. & Luquet G. Evolution of nacre: biochemistry and 'shellomics' of the shell organic matrix of the cephalopod *Nautilus macromphalus*. (Soumis à *J. Biol. Chem.*)

Marie B., Luquet G., Bédouet L., Milet C., Medakovic D. & Marin F. Nacre calcification in the freshwater mussel *Unio pictorum*: carbonic anhydrase activity and purification of a 95-kDa calcium-binding glycoprotein. (Soumis à *ChemBiochem.*)

Marie B., Laratte S., Luquet G., Durlot C., Alcaraz G. & Marin F. Paleobiochemistry of nacre: characterisation of well preserved shells of an eocene freshwater bivalve (Palaeoheterodonta: Unionoida). (en préparation pour *Biogeosciences*).

Proceedings avec comité de lecture :

Marie B., Guichard N., Luquet G. & Marin F. (2007) Calcification in the shell of the freshwater bivalve *Unio pictorum*, In *Biomineralization: from Paleontology to Materials Science - Proceedings of the 9th International Symposium on Biomineralization* (Eds. Arias J.-L. & Fernandez M. S.), Editorial Universitaria, Santiago Chile, pp. 273-280.

Gaspard D., Marie B., Marin F. & Luquet G. (2007) Biochemical characteristics of the shell soluble organic matrix of some recent rhynchonelliformea (Brachiopoda), In *Biomineralization: from Paleontology to Materials Science - Proceedings of the 9th International Symposium on Biomineralization* (Eds. Arias J.-L. & Fernandez M. S.), Editorial Universitaria, Santiago Chile, pp. 193-204.

Marin F., Morin V., Knap F., Guichard N., Marie B., Luquet G., Westbroek P. & Médakovic D. (2007) Caspartin: Thermal stability and occurrence in mollusk calcified tissues, In *Biomineralization: from Paleontology to Materials Science - Proceedings of the 9th International Symposium on Biomineralization* (Eds. Arias J.-L. & Fernandez M. S.), Editorial Universitaria, Santiago Chile, pp. 281-288.

Luquet G., Fernandez M. S., Arias J.-L., Guichard N., Marie B. & Marin F (2007). Biochemical characterization of the soluble organic matrix of gastroliths from decapods, In *Biom mineralization: from Paleontology to Materials Science - Proceedings of the 9th International Symposium on Biom mineralization* (Eds. Arias J.-L. & Fernandez M. S.), Editorial Universitaria, Santiago Chile, pp. 319-328.

Communications scientifiques :

2007. 10^{ème} JFBTM, Université Jules Verne, Amiens France.

Marie B., Luquet G., De Barros J.-P., Guichard N., Morel S., Alcaraz G. & Marin F. Etude de la matrice organique de la coquille du bivalve *Unio pictorum* : implications de polysaccharides associés aux glycoprotéines dans la minéralisation de la nacre. *Communication orale* (obtention d'une bourse).

Fleury C., Marin F., Serpentine A., Marie B., Luquet G. & Lebel J.-M. Variation de l'expression des transcrits d'un collagène fibrillaire et d'un collagène non fibrillaire au cours de la réparation de la coquille du mollusque gastéropode *Haliotis tuberculata*. *Communication affichée*.

2006. Réunion des sciences de la terre. Université de Bourgogne, Dijon France.

Marie B., Luquet G., Marin F. Etude de la calcification de la nacre chez les mollusques. *Communication orale*.

2006. Gordon Conference on Biom mineralization. Colby Sawyer College, New London, NH, USA.

Marie B., Guichard N., Pais De Barros J.-P., Luquet G. & Marin F. Calcification of the nacreous layer in the shell of the bivalve *Unio pictorum*, *Communication affichée*.

2006. 2ème congrès commun SFTC/JFBTM. Université Claude Bernard, Lyon France

Marie B., Guichard N., Pais De Barros J.-P., Luquet G. & Marin F. Calcification de la coquille chez le bivalve d'eau douce *Unio pictorum*, *Communication affichée*.

Luquet G., Fernandez M. S., Navarette M. J., Arias J.-L., Guichard N., Marie B. & Marin F. Caractérisation biochimique de la matrice organique de gastrolithes de crustacés décapodes, *Communication affichée*.

Marin, F., Gaspard, D., Alcaraz, G., Morel, S., Marie, B., Guichard, N., Luquet, G. Biochimie des matrices coquillères calcifiantes chez les brachiopodes Rhynchonelliformea, *Communication affichée*.

2006. Journées de la Société Française de Minéralogie et Cristallographie. ENSG, Nancy France.

Marie B., Guichard N., Pais De Barros J.-P., Luquet G. & Marin F. Calcification de la coquille chez le bivalve d'eau douce *Unio pictorum*, *Communication affichée*.

2005. 8èmes Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés (JFBTM). Le Croisic, France

Marie B., Guichard N., Luquet G. & Marin F. Calcification de la coquille chez le bivalve d'eau douce *Unio pictorum*. *Communication affichée*. (Obtention d'une bourse)

Marin, F., Morin, V., Marie, B., Guichard, N., & Luquet, G. Immunologie, taxonomie et microstructures coquillères chez les mollusques. *Communication affichée*.

2005. 4th European Conference on Marine Natural Products. MNHN Paris, France.

Marie, B., Guichard, N., Luquet, G. & Marin, F. Molluscan shell proteins. *Communication affichée*.

2005. 5th International Brachiopod Congress. Copenhagen, Danemark.

Gaspard D., Marie B., Marin F. & Luquet G. Preliminary analysis of soluble organic matrix in some recent terebratulid Brachiopoda. *Communication orale de D. Gaspard*.

2005. 9th International Symposium on Biom mineralization. Pucon, Chili.

Marie B., Guichard N., Luquet G. & Marin F. Calcification in the Shell of the Freshwater Bivalve *Unio pictorum*, *Communication affichée*.

Gaspard D., Marie B., Marin F. and Luquet G. Biochemical Characteristics of the Shell Soluble Organic Matrix of Some Recent Terebratulid Brachiopods, *Communication orale de D. Gaspard*.

Luquet G., Fernandez M.S., Arias J.-L., Guichard N., Marie B. and Marin F. Biochemical Characterization of the Soluble Organic Matrix of Gastroliths from Decapods, *Communication orale de G. Luquet*.

Abréviations

AA:	acides aminés
ADN:	acide désoxyribonucléique
ADNc:	ADN complémentaire
ADNr:	ADN ribosomal
AIM:	« acido-insoluble matrix », matrice acido-insoluble
ARN:	acide ribonucléique
ARNm:	ARN messenger
ARN polyA:	ARN poly-adénylé
ASM:	« acido-soluble matrice », matrice acido-soluble
BCA:	« bicinchoninic acid », acide bicinchoninique
BLAST:	« basic local alignment search tool »
BMP:	« bone morphogenic protein »
BSA:	« bovin serum albumin », sérum albumine bovine
CBB:	« Coomassie brilliant blue », bleu de Coomassie
CHAPS:	3-[(3-chloramidopropyl)diméthylammonio]-1-propane sulfonate
DMB:	1,9- dimethylmethylene blue
DTT:	dithiothréitol
EDTA:	acide éthylènediaminetétraacétique
ELISA:	« enzyme-linked immunosorbent assay », dosage immuno-enzymatique sur support solide
ESI:	« electrospray injection », injection par électrospray
EST:	« expressed sequence tag », étiquette de séquences exprimées
FTIR:	« Fourier transform infra red », transformation de Fourier des infrarouges
GAG:	glycoaminoglycane
HRP:	« horse radish peroxidase », peroxydase de raifort
IEF:	« isoelectric focusing », focalisation isoélectrique
IGF:	« insulin growth factor », facteur de croissance de type insuline
IPG:	« immobilized pH gradient », gradient de pH immobilisé
kDa:	kilo Dalton
KRMP:	« lysine-rich matrix protein », protéine de matrice riche en lysine
LC:	« liquid chromatography », chromatographie en phase liquide
M.A.:	Million d'années

MEB:	microscopie électronique à balayage
MS:	« mass spectrometry », spectrométrie de masse
MSI:	« molluscan shell insoluble », protéine insoluble de coquille de mollusque
PAGE:	« polyacrylamide gel electrophoresis », électrophorèse sur gel de polyacrylamide
PAS:	« periodoc acid-Schiff », acide périodique-Schiff
pH:	potentiel hydrogène
pI:	point isoélectrique
p.p.m.:	particules par millions
PVDF:	« polyvinylidene difluoride », difluorure de polyvinylidène
qTOF:	quadripôle associé au TOF
r.p.m.:	rotations par minute
RT:	« reverse transcription », transcription inverse
RX:	rayons X
SDS:	« sodium dodecyl sulfate », dodécyl sulfate de sodium
Stains-All:	1-éthyl-2-[3-(1-éthyl-napto[1,2d]thiazolin-2-ylidène)-2-méthylpropenyl] naphto[1,2d] thiazolium bromide
TBS:	« Tris-buffer saline », tampon Tris salin
TFA:	« trifluoro acetic acid », acide trifluoro acétique
TFMS:	« trifluoromethane sulfonic acid », acide trifluorométhane sulfonique
TOF:	« time of flight », temps de vol
Tris:	tris-(hydroxyméthyl) amino méthane
Tween 20:	polyoxyéthylènesorbitan monolaurate
v/v:	volume par volume
w/w:	« weight for weight », masse par masse
U.V.:	rayonnements ultraviolets

Tableau des acides aminés

Acide aminé	Code 3-lettres	Code 1-lettre	Polarité	Charge
Alanine	Ala	A	Non polaire	Neutre
Arginine	Arg	R	Polaire	Basique
Asparagine	Asn	N	Polaire	Neutre
Acide aspartique	Asp	D	Polaire	Acide
Cystéine	Cys	C	Non polaire	Neutre
Acide glutamique	Glu	E	Polaire	Acide
Glutamine	Gln	Q	Polaire	Neutre
Glycine	Gly	G	Non polaire	Neutre
Histidine	His	H	Polaire	Basique
Isoleucine	Ile	I	Non polaire	Neutre
Leucine	Leu	L	Non polaire	Neutre
Lysine	Lys	K	Polaire	Basique
Méthionine	Met	M	Non polaire	Neutre
Phénylalanine	Phe	F	Non polaire	Neutre
Proline	Pro	P	Non polaire	Neutre
Sérine	Ser	S	Polaire	Neutre
Thréonine	Thr	T	Polaire	Neutre
Tryptophane	Trp	W	Non polaire	Neutre
Tyrosine	Tyr	Y	Polaire	Neutre
Valine	Val	V	Non polaire	Neutre

Table des matières

Introduction générale	1
Chapitre I – Revue des connaissances	7
1 – Les biominéralisations	9
1.1 – Définition	9
1.2 – Séquence de la biominéralisation	11
1.3 – Diversité des fonctions biologiques	13
1.4 – Diversité des types de minéraux	16
1.5 – Les matrices organiques biominéralisantes	17
1.6 – Origine(s) de la(des) biominéralisation(s)	19
1.7 – Interactions avec l’environnement	22
2 – La biominéralisation chez les mollusques	23
2.1 – Les mollusques: généralités	23
2.2 – Différents types de biominéralisations chez les mollusques	25
2.3 – La calcification	27
2.4 – Les polymorphes du carbonate de calcium	28
2.5 – La coquille des mollusques	30
2.6 – Physiologie de la sécrétion de la coquille	32
2.7 – La matrice organique	35
2.7.1 – Les protéines fortement acides	40
2.7.2 – Les protéines modérément acides	43
2.7.3 – Les protéines neutres ou basiques	46
2.7.4 – Les protéines partiellement caractérisées	50
2.7.5 – Quelques remarques	53
2.8 – Aspects évolutifs	55
3 – La biominéralisation de la nacre	58
3.1 – Répartition de la nacre dans le phylum des Mollusca	58
3.2 – Généralités/description	58
3.3 – Les deux types de nacre	59
3.4 – La matrice organique de la nacre	62
4 – Acquis du chapitre et objectifs de la thèse	68
Chapitre II – La biominéralisation de la coquille chez <i>Unio pictorum</i>	71
1 – Introduction	73
1.1– Description, biologie et cycle de vie	73
1.2– Phylogénie et position taxonomique	75
1.3– Description de la coquille	77
1.4– Echantillonnage	79
1.5– But de l’étude	79

2 – Calcification in the shell of the freshwater bivalve <i>Unio pictorum</i> , In <i>Biom mineralization: from Paleontology to Materials Science - Proceedings of the 9th International Symposium on Biom mineralization</i> , Santiago Chile, pp.273-280.	81
3 – The shell matrix of the Unionoid freshwater mussel <i>Unio pictorum</i> : Acidic polysaccharides of matrix glycoproteins involves in mineralization of nacre. <i>FEBS J.</i> 274 , 2933-2945.	91
4 – Nacre calcification in the freshwater mussel <i>Unio pictorum</i> : carbonic anhydrase activity and purification of a 95-kDa calcium-binding glycoprotein. (<i>Soumis à ChemBiochem.</i>)	107
5 – Résultats complémentaires	119
5.1 – Variabilité intra- et inter-spécifique	119
5.2 – Le fluide extrapalléal	121
5.3 – Approche protéomique	122
5.4 – Construction d'une banque d'ADNc	124
6 – Les acquis des travaux effectués chez <i>Unio pictorum</i>	125
Chapitre III – La biominéralisation de la coquille chez <i>Nautilus macromphalus</i>	129
1 – Introduction	131
1.1– Description, biologie et cycle de vie	131
1.2– Phylogénie et position taxonomique	133
1.3– Description de la coquille	135
1.4– Echantillonnage	138
1.5– But de l'étude	138
2 – Evolution of nacre: biochemistry and 'shellomics' of the shell organic matrix of the cephalopod <i>Nautilus macromphalus</i> . (<i>Soumis à J. Biol. Chem.</i>)	141
3 – Résultats complémentaires	181
3.1 – Déprotéination de la matrice	181
3.2 – Purification des différents constituants de la matrice	182
4 – Les acquis des travaux effectués chez <i>Nautilus macromphalus</i>	183
Chapitre IV – La biominéralisation de la coquille chez les brachiopodes	185
1 – Introduction	187
1.1– Description, biologie et cycle de vie	187
1.2– Phylogénie et position taxonomique	188
1.3– Description de la coquille	190
1.4– Echantillonnage	191
1.5– But de l'étude	192
2 – Biochemical characteristics of the shell soluble organic matrix of some recent	193

Rhynchonelliformea (Brachiopoda), In <i>Biomineralization: from Paleontology to Materials Science - Proceedings of the 9th International Symposium on Biomineralization</i> , Santiago Chile, pp.193-204.	
3 – Biochemical characteristics of the soluble organic matrix from the shell of three recent terebratulid brachiopod species. <i>Fossils & Strata</i> 54 , 269-275.	207
4 – Les acquis des travaux effectués chez les brachiopodes	217
Conclusions et perspectives	219
Participation à d'autres travaux	233
1 – Molluscan shell proteins: primary structure, origin and evolution. <i>Cur. Top. Dev. Biol.</i> 80 , 209-276.	235
2 – Shell repair process in the green ormer <i>Haliotis tuberculata</i> : a histological and microstructural study. <i>Tissue Cell</i> 40 , 207-218.	237
3 – Biochemical characterization of the soluble organic matrix of gastroliths from decapods, In <i>Biomineralization: from Paleontology to Materials Science - Proceedings of the 9th International Symposium on Biomineralization</i> Santiago Chile, pp. 319-328.	239
4 – Caspartin: Thermal stability and occurrence in mollusk calcified tissues, In <i>Biomineralization: from Paleontology to Materials Science - Proceedings of the 9th International Symposium on Biomineralization</i> , Santiago Chile, pp. 281-288.	241
Techniques et protocoles d'analyses	243
1 – Préparation des biominéraux, mesures physiques et observations	245
2 – Extraction des matrices et mesures globales	246
3 – Analyses sur gel de polyacrylamide	249
4 – Tests d'interaction avec le carbonate de calcium	251
5 – Immuno-détection	253
6 – Purification des macromolécules des matrices	255
7 – Analyses par spectrométrie de masse	256
Références bibliographiques	259
Annexes	285

Introduction générale

Introduction générale

Au cours de l'histoire de la vie sur notre planète, les organismes vivants ont développé à de nombreuses reprises la capacité de transformer les ions minéraux en structures minérales rigides. Les processus qui permettent la formation de matériel inorganique par des organismes vivants sont définis par le terme de *biominéralisation*. Aujourd'hui, même si les structures biominéralisées sont absentes de nombreux taxons, elles sont largement répandues dans les trois règnes du vivant (eubactéries, archéobactéries et eucaryotes). Actuellement, on distingue plus de 60 types différents de minéraux pouvant être formés par des organismes. Depuis les structures microscopiques des bactéries, jusqu'aux formations macroscopiques que sont les coquilles, les os ou les récifs coralliens chez les métazoaires, l'évolution de la vie a vu apparaître des processus chimiques et biochimiques innovants, aboutissant à la synthèse et à la formation de constructions minéralisées fonctionnelles. La capacité à former des biominéraux a nécessité la mise en place de fonctionnalités adaptatives complexes, tant au niveau tissulaire qu'au niveau moléculaire. Les structures biominéralisées qui en résultent associent souvent des matériaux inorganiques et des matériaux organiques. En effet, une des propriétés communes à la majorité des biominéraux est la présence dans la phase minérale d'une matrice organique incluse, à laquelle on attribue généralement un rôle majeur dans le contrôle des processus de formation du bio-composite. Le terme biominéralisation (qui définit le domaine d'étude consistant à caractériser la formation, la structure et les propriétés des minéraux bioformés) est aussi bien utilisé pour désigner les processus de formation du biominéral que pour décrire le minéral bio-formé lui-même.

Parmi les nombreux biominéraux observés, les formations carbonatées occupent une place prépondérante dans le domaine des biominéralisations. Cela s'explique par leur importance quantitative dans les enregistrements géologiques, mais également à cause du nombre de taxons sécrétant des structures biominéralisées en carbonate de calcium. Parmi eux, les mollusques représentent un groupe majeur, tant par le nombre d'espèces produisant un exosquelette calcifié, par la diversité de leur organisation microstructurale, que par les différents polymorphes cristallins du carbonate de calcium dont ils contrôlent la formation.

Le travail entrepris et présenté dans cette thèse vise à étendre nos connaissances sur les adaptations fonctionnelles qui contrôlent la calcification mais également sur l'évolution de ces phénomènes à travers l'exemple de la coquille nacrée des mollusques.

Chez les mollusques, on a pu distinguer près de 17 types différents de biominéralisations aux fonctions et aux types de minéraux associés très variés. On peut citer parmi les exemples les plus connus les radulas oxydo-ferreuses, les granules de stockage de phosphate de calcium ou les coquilles calcifiées externes. Pour ces raisons, le phylum des mollusques est souvent cité comme le groupe taxonomique modèle privilégié pour l'étude des processus de biominéralisation. Bien que les coquilles de mollusques puissent être de formes et de tailles très variées, elles sont exclusivement formées de carbonate de calcium et contiennent très majoritairement de la calcite et/ou de l'aragonite. Lorsque ces deux minéraux sont présents dans la coquille, ils sont séparés spatialement en différentes couches superposées. Souvent, et en particulier chez les bivalves ptériomorphes, la partie extérieure minéralisée consiste en une couche formée de larges prismes de calcite, alors que la couche interne est formée par une couche nacrée aragonitique. Ces différentes couches minéralisées des coquilles sont le plus souvent recouvertes d'une fine couche organique externe, le périostracum, qui isole la coquille du milieu extérieur.

La nacre est depuis plusieurs décennies la texture coquillière la plus étudiée pour de nombreuses raisons : son intérêt économique, son utilisation en chirurgie réparatrice osseuse ou encore à cause de ses propriétés mécaniques remarquables. Elle est considérée comme modèle de référence, sans doute à cause de son apparente simplicité structurale - elle sert de modèle pour l'élaboration de matériaux biomimétiques - et de sa présence au sein de quatre des huit sous-classes de mollusques, à savoir les bivalves, les gastéropodes, les céphalopodes et les monoplacophores. La nacre est formée d'une juxtaposition régulière de couche de tablettes d'aragonite de 0,5 μm d'épaisseur, soudées par un ciment organique de 20 nm d'épaisseur. Les composés organiques associés à la nacre sont localisés autour des tablettes de nacre, mais aussi à l'intérieur des cristaux. Ils sont impliqués dans l'initiation de la précipitation du minéral (nucléation), dans la régulation de la croissance, dans la détermination du polymorphe cristallin, comme dans l'organisation microstructurale du biominéral. Même si la composition et les fonctions de cette matrice organique ne restent encore que partiellement connues, de nombreux travaux ont permis de décrire certaines de ces molécules. Cependant, il est important de noter que l'ensemble des connaissances acquises l'ont été à partir de l'étude d'un nombre restreint de modèles biologiques appartenant principalement à deux genres de mollusques - *Pinctada* pour les bivalves (= lamellibranches) ptériomorphes et *Haliotis* pour les gastéropodes. Or, à ce jour, la matrice organique calcifiante de nombreux taxons comportant une structure nacrée n'a pas encore été étudiée.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés essentiellement à deux nouveaux modèles de mollusques nacriers jusqu'alors peu étudiés : le bivalve paléohétérodonte *Unio pictorum* et le céphalopode nautiloïde *Nautilus macromphalus*, le choix de ces modèles étant motivé par des considérations taxonomiques. En effet, *Unio pictorum* est un représentant des paléohétérodontes, qui mêle à la fois des caractères plésiomorphes (présence d'une coquille nacro-prismatique) et apomorphes (charnière proche de celle des formes 'modernes' hétérodontes). Le nautiloïde quant à lui appartient à un ordre très ancien de céphalopodes, les nautiloïdes, dont l'histoire évolutive débute au Paléozoïque inférieur. Notre approche de caractérisation biochimique des matrices coquillières vise à mieux connaître les mécanismes moléculaires essentiels à la formation de la nacre chez les mollusques, en déterminant si dans les différents taxons étudiés, les processus de biominéralisation utilisent des molécules homologues conservées par l'évolution. Ce travail tentera de déterminer si les nacres des différentes classes de mollusques nacrés constituent des structures homologues et si leurs mécanismes de formation sont similaires.

La **première partie** de ce travail présentera en guise d'introduction les grands principes de la biominéralisation, puis se penchera sur la présentation de l'étude des coquilles de mollusques et de leurs matrices organiques et enfin fera un bilan de l'état actuel de nos connaissances sur la nacre.

Dans la **deuxième partie**, le mémoire abordera l'étude du modèle *Unio pictorum*, en présentant en introduction les caractéristiques générales du modèle, puis les résultats obtenus dans le cadre de ce travail de thèse. Ainsi nous présenterons trois articles de recherche, dans lesquels nous observerons notamment le rôle des modifications post-traductionnelles des protéines de la matrice calcifiante dans les processus de minéralisation.

La **troisième partie** traitera du modèle *Nautilus macromphalus* et présentera l'ensemble des travaux que nous avons pu réaliser lors de l'étude de la coquille de cette espèce. Nous présenterons entre autres, dans le cadre d'un article de recherche, les résultats de notre approche protéomique et leurs implications dans les mécanismes de formation de la nacre et dans l'évolution des protéines des matrices au sein des mollusques nacrés.

Nous présenterons ensuite, dans une **quatrième partie**, les résultats préliminaires obtenus avec l'étude des coquilles carbonatées de brachiopodes actuels, ce taxon servant de groupe externe aux mollusques dans notre approche phylogénétique générale. Au sein de deux

articles de recherche, nous observerons et discuterons notamment les résultats de la caractérisation biochimique des matrices calcifiantes de six espèces de Rhynchonelliformea. Enfin, le lecteur trouvera dans la **cinquième partie** les conclusions générales de ce travail, ainsi qu'une discussion et une présentation de perspectives de recherches qui pourraient permettre d'approfondir et de compléter les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse.

Chapitre I: **Revue des connaissances**

Revue des connaissances

1 - Les biominéralisations

1.1 - Définition

Le terme biominéralisation est utilisé pour désigner toute structure minérale élaborée par un organisme vivant.

Si l'on considère tous les types de biominéraux observés, les liens entre les organismes qui les produisent, ainsi que leur abondance dans la biosphère, la biominéralisation apparaît comme un phénomène naturel courant, largement répandu dans l'ensemble du monde du vivant, mais aussi, très diversifié. Beaucoup des minéraux biogéniques sont formés dans des environnements où ils ne peuvent précipiter naturellement et leur formation chez des organismes implique que ces derniers possèdent des mécanismes cellulaires et moléculaires spécifiques. Cette capacité occasionne pour ces organismes un coût énergétique supplémentaire à celui du simple fonctionnement des cellules, afin de mettre en œuvre les conditions favorables à la formation des biominéraux. Parmi ces mécanismes indispensables à la biominéralisation et consommant de l'énergie, on peut énumérer de façon non exclusive : le transport cellulaire des ions contre leur gradient de concentration, la production de molécules capables de favoriser, voire de contrôler la sursaturation des ions minéraux, et souvent la sécrétion de molécules hors des cellules (Palmer, 1992).

On distingue classiquement deux types de processus de minéralisation biologique :

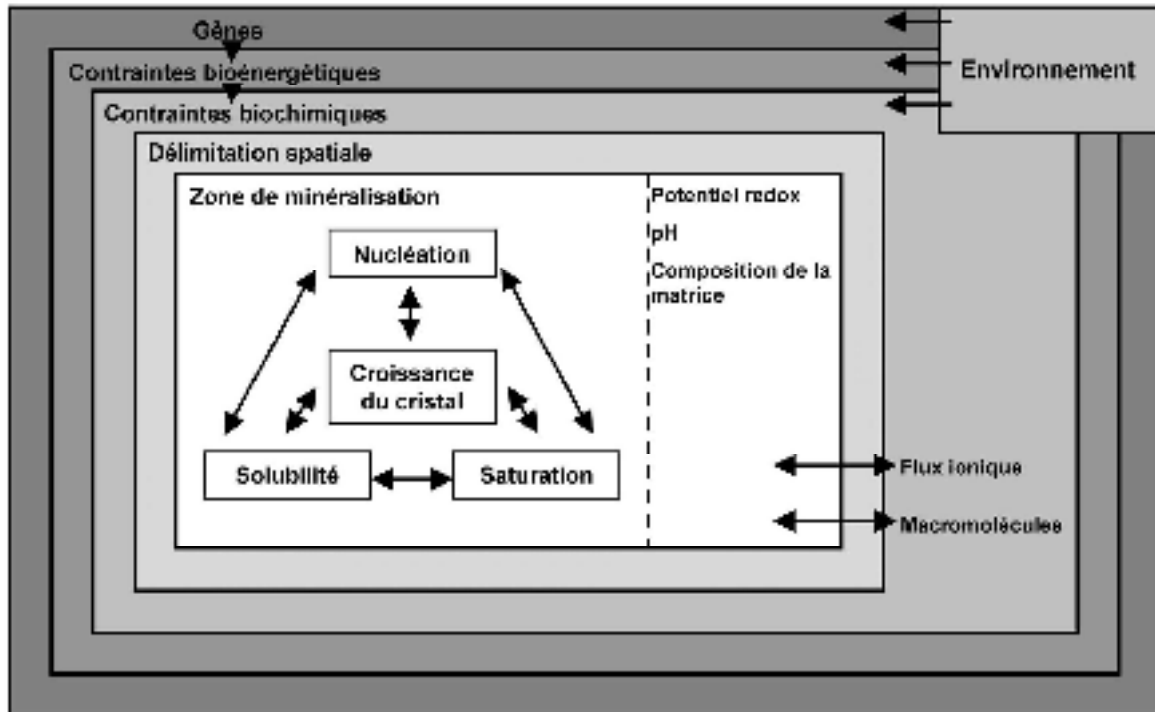
- les processus qui ne nécessitent pas de machinerie biologique dédiée et qui résultent de l'interaction entre le métabolisme « classique » de l'organisme et son environnement, on parle alors de *biominéralisations induites*,
- les processus de minéralisation qui nécessitent, pour les organismes biominéralisants, la mise en œuvre d'une machinerie physiologique, tissulaire, cellulaire et moléculaire spécifique, on parle alors de *biominéralisations contrôlées*.

La biominéralisation induite - Elle résulte de l'interaction entre l'activité biologique et l'environnement. En milieu aqueux, la formation de minéraux peut être induite par un organisme lorsqu'il change (même modestement) l'environnement qui l'entoure en y excréant passivement un produit de son métabolisme. Ce processus ne semble pas entraîner

de coût métabolique supplémentaire pour les organismes, qui d'ailleurs n'en tirent pas nécessairement un bénéfice. Le biominéral formé est très proche du minéral qui est produit dans des conditions abiotiques, indépendamment de toute activité biologique. Un même organisme peut former différents minéraux lorsque les conditions environnementales sont différentes. La biominéralisation induite concerne entre autres les eubactéries (élaborant par exemple les fameux stromatolithes), mais également certaines algues aquatiques (comme les *Padina* formant des précipités calcaires intracellulaires ; Borowitzka, 1982), voire même certains mollusques (cas de la calcification du bec chez *Nautilus* ; Lowenstam, 1984).

La biominéralisation contrôlée - Elle résulte de la mise en oeuvre de processus physiologiques dynamiques, spécifiques et complexes contrôlés par l'expression génique. L'activité de cet appareillage tissulaire, cellulaire et moléculaire entraîne un coût énergétique pour l'organisme qui tire parti de la formation du biominéral produit. Les types de biominéraux formés sont différenciables de ceux précipités par voie purement chimique (Weiner et Traub, 1984). La formation des minéralisations contrôlées implique la mise en place chez l'organisme de mécanismes de délimitation d'un espace (dans la cellule, entre les cellules ou entre l'organisme et le milieu externe), afin d'isoler le compartiment dans lequel la cristallisation va se produire. Elle implique également des mécanismes de transport cellulaire des ions minéraux participants (*e.g.* Ca^{2+} , CO_3^{2-} , HPO_4^{2-} , Fe^{2+} ...), de production d'une matrice organique (protéines, polysaccharides, lipides...), de contrôle de la nucléation, de la croissance et de la structure des cristaux, et enfin, de l'arrêt de leur croissance (Figure 1). La formation des biominéralisations contrôlées se retrouve dans de très nombreux groupes taxonomiques. Pour illustrer cette grande diversité de type de minéraux, de fonction ou de phylums, nous ne citerons que ces quelques exemples : les magnétosomes des bactéries magnétotactiques, les coccolithes des coccolithophoridés, les coquilles de mollusques ou bien les dents des vertébrés.

Figure 1 : La biominéralisation contrôlée (modifié d'après Mann, 1988). Chez les organismes contrôlant les processus de biominéralisation, ce phénomène a lieu dans un espace délimité et est hautement régulé. La biominéralisation est sous dépendance des conditions physico-chimiques de précipitation des ions, et est régulée par des facteurs biochimiques, bioénergétiques, mais aussi génétiques.



1.2 - Séquence de la biominéralisation

Constitution d'une solution saturée - Une des étapes importantes nécessaire à la minéralisation est la formation d'un espace clos délimité par une barrière (Mann, 1988) au travers de laquelle les ions peuvent diffuser pour se concentrer en une solution saturée. L'accumulation d'ions dans l'espace de minéralisation résulte d'un transport actif impliquant des pompes ioniques et/ou d'un transport passif s'effectuant soit via des canaux ioniques transmembranaires, soit par une simple diffusion au travers d'une membrane cellulaire suivant le gradient de concentration. Ainsi, de nombreux organismes sont capables de former des biominéraux dans des environnements apparemment hostiles à leur précipitation (eaux de mer sous-saturées en silice ; eaux au pH acide ; domaine marin profond situé en dessous de la limite de compensation des carbonates...) en contrôlant la saturation des ions essentiels par des mécanismes actifs de transport ioniques. L'ordre dans lequel les ions sont introduits dans l'espace de biominéralisation est aussi contrôlé par les cellules minéralisantes. Ces cellules hautement spécialisées participent aussi bien aux échanges ioniques entre le tissu

minéralisateur et l'espace de minéralisation qu'à la production et à la sécrétion des constituants du fluide minéralisant, notamment ceux de la matrice organique.

La nucléation - Le premier stade de la formation d'un cristal est sa nucléation. Dans une solution saturée, les ions et les solutés présents 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 formation d'un cristal en stabilisant les agrégats formés. Ce type de contrôle de la nucléation est une stratégie couramment employée par les organismes afin d'enclencher la formation de biominéralisation. L'induction de la croissance orientée d'un cristal par un support organique insoluble est définie par le terme d'hétéro-épitaxie. Ce processus correspond à l'un des concepts fondamentaux du modèle de biominéralisation orchestrée par une matrice organique. Chez les mollusques par exemple, le périostacum induit la nucléation des cristaux de la couche minéralisée externe de la coquille et sert de support à leur croissance ainsi qu'à leur organisation structurale (Meenakshi, 1974).

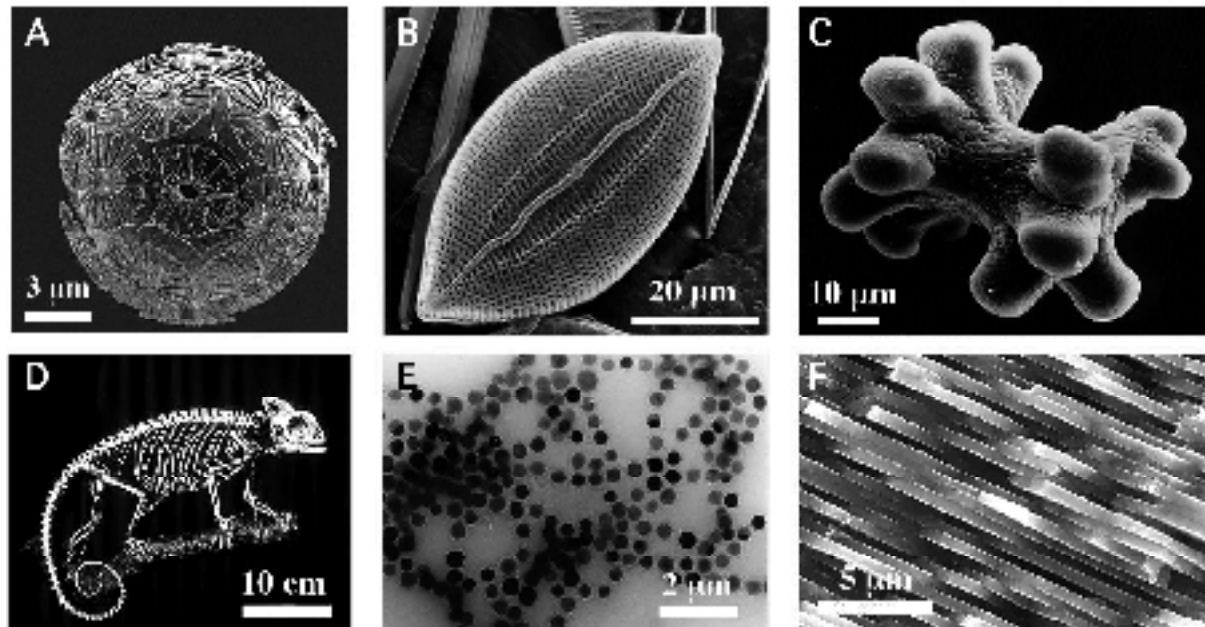
La croissance du cristal - Les cristaux néoformés croissent par addition progressive de molécules et d'ions. La morphologie du cristal est déterminée par la vitesse relative de croissance du cristal dans les différents plans de l'espace. Par exemple, lors de la formation des spicules de calcite des oursins, les cristaux prennent progressivement une forme d'aiguille suite à une croissance cristalline, préférentiellement selon un seul axe (c), sous le contrôle de molécules organiques incluses dans le biominéral (Addadi et Weiner, 1985). De plus, la mise en place de polymorphes instables durant la croissance cristalline - spicules de vaterite des ascidies (Lowestam & Abbott, 1975), liseré de carbonate de calcium amorphe des tablettes de nacre des mollusques (Nassif et al., 2006) - doit être mise en relation avec le fait que certaines molécules de la matrice organique semblent favoriser la formation de certains polymorphes cristallins plus ou moins stables (Falini *et al.*, 1996). Par ailleurs, il est à noter que de nombreuses molécules extraites des biominéraux carbonatés, en particulier des protéines ou des glycoprotéines acides, présentent une capacité à stabiliser la formation de faces cristallines non conventionnelles, modifiant ainsi la croissance de cristaux formés *in vitro* (Albeck *et al.*, 1996a-b). La taille de ces macromolécules étant bien supérieure à celle du réseau cristallin, leur inclusion dans le cristal néoformé modifie les paramètres de maille du cristal (Pokroy *et al.*, 2006).

L'arrêt de la croissance - Le contrôle de l'arrêt de la croissance d'un cristal en un de ces points détermine sa forme finale. Ce phénomène est impliqué par exemple dans la formation des structures complexes des plaques des coccolithophoridés. Cependant, il apparaît dans de nombreux cas que les cristaux arrêtent de croître, soit parce qu'ils rencontrent un obstacle comme un autre cristal (phénomène de compétition de croissance cristalline) ou une matrice organique (matrice interlamellaire des tablettes de nacre), soit par épuisement de certains constituants minéraux.

1.3 - Diversité de fonctions biologiques

Si les biominéralisations sont largement diversifiées dans leurs compositions chimiques et dans leurs structures, elles le sont aussi dans les fonctions biologiques auxquelles elles sont vouées (Figure 2). Une des fonctions couramment observée de ces minéraux biogéniques est d'apporter aux tissus mous un support mécanique, comme pour le squelette ou les dents. Les organismes qui sont capables de former des parties minéralisées, dures et protectrices, en tirent des avantages adaptatifs majeurs. La formation d'un squelette rigide et durable a servi de base/support à l'apparition de formes d'organismes plus complexes au cours de l'évolution. Cependant, chez les organismes vivants, les biominéraux peuvent être impliqués dans de nombreuses fonctions autres que le support des tissus, tels que la protection contre les U.V., la protection contre les prédateurs, l'isolement de l'organisme par rapport au milieu extérieur, la perception de la gravité, la nutrition, la reproduction, la perception lumineuse ou magnétique, ou bien le stockage d'ions sous formes transitoires (Simkiss & Wilbur, 1989).

Figure 2 : Diversité de formes et de tailles des biominéralisations au sein du vivant (modifié d'après Wilt, 2005 (A-E); et observations personnelles (F)). A) Observation au MEB de l'exosquelette d'un coccolithophoridé. Il est constitué de plaques calcifiées (calcite), les coccolithes, qui sont produites individuellement dans l'appareil de Golgi de cet organisme unicellulaire planctonique ; B) Observation au MEB d'un exosquelette siliceux (frustule) d'une diatomée, algue unicellulaire ; C) Observation au MEB d'un spicule de carbonate de calcium (vaterite) de la tunique d'une ascidie ; D) Endosquelette de phosphate de calcium d'un vertébré, le caméléon ; E) Observation au MET des particules de magnétite formant le magnétosome, organe de perception du champ magnétique des bactéries magnétotactiques ; F) Observation au MEB de la microstructure de la couche nacrée aragonitique de la coquille d'un bivalve.



Certains organismes eucaryotes ou bactériens sont capables de percevoir la gravité par des systèmes complexes contenant des biominéralisations. Ces composés minéraux solides, d'origine calcitique pour la plupart, sont maintenus dans une cavité dont les cellules périphériques détectent les mouvements. Les organismes en tirent alors une information sur l'orientation du champ gravitationnel. Chez les plantes, ce sont les structures racinaires qui sont responsables du géotropisme, alors que chez les poissons et les amphibiens, ce sont les otolithes qui remplissent ce rôle.

La magnétite d'origine biologique a été découverte pour la première fois dans la radula de chitons (Lowenstam, 1962). Cette découverte modifia l'idée préconçue selon laquelle ce minéral ne pouvait précipiter qu'à des pressions et à des températures bien plus élevées que celles rencontrées chez ces organismes. Depuis, la magnétite a été observée chez d'autres espèces, sous diverses formes comme les chaînes de cristaux intracellulaires (magnétosome) des bactéries magnétotactiques qui leur permettent de se déplacer le long d'un champ magnétique (Frankel *et al.*, 1979). Notons que d'autres organes d'orientation dans le champ

magnétique, contenant de la magnétite, ont depuis été observés chez les vertébrés (Perry *et al.*, 1985).

D'autres structures biominérales correspondent à des formes de stockage transitoire des ions minéraux. Chez certains crustacés terrestres, des structures de stockage se présentant sous forme de carbonate de calcium amorphe se développent à chaque cycle de mue afin de favoriser la calcification de la nouvelle cuticule (Graf, 1978 ; Luquet & Marin, 2004). Chez de nombreux organismes eucaryotes, les ions fer peuvent eux aussi être temporairement stockés sous formes de granules de ferrihydrite, grâce à la formation de complexes entre les ions Fe et une protéine, la ferritine.

Tableau 1 : Diversité des biominéralisations, de leurs structures et de leurs fonctions au sein des trois règnes du vivant (modifié d'après Mann *et al.*, 2001).

Organismes		Structures/fonctions
Carbonates (de calcium)		
Calcite	Coccolithophorides, Mollusques, Trilobites, Mammifères	Exosquelette, Organe visuel, capteurs de gravité
Aragonite	Cnidaires, Mollusques, Téléostéens	Exosquelette, capteurs de gravité
Vatérine	Ascidies	Spicules
Amorphe	Plantes supérieures, Crustacés	Exosquelette, réserves de calcium
Phosphates (de calcium)		
Hydroxyapatite	Vertébrés	Endosquelette, dents, réserves de calcium
Phosphate d'octa-calcium	Vertébrés	Précurseurs osseux
Amorphe	Vertébrés, Bivalves	Précurseurs osseux, réserves de calcium
Oxalates (de calcium)		
Whewellite	Plantes supérieures	Réserves de calcium
Weddelite	Plantes supérieures	Réserves de calcium
Sulfates		
Gypse (calcium)	Cnidaires	Capteurs de gravité
Barite (baryum)	Cyanophycées	Capteurs de gravité
Célestite (strontium)	Acanthaires	Exosquelette
Silice		
Opale	Diatomées, Porifères	Exosquelette, spicules
Oxydes (de fer)		
Magnétite	Eubactéries, Archéobactéries, Téléostéens, Tortues, Chitons	Capteurs de champ magnétique, dents
Goethite	Patelles	Radula
Lepidocrocite	Chitons	Radula
Ferrihydrite	Eucaryotes	Protéines de stockage du fer

1.4 - Diversité des types de minéraux

En 1989, Lowenstam et Weiner ont pu lister près de 60 types différents de minéraux biocomposites, mais il est tout à fait possible que leur nombre réel soit bien supérieur (Tableau 1). Cette grande diversité de minéraux d'origine biologique est due à la grande variété des constituants ioniques utilisés et des structures cristallines produites. Les constituants ioniques des biominéraux sont les mêmes que ceux des minéraux qui se forment par précipitation physico-chimique abiotique.

On peut distinguer quatre grands types de biominéraux, listés ici en fonction de leur abondance taxonomique : les biominéraux carbonatés, les biominéraux phosphatés, les biominéraux siliceux et les biominéraux composés d'oxydes de fer. Le carbonate de calcium prédomine chez les invertébrés tandis que le phosphate de calcium est majoritairement présent chez les vertébrés. Les ions calcium occupent une place toute particulière au sein du domaine des biominéralisations, ils sont présents dans près de 50% des minéraux biogéniques. Ce pourcentage élevé est certainement lié au fait que les organismes ont présenté, tôt dans l'évolution, la capacité à métaboliser ce cation (Lowenstam et Weiner, 1989).

Il est important de noter qu'un même minéral (formule chimique unique) peut cristalliser sous plusieurs structures différentes, on parle alors de variétés polymorphiques ou polymorphes. On cite couramment les exemples de l'aragonite (système orthorhombique) et de la calcite (système rhomboédrique). Dans certains cas, un même organisme peut produire plusieurs polymorphes d'un même minéral, le plus souvent en des zones bien distinctes. Le tableau 2, présente la diversité des organismes eucaryotes qui produisent des biominéraux constitués par les différents polymorphes du carbonate de calcium. En termes de diversité taxonomique et de quantité, les carbonates de calcium sont les biominéralisations les plus importantes au sein du vivant.

Tableau 2 : Les polymorphes du carbonate de calcium au sein des eucaryotes, leurs localisations et leurs fonctions biologiques (modifié d'après Mann, 2001).

Minéral	Formule	Organismes	Localisations	Fonctions
Calcite	CaCO ₃	Coccolithophoridés	Paroi cellulaire	Exosquelette
		Foraminifères	Coquille	Exosquelette
		Trilobites	Lentille oculaire	Vision
		Mollusques	Coquille	Exosquelette
		Crustacés	Cuticule	Résistance mécanique
		Oiseaux	Coquille d'œuf	Résistance mécanique
		Mammifères	Oreille interne	Orientation
Mg-calcite	(Mg,Ca)CO ₃	Octocoralliaires	Spicules	Résistance mécanique
Aragonite	CaCO ₃	Échinodermes	Coquille/spicules	Exosquelette/protection
		Scléractinaires	Paroi cellulaire	Exosquelette
		Mollusques	Coquille	Exosquelette
		Gastéropodes	Penis	Reproduction
		Céphalopodes	Coquille	Flottabilité
		Téléostéens	Statolithes	Orientation
Vatérite	CaCO ₃	Gastéropodes	Coquille	Exosquelette
		Ascidies	Spicules	Protection
CaCO₃ Amorphe	CaCO ₃ , nH ₂ O	Crustacés	Organes de stockage divers	Stockage
		Plantes supérieures	Feuilles	Stockage

1.5 - Les matrices organiques biominéralisantes

Des macromolécules organiques sont associées à la grande majorité des minéraux formés sous contrôle biologique, et en général, les processus de biominéralisation sont, en retour, contrôlés par ces macromolécules. La grande majorité des informations portant sur les biomolécules associées aux biominéraux concerne les tissus carbonatés ou phosphatés comme les os, l'endosquelette des larves d'échinodermes ou les coquilles des mollusques. L'étude de ces biomacromolécules nécessite en premier lieu de les extraire du minéral en déminéralisant ce dernier. Pour les biominéraux composés de phosphate de calcium ou de carbonate de calcium, la technique usuelle de décalcification passe par une dissolution du minéral par de l'EDTA ou par un acide, permettant d'extraire des macromolécules solubles, ainsi qu'une fraction quantitativement importante de macromolécules insolubles. Les tissus minéralisés ainsi étudiés ont révélé la présence de dizaines de protéines différentes associées, mais la (quasi-) totalité de ces composés ne sont connus que dans très peu de systèmes, dont les os et les dents des mammifères (Veis, 1984). Les constituants des spicules ou des piquants des oursins (Killian & Wilt, 1996) et ceux de la coquille des mollusques ne sont, quant à eux, que partiellement connus.

Dans quasiment tous les cas étudiés, la dissolution des biominéraux libère des macromolécules solubles dont une majorité présente des propriétés singulières caractéristiques : elles sont soit très acides, soit hydrophobes. En effet, une grande partie des protéines observées présente une composition riche en acides aminés acides, tels que l'acide aspartique et l'acide glutamique (Weiner, 1979) et, de plus, les résidus sérine et thréonine sont très souvent phosphorylés. Lorsqu'elles portent des groupements saccharidiques, ces macromolécules comportent souvent des monosaccharides sulfatés, très acides (Crenshaw, 1972). Ces macromolécules acides semblent pouvoir jouer un rôle prépondérant dans la formation des cristaux. Des fonctions apparemment aussi antagonistes que la nucléation ou l'inhibition de la formation des cristaux ont été attribuées à ces macromolécules acides (Wheeler, 1981). Il apparaît aujourd'hui que la matrice soluble acide puisse être composée de différentes molécules aux propriétés variées, qui interagissent en synergie lors de la formation du biominéral (Matsushiro *et al.*, 2003). Les autres constituants macromoléculaires des matrices sont majoritairement hydrophobes, riches en sérine, glycine et alanine, mais ces matrices peuvent parfois aussi être composées en partie de chitine. On attribue classiquement à ces molécules hydrophobes un rôle dans la mise en place structurale des biomatériaux. L'observation de ces deux types de macromolécules dans de très nombreux phylums (Veis, 1984), même s'il existe des exceptions (De jong *et al.*, 1976), permet de supporter l'idée selon laquelle de telles molécules peuvent jouer un rôle essentiel dans les processus de biominéralisation (Tableau 3).

Tableau 3 : Les macromolécules organiques extraites des biominéraux dans différents phylums (modifié d'après Lowestam et Weiner, 1989).

Phylum	Organe minéralisé	Minéral	Macromolécules de structure	Macromolécules acides
Chordata	Os et dents	Dahllite	Collagène	Glycoprotéines, protéoglycans
	Email des dents	Dahllite	Amélogénine	Glycoprotéines
	Cartilage	Dahllite	?	
Echinoderma	Epines, spicules	Calcite	?	Glycoprotéines, protéoglycans
Mollusca	Coquille	Calcite, aragonite	Chitine, protéines fibroïnes	Glycoprotéines, protéoglycans
Arthropoda	Cuticule	Calcite	Complexe chitino-protéique	Glycoprotéines
	Granules	ACP	?	Glycoprotéines
Cnidaria	Squelette, spicules	Calcite, aragonite	Complexe protéique, ?	Glycoprotéines
Annelida	Tube	Calcite, aragonite	Complexe chitino-protéique	Glycoprotéines
Brachiopoda	Coquille	Francolite, calcite	Complexe chitino-protéique	Protéines, ?
Ectopoda	Cuticule	Calcite	Complexe chitino-protéique	Glycoprotéines, ?
Porifera	Spicules	Opale	Protéines fibrillaires	?
Radiolaria	Squelette	Opale	?	Glyco(?)protéines
Foraminifera	Coquille	Calcite	?	Glycoprotéines, protéoglycans
Coccolithophoridés	Coccolithes	Calcite	?	Polysaccharides acides, protéines ?

1.6 - Origine(s) de la(des) biominéralisation(s)

Chez les métazoaires, la grande diversité des biominéraux, tant au niveau de leur composition, de leur fonction ou des organismes qui les produisent, semble incompatible avec l'hypothèse d'une origine unique de « La Biominéralisation ». Certaines données permettent pourtant de discuter cette notion. Deux hypothèses principales (et antinomiques) sont à évaluer : 1) les similitudes observées entre les différents biominéraux reflètent une divergence depuis un ancêtre commun ; 2) ces similitudes sont le fruit d'une convergence évolutive s'étant produite dans des taxons indépendants. Même si actuellement il est difficile de statuer, nous avons regroupé dans le paragraphe suivant les données permettant de discuter ces deux hypothèses autour de l'exemple des métazoaires biominéralisants utilisant le calcium (carbonate de calcium et phosphate de calcium).

L'explosion cambrienne (il y a 544 M.A.) est marquée par l'apparition dans les roches sédimentaires d'une grande quantité de squelettes et de carapaces minéralisés. Cette

apparition soudaine de traces d'une riche activité biologique des grands clades de métazoaires actuels est interprétée comme l'émergence de la majorité de ces phylums. En effet, on décrit à cette période l'apparition des cnidaires, des brachiopodes, des mollusques, des arthropodes et des vertébrés (entre autres). En quelques millions d'années, un grand nombre de phylums de métazoaires ont 'découvert' comment former des tissus minéralisés complexes et fonctionnels impliqués dans des fonctions diverses : soutien et protection des tissus mous, prédation, locomotion ou orientation. On pense classiquement que, à cette époque, des conditions (physico-chimiques ou biotiques) favorables à l'émergence de ces systèmes biominéralisés se seraient mises en place, sans pour autant savoir quel(s) a(ont) pu être le(s) facteur(s) stimulant l'émergence de ces innovations (pression d'O₂, concentration en ions des océans ou apparition de la prédation). Il apparaît que la formation de squelettes minéralisés a apporté de nombreux avantages sélectifs à divers phylums qui ont su perdurer et prospérer depuis. Il est très largement établi que, à cette époque, les métazoaires auraient « inventé » ces formes minéralisées dont nous observons aujourd'hui les traces. La question est de savoir si l'apparition de ces squelettes minéralisés s'est produite avant ou après la période de grande diversification et d'apparition des phylums majeurs des métazoaires ?

La faune d'Ediacara, découverte il y a une soixantaine d'années et, depuis, identifiée en de nombreux points du globe, est caractérisée par des organismes dépourvus de structure minéralisée reconnaissable. Cette faune a permis de découvrir que de nombreux phylums étaient déjà présents avant l'explosion cambrienne. Notons cependant que certaines interprétations de ces fossiles et de leur plan d'organisation sont matière à controverse. Quoiqu'il en soit, l'interprétation des temps de divergences des séquences génétiques hautement conservées (la distance génétique) a permis de dater l'émergence des différents grands groupes de métazoaires actuels à 1000-700 M.A. (Wray *et al.*, 1996 ; Ayala *et al.*, 1998), soit bien avant l'observation des premières traces de minéralisation chez ces organismes. Compte tenu de la complexité des processus de biominéralisation contrôlée, il semblerait peu concevable que l'évolution ait permis l'apparition concomitante, mais indépendante, de si nombreux phylums capables de biominéraliser. La complexité des systèmes physiologiques nécessaires à l'élaboration de biominéraux semble difficile à reproduire de façon analogue chez différents taxons.

Des macromolécules acides sont associées aux biominéraux carbonatés dans la quasi-totalité des phylums étudiés. À ce jour, nous ne connaissons pas assez ces molécules pour déterminer si elles tirent leur origine d'un ancêtre commun ou si elles ont été recrutées indépendamment durant l'évolution pour remplir des fonctions similaires. La réponse à cette question

permettrait d'apporter une information capitale sur l'origine même de la biominéralisation dans ces différents taxons. De plus, des études de reconnaissance des constituants des matrices organiques avec des anticorps dirigés contre des protéines de matrice de systèmes hétérologues ont permis de détecter plusieurs exemples de réactivités croisés (e.g. vertébré/échinoderme par Veis *et al.*, 1986 ; échinoderme/prochordés par Lambert & Lambert, 1996 ; mollusques/brachiopodes par Marin, données non publiées). Ces résultats suggèrent que ces différentes matrices peuvent posséder des épitopes protéiques et/ou saccharidiques communs. Un autre exemple frappant étayant l'hypothèse de l'origine commune ancienne est celui de l'activité biologique de la nacre des mollusques pour la stimulation de la réparation des os des vertébrés (Atlan *et al.*, 1997 ; Lopez *et al.*, 1992). Dans différentes expériences réalisées *in vivo*, Lopez et ses collaborateurs ont démontré que des implants de nacre ou des extraits de matrice de nacre étaient capables d'induire la régénération des tissus osseux sans pour autant provoquer de rejet. Au vu de ce résultat, il semble que la nacre puisse contenir au moins un facteur inductif qui serait reconnu par les cellules osseuses (Westbroek & Marin, 1998). Il est possible que l'un de ces facteurs soit en réalité une protéine appartenant à la famille des BMPs (Bone Morphogenic Protein), identifiée chez les mollusques (Lelong *et al.*, 2000 ; Matsushiro *et al.*, 2004 ; Miyashita *et al.*, 2008).

Des travaux récents chez les vertébrés ont permis d'identifier un grand nombre de protéines associées aux biominéralisations. Dans un article de revue, Sire et ses collaborateurs (2006) font l'inventaire des différentes protéines impliquées dans la formation des dents et retracent l'évolution de leurs gènes chez les vertébrés. La période durant laquelle le gène SPARK se serait dupliqué pour donner naissance à la famille de gènes codant des protéines appelées amélogénines est estimée à 600 millions d'années ; remarquons que ces gènes sont tous regroupés sur le même locus d'un même chromosome. Récemment, les travaux de séquençage du génome de l'échinoderme *Strongylocentrotus purpuratus* (Livingston *et al.*, 2006) ont permis d'observer que l'ensemble des gènes codant pour les protéines associées aux spicules de la larve d'oursin était regroupés sur le même chromosome et qu'ils provenaient de la duplication d'un même gène ancestral. En outre, aucune homologie de séquence n'a pu être observée entre ces protéines et celles associées à la formation des dents ou des os chez les vertébrés, suggérant que l'origine de ces protéines est indépendante chez ces deux phylums.

À côté de ces deux hypothèses, un scénario permettant de concilier un bon nombre de ces considérations différentes a récemment été proposé (Marin *et al.*, 2003, 2008) : il s'agit de

l'hypothèse de la préexistence de la machinerie nécessaire à l'apparition de la biominéralisation chez des organismes ayant préalablement divergé.

Le calcium est un élément essentiel à la vie de tous les organismes eucaryotes depuis leurs origines. Il sert de métabolite secondaire intracellulaire, dans la contraction musculaire, la sécrétion cellulaire et est impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques, comme la régulation osmotique, ou la transmission nerveuse. Le calcium est stocké dans différents compartiments des cellules. Lowenstam et Margulis (1980) considèrent que la machinerie cellulaire nécessaire à la gestion du calcium intracellulaire était déjà en place depuis bien longtemps lorsque les organismes ont commencé à minéraliser le calcium (sous forme de carbonate ou de phosphate). Ces auteurs suggèrent qu'un changement des conditions physico-chimiques des océans du Cambrien aurait favorisé le 'détournement' de la machinerie cellulaire préexistante de gestion du calcium (propre à tout organisme eucaryote) afin de créer une nouvelle fonction bénéfique à l'organisme, c'est-à-dire produire le biominéral. Marin et ses collaborateurs (1996, 2000) ont proposé que la fonction originelle à partir de laquelle la minéralisation a émergé était une fonction de type anti-calcification, nécessaire dans un contexte marin de saturation vis-à-vis du carbonate de calcium. La mise en place de mécanismes moléculaires de contrôle de la sursaturation ionique et/ou de la précipitation localisée a pu favoriser l'apparition de squelettes protecteurs. Il est aussi à noter que les biominéraux peuvent se former de façon pathologique et l'on peut imaginer que certains organismes aient pu en tirer parti.

1.7 - Interactions avec l'environnement

Certains minéraux biogéniques sont formés à une échelle tellement importante qu'ils ont un impact majeur sur la chimie des océans et représentent l'un des constituants substantiels des sédiments marins aussi bien que continentaux. Un des effets majeurs des biominéralisations sur la chimie des océans concerne le cycle de la silice. De par la colossale activité des organismes planctoniques qui pompent la silice pour former leurs squelettes (*e.g.* les diatomées, les radiolaires, les silico-flagellés ou les éponges siliceuses), les océans sont perpétuellement en sous-saturation en silice. L'apparition de ces organismes est concomitante de l'enregistrement dans les archives géologiques d'une importante diminution de la teneur en silice. De plus, la période de formation des roches riches en silice dans le fond des océans correspond à celle du maximum de production de ces organismes (Broecker, 1974, Lowenstam & Weiner 1989). Les coccolithes et les foraminifères sont à l'origine d'une majorité des roches carbonatées. Ces organismes peuvent aussi modifier la composition

chimique des eaux océaniques. Ces organismes calcifiants planctoniques participent à la circulation des éléments comme le carbonate de calcium, le strontium et le baryum. Ils se développent dans les couches supérieures des océans qu'ils appauvrissent en ces éléments, puis, à leur mort, ils sédimentent et peuvent soit se dissoudre dans les eaux abyssales, soit être incorporés aux sédiments des plaines océaniques du plateau continental pour former les roches sédimentaires. Depuis peu, il est sérieusement envisagé que ces organismes soient utilisés afin de participer à la lutte contre le réchauffement climatique, et ce grâce à leur capacité à fixer les carbonates. Les récifs coralliens constituent aussi de véritables puits à CaCO_3 . On estime que 50% de la quantité des carbonates apportés continuellement par les rivières et les fleuves dans les océans seront incorporés dans les récifs coralliens (Lowenstam & Weiner, 1989).

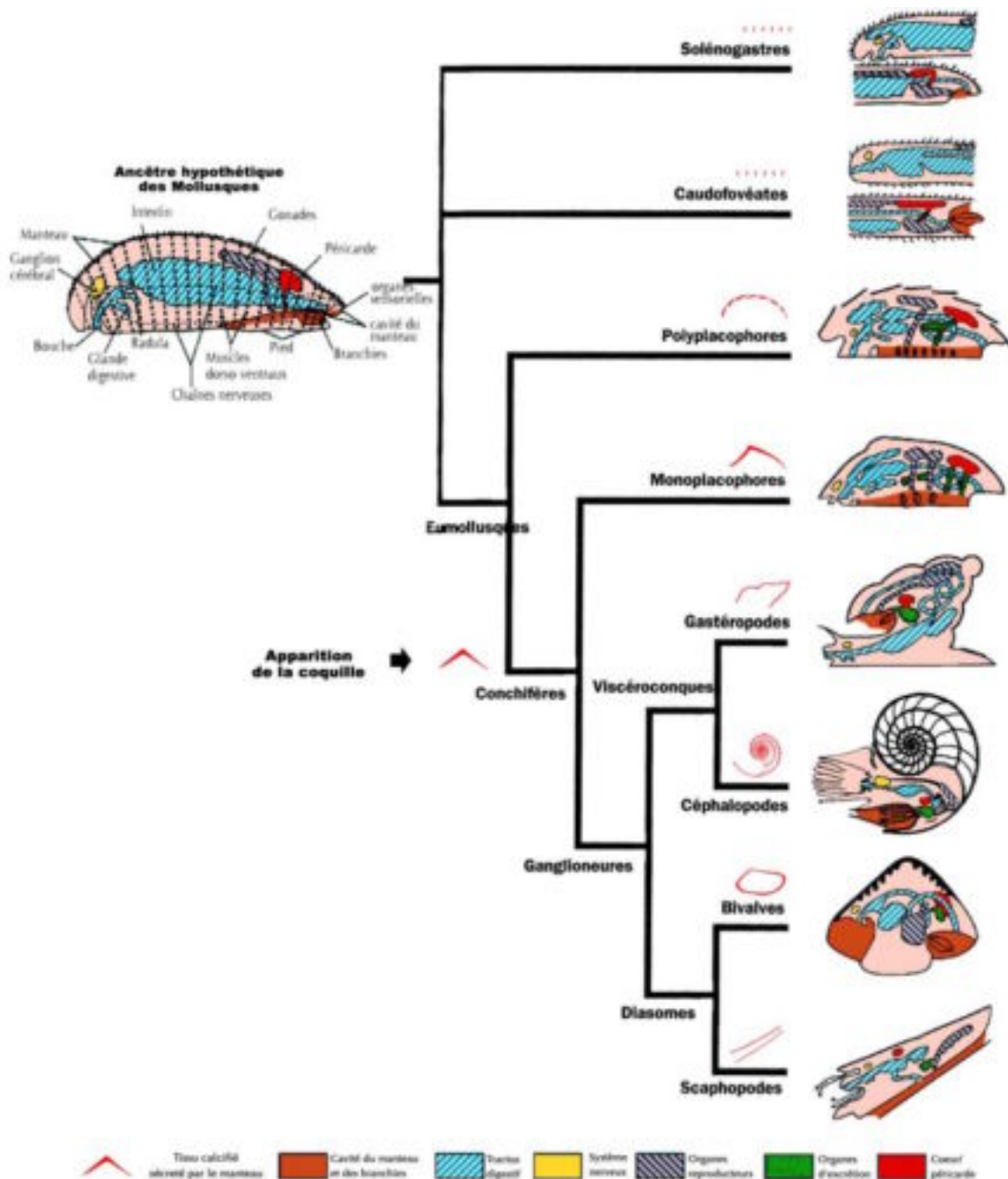
2 - La biominéralisation chez les mollusques

2.1 – Les mollusques : généralités

Les mollusques constituent un des embranchements du règne des eucaryotes les plus diversifiés, tant au niveau de leur forme, de leur anatomie, de leur taille, que du nombre d'espèces actuelles. Ce phylum renferme les métazoaires parmi les plus étranges et les plus familiers (Martoja, 1995). Les relations de parenté entre les grandes familles de mollusques remontent au début du Cambrien ; plusieurs classes de mollusques sont connues dès le Cambrien inférieur (≈ 540 M.A.), alors que leur origine remonterait probablement à ≈ 680 M.A. (Brusca & Brusca, 1990). La faune d'Ediacara recèle des formes d'organismes à corps mous que l'on rapproche des mollusques (genre *Kimberella*). On compte parmi les mollusques des individus de tailles très diverses : un céphalopode, nommé *Architeuthis*, mesure avec ses tentacules plus de 20 m de longueur, alors que le mollusque le plus petit est de la taille d'un grain de sable. Les mollusques, par le nombre d'individus, le nombre d'espèces (de 80 000 à plus de 130 000 espèces selon les estimations) et par leur diversité, constituent un groupe important dans diverses chaînes écologiques situées en eau douce, dans les milieux marins côtiers et abyssaux ou dans les milieux terrestres. Ils ne sont absents que des déserts les plus secs et les plus glacés. Ils peuvent être les hôtes intermédiaires de divers parasites (*e.g. Schistosoma*), alors que certains gastéropodes sont eux-mêmes les parasites d'autres animaux marins. Ce sont des métazoaires triploblastiques coelomates, le coelome étant très réduit chez les individus adultes. Ce sont des organismes de formes très variées, mais dont le plan d'organisation est homogène (Figure 3). Au cours du développement embryonnaire la segmentation aboutit à la formation d'une larve trochophore ciliée, le plus

souvent nageuse et planctonique ; elle se transformera en une larve véligère, puis en adulte. Cependant, chez certains groupes de gastéropodes et de céphalopodes, le développement est direct. Le pied, souvent musculeux, présente des fonctions diverses. Les régions dorsales et latérales du corps sont modifiées en un épithélium sécréteur de la coquille ou/et des spicules calcaires, appelé le manteau. Secondairement, chez certaines espèces, la coquille peut être absente ou internalisée dans le manteau (comme chez l'aplysie).

Figure 3 : Phylogénie et plan d'organisation des différentes familles de mollusques (modifié d'après Brusca & Brusca, 1990 ; Prothero, 1998 ; Haszpnar, 2000).

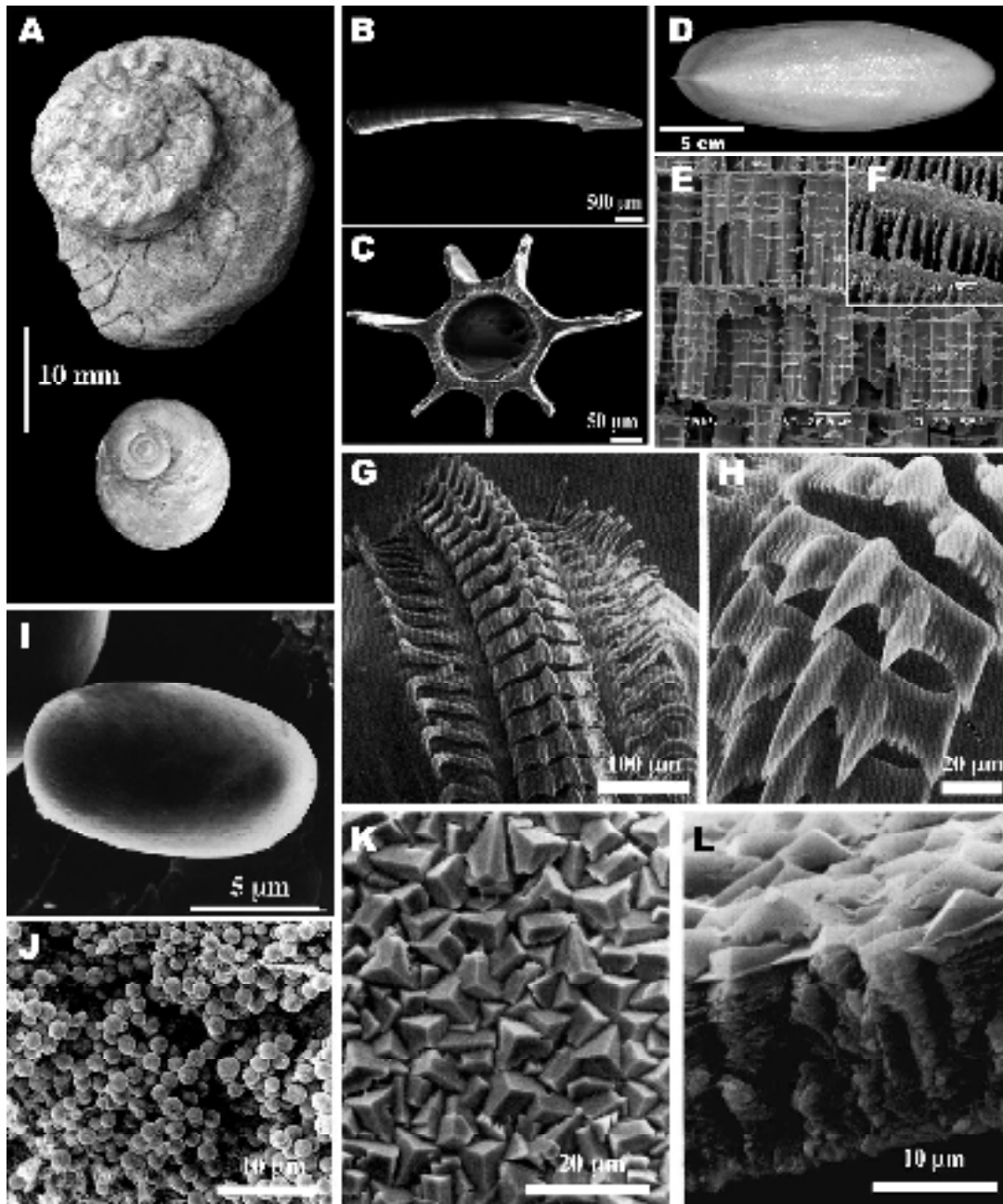


2.2 - Différents types de biominéralisations chez les mollusques

Les mollusques ont la réputation d'être des organismes experts en minéralisation, grâce à leurs solides coquilles, qui protègent avec succès leur corps mou depuis plus de 540 M.A.. La diversité des minéraux formés par ces organismes atteste de leur capacité étonnante à contrôler la formation de tissus minéralisés.

Lowenstam et Weiner (1989) ont dénombré chez les mollusques pas moins de 21 types de minéraux impliqués dans plus de 17 fonctions biologiques différentes. Notons parmi les biominéralisations amorphes la présence de carbonate de calcium, de phosphate de calcium, de silice, et parmi les minéraux cristallins, la calcite, l'aragonite, la vaterite, mais aussi la ferrihydrite, la magnétite, l'opale ou la goethite. La figure 4 illustre la diversité des organes minéralisés rencontrés chez les mollusques : les coquilles d'œufs calcifiées des gastéropodes terrestres, les organes de reproduction calcifiés de certains gastéropodes ('love darts'), la radula des chitons ou de certains gastéropodes brouteurs, les granules intracellulaires de phosphate de calcium amorphe dans les branchies des Unionoidae (Weiner & Lowenstam, 1989 ; Simkiss & Wilbur, 1989). Ces organes ou tissus minéralisés sont impliqués dans des fonctions très variées comme la protection mécanique des tissus mous, la reproduction, la nutrition, la flottabilité, l'orientation, la détoxification, ou le stockage des ions. Notons aussi qu'un même mollusque, le nautilus, présente à lui seul pas moins de 5 minéraux différents (aragonite, calcite, brushite, phosphate de calcium amorphe et weddelite). La radula de chiton, quant à elle, peut contenir 3 types de minéraux différents (la magnétite, l'hydroxyapatite et la lépidocrotite). À ce jour, la coquille reste la biominéralisation la plus étudiée chez les mollusques.

Figure 4 : Diversité de structures et de fonctions des biominéralisations chez les mollusques (modifié d'après Pedroso *et al.*, 1971 (I) ; Tompa, 1976 (K-L); Simkiss & Wilbur, 1989 ; Byrne, 2000 (J) ; Seibel *et al.*, 2004 (D-F) ; Koene *et al.*, 2005 (B-C) ; et observations personnelles (A)). A) Coquille et opercule calcifiés d'un gastéropode marin ; B-C) Observations au MEB d'un organe de reproduction calcifié ('love dart'), le pénis d'un gastéropode terrestre ; D-E-F) Observations macroscopiques et microscopiques au MEB d'un os de seiche ; bien que majoritairement composé de chitine, cet organe est aussi partiellement calcifié ; G-H) Observations au MEB d'une radula de magnétite d'un chiton ; I) Observation au MEB d'une statoconie, granule de carbonate de calcium de l'organe de perception de la gravité d'un gastéropode ; J) Observation au MEB de granules de phosphate de calcium amorphe du manteau d'un bivalve paléohétérodonte ; K-L) Observations au MEB d'une coquille calcifiée d'œuf de gastéropode terrestre.



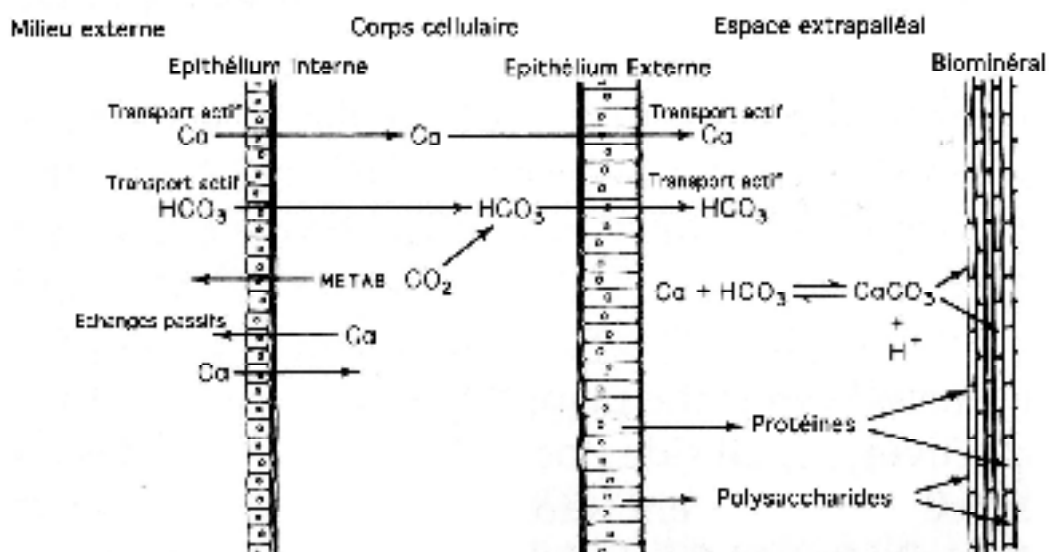
Le phylum des mollusques comporte huit classes différentes. Cinq d'entre elles, appartenant au clade des mollusques conchifères, portent donc des coquilles : les céphalopodes, les

gastéropodes, les bivalves (= lamellibranches), les scaphopodes et les monoplacophores. Secondairement, chez les gastéropodes et les céphalopodes, la coquille peut être perdue ou internalisée. Dans la classe des polyplacophores, la partie dorsale de ces organismes est recouverte par huit plaques coquillières aragonitiques, ainsi que par des groupements de spicules traversant l'épithélium. Chez les solénogastres et les caudofovéates, anciennement regroupés en aplacophores, le corps est entièrement ou partiellement recouvert de spicules calcaires. Cependant, la position phylogénétique de ces derniers au sein des mollusques est sujette à controverse. En effet, soit ces organismes correspondent à des mollusques sans coquille dont l'origine serait antérieure à l'apparition de la coquille, étant donc situés en position basale de l'arbre phylogénétique des mollusques, soit ils constituent deux classes de mollusques dérivés, ayant perdu secondairement leur coquille (Brusca & Brusca, 1990).

2.3 - La calcification

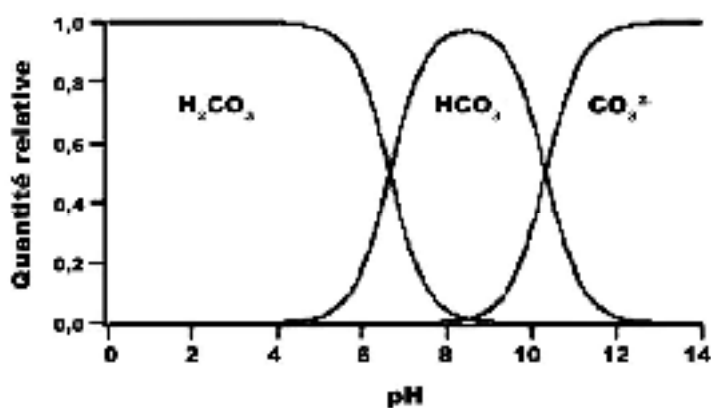
En termes de distribution taxonomique et de quantité, les carbonates de calcium sont les constituants les plus utilisés en biominéralisation (Tableau 2). Chez les mollusques, on observe de nombreuses structures calcifiées, les plus importantes étant les coquilles des conchifères ; c'est aussi sans doute le tissu calcifié le plus étudié chez les invertébrés. Dans la suite de ce travail, nous nous pencherons sur l'étude de la formation des couches calcifiées de la coquille des mollusques, mais dans un premier temps nous évoquerons les principes essentiels de la calcification chez ces organismes.

Figure 5 : Schéma du système de biominéralisation de la coquille chez les mollusques (modifié d'après Simkiss & Wilbur, 1989).



Les carbonates de calcium se forment par précipitation en solution d'un anion carbonate avec un cation calcium selon l'équation : $\text{Ca}^{2+} + 2 \text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CaCO}_3 + \text{CO}_2 + \text{OH}^- + \text{H}^+$ (Figure 5). La cristallisation du carbonate de calcium en solution aqueuse est un phénomène complexe régulé par de nombreux facteurs physico-chimiques externes : le pH, la saturation, la température, la pression et la présence d'impuretés en solution (des ions ou des macromolécules). La précipitation du CaCO_3 est tout particulièrement influencée par l'équilibre acide-base (pH dépendant) de l'acide carbonique dans ses différents états de protonation : CO_2 , CO_3^{2-} , HCO_3^- et H_2CO_3 (Figure 6).

Figure 6 : Distribution des ions carbonate en fonction du pH de la solution aqueuse (modifié d'après Heinemann, 2005). H_2CO_3 (représentant la somme du CO_2 dissout et du H_2CO_3) prédomine à pH acide ; HCO_3^- est plus abondant dans les pH médians ; CO_3^{2-} est dominant à pH basique.

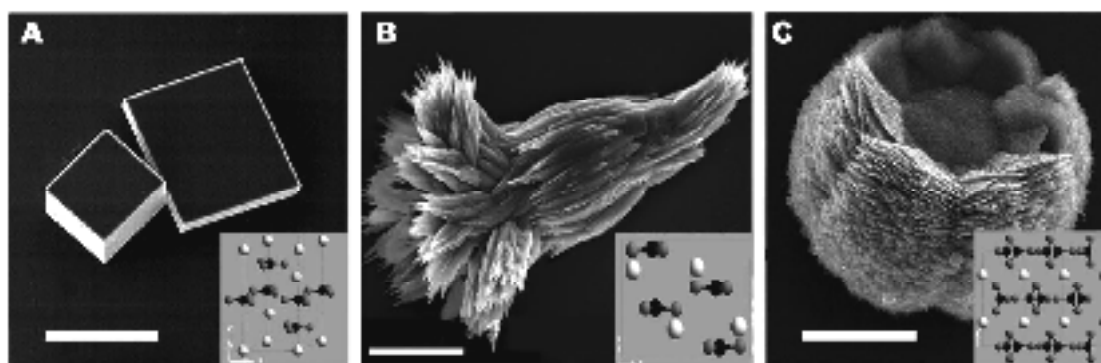


2.4 - Les polymorphes du carbonate de calcium

Le carbonate de calcium peut précipiter en six polymorphes de structures différentes : la calcite, l'aragonite, la vaterite (Figure 7), le carbonate de calcium monohydraté, le carbonate de calcium hexahydraté et le carbonate de calcium amorphe. De ces différents polymorphes, seuls deux - la calcite et l'aragonite, par ordre décroissant de stabilité - sont thermodynamiquement stables et sont largement utilisés dans les biominéralisations. Certains cations divalents, tel le magnésium, peuvent eux aussi être incorporés en grande quantité au moment de la précipitation du carbonate de calcium, comme c'est le cas pour la calcite magnésienne. La formation de certains polymorphes et la morphologie des cristaux sont déterminées par les interactions moléculaires entre différents constituants, mais aussi par des facteurs physico-chimiques externes. La modification de l'un de ces paramètres externes devrait modifier la morphologie des cristaux formés (Lowenstam, 1954). Cependant les

organismes semblent capables, dans de nombreux cas, de contrôler strictement le polymorphe cristallin qui sera formé.

Figure 7 : Observations au MEB des différents polymorphes cristallins du carbonate de calcium précipités *in vitro* à partir d'une solution saturée. En bas à droite, représentation d'unité d'organisation ionique des différents polymorphes (modifiés d'après Yan *et al.*, 2007 (B) ; Addadi *et al.*, 2008 (encarts) ; et observations personnelles (A,C)). A) Les cristaux de calcite présentent une forme rhomboédrique caractéristique (barre d'échelle = 20 μm). La calcite est le polymorphe le plus abondant et le plus stable à température ambiante ; B) Les cristaux d'aragonite prennent une forme typique en agrégat d'aiguilles (barre d'échelle = 5 μm) ; C) Les cristaux de vaterite sont constitués, thermodynamiquement parlant, du polymorphe cristallin le plus instable. (barre d'échelle = 20 μm).

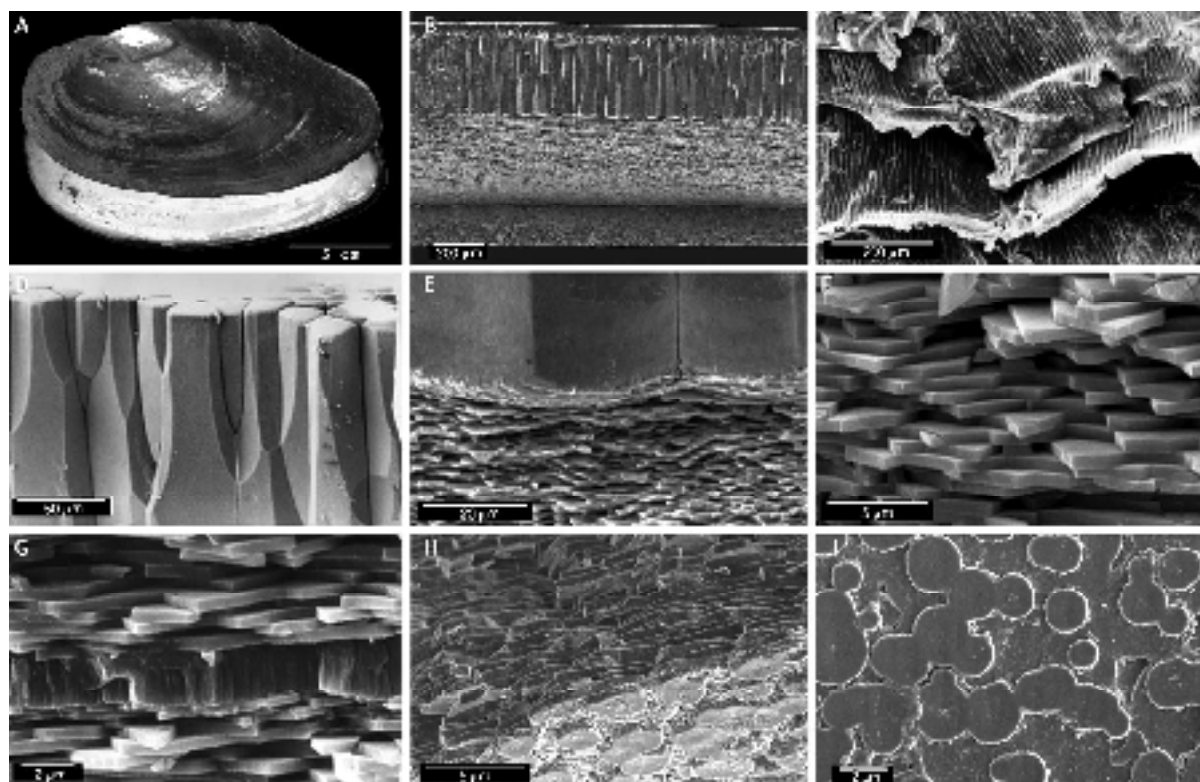


Il est aussi important de noter la présence de carbonate de calcium amorphe au sein de la coquille en formation. De nombreuses observations font état de la présence de phase amorphe dans la première coquille des bivalves (Medakovic *et al.*, 1997 ; Weiss *et al.*, 2002), dans la zone de croissance de la coquille de gastéropodes adultes (Marxen *et al.*, 2003), et plus spécifiquement dans la zone périphérique des tablettes de nacre (Nassif *et al.*, 2005). Une phase minérale est considérée comme amorphe lorsqu'elle ne possède pas d'organisation cristalline à grande échelle et qu'elle ne contient pas de longues répétitions d'un même motif cristallin. La formation de carbonate de calcium amorphe comporte plusieurs avantages : elle requiert moins d'énergie, elle permet une incorporation des impuretés plus facilement que dans le cas des formes cristallines et le CaCO_3 amorphe est plus facilement solubilisable ou remodelable. Il semblerait donc que la totalité de la phase cristalline des coquilles de mollusques semble pouvoir se former via une phase amorphe transitoire. Le passage de la phase amorphe à la phase cristalline se produit par simple perte d'eau. Notons que ce modèle est particulièrement compatible avec le scénario proposé par Addadi et ses collaborateurs (2005), dans lequel les cristaux se forment par déshydratation progressive d'un hydrogel sursaturé en ions et contenant les macromolécules de la matrice organique.

2.5 - La coquille des mollusques

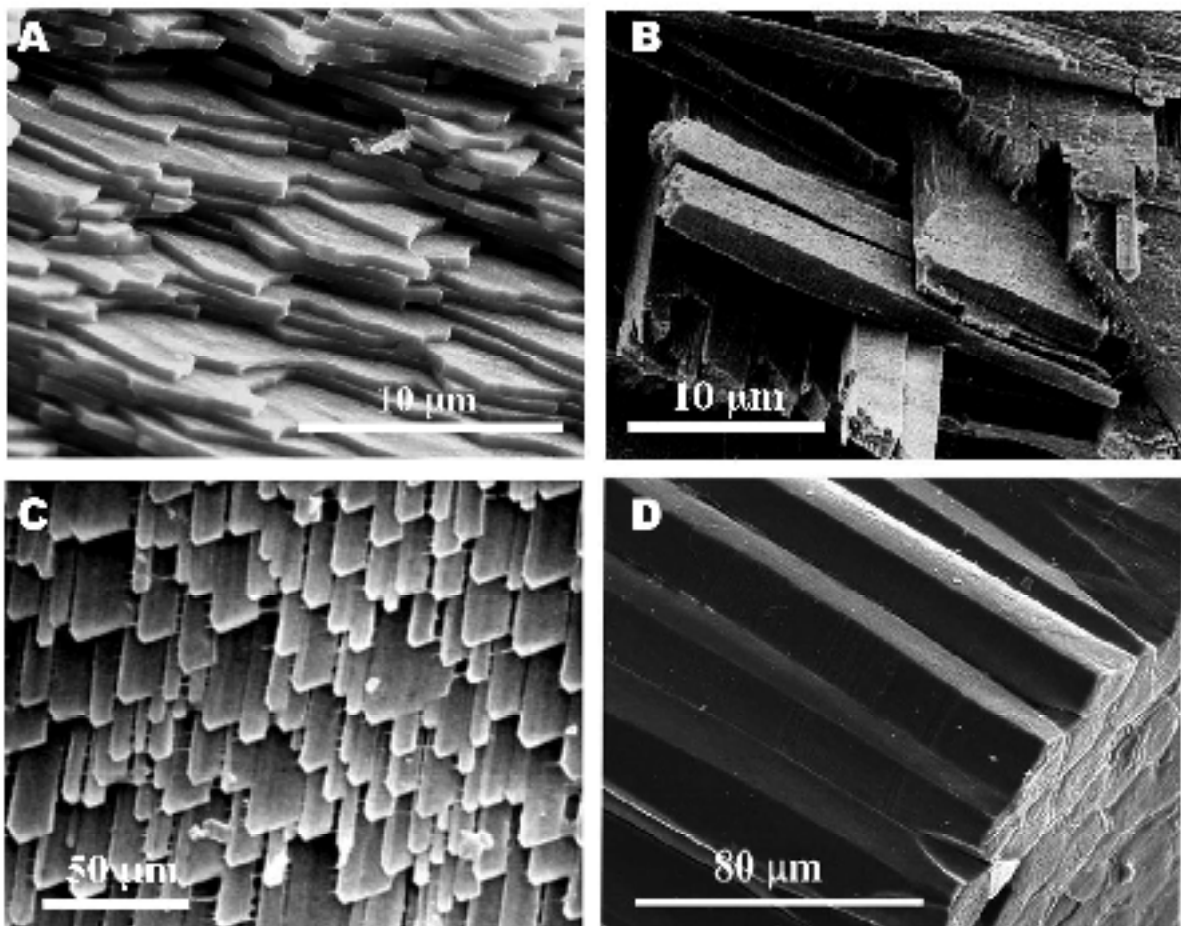
La coquille des mollusques possède une structure caractéristique multicouche, composée de carbonate de calcium sous la forme de calcite et/ou d'aragonite, comprenant une fraction variable (0,01 à 5%) de matière organique (Hare & Abelson, 1965 ; Goffinet & Jeuniaux, 1979). Dans les coquilles comportant les deux polymorphes du carbonate de calcium, ceux-ci sont spatialement séparés en couches distinctes. Ces couches se différencient généralement par leurs types de microstructure. L'ensemble des couches calcifiées de la coquille sont recouvertes d'une fine couche organique en contact direct avec le milieu extérieur, le périostracum (Figure 8). Il joue notamment un rôle de protection de la coquille chez certaines espèces comme chez *Margaritifera*, qui vit dans des eaux relativement acides, et dont la coquille se dissout localement si le périostracum est abimé.

Figure 8 : Organisation de la coquille d'un bivalve paléohétérodonte. Vue générale et observations au MEB (B-H) (modifié d'après Callil & Mansur, 2005 (A,C,D,F,G); et observations personnelles (B,E,H,I). A) Les deux valves d'une coquille d'anodonte, le périostracum recouvre l'extérieur de la coquille, alors que la couche nacrée tapisse l'intérieur de la coquille; B) Cassure fraîche de la coquille, en vue transversale (couche prismatique externe, en haut, et couche nacrée interne, en bas) ; C) périostracum, en vue oblique ; D) Couche prismatique sur cassure fraîche de coquille, en vue oblique. Le périostracum a été dissous par traitement de la coquille à l'hypochlorite de Na ; E-F-G) Séparation entre la couche prismatique et la couche nacrée, couche nacrée et couche de myostracum, respectivement, sur cassure fraîche de coquille en vue transversale ; H) Zone de croissance de la couche nacrée sur cassure fraîche, en vue oblique ; I) Surface de la couche nacrée, en vue interne.



Les différents types de microstructure ont été illustrés par Carter et Clark (1985). Ces auteurs ont pu distinguer une dizaine de microstructures associées entre elles en de nombreuses combinaisons ; on peut principalement citer les microstructures prismatiques, prismatiques composites, nacrées (et sous-nacrées), lamellaires croisées, lamellaires croisées complexes, foliées, granulaires, homogènes (Figure 9). Bien que la présence des différents types de microstructures et de polymorphes cristallins soit spécifique des différents taxons, certaines conditions expérimentales de culture ont pu modifier l'organisation des coquilles néoformées (Checa *et al.*, 2006). Notons chez certaines espèces la présence d'une couche intermédiaire, le myostracum, qui se forme dans la zone d'attachement des muscles à la coquille (Figure 8).

Figure 9 : Observation au MEB des principaux types microstructuraux des coquilles de mollusques (modifié d'après Wilbur & Simkiss, 1989 (B) ; Dauphin *et al.*, 2007 (C) ; Marin *et al.*, 2008 (A,D)). A) la nacre, sur une cassure fraîche de coquille de gastéropode marin ; B) la structure lamellaire-croisée, sur une cassure fraîche de coquille de gastéropode terrestre ; C) la calcite foliée, sur une coquille de bivalve, en vue interne; D) Les prismes, sur une cassure fraîche de coquille de bivalve, en vue interne.

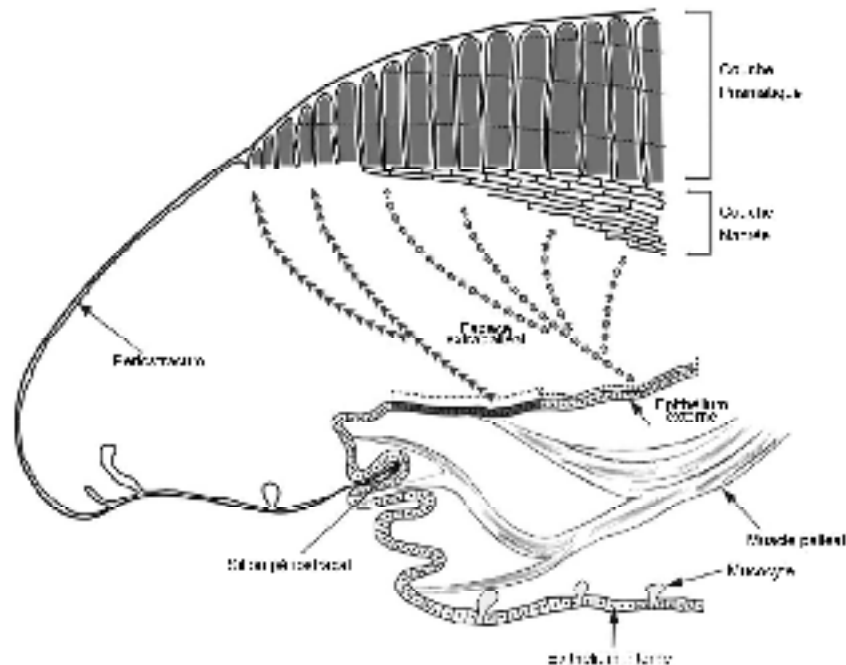


L'édification de la coquille est un phénomène qui se produit continuellement pendant toute la vie de l'animal ; la croissance de la coquille est dite continue. Cependant, la vitesse de calcification évolue en fonction des saisons et semble être corrélée à l'activité métabolique ou à la nutrition de l'animal, ainsi qu'à la température du milieu. On pense même que les organismes sont capables de dissoudre une partie de la coquille, remobilisant ainsi différents ions qui pourront être réintégrés dans le métabolisme de l'organisme afin de l'aider à supporter des conditions difficiles, comme l'hypoxie du milieu ou une disette alimentaire hivernale (Greenaway, 1971 ; Lutz & Rhoads, 1977). On peut lire ainsi, en observant les « lignes de croissance » de la coquille, l'enregistrement de l'histoire de vie d'un organisme. Les différentes couches constituent un archivage des conditions environnementales. L'analyse géochimique de ces couches permet donc de quantifier les variations, au cours du temps, des paramètres environnementaux tels que la température, la salinité ou la composition chimique du milieu (Ricken *et al.*, 2003 ; Ravera *et al.*, 2003 ; Auclair *et al.*, 2004).

2.6 - Physiologie de la sécrétion de la coquille

La formation de la coquille des mollusques est un phénomène complexe hautement contrôlé par les organismes. Elle est le fruit de l'expression d'une série de gènes (spécifiques et plus généralistes), régissant l'activité des cellules minéralisantes, les cellules du manteau (Wilbur & Jodrey, 1955 ; Kunigelis & Saleuddin, 1978 ; Nederbragt *et al.*, 2002 ; Schonitzer & Weiss, 2007). On peut décomposer les différentes étapes mécanistiques de formation de la coquille en une séquence comprenant : la délimitation de l'espace de biominéralisation, la synthèse d'une trame organique, la nucléation des cristaux et la régulation de la croissance. La séquence de biominéralisation de la coquille des mollusques se réalise sous contrôle d'un tissu clef, hautement différencié et jouant de multiples rôles, le manteau.

Figure 10 : Physiologie de la sécrétion de la coquille chez les mollusques. Exemple d'un bivalve à coquille nacro-prismatique (modifié d'après Marin *et al.*, 2008). La calcification se produit dans l'espace extrapalléal, au niveau de la bordure distale de la coquille. Dans l'épithélium externe du manteau, les cellules impliquées dans la formation de la couche prismatique sont les plus distales et ne sont pas les mêmes que celles responsables de la formation de la couche nacréée. Notons que les prismes et la nacre ne sont pas ici dessinés à l'échelle.



Le manteau est l'organe responsable de la formation de la coquille. Ce fin tissu d'origine ectodermique est constitué de deux épithéliums (l'un, interne, en contact avec l'hémolymphe, l'autre, externe, en contact direct avec la coquille) séparés par un tissu conjonctif comprenant différents types cellulaires. La figure 10 schématise les différents mécanismes de la formation de la coquille par le manteau : la synthèse du périostacum par le sillon périostacal, le transport des ions minéraux vers l'espace extra-palléal et la sécrétion des macromolécules et des métabolites organiques contrôlant les différentes étapes de la formation des cristaux. La mise en place du périostacum va permettre la formation d'un compartiment isolé du milieu extérieur et va ainsi délimiter l'espace de minéralisation: l'espace extra-palléal. C'est dans cet espace clos que vont se mettre en place les conditions requises à la formation des couches minéralisées et que le liquide extra-palléal va être sécrété (solution ionique saturée + matrice organique calcifiante). Les ions calcium peuvent transiter à travers l'épithélium externe sous plusieurs formes : en solution, via le cytosol ou l'espace inter-cellulaire, ou sous forme précipité, incorporés à des granules intra- ou inter-cellulaires (Fournié & Chétail, 1982).

Notons que des régions distinctes (mais adjacentes) de l'épithélium externe sont responsables de la formation des différentes couches de la coquille. En effet, ces cellules différenciées sécrètent un cocktail macromoléculaire spécifique capable d'induire la précipitation d'un polymorphe cristallin et/ou d'une microstructure particulière (Takeuchi & Endo, 2005). Chez les mollusques à coquille nacro-prismatique, la région du manteau externe qui contrôle la formation de la couche prismatique occupe une position plus distale (mais adjacente) que celle qui contrôle la formation de la couche nacrée (Sudo *et al.*, 1997 ; Jolly *et al.*, 2004). Une étude chez l'huître *Crassostrea virginica* a récemment démontré que des cellules circulantes (probablement des hémocytes) pouvaient être impliquées dans des phénomènes de réparation de la coquille (Mount *et al.*, 2004). Cependant, le rôle de ces cellules n'a toujours pas été relié à des processus de calcification « normale » de la coquille en croissance.

Le périostracum est une couche chitino-protéique qui recouvre la surface externe des coquilles ou uniquement la bordure de la coquille en croissance, selon les espèces. Il est sécrété dans une zone spécifique du manteau (en position extrême), le sillon périostracal. Dans cette région, des cellules hautement différenciées sécrètent un film liquide contenant des précurseurs protéiques riches en Tyr, qui polymérisent entre eux par des processus de quinonisation (Timmermans, 1969 ; Waite, 1983). Degens et ses collaborateurs (1967) ont aussi détecté dans le périostracum la présence d'une quantité remarquable de chitine. On attribue principalement deux fonctions au périostracum : délimiter l'espace de minéralisation et servir de support à la formation des premiers cristaux. Sa partie la plus interne favorise le dépôt des cristaux de carbonate de calcium par l'intermédiaire de protéines riches en résidus Gly et Asp (Cariolou & Morse, 1988). Cette couche est aussi la première à être synthétisée lors de l'apparition de la première coquille durant les stades précoces du développement larvaire (Bielefeld & Becker, 1991). Bien que le périostracum semble jouer un rôle essentiel dans la mise en place de la coquille et de ses différentes couches (Meenakshi *et al.*, 1974), il reste à ce jour relativement peu connu.

Le *fluide extrapalléal* pourrait lui aussi jouer plusieurs fonctions essentielles dans la formation des coquilles. L'espace extrapalléal semble être le lieu où s'effectue la transition entre la phase aqueuse sécrétée par l'épithélium externe du manteau et la phase solide minéralisée. Des analyses chimiques de ce fluide ont montré qu'il était sursaturé en ions carbonate et calcium (Moura *et al.*, 2000), et qu'il était aussi riche en inhibiteurs de minéralisation, lui permettant ainsi d'éviter une formation non-contrôlée des cristaux de

carbonate de calcium (ce phénomène n'étant d'ailleurs jamais observé). Bien que cela n'ait pu être encore mis en évidence, on suppose que le fluide extrapalléal devrait contenir des accepteurs de protons émis par la réaction de calcification, permettant ainsi d'éviter une acidification du milieu qui entraînerait la re-dissolution des minéraux. La position du manteau par rapport à la coquille peut varier en fonction de son activité de biominéralisation. En outre, le manteau sécrète un mucus qui pourrait faciliter son propre positionnement. L'espace extrapalléal est aussi la zone dans laquelle la matrice organique coquillière est sécrétée avant d'être incorporée au biominéral. La matrice organique est une mixture de protéines, de glycoprotéines, de polysaccharides, de chitine et probablement de lipides. Cependant, à ce jour, aucune macromolécule de la matrice organique de la coquille n'a pu directement être détectée au sein du fluide extrapalléal. Il est fort probable que ces macromolécules transitent très rapidement à travers l'espace extrapalléal et se lient au biominéral en formation. D'autre part, il semble que certaines protéines extraites du fluide extrapalléal ne sont pas incorporées à la coquille (Yin *et al.*, 2005 ; Ma *et al.*, 2007). Moura et ses collaborateurs (2000) ont mis en évidence, dans le fluide extrapalléal du bivalve d'eau douce *Anodonta cygnea*, la présence de polysaccharides acides qui n'étaient pourtant pas intégrés à la coquille. Devant ces résultats insatisfaisants quant aux fonctions présumées du fluide extrapalléal, son existence et son rôle effectifs ont récemment été discutés par Addadi et ses collaborateurs (2005). Ces auteurs émettent l'hypothèse que les cellules du manteau pourraient être en contact direct avec le minéral et que la matrice organique pourrait être sécrétée sous forme d'un gel hydraté, produit « à la demande », qui pré-remplirait les micro-espaces où se produira la minéralisation.

2.7 - La matrice organique

Chez les eucaryotes, toutes les biominéralisations contrôlées de carbonate de calcium sont associées à une matrice organique qui est impliquée dans de nombreuses fonctions essentielles : la nucléation des cristaux, le contrôle de la structure des cristaux, ainsi que l'inhibition de la croissance des cristaux (Mann, 1988).

Pour étude, la matrice des coquilles de mollusque peut être extraite du biominéral par dissolution de ce dernier par un acide (souvent l'acide acétique), par de l'EDTA, ou simplement par de l'eau. Deux fractions sont ainsi libérées, l'une soluble, l'autre insoluble. La matrice soluble représente entre 0,03 et 0,5% de la masse totale du biominéral tandis que la matrice insoluble est évaluée entre 0,01 et 5%, en fonction du type de microstructure et de l'espèce étudiée. Notons que des quantités définies de matrice organique semblent correspondre aux différentes microstructures (nacre, prismes, structure lamellaire croisée, par

ordre décroissant). Compte tenu du fait que la production de matrice organique est considérée comme le processus biologique le plus coûteux en énergie dépensée par l'organisme pour produire sa coquille, ces différences sont interprétées comme une optimisation du rapport coût/profit qui s'est mise en place au cours de l'évolution (Palmer, 1992).

Figure 11 : Organisation de la matrice organique au sein de la couche prismatique. Observations au MEB de la couche prismatique en vue interne, au niveau de la partie la plus distale de la coquille (modifié d'après Dauphin *et al.*, 2003). A) Coquille fraîche. Remarquer l'homogénéité apparente de chaque prisme ; B) Après un léger décapage à l'EDTA, chaque prisme semble présenter une zonation interne ; C) Après un décapage total à l'acide, seule la gaine organique péri-prismatique (chitino-protéique) subsiste.

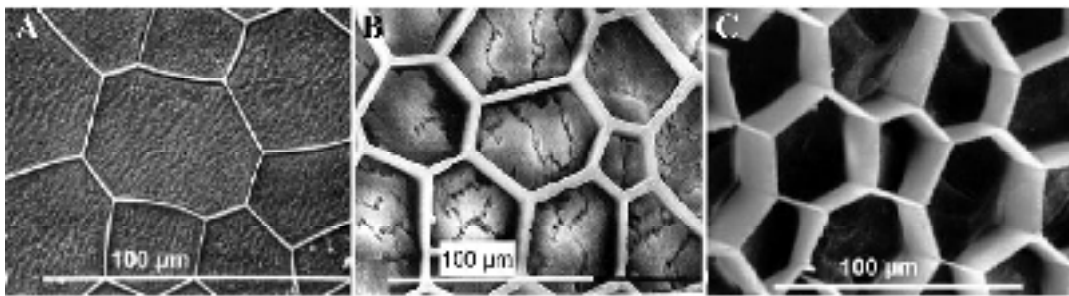
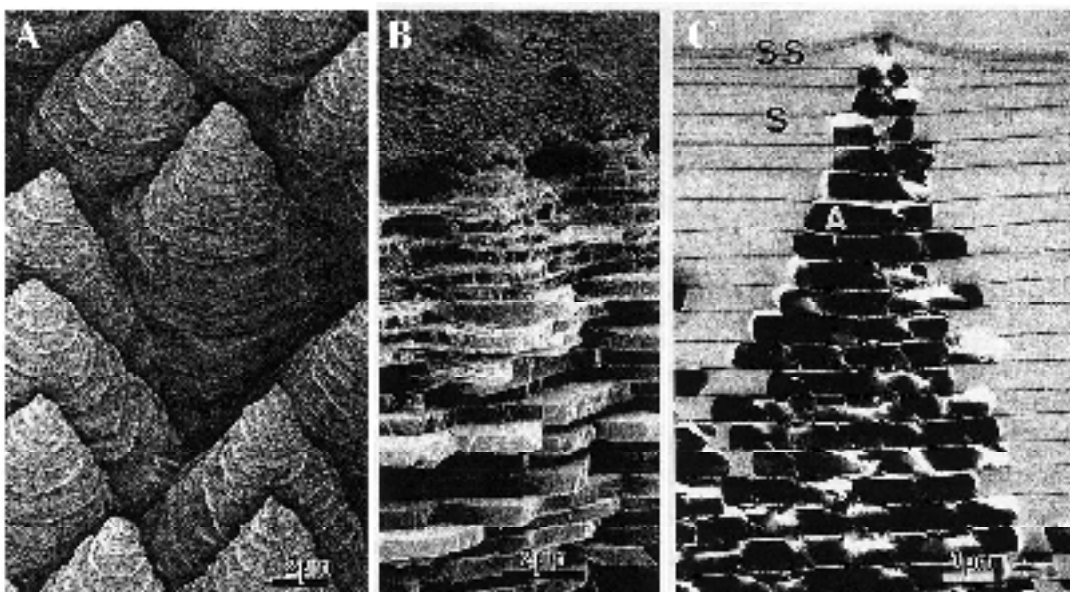


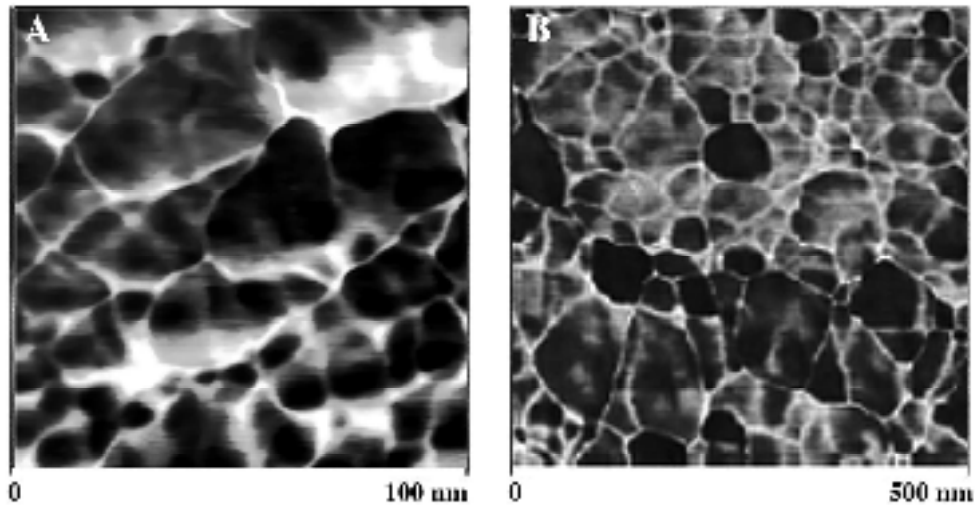
Figure 12 : Organisation de la matrice organique au sein de la nacre. Observations au MEB (A-B) et au MET (C) de la couche nacrée en vue transversale (modifié d'après Nakahara, 1991). A) Zone de croissance de la nacre après traitement à l'hypochlorite de sodium, seules restent les tablettes minérales.; B) Zone de croissance de la nacre, sans traitement ; C) Zone de croissance de la nacre en coupe mince, les tablettes minérales apparaissent ici en noir. On remarque les couches de matière organique qui précèdent l'apparition des tablettes minérales (S, couche organique ; SS, couche organique supérieure).



Les principaux composants de la matrice soluble sont des protéines, des glycoprotéines et des polysaccharides, souvent acides. Un point commun aux matrices solubles des coquilles, et aux couches coquillières des différents mollusques étudiés, est qu'elles sont généralement riches en acides aminés acides : l'acide aspartique et l'acide glutamique (Nakahara *et al.*, 1982 ; Sarashina & Endo, 1998 ; Keith *et al.*, 1993). On considère que les groupements carboxyles de ces résidus jouent un rôle important dans la capacité de ces macromolécules à lier les ions calcium ou à nucléer la formation des cristaux de carbonate de calcium. Les groupements sulfates des glycoprotéines ou des polysaccharides sembleraient eux aussi impliqués dans la capacité de la matrice à interagir avec le calcium (Addadi *et al.*, 1987). Les différentes protéines de coquille de mollusque étudiées à ce jour sont décrites plus bas dans ce chapitre. La matrice insoluble, quant à elle, est constituée de protéines riches en résidus hydrophobes glycine et alanine, semblables à des protéines de type fibroïne de soie (Nakahara *et al.*, 1982 ; Keith *et al.*, 1993), ainsi que de résidus aromatiques (Ravindranath et Ravindranath, 1974) et d'une fraction plus ou moins importante de β -chitine (Goffinet & Jeuniaux, 1979 ; Weiner & Traub, 1980, Levi-Kalisman *et al.*, 2001). Tous ces différents composants de la matrice organique sont les maîtres d'œuvre de la formation des couches minéralisées et se retrouvent intégrés de façon spécifique dans le biominéral mature. On considère classiquement que la matrice insoluble est majoritairement péri-cristalline et que la matrice soluble est plutôt intra-cristalline. Les figures 11 et 12 présentent différentes observations au microscope électronique de la matrice organique péri-cristalline après dissolution de la phase minérale (prismes et nacre, respectivement). Bevelander & Nakahara (1969) ont été les premiers à observer au microscope électronique à transmission sur des coupes transversales de coquille décalcifiée qu'une matrice organique entourait individuellement chaque structure cristalline et qu'elle pouvait être décomposée en différentes sous-couches. Ils identifièrent la couche médiane comme étant constituée de chitine et les deux couches adjacentes comme étant formées par des protéines de type fibroïne de soie et par des macromolécules acides (voir plus bas, description de la nacre). Crenshaw et Ristedt (1975) localisèrent différents polysaccharides sulfatés autour et au centre des tablettes de nacre. Weiner et Traub (1980, 1984) proposèrent que les cristaux se forment par épitaxie entre les différentes couches de matrice structurale, sous contrôle de molécules acides aux fonctions multiples (Weiner, 1979 ; Wheeler *et al.*, 1981). Plus récemment, des observations au microscope électronique à force atomique (atomic force microscopy, AFM) montrèrent qu'à une échelle nanométrique, les cristaux, qu'ils soient de calcite ou d'aragonitique, possédaient tous la même structure (Figure

13), et qu'ils étaient formés de nanograins cristallins séparés par une matrice organique, probablement la matrice soluble (Dauphin, 2003 ; Blank *et al.*, 2003 ; Rousseau *et al.*, 2005).

Figure 13 : Observations AFM de la nano-structure intracristalline des prismes et de la nacre. Ces deux biominéraux apparaissent composés de nano-grains minéraux, séparés par une fine gaine organique (modifié d'après Dauphin, 2003 (A) ; Rousseau *et al.*, 2005 (B). A) Prismes ; B) Nacre.



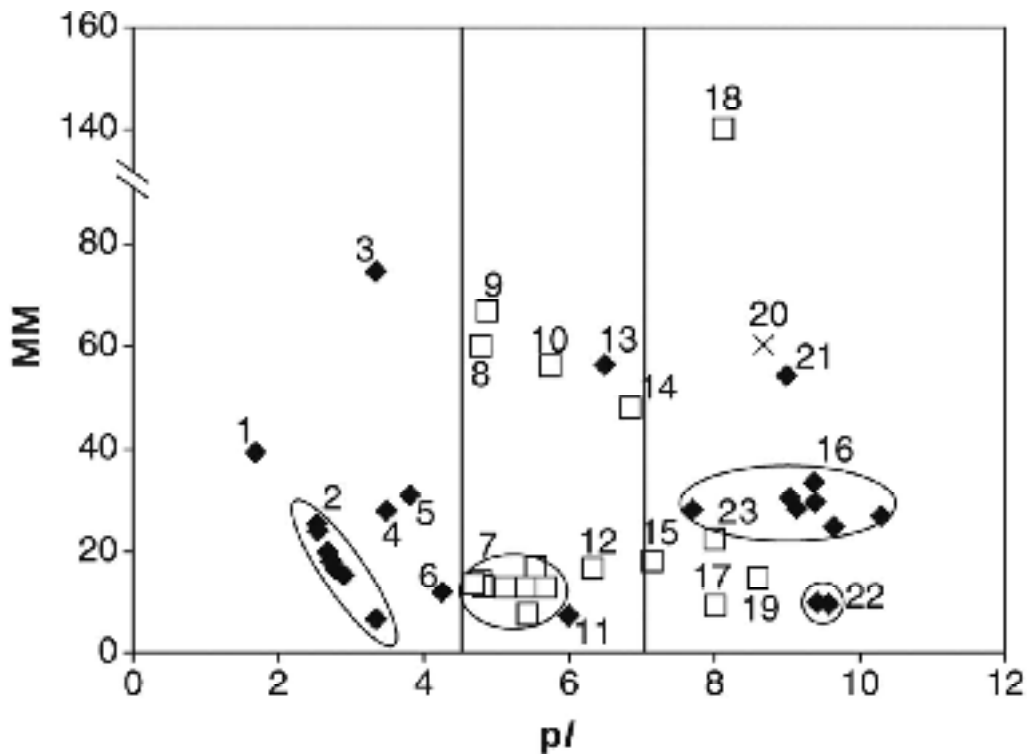
Depuis que l'on suspecte la matrice organique d'être un composé essentiel à la formation du biominéral, de nombreuses études se sont intéressées à la caractérisation de sa composition en macromolécules. Si la matrice insoluble est connue depuis plus d'un siècle et demi, sous la dénomination initiale de conchioline, l'existence de la matrice soluble n'a été découverte que plus récemment (Crenshaw, 1972). Grégoire et ses collaborateurs (1955) ont été les premiers à étudier la composition biochimique de la matrice insoluble. En utilisant différents solvants, ces auteurs découvrirent que cette matrice était constituée de différents composés protéiques et purent isoler différentes fractions, qu'ils nommèrent Nacrin, Nacrosclerotin et Nacroin, la dernière étant tout particulièrement riche en résidus Ala et Gly. D'autres travaux ultérieurs confirmèrent l'importance de ces deux acides aminés dans la composition des matrices insolubles extraites des coquilles de mollusques (Hare, 1963 ; Grégoire, 1972). Parallèlement, la chitine a été identifiée comme un composé important de ces matrices (Goffinet & Jeuniaux, 1979). Wise (1970) montra que la matrice associée aux coquilles présentait une composition en acides aminés comparable à celle des protéines de type fibroïne de soie, les principales protéines qui constituent la soie des papillons et des araignées. Cette étonnante similitude pourrait expliquer la remarquable élasticité de la coquille et sa résistance à la fracture. La

matrice soluble fut, quant à elle, décrite plus tard comme composée de macromolécules acides, essentiellement des glycoprotéines riches en acides aminés acides (Glu et Asp), portant parfois des sucres sulfatés (Crenshaw, 1972 ; Weiner & Hood, 1975 ; Weiner, 1979). Ces derniers auteurs proposèrent que ces macromolécules poly-anioniques puissent agir comme les supports de l'initiation de la nucléation des cristaux de carbonate de calcium. Quelques années plus tard, Wheeler et ses collaborateurs (1981) découvrirent que la matrice organique soluble pouvait aussi être capable d'inhiber la précipitation des cristaux. La découverte de ces deux fonctions, a priori antagonistes, au sein de la matrice soluble (nucléation/inhibition), permit de faire émerger la notion de régulation de la minéralisation par la matrice calcifiante.

La majorité de nos connaissances actuelles sur les macromolécules qui constituent les matrices organiques associées aux coquilles de mollusque concerne les protéines. Près de 60 structures primaires plus ou moins complètes de ces protéines ont été décrites à ce jour. La première séquence partielle n'a été obtenue qu'au début des années 90 (Rusenko *et al.*, 1991) alors que la première séquence complète a été décrite 5 ans plus tard (Miyamoto *et al.*, 1996). Ces protéines sont souvent riches en acides aminés acides et peuvent comporter des modifications post-traductionnelles comme des glycosylations ou des phosphorylations (Marin *et al.*, 2000, Sarashina & Endo, 2001). Elles peuvent aussi présenter des fonctions très diverses telles que des activités enzymatiques de type anhydrase carbonique (Miyamoto *et al.*, 1996), une capacité à lier le calcium (Miyashita *et al.*, 2000, Marin *et al.*, 2005), une capacité à induire et à stabiliser spécifiquement l'un des polymorphes du carbonate de calcium (Falini *et al.*, 1996 ; Belcher *et al.*, 1996 ; Pokroy *et al.*, 2006), une capacité à inhiber ou à induire la précipitation du carbonate de calcium (Kono *et al.*, 2000 ; Marin *et al.*, 2000, Weiss *et al.*, 2001), ou une capacité à se lier à une autre macromolécule (Shen *et al.*, 1997 ; Weiss *et al.*, 2000 et 2001 ; Suzuki *et al.*, 2004). Sud et ses collaborateurs (2001) ont pu mettre en évidence que la matrice soluble de *Pinctada maxima* pouvait induire une augmentation de l'activité calcifiante de cellules du manteau d'*Haliotis tuberculata*, suggérant la présence d'un facteur de régulation au sein de cette matrice.

Dans le paragraphe suivant, nous décrirons synthétiquement ces protéines, que nous avons arbitrairement regroupées en fonction de leur point isoélectrique respectif (Figure 14), en discutant leurs fonctions effectives ou putatives, ainsi que leurs similitudes avec d'autres protéines connues dans des systèmes différents.

Figure 14 : Représentation graphique des protéines de coquille de mollusque complètement séquencées en fonction de leur point isoélectrique (pI) et de leur masse moléculaire (MM) (modifié d'après Marin *et al.*, 2008). Pour calculer la MM et le pI, nous avons pris soin de retirer la séquence du peptide signal. Noter que l'échelle des MM est discontinue. □ = protéines associées à l'aragonite ; ◆ = protéines associées à la calcite ; × = protéines associées aussi bien à l'aragonite qu'à la calcite (1 = Aspein ; 2 = protéines Asprich ; 3 = MSP-1 ; 4 = MSP-2 ; 5 = MSI-31 ; 6 = Prismalin-14 ; 7 = protéines N-14, Pearlin, Perline, AP-7 et AP-24 ; 8 = MSI-60 ; 9 = Mucoperlin ; 10 = Nacrein de *P. fucata* ; 11 = MSI-7 ; 12 = Dermatopontin ; 13 = Tyrosinase-like1 ; 14 = Nacrein de *T. marmoratus* ; 15 = Perlucin ; 16 = protéines Shemattrin 1-10 ; 17 = Perlustrin, 18 = Lustrin A ; 19 = Perlwapin ; 20 = N-66 ; 21 = Tyrosine-like2 ; 22 = protéines KRMP ; 23 = N19).



2.7.1 - Les protéines fortement acides (pH inférieur à 4,5 ; Tableau 4)

La présence de protéines très acides a été observée dans les matrices de coquille de mollusques dès les premières caractérisations biochimiques (Ravindranath & Ravindranath, 1974 ; Weiner & Hood, 1975 ; Weiner, 1979). D'un point de vue technique, les protéines acides sont les plus difficiles à purifier. De par leur acidité, ces protéines réagissent difficilement avec les colorations classiques utilisées en SDS-PAGE (Marin *et al.*, 2001) et sont suspectées de diffuser rapidement en dehors des gels après migration (Gotliv *et al.*, 2003). Les deux premières séquences de protéines très acides, MSI31 et MSP-1, ont été déduites à partir des séquences de leurs transcrits (Sudo *et al.*, 1997 ; Sarashina et Endo, 2001). À ce jour, ce groupe ne comporte que 15 protéines différentes, dont 10 protéines Asp-

rich. Il est intéressant de constater qu'elles sont exclusivement associées à la calcite. Le fait que les protéines très acides soient préférentiellement associées à la calcite avait déjà été proposé par Hare (1963), à partir de l'observation de forts taux en acides aminés acides de la matrice organique associée à ce polymorphe cristallin. Il est aussi singulier de remarquer que ces protéines acides sont nettement plus riches en résidus Asp qu'en résidus Glu (Marin & Luquet, 2007). Les raisons de tels phénomènes restent, à ce jour, inexpliquées.

MSI31 est une protéine de la matrice insoluble riche en glycine. Elle est supposée faire partie des protéines de structure de la matrice organique (Sudo *et al.*, 1997). En effet, sa partie N-terminale, qui adopte probablement une structure secondaire en feuillets β , est composée par ailleurs d'une dizaine de répétitions de 10 groupes hydrophobes poly-Gly. La partie C-terminale présente six motifs acides (ESEEDX) qui sont supposés être impliqués dans des interactions avec les ions calcium.

MSP-1 (mollusc shell protein-1) fut la première protéine très acide à être décrite. C'est une glycoprotéine extraite de la couche calcitique foliée de la coquille St Jacques japonaise *Patinopecten yessoensis*. Elle est majoritairement composée de résidus Ser, Asp et Gly. Elle présente une structure modulaire avec de courts domaines basiques et, dans sa partie N-terminale, des domaines GS alternant avec des domaines acides riches en Asp (Sarashina & Endo, 1998 et 2001). Ces motifs sont suspectés de lier les ions calcium ou d'interagir avec les cristaux de CaCO_3 . Cette protéine semble présenter des similitudes globales avec les phosphoporines de la dentine des mammifères. Récemment une autre protéine, **MSP-2** (aussi appelée SP-2), a été découverte chez le même organisme et présente 91% d'homologie avec MSP-1 (Hasegawa & Uchiyama, 2005).

Aspein est une protéine de la couche prismatique de l'huître perlière, *Pinctada fucata*. De par sa composition en acides aminés comprenant plus de 60% de résidus acide aspartique, cette protéine très acide présente un *pI* théorique de 1,7 (c'est la protéine la plus acide décrite à ce jour !). La structure de cette protéine est marquée par la présence de 58 blocs poly-Asp, séparés par des dipeptides SG, ce qui suggère qu'elle pourrait présenter une capacité à lier le calcium.

La famille de protéines **Asp-rich** comporte 10 membres décrits exclusivement par leurs transcrits obtenus par construction d'une banque d'ADNc de cellules du manteau du bivalve *Atrina rigida* (Gotliv *et al.*, 2005). Cette famille de protéines est caractérisée par une composition riche en acides aminés acides (entre 50 et 60%). Leurs séquences primaires présentent différents domaines communs (de la partie N- à la partie C-terminale) : un domaine hydrophobe, un court domaine basique, un premier domaine acide, un domaine acide variable

(poly-Asp, plus ou moins long), un domaine de répétition DEAD (probablement apte à lier les cations) et pour finir un deuxième domaine acide. Le premier domaine acide présente des homologies avec des domaines de liaisons du calcium. Des anticorps dirigés contre ce domaine ont démontré que ces protéines n'étaient présentes que dans la couche des prismes calcitiques.

Prismalin-14, une protéine hydrophobe de la matrice insoluble, a été décrite aussi bien au niveau protéique qu'au niveau de son transcrit (Suzuki *et al.*, 2004). C'est une protéine riche en Gly et en Tyr (28% et 20% des acides aminés totaux, respectivement), et qui possède de nombreuses répétitions PIYR, potentiellement impliquées dans l'interaction avec d'autres macromolécules de la matrice. Cette protéine lie les ions calcium, probablement au niveau de sa partie C-terminale riche en Asp, et inhibe la précipitation de carbonate de calcium *in vitro*. Il est intéressant de préciser que Prismalin-14, Aspein et MSI31 sont co-exprimées dans des cellules de l'épithélium externe du manteau et qu'elles sont probablement sécrétées en même temps (Takeuchi & Endo, 2005).

Tableau 4 : les protéines fortement acides associées aux coquilles de mollusques (modifié d'après Marin *et al.*, 2008). (C) indique que ces protéines sont associées à la calcite. « Bioch. » et « Biomol. » indiquent que ces protéines ont été caractérisées par biochimie (SDS-PAGE) ou par biologie moléculaire (transcrit, ADNc), respectivement.

Classe	Espèce	Protéine	Microstructure (polymorphe)	MM (kDa)	pI	Observation	Référence
Bivalve	<i>Pinctada fucata</i>	Aspein	Prismes (C)	39,3	1,67	Biomol.	Tsakamoto <i>et al.</i> , 2004
		MSI31	Prismes (C)	32,9	3,8	Biomol.	Sudo <i>et al.</i> , 1997
		Prismalin-14	Prismes (C)	11,9	4,2	Bioch/Biomol.	Suzuki <i>et al.</i> , 2004
	<i>Patinopecten yessoensis</i>	MSP-1	Calcite foliée (C)	74,4	3,3	Biomol.	Sarashina & Endo 2001
		MSP-2/SP-2	Calcite foliée (C)	27,9	3,5	Biomol.	Hasegawa & Uchiyama, 2005
	<i>Atrina rigida</i>	Asp-rich 1	Prismes (C)	6,6	3,3	Biomol.	Gotliv <i>et al.</i> , 2005
		Asp-rich 2	Prismes (C)	15	2,9	Biomol.	Gotliv <i>et al.</i> , 2005
		Asp-rich 3	Prismes (C)	16,5	2,8	Biomol.	Gotliv <i>et al.</i> , 2005
		Asp-rich 4	Prismes (C)	18	2,7	Biomol.	Gotliv <i>et al.</i> , 2005
		Asp-rich 5	Prismes (C)	17,4	2,8	Biomol.	Gotliv <i>et al.</i> , 2005
		Asp-rich 6	Prismes (C)	18,2	2,7	Biomol.	Gotliv <i>et al.</i> , 2005
		Asp-rich 7	Prismes (C)	25,8	2,5	Biomol.	Gotliv <i>et al.</i> , 2005
		Asp-rich 8	Prismes (C)	25,3	2,5	Biomol.	Gotliv <i>et al.</i> , 2005
		Asp-rich 9	Prismes (C)	18,2	2,7	Biomol.	Gotliv <i>et al.</i> , 2005
		Asp-rich 10	Prismes (C)	20	2,7	Biomol.	Gotliv <i>et al.</i> , 2005

2.7.2 - Les protéines modérément acides (pH compris entre 4,5 et 7 ; Tableau 5)

Ce groupe de protéines très disparates comporte les protéines du type Nacrein de bivalves et de gastéropodes, MSI60, MSI7, la famille de protéines du type N14/N16/Perline, Mucoperlin, AP24, AP7, Tyrosinase-like-1 et Dermatopontin de *Biomphalaria glabrata*. Notons que quasiment toutes ces protéines sont exclusivement associées à l'aragonite.

Nacrein a été la première protéine de coquille de mollusque à avoir été séquencée et elle est sans doute encore la protéine la plus étudiée (Miyamoto *et al.*, 1996, 2003, 2005 ; Miyashita *et al.*, 2002 ; Matsushiro & Miyashita, 2004 ; Takeushi & Endo, 2005). Initialement, cette protéine fut extraite de la couche nacrée du bivalve *Pinctada fucata*, mais par la suite elle a aussi été localisée dans la couche prismatique. Nacrein a aussi été la première protéine à présenter une activité enzymatique de type anhydrase carbonique (AC). Elle est composée de nombreuses répétitions GXN bordées par 2 domaines anhydrase carbonique, présentant une forte homologie avec l'enzyme humaine. Des expériences de précipitation *in vitro* du carbonate de calcium ont montré que les répétitions GXN étaient impliquées dans l'inhibition de la cristallisation (Miyamoto *et al.*, 2005). Il est intéressant de noter que Miyashita et ses

collaborateurs ont caractérisé, par biologie moléculaire, un homologue de Nacrein de bivalve, chez le gastéropode marin, *Turbo marmoratus*. Cette découverte suggère que l'origine de ces protéines pourrait être très ancienne, et serait même antérieure à l'émergence de ces deux classes (divergence Diasomes/Viscéroconques). Mais cette problématique reste encore très peu étudiée à ce jour (Marin *et al.*, 1999).

MSI60 est une protéine insoluble de la couche nacrée du bivalve *P. fucata* (Sudo *et al.*, 1997). Elle présente 11 groupes poly-Ala et 39 groupes poly-Gly dispersés tout le long de sa séquence. Ces groupes de répétitions du résidu Ala confèrent à cette protéine des homologies avec les protéines de soie des arachnides. Les groupes poly-Gly sont probablement impliqués dans la formation de feuillets β . La séquence de cette protéine comporte également des répétitions du résidu Asp, qui lui confère une capacité à lier le calcium. Des expériences d'hybridation *in situ* ont démontré que le gène codant cette protéine n'était exprimé que dans les cellules du manteau externe.

Une autre famille de protéines capables de lier le calcium est celle des **N14/N16/Perline** (Samata *et al.*, 1999 ; Kono *et al.*, 2000 ; Montagnani *et al.*, 2006). Ces petites protéines, spécifiques de la couche nacrée, possèdent de nombreux sites de phosphorylation putative, ainsi qu'un domaine probablement capable de lier l'héparine. Tous les membres de cette famille ne diffèrent que de quelques acides aminés. Ils sont riches en résidus Gly, Tyr et Asn, et présentent des répétitions Gly-Asn. Pearlin a été extraite de la fraction insoluble de la couche nacrée de l'huître perlière *Pinctada fucata* (Miyashita *et al.*, 2000). Samata et ses collaborateurs (1999) ont observé qu'elle inhibait la précipitation du carbonate de calcium *in vitro*, mais qu'elle était aussi capable d'induire la formation d'aragonite lorsqu'elle était associée à la matrice insoluble. Cette protéine, dont la séquence ne diffère de celle de N16 que d'un seul acide aminé, porte des groupements saccharidiques sulfatés. La protéine la plus récemment décrite, Perline (Montagnani *et al.*, 2006), présente 93% d'homologies avec N14.

Mucoperlin a été décrite par immuno-criblage d'une banque d'ADNc de cellules du manteau de *Pinna nobilis*. Il s'agit d'une glycoprotéine riche en Ser et en Pro qui appartient à une famille à part (Marin *et al.*, 2000). Mucoperlin est composée de trois domaines : un court domaine N-terminal, une région centrale comprenant 13 motifs répétés de 31 résidus enrichis en résidus Pro et Ser, et une région C-terminale riche en Ser. Cette protéine spécifique de la couche nacrée fut la première à être directement localisée dans la coquille par immuno-

marquage. Elle a été affiliée à la famille des mucines car elle possède de nombreux sites de glycosylation, suggérant ainsi que certaines protéines des matrices calcifiantes des coquilles de mollusques pourraient dériver des mucines (Marin *et al.*, 1996).

Les deux protéines **AP7** et **AP24** ont été isolées de la fraction soluble à l'EDTA de la couche nacrée du gastéropode marin *Haliotis rufescens* (Michenfender *et al.*, 2003, 2004). AP24 est une glycoprotéine dont la masse théorique de la chaîne peptidique est de 17 kDa, et qui migre aux alentours de 24 kDa en SDS-PAGE. AP7 et AP24 interagissent avec la précipitation du carbonate de calcium par les 30 premiers résidus de leur extrémité N-terminale (Kim *et al.*, 2004 ; Wustman *et al.*, 2004).

Une autre protéine modérément acide, **MSI7**, a été isolée à partir de la couche prismatique de la coquille de l'huître *Pinctada fucata* (Zhang *et al.*, 2003). Cette protéine riche en Gly est composée d'une région N-terminale hydrophobe, d'un domaine riche en GGG et GG, ainsi que d'une région C-terminale hydrophobe qui adopte une conformation en feuillets β . MSI7 présente de nombreuses homologies de séquence avec MSI31, et tout particulièrement avec son peptide signal. Contrairement à MSI31, MSI7 est exprimée dans la région dorsale et dans la région la plus distale du manteau externe, suggérant que cette protéine pourrait également être impliquée dans la formation de la couche nacrée et de la couche prismatique. Des expériences de précipitation *in vitro* du carbonate de calcium ont montré que cette protéine accélérerait la précipitation du minéral et modifiait la morphologie des cristaux. Pour ces raisons, il est envisagé que MSI7 fasse partie des protéines de structure de la matrice. Une autre protéine, la tyrosinase-like protein 1 (**Pfty1**), a récemment été séquencée chez le même organisme (Nagai *et al.*, 2007). Les tyrosinases, des enzymes appartenant à la famille des phénoloxydases, sont impliquées dans les réactions d'oxydation des groupements phénols des résidus Tyr, entraînant la formation de la mélanine. Pfty1 possède un site conservé de liaison aux ions cuivre, ce qui suggère que le site enzymatique peut être actif. Pfty1 semble être impliquée dans la pigmentation de la couche prismatique, à laquelle elle est intégrée durant la minéralisation.

Dermatopontin a été isolée à partir de la couche lamellaire-croisée (aragonite) de la coquille du gastéropode d'eau douce *Biomphalaria glabrata* (Marxen & Becker, 1997, Marxen *et al.*, 2003). Cette glycoprotéine majoritaire de la matrice soluble migre à 19,2 kDa en SDS-PAGE et ne présente pas de capacité à lier le calcium. Elle présente des homologies de séquences

avec les protéines du type Dermato-pontin de vertébrés et d'invertébrés, une famille de protéines des matrices extracellulaires de nombreux tissus. Il a été proposé que Dermato-pontin de *B. glabrata* puisse être impliquée dans l'organisation supramoléculaire de la matrice calcifiante.

Tableau 5 : les protéines faiblement acides associées aux coquilles de mollusques (modifié d'après Marin *et al.*, 2008). (C) indique que ces protéines sont associées à la calcite et (A) qu'elles sont associées à l'aragonite. « Bioch. » et « Biomol. » indiquent que ces protéines ont été caractérisées par biochimie (SDS-PAGE) ou par biologie moléculaire (transcrit, ADNc), respectivement.

Classe	Espèce	Protéine	Microstructure (polymorphe)	MM (kDa)	pI	Observation	Référence
Bivalve	<i>Pinctada fucata</i>	Nacrein	Nacre + prismes (A+C)	48,2	6,9	Biomol.	Miyamoto <i>et al.</i> , 1996
		N16/Pearlin	Nacre (A)	12,8	5,1	Biomol.	Samata <i>et al.</i> , 1999
		MSI60	Nacre (A)	61,7	4,8	Biomol.	Sudo <i>et al.</i> , 1997
		MSI7	Nacre + Prismes (A+C)	7,3	6,0	Biomol.	Zhang <i>et al.</i> , 2003
		Tyrosinase-like 1	Prismes (C)	56,3	6,5	Biomol.	Nagai <i>et al.</i> , 2007
	<i>Pinctada maxima</i>	N14	Nacre (A)	13,7	4,8	Biomol.	Kono <i>et al.</i> , 2000
	<i>Pinctada margaritifera</i>	Perline	Nacre (A)	13,6	4,7	Biomol.	Montagnini <i>et al.</i> , 2006
	<i>Pinna nobilis</i>	Mucoperlin	Nacre (A)	65,4	4,9	Biomol.	Marin <i>et al.</i> , 2000
Gastéro-pode	<i>Haliotis rufescens</i>	AP7	Nacre (A)	7,6	5,4	Biomol.	Michenfender <i>et al.</i> , 2003
		AP24	Nacre (A)	17	5,5	Biomol.	Michenfender <i>et al.</i> , 2003
	<i>Turbo marmoratus</i>	Nacrein	Nacre (A)	56	5,8	Biomol.	Miyamoto <i>et al.</i> , 2003
	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Dermato-pontin	Lamellaire croisé (C)	16,6	6,3	Bioch.	Marxen <i>et al.</i> , 2003

2.7.3 - Les protéines neutres ou basiques (pH supérieur à 7 ; Tableau 6)

Contrairement aux protéines fortement acides, la présence de protéines basiques dans les matrices associées aux coquilles de mollusques a été une découverte plutôt surprenante. Parallèlement, des protéines basiques ont récemment été observées dans les matrices des spicules des larves d'échinodermes (Killian & Wilt, 1996). Il est intéressant de noter que les protéines les plus basiques de ce groupe appartiennent exclusivement à des matrices associées à la calcite, alors que la majorité des protéines neutres sont associées à l'aragonite.

Lustrin-A est la plus grande protéine de coquille de mollusque décrite à ce jour (Shen *et al.*, 1997). Cette protéine de 160 kDa, extraite de la matrice de la couche nacrée de l'ormeau *Haliotis rufescens*, possède une structure modulaire, ce qui suggère qu'elle peut jouer plusieurs fonctions. Elle comporte neuf domaines riches en Cys hautement conservés, espacés par huit domaines riches en Pro, un domaine riche en Gly et Ser, situé entre les deux domaines riches en Cys les plus proches de l'extrémité C-terminale, ainsi qu'un domaine basique et une région C-terminale présentant des similitudes avec des inhibiteurs de protéase. L'enchaînement observé de domaines riches en Cys et de domaines riches en Pro est une configuration que l'on retrouve dans la famille des frustulines, des protéines des parois siliceuses des diatomées. Le domaine C-terminal de type inhibiteur de protéase pourrait protéger les protéines de la matrice sécrétée contre une dégradation. La présence d'un domaine basique, riche en Arg et Lys, suggère que cette région puisse interagir avec des composés anioniques, lors de la minéralisation. Le domaine GS confère une certaine flexibilité à cette protéine, tandis que le domaine basique de l'extrémité C-terminale (RKSY) pourrait, quant à lui, permettre une interaction avec d'autres macromolécules. Le court domaine acide pourrait quant à lui permettre les liaisons avec le minéral (Wustman *et al.*, 2003). Lustrin-A présente clairement les caractéristiques d'une protéine multifonctionnelle.

Deux protéines basiques ont été caractérisées chez les huîtres perlières *Pinctada maxima* et *Pinctada fucata*. La première, **N66** (Kono *et al.*, 2000), appartient à la famille des protéines de type Nacrein, mais comporte des répétitions GXN plus longues que Nacrein de *P. fucata*. À l'instar des autres protéines de type Nacrein, elle comporte un domaine anhydrase carbonique. Les répétitions GXN semblent être impliquées dans l'aptitude de cette protéine à lier le calcium. Le transcrit de N66 a été observé comme étant exprimé aussi bien dans la partie médiane que dans la partie distale de l'épithélium externe du manteau calcifiant.

Pfty2, la seconde *tyrosinase-like protein*, présente une forte homologie (53% sur 493 résidus) avec Pfty1. Elle possède elle aussi un domaine de liaison des ions cuivre, ce qui suggère que le site enzymatique tyrosinase puisse être actif. La fonction présumée de cette protéine est d'intervenir dans les processus de mélanisation, responsable de la pigmentation de la coquille ou dans les processus de polymérisation des constituants de la matrice insoluble (Zhang *et al.*, 2006).

Quatre protéines ont été extraites et séquencées à partir de la couche nacrée du gastéropode marin *Haliotis laevigata* : Perlustrin (Weiss *et al.*, 2000, 2001), Perlucin (Weiss *et al.*, 2000 ;

Mann *et al.*, 2000), Perlwapin (Treccani *et al.*, 2006) et Perlinhibin (Mann *et al.*, 2007). **Perlustrin** est une petite protéine qui présente des homologies de séquence (40%) avec la famille des IGF-BPs (*Insulin Growth Factor-Binding Proteins*). Cette famille regroupe les protéines qui se lient aux facteurs de croissance de type insuline. **Perlustrin** a montré, par des expériences *in vitro*, sa capacité effective à se lier à l'insuline. C'est une protéine N-glycosylée (via un résidu Asp) dont la séquence présente des similitudes avec des lectines calcium-dépendantes de type C. **Perlucin** présente aussi une forte homologie avec l'extrémité C-terminale de Lustrin-A. Cette protéine inhibe la précipitation du carbonate de calcium, en interagissant préférentiellement avec certains plans de clivage des cristaux en formation. Des tests fonctionnels ont démontré que le domaine de reconnaissance des carbohydrates (CRD) de Perlucin avait une large spécificité et liait particulièrement le mannose ainsi que le galactose. Parallèlement, des tests de précipitation du carbonate de calcium en présence de cette protéine ont montré qu'elle était capable d'accélérer la nucléation des cristaux (Blank *et al.*, 2003). La troisième protéine de la couche nacrée de l'ormeau est **Perlwapin**. La séquence de cette protéine comporte trois répétitions d'une quarantaine de résidus, similaires aux domaines de protéines très acides de la famille WAP et contenant huit résidus Cys caractéristiques, impliqués dans la formation de ponts disulfures. La dernière protéine décrite à partir de la couche nacrée de cet animal est **Perlinhibin**. Elle fut nommée ainsi car elle présente la capacité à inhiber la formation de la calcite et à induire celle de l'aragonite (Mann *et al.*, 2007). Notons qu'une autre protéine, **Perlbikunin**, a été également extraite, mais que sa séquence primaire n'a à ce jour pas été décrite.

Récemment un groupe de protéines a été identifié par construction d'une banque d'ADNc à partir de cellules du manteau de *Pinctada fucata*. À une exception près, toutes ces nouvelles protéines possèdent un pI aux alentours de 9, constituant ainsi le groupe de protéines associées aux coquilles de mollusques les plus basiques. Deux familles de protéines se différencient au sein de ce groupe : les protéines riches en Lys (KRMPs) et les protéines de type Shematin. Les protéines de type **KRMP** forment une famille de trois petites protéines de 10 kDa (Zhang *et al.*, 2006) ne différant entre elles que de quelques acides aminés. Ces protéines sont constituées de domaines riches en Lys, Gly et Tyr présentant des homologies avec des protéines de tannage quinonique, ce qui suggère que leurs résidus Tyr peuvent être oxydés en DOPA dans leur forme mature. Les régions riches en Lys sont suspectées d'être impliquées dans l'interaction de ces protéines avec des composés chargés négativement comme les ions bicarbonates ou les macromolécules acides de la matrice. La structure de ces

protéines conduit à penser que leur fonction consiste à lier les protéines solubles acides à la matrice de structure hydrophobe. La seconde famille de protéines basiques est celle des protéines de type **Shemattrin**, comprenant sept membres de masses moléculaires comprises entre 25 et 33 kDa et dont les *pI* varient entre 9 et 10. Elles présentent toutes des domaines riches en Gly, leur extrémité C-terminale étant invariablement RKKKY, RRKKY ou RRRKY. Il est intéressant de noter que le domaine riche en Gly de Shemattrin-2 présente une forte homologie avec MSI31 (98% sur 227 résidus), mais les extrémités C-terminales de ces deux protéines diffèrent complètement. Shemattrin-5 est la seule protéine de cette famille à présenter un domaine acide similaire à celui d'Aspein. Des analyses biochimiques de la fraction soluble à l'urée de la matrice des prismes calcitiques ont montré que ces protéines étaient présentes dans cette fraction, ce qui suggère qu'elles pourraient être des protéines de structure de la matrice insoluble.

N19 est, à ce jour, la dernière protéine à avoir été extraite de la couche nacrée de *Pinctada fucata* et à avoir été complètement séquencée (Yano *et al.*, 2006). Cette protéine comporte 3 domaines répétés longs d'une cinquantaine d'acides aminés, ainsi qu'une région N-terminale hydrophobe. Elle présente une capacité à inhiber la précipitation du carbonate de calcium et semble jouer un rôle dans la régulation de la calcification de la couche nacrée.

Tableau 6 : les protéines neutres ou basiques associées aux coquilles de mollusques (modifié d'après Marin *et al.*, 2008). (C) indique que ces protéines sont associées à la calcite et (A) qu'elles sont associées à l'aragonite. « Bioch. » et « Biomol. » indiquent que ces protéines ont été caractérisées par biochimie (SDS-PAGE) ou par biologie moléculaire (transcrit, ADNc), respectivement

Classe	Espèce	Protéine	Microstructure (polymorphe)	MM (kDa)	pI	Observation	Référence
Bivalve	<i>Pinctada fucata</i>	Shematin-1	Prismes (C)	30,3	9	Biomol.	Yano <i>et al.</i> , 2006
		Shematin-2	Prismes (C)	33,4	9,4	Biomol.	Yano <i>et al.</i> , 2006
		Shematin-3	Prismes (C)	29,7	9,4	Biomol.	Yano <i>et al.</i> , 2006
		Shematin-4	Prismes (C)	28,2	9,2	Biomol.	Yano <i>et al.</i> , 2006
		Shematin-5	Prismes (C)	28	7,7	Biomol.	Yano <i>et al.</i> , 2006
		Shematin-6	Prismes (C)	24,8	9,7	Biomol.	Yano <i>et al.</i> , 2006
		Shematin-7	Prismes (C)	26,8	10,3	Biomol.	Yano <i>et al.</i> , 2006
		KRMP 1	Prismes (C)	9,5	9,6	Biomol.	Zhang <i>et al.</i> , 2006
		KRMP 2	Prismes (C)	9,8	9,4	Biomol.	Zhang <i>et al.</i> , 2006
		KRMP 3	Prismes (C)	9,8	9,4	Biomol.	Zhang <i>et al.</i> , 2006
		Tyrosinase-like 2	Prismes (C)	54,4	9	Biomol.	Nagai <i>et al.</i> , 2007
		N19	Nacre (A)	22,9	8	Biomol.	Yano <i>et al.</i> , 2007
		N66	Nacre + prismes (A+C)	59,8	8,7	Biomol.	Kono <i>et al.</i> , 2000
Gastéro-pode	<i>Pinctada maxima</i>						
	<i>Haliothis rufescens</i>	Lustrin A	Nacre (A)	140	8,1	Biomol.	Shen <i>et al.</i> , 1997
	<i>Haliothis laevigata</i>	Perlustrin	Nacre (A)	9,3	8	Bioch.	Weiss <i>et al.</i> , 2001
		Perlucin	Nacre (A)	18,2	7,2	Bioch.	Mann <i>et al.</i> , 2000
		Perlwapin	Nacre (A)	14,5	8,7	Bioch.	Treccani <i>et al.</i> , 2006
		Perlinhibin	Nacre (A)	4,8	8,3	Bioch.	Mann <i>et al.</i> , 2007

2.7.4 - Protéines partiellement caractérisées (Tableau 7)

En plus des protéines dont la séquence d'acides aminés a été complètement décrite, il existe de nombreuses protéines qui ne sont que partiellement caractérisées pour l'instant. On peut distinguer parmi cette liste de protéines, celles qui ont été assez complètement caractérisées par des techniques biochimiques (SDS-PAGE, purification, test d'activités...) comme RP-1, P12, P16, Caspartin, Calprismin et ACLS40, et celles dont on ne connaît que leur séquence partielle, comme les protéines décrites chez *Nautilus pompilius*, *Atrina vexillum* et *Mytilus edulis*, et la protéine de 61 kDa de *Biomphalaria glabrata*. Il faut aussi noter que certaines séquences partielles correspondent à des protéines putatives obtenues par biologie moléculaire chez différents bivalves pour les Nacrein-like et chez des gastéropodes terrestres pour les protéines du type Dermatopontin. Enfin, il existe certaines protéines qui ont pu être caractérisées par biochimie, mais dont aucune séquence primaire n'est encore connue.

Les protéines de type **RP-1** sont des phosphoprotéines solubles de la couche de calcite foliée des huîtres *Crassostrea virginica* et *Adamussium colbecki* (Donachy *et al.*, 1992 ; Halloran & Donachy, 1995). Ces protéines riches en résidu Asp inhibent la précipitation de la calcite *in vitro*. Elles présentent des homologies de séquences avec les phosphoporines et des homologies de domaine avec certaines protéines acides des matrices calcifiantes de mollusques (MSP-1, MSP-2, Aspein et Asp-rich). Notons ici que deux protéines riches en Asp furent purifiées de la couche prismatique de la moule *Mytilus californianus* (Weiner, 1983) et que deux protéines similaires furent également extraites de la couche prismatique du bivalve *Pinna nobilis* (Marin *et al.*, 2005, 2007). La première, **Caspartin**, est une protéine non glycolylée, migrant à 17 kDa en SDS-PAGE. Un anticorps dirigé contre cette protéine purifiée a permis de la localiser au sein de la coquille, à l'intérieur et autour des prismes de calcite. La seconde, **Calprismin**, est une glycoprotéine acide de 38 kDa riche en Ala, Asx, Thr et Pro. **P20** est une protéine extraite de la couche nacrée de *Pinctada margaritifera* (Bédouet *et al.*, 2001) qui peut former des oligomères composés de six monomères liés par des ponts disulfures. Récemment, de nombreux peptides de 1 kDa riches en Gly ont été extraits du même animal. Dernièrement, une protéine de 40 kDa (**ACLS40**) a été extraite de la coquille du gastéropode *Strombus decorus* (Pokroy *et al.*, 2006). Cette protéine, riche en Glu, Asp et Ala, présente la propriété originale de stabiliser la formation *in vitro* de vaterite.

L'obtention de séquences partielles, par RT-PCR, de protéines Nacrein-like chez divers bivalves suggère que les différentes protéines de type Nacrein forment une véritable famille largement présente au sein des bivalves ptériomorphes, et dont les membres possèdent des domaines très conservés (Norizuki, données non publiées). La même technique a dernièrement permis à Sarashina et ses collaborateurs (2006) de décrire plusieurs séquences partielles de protéines du type Dermatopontin chez divers gastéropodes, permettant ainsi de retracer l'histoire évolutive de cette famille. D'autre part, Jackson et ses collaborateurs (2006) ont obtenu, par EST de cellules du manteau de l'ormeau *Haliotis asinina*, plusieurs séquences codant pour des protéines appartenant probablement à la matrice calcifiante, mais l'existence de ces protéines au sein des matrices de coquille reste encore incertaine.

À ce jour, une seule protéine de périostracum a été partiellement caractérisée, **Periostracin** (Waite *et al.*, 1979). Cette protéine basique et hydrophobe de 20 kDa est très riche en Gly (55%), ainsi qu'en Tyr et DOPA. Il est très probable que cette protéine polymérise et devienne insoluble dès qu'elle est sécrétée par les cellules du sillon périostracal.

Cariolou et Morse (1988) ont décrit deux protéines de 43 et 54 kDa à partir de la couche nacrée de coquilles de juvéniles et d'adultes d'*Haliotis rufescens*. Ces protéines sont toutes

deux riches en Asx et Glx, la première étant plus acide et la seconde plus hydrophobe. Fu et ses collaborateurs (2005) ont caractérisé chez la même espèce une petite protéine acide, appelée **AP8**, riche en Asx et Gly, et capable de modifier la forme des cristaux de calcite précipités *in vitro*. D'autres protéines acides ont été isolées de la couche nacrée du bivalve *Atrina rigida* (Falini *et al.* , 1996 ; Gotliv *et al.*, 2003). Ces protéines sont capables, lorsqu'elles sont en contact avec de la chitine et des protéines de soie, de stabiliser *in vitro* la formation de carbonate de calcium amorphe (ACC, *amorphous calcium carbonate*) et d'aragonite. Une petite protéine hydrophobe riche en Gly, Leu et Ala, appelée P10, extraite de la couche nacrée de *Pinctada fucata*, présente une capacité à induire la précipitation du carbonate de calcium et favorise la formation d'aragonite *in vitro* (Zhang *et al.*, 2006). Cette protéine, également testée sur des cultures de cellules humaines (MRC-5 et MC3T3), a induit une activité ostéoinductrice chez ces cellules. Dernièrement, une autre protéine de 40 kDa a été décrite chez la même espèce, N40 (Yan *et al.*, 2007). Cette protéine de la matrice insoluble, riche en Gly et Ala, est impliquée dans la nucléation de l'aragonite.

Tableau 7 : les protéines partiellement caractérisées, associées aux coquilles de mollusques (modifié d'après Marin *et al.*, 2008). (C) indique que ces protéines sont associées à la calcite et (A) qu'elles sont associées à l'aragonite de la nacre ou de structures lamellaires-croisées (Lam. Crois.). « Biochim. » et « Biomol. » indiquent que ces protéines ont été caractérisées par biochimie (SDS-PAGE) ou par biologie moléculaire (transcrit, ADNc), respectivement

Classe	Espèce	Protéine	Microstructure (polymorphe)	Observation	Référence
Bivalve	<i>P. maxima</i>	P20	Nacre (A)	Biochim.	Bédouet <i>et al.</i> , 2001
	<i>P. margaritifera</i>	WSM peptides	Nacre (A)	Biochim.	Bédouet <i>et al.</i> , 2006
	<i>P. fucata</i>	N40	Nacre (A)	Biochim.	Yan <i>et al.</i> , 2007
		Nacrein-like	Nacre (A)	Biomol.	Norizuki (non publié)
	<i>P. maxima</i>	Nacrein-like	Nacre (A)	Biomol.	Norizuki (non publié)
	<i>P. yessoensis</i>	Nacrein-like	Nacre (A)	Biomol.	Norizuki (non publié)
		Nacrein-like	Nacre (A)	Biomol.	Norizuki (non publié)
	<i>C. nippona</i>	Nacrein-like	Nacre (A)	Biomol.	Norizuki (non publié)
		Nacrein-like	Nacre (A)	Biomol.	Norizuki (non publié)
	<i>C. virginica</i>	RP-1	Calcite foliée (C)	Biochim.	Donachy <i>et al.</i> , 1992
	<i>A. colbecki</i>	RP-1	Calcite foliée (C)	Biochim.	Halloran <i>et al.</i> , 1995
	<i>P. nobilis</i>	Calprismine	Prismes (C)	Biochim.	Marin <i>et al.</i> , 2007
		Caspartin	Prismes (C)	Biochim.	Marin <i>et al.</i> , 2005
	<i>M. californianus</i>	P12, P16	Prismes (C)	Biochim..	Weiner, 1983
	<i>M. edulis</i>	45-, 21-, 5-kDa	Nacr. + Prism. (A+C)	Biochim.	Keith <i>et al.</i> , 1993
	<i>A. vexillum</i>	55-, 20-, 15-kDa	Nacre (A)	Biochim.	Zhao <i>et al.</i> , 2003
	<i>A. rigida</i>	30-kDa	Nacre (A)	Biochim.	Gotliv <i>et al.</i> , 2003
	<i>P. fucata</i>	P10	Nacre (A)	Biochim.	Zhang <i>et al.</i> , 2006
	<i>M. edulis</i>	Periostracin	Periostracum	Biochem.	Waite <i>et al.</i> , 1979
Gastéropode	<i>S. japonica</i>	Dermatopontin	Lam. Crois. (A)	Biomol.	Sarashina <i>et al.</i> , 2006
	<i>M. aureola</i>	Dermatopontin	Lam. Crois. (A)	Biomol.	Sarashina <i>et al.</i> , 2006
	<i>M. aureola</i>	Dermatopontin	Lam. Crois. (A)	Biomol.	Sarashina <i>et al.</i> , 2006
	<i>E. peliomphala</i>	Dermatopontin	Lam. Crois. (A)	Biomol.	Sarashina <i>et al.</i> , 2006
	<i>E. amaliae</i>	Dermatopontin	Lam. Crois. (A)	Biomol.	Sarashina <i>et al.</i> , 2006
	<i>E. herklotsi</i>	Dermatopontin	Lam. Crois. (A)	Biomol.	Sarashina <i>et al.</i> , 2006
	<i>E. brandtii</i>	Dermatopontin	Lam. Crois. (A)	Biomol.	Sarashina <i>et al.</i> , 2006
	<i>E. brandtii</i>	Dermatopontin	Lam. Crois. (A)	Biomol.	Sarashina <i>et al.</i> , 2006
	<i>B. glabrata</i>	Dermatopontin	Lam. Crois. (A)	Biomol.	Sarashina <i>et al.</i> , 2006
	<i>B. glabrata</i>	Dermatopontin	Lam. Crois. (A)	Biomol.	Sarashina <i>et al.</i> , 2006
	<i>L. stagnalis</i>	Dermatopontin	Lam. Crois. (A)	Biomol.	Sarashina <i>et al.</i> , 2006
	<i>L. stagnalis</i>	Dermatopontin	Lam. Crois. (A)	Biomol.	Sarashina <i>et al.</i> , 2006
	<i>L. stagnalis</i>	Dermatopontin	Lam. Crois. (A)	Biomol.	Sarashina <i>et al.</i> , 2006
	<i>S. decorus</i>	ACLS40	Lam. Crois. (A)	Biochim.	Pokroy <i>et al.</i> , 2006
	<i>H. rufescens</i>	AP8	Nacre (A)	Biochim.	Fu <i>et al.</i> , 2005
	<i>B. glabrata</i>	61-kDa	Lam. Crois. (A)	Biochim.	Marxen <i>et al.</i> , 1997
Céphalopode	<i>N. pompilius</i>	60-, 32-, 12-kDa	Nacre (A)	Biochim.	Zhao <i>et al.</i> , 2003

2.7.5 - Quelques remarques

Il est important de noter qu'un grand nombre de ces protéines ont été caractérisées au niveau de leur transcrit, mais que peu d'entre elles ont été directement observées dans la matrice organique. Nacrein, N14/N16, Prismaticin-14, Dermatopontin, Mucoperlin, AP24 et AP7 sont les seuls exemples pour lesquels le lien entre le transcrit et la protéine ait été clairement établi.

Par ailleurs, si nous disposons des séquences de plus de 40 protéines différentes, nous n'avons qu'une vague idée de leurs fonctions. En effet, les fonctions des protéines décrites à partir de leurs transcrits n'ont pu être proposées que par homologie de leur séquence avec des domaines connus et sans avoir pu pour autant le vérifier expérimentalement. De plus, les protéines appartenant à la matrice insoluble sont particulièrement difficiles à étudier par les techniques classiques de biochimie, mais pourraient être caractérisées à partir de la protéine recombinante surexprimée et purifiée. Cependant, bon nombre de ces protéines possèdent des sites potentiels de modifications post-traductionnelles (*e.g.* glycosylation, phosphorylation), qui, potentiellement, peuvent radicalement changer les propriétés de ces protéines (Hecker *et al.*, 2003). À ce jour, Dermatopontin de *Biomphalaria glabrata* est la seule protéine pour laquelle la fraction glycosidique ait été complètement caractérisée (Marxen *et al.*, 2003). La localisation de ces protéines au sein du biominéral (Marin *et al.*, 2000) est un autre aspect fondamental qui permettrait d'intégrer ces protéines dans les modèles de croissance des biominéraux (voir le modèle nacre).

Nous n'avons pas ici pris en compte les protéines du fluide extrapalléal déjà décrites, ainsi que les autres protéines sécrétées par le manteau (revues *in* Marin & Luquet, 2004 ; Zhang & Zhang, 2006 ; Marin *et al.*, 2008). Ces protéines sont potentiellement impliquées (directement ou indirectement) dans les processus de formation de la coquille, mais dans la plupart des cas leur rôle reste peu connu. Il est intéressant de noter que, jusqu'à présent, toutes les protéines du fluide extrapalléal décrites sont différentes de celles observées dans la coquille! Ce résultat soulève quelques questions quant à l'existence et au rôle effectif de ce compartiment dans la minéralisation (Addadi *et al.*, 2005).

D'autres questions restent encore totalement ouvertes. Par exemple, le nombre de protéines associées aux coquilles et nécessaires à leur formation reste pour l'instant indéterminé. En effet, des observations de matrice organique de mollusque sur SDS-PAGE révèlent que ces matrices sont composées de quelques bandes majoritaires et de quelques bandes minoritaires, parfois confondues dans un nuage de composés non-discrets (Marin *et al.*, 2001). Par ailleurs, la capacité à visualiser ces macromolécules dépend directement de la technique de coloration utilisée (voir le chapitre : Matériels et Méthodes) et de la fixation des composés dans le gel (Gotliv *et al.*, 2003). Killian et Wilt (1996) ont remarqué, en observant la matrice soluble extraite des spicules des larves d'échinodermes, que les bandes observées en SDS-PAGE se décomposaient en différentes protéines lorsque la matrice était observée sur un gel à deux dimensions, révélant ainsi qu'elle était constituée par une cinquantaine de protéines

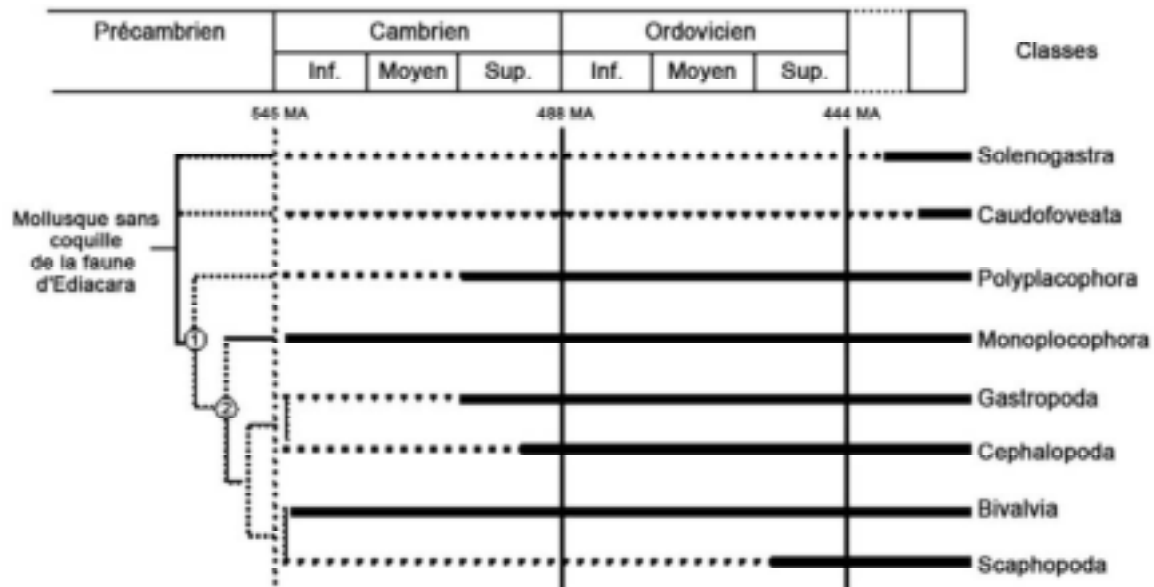
différentes. À ce jour, une telle observation n'a pas encore pu être effectuée sur les matrices des coquilles de mollusque.

La question de la diversité des protéines de coquilles au sein des différents mollusques est elle aussi ouverte et pour l'instant sans réponse. En effet, depuis 1996 et la première caractérisation de Nacrein, le nombre de types différents de protéines associées aux coquilles de mollusque ne cesse de croître. Cependant, il est à noter que plus des 2/3 de ces protéines proviennent de deux modèles biologiques, l'huître perlière *Pinctada* sp. et l'ormeau *Haliotis* sp.. On peut se demander si le nombre de familles de protéines de matrice ne pourrait pas encore croître avec l'étude d'autres modèles. En effet, Jackson et ses collaborateurs (2006) ont récemment caractérisé, par une approche globale analysant des EST, un très grand nombre de gènes exprimés par le manteau d'*Haliotis asinina* (dont certains produits de traduction semblaient être sécrétés). Ces auteurs ont remarqué que peu de ces protéines présentaient des homologies avec celles déjà observées chez les autres espèces d'*Haliotis*.

2.8 - Aspects évolutifs

L'origine des mécanismes de la calcification de la coquille des mollusques ainsi que celle des protéines associées est une question fascinante. La classe des mollusques forme un groupe monophylétique qui tire son origine du début de l'émergence des métazoaires (Précambrien). Les observations fossiles relatent la présence d'organismes potentiellement identifiés comme des mollusques primitifs sans coquille dès 555 M.A. (e.g. *Kimberella quadrata* ; Fedonkin & Waggoner, 1997). Cependant, des évaluations de l'ancienneté des mollusques, basées sur des observations de la divergence moléculaire entre les différents métazoaires, dateraient l'émergence de ce groupe plus profondément encore dans le Cambrien. Quoi qu'il en soit, il est intéressant de noter que l'apparition de la coquille chez les mollusques remonte au début de la radiation des eumollusques à plus de 545 M.A.. Cette période correspond à la 'fameuse' explosion cambrienne de la diversité des métazoaires et elle a vu l'émergence et la diversification précoce des grandes familles de mollusques à coquilles, les conchifères (Figure 15). Ce point paraît essentiel quant à l'élaboration d'un scénario évolutif des mécanismes de mise en place de la calcification dans ce phylum.

Figure 15 : Origine de la minéralisation et phylogénie du phylum des mollusques (modifié d'après Marin *et al.*, 2008). Dans la phylogénie proposée par Brusca & Brusca (1990), les solénogastres et les caudofovéates occupent une position basale au sein du groupe. Le nœud 1 correspond à l'apparition du sous-phylum des eumollusques et le nœud 2 à celle de la super-classe des conchifères, les mollusques à coquille vraie. À l'exception des scaphopodes, dont les premiers enregistrements fossiles remontent à 450 M.A., tous les eumollusques ont émergé au Cambrien, les monoplacophores et les bivalves émergeant en premier lors de l'explosion cambrienne de la diversité des métazoaires.



D'un point de vue embryologique, physiologique et structural, les coquilles des conchifères (monoplacophores + gastéropodes + céphalopodes + bivalves + scaphopodes) sont des structures homologues. La mise en place de la coquille se produit dès les premières étapes du développement larvaire, elle est sécrétée dans tous les cas par le même tissu, le manteau calcifiant, et les organisations structurales et microstructurales des coquilles des adultes sont très semblables. Aujourd'hui, l'hypothèse de l'origine unique des coquilles de ces différents mollusques est largement acceptée et aucune donnée ne semble la contredire. Le paragraphe suivant s'efforcera de présenter les différents arguments permettant d'affirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

L'hypothèse de l'origine unique des coquilles des mollusques provient de l'observation des fossiles. La description des échantillons les plus anciens a montré que, dès leur origine, les coquilles de mollusque présentaient des structures complexes et variées. Il est important de remarquer que les microstructures prismatiques et probablement aussi nacrées étaient présentes dès le Cambrien (Feng & Sun, 2003). Ces observations suggèrent que les mollusques ont rapidement exploré les possibilités génétiques permettant la construction optimale des coquilles et que les structures nacrées et prismatiques (entre autres) sont des

structures efficaces particulièrement contraintes par l'évolution. En particulier, la nacre constitue un exemple frappant de structure stable et pérenne (voir paragraphe suivant). Si l'on considère que les différents types de nacres observés chez les bivalves, les céphalopodes, les monoplacophores et les gastéropodes sont des structures homologues, on pourrait s'attendre à ce que les outils moléculaires nécessaires à leurs formations (*e.g.* les protéines des matrices calcifiantes) soient eux aussi homologues, mais ce point reste encore à démontrer. Marin et ses collaborateurs (1999) ont observé, dans une étude sérologique des matrices des coquilles de différents mollusques, que ces matrices présentaient une réactivité croisée interclasse qui ne semblait être liée ni aux microstructures, ni à la phylogénie. Ce résultat suggère cependant la présence d'épitopes communs entre les matrices coquillières de certains groupes étudiés.

L'analyse des séquences de protéines de coquille n'a pas permis pour l'instant de distinguer clairement « une boîte à outils » moléculaire commune aux différentes familles de mollusques ou aux différentes microstructures. En effet, on peut s'étonner que Dermatopontin, protéine majoritaire de la matrice de *Biomphalaria glabrata*, essentielle à la formation de sa coquille, n'ait pu être détectée dans la matrice des *Haliotis* sp., et ce malgré le nombre d'études portées sur ce dernier modèle (Jackson *et al.*, 2007). Une étude phylogénétique de cette protéine a suggéré qu'elle avait été recrutée deux fois et de façon indépendante comme protéine de matrice coquillière chez les gastéropodes d'eau douce, au Carbonifère et au Tertiaire (Sarashina *et al.*, 2006). Il est toutefois possible que ce gène n'ait été recruté qu'une seule fois, mais qu'il ait pu être « délaissé » ultérieurement par certains organismes. Parallèlement, une protéine de nacre, homologue à Nacrein de *Pinctada* sp., a récemment été décrite et séquencée chez le gastéropode *Turbo marmoratus* (Miyashita *et al.*, 2003). Ce résultat isolé reste cependant à confirmer. Quoi qu'il en soit, il semble que le cocktail de protéines sécrétées pour former la coquille subisse une pression de sélection moindre que celle à laquelle on aurait pu s'attendre (compte tenu des données relatives à la conservation des microstructures). Marin et ses collaborateurs (2008) ont proposé qu'au moins une partie des gènes codant pour les macromolécules des matrices coquillières pourrait être sujette à une évolution « rapide », comme semble le montrer l'étude du transcriptome de cellules du manteau calcifiant d'*Haliotis asinina* (Jackson *et al.*, 2006 ; 2007).

3 – La biominéralisation de la nacre

3.1 - Répartition de la nacre dans le phylum des Mollusca

La nacre est une microstructure, exclusive des coquilles des mollusques, qui est souvent considérée comme primitive (Kouchinsky, 2000 ; Checa *et al.*, 2006) ; les enregistrements fossiles font état de sa présence dès le début de l'apparition de la coquille des mollusques au Cambrien. La nacre est présente chez des représentants actuels des bivalves, des gastéropodes, des céphalopodes et des monoplacophores. Chez les bivalves actuels, on retrouve la nacre dans les coquilles de certaines espèces appartenant à quatre sous-classes: les paléotaxodontes, les ptériomorphes, les paléohétérodontes et les anomalodesmata (Taylor *et al.*, 1969 ; Taylor, 1973). Alors que la nacre était présente dans la coquille d'un grand nombre de taxons fossiles de céphalopodes aujourd'hui éteints, désormais on la retrouve exclusivement chez les nautilidés. Chez les gastéropodes, la nacre est présente dans certains taxons des paléogastéropodes, tels les trochidés ou les haliotidés (Ponder & Lindberg, 1997). La nacre est également observée dans les coquilles des monoplacophores. Chez ces derniers, la couche nacrée occupe une position médiane dans la coquille, contrairement à celle de toutes les autres classes de mollusques chez lesquelles cette couche est située en position interne. Notons la présence d'une structure calcitique analogue à de la nacre dans le squelette d'un phylum de bryozoaires (Weedon & Taylor, 1995).

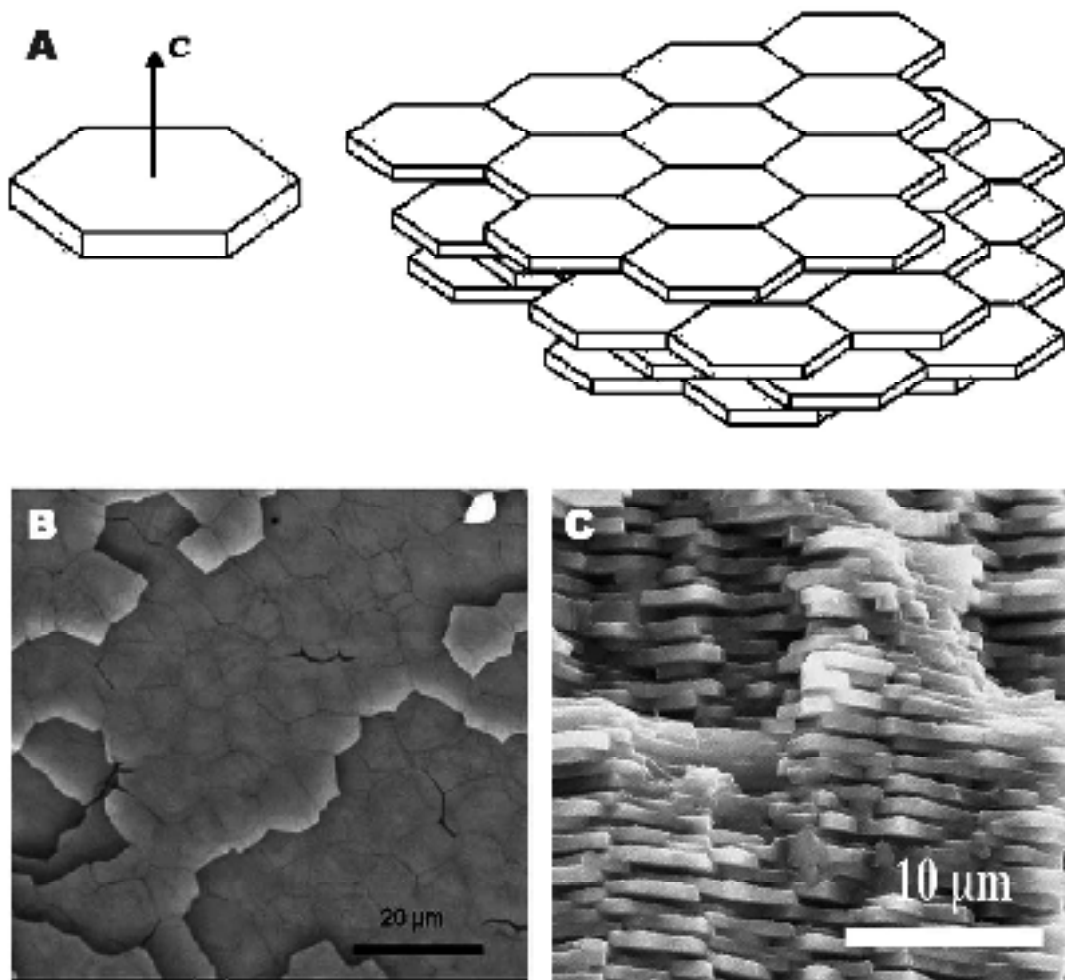
3.2 - Généralités/description

La nacre constitue un modèle de choix pour l'étude de la biominéralisation. Les raisons d'un tel intérêt sont multiples : ses remarquables propriétés mécaniques et plastiques, son succès évolutif au sein des mollusques, son apparente simplicité structurale ainsi que certaines considérations d'ordre économique. En effet, ce biomatériau est l'objet d'une grande quantité de travaux de recherche dans des disciplines très diverses : physique structurale (Lin et Meyers, 2005), climatologie (Ricken *et al.*, 2003), ingénierie (Sellinger, 1998), chimie (Addadi *et al.*, 2008), écologie (Ravera *et al.*, 2003), biologie évolutive (Kobayashi, 1991) ou médecine thérapeutique (Atlan *et al.*, 1997).

À macro-échelle, on reconnaît souvent la nacre par son aspect iridescent caractéristique, mais le terme de « nacre » désigne exclusivement un type de microstructure bien défini. Les couches minérales nacrées se distinguent à micro-échelle par la présence d'une superposition régulière de couches de tablettes d'aragonite coalescentes, mesurant 0,5 μm d'épaisseur chacune (Figure 16), recouvertes d'une fine couche organique de 20 nm d'épaisseur, le tout formant une structure compacte d'une apparente simplicité. Les tablettes peuvent être de

formes hexagonales, rectangulaires ou arrondies et semblent se comporter comme des monocristaux.

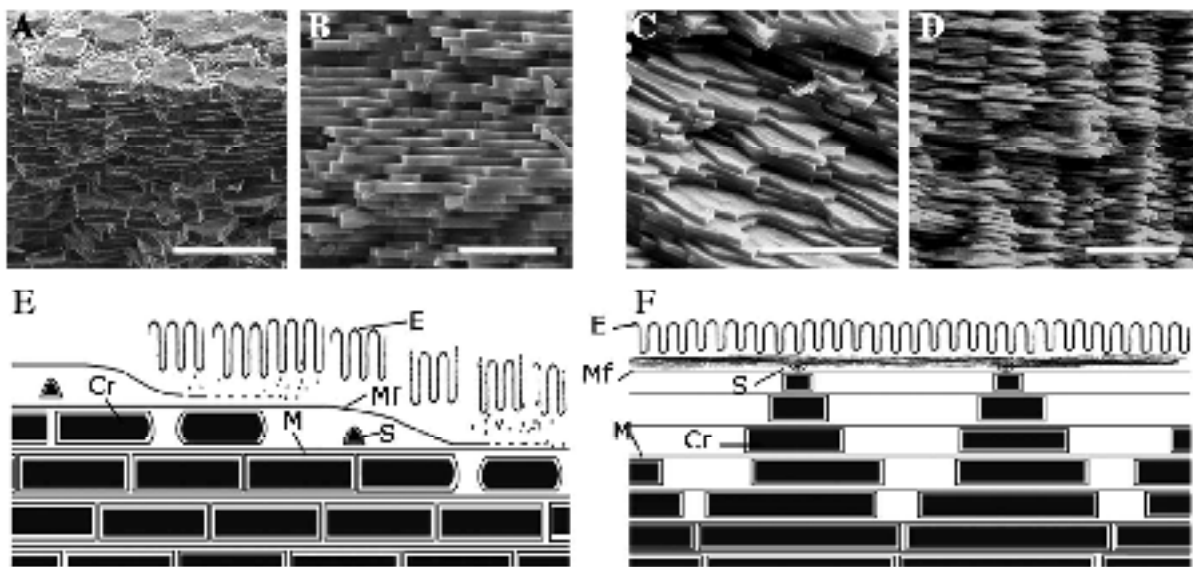
Figure 16 : La nacre d'*Haliotis* sp. (modifié d'après Lin & Meyers, 2005 (A,B) ; et observations personnelles (C)). A) Représentation schématique de l'empilement des tablettes de nacre (épaisseur 0,5 μm ; largeur 20 μm). Les tablettes de nacre croissent dans un premier temps majoritairement selon l'axe c, puis uniquement selon les axes a et b ; B-C) Observations au MEB de l'arrangement des tablettes de nacre mature sur cassure fraîche de coquille, en vues intérieure et transversale, respectivement.



3.3 - Les deux types de nacres

On distingue classiquement deux types de nacre résultant de modes différents d'agencement des tablettes entre elles : la nacre en *mur de brique* (« sheet nacre »), présente chez les bivalves et les monoplacophores, et la nacre *columnnaire* (« columnar nacre ») présente chez les gastéropodes et les céphalopodes (Figure 17).

Figure 17 : Structures des deux types de nacre (modifié d'après Nakahara, 1991 (E-F) ; Marin *et al.*, 2008 (A-D)). A-B) Observations au MEB de la couche nacrée sur cassure fraîche de la coquille d'un bivalve, en vues oblique et transversale, respectivement ; C-D) Observations au MEB de la couche nacrée sur cassure fraîche de la coquille d'un gastéropode, en vues oblique et transversale, respectivement. Les barres d'échelle représentent 10 μm ; E) Représentation schématique du modèle de la nacre en mur de brique des bivalves ; F) Représentation schématique du modèle de la nacre colonnaire des gastéropodes. Notons que ces modèles, adaptés à partir d'observations au MET sur coupes de coquille décalcifiées, d'après les travaux de Nakahara (1991), ne prennent pas en compte la présence de pores dans la matrice interlamellaire, la zonation de la nacre au sein des tablettes, ou l'existence d'une fine couche de carbonate de calcium amorphe autour des tablettes. Les abréviations sont: E, épithélium calcifiant ; M, couche de matrice organique ; Mf, couche de matrice organique en formation ; Cr, cristaux d'aragonite ; S, sommet du dernier cristal en formation.



La nacre des bivalves présente des tablettes qui sont co-orientées selon les axes a, b et c ; l'axe c étant perpendiculaire à la surface des tablettes et l'axe b étant parallèle à l'axe de croissance de la coquille (Checa *et al.*, 2006). Dans la nacre du second type, celle des gastéropodes et des céphalopodes, les tablettes semblent alignées et croissent les unes sur les autres formant ainsi des piles de cristaux (Lin & Meyers, 2005). Les tablettes de la même pile sont toutes co-orientées selon l'axe c, mais les tablettes des piles adjacentes ne partagent pas la même orientation selon les axes a et b. Il semble que ces deux types différents d'agencement des tablettes de nacre résultent de mécanismes de nucléation et de croissance des tablettes bien distincts, décrits sur les Figures 18 et 19. Ces modèles synthétiques, élaborés à partir de l'observation de la nacre en formation et de la nacre mature, reposent sur des principes de nucléation différents pour les deux types de nacres, mais permettent assez bien d'expliquer leurs différences d'organisation structurale. Notons cependant, que malgré

ces différences, les tablettes de nacre présentent, dans tous les cas, une remarquable régularité en épaisseur (0,5 μm), en largeur (10 μm) et qu'elles sont toujours enrobées d'une matrice organique mesurant 20 nm d'épaisseur.

Figure 18 : Formation de la nacre en mur de brique des bivalves (modifié d'après Rousseau *et al.*, 2005). A) Observation au MEB de la zone de croissance de la nacre en mur de brique, en vue interne. Les nouvelles tablettes se forment par hétéro-épitaxie au niveau de la limite de séparation des tablettes de la couche inférieure, lorsque ces dernières deviennent coalescentes. B) Modèle de la séquence de la formation de la nacre en mur de brique. (1) Mise en place de trame organique (zone grisée), (2) nucléation des nouvelles tablettes et croissance majoritairement selon l'axe c (3) croissance concentrique des tablettes selon les axes a et b uniquement, (4) les tablettes se rejoignent, deviennent coalescentes et prennent leur forme polygonale, (5) nacre mature.

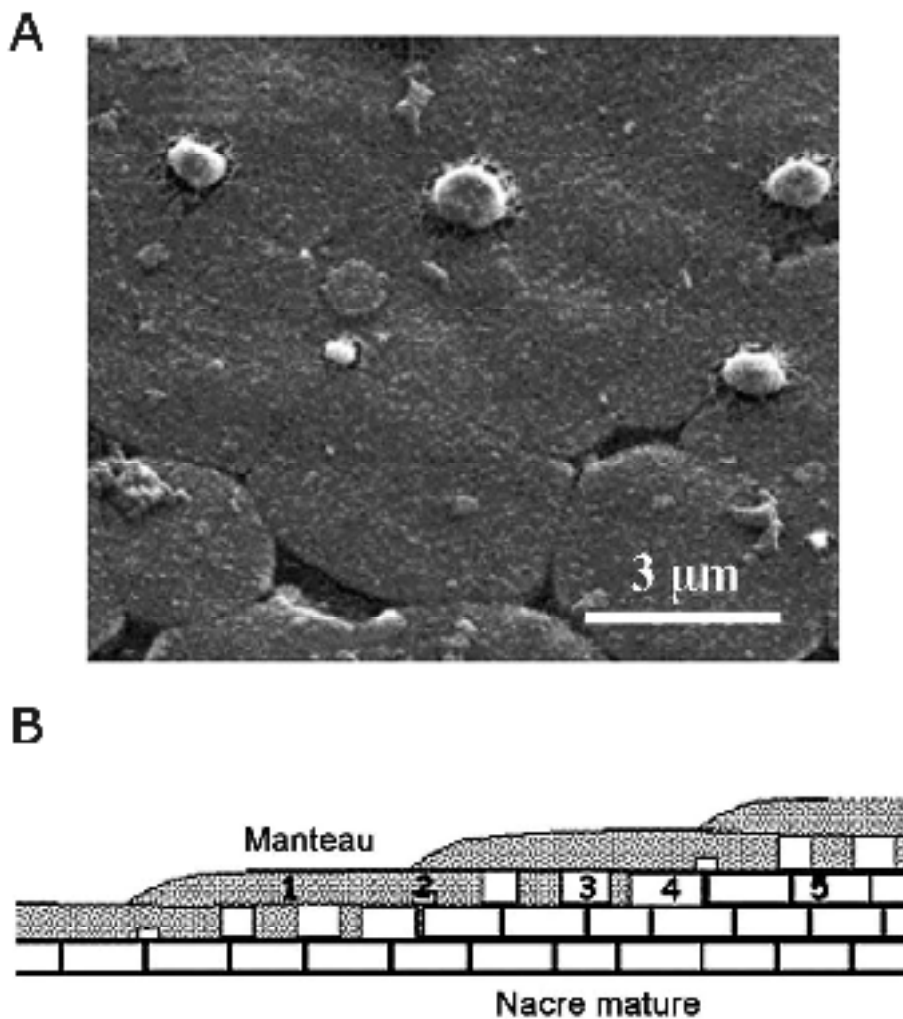
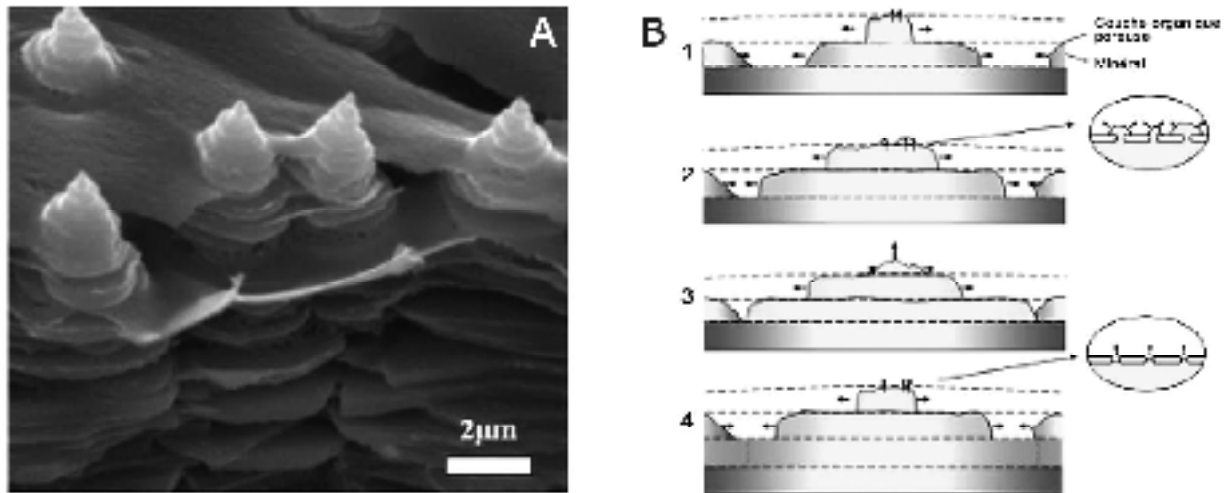


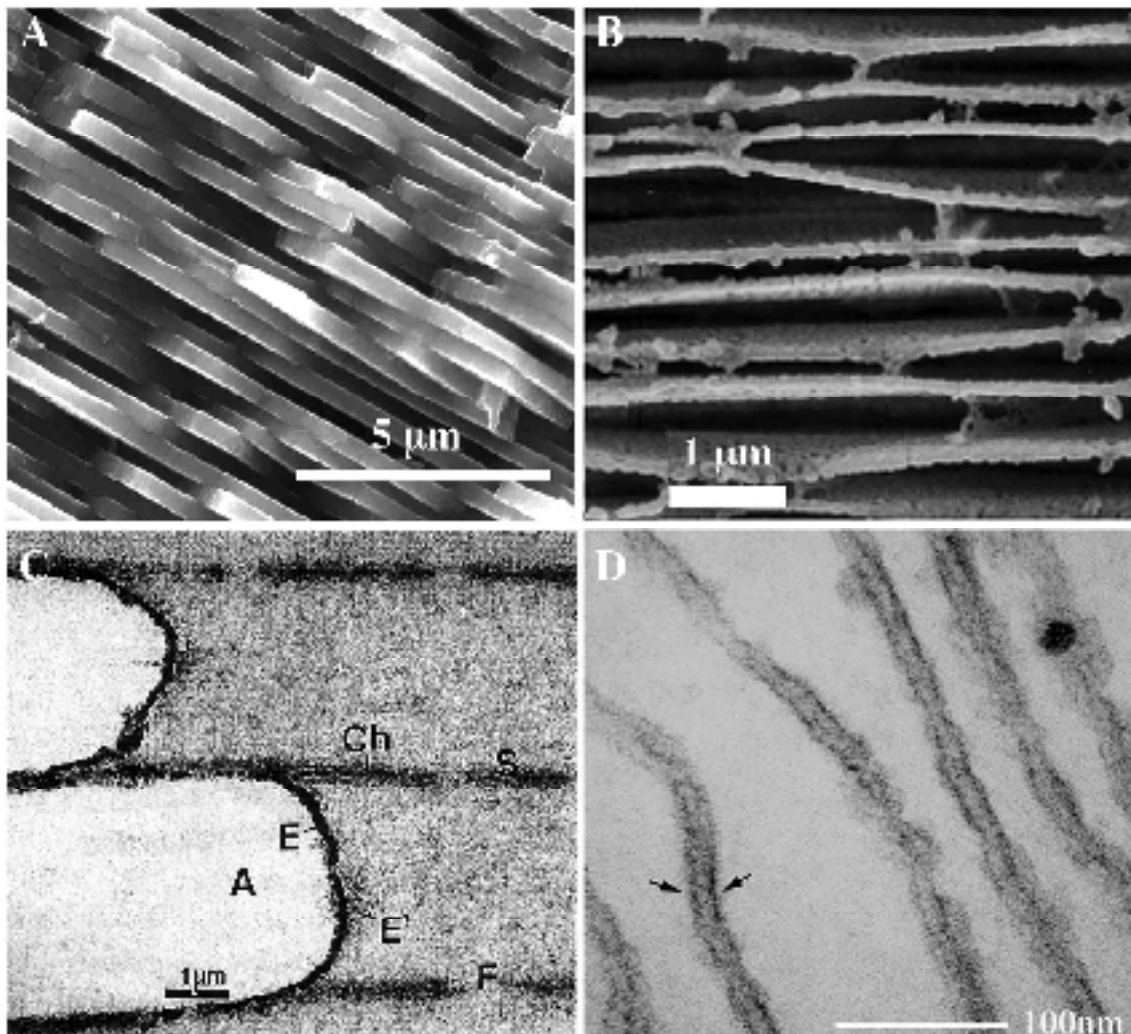
Figure 19 : Formation de la nacre colonnaire des gastéropodes. A) Observation au MEB de la zone de croissance de la nacre colonnaire sur cassure fraîche, en vue oblique. Les nouvelles tablettes se forment sur la couche supérieure, formant ainsi des empilements. B) Modèle de la séquence de la formation de la nacre colonnaire. Les nouvelles tablettes se forment par des ponts minéraux qui diffusent au travers de la couche organique poreuse (modifié d'après Lin & Meyers, 2005).



3.4 - La matrice organique de la nacre

La matrice organique de la nacre représente entre 1 et 5% de la masse totale du biominéral (Hare & Abelson, 1965 ; Goffinet & Jeuniaux, 1979). La très grande majorité des informations concernant la composition de cette matrice provient de l'analyse du produit d'extraction obtenu par décalcification du biominéral mature. Au sein des tablettes de nacre, la matrice organique est localisée autour des tablettes, on parle de matrices intra- et inter-lamellaires, mais aussi à l'intérieur du biocristal, on parle alors de matrice intra-cristalline (Figure 20).

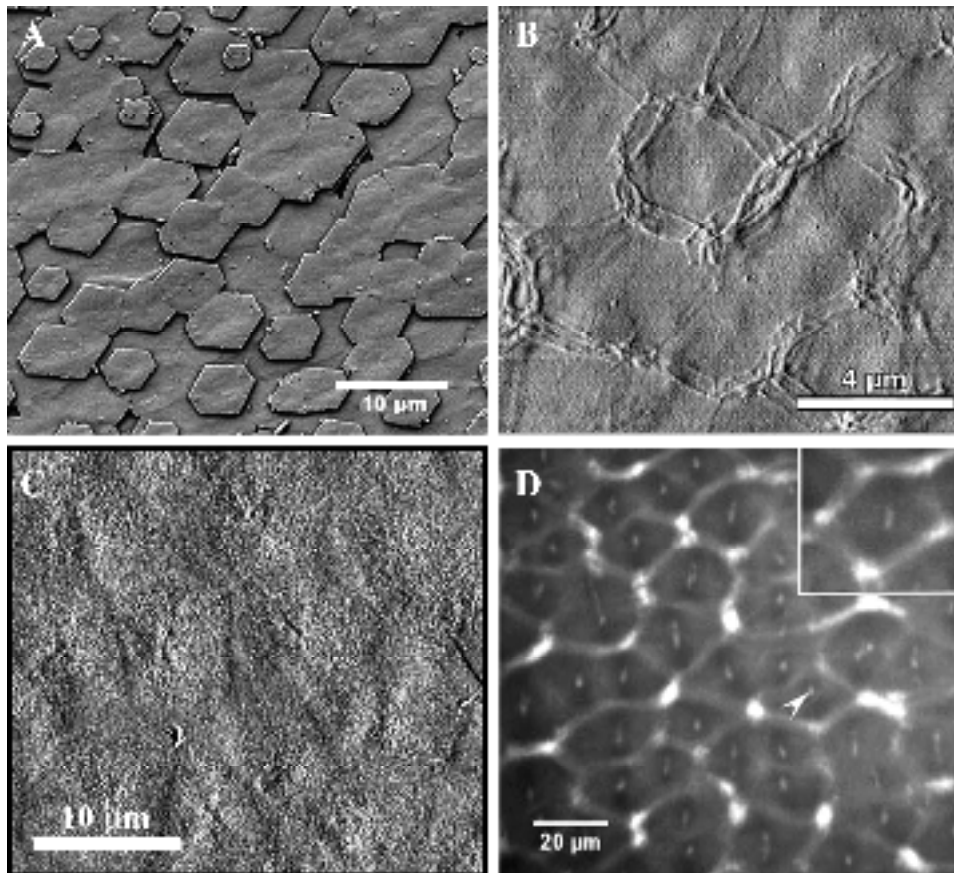
Figure 20 : Organisation de la matrice organique au sein de la couche nacrée. Observations au MEB (A-B), au MET (C) et au cryo-MET (D) de la couche nacrée en vues transversales (modifié d'après Nakahara, 1991 (C) ; Clark, 1999 (B) ; Levi-Kalishmann *et al.*, 2001 (D) ; et observations personnelles (A)). A) Cassure fraîche, sans traitement ; B) Lame mince polie d'une coupe transversale de coquille, après décalcification complète de la phase minérale à l'acide acétique. Seules subsistent une couche organique inter-lamellaire continue (ici horizontale, 0,1 μm d'épaisseur), qui sépare les différentes couches adjacentes de tablettes de nacre, ainsi qu'une fine couche organique (ici verticale, 0,02-0,05 μm d'épaisseur) qui sépare les tablettes contiguës de la même couche. C) Observation d'une coupe fine de la zone de croissance de la nacre après décalcification, la zone claire correspondant à l'emplacement du minéral avant décalcification. On distingue les différentes couches de la matière organique (A, emplacement du minéral ; E, enveloppe organique péri-tablettaire ; Ch, chitine ; S, couche organique inter-lamellaire ; F, fenêtre dans la couche organique inter-lamellaire) ; D) Observation de la couche organique inter-lamellaire après décalcification. On distingue une zonation au sein de cette couche organique chitino-protéique.



Des travaux pionniers d'observation de la nacre au microscope électronique à transmission ont montré qu'une matrice organique délimitait les différentes couches de nacre (Bevelander & Nakahara, 1969). Cette couche organique de 20 nm d'épaisseur détermine les limites

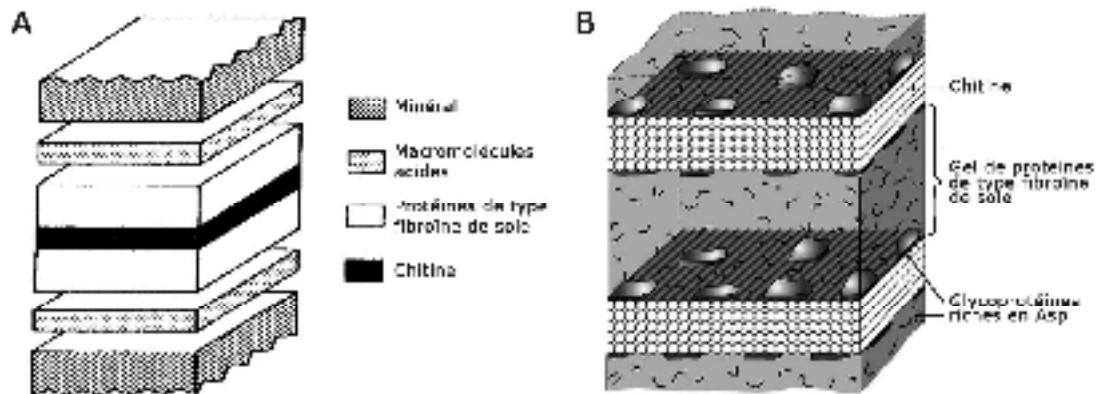
inférieure et supérieure des tablettes. Ces auteurs ont également observé qu'une fine couche organique séparait les tablettes de nacre adjacentes de la même couche (matrice intralamellaire). Des analyses de la composition en acides aminés ont dévoilé que la matrice entourant les tablettes de nacre était riche en Ala et Gly (Grégoire, 1972). Cette composition particulière confère à cette matrice des propriétés d'hydrophobicité semblables à celles des protéines de soie des arthropodes. Des travaux d'observation des tablettes, après différents traitements chimiques, ont permis à Weiner (1979) de montrer que la matrice organique présente à la surface des tablettes était essentiellement composée de glycoprotéines acides. Notons qu'à ce jour, les protéines extraites de la nacre n'ont présenté que des *pI* faiblement acides, comparativement à celui des protéines extraites des couches calcitiques (Figure 14). Crenshaw et Ristedt (1975) ont mis en évidence une zonation des tablettes de nacre. Ils ont observé au centre des tablettes la présence de polysaccharides sulfatés et de protéines acides probablement impliqués dans la nucléation des tablettes (Figure 21). Mutvei (1980) a décrit une zonation circulaire au centre des tablettes, suggérant que leur croissance pourrait être concentrique. Il a également mis en évidence une sectorisation des tablettes de nacre en quatre parties. Parallèlement, différents travaux ont démontré que la chitine (Goffinet & Jeuniaux, 1979) et tout particulièrement la β -chitine (Weiner & Traub, 1980) était un composé important de la matrice organique de la nacre chez la majorité des espèces étudiées.

Figure 21 : Organisation de la matrice organique de la couche nacrée. Observations au MEB (A), au microscope optique (B), à l'AFM (C) et au cryo-MET (D) en vues internes (modifié d'après Blank *et al.*, 2003 (B) ; Bruet *et al.*, 2005 (C) ; Nudelman *et al.*, 2006 (A,D)). A) Zone de croissance d'une couche de nacre de bivalve ; B) Lamelle de nacre mature décalcifiée, observée au microscope à force atomique. On distingue les filaments chitino-protéiques de la matrice intra-lamellaire, formant un maillage autour de chaque tablette ; C) Lamelle de nacre observée à l'AFM. Notons la présence d'une zonation des tablettes qui apparaissent constituées d'une zone centrale plus riche en composés organiques ; D) Lame mince de nacre fixée/décalcifiée, découpée selon un plan parallèle à l'axe de croissance de la couche nacrée, après coloration à l'aminocradone. Ce traitement permet de visualiser/localiser les groupements carboxyliques des protéines au sein des tablettes de nacre. Notons la présence d'une zonation des tablettes qui présentent en leurs centres et leurs périphéries des zones riches en groupements carboxyliques.



Weiner et Traub (1984) intégrèrent ces nouvelles données dans un modèle synthétique de la structure des tablettes de nacre, prenant en compte la présence de chitine, de protéines hydrophobes de type fibroïne de soie et des glycoprotéines acides (Figure 22A). Dans cette représentation, la couche de chitine est bordée par deux couches de protéines hydrophobes, elles-mêmes cernées par deux couches de protéines acides en contact avec le minéral. Plus récemment des observations de la matrice inter-lamellaire au cryo-TEM ont permis à Levi-Kalishman et ses collaborateurs (2001) de constater que cette couche était majoritairement formée de fibres de chitine qui présentaient une grande organisation structurale (Figure 22B).

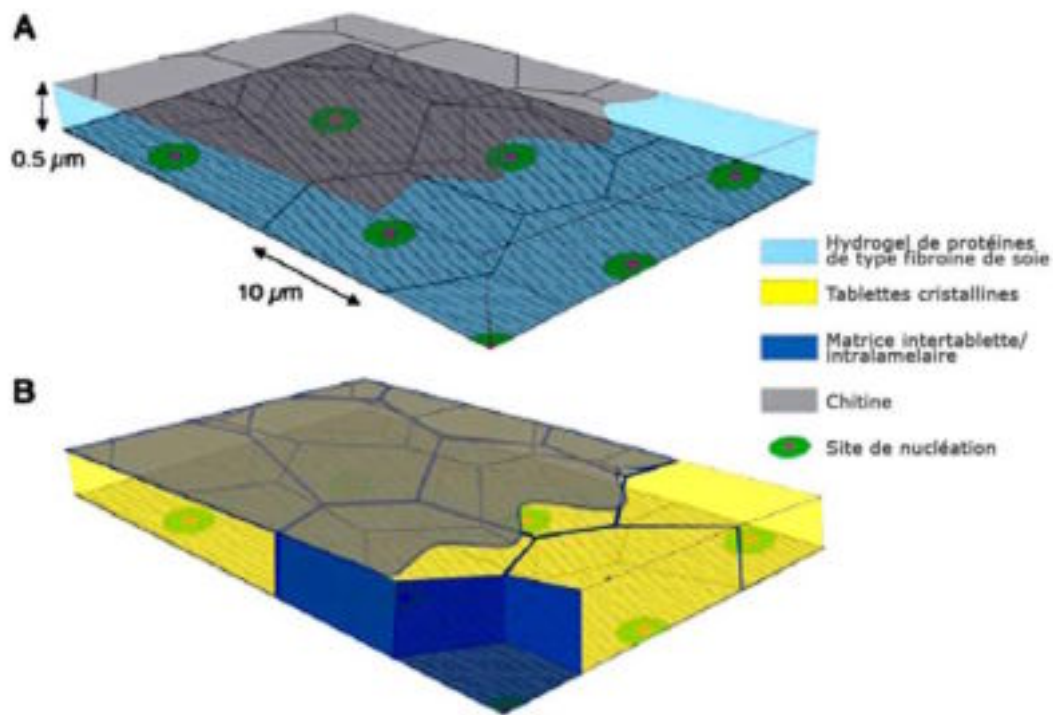
Figure 22 : Modèles schématiques de l'organisation structurale de la matrice organique inter-lamellaire au sein de la nacre. Notons que ces illustrations ne sont pas dessinées à l'échelle. A) Modèle à cinq couches, d'après Weiner & Traub, (1984) ; B) Modèle montrant l'organisation des couches de chitine, d'après Levi-Kalisman *et al.*, (2001).



Plus récemment, Addadi et ses collaborateurs (2005) ont proposé un modèle dynamique des mécanismes de la formation de la nacre. Ces auteurs considèrent que, même si différents points restent encore indéterminés, il est actuellement envisageable de présenter un scénario synthétique reprenant les différentes étapes de ce processus (scénario illustré dans la figure 23):

- 1) Les protéines hydrophobes, semblables aux fibroïnes de soie, forment un gel hydraté sursaturé en ions, qui pré-remplit le micro-environnement où la minéralisation va avoir lieu.
- 2) Les fibres de chitine constituent une phase structurale ordonnée qui va contraindre l'orientation et la mise en place du cristal mature.
- 3) Les différents constituants de la matrice se répartissent spécifiquement dans l'espace de minéralisation.
- 4) Lors de la précipitation des ions, le carbonate de calcium amorphe (ACC) va se former en premier et ce, de façon transitoire, avant de se convertir progressivement, par perte de molécules d'eau, en un polymorphe cristallin plus stable, l'aragonite.
- 5) La nucléation se produit au contact de la matrice et la croissance de la phase minérale cristalline se produit aux dépens de l'ACC.
- 6) Durant la croissance du minéral, des protéines acides sont incluses dans les cristaux du biominéral.

Figure 23 : Modèle schématique représentant la formation de la nacre, avant et après minéralisation (A & B, respectivement) (modifié d'après Addadi *et al.*, 2005). A) L'assemblage de la trame organique précède le dépôt de la phase minérale. Le micro-environnement de la minéralisation est un hydrogel de protéines de type fibroïne de soie, délimité par deux couches de β -chitine. Le gel, chargé en particules minérales, est capable d'inhiber la précipitation des ions. Les protéines de nucléation sont adsorbées sur la couche de chitine inférieure, délimitant les zones de nucléation (notons que ces zones sont placées différemment dans les deux types de nacre). B) Couche nacrée minéralisée. La nucléation de l'aragonite est induite par des protéines acides. Au fur et à mesure de la croissance des tablettes, l'hydrogel perd des molécules d'eau et les protéines de type fibroïne de soie sont déplacées et concentrées entre les tablettes adjacentes et les couches de chitine.



Même si ce modèle permet d'imaginer comment se forment les tablettes de nacre, le lien entre ces mécanismes et les protéines extraites des matrices organiques, reste encore parfois incertain. À ce jour, très peu de travaux ont permis de localiser les différentes protéines de matrice coquillière au sein du biominéral mature ou des tablettes en formation. Marin et ses collaborateurs (2000) ont pu montrer que Mucoperlin était présente principalement au niveau de la matrice inter-tablettaire. Ces auteurs ont suggéré que cette glycoprotéine, semblable à des mucines et capable d'inhiber la précipitation du carbonate de calcium *in vitro*, pouvait très vraisemblablement être une protéine de l'hydrogel permettant de contrôler la précipitation des ions (Marin *et al.*, 2008). Nudelman et ses collaborateurs (2006) ont pu co-localiser au centre des tablettes de nacre des groupements carboxyliques, des sucres sulfatés et des protéines capables de lier le calcium. Ces auteurs ont proposé que des glycoprotéines portant des sucres

sulfatés et capables de lier le calcium étaient responsables de la nucléation des tablettes d'aragonite.

Il apparaît donc que, dans la grande majorité des cas, le rôle effectif des protéines extraites des coquilles dans les processus de minéralisation reste encore énigmatique.

4 – Acquis du chapitre et objectifs de la thèse

Dans ce chapitre consacré à la revue des connaissances, nous avons pu décrire la diversité des biominéralisations au sein du vivant et nous avons tout particulièrement présenté l'une des structures biominérales les plus étudiées, la nacre des coquilles de mollusques.

Parmi les 60 types différents de minéraux pouvant être biologiquement formés, les carbonates de calcium semblent occuper une place toute particulière. En effet, ce minéral représente à lui seul 50% des biominéralisations formées à la surface du globe. Parmi les nombreux phylums d'eucaryotes capables de contrôler la formation de ce biominéral, les mollusques constituent un exemple fascinant à de nombreux égards. Apparu probablement durant le Paléozoïque, ce taxon a acquis dès le début du Cambrien la possibilité de former une structure calcifiée particulièrement remarquable, la coquille. Ce squelette externe calcifié est organisé en une superposition de couches minéralo-organiques de structures et de compositions différenciées. Parmi ces différentes couches, la nacre constitue un modèle de choix pour l'étude des biominéralisations.

La nacre est apparue chez les mollusques au cours du Cambrien et a connu un certain succès évolutif. Aujourd'hui, on observe des couches nacrées dans les coquilles de différents représentants des monoplacophores, des céphalopodes, des gastéropodes, mais aussi des bivalves. La nacre est un matériau biocomposite formé sous contrôle biologique d'un tissu minéralisateur, le manteau. Lors de la précipitation des cristaux de carbonate de calcium, de nombreuses macromolécules participant à l'édification de cette structure sont intégrées dans le biominéral. Le biominéral formé est donc une structure hautement organisée aussi bien à micro- qu'à nano-échelle. La couche nacrée est composée à 95-99% de minéral, l'aragonite, et de 1-5% de matériel organique précisément répartis dans et autour des cristaux et comprenant essentiellement des protéines, des glycoprotéines et des polysaccharides dont la chitine. On pense que ces composés organiques sont aussi bien impliqués dans la structure du biominéral que dans les processus de sa formation. La majorité des informations que nous possédons sur ces mêmes macromolécules proviennent d'un nombre restreint de modèles

biologiques, principalement le bivalve ptériomorphe du genre *Pinctada* et le gastéropode du genre *Haliotis*.

Il paraît intéressant de se demander si les différentes nacres, apparemment très conservées par l'évolution, constituent des structures homologues et si leurs mécanismes de formation sont les mêmes chez les différents groupes de mollusques nacrés.

Dans cette optique, nous étudierons et caractériserons, dans ce travail, les matrices organiques associées aux couches nacrées de coquilles de deux modèles biologiques peu étudiés à ce jour dans cette perspective : le bivalve (= lamellibranche) Palaeoheterondonta *Unio pictorum* et le céphalopode Nautiloidae *Nautilus macromphalus*, dont les positions taxonomiques respectives paraissent propices à une comparaison avec les deux modèles mieux connus, précédemment cités. Ce travail se positionnera dans l'optique de déterminer si les pressions de sélection qui s'expriment sur les protéines minéralisantes des coquilles de mollusques sont aussi importantes qu'on aurait pu l'imaginer, compte tenu de la remarquable conservation de cette structure au sein du phylum. Est-ce que la pression de sélection, qui s'est exercée tout au long de l'histoire de cette microstructure coquillière très conservée, s'applique plutôt sur le produit final, la coquille et/ou la microstructure du biominéral, ou alors sur l'ensemble ou certains des gènes/protéines qui sont impliqués dans sa formation ?

Enfin, dans un but comparatif et évolutionniste, nous confronterons en dernière partie de ce manuscrit nos données à celles obtenues chez d'autres lophotrochozoaires à coquille calcifiée (« out-group »), les brachiopodes Rhynchonelliformea.

Chapitre II:
La biominéralisation de la coquille
chez *Unio pictorum*

La biominéralisation de la coquille chez *Unio pictorum*

1 - Introduction

1.1 - Description, biologie et cycle de vie

Unio pictorum (Linné, 1758) est un mollusque bivalve d'eau douce, appartenant à la sous-classe des Palaeoheterodonta et à l'ordre des Unionoida. Cet animal est considéré comme une espèce courante des cours d'eau européens et de l'ouest de l'Asie, des travaux font état de sa présence dans de nombreux fleuves, dans des cours d'eau plus modestes, des canaux et même des lacs. *U. pictorum* est également très courant en région Bourguignonne, puisqu'il peut être retrouvé aussi bien dans le canal de Bourgogne que dans des rivières comme l'Ouche, la Vouge ou la Seine. Il partage le nom commun de « moule d'eau douce » avec d'autres membres du genre *Unio*. On lui donne aussi le nom plus spécifique de « mulette des peintres », ou « unio des peintres », en référence à l'utilisation de sa coquille par les peintres pour mélanger les pigments.

Comme chez tous les bivalves (= lamellibranches), le corps mou de cet invertébré est recouvert d'une coquille calcifiée, composée de deux valves (reliées par un ligament en position dorsale) plus ou moins symétriques pouvant s'ouvrir et se fermer, laissant dépasser les siphons inhalant et exhalant par lesquels l'animal aspire puis rejette l'eau pour se nourrir et respirer. Cet animal aquatique à respiration branchiale crée un courant d'eau autour de ses branchies grâce à la multitude de cils vibratiles qui les recouvrent. L'animal utilise également ce courant pour aspirer les micro-organismes planctoniques dans sa cavité palléale et les piéger sur un tapis muqueux qui recouvre les branchies. Les particules alimentaires, engluées dans le mucus, transitent alors vers l'estomac où elles seront broyées par une tige cristalline.

Contrairement aux moules marines comestibles du genre *Mytilus*, *U. pictorum* ne possède pas de byssus pour s'ancrer sur un support, mais un pied bien développé qui lui permet de se déplacer et de s'enfouir dans le sédiment. La Figure 24 présente l'anatomie interne d'un Unionoidae. Notons que, contrairement aux autres classes de mollusques, les bivalves ne possèdent ni tête, ni pharynx, ni radula. Le corps est complètement enveloppé dans le manteau qui sécrète la coquille de l'animal. Les deux valves sont reliées par un ligament dorsal et deux muscles adducteurs assurent la fermeture de la coquille. La charnière, la zone de jointure entre les deux valves, constitue un caractère morphologique important dans la détermination taxonomique des bivalves. La charnière des Palaeoheterodonta présente des caractéristiques « modernes » qui la font ressembler à celle des hétérodontes.

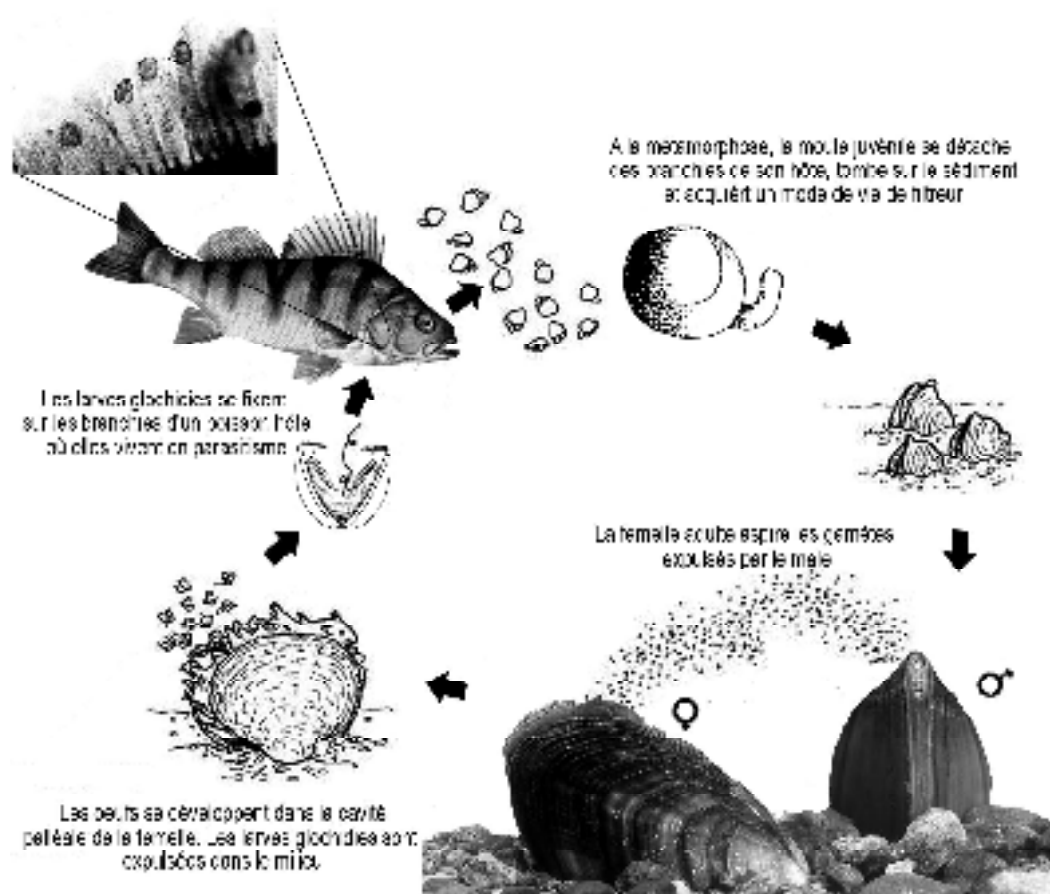
Figure 24 : Anatomie d'un Unionoidae (modifié d'après Ellis, 1978).

Vue latérale de l'animal en entier (gauche) et section transversale (droite) ; bex, branchie externe ; bin, branchie interne ; cq, coquille ; cr, crochet ; lg, ligament ; mu, muscle ; man, manteau, mv, masse viscérale ; pd, pied ; sex, siphon exhalant ; sin, siphon inhalant.

Les adultes d'*Unio pictorum* peuvent vivre plus de 20 ans et atteindre près de 15 cm de longueur (Aldridge, 1999). Les *Unio* sont gonochoriques. Leur période de reproduction a lieu à la fin du printemps. Les mâles émettent leurs gamètes directement dans l'eau à proximité des femelles qui les aspirent par leur siphon inhalant pour féconder leurs nombreux œufs. Les œufs sont incubés par la femelle dans la cavité palléale. Après l'éclosion, les larves sont rejetées dans le milieu. La suite du cycle de vie des Unionoidae présente quelques singularités (Figure 25). En effet, les larves glochidies exigent pour se développer de s'enkyster dans les branchies (essentiellement) d'un poisson qui les aura ingérées. Une fois bien fixées, les glochidies vont se nourrir pendant 4 à 9 mois du sang qui transite abondamment dans les branchies de l'hôte. Cependant, il semblerait que ce type de parasitisme ne nuise que très modérément à l'hôte qui peut porter plusieurs dizaines de larves par lamelle branchiale. Notons qu'en plus de fournir de la nourriture à la larve, cette stratégie permet à l'espèce de coloniser rapidement de nouveaux milieux. En contrepartie, cette association implique que, pour perdurer, les espèces de moules d'eau douce ont besoin nécessairement d'un hôte poisson.

À la métamorphose, le jeune *Unio* atteint sa forme définitive (mais d'une taille minuscule), quitte son hôte et tombe sur le fond où il poursuit son développement et entame son nouveau mode de vie de filtreur. Durant toute leur vie, ces animaux vont filtrer l'eau, avaler les particules alimentaires, mais aussi accumuler dans leurs tissus des métaux et des polluants. Pour ces raisons, les moules d'eau douce servent couramment de bio-indicateurs de pollution des cours d'eau (Ravera *et al.*, 2003).

Figure 25 : Cycle de vie d'un Unionoidae (modifié d'après Cummings & Mayer, 1992).



1.2 – Phylogénie et position taxonomique

Unio pictorum appartient à l'une des cinq sous-classes qui constituent la classe des Bivalvia (= Lamellibranchia), celle des Palaeoheterodonta (Figure 26). Ce taxon est constitué de 848 espèces actuelles, regroupées en deux ordres : les Trigonioidea, qui comprennent six espèces exclusivement marines, présentes dans les eaux côtières ou saumâtres du Pacifique Sud, et les Unionoidea, qui constituent un groupe monophylétique regroupant l'ensemble des « moules d'eau douce » (842 spp.) présentes dans les six régions écologiques (Nearctica, 302 spp. ; Neotropica, 172 spp. ; Afrotropica, 85 spp. ; Palearctica, 42 spp. ; Indotropica, 208 spp. ; Australasia, 33 spp.). Ces différentes régions comportent toutes des lignées endémiques, suggérant que les époques de divergence entre les peuplements remontent à l'époque (fin du Trias) où la Pangée s'est séparée pour former les continents actuels. Notons que d'autres bivalves non Unionoidea peuplent également les cours d'eau du globe (endémiques ou non), mais ces espèces (*e.g.* *Dreissena* sp. ou *Corbicula* sp.) appartiennent aux Heterodonta et n'entrent pas dans la dénomination « moules d'eau douce » (également appelées naïades).

Figure 26 : Arbre phylogénétique des Bivalvia (= Lamellibranchia) (modifié d'après Adamkewicz *et al.*, 1997). Notons que, d'après cette étude, les Pteriomorphia constituent un groupe paraphylétique.

Les Unionoida représentent un groupe taxonomique composé de 842 espèces réparties sur tout le globe (sauf les régions glacées), dont l'origine remonte à plus de 200 M.A., probablement au cours du Trias. Ce taxon exclusivement dulçaquicole est depuis peu le centre d'intérêt de nombreuses études macro-évolutives, retraçant les différentes hypothèses de colonisation des bassins continentaux (Graf, 2001 ; Graf & Cummings, 2006).

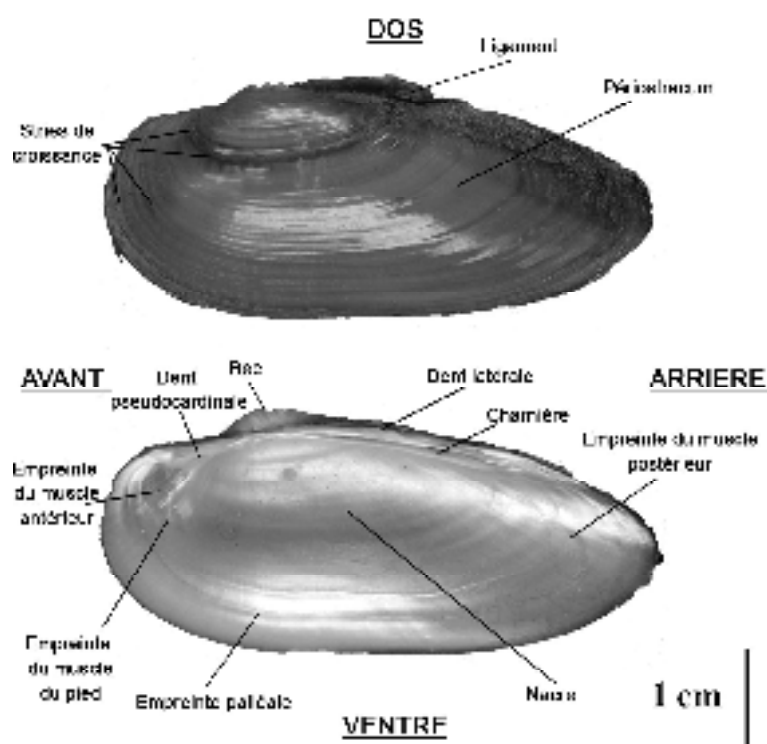
Figure 27 : Arbre phylogénétique des Palaeoheterodonta (Modifié d'après Graf, 2001).

Le genre *Unio* est composé de sept espèces biologiques différentes présentes en Europe. Notons que la multiplicité des descriptions de ces espèces au cours des siècles passés a donné lieu à de nombreuses synonymies. En effet, on peut dénombrer près de 125 dénominations différentes décrivant *Unio pictorum* et ses sous-espèces. La grande plasticité phénotypique de la forme des coquilles, ainsi que le nombre très réduit de caractères morphologiques permettant de discriminer les différents espèces, expliquent en partie l'abondance de ces synonymies.

1.3 – Description de la coquille

Chez certains Unionoidae, la forme de la coquille peut présenter un léger dimorphisme sexuel, les femelles possédant souvent une carène dorsale plus prononcée, mais cette éventualité n'a, à ce jour, pas été testée chez *U. pictorum*. L'épaisseur de la coquille peut être mise en relation avec l'écologie de l'animal ou la composition chimique de l'eau (Rhoads & Lutz, 1980).

Figure 28 : La coquille d'*Unio pictorum*. Valve gauche et valve droite en vue externe et interne, respectivement.

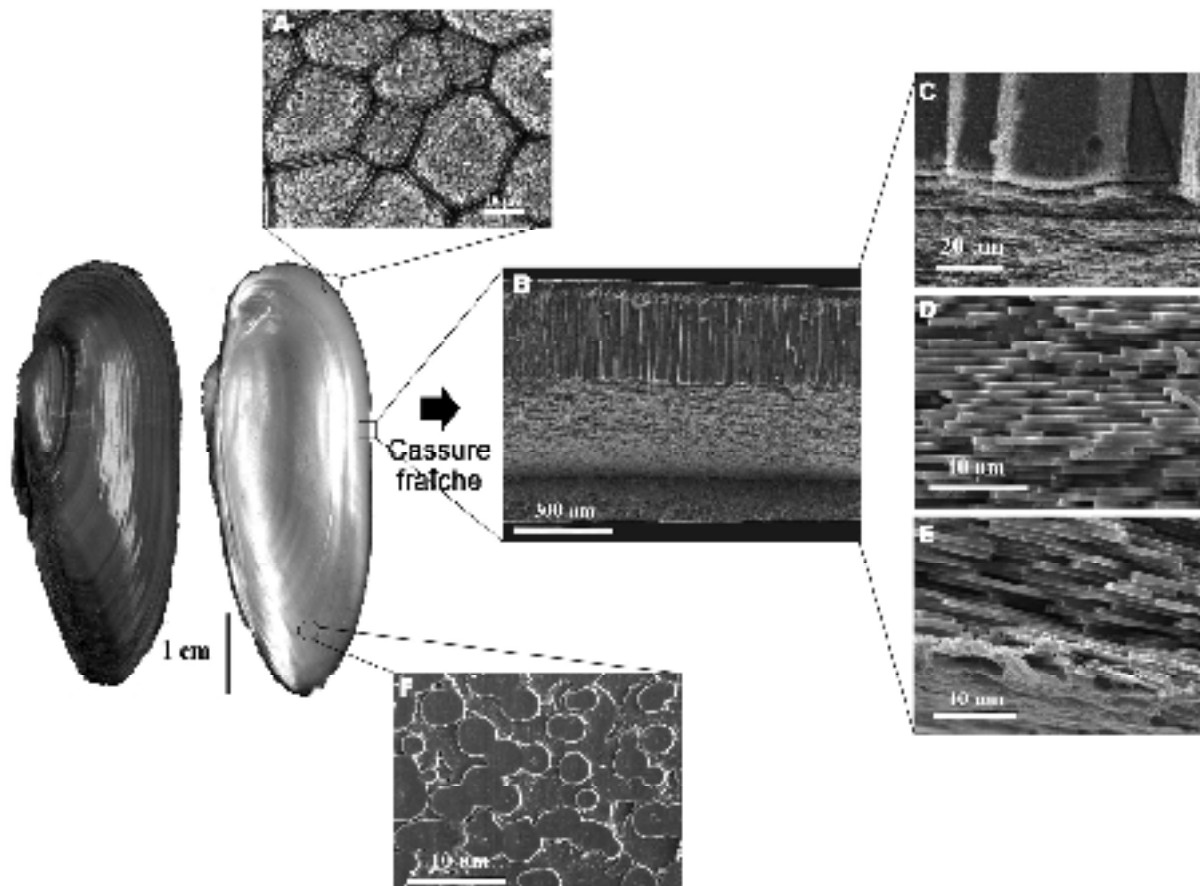


L'examen de la surface externe des valves révèle très souvent des bandes parallèles à la bordure de la coquille. Ces bandes peuvent être de deux catégories: des bandes larges et

sombres, régulièrement espacées ou des bandes plus fines et plus discrètes, dont l'espacement relatif est plus irrégulier (Figure 28). La signification et la formation de ces bandes sont reliées aux différentes périodes de croissance de la coquille. Chez tous les bivalves, la croissance de la coquille est continue et se déroule durant toute la vie de l'animal, constituant une archive des événements qu'il a vécu (Ravera *et al.*, 2003 ; Ricken *et al.*, 2003).

La coquille se forme dès les premiers stades de développement de la larve glochidie. Cette « première coquille » est majoritairement formée de composés organiques. Chez certaines espèces, la bordure apicale de ces coquilles comporte des crochets servant à l'enkystement de la larve dans les tissus du poisson hôte. À la métamorphose, la coquille devient plus épaisse et les crochets vont disparaître, entraînant le détachement de la larve qui va rejoindre le sédiment.

Figure 29 : La coquille d'*Unio pictorum*, vue générale et observations au MEB (A-F). A) Couche prismatique en vue interne. B) Ensemble des couches de la coquille en vue transversale sur cassure fraîche (C-E, détails). C) Limite entre la couche prismatique et la couche nacrée. D) Couche nacrée en « mur de briques ». E) Couche nacrée en formation. F) Couche nacrée en vue interne.



Comme la coquille de nombreux bivalves, celle des Unionoida est composée de deux couches minéralisées (la couche externe est prismatique, la couche interne est nacrée). L'ensemble de ces couches est recouvert d'une couche organique, le périostracum. Cette couche chitino-protéique sert de support à la croissance de la phase minérale lors de la séquence de formation du biominéral (Towe & Hamilton, 1968). Notons que chez certaines espèces d'Unionoidea, la couche prismatique est absente. Chez *U. pictorum*, la coquille est épaisse et présente une couche prismatique externe réduite au dixième de l'épaisseur de la coquille. L'épaisse couche nacrée présente l'organisation microstructurale classique de la nacre en « mur de briques » des bivalves.

Contrairement aux coquilles nacro-prismatiques des Pteriomorpha, mais de manière similaire à celles de certains gastéropodes et de certains céphalopodes, celles des Unionoida est entièrement aragonitique. C'est en cela qu'on considère que la coquille des Unionoida présente une texture plutôt primitive car ce caractère est partagé par différentes familles dites anciennes, dont les Trigoninoida avec lesquels ils forment la sous-classe des Palaeoheterodonta.

1.4 – Echantillonnage

Les coquilles fraîches d'organismes adultes de 10 à 16 cm de longueur ont été prélevées sur des moules d'eau douce *Unio pictorum* collectées dans le canal de Bourgogne, ainsi que dans la Vouge (Bourgogne, France). Les coquilles ont été méticuleusement nettoyées par un bain prolongé dans de l'hypochlorite de sodium afin de retirer toutes traces de contaminants exogènes ou de tissus non calcifiés. Les coquilles ont ensuite été abondamment rincées à l'eau déminéralisée, puis séchées, avant d'être étudiées.

1.5 – But de l'étude

À l'instar des bivalves Pteriomorpha à coquilles nacro-prismatiques, les Unionoidae possèdent des coquilles dont l'assemblage microstructural est souvent qualifié de primitif. Cependant, contrairement à celles des Pteriomorpha, leurs coquilles sont entièrement aragonitiques. Une question semble essentielle : est-ce que des microstructures coquillières similaires, présentes chez différents taxons, sont produites par un même système macromoléculaire ? L'exemple de la nacre chez les bivalves (= lamellibranches) semble particulièrement propice à cette étude. La nacre est présente chez certains représentants de quatre sous-classes de bivalve (Palaeotaxodonta + Pteriomorpha + Palaeoheterodonta +

Anomalodesmata). Or, toutes les données moléculaires publiées sur la nacre des bivalves concernent exclusivement les Pteriomorphia (deux genres étudiés, *Pinctada* et *Pinna*). Aucune donnée concernant les trois autres sous-classes n'est à ce jour disponible.

Notre travail a pour but de caractériser, par des techniques de biochimie, les différents constituants de la matrice calcifiante extraite de la coquille du bivalve Unionoida, *Unio pictorum*. Il s'agit de savoir si les différents constituants macromoléculaires qui contrôlent la formation de la micro-structure nacrée chez *U. pictorum* « ressemble » à ceux identifiés chez d'autres bivalves à coquille nacro-prismatique, en particulier, les bivalves Pteriomorphia, dont l'huître perlière *Pinctada* sp. constitue le modèle prédominant, en ce qui concerne l'étude de la biominéralisation.

Les trois articles de recherche présentés ci-après sont consacrés à l'étude des composés organiques de la couche nacrée, notamment les protéines et les glycoprotéines. Dans ces travaux, nous avons souligné l'importance du rôle de la fraction saccharidique des glycoprotéines dans les processus de minéralisation de la nacre. Ces articles, présentés ici en langue anglaise dans leur format de publication ou de soumission, sont précédés d'un résumé en français.

Le lecteur trouvera à la suite, quelques résultats complémentaires qui font encore l'objet d'études et de travaux d'approfondissement. En fin de chapitre, une conclusion retracera les résultats majeurs obtenus dans le cadre de cette étude, leurs implications, ainsi que les questions qu'ils soulèvent et les pistes de recherches ultérieures à suivre.

2 – Calcification in the shell of the freshwater bivalve *Unio pictorum*, In *Biom mineralization: from Paleontology to Materials Science - Proceedings of the 9th International Symposium on Biom mineralization* (2007), pp. 273-280.

Résumé

Cette étude vise à élucider la séquence primaire des protéines extraites des coquilles du mollusque *Unio pictorum*. Ce bivalve d'eau douce possède une coquille externe calcifiée de structure nacro-prismatique, qui est exclusivement constituée d'aragonite. La matrice acido-soluble de la couche nacrée a été extraite et analysée sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. Les cinq composés protéiques majoritaires migrent aux alentours de 95, 50, 29, 14 et 10 kDa, respectivement. Cette matrice présente la capacité à modifier la forme des cristaux de carbonate de calcium précipités *in vitro*. Les trois composés de masses moléculaires les plus importantes sont acides, portent des groupements poly-saccharidiques et sont capables de lier les ions calcium en solution. Certaines de ces protéines ont été purifiées par électrophorèse préparative. Les propriétés biochimiques de ces composés sont comparées à celles des autres protéines extraites de la nacre d'autres mollusques, comme *Pinctada* sp., *Pinna nobilis*, *Haliotis* sp. et *Turbo marmoratus*.

Calcification in the Shell of the Freshwater Bivalve *Unio pictorum*

Benjamin Marie^{1*}, Nathalie Guichard¹, Jean-Paul Pais De Barros², Gilles Luquet¹
and Frédéric Marin^{1*}

¹UMR CNRS 5561 Biogéosciences, University of Burgundy, 6 Bd. Gabriel, F-21000 Dijon, France.

²U 496 INSERM, University of Burgundy, 7 Bd. Jeanne d'Arc F-21079 Dijon, France.

benjamin.marie@u-bourgogne.fr*, frederic.marin@u-bourgogne.fr*

ABSTRACT

The scope of the present study is to elucidate the primary structure of the shell proteins of the mollusk Unio pictorum. This freshwater bivalve exhibits an aragonitic shell with nacre-prismatic microstructures. The acetic acid-soluble matrix of the nacreous layer has been extracted, and analyzed on standard polyacrylamide gel under denaturing conditions. Five main proteins can be observed. Their respective apparent molecular weight is 95, 50, 29, 14 and 10 kDa. The three high molecular weight bands are acidic, glycosylated and bind calcium in vitro. These proteins are purified by preparative SDS-PAGE. In addition, these fractions are tested to check their ability to modify the shape of CaCO₃ crystals. The biochemical properties of these proteins can be compared to that of other proteins of nacreous mollusks, such as Pinctada sp., Pinna nobilis, Haliotis sp. and Turbo marmoratus.

INTRODUCTION

Among metazoans, the shells secreted by mollusks are a remarkable example of a natural composite biomaterial, synthesized at ambient temperature. Despite numerous detailed studies carried out on molluscan shell biomineralization, it still remains obscure how mollusks produce and shape their shells. Various taxa of mollusks exhibit a shell with a nacreous layer characterized by highly oriented calcium carbonate crystals of aragonite embedded in a small amount of organic material (1-5% weight). At macroscale, this matrix is, among others, responsible for the remarkable fracture toughness of the shell (Weiner, 1986). At molecular scale, it is mainly constituted of proteins, polysaccharides and lipids. It has been shown to regulate the crystal nucleation, the crystal size and morphology, and to act as a growth inhibitor (Weiner and Addadi, 1997).

Recently, a number of shell matrix proteins that are involved in nacre formation have been characterized among gastropods and bivalves (Marin and Luquet, 2004). In this latter group, all the molecular data published so far concern the pteriomorphids. To date, very little is known on the shell macromolecular

Marie et al.

constituents of Paleoheterodont bivalves. Our knowledge is mostly limited to the extrapallial fluid components (Moura *et al.*, 2000; Lopes-Lima *et al.*, 2005). The shell of the Unionidae is indeed entirely aragonitic, and made of two mineralized layers; the external one is made of prisms, and the internal layer is nacreous (Checa *et al.*, 2000).

The aim of the present study is to investigate the protein content of nacre from the freshwater painter's mussel *Unio pictorum*.

MATERIALS AND METHODS

Shell matrix extraction

Lake mussels with 10-16 mm of shell length (Fig. 1-1), belonging to the species *Unio pictorum*, were collected from the canal of Burgundy (Dijon, France). The shells were immersed in 1% (v/v) NaClO to remove the periostracum and superficial contaminants. The shells were mechanically abraded, cleaned and crushed. The powder of the two aragonitic layers (nacreous and prismatic) or of the nacreous layer alone was decalcified overnight at 4°C in cold dilute acetic acid (10% v/v). The entire extract was directly centrifuged at 3900 g (15 min, 4°C). The supernatant solution was filtered (5 µm) before being concentrated by ultra-filtration (cut-off 10 kDa). The concentrated solution (about 5 mL) was dialyzed against MilliQ water (3 days) before being freeze-dried and weighed.

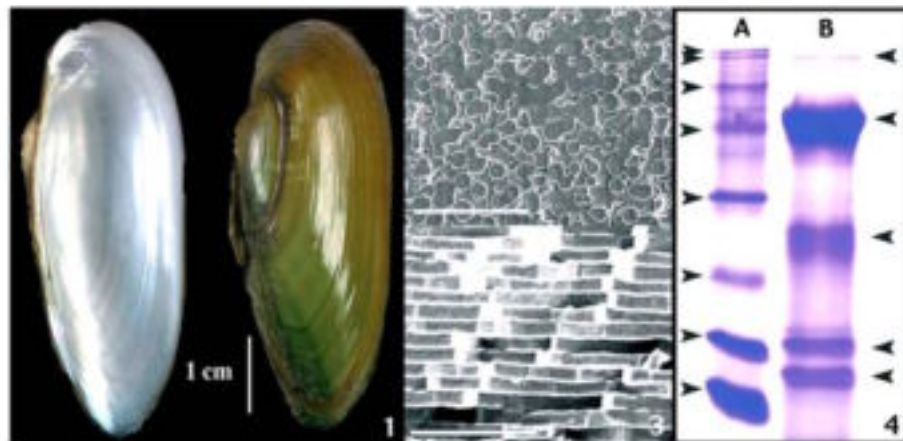


Figure 1. Shell of *Unio pictorum*. 1) General view. 2) SEM internal view of the nacre (scale bar 30 µm). 3) Transversal view (scale bar 20 µm). 4) 15% SDS-PAGE profile of ASM stained by CBB. A: molecular weight markers (116, 97.4, 65, 45, 31, 21, 14.4 et 6.5 kDa) ; B : ASM (95, 50, 29, 14 and 10 kDa).

Mono and two-dimensional PAGE

The macromolecules of the Acido-Soluble Matrix (ASM) were fractionated by denaturing SDS-PAGE (Mini Protean III, Bio-Rad). Gels were subsequently stained by Coomassie brilliant blue (CBB), silver nitrate, alcian blue, PAS, 'Stains-All' or blotted on a polyvinylidene difluoride membrane for Ca^{45} -binding test or for Western blot analysis, as described by Marin *et al.* (2005). The ASM was also fractionated on 2-D electrophoresis. The first dimension was performed by isoelectric focusing in IPG strips (pH 3-10) in presence of ampholytes. The second dimension was subsequently run under denaturing conditions (4-10% SDS-PAGE).

Protein purification

The denatured matrix was fractionated on a preparative SDS-PAGE as described by Marin *et al.* (2001). Fractions containing purified proteins were detected immunologically by dot-blot performed with the anti-nacre of *P. nobilis* matrix antiserum. The purity of the fractions was assessed on a mini-SDS polyacrylamide gel, which was subsequently stained with silver nitrate. Fractions of the same proteins were pooled, thoroughly dialyzed against MilliQ water and freeze-dried.

Protein-calcite interaction test

Synthetic calcite crystals were grown by slow diffusion of ammonium bicarbonate in 500 μl of 10 mM calcium chloride solution (Albeck *et al.*, 1993) in presence of different concentrations of ASM (24 h, 4°C). Blank tests were performed without any macromolecule. Dried crystals were observed by scanning electron microscopy (JEOL 6400).

RESULTS

Unio pictorum shell consists of an outer aragonitic prismatic layer and an inner nacreous layer with the prismatic layer comprising only 10-30% of the total thickness. Prisms are fibrous polycrystalline aggregates. Transition to nacre is gradual. In Unionidae, 'the first nacreous tablets grow by epitaxy onto the distal ends of the prism fibres' (Checa, 2000). The inner surface of the nacreous layer shows a terraced disposition of aragonite sheets, which grow towards the shell margin. The shape of aragonite tablets is rhombic (Fig. 1-2 and 1-3).

The ASM represents 0.04 % of the dry weight of the shells of *Unio pictorum*, whereas the acid-insoluble matrix accounts for 0.5 %. SDS-PAGE of the ASM reveals the presence of 5 prominent components with apparent molecular weights of 95, 50, 29, 14 and 10 kDa which all stain with CBB (Fig. 1-4). Matrix

Marie et al.

extracted from the two aragonitic layers (prisms + nacre) or from the nacreous layer alone show similar electrophoretical pattern. This demonstrates that all five protein bands are present at least in the nacreous layer. No supplementary major product can be detected with other coloration performed, like the much more sensitive silver nitrate stain (Fig. 2, lanes B). The 95, 50 and 29 kDa bands stain with nitrate silver, CBB, PAS, alcian blue, and 'Stains-All' (Fig. 2, lanes B-F). In addition, they all bind Ca^{45} *in vitro* (Fig. 2, lane G). These results indicate that the three high molecular weight proteins are acidic and glycosylated, and additionally, bind calcium ions. In the other hand, the 14 and 10 kDa bands observed with CBB, do stain neither with alcian blue, nor with PAS. They do not bind calcium and exhibit a negative staining with silver nitrate and 'Stains-All' (not shown). They exhibit biochemical characteristics of acidic proteins associated with biominerals, as reported by Keith *et al*, 1993.

The 2-D electrophoresis profile reveals that bands observed on 1-D SDS-PAGE gel are composed of numerous isoforms exhibiting various pI (Fig. 3). The 95 kDa-band exhibits 8-9 isoforms, which represent the most acidic pI of the ASM. On the other hand, the 29 kDa-band seems to be composed of 2 distinct protein groups, one represented by a single spot with an acidic pI, the other one composed of four basic spots.

The *in vitro* crystallization of calcium carbonate shows that the morphology of the crystals is dramatically modified when ASM is added to the medium (Fig. 4). In a blank experiment without any protein added, the crystals obtained are rhombohedral with smooth surfaces. The effect of ASM starts to be apparent at concentrations of 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. At this concentration, the crystals produced have a

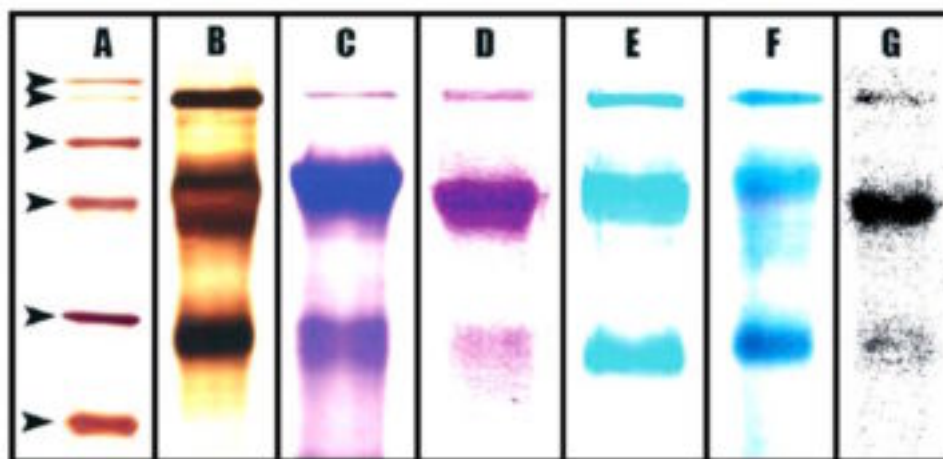


Figure 2: SDS-PAGE 12% A) Molecular weight markers (116, 97.4, 65, 45, 31 and 21.5 kDa). B-G) *Unio pictorum* ASM. A and B: Silver staining, C: Coomassie blue, D: PAS, E: Alcian Blue, F: 'Stains-All' and G: Autoradiography with Ca^{45} .

bigger size. They are characterized by the formation of numerous steps on their sides. By increasing the ASM concentration to 10 $\mu\text{g/ml}$, the crystals produced are bigger and are all polycrystalline. At higher concentration (20 $\mu\text{g/ml}$), an inhibiting effect is recorded: the crystals are smaller, less numerous, and exhibit more complex shapes.

The western blot pattern of ASM obtained with an anti-serum raised against *P. nobilis* nacre matrix (Fig. 5), allowed us to perform a large-scale fractionation

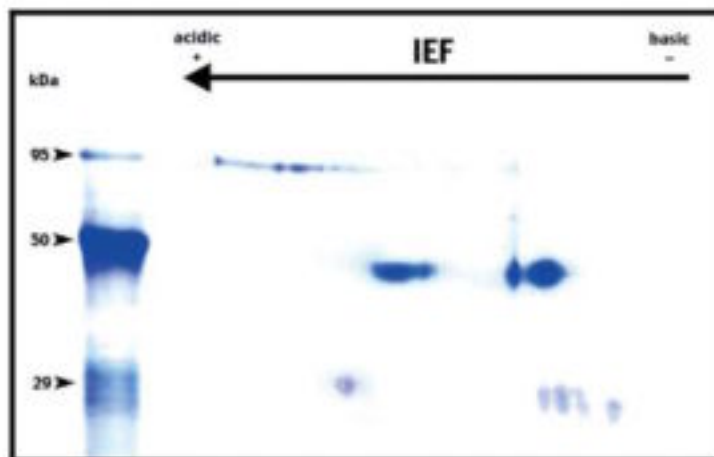


Figure 3: Two-dimensional gel electrophoresis of the ASM (50 μg load/gel), stained by Coomassie blue (Bio-rad), 3-10 pH and 4-10% polyacrylamide. The first dimension was run with ampholytes.

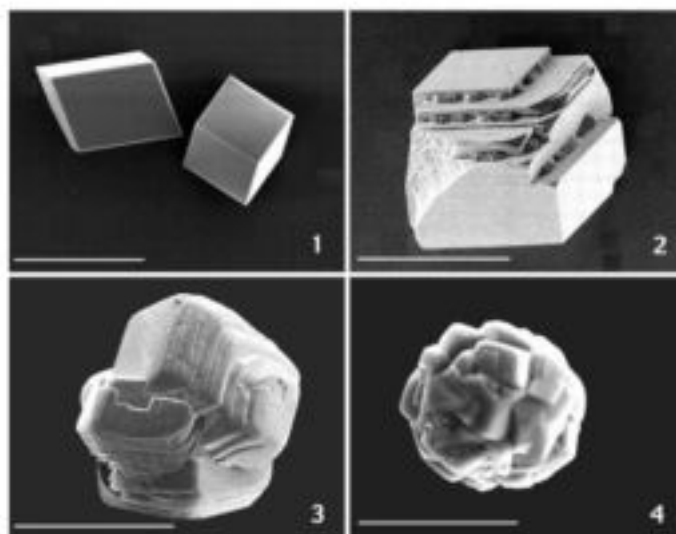


Figure 4: In vitro crystallisation of calcium carbonate with different concentrations of ASM of *Unio pictorum*. 1) Blank test. 2) 5 $\mu\text{g/ml}$. 3) 10 $\mu\text{g/ml}$. 4) 20 $\mu\text{g/ml}$ (scale bars are respectively 20, 60, 80 and 20 μm).

Marie *et al.*

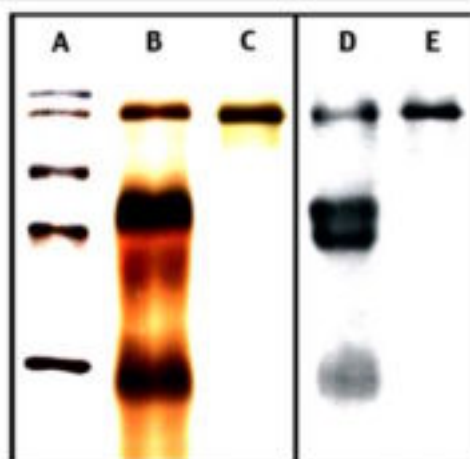


Figure 5: Purification of the P95 on 12 % SDS-PAGE, silver staining (A, B and C) and Western-blot with anti-nacre of *Pinna nobilis* (D and E). A) Molecular weight. B and D) ASM. C and E) P95.

of the matrix by preparative electrophoresis and to purify the 95 kDa protein. When tested again on a minigel in denaturing conditions, the purified product, provisionally called P95, appears like a single band.

DISCUSSION

The electrophoresis results show the presence of many components in a wide range of molecular weight, in the nacre ASM. In regard to dye patterns, the three high molecular weight products are acidic, densely glycosylated, and bind Ca^{2+} *in vitro*. The biochemical characterization of these proteins is in progress, in particular, amino acid analysis, N-terminal sequencing, and glycosylation studies. In parallel, because ASM strongly interacts with CaCO_3 crystal *in vitro*, the purified products will be tested individually, to estimate the relative contribution of each of them in the modulation of crystal growth.

Former studies showed the existence of glycoproteins in the nacreous layer of numerous mollusks (Keith *et al.*, 1993, Marxen and Becker, 1997, Sarashina and Endo, 1998, Bédouet *et al.*, 2001, Yin *et al.*, 2005). One can suppose that the contribution of glycans in molluscan shell formation is still widely underestimated. In our future work, we plan to investigate the role of glycosyl moieties in the glycoprotein/crystal interactions (Albeck *et al.*, 1996).

The production of a polyclonal antibody raised against the purified 95 kDa protein of the nacreous ASM is in progress. This will constitute a useful tool for detecting the protein within the shell layers and within the calcifying epithelium. This antibody will also be used for immuno-screening of a cDNA

expression library (Marin *et al.*, 2003) constructed from mantle tissues. The new DNA sequences obtained will be compared to those found in pteriomorphid bivalves, for evolutionary purposes.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work is supported by an ACI (Action Concertée Incitative, JC 3049) awarded by the French "Ministère délégué à la Recherche et aux Nouvelles Technologies" to F. Marin on the scientific theme "the origin of animal calcification". B. Marie is recipient from a PhD fellowship of the "Ministère délégué à la Recherche et aux Nouvelles Technologies". Additional supports are provided by the "Conseil Régional de Bourgogne".

REFERENCES

- ALBECK, S., AIZENBERG, L., ADDADI, L., WEINER, S. (1993). Interactions of various skeletal intracrystalline components with calcite crystals. *Journal of the American Chemical Society* 115: 11691-11697.
- ALBECK S., WEINER S., ADDADI L. (1996). Polysaccharides of intracrystalline glycoproteins modulate calcite crystal growth. *Chem. Eur. J.* 2 (3): 278-284.
- BÉDOUET L., SCHULLER M., MARIN F., MILET C., LOPEZ E., GIRAUD M. (2001). Soluble matrix of the nacre of the giant oyster *Pinctada maxima* and the abalone *Haliotis tuberculata*: extraction and partial analysis of nacre proteins. *Comp. Biochem. Physiol. B* 128: 389-400.
- CHECA A. (2000). A new model for periostracum and shell formation in Unionidae (Bivalvia, Mollusca). *Tissues Cell* 32 (5): 405-416.
- CHECA A., RODRIGUEZ-NAVARRO A. (2000). Geometrical and crystallographic constraints determine the self-organization of shell microstructures in Unionidae (Bivalvia, Mollusca). *Proc. R. Soc. Lond. B* 268: 771-778.
- KEITH J., STOCKWELL S., BALL D., REMILLARD K., KAPLAN D., THANNHAUSER T., SHERWOOD R. (1993). Comparative analysis of macromolecules in mollusc shells. *Comp. Biochem. Physiol. B* 105 (3-4): 487-496.
- LOPES-LIMA M., RIBEIRO I., PINTO RA, MACHADO J. (2005). Isolation, purification and characterization of glycosaminoglycans in the fluids of the mollusc *Anodonta cygnea*. *Comp Biochem Physiol A* 141(3): 319-26.
- MARIN, F., PEREIRA, L., WESTBROEK, P. (2001). Large-scale fractionation of molluscan shell matrix. *Prot. Expres. Purif.* 23: 175-179.
- MARIN F., DE GROOT L., WESTBROEK P. (2003). Screening molluscan cDNA expression libraries with anti-shell matrix antibodies. *Prot. Expres. Purif.* 30: 175-179.
- MARIN F., AMONS R., GUICHARD N., STIGTER M., HECKER A., LUQUET G., LAYROLLE P., ALCARAZ G., RIONDET C., WESTBROEK P., (2005). Caspartine and Calprismin, two proteins of the

Marie et al.

- shell calcitic prisms of the mediterranean mussel *Pinna nobilis*. J. Biol. Chem. 280 (40): 33895-908.
- MARKEN J., BECKER W. (1997). The shell matrix of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. Comp. Biochem. Physiol. B 118 (1): 23-33.
- MOURA G., VILARINHO L., SANTOS AC., MACHADO J. (2000). Organic compounds in the extrapallial fluid and haemolymph of *Anodonta cygnea* (L.) with emphasis on the seasonal biomineralization process. Comp Biochem Physiol B 125(3): 293-306.
- SARASHENA I., ENDO K. (1998). Primary structure of a soluble matrix protein of scallop shell : Implication for calcium carbonate biomineralization. American Mineralogist 83: 1510-1515.
- YIN Y., HUANG J., PAINE M., REINHOLD V., CHASTEEN D. (2005). Structural characterization of the major extrapallial fluid protein of the mollusc *Mytilus edulis* : implications for function. Biochemistry 44: 10720-10731.
- WEINER S. (1986). Organisation of extracellularly mineralized tissues: a comparative study of biological crystal growth. CRC Crit. Rev. Biochem. 20 (4): 365-408.
- WEINER, S., ADDADI, L. (1997). Design strategies in mineralized biological materials. J. Mater. Chem. 7 (5): 689-702.

3 - The shell matrix of the Unionoid freshwater mussel *Unio pictorum* : Acidic polysaccharides of matrix glycoproteins involves in mineralization of nacre. *FEBS J.* (2007), 2933-2945.

Résumé

Chez les mollusques, les processus de biominéralisation de la coquille sont contrôlés par un cocktail de macromolécules extracellulaires, qui sont sécrétées par le manteau calcifiant. Malgré de nombreuses études, ces composés sont essentiellement connus chez les bivalves à partir de l'étude de quelques espèces appartenant à l'ordre des ptériomorphes. Dans le cas présent, nous avons étudié les propriétés biochimiques de la coquille aragonitique du bivalve d'eau douce *Unio pictorum* (Paleoheterodonta, Unionoida). L'analyse de la composition en acides aminés a révélé la présence d'une quantité importante de résidus Gly, Asx et Ala dans la matrice acido-soluble, alors que la matrice acido-insoluble est majoritairement composée de résidus Ala et Gly. L'analyse de la composition en monosaccharides a montré que la matrice insoluble était constituée en grande partie de glucosamine, le monomère précurseur de la chitine. De plus, nous avons observé qu'une grande quantité de sucres de la matrice soluble étaient sulfatés. L'analyse électrophorétique de la matrice acido-soluble par SDS-PAGE en conditions dénaturantes a révélé la présence de composés macromoléculaires de masses moléculaires discrètes. Les colorations de ces composés au Stains-All, au bleu Alcian, au PAS, ainsi que l'autoradiographie avec le ^{45}Ca a permis d'observer trois composés majoritaires: trois glycoprotéines sulfatées, poly-anioniques, capables de lier les ions calcium en solution et de masses moléculaires apparentes 95, 50 et 29 kDa, respectivement. Les analyses par électrophorèse à deux dimensions ont montré que les trois bandes, provisoirement appelées P95, P50 et P29, étaient composées de plusieurs isoformes qui présentent majoritairement des points isoélectriques acides. La déglycosylation chimique de cette matrice à l'acide trifluorométhane sulfonique a induit une diminution importante de la masse moléculaire de ces trois composés majoritaires, mais a également modifié leur point isoélectrique respectif. Ce traitement a également provoqué la modification de la forme des cristaux de CaCO_3 formés *in vitro* en présence de matrice soluble, et la perte de la capacité à lier les ions calcium de deux de ces protéines majoritaires (P95 et P50). Nos données démontrent que les modifications post-traductionnelles - comme la présence de motifs saccharidiques - peuvent jouer un rôle important dans les processus de calcification de la coquille des mollusques.

The shell matrix of the freshwater mussel *Unio pictorum* (Paleoheterodonta, Unionoida)

Involvement of acidic polysaccharides from glycoproteins in nacre mineralization

Benjamin Marie¹, Gilles Luquet¹, Jean-Paul Pais De Barros², Nathalie Guichard¹, Sylvain Morel³, Gérard Alcaraz³, Loïc Bollache¹ and Frédéric Marin¹

¹ UMR CNRS 5561, Biogéosciences, Université de Bourgogne, Dijon, France

² U 496 INSERM, Métabolisme des lipoprotéines humaines et interactions vasculaires, Université de Bourgogne, Dijon, France

³ UMR INRA 692, Biochimie des interactions cellulaires, ENESAD, Dijon, France

Keywords

biomineralization; calcium-binding protein; glycoprotein; matrix macromolecules; mollusc shell nacre

Correspondence

B. Marie, G. Luquet, or F. Marin, UMR 5561 CNRS, Biogéosciences, Université de Bourgogne, 6 boulevard Gabriel, F-21000, France

Fax: +33 3 80 39 63 87

Tel: +33 3 80 39 63 72

E-mail: benjamin.marie@u-bourgogne.fr,

gilles.luquet@u-bourgogne.fr,

frederic.marin@u-bourgogne.fr

(Received 27 December 2006, revised 13 March 2007, accepted 10 April 2007)

doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05825.x

Among molluscs, the shell biomineralization process is controlled by a set of extracellular macromolecular components secreted by the calcifying mantle. In spite of several studies, these components are mainly known in bivalves from only few members of pteriomorph groups. In the present case, we investigated the biochemical properties of the aragonitic shell of the freshwater bivalve *Unio pictorum* (Paleoheterodonta, Unionoida). Analysis of the amino acid composition reveals a high amount of glycine, aspartate and alanine in the acid-soluble extract, whereas the acid-insoluble one is rich in alanine and glycine. Monosaccharidic analysis indicates that the insoluble matrix comprises a high amount of glucosamine. Furthermore, a high ratio of the carbohydrates of the soluble matrix is sulfated. Electrophoretic analysis of the acid-soluble matrix revealed discrete bands. Stains-All, Alcian Blue, periodic acid/Schiff and autoradiography with ⁴⁵Ca after electrophoretic separation revealed three major polyanionic calcium-binding glycoproteins, which exhibit an apparent molecular mass of 95, 50 and 29 kDa, respectively. Two-dimensional gel electrophoresis shows that these bands, provisionally named P95, P50 and P29, are composed of numerous isoforms, the majority of which have acidic isoelectric points. Chemical deglycosylation of the matrix with trifluoromethanesulfonic acid induces a drastic shift of both the apparent molecular mass and the isoelectric point of these matrix components. This treatment induces also a modification of the shape of CaCO₃ crystals grown *in vitro* and a loss of the calcium-binding ability of two of the main matrix proteins (P95 and P50). Our findings strongly suggest that post-translational modifications display important functions in mollusc shell calcification.

Among molluscs, the shell biomineralization is a matrix-mediated process, performed extracellularly. This matrix is a complex mixture of proteins, glycoproteins, polysaccharides and lipids, which are secreted by the mantle calcifying epithelium, together with the

mineral precursors [1]. All these components are released in the extrapallial space, where they are supposed to self-assemble in an orderly manner. The matrix may have several functions: it organizes spatially a 3D framework, concentrates locally mineral ions above

Abbreviations

AIM, acid-insoluble matrix; ASM, acid-soluble matrix; BCA, bicinchoninic acid; CBB, Coomassie Brilliant Blue; DMB, 1,9-dimethylmethylene blue; IEF, isoelectric focusing; IPG, immobilized pH gradient; PAS, periodic acid/Schiff; TFMS, trifluoromethanesulfonic acid.

the supersaturation threshold, analyzes mineral precipitation, nucleates crystals, determines the polymorph of crystal lattice scale, controls the crystal's shape by stereo-specific adsorptions and, finally, initiates crystal growth [3]. In addition, the matrix is suspected to be involved in cell signaling with the extracytoplasmatic [3].

During the last decade, several macromolecules have been characterized from the mollusk shell [4]. One drawback of these previous studies on matrix is that they focused mainly on protein components. To date, there are limited data available dealing with other macromolecular components (i.e. sugars and lipids) [5,6]. Another point worthy of note is the scarcity of tested biological models. For example, in bivalves, most of the findings were obtained from oyster species only, all belonging to the pectinophorid subfamily. In particular, due to economic purposes, the pearl oyster *Pinctada* sp. constitutes the most common model for studying the formation of mother-of-pearl.

For many reasons, adductor-odontoblasts represent an interesting model. This small subshell, which comprises the endo- and rhiponodae, a traditionally considered homoeo-ataxiomorphic and the modern heterodont bivalves [7]. Most of them are freshwater species, which are observed worldwide. Until now, they have been often used in environmental pollution studies, notably as metal accumulation indicators [8,9]. If microscopic observations have been performed describing the structure of the shell of some ammonite bivalves [10,11], very little is known about the organic components of the shell, especially at the molecular level [6,12–14].

Like many pectinophorid pectinophorid bivalves (including *Mytilus* and *Pectinella*), paleoheterodont bivalves exhibit a rather 'primitive' shell texture, comprising an outer prismatic shell layer (not always present among some species) and an inner nacreous (i.e. the typical 'brick wall' nature). Unlike most pectinophorid bivalves (but like some gastropods and cephalopods), the prismatic shell layer of paleoheterodonts is entirely argentine [15]. Moreover, the shell hinge of paleoheterodonts is rather 'modern' and similar to that of heterodont bivalves. Thus, paleoheterodont molluscs represent a case of complex 'mosaic' evolution because they exhibit both primitive and derived characters [7].

One key question is whether the macromolecules that constitute the shell organic matrix are similar to those found in the argentine layers of pectinophorid bivalves. In this paper, we present the first mechanistic characterization of the shell matrix of the freshwater ammonite bivalves *Unio pictorum*. We focus our attention on the nacreous layer, notably on its

structural organization, and underline the importance of the role of glycosyl moiety in the nacre formation process.

Results

Analysis of shell matrices on SDS/PAGE

As shown in Fig. 1A–C, the shell of *U. pictorum* is composed of two mineralized layers: a thin columnar prismatic layer (Fig. 1B), representing less than 10% of the total shell thickness, and a thick nacreous layer made of flat tablets (Fig. 1C). The subsequent work was performed on the nacre layer.

After desolubilization, the amounts of nucleic acid and ash's matrix were quantified: the ash's acid nucleic matrix (ASM) represents 0.04% w/w, and the ash's acid nucleic matrix (ATM), 0.5% w/w of the shell powder. These results are consistent with previous findings on the nacreous layer of *Pincta margaritifera* [16]. ATM is insoluble in most of the chaotropic agents. For subsequent electrophoretic analyses, we could only easily dissolve it in 8 M urea.

Monodimensional electrophoresis of the ASM and of the urea-soluble ATM shows few discrete bands near

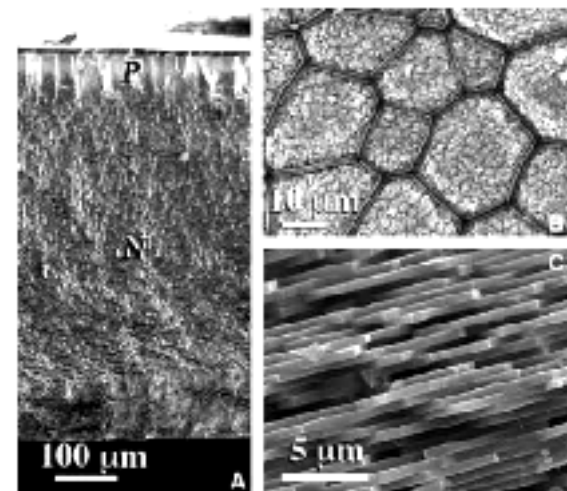


Fig. 1. Scanning electron microscopy micrographs showing the structure of the shell of *U. pictorum*. (A) View of the complete shell (lower in the horizontal plane). (B) prismatic layer. (C) high-magnification view of the prismatic layer, composed of a single layer of the shell. The nacreous layer of *U. pictorum* is composed of packed polygonal crystals of aragonite. The nacreous layer is composed of two distinct mineralized layers: the inner nacreous layer (lower in the vertical plane) is made of columnar aragonite crystals, and the outer nacreous layer is made of

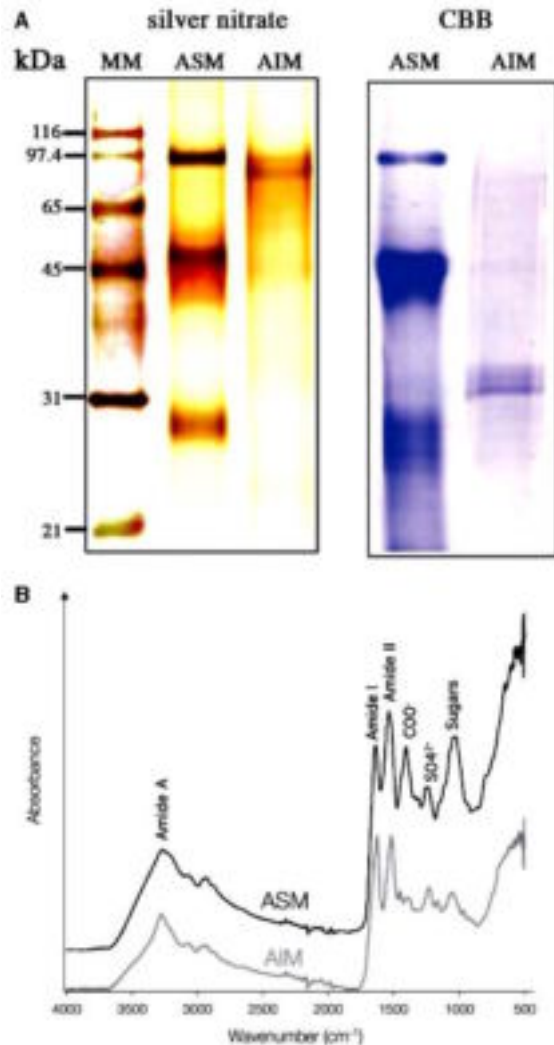


Fig. 2. Macromolecular and functional composition of the organic matrix of *U. pictorum*. (A) Electrophoretic analysis of organic fractions obtained by decalcification of *U. pictorum* nacreous layers with 5% acetic acid. 12% SDS/PAGE of the ASM and the AIM. The AIM was suspended in 8 M urea (80 °C, 2 h) before electrophoresis. MM, molecular mass markers. (B) Infrared spectra of the ASM and the AIM.

bands, in addition to a diffuse pattern made of non-discrete components (Fig. 2A). The ASM pattern exhibits three main bands at 95, 50 and 29 kDa with both silver nitrate and Coomassie Brilliant Blue (CBB). The AIM appears predominantly as a smear, with few discrete thin bands, around 90 kDa, which are revealed only with silver nitrate staining, and around 35 kDa, the latter being stained only with CBB.

Fourier transform IR analysis of the ASM and AIM

The IR absorption spectra of the ASM and of the AIM are shown in Fig. 2B. In both extracts, the thick band around 3270 cm⁻¹ is attributed to the amide A group (N-H bound) and two strong IR bands near 1650 and 1540 cm⁻¹ were attributed to the amide I (C=O bound) and the amide II (C-N bound) groups, respectively. This is in agreement with the findings of Marxen and Becker [5] for the organic matrix of *Bio-mphalaria* shell. Interestingly, a strong carboxylate absorption band at 1420 cm⁻¹ and an important carbohydrate band at 1060 cm⁻¹ are observed with the ASM extract. The distinct band at 1200–1250 cm⁻¹ is mainly due to the sulfate groups, strongly suggesting that polysaccharides are sulfated [17].

Amino acid composition of the ASM and AIM

The total amounts of amino acids represent 67 and 52% w/w of ASM and AIM, respectively. Table 1A shows the composition in amino acids (in mol%) of the soluble and the insoluble matrices. Due to the conversion of amidated amino acids (Asn, Gln) during hydrolysis, one should note that the Asx and Glx residues represent Asn + Asp and Gln + Glu, respectively. In the ASM extract, Gly, Asx and Ala represent prominent amino acids, followed by Glx, Ser and Pro. The three first constitute 40% of the total amino acid composition, and the eight amino acids together (because Asx and Glx represent two amino acids, respectively), almost two-thirds of that composition. The ASM matrix does not seem particularly acidic as regard to Asp and Glu percentage (22%). On the other hand, the composition of the AIM is dominated by Ala and Gly residues, which, together, represent 49% of the total composition.

Monosaccharide composition of the ASM and AIM

The total amounts of neutral and amino sugars obtained after trifluoroacetic acid hydrolysis represent, in each matrix, 3.1 and 2.8% w/w of ASM and AIM, respectively (Table 1B). However, in the case of the AIM, the standard sugar extraction procedure that we used probably does not release the totality of the monosaccharides. Even after the standard hydrolysis with 2 M trifluoroacetic acid, we observed an insoluble residue that may still contain a high amount of carbohydrates. Thus, it is likely that the percentages are underestimated. Furthermore, a few unidentified peaks

[illegible][illegible]

were detected, but these could not be attributed to structural non-homogeneity. For both extracts, low-molecular monosaccharides constitute the main part of the sugar moiety: galactosamine and glucose, then galactose and lactose. The sum of these four sugars represents 91% and 93% of the total amount

of neutral and amino sugars investigated for ASM and AIM, respectively. AIM contains two-fold more glucosamine than ASM (55% and 30%, respectively). The two extracts contain only traces of fucose, mannose and xylose. Ribose, arabinose, galactosamine and glutamic acids were not detected in both extracts. Sialic acids were observed to be present in very small amounts in ASM and AIM. Neu5Ac was detected as traces, whereas Neu5Gc was deficient in both fractions.

The adalated sugar content of ASM and ACM was measured by spectrophotometry. High arabinose and adalated sugars were quantified in the ASM, representing 21% of the total sugar content. This corroborates previous findings on molasses shed sugar analysis (5,18).

ASM polysaccharide staining and ASM calcium-binding ability on gels

Figure 5 shows the different staining of the ASM on gel, in addition to the autoradiography after ^{45}Ca incorporation. The three main proteins, provisionally called P95, P96 and P99, stain with the nonspecific staining, silver nitrate and CBB. In addition, they stain with periodic acid-Schiff (PAS). Alcian Blue and Stains-AF (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) does. The PAS reagent reacts directly with aldehyde groups on peripheral sugar and sialic acids with a specific colour (red). Furthermore, the Alcian Blue staining procedure, which was used in this study (pH 1), is characteristic of the very acidic sulfated sugars [19]. The results show that P95, P96 and P99 are glycosylated and that they bear sulfate groups (Fig. 7). The specific metachromatic blue colour observed for these three bands with the carboxyrine dye is characteristic of potential calcium binding proteins [20]. The putative calcium binding ability of the three main proteins was confirmed by the ^{45}Ca overlay test. In comparison to the calcium binding activity of the carboxyrine-treated control (not shown), the signal obtained from the three glycoproteins is relatively weak under denaturing conditions, but considerably higher than the background signal.

In vitro inhibition of calcium carbonate precipitation

Figure 5 shows the result of the titration test. In the very initial part of the reaction, when CaCl_2 is added to the NaHCO_3 solution, the pH decreases instantaneously from 8.0 to 7.0 before rising again to 8.95 in approximately 30 s. In the blank experiment two

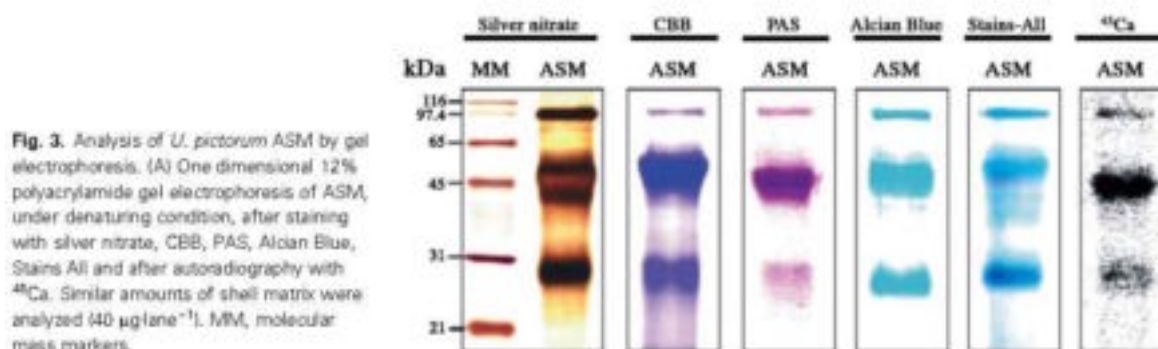


Fig. 3. Analysis of *U. pictorum* ASM by gel electrophoresis. (A) One dimensional 12% polyacrylamide gel electrophoresis of ASM, under denaturing condition, after staining with silver nitrate, CBB, PAS, Alcian Blue, Stains All and after autoradiography with ^{45}Ca . Similar amounts of shell matrix were analyzed ($40 \mu\text{g lane}^{-1}$). MM, molecular mass markers.

added matrix) the pH decreases without any time lag (approximately 60 s), corresponding to the rapid precipitation of calcium carbonate (Fig. 4). When ASM was present in the solution, we observed a delay of CaCO_3 precipitation. The effect of the matrix was efficient from $10 \mu\text{g}$ and the delay observed was dose-dependent when 25 or $50 \mu\text{g}$ of ASM were added. Above $50 \mu\text{g}$, the inhibition was total. We used poly L-aspartic acid ($10 \mu\text{g}$) as a positive control of inhibition. The result obtained with the matrix of the *U. pictorum* shell is consistent with that obtained from bivalve nacre extracts [21].

ASM deglycosylation studies

We performed a chemical deglycosylation rather than an enzymatic one. In our hands, the enzymatic deglycosylation was not efficient (data not shown). We assumed that this was due to the lack of accessibility of enzymatic cleavage sites. As recommended by Edge *et al.* [22], the chemical deglycosylation was performed

at 0°C , under a nitrogen atmosphere, to preclude peptide bond hydrolysis but allow the removal of most of the sugars. The trifluoromethanesulfonic acid (TFMS) deglycosylation produced a drastic effect on the ASM (Fig. 5). This is particularly visible when the samples were tested on gel (lanes 2-3). We observed a shift of the three prominent proteins, towards a lower molecular mass: deglycosylated P95 (deg-P95) migrates at 70 kDa , deglycosylated P50 (deg-P50) at 38 kDa , and

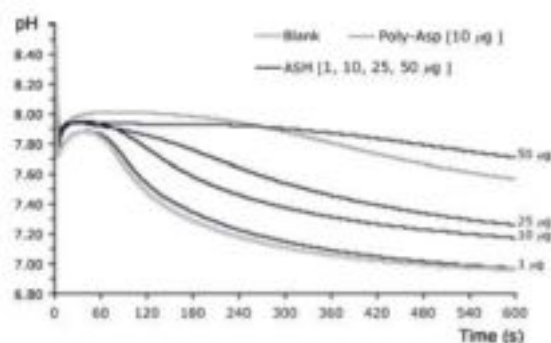


Fig. 4. *In vitro* inhibition of precipitation of CaCO_3 by ASM. The pH of the solution was recorded as a function of time. The graph shows that ASM starts to be effective at $10 \mu\text{g}$. The delay observed is dose dependent.

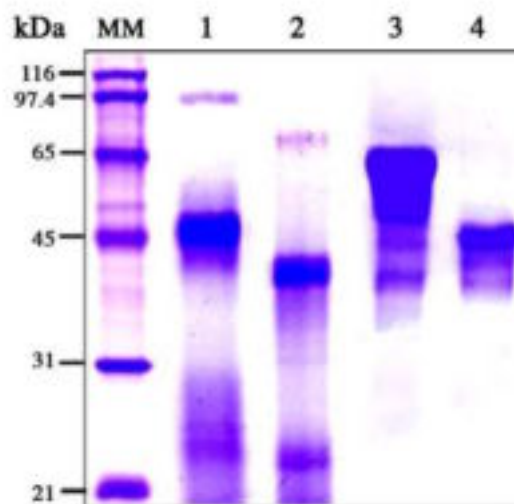


Fig. 5. Chemical deglycosylation study of *U. pictorum* ASM with TFMS at 0°C . Analysis of ASM and fetuin deglycosylation on a CBB stained 12% acrylamide gel. Protein concentrations were determined with the BCA method, in order to adjust the concentration and to load the same amount of proteins in treated and non treated samples with TFMS; $40 \mu\text{g}$ of ASM or deg ASM proteins were loaded. We estimate that 25-30% by weight of *U. pictorum* ASM is composed of carbohydrates which are removed with TFMS. Lane 1, molecular mass markers; lane 2, nontreated ASM; lane 3, deg ASM; lane 4, nontreated fetuin ($5 \mu\text{g}$); lane 5, deg fetuin ($5 \mu\text{g}$).

deglycosylated P29 (deg-P29) at 23 kDa. This corresponds to a 32%, 24% and 24% loss of apparent molecular mass, respectively. We assume that these shifts result from optimal sugar removal, and not peptide bond hydrolysis, because our positive control with fetuin migrates as a discrete band at the expected molecular mass. The shifts suggest that the carbohydrate content of the ASM is higher than that measured by the monosaccharide analysis. The reason of this discrepancy is not yet explained, but might be related to the ability of the standard trifluoroacetic acid hydrolysis to release monosaccharides, without damaging them.

Figure 6 shows the different profiles observed for the ASM before and after deglycosylation. For

accurate comparison, we took care to load the gel lanes with the same amounts of ASM. With the silver stained gel (Fig. 6A, left), we observed an attenuation of the staining after ASM deglycosylation. With PAS staining, the decrease of the signal is almost complete (Fig. 6A, center). The faint PAS-positive staining of the three major deglycosylated bands may be explained by the fact that monosaccharides, which are directly bound to the peptide core (*N*-acetylglucosamine, *N*-acetylgalactosamine on threonine and arginine), are not cleaved by TFMS [23]. Interestingly, we also observed a complete loss of staining with Alcian Blue (Fig. 6A, right), as well as a colour change with the Stains-All dye (Fig. 6B, left). In particular, the deg-P95 and the deg-P50 proteins stained red after deglycosylation, whereas the deg-P29 is still stained blue. Furthermore, the overlay test with ^{45}Ca (Fig. 6B, right) shows a dramatic loss of signal for deg-P95 and deg-P50, but a strong signal at low molecular mass. Taken together, these results demonstrate that the calcium-binding ability is carried out by the glycosyl moieties, for P95 and P50, and by the peptide core, in the case of P29.

ASM analysis on 2D gel electrophoresis

Two-dimensional gel electrophoresis analysis of the ASM, before and after deglycosylation, revealed discrete spots in both extracts (Fig. 7). In the native ASM (Fig. 7A), the three prominent bands are composed of numerous isoforms exhibiting various isoelectric points (pI). P95 comprises 6–7 isoforms, which are focused at acidic pI values in the range 3.5–4.5. On the other hand, P50 appears to be composed of two distinct proteins of neighbouring molecular mass, which migrate in two clusters, one in the pI range 5–6, and the other one in the pI range 6–7. P29 is not homogeneous, but is composed of a single acidic diffuse spot (with a pI around 5) and a succession of spots, representing four evenly spaced isoforms in the pI range 6.5–7.5.

The deglycosylation has a remarkable effect on the respective positions of the different spots in both dimensions (Fig. 7B): in particular, deg-P95 is localized as a single spot around pI 7, which means a pI shift of more than three pH units. This result suggests that P95 spots observed are made with the same amino acid core bearing various glycosylation patterns. The pI value of deg-P50 gains two pH units in comparison to P50, and deg-P50 migrates as one cluster of two bands of neighbouring molecular mass. For the two populations of spots that constitute the deg-P29, a shift

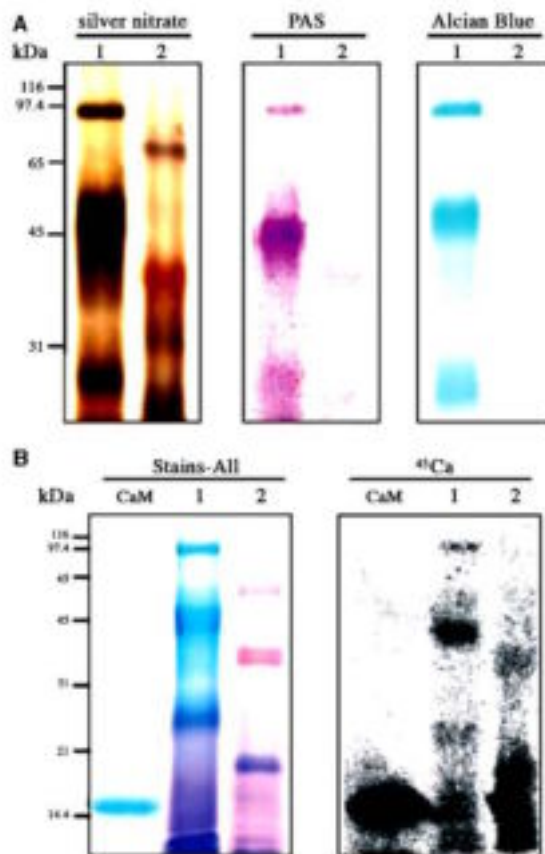


Fig. 6. Characterization of carbohydrate residues by chemical deglycosylation of *U. pictorum* ASM followed by staining with poly anionic dyes and calcium binding test, on SDS/PAGE. (A) 10% SDS/PAGE stained with silver nitrate, PAS and Alcian Blue. MM, molecular mass markers. Lane 1, ASM; lane 2, deg ASM. (B) 12% SDS/PAGE gels: staining with Stains All (right) and autoradiography with ^{45}Ca (left). CaM, calmodulin (5 μg); Lane 1, ASM; lane 2, deg ASM. Same amounts of matrix (40 μg) were loaded in each well.

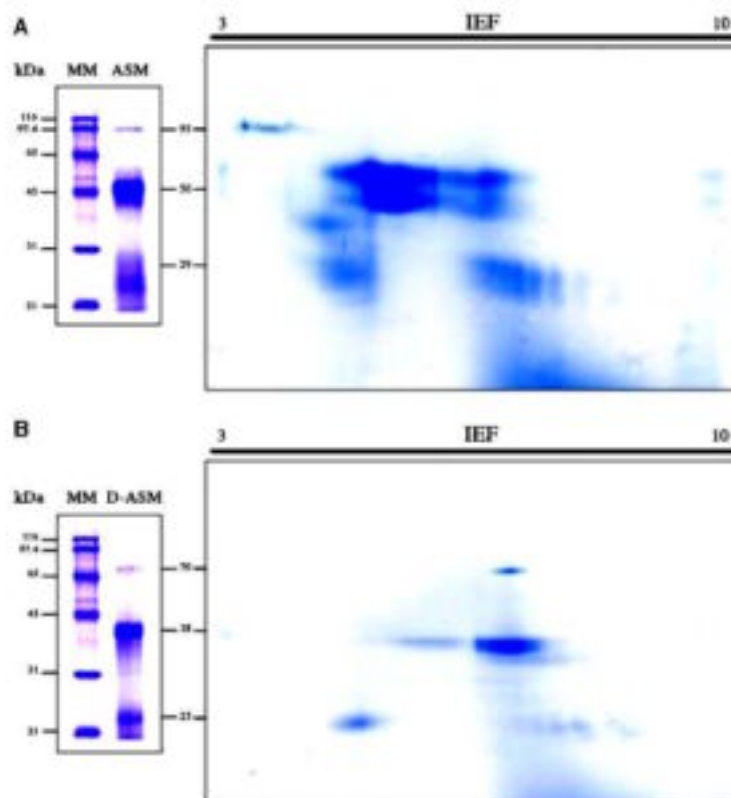


Fig. 7. Two dimensional electrophoresis analysis of the effects of the TFMS deglycosylation on *U. pictorum* ASM components (CBB staining). (A) Native ASM. (B) Deg ASM. On the left, mono dimensional gels with molecular markers (MM) and native (A, lane ASM) or deglycosylated ASM (B, lane D-ASM), showing the correspondence between the protein bands and the spots. Forty micrograms of matrices were loaded on gels. Approximate pI values are indicated at the top of the 2D gels.

towards basic pI can be observed, although this is far less apparent than for P95 and P50. Our data demonstrate that the sugar moieties have an important effect on the electrophoretic behaviour of the ASM. Clearly, the sugar moieties 'acidify' the proteinaceous components of the ASM.

Growth of calcite crystals in the presence of native and chemically deglycosylated ASM

The results of the crystal growth experiment are shown in Fig. 8. When no matrix is added to the solution, calcium carbonate crystals, obtained *de novo* by the slow diffusion method, form rhombohedra, typical of calcite (Fig. 8A). The crystals present smooth surfaces and sharp edges. The length of their edge is approximately 50 μm . The effect of ASM starts to become visible at concentrations above 0.5–1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, where some polycrystalline aggregates are formed. They exhibit microsteps and the development of new faces (Fig. 8B). At higher concentrations (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Fig. 8C), the size of the crystals produced increases (typically 70–100 μm) and they are all polycrystalline aggregates. At 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, the size of the polycrystal-

line aggregates decreases (around 20 μm , Fig. 8D), which suggests that the ASM starts to inhibit crystal growth.

The results obtained from the deglycosylated ASM (deg-ASM) are shown in Fig. 8E–H. We observed important differences between the two extracts: at low concentrations of deg-ASM (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Fig. 8E), crystals are slightly modified. Higher concentrations are required before observing a significant effect (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Fig. 8F). At high concentrations (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Fig. 8G,H) and contrary to the native ASM, no inhibiting effect is observed. This suggests that the sugar moieties are involved in the inhibition process. One specific effect observed with deg-ASM is the formation of truncated corners (Fig. 8F–H) without any microstep. In the present case, these patterns are never observed with undeglycosylated ASM.

Discussion

In the present paper, we have characterized biochemically the calcifying matrix associated with the nacreous shell layer of the paleoheterodont freshwater bivalve *U. pictorum*. As regards the decalcification method

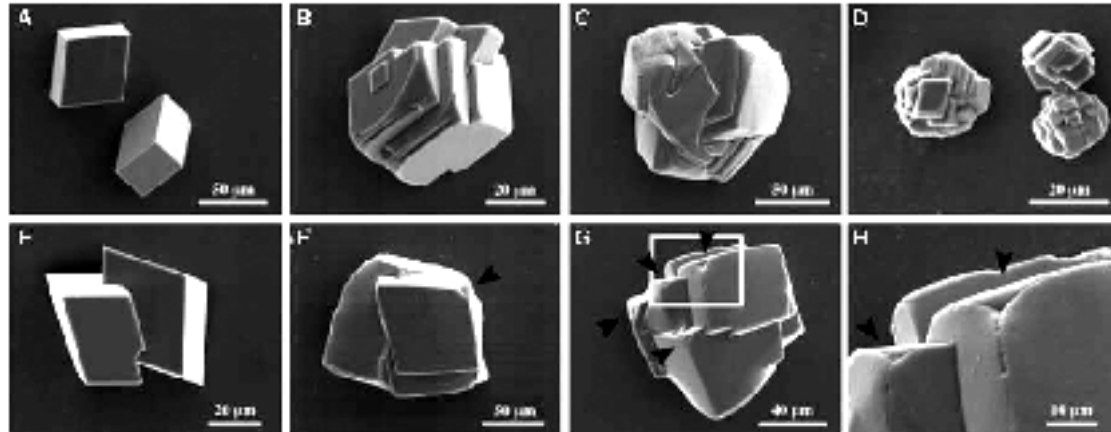


Fig. 8. Scanning electron micrographs (A-H) of shell matrix. (A) 20 µm, (B) 20 µm, (C) 20 µm, (D) 20 µm, (E) 20 µm, (F) 20 µm, (G) 20 µm, (H) 20 µm, (I) 20 µm, (J) 20 µm, (K) 20 µm, (L) 20 µm, (M) 20 µm, (N) 20 µm, (O) 20 µm, (P) 20 µm, (Q) 20 µm, (R) 20 µm, (S) 20 µm, (T) 20 µm, (U) 20 µm, (V) 20 µm, (W) 20 µm, (X) 20 µm, (Y) 20 µm, (Z) 20 µm, (AA) 20 µm, (AB) 20 µm, (AC) 20 µm, (AD) 20 µm, (AE) 20 µm, (AF) 20 µm, (AG) 20 µm, (AH) 20 µm, (AI) 20 µm, (AJ) 20 µm, (AK) 20 µm, (AL) 20 µm, (AM) 20 µm, (AN) 20 µm, (AO) 20 µm, (AP) 20 µm, (AQ) 20 µm, (AR) 20 µm, (AS) 20 µm, (AT) 20 µm, (AU) 20 µm, (AV) 20 µm, (AW) 20 µm, (AX) 20 µm, (AY) 20 µm, (AZ) 20 µm, (BA) 20 µm, (BB) 20 µm, (BC) 20 µm, (BD) 20 µm, (BE) 20 µm, (BF) 20 µm, (BG) 20 µm, (BH) 20 µm, (BI) 20 µm, (BJ) 20 µm, (BK) 20 µm, (BL) 20 µm, (BM) 20 µm, (BN) 20 µm, (BO) 20 µm, (BP) 20 µm, (BQ) 20 µm, (BR) 20 µm, (BS) 20 µm, (BT) 20 µm, (BU) 20 µm, (BV) 20 µm, (BW) 20 µm, (BX) 20 µm, (BY) 20 µm, (BZ) 20 µm, (CA) 20 µm, (CB) 20 µm, (CC) 20 µm, (CD) 20 µm, (CE) 20 µm, (CF) 20 µm, (CG) 20 µm, (CH) 20 µm, (CI) 20 µm, (CJ) 20 µm, (CK) 20 µm, (CL) 20 µm, (CM) 20 µm, (CN) 20 µm, (CO) 20 µm, (CP) 20 µm, (CQ) 20 µm, (CR) 20 µm, (CS) 20 µm, (CT) 20 µm, (CU) 20 µm, (CV) 20 µm, (CW) 20 µm, (CX) 20 µm, (CY) 20 µm, (CZ) 20 µm, (DA) 20 µm, (DB) 20 µm, (DC) 20 µm, (DD) 20 µm, (DE) 20 µm, (DF) 20 µm, (DG) 20 µm, (DH) 20 µm, (DI) 20 µm, (DJ) 20 µm, (DK) 20 µm, (DL) 20 µm, (DM) 20 µm, (DN) 20 µm, (DO) 20 µm, (DP) 20 µm, (DQ) 20 µm, (DR) 20 µm, (DS) 20 µm, (DT) 20 µm, (DU) 20 µm, (DV) 20 µm, (DW) 20 µm, (DX) 20 µm, (DY) 20 µm, (DZ) 20 µm, (EA) 20 µm, (EB) 20 µm, (EC) 20 µm, (ED) 20 µm, (EE) 20 µm, (EF) 20 µm, (EG) 20 µm, (EH) 20 µm, (EI) 20 µm, (EJ) 20 µm, (EK) 20 µm, (EL) 20 µm, (EM) 20 µm, (EN) 20 µm, (EO) 20 µm, (EP) 20 µm, (EQ) 20 µm, (ER) 20 µm, (ES) 20 µm, (ET) 20 µm, (EU) 20 µm, (EV) 20 µm, (EW) 20 µm, (EX) 20 µm, (EY) 20 µm, (EZ) 20 µm, (FA) 20 µm, (FB) 20 µm, (FC) 20 µm, (FD) 20 µm, (FE) 20 µm, (FF) 20 µm, (FG) 20 µm, (FH) 20 µm, (FI) 20 µm, (FJ) 20 µm, (FK) 20 µm, (FL) 20 µm, (FM) 20 µm, (FN) 20 µm, (FO) 20 µm, (FP) 20 µm, (FQ) 20 µm, (FR) 20 µm, (FS) 20 µm, (FT) 20 µm, (FU) 20 µm, (FV) 20 µm, (FW) 20 µm, (FX) 20 µm, (FY) 20 µm, (FZ) 20 µm, (GA) 20 µm, (GB) 20 µm, (GC) 20 µm, (GD) 20 µm, (GE) 20 µm, (GF) 20 µm, (GG) 20 µm, (GH) 20 µm, (GI) 20 µm, (GJ) 20 µm, (GK) 20 µm, (GL) 20 µm, (GM) 20 µm, (GN) 20 µm, (GO) 20 µm, (GP) 20 µm, (GQ) 20 µm, (GR) 20 µm, (GS) 20 µm, (GT) 20 µm, (GU) 20 µm, (GV) 20 µm, (GW) 20 µm, (GX) 20 µm, (GY) 20 µm, (GZ) 20 µm, (HA) 20 µm, (HB) 20 µm, (HC) 20 µm, (HD) 20 µm, (HE) 20 µm, (HF) 20 µm, (HG) 20 µm, (HH) 20 µm, (HI) 20 µm, (HJ) 20 µm, (HK) 20 µm, (HL) 20 µm, (HM) 20 µm, (HN) 20 µm, (HO) 20 µm, (HP) 20 µm, (HQ) 20 µm, (HR) 20 µm, (HS) 20 µm, (HT) 20 µm, (HU) 20 µm, (HV) 20 µm, (HW) 20 µm, (HX) 20 µm, (HY) 20 µm, (HZ) 20 µm, (IA) 20 µm, (IB) 20 µm, (IC) 20 µm, (ID) 20 µm, (IE) 20 µm, (IF) 20 µm, (IG) 20 µm, (IH) 20 µm, (II) 20 µm, (IJ) 20 µm, (IK) 20 µm, (IL) 20 µm, (IM) 20 µm, (IN) 20 µm, (IO) 20 µm, (IP) 20 µm, (IQ) 20 µm, (IR) 20 µm, (IS) 20 µm, (IT) 20 µm, (IU) 20 µm, (IV) 20 µm, (IW) 20 µm, (IX) 20 µm, (IY) 20 µm, (IZ) 20 µm, (JA) 20 µm, (JB) 20 µm, (JC) 20 µm, (JD) 20 µm, (JE) 20 µm, (JF) 20 µm, (JG) 20 µm, (JH) 20 µm, (JI) 20 µm, (JJ) 20 µm, (JK) 20 µm, (JL) 20 µm, (JM) 20 µm, (JN) 20 µm, (JO) 20 µm, (JP) 20 µm, (JQ) 20 µm, (JR) 20 µm, (JS) 20 µm, (JT) 20 µm, (JU) 20 µm, (JV) 20 µm, (JW) 20 µm, (JX) 20 µm, (JY) 20 µm, (JZ) 20 µm, (KA) 20 µm, (KB) 20 µm, (KC) 20 µm, (KD) 20 µm, (KE) 20 µm, (KF) 20 µm, (KG) 20 µm, (KH) 20 µm, (KI) 20 µm, (KJ) 20 µm, (KL) 20 µm, (KM) 20 µm, (KN) 20 µm, (KO) 20 µm, (KP) 20 µm, (KQ) 20 µm, (KR) 20 µm, (KS) 20 µm, (KT) 20 µm, (KU) 20 µm, (KV) 20 µm, (KW) 20 µm, (KX) 20 µm, (KY) 20 µm, (KZ) 20 µm, (LA) 20 µm, (LB) 20 µm, (LC) 20 µm, (LD) 20 µm, (LE) 20 µm, (LF) 20 µm, (LG) 20 µm, (LH) 20 µm, (LI) 20 µm, (LJ) 20 µm, (LK) 20 µm, (LL) 20 µm, (LM) 20 µm, (LN) 20 µm, (LO) 20 µm, (LP) 20 µm, (LQ) 20 µm, (LR) 20 µm, (LS) 20 µm, (LT) 20 µm, (LU) 20 µm, (LV) 20 µm, (LW) 20 µm, (LX) 20 µm, (LY) 20 µm, (LZ) 20 µm, (MA) 20 µm, (MB) 20 µm, (MC) 20 µm, (MD) 20 µm, (ME) 20 µm, (MF) 20 µm, (MG) 20 µm, (MH) 20 µm, (MI) 20 µm, (MJ) 20 µm, (MK) 20 µm, (ML) 20 µm, (MM) 20 µm, (MN) 20 µm, (MO) 20 µm, (MP) 20 µm, (MQ) 20 µm, (MR) 20 µm, (MS) 20 µm, (MT) 20 µm, (MU) 20 µm, (MV) 20 µm, (MW) 20 µm, (MX) 20 µm, (MY) 20 µm, (MZ) 20 µm, (NA) 20 µm, (NB) 20 µm, (NC) 20 µm, (ND) 20 µm, (NE) 20 µm, (NF) 20 µm, (NG) 20 µm, (NH) 20 µm, (NI) 20 µm, (NJ) 20 µm, (NK) 20 µm, (NL) 20 µm, (NM) 20 µm, (NN) 20 µm, (NO) 20 µm, (NP) 20 µm, (NQ) 20 µm, (NR) 20 µm, (NS) 20 µm, (NT) 20 µm, (NU) 20 µm, (NV) 20 µm, (NW) 20 µm, (NX) 20 µm, (NY) 20 µm, (NZ) 20 µm, (OA) 20 µm, (OB) 20 µm, (OC) 20 µm, (OD) 20 µm, (OE) 20 µm, (OF) 20 µm, (OG) 20 µm, (OH) 20 µm, (OI) 20 µm, (OJ) 20 µm, (OK) 20 µm, (OL) 20 µm, (OM) 20 µm, (ON) 20 µm, (OO) 20 µm, (OP) 20 µm, (OQ) 20 µm, (OR) 20 µm, (OS) 20 µm, (OT) 20 µm, (OU) 20 µm, (OV) 20 µm, (OW) 20 µm, (OX) 20 µm, (OY) 20 µm, (OZ) 20 µm, (PA) 20 µm, (PB) 20 µm, (PC) 20 µm, (PD) 20 µm, (PE) 20 µm, (PF) 20 µm, (PG) 20 µm, (PH) 20 µm, (PI) 20 µm, (PJ) 20 µm, (PK) 20 µm, (PL) 20 µm, (PM) 20 µm, (PN) 20 µm, (PO) 20 µm, (PP) 20 µm, (PQ) 20 µm, (PR) 20 µm, (PS) 20 µm, (PT) 20 µm, (PU) 20 µm, (PV) 20 µm, (PW) 20 µm, (PX) 20 µm, (PY) 20 µm, (PZ) 20 µm, (QA) 20 µm, (QB) 20 µm, (QC) 20 µm, (QD) 20 µm, (QE) 20 µm, (QF) 20 µm, (QG) 20 µm, (QH) 20 µm, (QI) 20 µm, (QJ) 20 µm, (QK) 20 µm, (QL) 20 µm, (QM) 20 µm, (QN) 20 µm, (QO) 20 µm, (QP) 20 µm, (QQ) 20 µm, (QR) 20 µm, (QS) 20 µm, (QT) 20 µm, (QU) 20 µm, (QV) 20 µm, (QW) 20 µm, (QX) 20 µm, (QY) 20 µm, (QZ) 20 µm, (RA) 20 µm, (RB) 20 µm, (RC) 20 µm, (RD) 20 µm, (RE) 20 µm, (RF) 20 µm, (RG) 20 µm, (RH) 20 µm, (RI) 20 µm, (RJ) 20 µm, (RK) 20 µm, (RL) 20 µm, (RM) 20 µm, (RN) 20 µm, (RO) 20 µm, (RP) 20 µm, (RQ) 20 µm, (RR) 20 µm, (RS) 20 µm, (RT) 20 µm, (RU) 20 µm, (RV) 20 µm, (RW) 20 µm, (RX) 20 µm, (RY) 20 µm, (RZ) 20 µm, (SA) 20 µm, (SB) 20 µm, (SC) 20 µm, (SD) 20 µm, (SE) 20 µm, (SF) 20 µm, (SG) 20 µm, (SH) 20 µm, (SI) 20 µm, (SJ) 20 µm, (SK) 20 µm, (SL) 20 µm, (SM) 20 µm, (SN) 20 µm, (SO) 20 µm, (SP) 20 µm, (SQ) 20 µm, (SR) 20 µm, (SS) 20 µm, (ST) 20 µm, (SU) 20 µm, (SV) 20 µm, (SW) 20 µm, (SX) 20 µm, (SY) 20 µm, (SZ) 20 µm, (TA) 20 µm, (TB) 20 µm, (TC) 20 µm, (TD) 20 µm, (TE) 20 µm, (TF) 20 µm, (TG) 20 µm, (TH) 20 µm, (TI) 20 µm, (TJ) 20 µm, (TK) 20 µm, (TL) 20 µm, (TM) 20 µm, (TN) 20 µm, (TO) 20 µm, (TP) 20 µm, (TQ) 20 µm, (TR) 20 µm, (TS) 20 µm, (TT) 20 µm, (TU) 20 µm, (TV) 20 µm, (TW) 20 µm, (TX) 20 µm, (TY) 20 µm, (TZ) 20 µm, (UA) 20 µm, (UB) 20 µm, (UC) 20 µm, (UD) 20 µm, (UE) 20 µm, (UF) 20 µm, (UG) 20 µm, (UH) 20 µm, (UI) 20 µm, (UJ) 20 µm, (UK) 20 µm, (UL) 20 µm, (UM) 20 µm, (UN) 20 µm, (UO) 20 µm, (UP) 20 µm, (UQ) 20 µm, (UR) 20 µm, (US) 20 µm, (UT) 20 µm, (UU) 20 µm, (UV) 20 µm, (UW) 20 µm, (UX) 20 µm, (UY) 20 µm, (UZ) 20 µm, (VA) 20 µm, (VB) 20 µm, (VC) 20 µm, (VD) 20 µm, (VE) 20 µm, (VF) 20 µm, (VG) 20 µm, (VH) 20 µm, (VI) 20 µm, (VJ) 20 µm, (VK) 20 µm, (VL) 20 µm, (VM) 20 µm, (VN) 20 µm, (VO) 20 µm, (VP) 20 µm, (VQ) 20 µm, (VR) 20 µm, (VS) 20 µm, (VT) 20 µm, (VU) 20 µm, (VV) 20 µm, (VW) 20 µm, (VX) 20 µm, (VY) 20 µm, (VZ) 20 µm, (WA) 20 µm, (WB) 20 µm, (WC) 20 µm, (WD) 20 µm, (WE) 20 µm, (WF) 20 µm, (WG) 20 µm, (WH) 20 µm, (WI) 20 µm, (WJ) 20 µm, (WK) 20 µm, (WL) 20 µm, (WM) 20 µm, (WN) 20 µm, (WO) 20 µm, (WP) 20 µm, (WQ) 20 µm, (WR) 20 µm, (WS) 20 µm, (WT) 20 µm, (WU) 20 µm, (WV) 20 µm, (WW) 20 µm, (WX) 20 µm, (WY) 20 µm, (WZ) 20 µm, (XA) 20 µm, (XB) 20 µm, (XC) 20 µm, (XD) 20 µm, (XE) 20 µm, (XF) 20 µm, (XG) 20 µm, (XH) 20 µm, (XI) 20 µm, (XJ) 20 µm, (XK) 20 µm, (XL) 20 µm, (XM) 20 µm, (XN) 20 µm, (XO) 20 µm, (XP) 20 µm, (XQ) 20 µm, (XR) 20 µm, (XS) 20 µm, (XT) 20 µm, (XU) 20 µm, (XV) 20 µm, (XW) 20 µm, (XX) 20 µm, (XY) 20 µm, (XZ) 20 µm, (YA) 20 µm, (YB) 20 µm, (YC) 20 µm, (YD) 20 µm, (YE) 20 µm, (YF) 20 µm, (YG) 20 µm, (YH) 20 µm, (YI) 20 µm, (YJ) 20 µm, (YK) 20 µm, (YL) 20 µm, (YM) 20 µm, (YN) 20 µm, (YO) 20 µm, (YP) 20 µm, (YQ) 20 µm, (YR) 20 µm, (YS) 20 µm, (YT) 20 µm, (YU) 20 µm, (YV) 20 µm, (YW) 20 µm, (YX) 20 µm, (YY) 20 µm, (YZ) 20 µm, (ZA) 20 µm, (ZB) 20 µm, (ZC) 20 µm, (ZD) 20 µm, (ZE) 20 µm, (ZF) 20 µm, (ZG) 20 µm, (ZH) 20 µm, (ZI) 20 µm, (ZJ) 20 µm, (ZK) 20 µm, (ZL) 20 µm, (ZM) 20 µm, (ZN) 20 µm, (ZO) 20 µm, (ZP) 20 µm, (ZQ) 20 µm, (ZR) 20 µm, (ZS) 20 µm, (ZT) 20 µm, (ZU) 20 µm, (ZV) 20 µm, (ZW) 20 µm, (ZX) 20 µm, (ZY) 20 µm, (ZZ) 20 µm.

used, the matrix comprises two fractions, one acetic acid-soluble and the other, acetic acid-insoluble. The amino acid compositions of both fractions are typical of soluble and insoluble matrix fractions, respectively. The ASM is fairly acidic. This finding corroborates previous data collected from the ASM as matrix fraction [24]. The contents of Asn and Glx residues are significantly lower than in matrix non-fractions [25,26]. The ATM exhibits the signature of hydrophobic protein's enrichment in Gly and Ala, which belong to the α -keto library (the group [27,28]). Interestingly, the amino acid composition of the ATM of *M. persianus* resembles that reported by Weiner et al. [29] in *Mytilus edulis* gill tissue, another calcified tissue. In particular, the same decreasing order of matrix amino acids is observed: Gly, Ala, Ser and Asn. Similar results were obtained with the insoluble matrix fractions of the valve muscle, *Mytilus edulis*, of the cephalopod, *Nautica pompilioides* [30], and of the freshwater mussel, *Anodonta cygnea* [8]. The latter being closely related to *U. pictorum*.

However, the distinction between a soluble and insoluble matrix is purely technical. Recent findings on mussel from pteromorph bivalves have suggested that the so-called 'insoluble' matrix may be secreted as an aqueous gel [1], in which each structural unit is later 'crystallized' from form for a monomeric solution or 'beads' [31], growing centrifugally from a nucleation centre, as previously suggested by Nishikawa [32]. This gel also comprises acid glycosaminoglycans, which may surround the growing acorn radicle or be oxidized to the form [33]. The gel is formed by the gel and the sol-

dile glycoproteins is itself embedded between shell layers, which display a lamellar structure [34]. We reasonably assume that this model can be extrapolated to paleoheterodont bivalves, such as *C. pictorum*. Indeed, pteromorph and paleoheterodont matrix exhibit a similar brickwork structure in cross section [11,35]. Furthermore, they present similarities at the crystallographic level [36]. Finally, our biochemical data corroborate those obtained from pteromorph matrices. First, even by considering that all Asn and Glx residues are in their aspartic form, both mussel ASMs exhibit much lower amino acid compositions (Asn + Glx = 22%) than calcified matrices [8,25–27,29,37]. Second, both exhibit a lower capacity than calcified matrices to inhibit calcium carbonate precipitation in the pH-metric and CaCO_3 precipitation interference tests [26,38,39]. Third, as regards the saccharide composition of the shell matrices of *C. pictorum*, high amounts of glucosamine are detected in both extracts. With our analytical technique involving trifluoroacetic acid hydrolysis, we cannot distinguish glucosamine from its *N*-acetylated form, which is the monomer of chitin. Chitin has been detected in the insoluble shell matrices of diverse groups of molluscs, such as pteromorph bivalves [14,27,40,41], and is proposed to be involved in the 3D structuration of the matrix [34]. In our analyses, glucose and fructose were also detected in the ATM fraction of the ASM. This strongly suggests that a large amount of the detected glucosamine originates from the actual hydrolysis of chitin by trifluoroacetic acid.

1.1.1.1. Introduction

In the present paper, we have unequivocally demonstrated that the major proteins of the ASM (P95, P50 and P29) are heavily glycosylated. The sugar moiety is mostly composed of acidic sugars, in particular sulfated ones, which are responsible for the lowering of the pI of ASM components. Similarly, the matrix of the ammonite *Ammonia sanguinea* also exhibits a weakly acidic amino acid composition, a high amount of polysaccharide and the presence of sulfated groups [12]. Previous studies have reported the occurrence of sulfated sugars in the arthropod matrix [1, 2]. More recently, Marnett and Hacker [3] observed that sulfate groups are quantitatively important in the ASM, not reported in the AIM of the shell of the freshwater gastropod, *Biomphalaria pfeifferi*. We also demonstrated that the polysaccharide moiety serves as a calcium-binding moiety, which is drastically altered after decalcification. There is a striking example among vertebrates where the acidic sialic acid moiety of a calcified tissue-associated glycoprotein exhibits a calcium-binding capacity [45]. Calcium-binding activity due to sialic acids is also shown in the collagenous skeleton matrix [44], and has been associated among mollusk shell components [2]. Although we did not measure the affinity of the matrix for calcium, we suspect that it is low, in fact in agreement with the function of the matrix, which temporarily sequesters calcium ions and releases them when required [46]. For example, we demonstrated that the sialic acid moiety of the shell glycoproteins modulates the shape of calcium crystals grown *in vivo*. In particular, the de-glycosylation of the ASM leads to the formation of mineralized corners without any arthropods. Interestingly, similar patterns were observed with an amorphous-gelatin matrix extract of the meromorph mollusk, *Velonia nigra* [7], and similar microstructures were observed with glycosylated proteins of different sources [8, 9].

One central finding of our study is that the sialic acid moieties of the shell matrix play a key role, although this role is not yet understood. Most of the studies performed on mollusks to date have focused on the matrix proteinaceous components, and only a few reports deal with the characterization of carbohydrate chains, in particular studies by Serrão [11], Greenshaw [18], Mäkelä & Backer [9] and Mäkelä et al. [10]. The first sequence of an eukaryotic covalently N-linked to the dematopontin of the snail *Biomphalaria pfeifferi* was obtained only recently [51]. Various functions have been proposed for ASM polysaccharides in CaCO₃ mineralization. Acidic moieties, especially sulfated ones, may conductate calcium ions at the vicinity of the acidic proteins, inducing crystal nucleation

1.1.1.2. The calcification of the shell matrix of freshwater mussel

[52, 53]. This was observed histochemically by Greenshaw and Rinehart [32], and confirmed recently by Mäkelä et al. [53]. Polysaccharides may also play a role in mineral surface recognition [54] and in polymorph selection [55]. They also may be involved in water or ion compartment within the hydrogel, and they may modify its viscosity as the minerals, as minerals and carbohydrates can do [21, 56]. Lastly, matrix polysaccharides may display an active role in mediating mineral-matrix interaction and cell signalling [57]. Further experiments, including primary structure determination and Lewis localization, are essential for improving our understanding of the function of these matrix glycoproteins in biomineralization.

Experimental procedures

Shell material

Fresh shells (0.5–1 cm in length) of the freshwater mussel *U. pictorum* were collected in the pond of Burgundy (Dien, France) (see text) and kept in mineral oil. *U. pictorum* exhibits a bilayered shell made of a thin prismatic outer and a thick nacreous layer. The whole shell is transparent. For direct microscopic observations, freshly fragmented shell of shells were sectioned transversally and observed in the secondary electron mode with a JEOL 5700 scanning electron microscope (JEOL, Tokyo, JPN, Crossy-sur-Seine, France) in the Laboratory of "Réactivité des Solides", Dijon.

Shell preparation and matrix extraction

The whole shells were immersed in 10% NaOH for 24 h to remove the periostracum and superficial contaminants, followed by thorough rinsing with water. This treatment also disaggregates the outer thin prismatic layer. The shells were mechanically abraded until obtaining a pure nacre layer. They were then cleaned in water and crushed. The entire extract of nacre was recovered at 4 °C in 5% acetic acid as previously described [2, 36], and we obtained an ASM and AIM. Both were freeze-dried and weighed.

ASM and AIM analysis on mono-dimensional SDS/PAGE

The separation of matrix components (both from AIM or ASM), was performed under denaturing conditions by mono-dimensional SDS/PAGE in 12.5% polyacrylamide gels (Mini Protein 6; Bio Rad, Hercules, CA, USA) according to Laemmli [58]. The protein concentration of the ASM was estimated with the bicinchoninic acid (BCA) assay (BCA-250 Protein Assay kit; Pierce, Rockford, IL, USA).

Fifty micrograms of ASM were loaded in each well. One mg of AIM was partly dissolved in 400 μ L of 0.1 M NaOH at 60 $^{\circ}$ C (2 h). Twenty μ L of the soluble AIM were loaded on gel.

The gels were stained with Coomassie Brilliant Blue G250. To check the reproducibility of the staining procedure, we performed several double fractionations from single shells or from different pools of shells.

Infrared analysis on ASM and AIM

IR spectra were recorded with dry, lyophilized samples at a 2 cm $^{-1}$ resolution with resolutions on a Perkin Elmer Transform IR spectrometer, Biorad Vector 70 (Kallal et al. 1999) equipped with a Specac Golden Gate ATR device (Specac Ltd., Orpington, UK). The wave number range of 4000–500 cm $^{-1}$.

Amino acid composition of ASM and AIM

The amino acid compositions of the two fractions were determined by the Eurochemie Company (Groningen, the Netherlands). Freeze-dried samples were hydrolyzed with 8N HCl in the gas phase for 18 h at 100 $^{\circ}$ C. The resulting hydrolysates were analyzed on an HP 1090A microbore column (Pacart, Palo Alto, CA, USA) by an automated two-step procedure in the detector with 10 μ L of 100 mM ninhydrin and N-9-L-tryptophan- α -carboxylate for secondary amino acids. Lysine residues were quantified after oxidation. Tryptophan was not detected.

Monosaccharide analysis of ASM and AIM

For quantification of neutral monosaccharides, freeze-dried samples of ASM and AIM (100 μ g) were hydrolyzed in 100 μ L 1M HCl monosaccharide standard solution. Samples were evaporated to dryness before being dissolved with 100 μ L 20 mM NaOH. The neutral and amino sugar contents of the hydrolysates were determined by high performance ion exchange HPLC using a separation database (HPX87H PAD) on a CarboPac PA10 column (Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA). Carbohydrate standards (Sigma, St. Louis, MO, USA) were injected at 10, 5 and 4 μ mol. Neutral glycosaminides were analyzed similarly to detect free monosaccharides that could have contaminated the samples during analysis. Note that this technique does not allow the quantification of sialic acids, which are destroyed during hydrolysis with trifluoroacetic acid.

Sulfate determination was performed by UTA1-7AD after a molybdate hydrolysis (100 μ M acid, 2 h at 80 $^{\circ}$ C), as described by Kohrer [60]. The solution containing the released sulfate was analyzed on a Chiral (Ceracon, 5 kDa cut-off; Viscotec, Bedford, MA, USA) denuded under vacuum. Samples were redissolved in Viscotec water (Millipore) for measurement.

Spectrophotometric determination of sulfated carbohydrates

The direct spectrophotometric (DVR) method for quantifying of free polysaccharides [61] was adapted for monosaccharide releasing at 100 $^{\circ}$ C. Chondroitin-4 sulfate was used as standard for the quantification of ASM and AIM sulfated sugars.

ASM polysaccharide staining and ASM calcium-binding ability on gels

Relative glycosylations of ASM macromolecules were studied qualitatively. In particular, sialosaccharides were investigated as staining methods by using Alcian Blue 8GX [62], at pH 1 in order to stain specifically sialosaccharides [39], and PAS staining, specific of almost all carbohydrates residues [63]. The calcium-binding ability of ASM and deg-ASM was tested with two techniques: the ethanolic uranylamine dye Stains All staining [39] and the 45 Ca overlay procedure [64].

In vitro inhibition of calcium carbonate precipitation by the ASM

ASM were covalently assigned on the surface of calcium carbonate precipitation [38]. Three ml of 0.2 M CaCl_2 were rapidly added to 5 mL of 40 mM NaHCO $_3$ containing variable amounts of protein (from 0–30 μ g) but also enzymes. The pH was constantly recorded and a constant glass electrode coupled with a pH-meter model 64-01 (Cresco Research, Spain) connected to a computer. The concentration was tested in triplicate. Blank tests were performed in absence of protein. Positive controls were performed with poly-transacetic acid (Sigma).

ASM deglycosylation studies

Chemical deglycosylation of 5 mg of ASM was performed with 1.5 ml of a mixture of TBM8/azobis (2:1, v/v) at 60 $^{\circ}$ C for 2 h, under N $_2$ atmosphere, with constant stirring according to Bérubé et al. [22]. After neutralization with 1 ml of 0.05 M glycine, the aqueous phase was extracted twice with diethyl ether and the extensively dialyzed against water in dialysis before being lyophilized. Tenin was treated similarly and used as a positive control of deglycosylation by TBM8. All the deglycosylation extracts were analyzed via two-dimensional SDS/PAGE.

ASM analysis on 2D gel electrophoresis

Following its quantification by micro BCA assay, the ASM as well as the chemically deconvoluted ASM, were fractionated by 2D electrophoresis. Isobutanol (100 μ g, 100 μ g)

carried out using a Protein ITT cell (Bio Rad). Protein 2 buffer (pH 4.0) in molecular pH gradient (IPG) strips were dehydrated essentially at 50 V (25 V/cm) with 150 μ l buffer containing 40 μ g ASM in 6 M urea, 2 M thiourea, 4% glycerol, 0.5% 2-mercaptoethanol, 0.1% ampholytes and 0.001% bromophenol blue. For study afterwards, IIT was carried out at 250 V for 15 min, followed by 8000 V and 1000 V. The IPG strips were subsequently transferred (overnight) into 2 ml equilibration buffer (0.5 M Tris, 0.38 M SDS, 0.5 M 2-mercaptoethanol, pH 8.8, 20% glycerol) containing 50 mM dithiothreitol and 10 min into the same buffer containing 13 mM sodiumacetamide. Strips were fixed in 2.5% TGA, 192 nm elysine and 0.1% SDS (TGS), positioned on top of precast 4–20% NP-BAG96 BioRad Novex SDS polyacrylamide gels (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and fixed in place with an overlay solution of 0.8% agarose-TGS (w/v). Electrophoresis was then performed at 200 V for 40 min.

Growth of calcite crystals in the presence of native and chemically deglycosylated ASM

CaCO₃ precipitation was performed *in vitro* by slow diffusion of a calcium carbonate vapour in a closed beaker solution [36]. The test was adapted as follows: 500 μ l of 0.1 M CaCl₂ containing 1 μ mol of native or chemically deglycosylated ASM (0.1 μ g/ml) or 20 μ g/ml 2-mercaptoethanol as a control solution (300 μ l) were placed in a beaker (Dixasilur, Transilac, Luzen, NJ, USA). Beaker caps were airtight without any seal. They were incubated for 48 h at 4°C in a closed desiccator containing crystals of ammonium carbonate. They were then dried, carbon spattered and observed at 5 kV by scanning electron microscopy (SEM, 6400).

Acknowledgements

This work was supported by an Avenir-Cherche Initiative Jeunes Chercheurs (ACI-IC949) awarded to T. Marin by the French Ministère Délégué à la Recherche et aux Nouvelles Technologies. B. Marin is awarded by a PhD Fellowship (No. 13351) from the Ministère Délégué à la Recherche et aux Nouvelles Technologies. The 'Conseil Régional de Bourgogne' (Dijon, France) provided additional supports for the acquisition of new equipment in the Biogeochemistry research unit (UMR-CNRS 5363). D. Maitre and R. Maitre thank Canada-Jesse (Laboratoire de Recherche des sciences University of Bourgogne) for helping to handle the scanning electron microscopy and Damien Bailliet-Ikatewenke (UMR 5186 LSEU, University of Bourgogne) for the IR measurements.

References

1. Aokiuchi T, Joerer D, Nudelman T & Weiner S (2003) Mollusc shell formation: a source of new concepts for understanding biomineralization and stress. *Geology*, **31**, 990–992.
2. Smith R & Wilbur KV (1999) *Biomineralization: Cell Biology and Molecular Approaches*. Academic Press, Inc., San Diego, CA.
3. Sali D, Deane C, Lopez B & Mili C (2001) Role of water-soluble matrix proteins secreted from the valve of *Pinctada mazatlanica* in the regulation of shell activity in vitro and in the cell culture (*Pinctada mazatlanica*). *Tissue Cell*, **33**, 121–130.
4. Viana J & Lallier H (2004) Molluscan shell formation. *C & R Reviews*, **4**, 469–492.
5. Viana J & Baker B (1999) The regulation of matrix of the freshwater shell *Dreissena polymorpha*. *Comp Biochem Physiol*, **121**, 25–33.
6. Koussem M, Bédouet L, Lallier H, Guéret P, Le Né K & Lopez B (2005) Regulation of shell formation with microspins. *Comp Biochem Physiol*, **142**, 1–9.
7. Aokiuchi T, Hoshizaki MT, Blake J, Saito H & Dill J (1997) A molecular approach of the bivalve shell. *Mar Biol*, **124**, 619–629.
8. Viana J, Vilhinho L, Guéret P & Viana J (2000) The action of water-soluble matrix on the calcification process of *Dreissena polymorpha* (Unionidae) in vitro: morphology and composition analysis. *Science*, **29**, 49–54.
9. Kaurer O, Cenci R, Beone CV, Danti V & Lucchini A (2004) The chemical composition of fresh water mussels and macrophytes as related to those in their environment. *J Limnol*, **62**, 61–70.
10. Toms R & Hamilton G (1998) Ultrastructure and mineralization of the mantle and the developing valve in freshwater mussels. *Cell Tissue Res*, **266**, 218.
11. Chén A & Rodriguez-Navarro A (2001) Geometrical and crystallographic constraints during the self-organization of the shell microstructure in Unionidae (Bivalvia: Mollusca). *Proc Biol Sci*, **268**, 771–778.
12. Koussem MT & Rajaram R (1997) The chemical nature of the shell of molluscs. I. *Structure and chemical nature of a mollusc (*Dreissena polymorpha*)*. *Comp Biochem Physiol*, **48**, 39–41.
13. Peir IT (1991) Self-organization of mineralization in the calcified tissues. *Life*, **181**, 153.
14. Viana J, Le M, Chén A & Mili C (1991) Structure and calcification in the inner layers of the shell of *Dreissena polymorpha*. *J Comp Physiol*, **169**, 413–418.
15. Taylor JD, Knaub WJ & Hall A (1988) The shell structure and morphology of the bivalve. Introduction. *Nucleos. Tissuechem. Shell Biochem Mar Mol Zool*, **3**, 1–17.

16. Vann L, De Groot K & Westhoek P (2006) Screening of serum DNA expression library with anti-shell matrix antibodies. *Dev Biotech* 30, 246–252.
17. Yao Y, Zhang L & Cheng P (2006) Physicochemical properties and antimicrobial activities of water soluble chitosan and chitosan hydrogels cross-linked with poly-saccharides. *Carbohydr Res* 341, 2261–2269.
18. Christae M (1979) The role of chitin in *Mytilus edulis* bivalve shell. *Biomineral Res Rep* 6, 1–11.
19. Lee S & Spicer S (1982) Specific binding of sulfate groups with Alcian blue at low pH. *J Histochem Cytochem* 31, 339.
20. Campbell KP, MacLennan DJ & Jorgensen AO (1982) Kinetics of the Ca^{2+} binding proteins, as well as their interaction with calmodulin, troponin C, and S-100, with the ionic calcium dye 'Sulfin-AAT'. *J Biol Chem* 258, 11207–11213.
21. Vann L, Christae M & Gellera F (in press) Gellera F & Westhoek P (2006) Molluscs and molluscan calcification: from molluscs to the calcification of inorganic and organic matrix protein from the nucleus shell layer of the common *Ferussacian* (Bivalvia, Pectiniformia). *J Mol Chem* 276, 2000–2005.
22. Edge AS, Pollock CR, Ho L, Radcliffe K & Wilson D (1981) Deglycosylation of glycoproteins by trifluoroacetic acid. *Anal Biochem* 118, 131–137.
23. Edge AS (2003) Deglycosylation of glycoproteins with trifluoroacetic acid: elucidation of molecular structure and function. *Biochem J* 376, 339–346.
24. Nakamura H, Devlander G & Kakei M (1982) Electron microscopic and amino acid studies on the outer and inner shell layers of *Mytilus edulis*. *Venus* 41, 33–46.
25. Saitoh T & Kakei K (1995) Primary structure of a soluble chitin synthase and shell matrix synthesis in calcareous bivalve biomineralization. *J Biol Chem* 270, 1310–1313.
26. Vann L, Amos A, Gellera F, Stier V, Gellera F, Luchini G, Luchini F, Alcantara G, Riandet C & Westhoek P (2005) Genetic and physiological two periods of the shell matrix protein of the Mediterranean mussel. *Biomineral Res Rep* 30, 1385–1390.
27. Gellera F (1972) Structure of the molluscan shell. In *Comparative Zoology*, Vol. III (Fennell M & Smith R, eds), pp. 46–106. Academic Press, New York, NY.
28. Saito A, Fujikawa G, Nagasawa T, Okubo T, Sakaguchi K, Tanaka M, Nakamura K & Takahashi T (1997) Structure of chitinase and chitinase gene from *Mytilus* B7. *FEBS Lett* 407, 363–367.
29. Watanabe S, Uemura H & Hiroaki T (1995) Characterization of 30 milliliter per mole chitinase shell protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 7541–7545.
30. Kakei K, Shiohara S, Bell D, Remillard K, Kaplan D, Uemura H & Mowbray J (1993) Characterization of nucleomolecules in mollusk shells. *Comp Biochem Physiol* 105, 489–495.
31. Weiss IM, Tross M, Auluck L & Weiner S (2002) Mollusk bivalve shell formation: a model for the evolution of the calcareous matrix for aragonite. *J Exp Zool* 292, 437–451.
32. Nakamura H (1995) Nuclei formation in mollusk and gastropod shells. In *Molluscan and Gastropod Biomineralization in Biological Systems* (Saito S & Nakamura H, eds), pp. 344–356. Springer-Verlag, New York, NY.
33. Nakamura H, Gellera F, Auluck L & Weiner S (2006) Mollusk shell formation: mapping the distribution of organic matrix components underlying a single aragonite shell layer. *J Struct Biol* 153, 176–187.
34. Lee-Kawano Y, Gellera F, Auluck L & Weiner S (2001) Structure of the nucleus organic matrix of a bivalve mollusk shell examined by the electron spectroscopy (TEM). *J Struct Biol* 135, 1–7.
35. Mouri H (1980) The nucleus layer in molluscan shells. In *The Mechanisms of Biomineralization in Animals and Plants: Proceedings of the Third International Biomineralization Symposium* (Gron M & Weiner S, eds), pp. 49–60. Tokyo University Press, Tokyo.
36. Chazotte D, Hellebrand C & Wenz T (2000) Mollusk shell matrix: structure and crystallographic features. *J Struct Biol* 23, 132–135.
37. Bafout L, Schmitt MJ, Main F, Mili G, Lopez B & Girard M (2001) Soluble proteins in the matrix of the giant oyster *Platystrophia* and the oyster *Crassostrea*: structure, evolution and partial analysis of nucleoprotein. *Comp Biochem Physiol* 128, 385–400.
38. Wheeler AP, George JW & Evans CA (1995) Control of CaCO_3 nucleation and crystal growth by soluble matrix of oyster shell. *Science* 222, 1492–1498.
39. Weiss IM, Kachur S, Mann K & Foll M (2003) Purification and characterization of Perlim and Perlimin, two new proteins from the shell of the mollusk *Mytilus edulis*. *Biomineral Res Rep* 28, 17–21.
40. Gellera F & Luchini G (1995) Distribution of nucleomolecules quantitative de la chitine dans les coquilles de mollusques. *Comptes Rendus Acad Sci* 280, 14–16.
41. Shiohara K (1985) The organic matrix of the oyster shell. *Comp Biochem Physiol* 10, 411–415.
42. Christae M & Kachur S (1995) The bioceramics localization of nucleic groups in oyster matrix from *Crassostrea*. In *The Mechanisms of Biomineralization in the Invertebrates and Plants* (Saito S & Weiner S, eds), pp. 133–167. University of South Carolina Press, Columbia, OH.
43. Gellera F & Haffner W (1993) Calcium binding to shell matrix and its effect on the formation of apatite. *J Biol Chem* 268, 277–286.
44. Fennell-Carson M, Carson M, Gellera F, Gellera F, Luchini G, Fennell-Carson M (1999) A calcium binding, arginine-rich protein from the oyster shell matrix.

- formation in the ascusulin embryo. *J Cell Biol* 109, 1749-1760.
45. Suzuki T (1979) Ca-binding glycoproteins in molluscan shells with a particular emphasis on the matrix. *Biocer* 33, 193-201.
46. Vercellotti L (1984) Molecular recognition in biomineralization. *Nature* 332, 119-124.
47. Albeck S, Addadi L & Weiner S (1996) Regulation of calcite crystal morphology by intracrystal fine acidic polyelectrolytes and glycoproteins. *Chemical Process Res* 35, 363-370.
48. Albeck S, Arsenberg L, Addadi L & Weiner S (1993) Identification of various skeletal macromolecular components in calcite crystals. *J Am Chem Soc* 115, 11691-11697.
49. Fu CL, Qin SZ, Omer CY, Morse DF & De Yoreo JJ (2003) Acceleration of calcite kinetics by adsorbed mucin proteins. *Adv Mater* 17, 2676-2685.
50. Vercellotti L, Humeau V, Gahleitner J & Bärker W (1998) Carbohydrates of the organic shell matrix and the shell forming tissue of the snail *Bombina orientalis* (88). *Dev Biol* 194, 25-34.
51. Matsuda J, Nishio M, Becker W & Mann K (2003) The major protein (19.6 kDa) of the organic shell matrix of the freshwater snail *Bombina orientalis* is an N-glycosylated glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1650, 92-98.
52. Greenfield L, Wilson D & Gershwin V (1984) Inotropic modulation of acidic substrate by molluscan matrix. *Am Zool* 24, 945-954.
53. Addadi L, Moudouni J, Shay L, Macrae N & Weiner S (1987) A general model for the organization of sulfates and carbohydrates in acidic crystal nucleation: relevance to biomineralization. *Proc Acad Sci USA* 84, 2732-2736.
54. Dalgarno J, Crowe Z, Mann S, DeVries A, Hruschka P & Weibull P (1995) Influence of low-molecular-weight and matrix-associated organic additives on the morphology of calcium carbonate. *J Chem Soc Faraday Trans* 98, 1991-1998.
55. Tani C, Vercellotti L, Weiner S & Addadi L (1996) Characterization of the calcite growth surface by shell matrix macromolecules. *Science* 271, 67-69.
56. Durrin J, Vercellotti L & Ruyter F (1994) Effects of calcium and bound silicic acid on the viscosity of mucin. *Biochim Biophys Acta* 207, 486-490.
57. Liu W, Chen L, Zhu J & Rodgers CJ (2003) The glycoprotein (19.6 kDa) of the organic shell matrix. *Exp Cell Res* 312, 1785-1793.
58. Lammle UK (1997) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
59. Mochly N (1981) Silver stains for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal Biochem* 113, 303-310.
60. Rohrer J (2000) Analysing silicic acids using high-performance ion exchange chromatography. *Anal Biochem* 283, 3-9.
61. Barakat I, Garcia S, Barchier C, Casséville V, Caruelle JF, Vauzeilles J & Popyrian IG (2003) Improved and simple immunoassay for cultured glycosaminoglycans quantification in biological extracts and its use in skin and muscle tissue studies. *Glycoconjugate J* 20, 647-653.
62. Wall RS & Coy FH (1976) A method for coupling proteoglycans to polyacrylamide gels using the critical electrolyte concentration approach. *Anal Biochem* 175, 299-299.
63. Zacharias RM, Zell TB, Morrison JJ & Woodlock JJ (1992) Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Anal Biochem* 20, 118-122.
64. Vamvakis K, Villeret O & Philiou S (1994) Detection of the calcium-binding proteins by ⁴⁵Ca autoradiography on acrylamide and acrylamide and methacrylamide polyacrylamides. *J Biochem* 95, 511-516.
65. Addadi L & Weiner S (1987) Interactions between acidic proteins and crystal substrates in biomineralization. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 4110-4114.

4 – Nacre calcification in the freshwater mussel *Unio pictorum*: carbonic anhydrase activity and purification of a 95-kDa calcium-binding glycoprotein. (Soumis à ChemBiochem.)

Résumé

La formation de la partie minérale des coquilles de mollusques est contrôlée par les macromolécules de la matrice organique coquillière. Des résultats précédents ont montré que la fraction acido-soluble de la matrice organique extraite de la nacre du bivalve d'eau douce *Unio pictorum* présentait des propriétés remarquables: la capacité à lier les ions calcium en solution, la présence d'une importante fraction glycosylée, ainsi que la capacité à interagir à faible concentration avec la précipitation de cristaux de carbonate de calcium précipités *in vitro*. Dans ce travail, nous montrons que cette matrice présente également une activité anhydrase carbonique, une fonction importante des processus de calcification. Cette matrice est composée de trois constituants protéiques majoritaires. L'un d'eux est une glycoprotéine acide spécifique de la couche nacrée. Nommée provisoirement P95, cette protéine est riche en résidus Gly, Glx et Asx, et présente un point isoélectrique proche de 4, alors que sa forme déglycosylée focalise aux alentours de 7. De plus, la fraction saccharidique de cette protéine est impliquée dans sa capacité à lier les ions calcium. Des fractions purifiées de ces trois protéines majoritaires ont été digérées par la trypsine et les peptides obtenus ont été analysés par spectrométrie de masse. Des séquences peptidiques internes ont été acquises par séquençage *de novo* et comparées aux séquences des protéines de coquille de mollusques déjà décrites. Nos résultats sont discutés d'un point de vue évolutif.

N.B. : les données de MS/MS et leurs interprétations pour le séquençage *de novo* sont présentées dans les annexes situées en fin de manuscrit.

Submitted to ChemBiochem.

Proteins of nacre tissue

Nacre calcification in the freshwater mussel *Unio pictorum*: carbonic anhydrase activity and purification of a 95-kDa calcium-binding glycoprotein

Benjamin Marie,^{*[a]} Gilles Luquet,^{*[a]} Laurent Bédouet,^[b] Christian Milet,^[b] Davorin Medakovic,^[c] and Frédéric Marin^{*[a]}

The formation of mineral in mollusc shells is controlled by macromolecules of the shell organic matrix. Previous results have shown that the acido-soluble fraction of the nacre matrix of the freshwater paleoheterodont bivalve *Unio pictorum* shell displays a number of remarkable properties, such as calcium-binding activity, presence of extensive glycosylations, capacity to interfere at low concentration with the in vitro calcium carbonate precipitation. In the present paper, we found that the nacre soluble matrix exhibits a carbonic anhydrase activity, an important function in calcification processes. This matrix is composed of 3 main proteinaceous discrete fractions. The one

with the highest apparent molecular weight is a 95-kDa glycoprotein, specific of the nacreous layer. P95, as it is provisionally named, is enriched in Gly, Gln and Asx and exhibits an apparent pI value close to 4, and close to 7 when chemically deglycosylated. Furthermore, its glycosyl moiety is involved in binding calcium ions. Purified fractions of the 3 main proteins were digested with trypsin and the resulting peptides were analysed by mass spectrometry. Partial primary structures were obtained by de novo sequencing, and compared with known sequences from other mollusc shell proteins. Our results are discussed in an evolutionary viewpoint.

Introduction

The molluscan shell is an archetypal biomineralization, composed of one or two polymorphs of calcium carbonate, calcite and aragonite, generally assembled in superimposed layers of different textures. One of them, the nacre or mother-of-pearl, is a fascinating example of a functional inorganic/organic composite, made of 95–99% aragonite and of 1–5 % organic matrix [1–2]. Nacre can be described as the compact juxtaposition of 0.5– μ m thick mineral tablets, surrounded by a thin organic layer [3]. Although the organic matrix is quantitatively a minor component, it plays an important role for the elaboration of nacre [4]. This matrix is a complex amalgamate of proteins, glycoproteins, lipids, and polysaccharides including chitin, which are secreted by the calcifying epithelium of the mantle, as are the mineral precursor ions [5]. These matrix components are involved in critical functions such as the arrangement of a spatially ordered scaffold, the nucleation, the orientation and growth of calcium carbonate biominerals and the inhibition of their growth [6]. It has also been demonstrated that the nacre matrix controls the calcium carbonate polymorph [7] and that it exhibits cell-signalling properties [8]. At last, in one case, it has been reported that the matrix exhibits a carbonic anhydrase (CA) activity [9], an

important function for the conversion of carbon dioxide into bicarbonate ions, which are precursors of calcium carbonate precipitation.

Numerous studies on mollusc shell have characterized the primary structures of proteins associated with nacre matrix (for recent reviews, see [10–11]). The nacre proteins often exhibit modular structures, composed of different functional domains: carbonic anhydrase-like [9,12], C-type lectins [13], IGF-8P [14], mucins [15], silk fibroin-like [16], hydrophobic [17], WAP [18], Cys-rich or Pro-rich domains [19]. To date, about 15 complete sequences of effective or putative proteins associated with nacre tissues have been described, but this number may considerably increase by using EST or proteomic approaches [20–23]. In spite

^[a] B. Marie, Dr G. Luquet, Dr F. Marin
UMR CNRS 5561 Biogéosciences, Université de Bourgogne, 6, bd
Gabriel, 21000 Dijon, (France)
Tel: +33 3 80 39 63 72
Fax: +33 3 80 39 63 87
* benjamin.marie@u-bourgogne.fr; gilles.luquet@u-bourgogne.fr;
frederic.marin@u-bourgogne.fr

^[b] Dr Laurent Bédouet, Dr Christian Milet
UMR CNRS 5178, Biologie des Organismes Marins et
Ecosystèmes, MNHN, 75231 Paris, (France)

^[c] Prof D. Medakovic
Center for Marine Research Rovinj, 52210 Rovinj (Croatia)

of the increasing number of molecular data, it remains difficult to sketch the outline of the different protein families and domains involved in nacre formation, for a simple reason: all the data were obtained from only four mollusc genera. It is unlikely that this sampling gives an accurate picture of the whole diversity of proteins associated with nacre.

By considering the huge size of the phylum Mollusca, and by taking in consideration the diversity of shell textures [24], one major question that arises is to determine to which extent similar shell textures, present in different taxa, are produced by homologous sets of proteins. The bivalve nacre is particularly suitable for such an issue: the nacreous texture is known in representatives belonging to four distinct subclasses, namely the Palaeotaxodonta, the Pteriomorpha, the Palaeoheterodonta and the Anomalodesmata [25–26]. However, all the available molecular data briefly mentioned above have been retrieved from the Pteriomorpha only (*Pinctada* and *Pinna* genera), and no data have been published so far on the three other subclasses. This paper represents consequently a first step in characterizing the proteins associated with nacre in one Palaeoheterodont bivalve, in order to compare the nacre proteins of both groups. To this end, we selected the freshwater unionoid bivalve, *Unio pictorum*, which exhibits an entirely aragonitic nacre-prismatic shell. In a recent paper, we characterized the whole organic matrix (ASM) of the nacreous layer of *Unio pictorum* [27]. In the present paper, we use the combination of biochemistry and proteomics for characterizing further the shell matrix. In particular, we report the presence of a noteworthy carbonic anhydrase activity within the ASM matrix and we characterize biochemically P95, a nacre-specific glycoprotein able to bind calcium ions. Finally, we obtain by mass spectrometry analyses a set of partial sequences of nacre mollusc shell proteins.

Results

Shell matrix characterization on gels

Figure 1A and B show the two microstructures that compose the shell layers of *Unio pictorum*, respectively the nacre (Fig. 1A) and the outer prisms (Fig. 1B), and from which were extracted their corresponding acido-soluble matrices (ASM). Figure 1C shows the electrophoretic profiles of the two ASMs, stained with Coomassie brilliant blue (CBB, right) and with silver nitrate (left). Few prominent proteinaceous bands characterize the two extracts, in addition to a smear, particularly visible on CBB staining. Two bands, at about 50 and 29 kDa, are present in the two matrices. On the other hand, a protein migrating at 95 kDa, provisionally called P95, is exclusively observed in the nacreous layer, whatever the staining procedure used. It is to notice that the neatness of the observed electrophoretic profile depends on

the freshness of the shells. For example, the intensity of the P95 band tends to decrease in extracts from 'old' shells (collected years after the death of the animal), which exhibit a macroscopic altered aspect (not shown).

Carbonic anhydrase activity of the nacre ASM

Since a carbonic anhydrase (CA) activity was previously detected in the nacre of one pteriomorphid bivalve (*Pinctada* sp.), we investigated the CA activity in the nacre ASM of *Unio pictorum*, by using the phenol red colorimetric test performed by Maren [28]. The histogram of Fig. 2 shows that the ASM extract exhibits a notable CA activity, as for the bovine erythrocyte CA control. The ASM extract exhibits indeed an activity of 2.1 units.ml⁻¹ of CA for a 5 mg.ml⁻¹ concentration, and of 1.2 units.ml⁻¹ for a 3 mg.ml⁻¹ concentration. This corresponds to a mean specific activity of 0.4 units.mg⁻¹ matrix. The activities of both (control and ASM) are dose-dependent. Furthermore, they are sensitive to acetazolamide inhibitor and to heat-denaturation, which demonstrates a true enzymatic activity in the nacre of *U. pictorum*. In the case of the heat-denaturation of the ASM however, we noticed that a residual activity, representing one-third of the activity of the non-treated extract in the same concentration, was still observed after 10 min at 100°C. One explanation might be that some enzymatic sites may remain sterically protected even after heat-treatment.

P95 characterisation

P95 was found to be specific of the nacreous layer. It was consequently investigated further. The fractionation of the nacre ASM by preparative electrophoresis resulted in the effective one-step purification of P95. The purity of the P95 extract was checked on mono-dimensional gel electrophoresis with silver nitrate staining (Fig. 3A, lane 2). A polyclonal antibody raised against purified P95 was tested against P95 and against the ASM. The results, shown besides the silver nitrate staining (Fig. 3A) indicate a strong cross-reactivity of the antibody preparation with all the discrete components of the ASM. The antibody staining is slightly more discriminatory than the silver nitrate: the fat band at 50 kDa is indeed not homogeneous, but dissociates in two bands of close apparent molecular weight. The cross-reactivity of the antibodies may be explained as follows: P95 and the other discrete components share common oligosaccharidic or common protein epitopes.

The extract was analyzed further for amino acids composition. Figure 3B shows that the four dominant amino acid residues are Gly (17.6%), Glx (13.5%), Asx (10.5%) and Pro (8.9%). By comparing with the amino acid composition of the bulk matrix [27], P95 is enriched in Glx and Pro residues, but depleted in Ala and Asx residues. The sum of aliphatic residues is above 37%. The high level of aliphatic residues, on one side, and of the sum

of aspartate and glutamate residues, on the other side, is the signature of several molluscan shell proteins. Interestingly, a search based on the similarity of amino acid composition (AACompident, <http://expasy.org/tools/aacomp/>) identified several C-type lectins. From previous works, it is known that C-type lectins may be constituents of calcifying matrices [14].

Periodic acid-schiff (PAS) and Alcian blue staining on SDS-PAGE suggest that P95 is an acidic glycoprotein (Fig. 3C). In addition, Stains-All staining of P95 in blue and ^{45}Ca overlay test both demonstrate that P95 binds calcium ions. To further characterize its glycosyl moieties, P95 was chemically deglycosylated with trifluoromethanesulfonic acid (TFMS) at 0°C and the resulting extract was called deg-P95. When run on a gel, deg-P95 shows an important shift, about 25 kDa (from 95 to 70 kDa of apparent molecular weight). This shift is primarily the result of the loss of covalently linked polysaccharides. It may secondarily result in a difference in the amount of negative charges (due to SDS) surrounding the denatured P95 and deg-P95. The removal of linked polysaccharides is characterized by a drastic reduction of the PAS staining, and by the complete disappearance of the Alcian blue staining. Because we used Alcian blue in low pH conditions, this clearly suggests that the sugar moieties of P95 are sulfated. Furthermore, deg-P95 stains red with Stains-All and does not bind calcium ions with ^{45}Ca overlay test. This clearly demonstrates that the calcium binding ability of P95 is carried by its glycosyl moieties.

The 2-D gel shows that the P95 band is acidic with at least 6-7 isoforms, which focus at pI values ranging from 3.5 to 4.3 (Fig 3D, top). After the chemical deglycosylation, deg-P95 focuses as a single spot at a pI value between 6.5 and 7 (Fig 3D, bottom). This suggests that the P95 extract is a single protein, which exhibits different glycosylation patterns, carrying different negative charges. Calculation of the theoretical pI of the protein core (http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html) from its amino acid composition indicates a pI comprised between 4-10, depending whether Asx and Glx residues are on their acidic or amine form. Since deg-P95 exhibits a neutral pI, our computer simulation estimates that half of the Asx+Glx residues of P95 are in their acidic form.

CaCO₃ precipitation interference test

The interference analysis of CaCO₃ precipitation is a test commonly performed with calcitic or aragonitic associated macromolecules to investigate their role in calcium carbonate calcification [29-31,18]. To estimate the effects of P95 on the morphology of calcium carbonate crystals, we examined by SEM crystals obtained in the presence of P95, and we compared the results with a positive control experiment performed with the whole nacre ASM (Fig. 4). Negative control experiments

produced the typical rhombohedrons of calcite (Fig. 4A). In the presence of increasing amount of nacre ASM (0.5-10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$; Fig 4B-C-D), the produced precipitates appear mostly as polycrystalline aggregates (60-80 μm diameter). At 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ASM, crystals exhibit a foliation with microsteps and rounded corners (Fig. 4D). At highest concentration (20 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ASM), the precipitation of calcium carbonate starts to be inhibited, which results in the production of small-sized crystals (not shown). Similar effects were found with shell nacre matrices [31]. In the presence of P95, we do not observe any polycrystalline aggregates. Furthermore, the overall morphology of monocrystals grown in the presence of P95 develops with numerous superimposed faces organized in micro-steps (Fig. 4E-F-G-H). Even at highest concentration of P95 (up to 20 $\mu\text{g.ml}^{-1}$), the inhibition of precipitation does not occur. We note that the effect on crystal morphology is lesser with P95 alone than with the complete ASM, suggesting a synergistic effect of the different ASM components in interacting with the precipitation of carbonate crystal, as proposed by Matsushiro et al. [32].

Proteomics analysis

In a first approach, we investigate the primary structure of *Unio pictorum* shell proteins by N-terminal sequencing of purified proteins with preparative electrophoresis, but unfortunately no peptidic sequence was obtained as the proteins appeared to be a mixture of isoforms of the same masses or were N-terminally blocked. Subsequently, we performed a 2-DE separation approach followed by internal sequencing. Two-dimensional electrophoresis of nacre ASM gave satisfactory resolution for the separation of proteins [27], and 5 main spots were unambiguously excised from the gel for *de novo* sequencing (Fig. 5). All the protein spots digested with trypsin were firstly analyzed by MALDI-TOF/TOF on MS and MS/MS modes. No hit was found by peptide mass fingerprint (PMF) search using the MASCOT tool of the ExPASy server, indicating that the obtained peptides do not correspond to already known sequences from the databases. Because of the absence of genomic data on freshwater mussels and considering the diversity of the already sequenced mollusc shell proteins, it is not surprising that PMF searching cannot provide a reliable result for identifying proteins. On the other hand, the m/z values of these peptides indicate that the different spot proteins share numerous peptides of the same m/z, especially the spot U2 and U5 (Table 1), suggesting that different proteins of the nacre ASM may share similar peptide sequences. This was confirmed by analyzing on the MS/MS mode for *de novo* sequencing the most abundant peptides: peptides of the same m/z, such as 1313.7 from U2 and U5 spots, share the same spectrum pattern. This indicates that some of the protein spots analyzed on MS share common amino acid sequences. It is

important to note that, in spite of these similarities, the U2 and U5 digest patterns exhibit several non-common peptides (Table 1). This precludes the possibility of a contamination between these two spots. We can as well exclude the possibility that P95 and/or P50 result from the polymerization of P29 monomers, because they exhibit very different charges. However, this does not rule out the eventuality that the higher molecular weight proteins may be preferentially cleaved in smaller fragments. For example, P29 (spot U5) could constitute a cleavage product of P50 (spot U2). As the digestion of the U1 spot (corresponding to P95) gave very few peptides, due to insufficient amount of protein material in a spot, purified P95 was also similarly analyzed. We observed that the intensive digestion of P95 with trypsin yielded 28 to 33 peptides (Table 1), which is less than expected (about 70) according to the size of deglycosylated P95 and to its composition in basic amino acid residues (Arg+Lys). This suggests that some cleavage sites may be masked by the glycosyl moieties of P95.

Sequence analysis and homology search

Partial sequences of the ASM nacre proteins were obtained by interpretation of MS/MS spectrum for *de novo* sequencing (Fig. 6). The analysis of mass differences between ions was assisted by the Rapid De Novo software and all obtained sequences were further manually confirmed. We only consider amino acid positions, which were undoubtedly determined. Uncertain amino acids were mentioned in brackets. We obtained full or partial peptidic sequences only for the U2 and U5 spot or the P95 purified proteins using MALDI-TOF/TOF analysis (Table 2). Few peptides analyzed on MS/MS mode could be fractionated or gave good MS/MS spectra for amino acid sequence interpretations. It is likely that some of these trypsin digests bear glycosyl moieties or other post-translational modifications, which restrain the MS/MS fractionation and spectra interpretation.

A homology search was performed with the WU-BLASTP program against the Swiss-Prot protein non-redundant database, but no relevant similarity was obtained. A complementary SIM analysis was performed, by aligning two per two each obtained sequence with those of the known molluscan shell proteins [11]. We observed that the newly obtained sequences of *Unio* nacre ASM do not exhibit homology with other mollusc shell proteins, except for the Gly-repeat of the 1457.57 *m/z* peptide of the P95, which partly matches (5 aa residues) with several short motifs of the acidic proteins, MS131 [O02401], MS180 [O02402] and MS17 [Q7YWA5]. These similarities may be fortuitous, and may or may not have any phylogenetic implications.

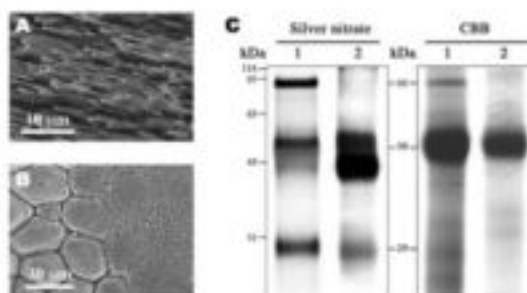


Figure 1. The shell of *Unio pictorum* and associated skeletal matrices. A) Scanning electron microscopy micrograph of a cross-section of the nacreous layer B) Scanning electron microscopy micrograph of the transition zone between the prisms (on the left, outer shell layer) and nacre tablets (on the right, internal shell layer), observed on the internal shell surface. C) Electrophoresis analysis of the acid-soluble matrices (ASM) obtained by decalcification of the nacreous and the prismatic layers (well 1 and 2, respectively) on 12% SDS-PAGE stained with silver nitrate and CBB.

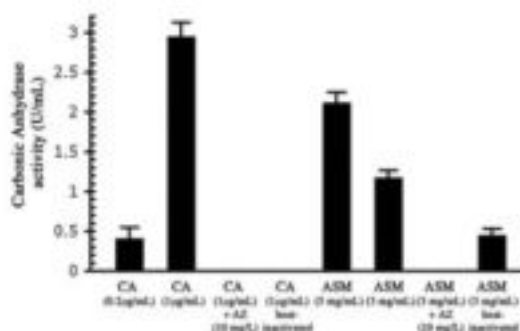


Figure 2. Anhydrase carbonic activity of the nacre ASM of *U. pictorum*. Commercial carbonic anhydrase (CA) from bovine erythrocytes was used as a positive control and acetazolamide (AZ) was used as specific inhibitor of carbonic anhydrase activity. Each value is the average of three independent experiments.

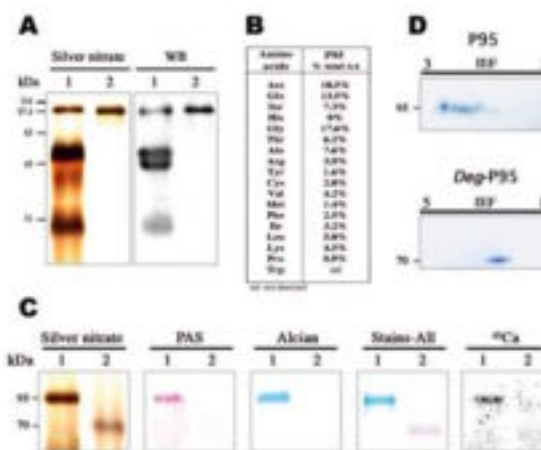


Figure 3. Purification and characterisation of the P95, a nacre-specific ASM protein. A) 12% SDS-PAGE of the nacre ASM (lane 1) and of the purified P95 (lane 2), stained with silver nitrate. The same extracts were tested on Western blot incubated with the anti-P95 polyclonal antibodies. Note that the antibodies

cross-react with the other discrete components of the ASM. B) Amino acid composition of the purified P95. Asx = Asn + Asp; Glx = Gln + Glu; tryptophan residues are destroyed during the hydrolysis. C) Two-dimensional gels of purified P95 and TFMS-deglycosylated P95 (deg-P95), stained with CBB. D) 10% mini-gels of P95 (lanes 1) and deg-P95 (lanes 2), stained with silver nitrate, PAS, Alcian blue and Stains-A1, and PVDF membrane revealed by autoradiography with ^{45}Ca .

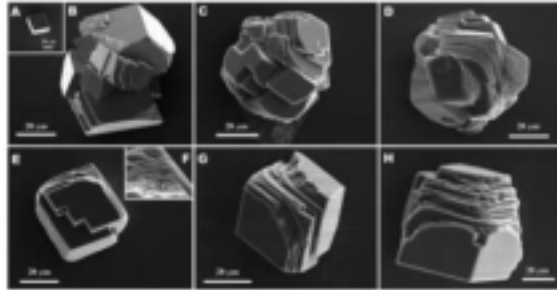


Figure 4. Scanning electron micrographs of synthetic calcium carbonate crystals grown *in vitro* with nacre ASM (B-D) and with purified P95 (E-H), at concentrations ranging from 0.1 to 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A) Negative control. B) ASM, 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. C) ASM, 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. D) ASM, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. E) P95, 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. F) Detail of (E). G) P95, 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. H) P95, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

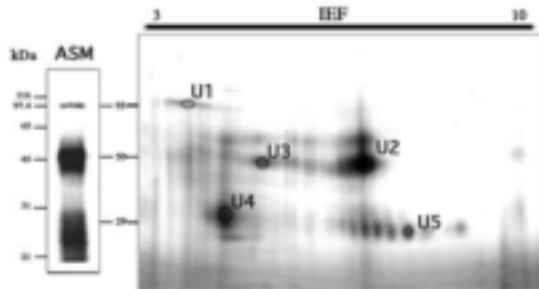


Figure 5. Proteomic analysis of *Unio pictorum* nacre proteins. A) Separation of nacre ASM by 2-D electrophoresis and coloration with CBB. Hundred micrograms of ASM were loaded on gel. Spots analyzed by MS after trypsin digestion were named U1-U5.

A

Search Parameters: Charge: MS Tol: 0.2 Da, MS2 Tol: 0.3 Da, RapDeNovo: True, IonType: Cx, MS1: 1687.913, Mass: 1688.812, Calc: 1688.808, Dev (Da): -0.003, Score: 2074, Sequence: KSKLLDNYVY(H)R

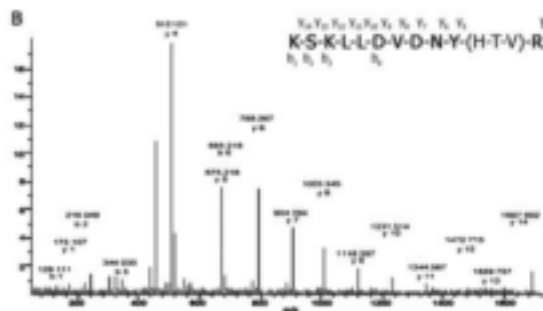


Figure 6. Example of *de novo* sequencing of a peptide obtained by trypsin digestion of purified matrix protein from *Unio pictorum*. A) RapDeNovo data with m/z 1687.83 from P95 trypsin hydrolysis. B) MS/MS spectrum acquired on MALDI-TOF/TOF. The *de novo* sequencing was performed, by considering precise mass differences between adjacent b- and y-ions. In this example, the determination of the 4 last amino acids (-HTVR, in y4-y1 positions) was uncertain. Consequently, the unambiguous sequence was only considered further. The protein sequence data reported in the paper will appear in the UniProt knowledgebase under the accession numbers P85508-P85510.

Table 1. The m/z values of the main peptides from excised 2-DE spots U1-U5 (see Fig. 5) or from the purified P95 (Fig. 3A, lane 2) after digestion with trypsin. The data were obtained by MALDI-TOF/TOF.

Protein name	m/z values (monocharged ions)
P95/spot U1	<u>2029.98</u> , 2057.00, <u>2069.99</u> , 2084.04, 2812.02
P50/spot U2	1002.35, 1003.37, 1073.45, 1086.47, 1097.26, 1113.44, 1127.45, <u>1130.48*</u> , 1162.47, 1256.64, 1269.65, <u>1286.32</u> , <u>1313.69*</u> , 1329.66, 1335.64, 1345.67, 1351.64, <u>1363.69*</u> , <u>1379.69*</u> , 1408.91, <u>1531.56</u> , 1550.65, 1603.70, <u>1647.71*</u> , 1685.66, 1694.03, 1701.57, 1704.72, 1718.75, 1724.57, 1748.81, 1759.83, 1781.81, 1787.79, 1804.84, <u>1805.84*</u> , <u>1842.92*</u> , 1862.85, 1881.73, 1900.91, 1933.89, 1967.90, 2030.84, 2079.90, <u>2179.95*</u> , 2488.24, 2536.23, 2637.11, 2664.32, 2809.18, 3137.45, 3162.28, 3209.44, 3271.40, 3289.37, 3339.44
P50/spot U3	<u>1130.47*</u> , 1144.50, 1196.05, <u>1313.67*</u> , <u>1326.04</u> , 1363.70, 1379.70, 1493.70, 1742.05, 1765.74, 1804.85, <u>1805.82*</u> , 1843.92, 2810.17*
P29/spot U4	<u>1130.48*</u> , 1235.17, 1268.55, <u>1313.69*</u> , <u>1363.71*</u> , 1638.88, <u>1647.73*</u> , 1804.87, <u>1805.86*</u> , 1829.81, 1838.96, 1842.93, 1862.87, 2116.93, 2399.00, 2810.18*
P29/spot U5	1197.22, 1269.66, <u>1313.69*</u> , 1329.66, 1345.63, 1351.61, 1363.68, 1375.57, 1379.68, 1550.63, 1638.84, <u>1647.68*</u> , 1661.71, 1704.74, 1708.80, 1748.75, 1781.81, 1785.73, 1804.80, <u>1805.83*</u> , <u>1819.84</u> , <u>1842.91*</u> , 1862.83, 1867.74, 1881.73, 2079.85, 2176.93, 2383.95, 2488.23, 2501.21, 2504.23, 2705.13
P95	<u>1025.59</u> , 1100.57, 1114.57, 1179.61, 1242.66, 1300.54, 1326.65, 1328.64, 1344.68, 1357.64, 1386.67, 1405.68, <u>1457.72</u> , 1475.77, 1493.72, 1657.75, 1670.79, <u>1687.83</u> , 1709.79, 1732.77, 1765.71, 2028.58, <u>2069.98</u> , 2085.99, 2192.14, 2271.13, 2293.09, 2309.06, 2383.92, <u>2389.22</u> , <u>2421.17</u> , 2628.03, 3312.25

*: peptides of the same m/z common in different purified proteins.
In bold: peptides that gave internal full or partial sequence by analysis of MS/MS spectra.
Underline: peptide analyzed on MS/MS mode.

Table 2. Full or partial (dash) *de novo* peptide sequences obtained after the tryptic digestion of purified ASM proteins of *Unio pictorum*. Sequences are deduced from MS/MS spectra.

Protein Name (Spot)	m/z	Charge	Partial or full sequence	Accession no.
P95	1457.7	1 ⁺	-TSHGGGKAQ-	P85508
	1687.8	1 ⁺	KSKLLDNY-	
P50 (U2)	1313.7	1 ⁺	KDALEHTGFAPK	P85509
	1647.7	1 ⁺	KDGEEHVEWNYN-	
P29 (U5)	1313.7	1 ⁺	KDALEHTGFAPK	P85510

Discussion & Conclusion

One of the challenges for understanding molluscan shell biomineralization at the molecular level is the thorough biochemical and functional characterization of the matrix macromolecules associated to the biominerals. Nacre is one of the most-studied shell structures, for different reasons including its remarkable mechanical properties, its importance in jewellery and its potential in bone surgery. It is widespread among shell-bearing molluscs. Furthermore, nacre is considered as an ancestral shell texture [33]. Thus, it constitutes a fascinating model for understanding the long-term evolution of molluscan mineralized tissues. In the present paper, we characterized the matrix extracted from the nacreous layer of the freshwater bivalve *Unio pictorum*. We evidenced a carbonic anhydrase enzymatic activity of the ASM and described a novel, nacreous layer-specific, acidic glycoprotein, P95. In addition, we used a proteomic approach for obtaining partial sequences, in order to compare the nacre proteins of this paleoheterodont bivalve with those previously published from pteriomorpha.

We recorded a substantial carbonic anhydrase activity in the acido-soluble shell matrix of *Unio pictorum*. Carbonic anhydrase (CA) is a ubiquitous metalloenzyme, observed in animals, plants and bacteria, that catalyses the reversible hydration of carbon dioxide, according to the equation $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$. When intracellular or associated with the cytoplasm membranes, it possesses an essential function for cytoplasmic acid-base balance and for transport mechanisms of CO_2 and carbonate ions [34]. In addition, CA is essential in calcification processes [35], since it has been identified in several calcifying epithelia [36-38]. One peculiarity of biomineralization is the occurrence of a CA activity in the extracellular skeletal matrix, a fact which has been reported only in few biological metazoan models: the cnidarian exoskeleton [39-40], crustacean calcium storage concretions [41], the fish otolith [42] and the molluscan shell [9]. The role of CA in an extracellular calcifying matrix is far from being elucidated. According to the mainstream hypothesis, CA catalyzes the production of bicarbonate ions, which subsequently react with calcium for precipitating calcium carbonate. Alternately, it is also possible that in extracellular matrices, CA works in a different way, by catalyzing the production of protons, which subsequently induce the dissolution of calcium carbonate [43]. It is also possible that the CA activity is integrated in a multi-domain protein, which implies a more complex functioning. The best illustration of this is nacrein, a shell protein, which exhibits both CA activity and structural function [9]. Nacrein indeed comprises two CA sub-domains (very similar to that of vertebrate CAII) separated by an acidic glycine/asparagine-rich domain. This structure suggests two successive spatio-temporal functions:

production of bicarbonate ions in the extrapallial fluid by the CA domains, followed by the incorporation within the biominerals as a component of the shell matrix framework. Reversely, the structural acidic module of nacrein may be used as a mineral-anchoring domain at the surface of the crystalite, allowing the CA domains to provide bicarbonate ions at the vicinity of the growing mineral. Clearly, supplementary characterizations are needed before we can conclude on the significance of CA activity in the matrices associated to molluscan shells.

Among the proteins extracted from the shell of *U. pictorum*, P95 is a major component, specific of the nacre ASM. It is virtually absent from the prismatic layer, contrarily to the other discrete components. This leads us to suggest that P95 might play an important function in defining *inter alia* the shape of nacre microstructure during shell formation. This also implies that P95 is expressed only in the mantle cells that secrete nacre matrix. P95 is a glycoprotein, the acidity of which is entirely conveyed by its glycosyl moieties, consisting of acidic and sulfated polysaccharides. From its amino acid composition, P95 presents the 'signature' of an acidic protein, in particular because of its high content in Asx and Glx residues [44]. However, its deglycosylated protein core exhibits an experimental pI of about 6.5-7, which classifies it, at the most, as a moderately acidic protein. Such a value may appear surprising but is in fact consistent with the distribution of the theoretical p/s (deduced from primary structures) of most of the molluscan shell proteins associated with nacre, which are, as a general rule, far less acidic than those extracted from calcitic shell layers [11]. Another remarkable feature of P95 is its ability to bind calcium ions. Here again, this property is fully conveyed by the post-translational modifications of P95, in particular, by the negatively charged sulfated sugars. The presence of sulfated sugars in CaCO_3 biomineralizations is known for a long time [45] but their role is still unclear. In mollusc nacre, two putative functions have been proposed for them: concentration of calcium ions at the vicinity of the nucleating site by an ionotropic effect [46-47] and mineral nucleation [48]. Recent *in situ* experiments aiming at localizing sulfate groups at the surface of nacre tablets [49] suggest that their function may be more diversified than expected since they are not localized similarly in sheet (bivalvian) and columnar (cephalopod) nacles. Differential immunostaining of P95 and of deg-P95 directly on nacre, with more specific antibodies than the one used in the present study, may bring a more definitive answer.

In a given shell, what is the degree of similarity of the different proteins constitutive of the shell matrix? This question is falsely naïve, but has only been touched upon, due to the fact that most of the published works characterize molluscan shell proteins one per one. Recent studies have identified some 'families', such as

the nacrein, N14/16, asprich, shematrins, or KRMPs (see [11] for a review) but so far, most of these families have been retrieved at the transcriptional level, and it is not clear yet whether all the members of a family are present together, as far as they have not been identified directly in the shell matrix. In our case, the proteomic analysis of trypsin-digested 2-DE spots and purified P95 generates several peptides, many of which extracted from different protein spots share the same m/z value. The MS/MS analysis of several of these peptides unambiguously demonstrates that some of them are identical. In one case, the similarity of these peptides is totally confirmed by the interpretation of fragmentation spectra for *de novo* sequencing. Our data demonstrate that short protein motifs can be used as 'functional blocks' by different shell matrix proteins of clearly identified molecular mass. In a previous paper [50], we evoked this eventuality. The present data tend to validate this hypothesis. Besides the possibility of a cross-reactivity due to shared saccharidic epitopes, our proteomic data may also explain why strong cross-reactivity is recorded between an antibody raised against a single protein and other matrix components. All these combined data have evolutionary implications and suggest that molluscan shell proteins were assembled, like a "Meccano", by the placing side by side (in tandem) of short functional modules of diverse origins. The genetic mechanism that underlies the process is unknown but may be related to exon-shuffling [51]. As we pointed out, the alternative hypothesis involves a preferential cleavage of high molecular weight matrix proteins in smaller fragments of determined mass, during shell maturation, in a similar manner as observed for tooth matrix proteins [52]. Clearly, these two scenarios require further testing.

Experimental Section

Shell preparation and matrix extraction: Living *Unio pictorum* of 70-100 mm length were collected in the canal of Burgundy (Dijon, France). For direct microscopic observation, cleaned freshly fragmented shells were carbon-sputtered and observed in the secondary electron mode with a JEOL 6400 scanning electron microscope. The shell acido-soluble matrices (ASM) of prismatic and nacreous layers were prepared as previously described [27].

Mono-dimensional SDS-PAGE: The separation of matrix components was performed under denaturing conditions by mono-dimensional SDS-PAGE in 12%-polyacrylamide gels (Mini-Protein 3; Bio-Rad) according to Laemmli [53]. Fifty micrograms of ASM were loaded in each well. Gels were stained with silver nitrate [54] or with Coomassie Blue (Bio-Safe Coomassie, Bio-Rad). For checking the reproducibility of our extraction procedure,

we performed several decalcifications from single shells, or from different batches of shells.

Carbonic anhydrase activity: The miniaturized colorimetric method developed by Maren [28] was performed for measuring the carbonic anhydrase (CA) activity of the nacre ASM. The experiment was carried out under stabilized flow of CO_2 in an ice-containing vessel. Four hundred microliters of phenol red (12.5 mg/L in 2.6 mM NaHCO_3) were mixed with 200 μL of water and 100 μL of sample. The reaction was initiated by adding 100 μL of freshly made carbonate buffer (0.6 M Na_2CO_3 , 0.412 M NaHCO_3) and the time interval until the colour change from red to yellow was monitored. This colour change characterizes the pH drop of the solution (from 8.2 to 7.3), resulting of the production of protons during the reaction catalyzed by the CA ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$). The enzyme unit (EU) activity was calculated according to the following equation: activity units (EU) = $(T_0 - T)/T$; where T and T_0 are the reaction times required for the pH change with and without a catalyst, respectively. Acetazolamide was used as a specific inhibitor of the reaction. Heat-inactivation of CA was performed, by boiling the samples at 100°C for 10 min.

Purification of proteins by preparative SDS-PAGE: The nacre ASM was fractionated on a preparative SDS 8% polyacrylamide gel under denaturing conditions as described by Marin *et al.* [55]. 80 fractions (5 ml each) were eluted from the preparative gel. Aliquots (100 μL) of the each of them were tested by dot-blotting technique (Bio-Dot apparatus, Bio-Rad) on PVDF membranes. The membranes were subsequently incubated with an antibody raised against the acido-soluble matrix of *Pinna nobilis* nacre. In previous experiments, we found that this polyclonal antibody cross-reacts with several molluscan matrices [56], including paleoheterodont bivalves such as *Unio* and *Anodonta* sp. Fractions of the same proteins were pooled, abundantly dialyzed against MilliQ water and freeze-dried. The purity of the fractions was assessed on a mini-SDS-PAGE stained with silver nitrate.

Polyclonal antibodies against P95 and Western-blot: Polyclonal antibodies raised against P95 were obtained, by immunizing subcutaneously (100 μg P95 per injection) a female New Zealand white rabbit according to a standard procedure (Covalab, Lyon, France), at day 1, 14 and 28. The blood was collected at day 1 (presera, 4-5 ml), 39 (1st bleeding, 12-15 ml) and 56 (final bleeding, 4-5 ml). The serum containing the antibodies was used for western blots. Briefly, the ASM and the purified P95 were run on SDS-PAGE, then blotted (120 mA, 90 min, Mini Trans Blot module, Bio-Rad) on a PVDF membrane. The membrane was treated as previously described [55], including blocking with gelatin solution, incubation with a solution

containing anti-P95 serum (final bleeding) diluted 5000 times, rinsing steps, incubation with secondary antibody (GAR- peroxidase conjugate), rinsing steps and staining by chemoluminescence with luminol.

Amino acid composition of P95: The amino acid composition of the purified fraction of P95 was determined by Eurosequence Co (Groningen, The Netherlands). After an hydrolysis with 6.7 N HCl (1.5 h at 150°C), the resulting amino acids were analyzed on an HP 1090 Aminoquant by an automated two-step precolumn derivatization with o-phthalaldehyde for primary and N-(9-fluorenyl)methoxycarbonyl for secondary amino acids. Cysteine residues were quantified after oxidation.

Deglycosylation of P95: Chemical deglycosylation of 1 mg P95 was performed with 1.5 ml of a mixture of TFMS/anisole (2:1, v/v) at 0°C for 3 h, under N₂ atmosphere, with constant stirring according to Edge *et al.* [57]. After neutralisation with 2 ml of 50% cold pyridine, the aqueous phase was extracted 2 times with diethyl ether and extensively dialyzed against water (5 days) before being lyophilized. Fetuin was treated similarly and used as a positive control.

Polysaccharide staining and calcium-binding ability on gels: The glycosylation of P95 was studied qualitatively on denaturing mini-gels and on blots. In particular, saccharide moieties were investigated on mini-gels by using Alcian Blue 8GX [58], at pH 1 in order to stain specifically sulfated sugars [59], and by staining with PAS, which stains most of the carbohydrate residues [60]. The calcium-binding ability of P95 and deglycosylated-P95 (deg-95) was tested according to two procedures: "Stains-All" staining on mini gels [61] and ⁴⁵Ca overlay test on blots [62].

Growth of calcite crystals in the presence of ASM and purified P95: CaCO₃ precipitation was performed *in vitro* by slow diffusion of ammonium carbonate vapour in a calcium chloride solution [63]. The test was adapted as follows: 500 µl of 7.5 mM CaCl₂, containing different amounts of nacre ASM or purified P95 (0.1 µg/ml to 20 µg/ml) were introduced in 8-well culture slides (BD Falcon). Blank controls were performed without any sample. The culture slides were incubated 48 h at 4°C in a closed desiccator containing crystals of ammonium bicarbonate. They were gently dried, carbon-sputtered and observed at 15 keV by scanning electron microscopy (JEOL 6400).

Separation of ASM proteins by 2-DE: The nacre ASM was fractionated by 2-DE. IEF was carried out using a Protean IEF cell (Bio-Rad). Precast 7 cm linear pH 3-10 IPG strips were re-hydrated overnight at 50 V (25°C) with 150 µl buffer containing 80

µg ASM in 6 M urea, 2 M thiourea, 4% (w/v) CHAPS, 20 mM DTT, 0.1% ampholytes and 0.001% bromophenol blue. Immediately afterwards, focalisation was performed at 250 V for 15 min. Then the voltage was set at 8000 V until reaching 10000 Vh. The IPG strips were subsequently transferred 10 min into 2 ml equilibration buffer (6 M urea, 2% SDS, 375 mM Tris/HCl pH 8.8, 20% glycerol) containing 130 mM DTT and 10 min into the same buffer containing 135 mM iodoacetamide. Strips were rinsed in TGS (25 mM Tris, 192 mM glycine and 0.1% SDS), placed on top of precast 4-10% NuPAGE[®] BisTris Novex SDS-PAGE and fixed with an overlay layer of 0.5% agarose/TGS (w/v). Electrophoresis was performed at 200 V for 40 min.

Protein digestion and MALDI-TOF/TOF analysis: After electrophoresis, gels were stained with Coomassie Blue, before spot excision. Excised spots were washed for 10 min in 100 mM NH₄HCO₃, and the supernatant was discarded. Following incubation in 20 µL 100% ACN for 10 min, under gentle stirring, the supernatant was discarded and samples were subsequently reduced with 20 mM DTT (30 min, 56°C in 0.1 M NH₄HCO₃) and alkylated with 0.1 M iodoacetamide (20 min, 25°C in 0.1 M NH₄HCO₃). Proteins were digested in gel with 20 µl of 10 µg/mL trypsin (ROCHE, France) in 0.01% TFA (30 min at 4°C), then 17 µL supernatant was discarded and pieces of gels were covered with 7 µL of 25 mM NH₄HCO₃ solution for incubation (2 h, 37°C). Peptide-containing liquid fractions were extracted by addition of 1 µL TFA 0.5%, then the supernatant was recovered, the gel was rinsed with 8 µL ACN and the supernatants were pooled. Digests were analyzed with the MS and the MS/MS mode on MALDI-TOF/TOF Ultraflex II (BRUCKER DALTONICS) with a α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) matrix. Purified P95 protein was similarly analyzed on MS and MS/MS after digestion with trypsin in solution.

Mass spectrometry data and database searching: The mass spectra data were searched against NCBI non-redundant database (October 2007), using MASCOT search engine (<http://www.matrixscience.com>). The mass tolerance was 50 ppm for MALDI-TOF MS and was 0.2 Da for MS/MS experiment with 1 missed cleavage. Other search parameters were carbamidomethyl as fixed modification and oxidation of methionine as variable modification. As no identification was achieved by MASCOT searching, MS/MS spectra were analyzed and interpreted *de novo* manually with the assistance of the Rapid de Novo software. All the candidate sequences were merged into a MS BLAST search and were compared and aligned one by one with the other sequences of mollusc shell proteins, using the SIM tool from the ExPASy server (<http://www.expasy.ch/tools/sim.html>).

Acknowledgements

This work is supported by an ANR project for the period 2007-2010 (ACCRO-Earth, ref. BLAN06-2_159971, coordinator Gilles Ramstein, LSCE, Gif/Yvette). B. Marie is financed by a PhD Fellowship (N°15351), associated to an ACI (ACI JC3049, 2003-2006) from the Ministère Délégué à la Recherche et aux Nouvelles Technologies. The "Conseil Régional de Bourgogne" (Dijon, France) provided additional supports for the acquisition of new equipment in the Biogeosciences research unit (UMR CNRS 5561). B. Marie and F. Marin thank Claudie Josse (Laboratoire de Réactivités des solides, University of Burgundy) for helping to handle the SEM, and Patrick Ducoroy, Géraldine Lucchi and Jean-Pascal Gimeno (IFR 100, Faculté de Médecine, Dijon) for their contribution in MS/MS analysis.

Keywords: Biomineralization, mollusc shell nacre, carbonic anhydrase, 2-DE, organic matrix.

- [1] G. Goffinet, C. Jeuniaux, *Cahiers Biologie Mar.* **1979**, 20, 341-349.
- [2] S. Weiner, W. Traub, *Phil. Trans. R. Soc. B* **1984**, 425-434.
- [3] H. Nakahara in *Mechanisms and Phylogeny of Mineralization in Biological Systems* (Eds.: S. Suga, H. Nakahara), Springer-Verlag, New York, **1991**, pp. 343-350.
- [4] K. Simkiss, K. M. Wilbur, *Biomineralization - Cell biology and mineral deposition*, Academic Press, San Diego, **1989**, pp. 1-337.
- [5] L. Addadi, D. Joester, F. Nudelman, S. Weiner, *Chemistry* **2005**, 12, 980-987.
- [6] S. Mann, *Nature* **1988**, 332, 119-124.
- [7] G. Falini, S. Albeck, S. Weiner, L. Addadi, *Science* **1996**, 271, 67-69.
- [8] D. Sud, D. Doumenc, E. Lopez, C. Milet, *Tissue Cell* **2001**, 33, 154-160.
- [9] H. Miyamoto, T. Miyashita, M. Okushima, S. Nakano, T. Morita, A. Matsushiro, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, 93, 9657-9660.
- [10] C. Zhang, R. Zhang, *Mar. Biotechnol.* **2006**, 8, 1-15.
- [11] F. Marin, G. Luquet, B. Marie, D. Medakovic, *Curr. Top. Dev. Biol.* **2008**, 80, 209-276.
- [12] M. Kono, N. Hayashi, T. Samata, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, 269, 213-218.
- [13] K. Mann, I. Weiss, S. André, H. Gabius, M. Fritz, *Eur. J. Biochem.* **2000**, 267, 5257-5264.
- [14] I. M. Weiss, S. Kaufmann, K. Mann, M. Fritz, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, 267, 17-21.
- [15] F. Marin, B. Corstjens, E. Gaulejac, E. De Vring-de Jong, P. Westbroek, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 20667-20675.
- [16] S. Sudo, T. Fujikawa, T. Nagakura, T. Ohkubo, K. Sakaguchi, M. Tanaka, K. Nakashima, T. Takahashi, *Nature* **1997**, 387, 563-564.
- [17] M. Michenfelder, G. Fu, C. Lawrence, J. Weaver, B. Wustman, L. Taranto, J. Evans, D. E. Morse, *Biopolymers* **2003**, 70, 522-533; erratum in *Biopolymers* **2004**, 73, 291.
- [18] L. Treccani, K. Mann, F. Heinemann, M. Fritz, *Biophys. J.* **2006**, 91, 2601-2608.
- [19] X. Shen, A. Belcher, P. Hansma, G. Stucky, D. E. Morse, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 32472-32481.
- [20] D. Jackson, C. McDougall, K. Green, F. Simpson, G. Wörheide, B. Degnan, *B.M.C. Biol.* **2006**, 4, 40-49.
- [21] D. Jackson, G. Wörheide, B. M. Degnan, *BMC Evol. Biol.* **2007**, 7, 160-177.
- [22] L. Bédouet, F. Rusconi, M. Rousseau, D. Duplas, A. Marie, L. Dubost, K. Le Ny, S. Berland, J. Péduzzi, E. Lopez, *Comp. Biochem. Physiol. B* **2006**, 144, 532-543.
- [23] L. Bédouet, A. Marie, L. Dubost, J. Péduzzi, D. Duplat, S. Berland, M. Puisségur, H. Boulzaguet, M. Rousseau, C. Milet, E. Lopez, *Mar. Biotechnol.* **2007**, 9, 638-649.
- [24] J. G. Carter, *Skeletal Biomineralization: Patterns, Processes, and Evolutionary Trends*, Van Nostrand Reinhold, New York, **1990**.
- [25] J. Taylor, W. Kennedy, A. Hall, *Bull. Br. Mus. (Nat. Hist.) Zool. Lond.* **1969**, 3(suppl.), 1-125.
- [26] J. Taylor, *Palaeontology* **1973**, 16, 519-534.
- [27] B. Marie, G. Luquet, J. P. Pais de Barros, N. Guichard, S. Morel, G. Alcaraz, L. Bollache, F. Marin, *FEBS J.* **2007**, 274, 2933-2945.
- [28] T. Maren, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1960**, 130, 26-29.
- [29] S. Albeck, S. Weiner, L. Addadi, *Chem. Eur. J.* **1996**, 2, 278-284.
- [30] Q. I. Feng, G. Pu, Y. Pei, F. Z. Cui, H. D. Li, T. N. Kim, *J. Cryst. Growth* **2000**, 216, 459-465.
- [31] G. Fu, S. R. Qiu, C. A. Orme, D. E. Morse, J. J. De Yoreo, *Adv. Mater.* **2005**, 17, 2678-2683.
- [32] A. Matsushiro, T. Miyashita, H. Miyamoto, K. Morimoto, B. Tonomura, A. Tanaka, K. Sato, *Mar. Biotechnol.* **2003**, 5, 37-44.
- [33] J. Carter, G. R. Clark II in *Mollusk, Note for a Short Course, Studies in Geology 13* (Ed.: T. W. Broadhead), University of Tennessee Press, Tennessee, **1985**, pp. 50-71.
- [34] S. Lindskog, *Pharmacol. Ther.* **1997**, 74, 1-20.
- [35] K. Wilbur, L. Jodrey, *Biol. Bull.* **1955**, 108, 82-112.
- [36] K. Mitsunaga, K. Akasaka, H. Shimada, Y. Fujino, I. Yasumasa, H. Numanoi, *Cell Differ.* **1986**, 18, 257-262.

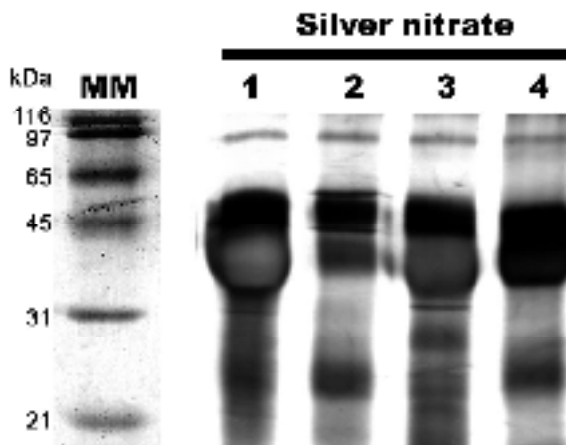
- [37] J. M. Lucas, L. W. Knapp, *Mar. Biol.* **1996**, 126, 471-477.
- [38] Z. Yu, L. Xie, S. Lee, R. Zhang, *Comp. Biochem. Physiol. B* **2006**, 143, 190-194.
- [39] M. A. Rahman, Y. Isa, T. Uehara, *Proteomics* **2005**, 5, 885-893.
- [40] S. Tambutti, E. Tambutti, D. Zoocola, N. Caminiti, S. Lotto, A. Moya, D. Allemand, J. Adkins, *Mar. Biol.* **2007**, 151, 71-83.
- [41] J. C. Meyran, F. Graf, J. Fournié, *Histochemistry* **1987**, 87, 419-429.
- [42] G. Borelli, N. Mayer-Gostan, P. L. Merle, H. De Pontual, G. Boeuf, D. Allemand, P. Payan, *Calcif. Tissue Int.* **2003**, 72, 717-725.
- [43] M. Chetail, J. Fournier, *Am. Zool.* **1969**, 9, 983-990.
- [44] S. Weiner, *Calcif. Tissue Int.* **1979**, 29, 163-167.
- [45] S. D. Douglas, H. D. Isenberg, L. S. Lavine, S. S. Spicer, *J. Histochem. Cytochem.* **1967**, 15, 285-291.
- [46] E. Greenfield, D. Wilson, M. Crenshaw, *Am. Zool.* **1984**, 24, 925-932.
- [47] L. Addadi, J. Moradian, E. Shay, N. G. Maroudas, S. Weiner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, 84, 2732-2736.
- [48] M. Crenshaw, H. Ristedt in *The Mechanisms of Mineralization in the Invertebrates and Plants* (Eds.: N. Watabe, K. M. Wilbur), University of South Carolina Press, Columbia, **1976**, pp. 355-367.
- [49] F. Nudelman, B. Gotliv, L. Addadi, S. Weiner, *J. Struct. Biol.* **2006**, 153, 176-187.
- [50] F. Marin, B. Pokroy, G. Luquet, P. Layrolle, K. De Groot, *Biomater.* **2007**, 28, 2365-2377.
- [51] L. Patthy, *Genetica* **2003**, 118, 217-231.
- [52] J. P. Simmer, J. C. Hu, *Connect. Tissue Res.* **2002**, 43, 441-449.
- [53] U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, 227, 680-685.
- [54] J. H. Morrissey, *Anal. Biochem.* **1981**, 117, 307-310.
- [55] F. Marin, L. Peirera, P. Westbroek, *Protein Expr. Purif.* **2001**, 23, 175-179.
- [56] F. Marin, M. Gillibert, P. Westbroek, G. Muyzer, Y. Dauphin, *Geol. Mijnb.* **1999**, 78, 135-139.
- [57] A. S. Edge, C. R. Faltynek, L. Hof, L. E. Reichert, P. Weber, *Anal. Biochem.* **1981**, 118, 131-137.
- [58] R. S. Wall, T. J. Oyl, *Anal. Biochem.* **1988**, 175, 298-299.
- [59] R. Lev, S. Spicer, *J. Histochem. Cytochem.* **1964**, 12, 309.
- [60] R. M. Zacharius, T. E. Zell, J. H. Morrison, J. J. Woodlock, *Anal. Biochem.* **1969**, 30, 148-152.
- [61] K. P. Campbell, D. H. MacLennan, A. O. Jorgensen, *J. Biol. Chem.* **1983**, 258, 11267-11273.
- [62] K. Maruyama, T. Mikawa, S. Ebashi, *J. Biochem.* **1984**, 95, 511-519.
- [63] L. Addadi, S. Weiner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, 82, 4110-4114.

5 – Résultats complémentaires

5.1 – Variabilité intra- et inter-spécifique

Dans une étude préliminaire, nous avons voulu tester la variabilité intra-spécifique des macromolécules de la matrice extraite de la nacre d'*Unio pictorum*. Les coquilles de quatre individus adultes de 14 à 16 cm de longueur ont été nettoyées et débarrassées du périostracum et de la couche prismatique, avant d'être broyées en une fine poudre, que nous avons par la suite décalcifiée à l'acide acétique 5%. Les matrices acido-solubles des différentes coquilles ont été purifiées par centrifugation/ultrafiltration et ont ensuite été analysées en SDS-PAGE après coloration des gels (contenant 12% de polyacrylamide) au nitrate d'argent. Sur la Figure 30, les composés majoritaires (P95, P50 et P29), observés sur des échantillons extraits de « pool » d'individus, sont également présents dans les coquilles isolées de ces quatre individus traitées séparément. On remarque cependant des différences d'intensité de coloration pour les bandes migrant à 50 et 29 kDa, suggérant que la quantité relative de ces composés varie légèrement d'un individu à l'autre.

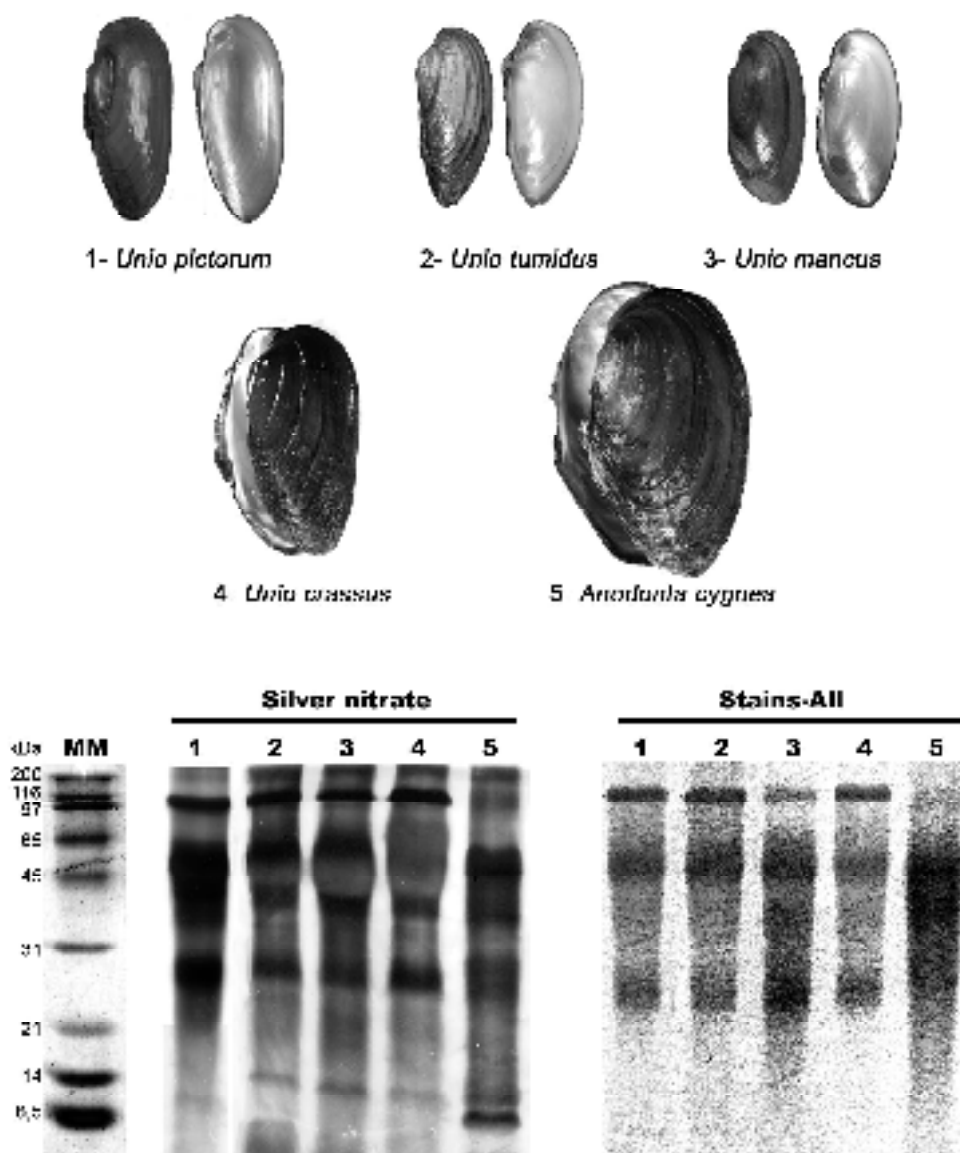
Figure 30 : Analyse en SDS-PAGE, chez *Unio pictorum*, de la matrice acido-soluble extraite de la couche nacrée de la coquille de quatre individus différents.



Nous avons également mené une étude préliminaire centrée sur différentes espèces d'Unionidae des cours d'eau européens. Celle-ci porte sur la variabilité inter-spécifique de la composition en macromolécules de la matrice acido-soluble de la nacre. Notons que le choix de l'étude de la matrice acido-soluble a été suggéré par le fait que cette matrice présente beaucoup plus de variabilité que la matrice acido-insoluble, lorsque l'on compare les matrices de différents mollusques (Weiner & Hood, 1975 ; Keith *et al.*, 1993). Le choix des espèces s'est porté sur des organismes du genre *Unio*, phylogénétiquement proche de notre espèce de

référence, ainsi que sur une espèce du genre *Anodonta*, qui est le plus proche du genre *Unio* (Källersjö *et al.*, 2005). Les extraits de coquilles des différents *Unio* (*U. pictorum*, *U. tumidus*, *U. mancus* et *U. crassus*) et d'*Anodonta cygnea* présentent de très grandes similitudes, les extraits d'*Unio* apparaissant même presque identiques sur gel d'électrophorèse. La matrice d'*Anodonta* comporte elle aussi une bande majoritaire migrant vers 45-50 kDa, une bande de masse moléculaire apparente proche de 29 kDa, ainsi qu'une faible bande aux alentours de 90 kDa. Notons que les similitudes de composition en macromolécules de ces différentes matrices sont également qualitatives. En effet, les différents composés présentent les mêmes réactivités avec des colorations plus spécifiques comme le PAS (résidus sacchariques), le bleu Alcian (sucres sulfatés) ou le Stains-All (capacité à lier les ions calcium).

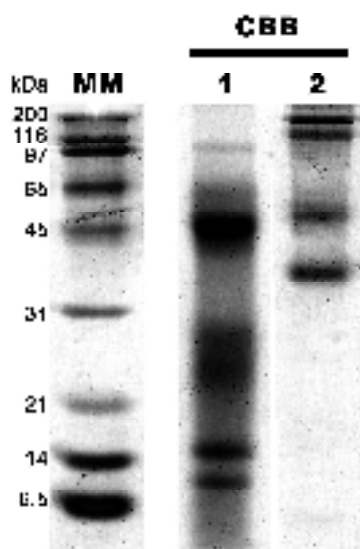
Figure 31 : Analyse en SDS-PAGE de la matrice acido-soluble extraite de la couche nacrée de la coquille de différentes espèces d'Unioinidae d'Europe.



5.2 – Fluide extrapalléal

Le fluide extrapalléal a été précautionneusement prélevé à l'aide d'une aiguille sur des individus adultes d'*Unio pictorum* maintenus en aquarium. L'extrait a ensuite été centrifugé 10 min à 14 000 rpm (4°C), puis le surnageant a directement été analysé en SDS-PAGE en conditions dénaturantes. Le profil électrophorétique du fluide extrapalléal a été comparé à celui de la matrice acido-soluble de la couche nacrée de la coquille. Notons que ce résultat a également été comparé avec celui obtenu à partir d'extrait de cellules du manteau et qu'il ne présente pas les bandes caractéristiques des composés cellulaires majoritaires de ce dernier (actines, tubulines, etc...). Le fluide extrapalléal présente une composition en macromolécules très différente de celle de la matrice coquillière. En effet, aucun composé ne migre aux mêmes masses apparentes dans les deux extraits. On dénombre essentiellement quatre bandes de masses moléculaires apparentes élevées (170, 130, 50 et 38 kDa). Ce résultat surprenant a été reproduit au laboratoire à deux reprises et mériterait des analyses complémentaires. Quoiqu'il en soit, nous pouvons d'ores et déjà proposer deux hypothèses alternatives pour expliquer ce résultat : 1) les protéines majoritaires du fluide extrapalléal ne sont pas intégrées dans la matrice de la coquille ; 2) les macromolécules observées dans le fluide extrapalléal sont des précurseurs de hauts poids moléculaires qui vont être clivés avant d'être intégrés à la matrice. Pour tester ces hypothèses, deux approches complémentaires pourraient être mises en œuvre : une analyse protéomique des macromolécules du fluide, et une analyse utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre des protéines de la matrice. Toutefois, l'hypothèse d'une contamination par les hémocyanines de l'hémolymphe reste également à tester.

Figure 32 : Composition du fluide extrapalléal d'*Unio pictorum* analysée en SDS-PAGE. Ligne 1, matrice acido-soluble extraite de la couche nacrée de la coquille ; ligne 2, fluide extrapalléal.



5.3 – Approche protéomique

Compte tenu des difficultés techniques rencontrées dans la mise en œuvre de l'analyse protéomique de la matrice acido-soluble de la nacre d'*Unio pictorum* par électrophorèse 2-DE couplée à l'analyse par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF MS/MS (article précédent), nous avons entamé une approche protéomique plus globale par ESI-QqTOF MS/MS (IBCP, Lyon). La Figure 33 présente les deux approches pratiquées ainsi que les données déjà acquises et restant encore à traiter: l'analyse de la matrice acido-soluble complète après digestion trypsique (Figure 33A) et l'analyse de différentes protéines purifiées en SDS-PAGE après digestion trypsique (Figure 33B). De très nombreuses séquences ont été obtenues par MS/MS suivie d'une interprétation *de novo* des spectres de fractionnement. Ces données sont en cours d'analyses *in silico* afin de détecter d'éventuelles similitudes avec des protéines déjà décrites chez d'autres organismes.

Plus de 150 séquences internes partielles ont été obtenues à partir de l'analyse de la matrice totale et plus de 100 l'ont été à partir des cinq protéines purifiées (Fig. 33A-B). Dans un premier temps, les peptides sont analysés à l'aide du logiciel MASCOT afin de comparer les profils MS/MS obtenus avec ceux des protéines déjà décrites dans les bases de données de génomique/transcriptomique/protéomique (EMBL, Swiss-Prot, GenBank...). Dans un second temps, les séquences obtenues par interprétation *de novo* des spectres MS/MS sont comparées à celles des protéines déjà décrites, afin de détecter des homologues de séquences. Compte tenu du fait que très peu de données de génome ou d'EST ne sont à ce jour disponibles chez les bivalves, il n'est pas surprenant que cette approche donne peu de résultats significatifs. Nous mettrons en œuvre par la suite une comparaison des nouvelles séquences avec celles obtenues à partir des matrices calcifiantes d'autres mollusques.

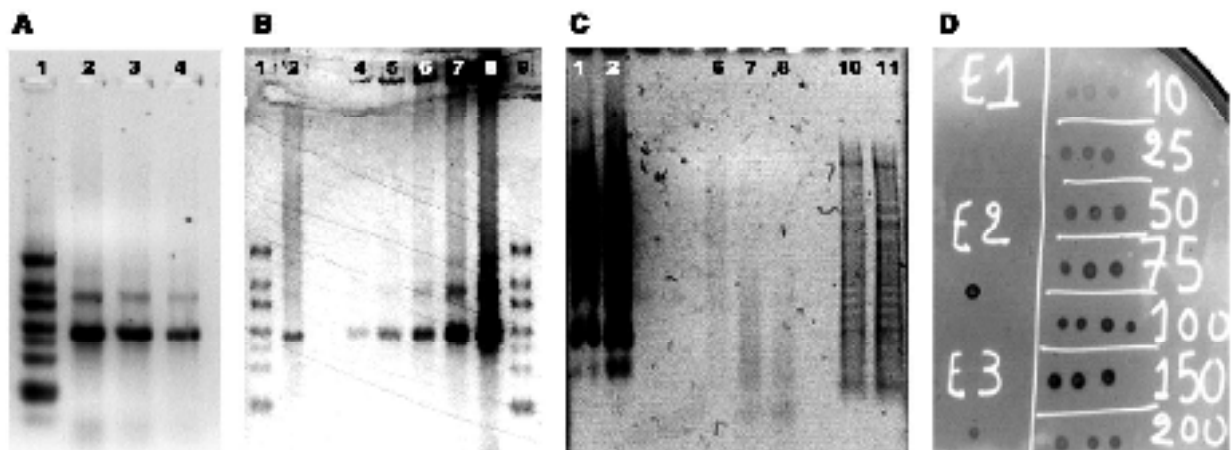
Au vu d'un premier traitement des données par le logiciel MS MASCOT, la protéine P12 présente une dizaine de peptides similaires à différents fragments d'une même protéine, une porine de 36 kDa de la membrane externe des bactéries (SwissProt Number P24305). La Figure 33C présente l'alignement obtenu avec les différentes séquences des fragments peptidiques de la P12 et avec la séquence primaire complète de la porine extra-membranaire de *Comamonas acidovorans*. Bien que ce résultat préliminaire reste encore à confirmer, il est à noter qu'à ce jour aucune protéine de ce type n'a été décrite à partir d'extraits de matrices calcifiantes. S'il est confirmé, ce résultat constituerait une originalité du modèle *Unio pictorum* et apporterait un scénario original d'évolution des protéines de matrice calcifiante chez ce bivalve.

5.4 – Construction d’une banque d’ADNc

Durant ce travail de thèse, nous avons également réalisé une banque d’expression d’ADNc construite à partir de cellules du manteau d’*Unio pictorum* en vue de la cribler et d’obtenir les séquences primaires de différents constituants de la matrice organique calcifiante. Nous présenterons sommairement les étapes déjà accomplies menant à la construction d’une banque d’expression secondaire ainsi que le travail restant à réaliser.

Ont été effectués à ce jour (Figure 34) : l’extraction des ARN totaux au Tri-Reagent ; l’extraction des ARNm à l’aide de microbilles oligo-dT ; la synthèse du 1^{er} brin d’ADNc (kit Zap Express®, Stratagene, La Jolla, USA) ; la synthèse du 2^{ème} brin d’ADNc ; la ligation des adaptateurs ; la phosphorylation des extrémités Eco-RI ; la purification des brins d’ADNc ; l’empaquetage ; la titration de la banque I^{aire} (10⁶ pfu) et l’amplification dans une banque II^{aire}.
Restent à réaliser : la titration de la banque secondaire, transfert et criblage. On peut envisager deux types de criblage : soit grâce à des sondes nucléotidiques dégénérées couplées à la digoxigenine dessinées à partir des séquences partielles déjà obtenues, soit grâce à des anticorps dirigés contre des protéines issues de la matrice.

Figure 34 : Construction d’une banque d’ADNc à partir de cellules du manteau d’*Unio pictorum*. A) Purification des ARN-totaux. Après extraction au Tri-Reagent, les ARN-totaux sont observés sur gel d’agarose 1,2%. On note la présence de deux bandes majoritaires correspondantes aux ARN 18S et 5S. Ligne 1, marqueurs moléculaires; lignes 2-3-4, ARN-totaux extraits. B) Extraction des ARNm. Après purification à l’aide de microbilles oligo-dT, les ARNm sont observés sur gel d’agarose 1,2%. Lignes 1 & 9, marqueurs moléculaires ; Ligne 2, ARNm extraits ; Lignes 4-8, ARNm totaux. C) Fractionnement des ADNc en fonction de leur taille. Après fractionnement sur colonne de Sépharose, les différentes fractions d’ADNc éluées sont observées sur gel d’agarose 1,2%. Lignes 1-2 & 10-11, marqueurs moléculaires ; lignes 6-7-8, fractions d’ADNc E1, E2 et E3, respectivement. D) Quantification des ADNc. La quantité d’ADN des fractions E1, E2 et E3 (à gauche) est estimée par comparaison avec différentes quantités d’un échantillon étalon (ADN de sperme de saumon, à droite).



6 – Les acquis des travaux effectués chez *Unio pictorum*

Même si notre étude de la matrice organique associée à la nacre de la coquille d'*Unio pictorum* ne nous permet pas encore de conclure définitivement quant à l'homologie de ces protéines avec celles déjà décrites chez d'autres bivalves nacriers (du genre *Pinctada*, entre autres), il est possible de dégager, au terme de ce travail, plusieurs informations.

- Alors que la matrice **acido-insoluble extraite de la nacre d'*Unio pictorum* est constituée entre autres de protéines hydrophobes et de chitine, la matrice acido-soluble est majoritairement composée de trois glycoprotéines acides portant des sucres sulfatés.** Ces glycoprotéines sont capables de lier le calcium grâce à leurs groupements saccharidiques. Il est aussi ressorti de notre analyse que ces **groupements saccharidiques étaient impliqués dans la capacité de ces molécules à interagir avec la formation du biominéral** (cela est dû à leur capacité à lier les ions calcium et à interagir avec la précipitation du carbonate de calcium, mais aussi à leur capacité à moduler l'acidité des glycoprotéines). **Même si l'implication des groupements saccharidiques dans les processus de calcification avait déjà été évoquée par le passé, elle n'avait jusque-là jamais été démontrée chez les mollusques.** Il reste à déterminer si ce résultat représente une constante insoupçonnée à toutes les matrices de nacre de mollusque ou s'il constitue une originalité exclusive du modèle *Unio pictorum*.

- Sur gel 2-D, on observe que l'ASM est constituée d'au moins une vingtaine de protéines différentes. De plus, on remarque que les différentes bandes polypeptidiques de l'ASM observées sur SDS-PAGE 1-D se décomposent en de nombreuses isoformes migrant entre les *pI* 3,5 et 7.

- En ce qui concerne leur acidité, **les trois glycoprotéines possèdent des *pI* semblables à ceux des autres protéines de nacre déjà décrites à ce jour.** Cette observation permet, à cet égard, de classer les protéines d'*Unio pictorum* dans le groupe homogène des protéines de nacre qui semblent jusqu'à présent toutes présenter un *pI* faiblement acide ou neutre.

- **La matrice acido-soluble d'*Unio pictorum* présente une activité enzymatique anhydrase carbonique, à l'instar d'autres bivalves appartenant au genre *Pinctada*.** Le constituant de la matrice portant cette activité reste à identifier. Bien que la fonction de cette enzyme semble

essentielle à la formation des biominéraux de carbonate de calcium, **son implication exacte dans les mécanismes de minéralisation des coquilles reste encore énigmatique.**

- **P95 est une glycoprotéine acide de pI 3-4, spécifique de la couche nacrée, capable de lier le calcium et qui interagit avec la précipitation du carbonate de calcium.** Sa composition en acides aminés suggère que cette protéine pourrait appartenir à la famille des lectines de type C.

- L'analyse protéomique et l'observation de la réactivité d'anticorps dirigés contre P95 nous montre que **les trois protéines majoritaires de l'ASM possèdent des épitopes identiques, notamment des séquences partielles internes, mais sans doute également des motifs saccharidiques.** Ces observations suggèrent que ces trois glycoprotéines pourraient avoir une origine commune et/ou que les plus petites dérivent du clivage de la P95.

- Une analyse protéomique, en cours, semble démontrer qu'une protéine de la matrice d'*Unio pictorum* de faible masse moléculaire, **P12, serait une homologue des porines de bactérie.** Ce résultat, à confirmer, constituerait la première observation de porine dans les matrices calcifiantes et tendrait à montrer qu'*Unio pictorum* **pourrait avoir, au moins sur ce point, une machinerie moléculaire originale par rapport à celle d'autres bivalves nacrés étudiés.**

Au vu de ces résultats, plusieurs pistes de recherche ultérieures paraissent particulièrement intéressantes à explorer :

- **L'étude approfondie de l'anhydrase carbonique de la matrice d'*Unio*.** Chez les mollusques, cette protéine a été décrite pour la première fois chez le bivalve *Pinctada fucata*. Appelée Nacrein, elle présente une protéine « homologue » chez le gastéropode *Turbo marmoratus*. Il serait particulièrement intéressant de déterminer si l'anhydrase carbonique, présente chez *Unio pictorum*, appartient elle aussi à la famille des protéines de type Nacrein. Pour ce faire, on peut envisager de mettre en œuvre **une approche par RT-PCR, couplée à une étude de protéomique, ainsi qu'une étude par purification biochimique couplée à une détection de l'activité enzymatique.**

- **L'étude approfondie des protéines de la matrice coquillière au sein des Unionoidea européens (genres *Unio*, *Anodonta* et *Margaritifera*).** Nos travaux préliminaires nous ont

montré que le cocktail des protéines constituant la matrice calcifiante était très semblable chez ces espèces phylogénétiquement proches. L'étude de l'évolution de ces protéines au sein de ce groupe, nous permettrait sans doute d'aborder la question de la pression de sélection et des vitesses évolutives qui s'exercent sur les gènes codant pour les protéines de matrice calcifiante. **Ce travail nécessiterait, chez *Unio pictorum*, une approche RT-PCR (à partir des séquences déjà obtenues par protéomique), suivie d'une RACE-PCR afin d'obtenir les séquences complètes. L'obtention d'une séquence complète d'une protéine de matrice chez *Unio pictorum*, permettrait alors d'envisager d'obtenir par RT-PCR celle des autres protéines étudiées et d'observer le degré de conservation de ces séquences.**

Chapitre III:
La biominéralisation de la coquille
chez *Nautilus macromphalus*

La biominéralisation de la coquille chez *Nautilus macromphalus*

1 - Introduction

1.1 - Description, biologie et cycle de vie

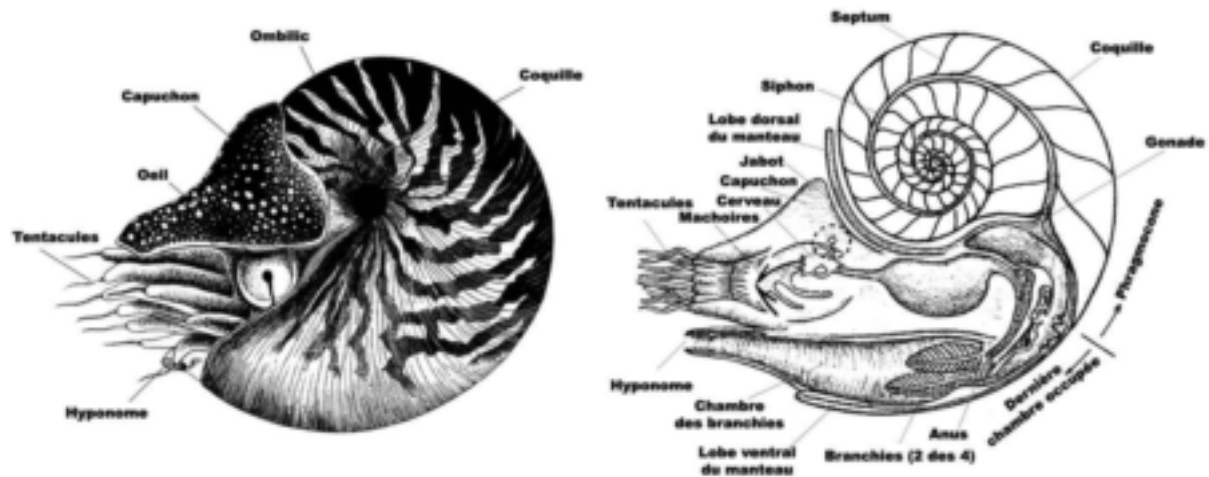
Les nautilus actuels sont des prédateurs marins pélagiques des eaux côtières tropicales du Pacifique Sud, répartis dans un secteur allant de l'Océan Indien à l'Australie. Ces organismes vivent sur les pentes externes des récifs coralliens, principalement entre 100 et 800 m de profondeur, et rarement dans les lagons. Ils peuvent remonter la nuit près de la surface pour se nourrir (essentiellement de crustacés et de petits poissons) ou se reproduire. On pense que vivre le jour en eaux profondes permet aux nautilus d'échapper à leurs prédateurs. Ces animaux possèdent de nombreuses adaptations physiologiques spécifiques (métabolisme aérobie très bas, hémoglobine à forte affinité pour l'oxygène) leur permettant de subsister dans ces eaux profondes, généralement hypoxiques.

La partie antérieure du pied est modifiée en tentacules préhensiles (environ 90), alors que la partie postérieure forme l'hyponome, qui permet à l'animal de se déplacer « à reculons » par émissions de jets d'eau. La Figure 35 présente une vue anatomique d'un nautilus. Le corps de l'animal est uniquement réparti dans la dernière loge de la coquille externe. Un capuchon calcifié permet de fermer complètement la coquille, protégeant ainsi tous les organes. Le système circulatoire est clos et l'animal possède un unique cœur contractile. En amont de la bouche, ces organismes possèdent deux pièces squelettiques mandibulaires calcifiées en forme de bec. Chez ces céphalopodes, et contrairement aux autres classes de mollusques, le système nerveux est très centralisé et forme un cerveau protégé par une capsule rigide remplissant la fonction de crâne. Les nautilus possèdent deux gros yeux pédonculés situés de chaque côté de la tête. Ces yeux, dépourvus de cristallin et fonctionnant selon le principe de « chambre noire », possèdent des pupilles contractiles laissant entrer plus ou moins de lumière. Contrairement aux Coleoidea (l'autre phylum des céphalopodes actuels), les nautilus possèdent deux paires de branchies, situées dans la cavité palléale, que l'animal ventile continuellement grâce à un courant d'eau produit par l'hyponome.

La coquille externe des nautilus est fortement calcifiée et présente une double fonction protectrice et hydrostatique. Elle est composée de carbonate de calcium et comprend une grande chambre d'habitation, contenant le corps de l'animal, ainsi qu'une série de chambres

cloisonnées (35 en moyenne chez un individu adulte). Lors de la croissance de l'animal, la coquille s'agrandit sur ses bords externes et forme successivement des nouvelles chambres pour atteindre sa taille maximale (de 150 à 250 mm selon les espèces) à la maturité sexuelle (environ 5-6 ans).

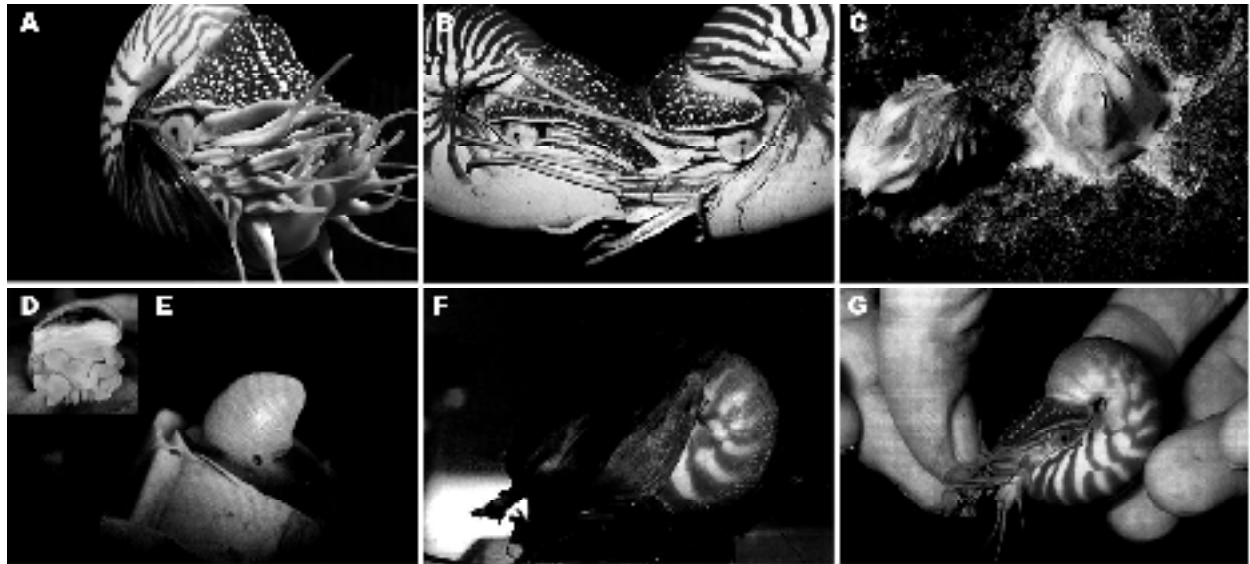
Figure 35 : Anatomie interne et externe de *Nautilus* sp. (modifié d'après Würtz, 1989 ; Westerman *et al.*, 2005).



Contrairement à la plupart des céphalopodes qui ne se reproduisent qu'une seule fois pendant leur vie, le nautilus peut se reproduire plusieurs fois (polycyclique) et possède une période de fécondité qui peut durer plusieurs années. Après la parade nuptiale, le mâle et la femelle s'enlacent au moyen de leurs tentacules pendant un accouplement qui peut durer jusqu'à 24 heures (Figure 36).

Les spermatophores sont introduits dans la cavité palléale de la femelle par un tentacule buccal spécialisé du mâle, le spadix. Les œufs fécondés subissent une segmentation partielle avec persistance d'une importante réserve vitelline. La période de ponte semble s'étendre sur toute l'année. La femelle nautilus peut pondre en moyenne entre un et deux œufs par mois (Norman, 2000). Deux semaines après l'accouplement, les œufs, particulièrement volumineux (25-35 mm pour 4 g), sont individuellement déposés sur un rocher (le plus souvent dans une cavité) et fixés grâce à une membrane souple qui est perforée à son sommet. Cette membrane laisse circuler l'eau de mer entre la gaine externe et la capsule ovale qui contient l'embryon et le vitellus. Le développement de la larve est direct et à l'éclosion, qui a lieu près d'un an après la ponte, le jeune ressemble en tous points à l'adulte. Il mesure alors près de trois centimètres et sa coquille possède déjà sept loges.

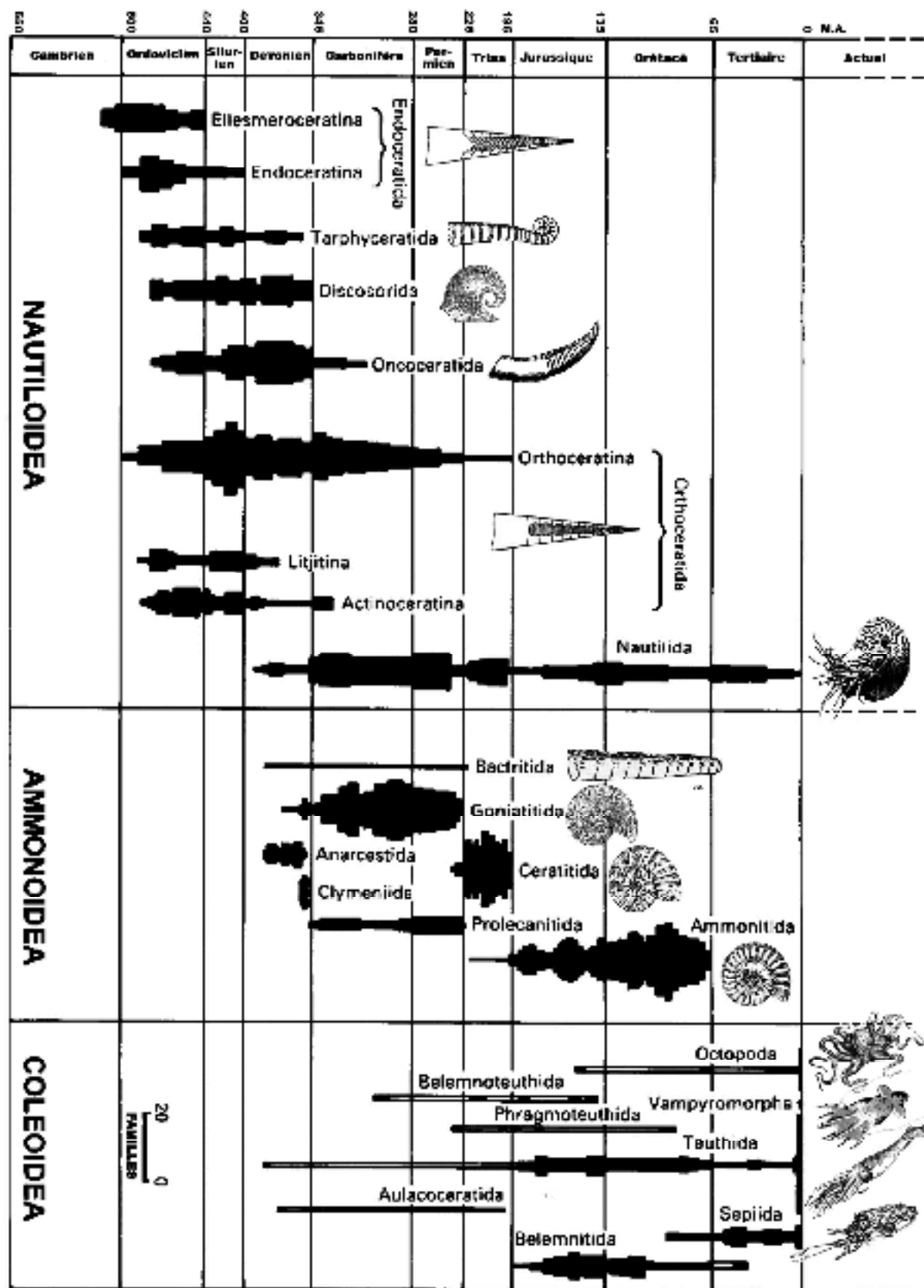
Figure 36 : Cycle de vie de *Nautilus* (modifié d'après Norman, 2000 ; Arnold J.©). A) *Nautilus* sp.. B) Accouplement face-à-face du nautilus. C) Les œufs volumineux sont fixés au rocher où ils vont continuer leur développement pendant un an. D-E) Larves de nautilus extraites de leur coquille à 1 mois et 4 mois, respectivement. F) Œuf de nautilus à 10 mois de développement. Durant la fin de l'incubation de l'œuf, la coquille perce la membrane de l'œuf alors que le reste de l'animal reste protégé à l'intérieur. G) À l'éclosion, le jeune mesure près de 3 cm et sa coquille possède 6-7 loges.



1.2 – Phylogénie et position taxonomique

Les céphalopodes sont des mollusques exclusivement marins dont les premiers fossiles, issus de la sous-classe des Nautiloidea, datent de la fin du Cambrien. On pense que les céphalopodes tirent leur origine d'un ancêtre qui ressemblait à un monoplacophore. Le plus vieux fossile de céphalopode connu est *Plectronoceras cambria* du Cambrien Supérieur (~510 M.A.). Ce groupe a connu une importante diversification lors de l'Ordovicien (~440-500 M.A., Figure 37), suivi d'importantes extinctions au cours du Paléozoïque. C'est au Carbonifère que les Nautiloidea connaissent l'apogée de leur diversité avec près de 75 genres. La sous-classe des Coleoidea (à laquelle appartiennent tous les céphalopodes actuels à l'exception du nautilus) semble, quant à elle, être apparue au cours du Dévonien (~350 M.A.). Les sous-classes des Nautiloidea et des Coléoidea ont connu un déclin important au cours du Tertiaire, mais ont perduré jusqu'à nos jours. Les nautilus constituent les seuls représentants des céphalopodes à coquille externe calcifiée depuis la disparition massive des Ammonoidea au cours de la crise Crétacé/Tertiaire (65 M.A.). Les seuls représentants actuels des Nautiloidea sont des Nautilidae (seul groupe de la sous-classe à avoir franchi la crise du Permo-Trias). La famille des Nautilidae, à laquelle appartient le genre *Nautilus*, semble avoir conservé la plupart des caractères morphologiques ancestraux propres au phylum.

Figure 37 : Diversité et abondance des différentes sous-classes de céphalopodes au cours des temps géologiques (modifié d'après House, 1988).



De nombreuses espèces de nautilé ont été décrites sur la base d'observations de caractères morphologiques, mais des études phylogénétiques récentes prenant en compte des données moléculaires (gènes mitochondriaux) n'ont distingué que trois espèces réparties en deux genres : *Nautilus macromphalus*, *Nautilus pompilius* et *Allonautilus scrobiculatus*. Depuis une dizaine d'années, des études suggèrent que l'origine de la spéciation de ces espèces est relativement récente (quelques millions d'années) et que ce genre connaît actuellement une période de diversification génétique (Wray *et al.*, 1995 ; Bonnaud *et al.*, 2004). L'espèce *Nautilus macromphalus* (Sowerby, 1948) est endémique des côtes de la Nouvelle-Calédonie, des îles de la Loyauté et du nord de l'Australie. Chez cette espèce, l'ombilic est tout particulièrement marqué et les coquilles mesurent jusqu'à 18-20 cm.

1.1 – Description de la coquille

Comme chez tous les mollusques conchifères, la croissance de la coquille de *Nautilus* est continue durant toute la vie de l'animal. La coquille est sécrétée par un épithélium hautement différencié, le manteau, qui entoure la partie viscérale du corps de l'animal (Westermann *et al.*, 2004). La coquille des nautilé est considérée comme étant un tissu calcifié homologue à celui de l'ensemble des mollusques conchifères. Elle se développe dès les premiers stades larvaires de l'animal (Figure 36 D-E). Chez les Nautilida, la coquille présente la particularité d'être enroulée et divisée en loges de taille croissante. La coquille des nautilé constitue un enregistrement de la vie et du développement de l'animal. Cette propriété est utilisée pour déterminer les conditions physico-chimiques de l'environnement dans lequel évoluent les stades juvéniles (Auclair *et al.*, 2004) ou pour retracer l'ontogénie de l'animal (Landman *et al.*, 2003).

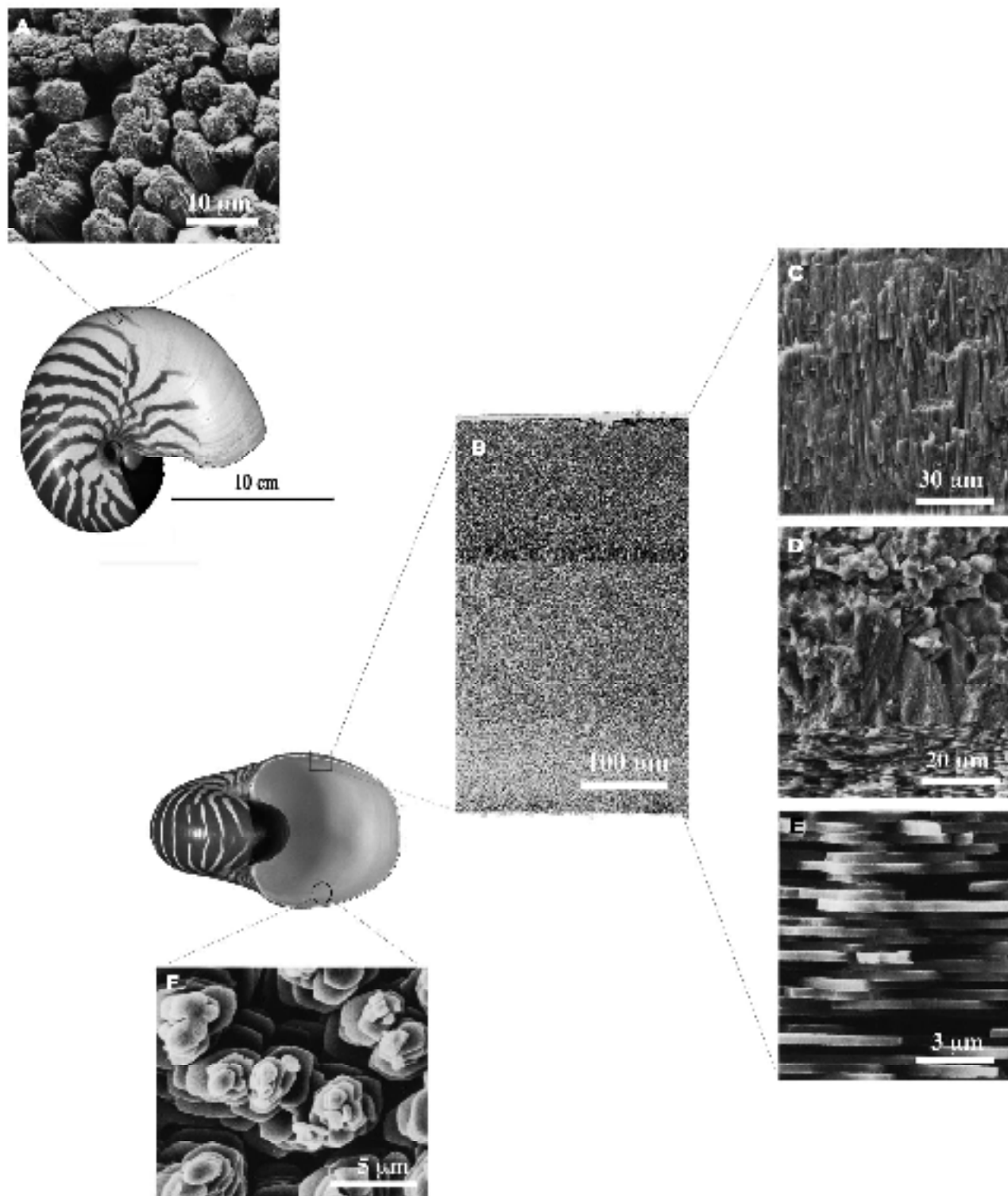
Chez cet animal, le rôle de la coquille est double. Elle sert aussi bien à protéger le corps de l'animal contre des prédateurs (poissons), qu'à assurer sa flottabilité. En effet, les chambres cloisonnées de la coquille contiennent principalement un gaz composé à plus de 90% d'azote, à une pression d'environ 0,7-0,9 Atm et du liquide en faible quantité. Ce volume de gaz permet à l'animal de compenser le poids important de sa coquille et d'adapter sa densité moyenne à celle de l'eau de mer, procurant ainsi à l'animal une flottabilité neutre. La coquille résiste à la pression hydrostatique de l'eau environnante jusqu'à 800 m de profondeur, la pression et le volume de gaz dans la coquille étant indépendants de la profondeur. Les nautilé peuvent ainsi flotter dans toute la gamme des profondeurs auxquelles ils évoluent sans avoir à changer significativement le volume de gaz contenu dans leur coquille. Notons cependant,

que les nautilus sont capables d'ajuster légèrement la quantité de liquide présent dans les chambres de leur coquille grâce à leur siphon. Le siphon constitue un mince tube enveloppé par une gaine calcifiée et protéique qui va de la partie la plus postérieure de l'animal à la loge la plus interne (ancienne) de la coquille. En effet, le corps de l'animal n'occupe que la dernière loge formée, mais reste en contact avec les loges précédentes par un ligament dorsale qui traverse l'ensemble des loges au travers du siphon, permettant ainsi la régulation de la pression des loges.

Comme la coquille de nombreux céphalopodes aujourd'hui disparus, celle des nautilus est entièrement aragonitique et est composée de deux couches minéralisées : la couche externe est prismatique tandis que la couche interne est nacrée (Figure 38). L'ensemble de ces couches est partiellement recouvert d'une très fine couche organique, le périostracum (Westermann *et al.*, 2004). Celui-ci sert de support à la croissance de la phase minérale, lors de la séquence de formation du biominéral (Towe & Hamilton, 1968). Notons que, dans la zone d'attachement des muscles, la couche interne de la coquille est de structure sphérulitique et que dans la zone des septa, cloisons qui séparent les différentes loges, la coquille est composée sur toute son épaisseur par une couche uniforme de nacre (Meenakshi *et al.*, 1974). L'ensemble de la coquille de *Nautilus* est aragonitique (prismes + nacre + sphérules). Une étude cristallographique aux rayons-X a montré que la couche nacrée présente des similitudes de structures avec celles des gastéropodes et des monoplacophores (Chateigner *et al.*, 2000). À échelle micrométrique, la nacre du nautilus présente la structure classique de la nacre colonnaire, telle qu'elle est décrite chez les gastéropodes (*e.g. Haliotis*) (Velasquez *et al.*, 2006).

La nacre de nautilus a été l'objet de nombreux travaux pionniers de caractérisation de la matrice organique extraite du biominéral (Goffinet, 1969 ; Goffinet & Jeuniaux, 1979). C'est Grégoire (1962) qui en premier observa la matrice organique située autour des tablettes de nacre et, depuis, de nombreux travaux sont venus compléter ses observations. La matrice organique de la nacre de *Nautilus* représente 4-5% du poids total du biominéral et est composée de protéines, de glycoprotéines (Crenshaw & Ridstet, 1975 ; Weiner *et al.*, 1975, Keith *et al.*, 1993 ; Dauphin, 2006) et d'une fraction importante de chitine (Goffinet & Jeuniaux, 1979 ; Weiner & Traub, 1980). Jusqu'à présent, peu d'études se sont penchées sur la caractérisation des macromolécules de cette matrice et seules trois courtes séquences partielles de protéines ont été décrites (Yano *et al.*, 2003).

Figure 38 : La coquille de *Nautilus macromphalus*: observations au MEB (modifié d'après Meenakshi, 1974 (A,C-F) ; observations personnelles (B). A) Couche prismatique externe en vue externe. B) Epaisseur de la coquille sur cassure fraîche, en vue transversale. C-D-E) Couche prismatique, limite entre la couche prismatique et la couche nacrée, et couche nacrée sur cassure fraîche, respectivement, en vues transversales. F) Couche nacrée en formation, en vue interne.



1.4 – Echantillonnage

Des individus adultes appartenant à l'espèce *Nautilus macromphalus* ont été pêchés dans les eaux côtières de Nouvelle-Calédonie. Les coquilles ont été prélevées à l'Aquarium de Nouméa sur des organismes mesurant entre 12 et 15 cm. Les coquilles ont été précautionneusement nettoyées par un bain prolongé dans de l'hypochlorite de sodium afin de retirer toutes traces de contaminants exogènes ou de tissus non calcifiés. Les coquilles ont ensuite été abondamment rincées à l'eau déminéralisée, puis séchées, avant d'être étudiées.

1.5 – But de l'étude

D'un point de vue évolutif, la nacre constitue un modèle d'étude fascinant. Premièrement, elle est apparue très tôt dans les enregistrements fossiles et a perduré jusqu'à nos jours. Deuxièmement, la nacre est considérée comme une microstructure « primitive » dont la formation nécessite l'incorporation d'une grande quantité de matrice organique calcifiante. Troisièmement, la présence de nacre est restreinte au phylum des mollusques, et appartient aux coquilles de représentants de quatre des cinq classes de mollusques conchifères. De ces constatations semblent se dégager une question essentielle : est-ce qu'à l'origine des mollusques conchifères, les types de nacre présents chez différentes classes étaient construits à partir d'un assemblage macromoléculaire similaire ? À ce jour, les compositions macromoléculaires des matrices associées à la nacre ont été décrites chez certains bivalves et certains gastéropodes, et très peu de données sont disponibles chez les céphalopodes et les monoplacophores.

Notre étude a pour but de caractériser par des techniques de biochimie les différents constituants de la matrice calcifiante extraite de la coquille du céphalopode Nautiloidea, *Nautilus macromphalus*. Notre objectif est de déterminer si la nacre du nautilé est construite avec les mêmes outils macromoléculaires que celle des gastéropodes du genre *Haliotis*, ou que celle des bivalves des genre *Pinctada* et *Pinna*, qui servent couramment de modèle pour l'étude de la biominéralisation chez les mollusques.

Nous avons concentré notre attention, au sein de l'article de recherche présenté ci-après, sur l'étude des composés organiques de la couche nacrée, notamment les protéines et les glycoprotéines. Cet article, présenté ici en langue anglaise dans son format de soumission, est précédé d'un résumé en français. Dans ce travail, nous avons notamment souligné l'importance du rôle de la fraction saccharidique des glycoprotéines dans les processus de

minéralisation de la nacre. Parallèlement, nous avons mené une approche protéomique de la matrice soluble et de la matrice insoluble extraites de la nacre. Enfin, nous discutons de l'implication de nos résultats dans les mécanismes de formation de la nacre, ainsi que dans l'évolution des protéines associées à cette microstructure chez les mollusques.

Le lecteur trouvera en fin de chapitre quelques résultats complémentaires acquis récemment, une conclusion retraçant les résultats majeurs obtenus dans le cadre de cette étude, leurs implications, ainsi que les questions qu'ils soulèvent et les pistes de recherches ultérieures à suivre.

2 –Evolution of nacre : biochemistry and ‘shellomics’ of the shell organic matrix of the cephalopod *Nautilus macromphalus*. (Soumis à *J. Biol. Chem.*)

Résumé

Chez les mollusques, la structure coquillière calcifiée la plus étudiée est la nacre. Cette couche aragonitique iridescente est présente en position interne des coquilles de plusieurs bivalves, de quelques gastéropodes et d'un céphalopode, le nautilus. À l'instar d'autres textures coquillières, la nacre contient une fraction mineure de composés organiques qui sont impliqués dans de nombreux processus de formation du biominéral. Même si la matrice organique associée à la nacre a fait l'objet de nombreuses caractérisations moléculaires, la grande majorité des informations disponibles provient de l'étude de deux modèles biologiques, l'huître perlière *Pinctada sp.* et l'ormeau *Haliotis sp.*. Dans ce travail, nous avons caractérisé par des techniques biochimiques la matrice organique extraite de la nacre du céphalopode *Nautilus macromphalus*. La matrice acido-soluble est constituée d'un cocktail de protéines, de glycoprotéines et de polysaccharides, qui sont capables d'inhiber la précipitation du carbonate de calcium *in vitro*, qui interagissent avec la formation de cristaux de calcite, et qui sont également aptes à lier les ions calcium en solution. Bien que la fraction polysaccharidique de cette matrice ne soit pas impliquée dans la capacité à lier les ions calcium, elle participe significativement à la modulation de la forme des cristaux de calcite précipités *in vitro*. De plus, nous avons mis en oeuvre une approche de protéomique appliquée à l'étude des matrices acido-soluble et acido-insoluble de la nacre, mais également à celle des protéines de la matrice soluble purifiées par électrophorèse à deux dimensions. Nos données démontrent que ces deux matrices contiennent de nombreuses séquences peptidiques communes. De plus, alors que la majorité des nouvelles séquences partielles obtenues ne correspondent à aucune protéine déjà caractérisée à partir des matrices organiques des coquilles de mollusques, certaines sont partiellement semblables à des protéines de coquilles de bivalves. Nos résultats ont des répercussions sur les scénarios macro-évolutifs des matrices calcifiantes des coquilles de mollusques.

N.B. : les données de MS/MS et leurs interprétations pour le séquençage *de novo* sont présentées dans les annexes situées en fin de manuscrit.

EVOLUTION OF NACRE: BIOCHEMISTRY AND 'SHELLOMICS' OF THE SHELL
ORGANIC MATRIX OF THE CEPHALOPOD *NAUTILUS MACROMPHALUS*

Benjamin Marie^{1,2*}, Frédéric Marin^{1,2*}, Arul Marie³, Laurent Bédouet⁴, Lionel Dubost³, Gérard Alcaraz^{5,2}, Christian Milet⁴ and Gilles Luquet^{1,2*}

¹ UMR CNRS 5561 Biogéosciences, 21000 Dijon, France

² Université de Bourgogne, 21000 Dijon, France

³ Département RDDM, Plateforme de Spectrométrie de Masse et de Protéomique, MNHN, 75231 Paris, France

⁴ UMR CNRS 5178, Biologie des Organismes Marins et Ecosystèmes, MNHN, 75231 Paris, France

⁵ UPSP PROXISS, Département Agronomie Environnement, ENESAD, 21000 Dijon, France

Running title: Organic shell matrix of *Nautilus macromphalus*

Keywords: Biomineralization/organic shell matrix/calcium-binding protein/proteomic/molluscan shell nacre

This work was supported by an “Aide Concertée Incitative Jeunes Chercheurs” (ACI JC3049) awarded to F. Marin by the French Ministère Délégué à la Recherche et aux Nouvelles Technologies, between 2003 and 2006. B. Marie is financed by a PhD Fellowship (N°15351) from the Ministère Délégué à la Recherche et aux Nouvelles Technologies. This work is supported by an ANR project for the period 2007-2010 (ACCRO-Earth, ref. BLAN06-2_159971, coordinator Gilles Ramstein, LSCE, Gif/Yvette). The “Conseil Régional de Bourgogne” (Dijon, France) provided additional supports for the acquisition of new equipment in the Biogéosciences research unit (UMR CNRS 5561).

*To whom correspondence may be addressed:

B. Marie, G. Luquet or F. Marin, UMR 5561 CNRS, Biogéosciences,
Université de Bourgogne, 6 Bd. Gabriel F-21000, France

Tel: +33 3 80 39 63 72

Fax: +33 3 80 39 63 87

benjamin.marie@u-bourgogne.fr

gilles.luquet@u-bourgogne.fr

frederic.marin@u-bourgogne.fr

SUMMARY

In mollusks, one of the most studied shell texture is the nacre, also called mother-of-pearl, the lustrous aragonitic layer that constitutes the internal part of the shell of several bivalves, a few gastropods and one cephalopod, the nautilus. Like other shell texture, nacre contains a minor organic fraction, which displays a wide range of functions in relation with the biomineralization process. Although the nacre matrix is the focus of numerous characterizations at the molecular level, most of our knowledge arises from two biological models, the pearl oyster *Pinctada* sp. and the abalone *Haliotis* sp. In the present paper, we have characterized biochemically the nacre matrix of the cephalopod *Nautilus macromphalus*. The acido-soluble matrix contains a mixture of polydisperse and discrete proteins, glycoproteins and proteoglycans,

which inhibits the *in vitro* precipitation of calcium carbonate, interacts with the formation of calcite crystals, and binds calcium ions in solution. Although the saccharidic moieties are not involved in binding calcium, they participate to the modulation of the shape of calcite crystals grown *in vitro*. In addition, we have used a ‘shellomic’ approach (proteomics applied to the shell matrix) on the acetic soluble and acetic insoluble matrices, as well as on spots obtained after 2-D electrophoresis. Our data demonstrate that the so-called insoluble and soluble matrices contain numerous shared peptides. Furthermore, while most of the obtained partial sequences do not fit with known molluscan shell proteins, few of them partly match with shell proteins of bivalvian origin. Our findings have implications in the knowledge of the macro-evolution of molluscan shell matrices.

INTRODUCTION

The calcification of the molluscan shell is a genetically controlled process. It results from the subtle interactions between an extracellular matrix, which is synthesized by the epithelial cells of the calcifying mantle, and the mineral ions precursors of calcification (calcium, bicarbonate, and minor elements such as magnesium). The proteins, glycoproteins and polysaccharides that are incorporated within the forming shell and which constitute the shell matrix, are supposed to display several key-functions in biomineralization [1]: to provide an organic template for mineral growth, to create locally physico-chemical conditions for promoting nucleation, to select the calcium carbonate polymorph (calcite *versus* aragonite), to guide the mineral growth in privileged directions, to organize the crystal architecture in well-defined microstructures, and to inhibit the crystal growth when necessary [2]. In addition, the matrix is suspected to possess a feedback signaling function towards the mantle epithelial cells [3, 4].

For several reasons related to its economical interest and to its remarkable mechanical properties, nacre is by far the most studied molluscan shell texture. On a structural viewpoint, it consists of a regular superimposition of polygonal flat aragonitic tablets of 0.5- μm thickness, embedded in a peripheral thin organic matrix [5, 6]. Recent ultrastructural advances have shown that each nacre tablet exhibits a hierarchical organization [7] and is composed of nano-domains [8]. Furthermore, the interface between the organic and the mineral phases exhibits a thin layer of ACC [9]. In parallel to these investigations, biochemical characterizations have shown that the nacre matrix comprises a wide set of macromolecular components: chitin, hydrophobic 'framework' proteins [10, 11], proteins with elastomeric properties [12] and soluble proteins and glycoproteins, with diverse functional domains: enzymatic [13, 14], lectin-type [15], mucin-like [16], growth factor-binding [4]. At present days, about fourteen completely sequenced and twelve partially characterized proteins have been shown to be specifically associated with nacre tissues [17, 18]. For few years, one assists to the emergence of new dynamic models of nacre formation, which try to conciliate both

biochemical and ultrastructural data [1]. Are particularly emphasized the prominent role played by chitin in structuring spatially the organic framework [1, 19], the distribution of key biochemical functions at the surface of nacre tablets [20], the likely existence of a transient precursor amorphous phase [21], the growth of nacre tablets in a hydrophobic gel, which subsequently becomes insoluble when nacre tablets reach coalescence [22].

From an evolutionary viewpoint, nacre constitutes also a fascinating model of study. First, nacre appeared early in the fossil record [23], somewhere in the Cambrian period, and since then, has been remarkably perennial throughout the whole Phanerozoic time until now. Secondly, nacre is usually considered as a rather primitive texture [24], with its high organic content required for controlling the mineralization process [25]. Thirdly, nacre is restricted to the phylum Mollusca, where it occurs in four of the five classes that constitute the conchiferan mollusks, namely monoplacophorans, bivalves, gastropods and cephalopods [24, 26]. Such a phylogenetic distribution in association with the apparent textural stability of nacre throughout the geological times give rise to two fundamental questions: at the origin of the diversification of conchiferan mollusks, were all nacre textures constructed from similar 'matrix assemblages' – among which matrix proteins - or did the different classes develop specific 'macromolecular tools' for controlling their nacre biomineralization? Consequently, are the nacre matrix proteins evolutionary constrained or not? Giving an answer to these questions will shed a light on the process of recruitment of shell matrix proteins at the dawn of the Cambrian, and on their subsequent evolution during the Phanerozoic times.

To this end, we investigated the biochemistry of the nacre matrix of the cephalopod *Nautilus macromphalus*. The choice of this biological model is dictated by the basal position of the genus *Nautilus* in the diverse phylogenetic trees of the class Cephalopoda [27]. It is the representative of the order Nautiloidea, the most ancient lineage among extant cephalopods [28] and the single one to have conserved an external calcified shell with a nacro-prismatic texture, truly homologous to that of bivalve or gastropod. In an evolutionary perspective, the comparison of the shell secretory repertoire of nautilus with

those of better-known models, such as the pearl oyster bivalve *Pinctada* or the gastropod abalone *Haliotis*, is fully relevant. Furthermore, although the nautilus has been the focus of several ultrastructural studies [5, 29-36] and of different biochemical characterizations on the bulk shell matrix [10, 37-45], an extremely limited number of papers deal with the characterization of its macromolecular components [46-48] and only 3 N-terminal sequences of 13, 15, and 6 amino acid residues are available so far [49]. The present work attempts to fully characterize the shell nacre matrix of the nautilus by combining the biochemical and proteomics approaches. Furthermore, it emphasizes the key-role displayed by saccharidic moieties in the modulation of calcium carbonate crystals. At last, it catches a first glimpse on the macroevolution of matrix proteins associated with nacre tissues.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Shell material. Fresh shells of 20/25-mm length of the cephalopod *Nautilus macromphalus* were collected on the coast of New Caledonia (Pacific). For direct microscopic observations, cleaned freshly fragmented shells were carbon-sputtered and directly observed in the secondary electron mode with a JEOL 6400 scanning electron microscope at the “Laboratoire de Réactivité des Solides”, Dijon.

Shell preparation and matrix extraction. Most of the external prismatic layer was removed by abrasion under cold water. Whole shells were mechanically crushed and fragment of the siphon were removed. The shell fragments were immersed in 1% (v/v) NaOCl for 24 h to remove the periostracum and superficial contaminants, then thoroughly rinsed with water. All the following extraction procedure was performed at 4°C. The shell powder (< 200 μ m) was decalcified overnight in cold dilute acetic acid (5% v/v) added by an automatic titrimeter (Titronic Universal, Schott), until pH 4. The solution was centrifuged at 3900 g (30 min). The pellet, corresponding to the acido-insoluble matrix (AIM), was rinsed 6 times with milliQ water and finally freeze-dried. The supernatant comprising the acido-soluble matrix (ASM) was filtered (5 μ m) before being concentrated with an Amicon ultrafiltration system on a

Millipore® membrane (YM10; 10-kDa cut-off). The concentrated solution (about 5-10 mL) was extensively dialyzed against MilliQ water (3 days, several water changes) before being freeze-dried and weighed.

Infrared spectra analysis. Infrared spectra were directly recorded from dry lyophilized samples at a 2 cm^{-1} resolution on a Fourier Transform Infra Red (FTIR) spectrometer Ucker Vector 22 equipped with a Specac Golden Gate™ ATR device in the wave number range of 4000-500 cm^{-1} . For each extract, we obtained several spectra with a high reproducibility.

Shell matrix analysis on mono-dimensional gel electrophoresis. The separation of matrix components was performed under denaturing conditions by mono-dimensional sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) containing 12% polyacrylamide (Mini-protein 3; Bio-Rad). Protein concentration of the ASM was estimated by using the BCA-200 Protein Assay kit (Pierce, Rockford, US). The ASM was directly suspended in Laemmli sample buffer containing β -mercaptoethanol and heat-denatured [50]. Fifty micrograms of ASM were loaded in each well. One mg of AIM was partly dissolved in 400 μ L 8 M urea at 60 °C (2 h). Twenty μ L of urea-soluble AIM were loaded on gel after heat-denaturation with Laemmli sample buffer.

Because the classical CBB staining is often inefficient to reveal all the proteins associated with calcified tissues, we chose to visualize proteins on gel with both silver nitrate [51] and Coomassie brilliant blue (CBB) R-250. For checking the reproducibility of the extraction and the variability of matrix composition, we performed different decalcifications from single shells.

Amino acid composition of ASM and AIM. The amino acid compositions of the two fractions were determined by Eurosequence (Groningen, The Netherlands). Freeze-dried samples were hydrolyzed with 5.7 M HCl in the gas phase for 1.5 h at 150°C. The resulting hydrolysates were analyzed on an HP 1090 Aminoquant [52] by an automated two-step precolumn derivatization with o-phthalaldehyde (OPA) for primary and N-(9-fluorenyl)methoxycarbonyl (FMOC) for secondary amino acids. Cysteine residues were quantified after oxidation. The hydrolysis procedure does not allow the quantification of tryptophan residues.

Saccharide analysis of AIM and ASM. Composition of neutral monosaccharides was determined as follows. Lyophilized sample matrices (100 μ g) were hydrolyzed in 100 μ l of 2 M trifluoroacetic acid (TFA) at 105°C for 4 h. Samples were evaporated to dryness before being resuspended with 100 μ l of 20 mM NaOH. The neutral and amino sugar contents of the hydrolysates were determined by high performance anion exchange-pulsed amperometric detection (HPAE-PAD) on a CarboPac PA100 column (Dionex P/N043055), according to the Dionex corp. instructions. Non-hydrolyzed samples were analyzed similarly, in order to detect free monosaccharides that could have contaminated the sample during dialysis. This technique does not allow the quantification of sialic acids, which are destroyed during hydrolysis with TFA.

Sialic acid determination was performed by HPAE-PAD after a moderate hydrolysis (0.5 M acetic acid, 3 h, 80°C), as described by Rohrer [53]. The solution containing the released sialic acids was centrifuged and filtered (Centricon, 3-kDa cut-off), then dried under vacuum. Samples were re-dissolved in Milli-Q water for measurement.

The direct 1,9-dimethylmethylene blue (DMB) method for quantifying sulfated polysaccharides [54] was adapted for microplate reading at 655 nm using the Blyscan™ kit provided by Biocolor (Newtownabbey, UK). Chondroitin-4-sulfate was used as a standard for the quantification of matrix sulfated sugars.

Biochemical characterization of ASM on ID-gels. Putative glycosylations of ASM macromolecules were studied qualitatively. Saccharide moieties were investigated on denaturing mini-gels by using PAS [55] and Alcian Blue 8GX staining [56], which, at pH 1, is specific of sulfated sugars [57].

The calcium-binding ability of the ASM was investigated by 'Stains-All' (cationic carbocyanine dye) staining [58] and by the ^{45}Ca overlay test [59]. For the second one, the gel was transferred on a PVDF Immobilon-P membrane (Millipore Corp.), with a mini-Trans Blot module (Bio-Rad) for 90 min at 120 mA. The membrane was subsequently incubated 3 times 20 min in an overlay buffer (60 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 10 mM imidazole-HCl, pH 6.8), then 30 min in the same buffer containing $^{45}\text{CaCl}_2$ (40

MBq/liter, 1.4 μM). After a brief washing (50% ethanol, 2 x 2 min), the membranes were air-dried and exposed to a film (X-Omat, Kodak) for 1 week. Troponin C, a calcium-binding protein (T1771; Sigma), was used as a positive control.

At last, the ASM was tested against rabbit polyclonal antibodies raised against ASM of the pearl oyster *Pinctada margaritifera* [60]. To this end, the ASM was transferred on a PVDF membrane, which was subsequently treated as previously described [16]. The second antibody used was a goat anti-rabbit, peroxidase-conjugated, antibody (A6154; Sigma). The peroxidase activity was revealed by chemoluminescence, after a 5 min-incubation in luminase buffer, and a quick exposition to an X-Omat film.

In vitro inhibition of calcium carbonate precipitation. ASM were subsequently assayed for *in vitro* inhibition of calcium carbonate precipitation [61]. Three ml of 40 mM CaCl_2 were rapidly added to 3 mL of 40 mM NaHCO_3 containing variable amounts of protein extract (1-100 μ g). For each experiment, the pH was constantly recorded with a combined glass electrode coupled with a pH-meter (Crison, model GLP21), connected to a computer. Each concentration was tested in triplicate. Blank tests were performed in absence of protein. Positive controls were performed with poly-L-aspartic acid (Sigma).

ASM deglycosylation and calcium-binding ability. Chemical deglycosylation of 5 mg of ASM was performed with 1.5 mL of TFMS/anisole (2:1, v/v) for 3 h, under N_2 atmosphere, with constant stirring [62]. The temperature was maintained at 0°C, to preclude peptidic bond hydrolysis. After neutralisation with 2 mL of 50% cold pyridine, the aqueous phase was extracted twice with diethyl ether and then extensively dialyzed against water (5 days) before being lyophilized. Fetuin was treated similarly and used as a positive control. All the deglycosylated extracts were analyzed on mono-dimensional SDS-PAGE and monosaccharide composition of the deglycosylated ASM was controlled by HPAE-PAD.

To test the effect of glycosyl moieties on the calcium-binding ability of the ASM, similar amounts of native and chemically deglycosylated extracts were dot-blotted on a PVDF membrane. The membrane was treated

with ^{45}Ca as described above for the calcium overlay test.

Growth of calcite crystals in the presence of native and deglycosylated ASM. CaCO_3 precipitation was performed *in vitro* by slow diffusion of ammonium carbonate vapor in a calcium chloride solution [63]. This test has been performed with soluble matrices extracted from both calcite and aragonite [64-67]. The test was adapted as follows: 500 μL of 10 mM CaCl_2 , containing different amounts of native or chemically-deglycosylated ASM (0.1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ to 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) were introduced in a 8-well culture slide (BD Falcon). The culture slide was closed with a plastic cover, which had been pierced with 1-mm holes. It was incubated 48 hours at 4°C in a closed vessel containing crystals of ammonium bicarbonate. After incubation, the slides were gently dried by capillarity and then by rapid incubation at 50°C. Blank controls were performed without any sample. The polymorph identity of the calcium carbonate crystals was determined by direct observation on FTIR spectrometer as described above. Samples were subsequently carbon-sputtered and observed at 15 keV by scanning electron microscopy (JEOL 6400).

ASM analysis on two-dimensional gel electrophoresis. Following its quantification by micro-BCA assay, the ASM was fractionated by 2-D electrophoresis. Isoelectric focusing (IEF) was carried out using a Protean IEF cell (Bio-Rad). Precast 7 cm linear pH 3-10 IPG strips were re-hydrated overnight at 50 V (25°C) with 150 μl of buffer containing 80 μg of ASM in 6 M urea, 2 M thiourea, 4% (w/v) CHAPS, 20 mM DTT, 0.1% ampholytes and 0.001% bromophenol blue. Immediately afterwards IEF was carried out at 250 V for 15 min in linear mode. Voltage was then raised up to 8000 V in rapid mode and maintained at 8000 V until 10000 Vh were accumulated. The IPG strips were subsequently transferred 10 min to 2 ml equilibration buffer (Urea 6 M, SDS 2%, 375 mM Tris-HCl pH 8.8, glycerol 20%, DTT 130 mM) and 10 min to the same buffer (without DTT) but containing 135 mM iodoacetamide. Strips were rinsed in TGS (25 mM Tris, 192 mM glycine and 0.1% SDS), positioned on the top of precast 4-10% NuPAGE® BisTris Novex SDS-polyacrylamide gels covered with 0.5% w/v agarose in TGS. Electrophoresis was then performed at 200 V for 40 min.

Spot protein digestion and MALDI-TOF/TOF analysis. Excised gel fractions were washed for 10 min in 100 mM NH_4HCO_3 , and incubated in 20 μL 100% acetonitrile (ACN) for 10 min, under gentle stirring (the supernatants were discarded). Samples were subsequently reduced with 20 mM DTT (30 min, 56°C in 0.1 M NH_4HCO_3) and alkylated with 0.1 M iodoacetamide (20 min, 25°C in 0.1 M NH_4HCO_3). Proteins were digested in gel with 20 μL of 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ trypsin (Roche, France) in 0.01% TFA (30 min at 4°C), then 17 μL supernatant were discarded and pieces of gels were covered with 7 μL of 25 mM NH_4HCO_3 for incubation (2 h, 37°C). Peptide-containing fractions were extracted by addition of 1 μL TFA 0.5%, then the supernatant was recovered. The gel was rinsed with 8 μL ACN and the supernatants were pooled. Digests were analyzed with the mass spectrometer (MS) and the MS/MS modes on matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF/TOF) Ultraflex II (Brucker Daltonics) with a HCCA matrix (ref. 201344, Brucker Daltonics).

LC ESI-QqTOF/TOF analysis of whole ASM and AIM. One mg ASM was dissolved in 20 μL 100 mM NH_4HCO_3 and proteins were reduced at 60°C for 15 min with 5 mM DTT, followed by alkylation with 2 mM iodoacetamide, in the dark at room temperature for 25 min. Samples were diluted in 400 μl NH_4HCO_3 buffer with 20 μL acetonitrile and incubated for 18 h at 37 °C with 10 μg of trypsin (Proteomic grade, Sigma). After centrifugation, the supernatant was lyophilized and stored at -20°C. One hundred mg AIM were suspended in 5 mL 100 mM NH_4HCO_3 and treated as described above for the ASM. Then the sample was lyophilized. One mg of the dry residue was dissolved in 100 μL NH_4HCO_3 buffer containing 5% acetonitrile and incubated for 18 h at 37°C with 10 μg trypsin. After centrifugation, the supernatant was lyophilized and stored at -20°C. The peptide digests were dissolved in 50 μL milliQ-water and 5 μL were used for proteomic analysis. HPLC of the tryptic peptides was performed on a capillary 0.32 mm-diameter C18 column (Discovery® Bio wide pore 5 μm , Sigma) at a flow rate of 50 $\mu\text{L.min}^{-1}$ with a gradient of acetonitrile in 1% formic acid (5 to 80% in 60 min). The separated peptides were analyzed with an electrospray ionization hybrid quadrupole time-

of-flight (ESI-QqTOF) hybrid mass spectrometer (pulsar I, Applied Biosystems) using information dependent acquisition (IDA), which allows switching between MS and MS/MS experiments. The data were acquired and analyzed with the Analyst QS software (Version1.1). After 1s acquisition of the MS spectrum, the two most intense multiple charged precursor ions (+2 to +4) could be selected for 2s-MS/MS spectral acquisitions. The mass-to-charge ratios of the precursor ions selected were excluded for 60s to avoid re-analysis. The minimum threshold intensity of the ion was set to 10 counts. The ion-spray potential and declustering potential were 5200 V and 50 V, respectively. The collision energy for the gas phase fragmentation of the precursor ions were determined automatically by the IDA based on their mass-to-charge ratio (m/z) values.

Mass spectrometry data and database searching. The mass spectra data were searched against NCBI non-redundant database (October 2007), using MASCOT search engine (<http://www.matrixscience.com>). The mass tolerance was 50 ppm for MALDI-TOF MS or 0.5 Da for ESI-QqTOF MS and was 0.2 Da for both MS/MS experiments with 1 missed cleavage. Other search parameters were carbamidomethyl as fixed modification and oxidation of methionine as variable modification. As no identification was achieved by MASCOT searching, MS/MS spectra were analyzed and interpreted *de novo* manually with the assistance of the RapiDeNovo software (Brucker) or the Analyst QS1.1 software. All the candidate sequences were merged in a MS BLAST search, compared and aligned two by two with the other sequences of mollusk shell proteins, using the SIM tool from the ExPASy server (<http://www.expasy.ch/tools/sim.html>).

RESULTS

Extraction of organic matrix. Like other nautiloids, the outer wall of the shell of *N. macromphalus* exhibits a bi-layered structure, made of an outer prismatic and an inner nacreous layer and the septal inner shell is only constituted of nacre (Fig 1). The whole shell is aragonitic.

We carefully removed the periostracum, the septa and the prismatic layer from the shell preparation. We subsequently

extracted the matrix exclusively associated with nacre. The AIM represents around 4% by weight of the nacre powder and is composed of 46% carbon and 16% nitrogen. The ASM represents only 0.1% by weight of the nacre powder and contains 70-75% proteins as determined by bicinchoninic acid assay. These results are consistent with previous data obtained either using EDTA or other acids for extraction [10, 41, 47, 48]. We note that nacre AIM represents between 3-5% of *Nautilus* sp. shells, around 1.5% for gastropod shells and only 0.5-1.5% for bivalve shells [10].

FTIR profiles of AIM and ASM. Figure 2A shows the FTIR profile of nacre AIM and ASM, testifying that the decalcification was complete since no aragonite band was observed [68]. Both AIM and ASM exhibit characteristic bands of proteinaceous and/or glyco-proteinaceous components: the thick band around 3270 cm^{-1} is attributed to the amide A group (N-H bounds), the two small bands at 2916 cm^{-1} and 2850 cm^{-1} were assigned to the C-H bounds, and the two noteworthy bands near 1640 cm^{-1} and 1530 cm^{-1} were ascribed to the amide I (C-O bound) and the amide II (C-N bound) groups, respectively, commonly associated with protein contents. This is in agreement with other previous works on mollusk shell organic compounds [45, 48, 69-71]. Carboxylate (COO^-) and sulfate (SO_4^{2-}) absorption bands are also present in both extracts, around 1420 cm^{-1} and 1234 cm^{-1} , respectively [69, 72]. On the other hand, ASM exhibits a strong carbohydrate absorption band around 1060 cm^{-1} in ASM, while this band is weaker for AIM. This suggests that ASM contains a more important sugar fraction. Interestingly, the AIM nacre profile of *Nautilus macromphalus* exhibits many similarities with that of the nacre AIM of the bivalve *Unio pictorum* [71]. The slight differences between our results and those obtained previously on the same species [48] might be due to differences in extracting the shell matrix components, or in preparing the samples for FTIR analyses, as we directly observed the lyophilized matrices without inclusion within KBr tablets.

Characterization of matrices by SDS-PAGE. The treatment of the AIM with urea dissolves only partly the insoluble components. The urea-treated fraction is called urea-soluble AIM. When run on mini-SDS-PAGE and stained with silver or CBB, the urea-soluble

AIM and the ASM are composed of various distinct macromolecular components (Fig. 2B). The urea-soluble AIM shows two main bands migrating around 50 and 18 kDa. Few minor bands around 30 and 20 kDa are also visible, only after silver staining. Silver and CBB stain the nacre ASM in different ways. The silver staining reveals high molecular weight components between 200 and 100 kDa, two thick bands around 63 and 52 kDa and small discrete bands between 20 and 12 kDa. Although silver staining is much more sensitive than CBB, its reproducibility is lesser: the 100-200 kDa components sometimes appear negatively stained, and the other components exhibit variations in the staining intensity.

CBB does not reveal the high molecular weight components between 200 and 100 kDa, suggesting that these components are either heavily glycosylated or are strongly negatively charged. CBB stains fairly the two thick bands around 63 and 52 kDa and few compounds between 40 and 22 kDa, and heavily stains the small discrete bands between 20 and 12 kDa. Previous observations of CBB-stained electrophoretic profiles obtained from EDTA- or acetic acid-soluble matrices of *Nautilus pompilius* shell [46, 47] revealed similar patterns, comprising thick bands above 45 kDa and few discrete compounds between 20 and 10 kDa.

Amino acid composition. The total amount of amino acid represents 16 and 66% w/w of the shell nacre AIM and ASM, respectively, when determined from amino acid quantification. We consider that the weak solubility of the AIM, even in 5.7 N HCl, produces a noteworthy underestimation of its proteinaceous content. Table 1 indicates the amino acid composition (in mol-%) of the AIM and the ASM. Due to the deamidation of Asn and Gln during the acid hydrolysis, Asx and Glx residues represent Asn + Asp and Gln + Glu, respectively. In the AIM extract, Gly, Ala, Glx represent prominent amino acids, followed by Ser and Asx. The three first constitute almost half of the total amino acids. This result is consistent with those previously obtained on other *Nautilus* species [47], as AIM exhibits the signature of hydrophobic extracts, which characterizes the 'silk fibroin-like' proteins [11, 40]. Similar results were obtained with nacre insoluble matrix from other various mollusks [71, 73-75]. The

composition of the ASM is characterized by a high amount of Gly and Asx, which represent more than two-fifth of the total amino acids. Our data match those published on *Nautilus pompilius* [41], but substantially differ from those of Keith et al. [47]. If most of the Asx residues are in their acidic form, as previously suggested for a similar matrix [42], this implies that the ASM of *Nautilus macromphalus* nacre is noticeably acidic. Such an assumption is further confirmed on 2-D gels.

Monosaccharide composition. The total amount of neutral, acidic and amino sugars obtained after 2 M TFA hydrolysis represent 6.1% and 5.2% of the AIM and the ASM, respectively (Table 2). However, for AIM, the standard hydrolysis for monosaccharide determination does not release the totality of the sugars, because of the presence of insoluble residues after hydrolysis. The AIM comprises only six monosaccharide residues, among which glucosamine represents 56%, galactose, 16% and Glucose, 15% of the composition. The technique used does not allow distinguishing glucosamine from its N-acetylated form. Consequently, it is likely that the important amount of glucosamine in AIM results of the partial hydrolysis of chitin. Chitin has been detected in insoluble nacre matrix of several mollusks [10, 76, 77]. In *Nautilus macromphalus* shell nacre, it represents between 5% and 35% w/w of the insoluble matrix, depending of the technique used [10, 29]. The ASM monosaccharide composition appears more diversified than that of the AIM, as it contains six of the seven standard neutral sugars (with the exception of xylose), the two amine sugars and also glucuronic acid. One unidentified peak was detected in the acidic sugar zone, but could not be attributed to any standard monosaccharide (supplemental data). As for AIM where glucosamine, glucose, galactose and galactosamine represent 95% of the monosaccharide composition, these four residues are also dominant in the ASM, with 18, 18, 15 and 12%, respectively. Traces of sialic acids (Neu5Ac only) were detected in both matrices.

The sulfated sugar content of the AIM and the ASM was measured by spectrophotometry. Important amounts of sulfated sugars were quantified in the ASM, representing 16% of the total sugar content. This corroborates previous findings on molluscan shell soluble matrix [70, 71, 78] and

more specifically, indirect determination on *Nautilus* sp. nacre matrix [20, 48].

Further characterization of ASM on 1D-gels. As silver nitrate stained profiles of the ASM exhibited a negative staining in the range 100-200 kDa (Fig. 3), we investigated further the biochemical properties of this extract, by using different gel and blot staining, as shown on Fig. 3. In particular, Alcian and PAS procedures stain heavily the high molecular weight compounds, as well as the two discrete bands at 63 and 52 kDa. Alcian blue staining method performed at pH 1 is specific of the very acidic sulfated sugars, while PAS reagent reveals vicinal diol groups on peripheral sugars with a specific red/purple color. Taken together, these results suggest that the high molecular weight compounds are acidic sulfated glycosaminoglycans, and that the 63 and 52-kDa bands are acidic sulfated glycoproteins.

The carbocyanine dye stains the 37-kDa band in dark blue, whereas the proteins below 20 kDa exhibit a particular light blue color. The ability of the low molecular weight proteins to bind calcium ions was unambiguously demonstrated by the ^{45}Ca overlay test under denaturing conditions.

The western-blot obtained after the incubation with an anti-serum against the ASM of *Pinctada margaritifera* shell shows several cross-reacting discrete and non-discrete components, suggesting that both ASM contains similar epitopes. Additionally, the strong signal observed for the 20-12-kDa non-glycosylated proteins implies that some similar epitopes are proteinaceous. At last, this western-blot underlines the presence of at least 5 discrete macromolecules at 37, 32, 28, 26 and 22 kDa, which are hardly visible with other staining procedures.

In vitro inhibition of CaCO_3 precipitation with ASM. The effect of nacre ASM on the kinetics of CaCO_3 precipitation was determined by monitoring the pH decrease, as shown in Fig. 4. In the blank experiment (without ASM) the pH decreased without any time lag (approximately 120 s), corresponding to the rapid precipitation of calcium carbonate. When ASM was present in the solution, we observed an inhibition of CaCO_3 precipitation. The effect of the nacre matrix started to occur above 1 μg and the delay of the reaction was dose-dependent. At about 100 μg ASM, a complete inhibition of the nucleation of

calcium carbonate was recorded. Our observation of the inhibition capacity of this matrix is consistent with previous works on organic soluble matrix of nacre from different molluscs [16, 71, 79]. Surprisingly, the inhibiting capacity is lesser than that of ASM extracted from calcitic shell microstructures [80]. Because both inhibition capacity and nucleation ability have been reported from different purified nacre proteins [16, 81], the ASM inhibition capacity that we recorded might represent the sum of these antagonistic activities.

Interaction of ASM with the in vitro calcite growth. The results of this test, performed for investigating the effect of soluble extracts on the precipitation of calcium carbonate, are shown in Fig. 5. In the control blank experiment, crystals exhibited the typical habitus of calcite (Fig. 5A, B). ASM was tested at concentrations varying from 0.1 to 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. In that range, we checked two parameters: the crystal size and shape, and the density of crystals per surface unit. Significant effects were observed above a threshold concentration of 0.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. At 0.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, most of the crystals were polycrystalline and exhibited smooth faces (Fig. 5B, C). At 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, the number of crystals increased (Fig. 5E) and all of them were polycrystalline, with rounded edges and microsteps (Fig. 5F). At 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, the density of crystals decreased moderately (Fig. 5G) and the polycrystalline aggregates exhibited foliated faces (Fig. 5H). At 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, the number of crystals did not vary (Fig. 5I), the angles of crystals appeared more rounded, with slightly curved faces (Fig. 5J). At 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, the density of crystals decreased (Fig. 5K) and they exhibited rounded shape (Fig. 5L). At 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, the size distribution of the crystals was heterogeneous (Fig. 5M), with a majority of smaller crystals than the ones produced at lower ASM concentrations. This size decrease was probably due to the inhibiting effect of ASM at high concentration. The formed polycrystalline aggregates exhibited curved faces, edges and corners (Fig. 5N). At higher magnification, the faces appeared to be formed by sub-micron crystallites of regular square shape (Fig. 5O). Similar effects were previously observed with proteins extracted from *Halotis rufescens* nacre by Michenfelder and co-workers [82]. We verified the mineralogy of the newly formed crystals by

FTIR and observed the presence of specific bands of calcite (877 and 713 cm^{-1}) in presence or not of nacre ASM (supplemental data). Aragonite was not detected.

Chemical deglycosylation of ASM. The results of the chemical deglycosylation of ASM are shown on Fig. 6. The completeness of sugar removal was verified by checking the monosaccharide composition of the deglycosylated-ASM. ASM and *deg*-ASM were compared on SDS-PAGE gels with double CBB/silver and Alcian blue staining (Fig. 6A). Their respective calcium-binding ability was checked on dot blots (Fig. 6B). In both cases, the protein concentration was measured with BCA test to guarantee that same amounts of proteins were analyzed. The double CBB/silver staining of the matrices allowed visualizing most of the macromolecular compounds of the ASM on the same gel. The 63 and 52 kDa glycoproteins in ASM shifted to 54 and 47 kDa, respectively. On the contrary, the low molecular weight proteins (below 20 kDa) did not exhibit any shift in their electrophoretic mobility, which suggests that these proteins are not glycosylated. Interestingly, the positive Alcian blue staining, observed for the high molecular-weight glycoaminoglycans and for the 63 and 52-kDa glycoproteins, was completely lost after deglycosylation. This result confirms that part of the polyanionic properties of these compounds is due to the glycosyl moieties.

On dot blot (Fig. 6B), ASM exhibited a calcium-binding activity, and this property was only slightly reduced with *deg*-ASM. From Fig. 3, this activity is mainly due to the low molecular weight proteins. Because these proteins are non-glycosylated, we conclude that most of the calcium-binding activity of the ASM is due to the protein - and not the sugar - moieties. Furthermore, considering that purified troponin C is a strong calcium-binding protein, and that the low molecular weight proteins represent only a fraction of the ASM, their ability to bind calcium may be relatively high.

Interaction of *deg*-ASM with the *in vitro* calcite growth. The importance of the role of the ASM glycosyl moieties was evaluated by comparing the calcium carbonate crystals obtained *in vitro* in the presence of ASM and of *deg*-ASM (Fig. 7). The deglycosylation had a remarkable effect on the morphological change of calcium carbonate crystals. While ASM produced

polycrystalline aggregates from 0.5 to $20\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Fig. 7A, C and E), we never observed such a result with the *deg*-ASM (Fig. 7B, D and F) even at the highest concentrations. Another specific effect of the *deg*-ASM was the formation of grooves in place of the edges of the crystals. The effect was more pronounced at high concentrations, with the broadening of the grooves. This effect was never observed with non-deglycosylated ASM. FTIR check indicated that only calcite crystals were formed (supplemental data).

Separation of ASM proteins by 2-DE and mass spectrometry analysis. The results of the two-dimensional gel analysis of nacre ASM are shown in Fig. 8. The previously observed bands on 1-D electrophoresis can be retrieved. Most of the ASM components mainly focus either at very acidic or very basic *pI* values. The two prominent 63- (spot N1) and 52-kDa glycoproteins focus at *pI* 3, suggesting that these proteins exhibit a *pI* of 3 or less. On the other hand, the set of low molecular weight proteins migrating between 20 and 12 kDa appears to be composed of very acidic (N5), neutral (N3 and N4) and very basic components (N6 and N7). Interestingly, the 12-kDa band is not homogenous and divides in two large spots around *pI* 3.5-4 and *pI* 9-10 (N5 and N7, respectively).

Seven spots were excised from the gel for protein characterization by MALDI-TOF/TOF with peptide mass fingerprinting (PMF) data search after digestion with trypsin (see one example with spot N1 in Fig. 9A). For the main peptides, the MS/MS spectra were acquired for *de novo* sequencing and results were submitted to a BLAST data search. The peptides obtained after trypsin digestion from the 2-DE spots (supplemental data) were searched against NCBI non-redundant database using MASCOT software and no significant result was found. Because of the absence of genomic/transcriptomic database on *Nautilus* sp., it is unsurprising that this approach cannot provide a reliable result for identifying proteins.

Interestingly, we observed that many common peptides are observed in various spots (supplemental data), suggesting that the different ASM proteins can share similar peptidic domains. For example, the spot protein N5 shares 3 peptide ions with N6 (*m/z* 1286.32, 1482.66, 1722.91) and 5 peptide ions with N7 (*m/z* 1003.37, 1286.32, 1482.66,

1531.52, 1758.87). This suggests that the N5 protein (*pI* around 3.5-4) and N6 or N7 proteins (*pI* 9-10) may exhibit similar domains. On the other hand, the N2 spot protein possesses 5 common peptide ions with the N1 spot (*m/z* 1512.92, 1723.41, 1774.87, 1892.15, 2122.9), 3 common peptide ions with N5 (*m/z* 1722.93, 1791.74, 3312.31) and 6 common peptide ions with the N6 spot protein (*m/z* 1490.78, 1645.95, 1722.93, 1774.87, 1876.72, 3211.46). This suggests that N2 proteins shares similar amino acid partial sequences with N1, N5 and N6. In spite of the possibility that different peptides of different primary structure could share the same *m/z*, the numerous cases of similar *m/z* values illustrated here rather indicate that the peptides are truly identical. If so, this suggests that different nacre ASM proteins may share identical peptide sequences, suggesting that these proteins result from a genetic patchwork assemblage.

We performed LC/MS-MS analysis of both the ASM and the AIM after hydrolysis with trypsin. This approach provided an important set of MS and MS/MS data for both extracts. When searched against MASCOT, no protein was identified. It is to notice that ASM and AIM share many peptides of the same *m/z*. By comparing the ASM and AIM MS/MS spectra two by two, we determined that 33 different peptides of the two matrices strictly share the same MS/MS-spectra patterns, as exemplified in Fig.10. At minimum, this implies that proteins of the AIM, on one side, and of the ASM, on the other side, are built from similar peptide blocks. Alternatively, these results could suggest that some proteins of the ASM are also present in the AIM extract.

Partial and full internal sequences were obtained by interpretation of MS/MS spectrum for *de novo* sequencing (for example, see Fig. 9B-C). The interpretation of the mass differences between ions was assisted by the RapiDeNovo software and Analyst QS 1.1 software, and sequences were further confirmed manually. We only consider amino acid positions, which were unambiguously determined. Only few peptides analyzed on MS/MS mode could be fractionated or gave good MS/MS spectra for sequence interpretations. It is very likely that some of the peptides digested with trypsin bear glycosyl moieties (*e.g.* for N1) or other post-

translational modifications, which restrain the MS/MS fractionation. With the 2-DE coupled with MALDI-TOF/TOF approach, we obtained 4 peptide sequences for the N1, N5 and N7 spots (Table 3). For LC-MS-MS/MS analysis, we deduced from the MS/MS spectra, 14 and 20 internal sequences for the ASM and the AIM extracts, respectively. Two peptides of 675.35 *m/z* and 675.85 *m/z* from the AIM, share the same amino acid sequence differing only by one residue, N or D, at the fifth position. This one-residue polymorphism could be explained by the presence of 2 isoforms of a particular domain in different matrix proteins or the occurrence of a repeat within the same protein as already observed for mucoperlin [16]. We also notice that the 492.26-*m/z* and 729.38- *m/z* peptides share identical -DSSVLT- internal sequence.

Sequence alignments. Only the sequences longer than 7 amino acids were further considered for SIM alignment or BLAST. We performed an alignment two by two with all the 65 known molluscan shell proteins [18], by using the SIM tool from Expasy server (www.expasy.org/tools/sim.html). In none of the cases, we obtained a perfect match. However, in some cases, some alignments may be significant, as shown in Figure 11A-E. Three peptides match partially with nacrein and nacrein-like proteins (Fig. 11A), two nacre-associated proteins, which are known to exhibit carbonic anhydrase (CA) activity. In spite of this sequence similarity, we did not detect any CA activity in the ASM extract of *N. macromphalus* (supplemental data). Similarly, other 3 peptides match significantly with N14, N16 and pearlins (Fig. 11B). Tyrosinase-like 1 and 2 are also similar to 2 peptides from *N. macromphalus* shell proteins (Fig. 11C). In mollusks, tyrosinase-like proteins are suggested to play an essential role in quinone-tanning process, by converting tyrosine residues to DOPA. As a consequence, they may be directly involved in the phase transformation of a gel or of soluble proteins into insoluble “framework” proteins. 3 peptides match with mucoperlin (Fig. 11D), a mucin-like protein from *Pinna nobilis* nacre [16]. Furthermore, low similarities are observed between 2 peptides of the AIM and low complexity sequences from MSI31 and MSI60 (Fig. 11E), but because of the bias due to the dominance of a single amino acid, these similarities may be fortuitous. Surprisingly,

most of the similarities detected with molluscan shell proteins are with shell proteins from bivalve origin, not from gastropods. We did not find any homology with the few sequences published by Zhao and coworkers on *Nautilus pompilius* [49].

DISCUSSION

In the present paper, we investigated the biochemical properties of the nacre-associated matrix extracted from the shell of the cephalopod *Nautilus macromphalus*. In mollusks, shell matrix components represent between 0.01 and 5 wt-%, depending on the shell texture [83]. Technically, they divide in soluble and insoluble fractions according to their behavior in a decalcification solution: after mineral dissolution, the insoluble macromolecular complexes are usually recovered by simple centrifugation, while the soluble components require additional concentration/dialysis/purification steps. In molluscan shells, the proportion of insoluble to soluble varies widely [84] but nacre textures, whatever their origin (bivalve, gastropod or cephalopod), are always characterized by high proportion of insoluble matrix [83]. In the present case, with a matrix content above 4 wt-%, the nacre of *Nautilus macromphalus* is the molluscan shell microstructure with the highest organic content. It exhibits a high AIM/ASM ratio (around 40), typical of nacre tissues. According to classical views on the biochemistry of soluble *versus* insoluble components, our analyses performed on the bulk matrices make clear distinction between these two fractions. The insoluble fraction is enriched in aliphatic residues, mainly Gly and Ala, and in glucosamine. Gly and Ala characterize ‘framework’ proteins [11], while high amounts in glucosamine indicate the likely presence of chitin [45]. The soluble fraction is more hydrophilic, and enriched in Asx residues, while its sugar composition is shared out between different monosaccharide residues.

From these data, one would expect proteomics to segregate hydrophobic from hydrophilic peptides, both resulting from the extraction of the AIM and ASM, respectively. This does not happen. Several peptides of the ASM (smpp1, -8, -12, -16, -17) exhibit a hydrophobic signature, while only three peptides of the same fraction (smpp2, -4 and -

14) are acidic. In parallel, while most of the AIM peptides are hydrophobic, two of them (impp17, -20) are surprisingly acidic. Furthermore, our MS and MS/MS data from AIM and ASM extracts show that several tryptic digests are present in both matrices. This apparent contradiction between shell matrix biochemistry and proteomics disappears when considering recent findings on molluscan biomineralization. Firstly, several shell matrix proteins exhibit a modular organization of their primary structure [17, 18], and their constitutive modules may have different hydrophobicity properties. A remarkable example is that of MSI31, a framework ‘putatively-insoluble’ protein of the prismatic calcitic layer of the pearl oyster, which exhibits both a hydrophobic N-terminus and a strongly acidic C-terminus [11]. Secondly, soluble proteins can become insoluble correlatively to their ability to form homopolymers of increasing size. Self-polymerization of a single shell protein has been indeed observed for P20 [85] and for caspartin [80]. Thirdly, soluble proteins can be components of complex insoluble heteropolymers, which result from cross-linking between matrix macromolecules. For example, such a phenomenon, which involves a quinone-tanning process (oxidation of tyrosine residues in DOPA via tyrosinase), has been described for the formation of the periostracum [86-88]. It may occur as well in the formation of nacre tissues, in particular for hardening the chitino-protein framework [22]. At last, Bédouet and co-workers [89] have recently observed that insoluble and water-soluble matrices of the pearl oyster *Pinctada maxima* contain identical peptides of MSI31. These combined data, together with our findings, strongly suggest that part of the so-called insoluble matrix is constituted of proteins that individually belong to the soluble fraction. Interestingly, a similar process has been described for another calcium carbonate-mineralizing system, the eggshell matrix of the hen *Gallus gallus* [90].

Representing 0.1 wt-% of the nacre, the nautilus ASM is a minor – but essential – fraction of the whole matrix. It is constituted of a mixture of polydisperse and discrete proteins, glycoproteins and proteoglycans. It inhibits *in vitro* the precipitation of calcium carbonate, interacts with the formation of calcite crystals, and binds calcium ions in solution. We unambiguously showed that this capacity is

almost entirely conveyed by the protein core, and more precisely, by the low molecular weight proteins (below 20 kDa). This result strikingly differs from our previous data obtained with the ASM nacre of the freshwater bivalve *Unio pictorum* [71], where we observed that acidic polysaccharides are significantly involved in binding calcium ions. In the future, we plan to immuno-localize the low molecular weight calcium-binding proteins on nacre, to see whether they distribute preferentially in the center and at the periphery of tablets, as suggested by a recent staining with calcein performed on *Nautilus pompilius* nacre [20].

Although the sugar moieties of the nautilus ASM apparently do not participate in the fixation of calcium ions, they affect the charge properties of ASM components above 50 kDa, by lowering their apparent *pI*. We demonstrated a similar effect with the nacre ASM of *Unio pictorum* [71]. Another important contribution of sugars of the nacre ASM of *Nautilus* is their remarkable effect on the modification of the shape of calcite crystals grown *in vitro*. Few works have shown that the glycosyl moieties of invertebrate calcified tissues - *i.e.* mollusks and echinoderms - are able to modulate the morphology of calcite crystal *in vitro* [64, 71, 91]. From these, sulfated sugars are particularly emphasized: localized in the centers of nacre tablets, they may play a key-function in nucleating aragonite crystals [20, 30] or in creating locally the physico-chemical conditions for concentrating (by electrostatic interactions) calcium ions in the vicinity of the crystal nucleators [92]. In addition, they may have unsuspected signaling functions, in relation with the functioning of the secreting epithelium [93].

The ‘shellomic’ approach that we used allowed obtaining 38 amino acid sequences, of 6 to 18 residues long. We are fully aware that this sequence pool represents only a small part of the whole sequences of the shell matrix proteins, giving thus a rather partial picture of the complete ‘shellome’ of *Nautilus macromphalus*. Furthermore, our approach focuses strictly on secreted proteins, which are incorporated in the shell. It does not take in consideration the ‘silent’ secreted proteins, such as extrapallial fluid proteins, nor the proteins of the mantle epithelium, which may contribute to the shell elaboration without

being constitutive of the shell matrix. Recent findings [94] suggest that the protein secretory repertoire of the calcifying mollusk mantle is much more complex than the proteins of the shell matrix. In spite of these technical limitations, it is puzzling to observe that most of the peptide sequences that we obtained do not exhibit any similarity with known molluscan shell proteins. This obviously points out the fundamental question of the diversity of molluscan shell proteins. Since 1996, the number of fully sequenced proteins/genes has exponentially increased, forming a wide range of protein families. However, these characterizations have been performed on a limited number of biological models, the two preponderant of which are the pearl oyster *Pinctada* sp. and the abalone *Haliotis* sp. By investigating new biological models on one side, and by using new approaches on the other side, such as ‘transcriptomic’ [94, 95] and ‘shellomic’ data, the informations on molluscan shell proteins increase at different levels: protein families, domains and functions.

Another remarkable finding of our proteomic approach on *Nautilus* is that the few peptides, which exhibit sequence homology with known shell proteins, match with those of bivalve origin. So far, we did not find any sequence homology with the nacre proteins characterized from the archeogastropod *Haliotis*, like lustrin A, perlustrin, perlucin, perlwapin, perlinhibin, AP7, AP24 (reviewed in [18]) or the set of proteins determined by EST [95]. In most of the phylogenetic reconstructions of the phylum Mollusca, cephalopods and gastropods are grouped together in the viscericoch clade, which represents the sister group of diasomes (bivalves + scaphopods). The phylogenetic proximity of cephalopods and gastropods is reflected in their respective nacre textures, which exhibit similarities, in contrast to bivalvian nacre [95, 97]. The first ones are columnar, and constituted of superimposed tablets [36, 98]; the second one represents the ‘brickwall-type’, also called ‘sheet nacre’ and nacre tablet grow ‘in terraces’ [6, 99]. It is then surprising to observe that the morphological resemblance between nautilus and abalone nacles is not translated in a “sampling” of their protein content. This discrepancy is not understood, in particular because nacre textures are usually considered to be plesiomorphic [24, 97] and one should expect

their constitutive proteins to be highly conserved during evolution. Our finding suggests - but does not demonstrate - that nacre proteins may be less evolutionary constrained than expected.

From an applied viewpoint, our results allow catching a glimpse of the *in vitro* synthesis of similar nacreous biomimetic materials from different protein assemblages.

REFERENCES

1. Addadi, L., Joester, D., Nudelman, F., and Weiner, S. (2006) *Chem. Eur. J.* **12**, 980-987.
2. Mann, S. (1988) *Nature* **332**, 119-124.
3. Westbroek, P., and Marin, F. (1998) *Nature* **392**, 861-862.
4. Weiss, I., Göhring, W., Fritz, M., and Mann, K. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**, 244-249.
5. Mutvei, H. (1980) in *The Mechanisms of Biomineralization in Animals and Plants* (Omori, M., and Watabe, N., eds) pp. 49-56, Tokai University Press, Tokyo.
6. Nakahara, H. (1991) in *Mechanisms and Phylogeny of Mineralization in Biological Systems* (Suga, S., and Nakahara, H., eds) pp. 343-350, Springer-Verlag, New York.
7. Oaki, Y., and Imai, H. (2005) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **44**, 6571-6575.
8. Rousseau, M., Lopez, E., Stempflié, P., Brendlé, M., Franke, L., Guette, A., Naslain, R., and Bourrat, X. (2005) *Biomaterials* **26**, 6254-6262.
9. Nassif, N., Pinna, N., Gehrke, N., Antonietti, M., Jaeger, C., and Coelfen, H. (2005) *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **102**, 12653-13655.
10. Goffinet, G., and Jeuniaux, C. (1979) *Cahiers Biologie Mar.* **20**, 341-349.
11. Sudo, S., Fujikawa, T., Nagakura, T., Ohkubo, T., Sakaguchi, K., Tanaka, M., Nakashima, K., and Takahashi, T. (1997) *Nature* **387**, 563-564.
12. Shen, X., Belcher, A. M., Hansma, P. K., Stucky, G. D., and Morse, D. E. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 32472-32481.
13. Miyamoto, H., Miyashita, T., Okushima, M., Nakano, S., Morita, T., and Matsushiro, A. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9657-9660.
14. Kono, M., Hayashi, N., and Samata, T. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **269**, 213-218.
15. Mann, K., Weiss, I., André, S., Gabius, H., and Fritz, M. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**, 5257-5264.
16. Marin, F., Corstjens, P., Gaulejac, B., de Vrind-De Jong, E. W., and Westbroek, P. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 20667-20675.
17. Zhang, C., and Zhang, R. (2006) *Mar. Biotechnol.* **8**, 572-586.
18. Marin, F., Luquet, G., Marie, B., and Medakovic, D. (2008) *Curr. Top. Dev. Biol.* **80**, 209-276.
19. Falini, G., Weiner, S., and Addadi, L. (2003) *Calcif. Tissue Int.* **72**, 548-554.
20. Nudelman, F., Gotliv, B., Addadi, L., and Weiner, S. (2006) *J. Struct. Biol.* **153**, 176-187.
21. Weiss, I., Tuross, N., Addadi, L., and Weiner, S. (2002) *J. Exp. Zool.* **293**, 861-862.
22. Levi-Kalishman Y, Falini G, Addadi L, and Weiner S. (2001) *J. Struct. Biol.* **135**, 8-17.
23. Cope, J. C. W. (1996) in *Origin and Evolutionary Radiation of the Mollusca* (Taylor, J. D., ed) pp. 361-370, Oxford University Press, Oxford.
24. Carter, J., and Clark, G. R. II (1985) in *Mollusk, Note for a Short Course, Studies in Geology 13* (Broadhead, T. W., ed.) pp. 50-71, Department of Geological Sciences, University of Tennessee Press, Tennessee.
25. Palmer, A. R. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1379-1382.
26. Erben, H. K. (1972) *Biomineral. Res. Rep.* **4**, 15-46.
27. Lindgren, A. R., Giribet, G., and Nishiguchi, M. K. (2004) *Cladistics* **20**, 454-486.
28. Bonnaud, L., Ozouf-Costaz, C., and Boucher-Rodoni, R. (2004) *C. R. Biol.* **327**, 133-138.
29. Goffinet, G. (1969) *Comp. Biochem. Physiol.* **29**, 835-839.
30. Crenshaw, M. A. and Ristedt, H. (1976) in *The Mechanisms of Mineralization in the Invertebrates and Plants* (Watabe, N., and Wilbur, K. M., eds.) pp. 335-367, University of South Carolina Press, Columbia.
31. Grégoire, C. (1987) in *Nautilus, the Biology and Paleontology of a Living Fossil, Topics in Geology vol. 6* (Saunders, W. B., and Landman, N. H., eds) pp. 463-486, Plenum press, New York.
32. Arnold, J. M., Mutvei, H., Landman, N. H., and Kuzirian A. M. (1990) *Am. Mus. Novitates* **2974**, 1-9.

33. Mitchel, P. R., and Phakey, P. P. (1995) *Scanning Microsc.* **9**, 215-230.
34. Dauphin, Y., 2001. *Paläont. Zeit.* **75**, 113-122.
35. Velazquez-Castillo, R. R., Reyes-Gasga, J., Garcia-Gutierrez, D. I., and Jose-Yacaman, M. (2006) *Biomaterials* **27**, 4508-4517.
36. Velazquez-Castillo, R. R., Reyes-Gasga, J., Garcia-Gutierrez, D. I., and Jose-Yacaman, M. (2006) *J. Mater. Res.* **21**, 1484-1489.
37. Degens, E. T., Johannesson, B. W., and Meyer, R. W. (1967) *Naturwissenschaften* **54**, 638-640.
38. Voss-Foucart, M. F. (1968) *Comp. Biochem. Physiol.* **26**, 877-886.
39. Wise, S. W. (1970) *Eclogae Geol. Helv.* **63**, 775-797.
40. Grégoire, C. (1972) in *Chemical Zoology Vol. 7* (Florkin, M., and Scheer, B., eds) pp. 45-102, Academic press, New York.
41. Weiner, S., and Hood, L. (1975) *Science* **190**, 987-988.
42. Weiner, S. (1979) *Calcif. Tissue Int.* **29**, 163-167.
43. Lowenstam, H. A., Weiner, S., and Traub, W. (1984) *Paleobiology* **10**, 268-279.
44. Crick, R. E., Burkart, B., Chamberlain, J. A., and Mann, K. O. (1985) *J. Mar. Biol. Assoc. UK* **65**, 415-420.
45. Dauphin, Y., and Marin, F. (1995) *Experientia* **51**, 278-283.
46. Weiner, S., Lowenstam, H. A., and Hood, L. (1977) *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **30**, 45-51.
47. Keith, J., Stockwell, S., Ball, D., Remillard, K., Kaplan, D., Thannhauser, T., and Sherwood, R. (1993) *Comp. Biochem. Physiol. B* **105**, 487-496.
48. Dauphin, Y. (2006) *Zoology*, **109**, 85-95.
49. Zhao, H., Samata, T., Takakura, D., Hashimoto, R., Miyazaki, Y., Nozawa, T., and Hikita, Y. (2003) in *Biomineralization (BIOM2001): Formation, Diversity, Evolution and Application* (Kobayashi, I., and Ozawa, H., eds) pp. 108-111, Tokai University Press, Kanagawa.
50. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685.
51. Morrissey, J. H. (1981) *Anal. Biochem.* **117**, 307-310.
52. Schuster, R. (1988) *J. Chromatogr.* **431**, 271-284.
53. Rohrer, J. (2000) *Anal. Biochem.* **283**, 3-9.
54. Barbosa, I., Garcia, S., Barbier-Chassefière, V., Caruelle, J. P., Martelly, I., and Papy-Garcia, D. (2003) *Glycobiology* **13**, 647-653.
55. Zacharius, R. M., Zell, T. E., Morrison, J. H., and Woodlock, J. J. (1969) *Anal. Biochem.* **30**, 148-152.
56. Wall, R. S., and Gyi, T. J. (1988) *Anal. Biochem.* **175**, 298-299.
57. Lev, R., and Spicer, S. (1964) *J. Histochem. Cytochem.* **12**, 309-319.
58. Campbell, K. P., MacLennan, D. H., and Jorgensen, A. O. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 11267-11273.
59. Maruyama, K., Mikawa, T., and Ebashi, S. (1984) *J. Biochem.* **95**, 511-519.
60. Marin, F., Muyzer, G., and Dauphin, Y. (1994) *C. R. Acad. Sci. Paris*, **318**, 1653-1659.
61. Wheeler, A. P., George, J. W., and Evans, C. A. (1981) *Science* **212**, 1397-1398.
62. Edge, A. S. B., Faltynek, C. R., Hof, L., Reichert, L. E., and Weber, P. (1981) *Anal. Biochem.* **118**, 131-137.
63. Addadi, L., and Weiner, S. (1985) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **82**, 4110-4114;
64. Albeck, S., Addadi, L., and Weiner, S. (1996) *Connect. Tissue Res.* **35**, 365-370.
65. Feng, Q., Pu, G., Pei, Y., Cui, F. Z., Li, H. D., and Kim T. N. (2000) *J. Cryst. Growth* **216**, 459-465.
66. Fu, G., Qiu, S. R., Orme, C. A., Morse, D. E., and De Yoreo, J. J. (2005) *Adv. Mater.* **17**, 2678-2683.
67. Treccani, L., Mann, K., Heinemann, F., and Fritz, M. (2006) *Biophys J.* **91**, 2601-2608.
68. Balmain, J., Hannoyer, B., and Lopez, E. (1999) *J. Biomed. Mater. Res. Applied Mat.* **48**, 749-754.
69. Worms, D., and Weiner, S. (1986) *J. Exp. Zool.* **237**, 11-20.
70. Marxen, J., and Becker, W. (1997) *Comp. Biochem. Physiol. B* **11**, 23-33.
71. Marie, B., Luquet, G., Païs de Barros, J. P., Guichard, N., Morel, S., Alcaraz, G., Bollache, L., and Marin, F. (2007) *FEBS J.* **274**, 2933-2945.

72. Marxen, J. C., Hammer, M., Gehrke, T., and Becker, W. (1998) *Biol. Bull.* **194**, 231-240.
73. Nakahara, H., Bevelander, G., and Kakei, M. (1982) *Venus* **41**, 33-46.
74. Moura, G., Vilarinho, L., Guedes, R., and Machado, J. (2000) *Haliotis* **29**, 43-53.
75. Pereira-Mouriès, L., Almeida, M. J., Ribeiro, C., Peduzzi, J., Barthélemy, M., Milet, C., and Lopez, E. (2002) *Eur. J. Biochem.* **269**, 4994-5003.
76. Weiner, S., and Traub, W. (1980) *FEBS Lett.* **111**, 311-316.
77. Zentz, F., Bédouet, L., Schuller, M. J., Milet, C., Lopez, E., Giraud, M. (2001) *Mar. Biotechnol.* **3**, 36-44.
78. Crenshaw, M. (1972) *Biomineral. Res. Rep.* **6**, 6-11.
79. Miyamoto, H., Miyoshi, F., and Kohno, J. (2005) *Zool. Sci.* **22**, 311-315.
80. Marin, F., Amons, R., Guichard, N., Stigter, M., Hecker, A., Luquet, G., Layrolle, P., Alcaraz, G., Riondet, C., and Westbroek, P. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 33895-33908.
81. Weiss, I. M., Kaufmann, S., Mann, K., and Fritz, M. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **267**, 17-21.
82. Michenfelder, M., Fu, G., Lawrence, C., Weaver, J. C., Wustman, B. A., Taranto, L., Evans, J. S., and Morse, D. E. (2003) *Biopolymers* **70**, 522-533.
83. Weiner, S., Traub, W., and Lowenstam, H. A. (1983) in *Biomineralization and Biological Metal Accumulation* (Westbroek, P., and De Jong, E. W., eds) pp. 205-224, D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland.
84. Kasai, H., and Ohta, N. (1981) in *Studies of Molluscan Paleobiology. Professor Masae Omori Memorial Volume* (Habe, T. and Omori, M., eds.) pp. 101-106, Niigata University Press, Niigata.
85. Bédouet, L., Schuller, M. J., Marin, F., Milet, C., Lopez, E., and Giraud, M. (2001) *Comp. Biochem. Physiol.* **B128**, 389-400.
86. Waite, J. H., Saleuddin, A. S. M., and Andersen, S. O (1979) *J. Comp. Physiol.* **130**, 301-307.
87. Nagai, K., Yano, N., Morimoto, K., and Miyamoto, H. (2007) *Comp. Biochem. Physiol.* **B146**, 207-214.
88. Zhang, C., Xie, L., Huang, J., Chen, L., and Zhang, R. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **342**, 632-639.
89. Bédouet, L., Marie, A., Dubost, L., Peduzzi, J., Duplat, D., Berland, S., Puisségur, M., Boulzaguet, H., Rousseau, M., Milet, C., and Lopez, E. (2007) *Mar. Biotechnol.* **9**, 638-649.
90. Mann, K., Macek, B., and Olsen, J. V. (2006) *Proteomics* **6**, 3801-10.
91. Albeck, S., Weiner, S., and Addadi, L. (1996) *Chem. Eur. J.* **2**, 278-284.
92. Addadi, L., Moradian, J., Shay, E., Maroudas, N. G., and Weiner, S. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 2732-2736.
93. Raman, R., Sasisekharan, V., and Sasisekharan, R. (2005) *Chem. Biol.* **12**, 267-277.
94. Jackson, D. J., McDougall, C., Green, K., Simpson, F., Wörheide, G., and Degnan, B. M. (2006) *BMC Biol.* **4**, 40-49.
95. Jackson, D. J., Wörheide, G., and Degnan, B. M. (2006) *BMC Evol. Biol.* **7**, 160-177.
96. Chateigner, D., Hedegaard, C., and Wenk, H.-R. (2000) *J. Struct. Geol.* **22**, 1723-1735.
97. Fryda, J., Weitschat, W., Tycova, P., Haloda, J., and Mapes, R. H. (2007) in *7th Intern. Symp. Cephalopods - Present and Past, Abstracts Vol.*, pp 56-57, Hokkaido University, Sapporo.
98. Lin, A., and Meyers, M. A. (2005) *Mater. Sci. Eng.* **A390**, 27-41.
99. Checa, A. G., Okamoto, T., and Ramirez, J. (2006) *Proc. R. Soc.* **B273**, 1329-1337.

Acknowledgments

Jean-Paul Pais de Barros (U198, Métabolisme des Lipoprotéines Humaines et Interactions Vasculaires, Université de Bourgogne) is acknowledged for his help in performing the two-dimensional electrophoresis. B. Marie and F. Marin thank Claudie Josse (Laboratoire de Réactivités des Solides, Université de Bourgogne) for helping to handle the SEM, Danielle Ballivet-Tkatchenko and Laurent Plasseraud (UMR 5188, LSEO, Université de Bourgogne) for the infrared measurements. They also thank Olivier Mathieu and Jean Lévêque for elemental analysis (UMR 5561, Biogéosciences, Université de Bourgogne) and Céline Muron for providing fresh shells of *Nautilus macromphalus*.

The protein sequence data appear in the UniProt knowledgebase under the accession numbers P85364-P85401.

The abbreviations used are: ACN, acetonitrile; AIM, acido-insoluble matrix; ASM, acido-soluble matrix; IPG, immobilized-pH gradient; TFA, trifluoroacetic acid; TFMS, trifluoromethanesulfonic acid.

Table 1

Amino acids	AIM	ASM
	% of the total amino acids	
Asx	9.5%	20.8%
Glx	10.3%	7.5%
Ser	9.6%	6.8%
His	0%	2.1%
Gly	24.0%	21.4%
Thr	2.8%	4.8%
Ala	13.3%	7.3%
Arg	5.6%	3.1%
Tyr	2.8%	2.9%
Cys	0%	1.1%
Val	3.4%	3.1%
Met	0.9%	0.7%
Phe	4.8%	2.7%
Ile	2.9%	2.3%
Leu	5.9%	3.2%
Lys	2.2%	3.9%
Pro	2.0%	6.4%
Trp	ND	ND

Table 1. Amino acid composition of the AIM and the ASM of *Nautilus macromphalus* nacre. Data are present as molar percentage of total amino acids for each extract. Note that Asx = Asn + Asp and Glx = Gln + Glu. Cysteine residues were quantified after oxidation. Tryptophan residues were not detected (ND), due to the hydrolysis conditions.

Table 2

Mono-saccharides	AIM	ASM
	ng/ μ g of matrix (% of the total)	
Fucose	0.8 (1%)	2.5 (5%)
Rhamnose	ND	2.5 (5%)
Arabinose	1.7 (3%)	1.0 (2%)
Galactose	10 (16%)	8.0 (15%)
Glucose	9.5 (15%)	9.3 (18%)
Mannose	ND	1.3 (2%)
Xylose	ND	ND
Galactosamine	4.6 (8%)	6.5 (12%)
Glucosamine	34.2 (56%)	9.7 (18%)
Galacturonic	ND	ND
Glucuronic acid	ND	3.8 (7%)
Neu5Ac	TR	TR
Neu5Gc	ND	ND
Sulfated sugars	0.5 (1%)	8.3 (16%)
Total	61.3 (100%)	52.9 (100%)

Table 2. Monosaccharidic composition of the AIM and the ASM of *Nautilus macromphalus* nacre. The composition of neutral sugars is obtained by high performance anion exchange-pulsed amperometric detection (HPAE-PAD; see supplemental data). Data are represented in ng/ μ g of the total matrix and in percentage of the total identified carbohydrates compounds. ND, not detected; TR, trace.

Table 3

Peptide name	<i>m/z</i>	Charge	[M+H] ⁺	Partial (-) or full sequence	Accession N°
MALDI-TOF/TOF analysis					
Spot N1					
SMPP1	2122.94	1 ⁺	2123.95	-SDCACLHALGHVAR	P85390
Spot N6					
SMPP2	1874.76	1 ⁺	1875.76	DGDDGDGD-	P85398
Spot N9					
SMPP3	1482.67	1 ⁺	1483.68	EKGYNPYVR	P85388
SMPP4	1876.79	1 ⁺	1877.79	DMYSDNLGLCDN-	P85391
ESI-QqTOF/TOF analysis					
ASM					
SMPP5 ^a	360.19	2 ⁺	719.37	FAPCPK	P85372
SMPP6	367.72	2 ⁺	734.43	ADLFLR	P85373
SMPP7 ^a	483.78	2 ⁺	966.56	LYSLLTEK	P85374
SMPP8	484.31	2 ⁺	967.62	GPAAVVRLLGK	P85375
SMPP9	492.26	2 ⁺	983.51	SFDSSVLTK	P85376
SMPP10 ^a	516.79	2 ⁺	1032.56	QLFQPPFR	P85364
SMPP11 ^a	517.78	2 ⁺	1034.55	TSFTLYMR	P85392
SMPP12 ^a	528.32	2 ⁺	1055.63	ALAQLLSLAR	P85377
SMPP13 ^a	549.28	2 ⁺	1097.54	TSTVFSDGQR	P85378
SMPP14	554.75	2 ⁺	1108.49	DFFFDGDR	P85379
SMPP15 ^a	584.31	2 ⁺	1167.61	LGICFASMPR	P85380
SMPP16	593.82	2 ⁺	1186.64	-FIAGLNGLR	P85381
SMPP17	681.38	2 ⁺	1361.76	LSLQEFGLWR	P85382
SMPP18	729.38	2 ⁺	1457.74	-DSSVLTSEYPR	P85383
AIM					
IMPP1	372.71	2 ⁺	744.41	FVSTYK	P85389
IMPP2	465.78	2 ⁺	930.55	VSVVGTVR	P85384
IMPP3	470.26	2 ⁺	939.51	YLTCLNR	P85393
IMPP4	480.78	2 ⁺	960.54	TLASAIASAR	P85385
IMPP5	512.26	2 ⁺	1023.52	LGSLDEYAR	P85386
IMPP6	519.77	2 ⁺	1038.54	SFSESLAAAR	P85387
IMPP7	582.81	2 ⁺	1164.61	TFVSSQVSGPR	P85394
IMPP8	600.83	2 ⁺	1200.65	AAALSQAADNLR	P85395
IMPP9	625.83	2 ⁺	1250.66	FTAASQTLEAGR	P85396
IMPP10	675.35	2 ⁺	1349.69	NSTMNSLLQLGR	P85397
IMPP11	675.85	2 ⁺	1350.70	NSTMDSLLQLGR	P85370
IMPP12	682.85	2 ⁺	1364.70	LSVNYQWLVR	P85399
IMPP13	697.82	2 ⁺	1394.64	ALVSADGDSWFAR	P85368
IMPP14	737.39	2 ⁺	1473.78	VTAKAVAAAEAAASSAR	P85371
IMPP15	762.88	2 ⁺	1524.76	LGSPFGGFDLGSNR	P85369
IMPP16	842.46	2 ⁺	1683.92	PGGGVSGALSSLVQSLVR	P85365
IMPP17	862.4	2 ⁺	1723.79	YYEEYVDGQGMVVR	P85366
IMPP18	890.10	3 ⁺	2669.29	-MFLGPGGAGGQAFDQAR	P85400
IMPP19	978.96	2 ⁺	1956.91	-GGGSNFGQFAGGLLDR	P85401
IMPP20	1057.4	2 ⁺	2113.79	-DMDDFGLGDFDDGR	P85367

^a : peptide also present in the AIM.

Table 3. Full and partial (-) peptide sequences of *Nautilus macromphalus* nacre ASM and AIM. Sequences were deduced from MS/MS spectra interpreted for *de novo* sequencing from 2-DE + MALDI-TOF/TOF or LC ESI-QqTOF/TOF analysis. These protein sequence data appear in the UniProt knowledgebase under the accession numbers P85364-P85401.

Figure 1

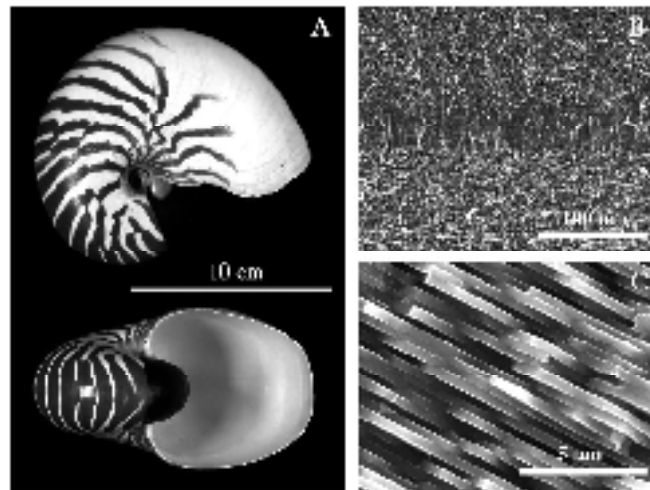


Fig. 1. The shell of *Nautilus macromphalus*. A, frontal (up) and lateral (down) views of the whole shell. B, SEM micrograph of the shell cross-section. The discontinuity between the prisms (up) and the nacre (down) is clearly shown. At the base of the prisms, a 30- μm thick transition layer can be observed. C, SEM micrograph of the nacreous layer. Nacre is made of a regular superimposition of aragonite flat tablets (0.5- μm thick), embedded in an organic matrix.

Figure 2

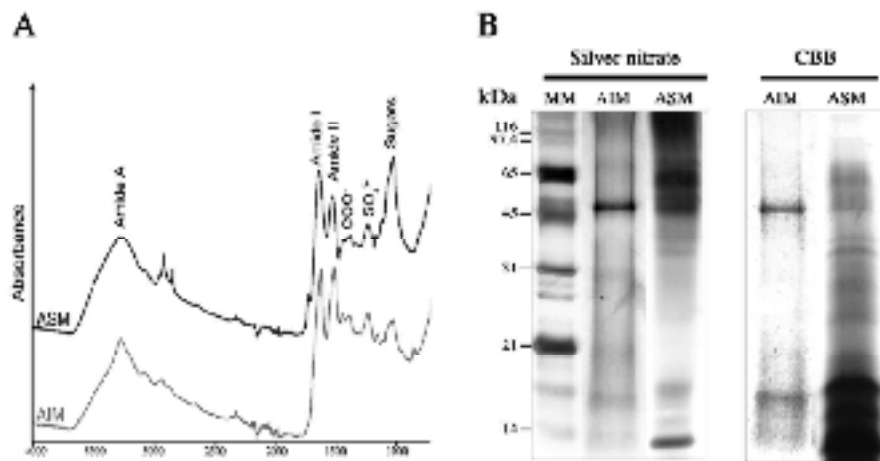


Fig. 2. Macromolecular and functional composition of the organic matrix of *Nautilus macromphalus* nacreous shell layer. *A*, infrared spectra of the acido-soluble (ASM, black line) and the acido-insoluble (AIM, gray line) matrices obtained by complete decalcification of the nacre powder in 5% acetic acid (4°C). *B*, electrophoretic analysis of the AIM and the ASM on 12% SDS-PAGE, under denaturing conditions. The AIM was suspended in 8 M urea (60°C, 2h) before electrophoresis. The gels were stained with silver (left) or Coomassie Brilliant blue (right). MM, molecular mass markers.

Figure 3

Fig. 3. SDS-PAGE analysis of the ASM of *Nautilus macromphalus* nacre. 12% acrylamide gels were stained with CBB, silver nitrate, Alcian blue, PAS, Stains-All, from left to right. The two right lanes correspond to the result of the calcium overlay test (^{45}Ca) and of an immunostaining using anti-*Pinctada margaritifera* ASM antibodies (WB). A similar amount of shell matrix was loaded on each lane (40 μg). MM, molecular mass markers.

Figure 4

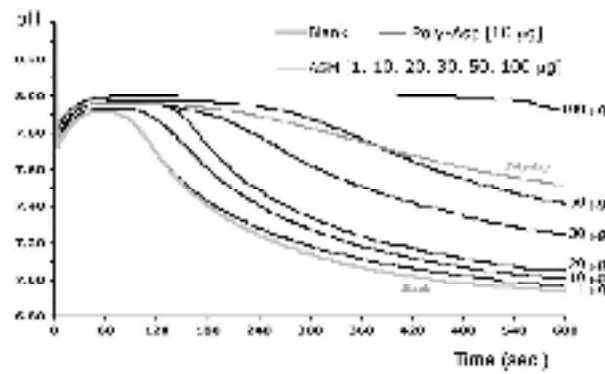


Fig. 4. *In vitro* inhibition of calcium carbonate precipitation by *Nautilus macromphalus* ASM. The pH of the solution was recorded as a function of time. The graph shows that ASM starts to be effective at 10 μg ; it almost completely inhibits the precipitation of CaCO_3 at 100 μg . The effect is dose dependent. Blank experiment (negative control) was performed without sample. 10- μg poly-Asp was used as positive control for inhibition.

Figure 5

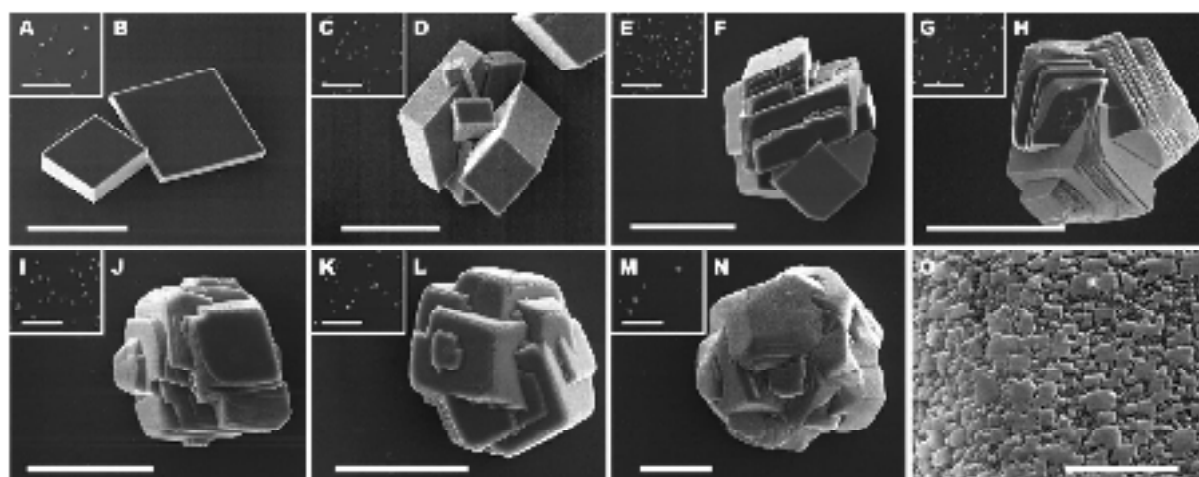


Fig. 5. Effects of *Nautilus macromphalus* nacre ASM on CaCO_3 crystal growth. SEM micrograph of calcite crystals grown *in vitro*, with different concentrations of ASM in the range $0.1\text{--}20\ \mu\text{g.mL}^{-1}$. A-B, negative control without matrix. C-D, ASM, $0.5\ \mu\text{g.mL}^{-1}$. E-F, ASM, $1\ \mu\text{g.mL}^{-1}$. G-H, ASM, $2\ \mu\text{g.mL}^{-1}$. I-J, ASM, $5\ \mu\text{g.mL}^{-1}$. K-L, ASM, $10\ \mu\text{g.mL}^{-1}$. M-N, ASM, $20\ \mu\text{g.mL}^{-1}$. O, detail of N. Scale bars: $600\ \mu\text{m}$ for A, C, E, G, I, K & M ; $30\ \mu\text{m}$ for B, D, F, H, J, L, & N ; $2\ \mu\text{m}$ for O. Under these conditions, we only observed the formation of calcite crystals (supplemental data).

Figure 6

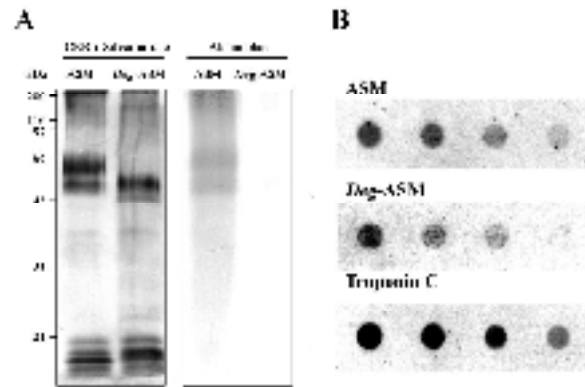


Fig. 6. Chemical deglycosylation of *Nautilus macromphalus* nacre ASM with TFMS acid. *A*, analysis of samples on 12% acrylamide SDS-PAGE after dual staining with CBB/silver (left) and Alcian blue staining (right). *B*, ^{45}Ca -binding overlay test on dot-blot with the ASM (up) and the *deg*-ASM (middle), under non-denaturing conditions. Pure troponin C (down) was used as positive control of calcium-binding ability. Different amounts of samples were tested (from the left to the right: 4, 2, 1, 0.5 μg per dot). Deglycosylation of the nacre ASM with TFMS slightly alters the calcium-binding capacity. The efficiency of the TFMS deglycosylation was checked on HPAE-PAD.

Figure 7

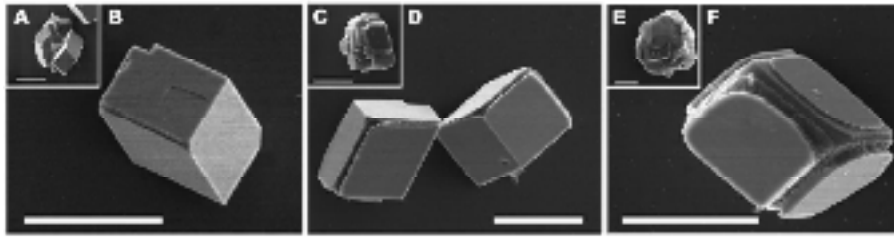


Fig. 7. Effect of chemical deglycosylation of *Nautilus macromphalus* nacre ASM on the *in vitro* CaCO_3 crystal growth. SEM micrograph of calcite crystals grown *in vitro* with different amounts of ASM (A-C-E) and *deg*-ASM (B-D-F). A-B, $0.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ of ASM and *deg*-ASM, respectively. C-D, $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ of ASM and *deg*-ASM, respectively. E-F, $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ of ASM and *deg*-ASM, respectively. Scale bars represent $30 \mu\text{m}$. Under these conditions, we only observed the formation of calcite crystals (supplemental data).

Figure 8

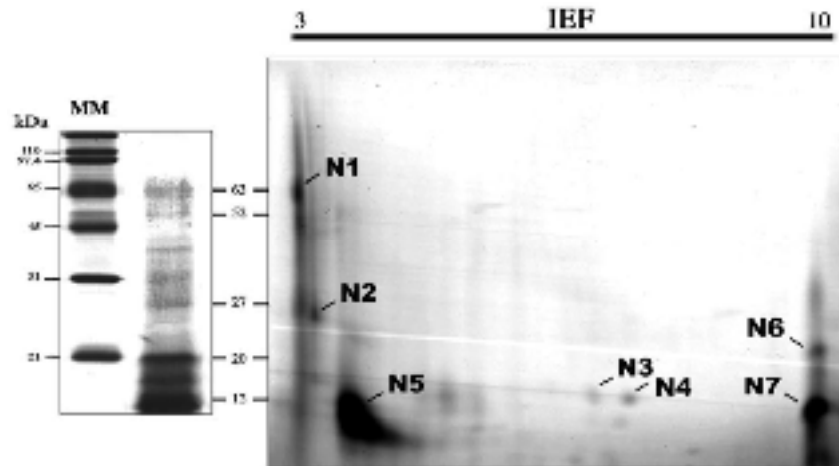


Fig. 8. 2D-electrophoresis analysis of *Nautilus macromphalus* nacre ASM. On the left, mono-dimensional gel with ASM, showing the correspondence between the protein bands and the spots observed on 2-DE (right) after CBB staining, using pH 3-10 IPG strip in the first dimension. MM, molecular mass markers. The seven most intense spots were excised from the gel and further analyzed by MALDI-TOF mass spectrometer after reduction, alkylation and digestion with trypsin. These spots are named N1-N7.

Figure 9

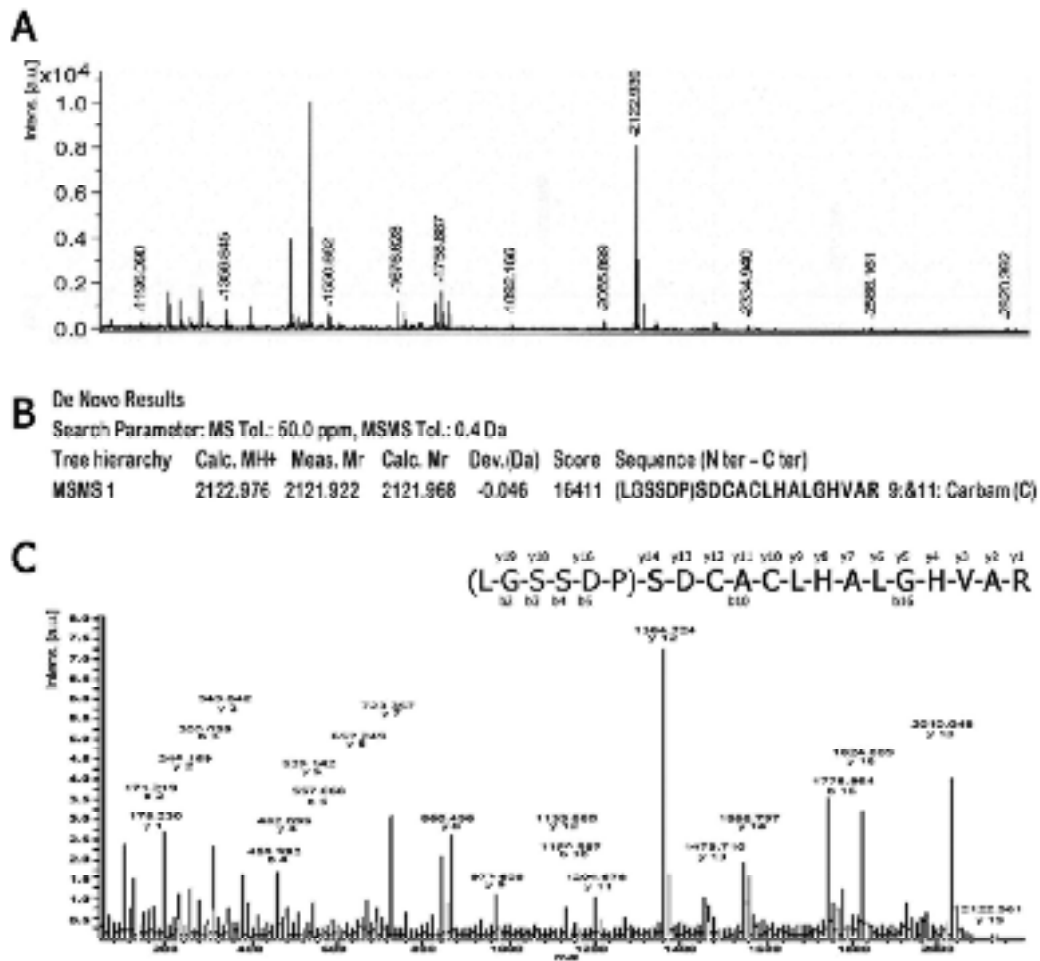


Fig. 9. Proteomic approach performed on *Nautilus macromphalus* nacre ASM proteins after separation by 2-DE. Example of the analysis performed on the Naut_smp1 peptide (m/z 2122.94, monocharged) from the N1 spot. *A*, tryptic PMF of the N1 spot protein acquired on the linear mode by MALDI-TOF using HCCA matrix. The most intensive peaks were manually selected for MS/MS fractionation. The MASCOT search engine was used for protein identification by comparing the mass spectra of the fragmented peptides. *B*, result of the RapiDeNovo software interrogation for MS/MS spectra interpretation for the 2122.94- m/z peptide fractionation. High score indicates good correspondence between MS/MS spectra of fractionated peptide and the sequence proposed by the software. The sequences were further validated by manual *de novo* sequencing. *C*, MS/MS spectra of the 2122.94- m/z peptide and manual interpretation of the spectrum for sequence identification. We only consider amino acid positions, which were undoubtedly determined. Uncertain amino acids were mentioned in brackets, but not validated and peptide sequences with uncertain amino acids in an internal position were not further considered. In this example, we validated the sequence SDCACLHALGHVAR for further BLAST, alignment with the SIM tool and sequence registration on Swissprot database.

Figure 10

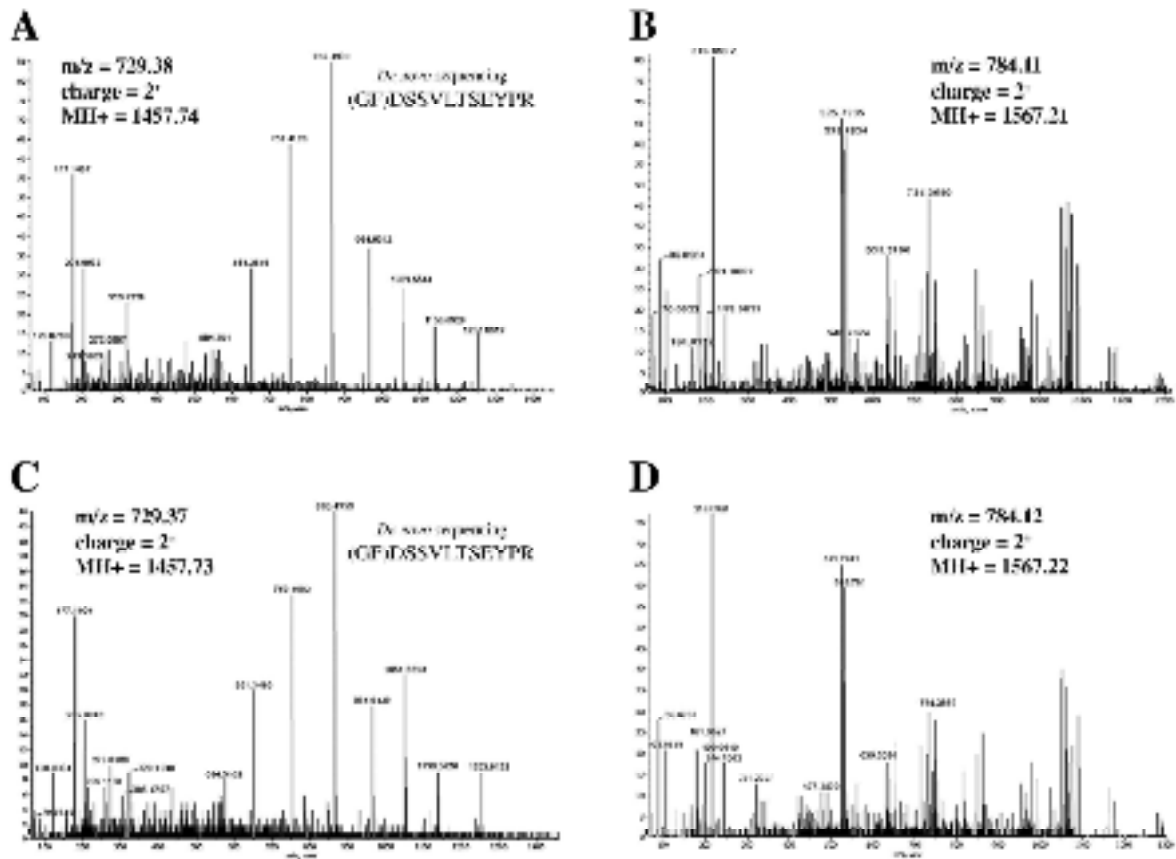


Fig. 10. The *Nautilus macromphalus* nacre ASM and AIM share common proteins. Example of MS/MS spectra of peptides, which exhibit similar m/z values, acquired by ESI-QqTOF/TOF from digestion with trypsin of the ASM (A-B) and the AIM (C-D). The minimum ion intensity was set to 10 counts. The ion-spray potential and declustering potential were 5200 V and 50 V, respectively. The collision energy for the gas phase fragmentation of the precursor ions were determined automatically by the IDA based on their m/z values. A and C, MS/MS spectrum of 729.4- m/z peptides from ASM and AIM tryptic digests, respectively. For these two peptides, *de novo* sequencing proposes the same (GF)DSSVLTSEYPR sequence. B and D, MS/MS spectrum of 784.1- m/z peptides from ASM and AIM tryptic digests, respectively. These two peptides share the same MS/MS profiles, but according to the complexity of the spectrum, no sequencing was possible for this example. By using this comparative approach for similar- m/z peptides from the two extracts, we were able to show that the ASM and the AIM share at least 33 common peptides, exhibiting the same MS/MS profiles and the same amino acid sequences.

Figure 11

A	B	C	D	E
Nacrein ^a	N14 ^b	Tyrosinase-like 1 & 2	Mucoperline	MSI60 & MSI31
ampp1 LEALGHV Q27908 LEALGHV ampp3 EDGYHFFYR Q27908 EDGYHFFYR lapp20 EDGDFGLGDFDU Q27908 EDGDFGLGDFDU	ampp15 LGTCFASNP Q9NL39 LGTCFASNP ampp8 RAVVRLC Q9NL39 RAVVRLC lapp17 YRKYVQ Q9NL39 YRKYVQ	ampp8 GPAAVVRLG A1IHF0 GPAAVVRLG A1IHF1 GPAAVVRLG lapp10 HNSLLQVAK A1IHF0 HNSLLQVAK A1IHF1 HNSLLQVAK	ampp5 GPAAVVRLC Q9BKM3 GPAAVVRLC ampp18 RAVVVRVVP Q9BKM3 RAVVVRVVP lapp5 SEDDYAR Q9BKM3 SEDDYAR	lapp14 AEAVAAAEAAASA O02402 AEAVAAAEAAASA lapp4 TLRARATASAK O02401 TLRARATASAK O02402 TLRARATASAK

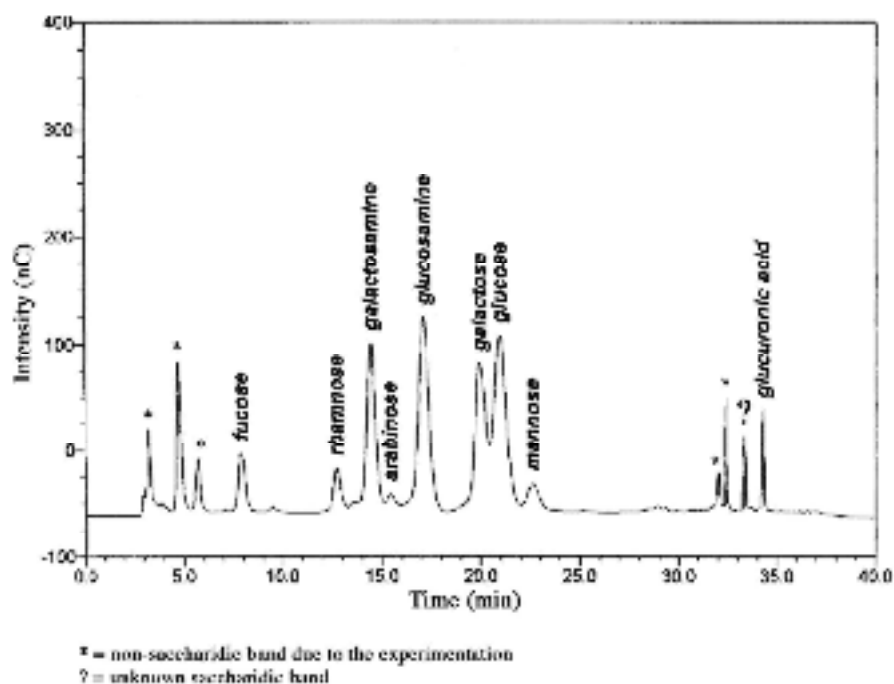
^a Similar conserved domains exhibiting similar alignment with *N. macromphalus* shell proteins are also observed in nacrein-like proteins.

^b Similar conserved domains exhibiting similar alignment with *N. macromphalus* shell proteins are also observed in N16 and perlins.

Fig. 11. Alignment of *Nautilus macromphalus* shell matrix sequences with previously characterized molluscan shell proteins. *A*, multiple alignments with *P. fucata* nacrein (accession number Q27908). Notice that similar alignments are observed with the 6 nacrein-like proteins (A0ZSF2, A0ZSF3, A0ZSF4, A0ZSF5, A0ZSF6, and A0ZSF7). *B*, multiple alignments with N14 (Q9NL39). Notice that similar alignments are observed with N16 and pearlins (O97048, Q14WA6). *C*, multiple alignments with tyrosinase-like proteins 1 and 2 (A1IHF0, A1IHF1). *D*, multiple alignments with mucoperlin (Q9BKM3). *E*, alignments with MSI60 (O02402) and MSI31 (O02401). Comparison of sequences were performed two by two with the new sequence of *N. macromphalus* shell matrix and the 65 full or partial sequences of mollusc shell proteins (reviewed in [18]), using the SIM tool from expasy software (www.expasy.org/tools/sim.html).

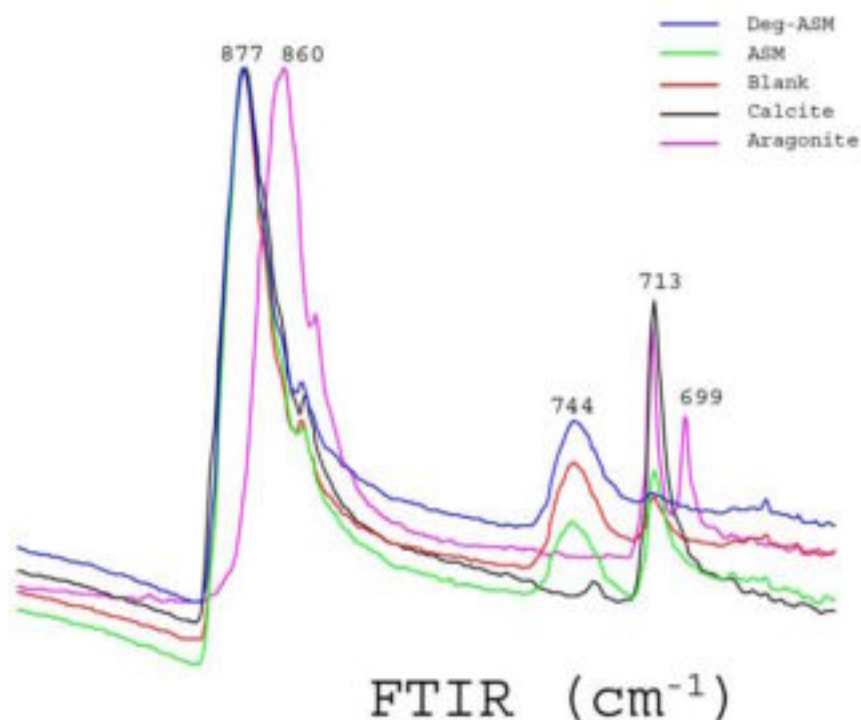
SUPPLEMENTAL DATA:

Monosaccharidic composition of the ASM of *Nautilus macromphalus* nacre



The composition of neutral sugars is obtained by high performance anion exchange-pulsed amperometric detection after hydrolysis with 2 M trifluoroacetic acid at 110°C (4 h). We observed that after hydrolysis, some non-hydrolyzed compounds were still present at the bottom of the vessel. An undetermined peak was observed in the acidic monosaccharide zone (?).

FTIR profile of calcium carbonate crystals grown *in vitro* in presence of ASM & deg-ASM



FTIR spectra of calcium carbonate crystals, produced *in vitro* in the presence of ASM or deg-ASM, according to the ammonium bicarbonate diffusion method. Blank experiments were performed similarly, but without the addition of shell matrix. Controls were obtained from geological calcite or aragonite.

Infrared spectra were directly recorded from dry samples at a 2 cm⁻¹ resolution on a Fourier Transform Infra Red (FTIR) spectrometer Ucker Vector 22 equipped with a Specac Golden GateTM ATR device in the wave number range of 4000-500 cm⁻¹.

Tryptic peptide mass fingerprinting (PMF) of protein spots from the *Nautilus macromphalus* shell nacre, recorded by MALDI-TOF.

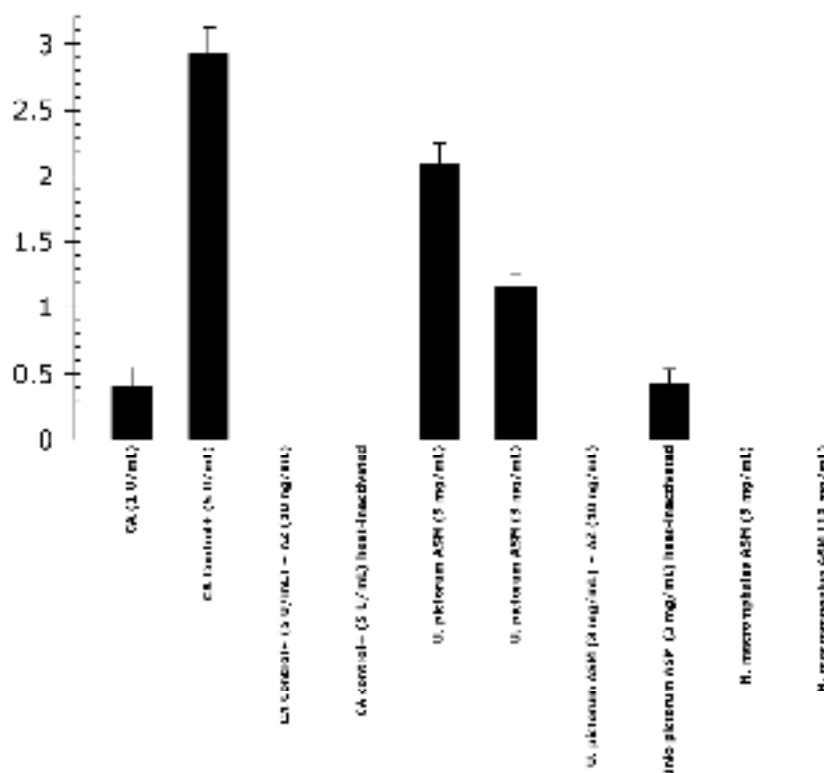
Underlined values correspond to peptides with the same m/z in different protein spots.

In bold: peptides from which sequences were obtained by MS/MS analysis.

*: peptides which were analyzed on MS/MS mode.

spot name	m/z values (monocharged ions)
N1	1196.09, 1356.85*, 1394.79, 1489.71*, 1505.68, <u>1512.94*</u> , 1550.88*, 1567.78, 1676.63*, 1690.63, 1692.63, <u>1723.43</u> , 1748.93*, <u>1758.89*</u> , <u>1774.89</u> , <u>1892.17</u> , 2065.90, <u>2122.94*</u> , 2334.94, 2566.19, 2820.39, 2835.37
N2	1197.25, 1361.81*, 1433.65, 1459.63, <u>1490.78</u> , <u>1512.92*</u> , <u>1645.95</u> , <u>1722.93*</u> , <u>1723.41</u> , <u>1760.86</u> , 1765.76*, <u>1774.87</u> , 1791.74*, 1837.98, <u>1876.72</u> , <u>1892.15</u> , 1900.89, 1909.02, <u>2122.91</u> , 2705.18, 3162.28*, <u>3211.46</u> , 3312.31
N3	<u>1998.94*</u> , <u>2711.17*</u>
N4	1584.73*, 1941.94, <u>1998.95*</u> , 2653.72, 2695.19, <u>2711.20*</u> , 4017.69, 4034.76
N5	<u>1003.37*</u> , 1013.54*, 1029.52*, <u>1286.32*</u> , 1310.57*, 1320.62, <u>1482.66*</u> , 1513.77*, 1523.61, 1524.59*, <u>1531.52</u> , 1580.63, 1655.65, 1701.55, 1707.78, <u>1722.91</u> , 1740.85, 1744.88, <u>1758.87</u> , 1765.75, 1791.77, 1811.88, 1836.96*, 1858.58, 1873.77, <u>1874.76*</u> , 1912.71, 1931.77, 1975.59, 2017.02, 2033.02*, 2312.14, 2399.00, 2689.40, 2740.14, 2817.49, 3312.35, 3621.65
N6	1140.55, 1169.69, 1184.68, 1188.64*, 1260.54*, 1274.55*, <u>1286.29</u> , 1325.78*, 1364.67, 1401.63, 1457.71*, <u>1482.63*</u> , <u>1490.73</u> , 1508.74, 1555.80, 1568.73, 1585.80*, <u>1645.90</u> , 1660.79, 1688.11, 1689.82, <u>1722.90</u> , 1738.01*, 1745.90, 1761.78, <u>1774.83</u> , 1805.75, <u>1876.75</u> , 1901.88, 1943.92, 2105.94, 2192.97, 2309.04*, 2465.12, 2576.09, 2732.16, <u>3211.42</u> , 3273.43, 3429.41, 4407.92
N7	<u>1003.38</u> , <u>1286.32*</u> , 1374.60, 1391.65, 1425.64*, 1438.67, 1465.64, 1467.64, <u>1482.67*</u> , 1502.47, 1520.62, <u>1531.55</u> , 1602.67, 1625.71, 1627.70, 1669.69, 1671.68, 1696.83, 1702.47*, 1743.83*, <u>1758.85</u> , 1759.84, <u>1760.83*</u> , 1796.79, 1819.76*, 1836.74, 1859.75, <u>1876.79*</u> , 1893.79*, 1914.74*, 1952.58, 2672.15, 3079.37, 3085.83, 3127.38*, 3170.36, 3255.44, 3270.43, 3314.38, 3553.56, 3695.60

Carbonic anhydrase activity in *Nautilus macromphalus* ASM



The miniaturized colorimetric method developed by Maren (1960) was performed for measuring the carbonic anhydrase (CA) activity of the nacre ASM. The experiment was carried out under stabilized flow of CO₂ at 4°C. Four hundred μ L of phenol red (12.5 mg/L in 2.6 mM NaHCO₃) were mixed with 200 μ L of water and 100 μ L of sample. The reaction was initiated by adding 100 μ L of freshly made carbonate buffer (0.6 M Na₂CO₃, 0.412 M NaHCO₃) then the time interval until the color change from red to yellow was monitored. This color change testifies the pH change in the solution (from 8.2 to 7.3) resulting of the production of protons during the reaction catalyzed by the CA ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$). The enzyme unit (EU) activity was calculated according to the following equation: Activity units (EU) = $(T_0 - T) / T$, where T and T₀ are the reaction times required for the pH change with and without a catalyst, respectively. Acetazolamide was used as a specific inhibitor of the reaction and heat-inactivation of AC was performed by boiling the samples (100°C, 10 min). Commercial CA was assayed as positive control for the test and *Unio pictorum* ASM was used of positive control for both matrix extraction process and CA activity.

Even at high concentration (10 mg/mL), no activity was detectable in *Nautilus macromphalus* ASM.

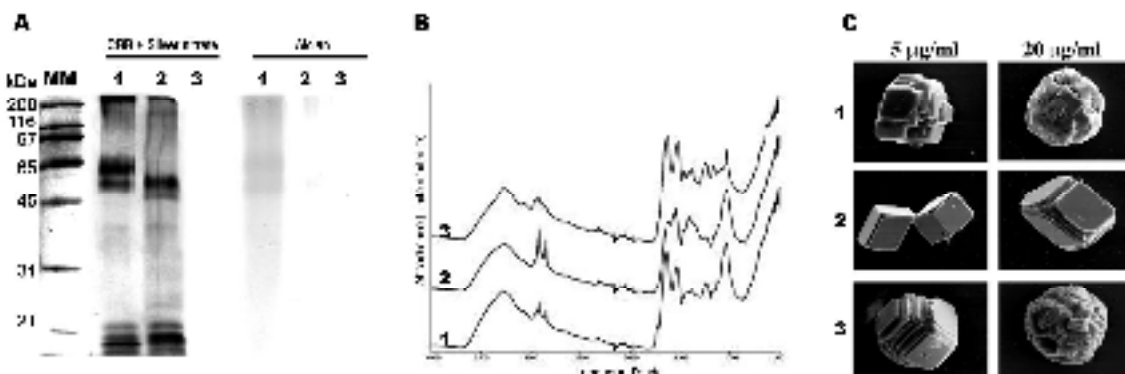
Maren T (1960) A simplified micromethod for determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* **130**, 26-29.

3 – Résultats complémentaires

3.1 - Déprotéinisation de la matrice

Dans une étude préliminaire, nous avons voulu étudier plus en profondeur le rôle des polysaccharides sulfatés de l'ASM dans les processus de formation de la couche nacrée de *Nautilus*. Après avoir effectué une déglycosylation chimique de cette matrice au TFMS, nous avons entrepris une déprotéinisation de cette matrice, afin d'en extraire les composés saccharidiques uniquement. L'ASM a été déprotéinée par une incubation d'une heure dans une solution de NaOH 1 M (80°C), suivie d'une étape de dialyse contre de l'eau ultra-pure. La quantité de protéines a été estimée par dosage au BCA. L'échantillon déprotéiné a ensuite été comparé avec l'ASM native et de l'ASM déglycosylée par trois techniques : l'électrophorèse sur gel 1-D, la spectrométrie FTIR et le test d'interaction de précipitation du carbonate de calcium *in vitro* (Figure 39A-B-C, respectivement). Il semblerait que ce traitement ait été efficace pour hydrolyser les chaînes d'acides aminés (perte de coloration observée en SDS-PAGE et perte de groupements spécifiques en spectrométrie FTIR). Notons cependant que les polysaccharides observés vers 100-200 kDa dans l'ASM ne sont plus détectables en SDS-PAGE après traitement. Cette observation suggère que le traitement a également dégradé partiellement cette fraction. Quoi qu'il en soit, la matrice déprotéinée présente une forte capacité à interagir avec la précipitation du CaCO₃. En effet, la réactivité de cet échantillon semble comparable à celle de l'ASM native, alors que l'ASM déglycosylée présente, aux mêmes concentrations, une réactivité fortement modifiée. Ces résultats encourageants restent cependant à approfondir. Une approche par purification de la fraction saccharidique par électrophorèse préparative semblerait tout indiquée pour cette étude.

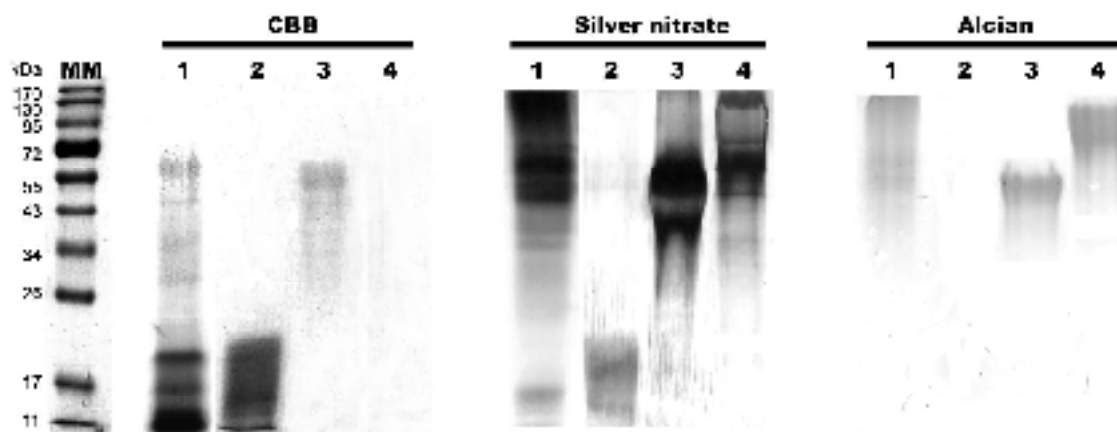
Figure 39 : Etude de la matrice acido-soluble de la nacre de *Nautilus* après déprotéinisation, en SDS-PAGE (A), par spectrométrie FTIR (B) et par le test d'interférence de précipitation du CaCO₃ *in vitro* (C). 1, ASM ; 2, ASM déglycosylée ; 3, ASM déprotéinée. Après déprotéinisation, même si les GAGs de l'ASM semblent avoir été partiellement dégradés, ils présentent une aptitude à interagir avec la précipitation du CaCO₃ *in vitro* comparable à celle de l'ASM native.



3.2 – Purification des différents constituants de la matrice

Nous avons évoqué précédemment l'intérêt de purifier les différentes macromolécules de l'ASM extraite de la nacre de *Nautilus*. Une approche de purification des différentes fractions de l'ASM par électrophorèse préparative permet d'obtenir des produits de purification sans traitement chimique additionnel. Par cette technique, nous avons pu purifier trois fractions correspondantes à différentes macromolécules de cette matrice : **une fraction comprenant plusieurs protéines non glycosylées de 10-20 kDa, capables de lier les ions calcium, une autre comprenant une glycoprotéine sulfatée migrant aux alentours de 50 kDa, ainsi qu'une dernière comprenant des polysaccharides sulfatés de 100-150 kDa** (Figure 40). L'obtention de ces fractions devrait, dans un avenir proche, nous permettre d'effectuer différents travaux complémentaires afin d'aller plus loin dans la caractérisation de ces macromolécules de l'ASM de la nacre : la production d'anticorps polyclonaux dirigés contre ces différentes fractions, la localisation de ces différents composés sur tissus calcifiés par la technique d'immuno-gold, le séquençage interne de la glycoprotéine migrant à 50 kDa, l'étude de la capacité de ces composés à inhiber et à interagir avec la précipitation du CaCO_3 . **Ces travaux devraient apporter des données essentielles à la compréhension du rôle et des fonctions des différents composés organiques de la matrice de la nacre dans les processus de biominéralisation. Ils devraient également permettre de confronter le modèle topographique de formation et d'organisation de la nacre avec les données d'identification et de caractérisation des macromolécules extraites des tissus.**

Figure 40 : Observations par SDS-PAGE des différentes fractions de l'ASM de la nacre de *Nautilus macromphalus*, purifiées par électrophorèse préparative. Ligne 1, ASM de nacre ; ligne 2, fraction comprenant plusieurs protéines non glycosylées de 10-20 kDa, capables de lier les ions calcium ; ligne 3, fraction comprenant une glycoprotéine sulfatée migrant aux alentours de 50 kDa ; ligne 4, fraction comprenant des polysaccharides sulfatés de 100-150 kDa.



4 – Les acquis des travaux effectués chez *Nautilus macromphalus*

Au terme de cette étude de la matrice organique associée à la couche nacrée de la coquille du céphalopode *Nautilus macromphalus*, il nous est possible de dégager plusieurs résultats importants.

Alors que la **matrice acido-insoluble est essentiellement constituée de protéines hydrophobes et de chitine**, la **matrice acido-soluble est majoritairement composée de protéines, de glycoprotéines et de polysaccharides acides portant des sucres sulfatés**. Nous avons pu distinguer au sein de cette matrice des polysaccharides sulfatés de masses moléculaires apparentes importantes (entre 100 et 200 kDa), des glycoprotéines très acides (pI inférieur ou égale à 3) migrant aux alentours de 60-50 kDa, ainsi que des protéines non glycosylées capables de fixer le calcium *in vitro*, migrant entre 10 et 20 kDa.

Les expériences de déglycosylation ont montré que la fraction saccharidique sulfatée était impliquée dans la capacité de la matrice à interagir avec la précipitation du carbonate de calcium, mais également dans l'acidité des glycoprotéines qui la constituent (les glycoprotéines de 50-60 kDa focalisent à un pI situé aux alentours de 3-4 après déglycosylation). Contrairement à ce que nous avons observé chez *Unio pictorum*, il semble que les sucres de l'ASM du nautilus ne soient pas impliqués dans la capacité à lier les ions calcium. Quoi qu'il en soit, ces résultats nous confirment que **les groupements saccharidiques de l'ASM de la nacre sont impliqués dans la capacité de cette matrice à interagir avec la formation du biominéral**.

Sur gel 2-D, on observe que les différentes macromolécules de l'ASM migrent à des pI s soit très acides (inférieurs ou égales à 3), soit très basiques (supérieurs à 9). La présence de protéines acides dans la nacre de nautilus avait été observée par Weiner (1979), qui proposa par la suite plusieurs modélisations de la nacre intégrant cette donnée (voir chapitre I). Notons par ailleurs que, compte tenu des données moléculaires, aucune protéine extraite de la nacre de bivalves ou de gastéropodes n'avait présenté jusqu'alors de pI particulièrement acide. Au vu de nos observations chez le nautilus, **il semblerait que les différentes classes de mollusques soient capables de former de la nacre à partir d'assemblages protéiques d'acidités différentes : très acides et très basiques (céphalopodes) ou faiblement acides, voir neutres (bivalves, gastéropodes)**.

L'analyse protéomique des spots protéiques observés sur gel 2-DE nous montre que **les différentes protéines de l'ASM possèdent des séquences peptidiques identiques**. Ces observations suggèrent que les différentes protéines de l'ASM puissent avoir une origine commune.

Une deuxième analyse protéomique des peptides obtenus par digestions trypsique de l'AIM et de l'ASM a démontré que ces deux matrices comportaient de nombreux peptides communs. **Ce résultat suggère que la matrice acido-insoluble puisse se former, au moins en partie, par polymérisation de protéines solubles**, impliquant probablement l'activité d'enzymes de type oxydase, comme les tyrosinases.

Les deux approches protéomiques mises en œuvre nous ont permis de décrire une quarantaine de séquences partielles de protéines de la matrice associée à la nacre de *Nautilus*. **Nous avons observé que certaines de ces séquences peptidiques présentaient des homologues avec les protéines de type Nacrein, N14/N16, Tyrosinase-like et Mucoperlin, des protéines de la nacre de bivalves ptériomorphes (*Pinctada* spp. et *Pinna nobilis*), alors qu'aucune homologie n'a pu être mise en évidence avec les protéines décrites chez les gastéropodes du genre *Haliotis***. Ces résultats remarquables suggèrent que les protéines de nacre des gastéropodes puissent avoir divergé au cours de leur évolution. Cette dernière hypothèse reste à tester.

Au vu de ces résultats, plusieurs pistes de recherche ultérieures paraissent particulièrement intéressantes à explorer :

- l'étude des processus de formation de la matrice insoluble : détection et caractérisation d'activités enzymatiques de type oxydase (phénoloxydase, tyrosinase...)
- la localisation des différents constituants de la matrice de *Nautilus* au sein des tissus calcifiés: purification des différents composés majoritaires (électrophorèse préparative), caractérisation de la structure primaire des protéines (MS/MS), production d'anticorps polyclonaux, immuno-détection sur coquille (immuno-gold).

Ces travaux devraient permettre d'apporter des données essentielles à la compréhension des mécanismes qui régissent la formation de la nacre, mais aussi de concilier/réconcilier les modèles topographiques avec les données moléculaires.

Chapitre IV:
La biominéralisation de la coquille
chez les brachiopodes

La biominéralisation de la coquille chez les brachiopodes

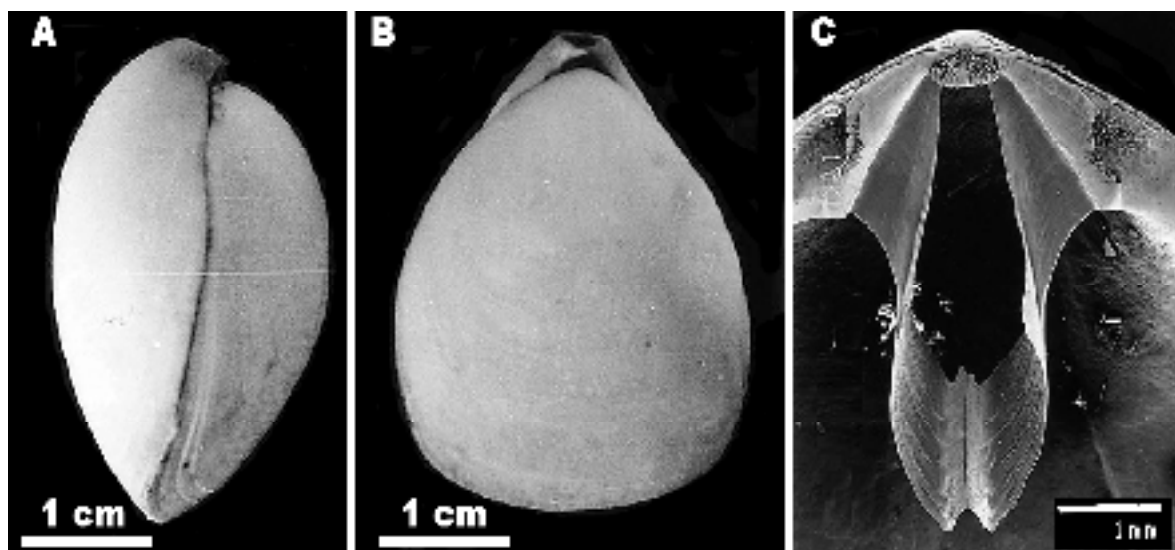
1 - Introduction

1.1 - Description, biologie et cycle de vie

Les brachiopodes sont des animaux exclusivement marins, pour la plupart sessiles. On les trouve de la zone intertidale jusque dans les grands fonds océaniques. Ces organismes ont une répartition mondiale, mais ponctuelle, surtout en mers froides (principalement, les mers antarctiques et subantarctiques, les côtes sud-américaines, australiennes et néo-zélandaises). On trouve également des espèces de petite taille en Méditerranée et en Manche. Ces animaux sont des organismes filtreurs de particules en suspension dont ils se nourrissent. Les adultes des représentants actuels mesurent entre 1 et 6 cm de longueur. Les sexes sont séparés, les gamètes sont émis dans l'eau et la fécondation est externe. L'œuf subit un clivage radiaire ; la larve ciliée nageuse est planctonique. Les larves sont négativement phototrophes et, à la métamorphose, elles se fixent aux sédiments et se transforment alors en jeunes, semblables aux adultes.

Les brachiopodes sont des organismes lophotrochozoaires, non segmentés, dont le corps est protégé dans une coquille constituée de deux valves (Figure 41). À la différence des bivalves (= lamellibranches) qui possèdent une valve droite et une valve gauche, les deux valves des brachiopodes, appelées valves brachiales dorsale et ventrale, sont disposées perpendiculairement au plan de symétrie du corps de l'animal, selon l'axe dorso-ventral.

Figure 41 : La coquille d'un brachiopode actuel, *Stenosarina crosnieri* (photographies extraites de Gaspard, 2003). A) Vue générale latérale droite. B) Vue générale ventrale; C) Observation au MEB de la zone d'articulation de la coquille sur une valve ventrale en vue interne.



L'animal possède un pédoncule flexible sortant de la valve ventrale par lequel il se fixe au substrat (Figure 42). La coquille est secrétée par une extension de la paroi corporelle, le manteau (tissu non homologue au manteau des mollusques). À l'intérieur de la coquille, le lophophore, organe volumineux muni de cils vibratiles qui permet à l'animal de brasser et de filtrer l'eau, se situe en amont de la bouche, et est soutenu par des pièces squelettiques fixées en position interne. Selon les espèces, le tube digestif est aveugle ou présente un anus qui débouche sur la cavité du manteau. Le système vasculaire est ouvert et certaines espèces possèdent un cœur contractile. L'ensemble des organes occupe un volume restreint, comparativement au lophophore. L'animal possède également trois paires de muscles permettant d'ouvrir et de fermer la coquille ou de contracter le pédoncule.

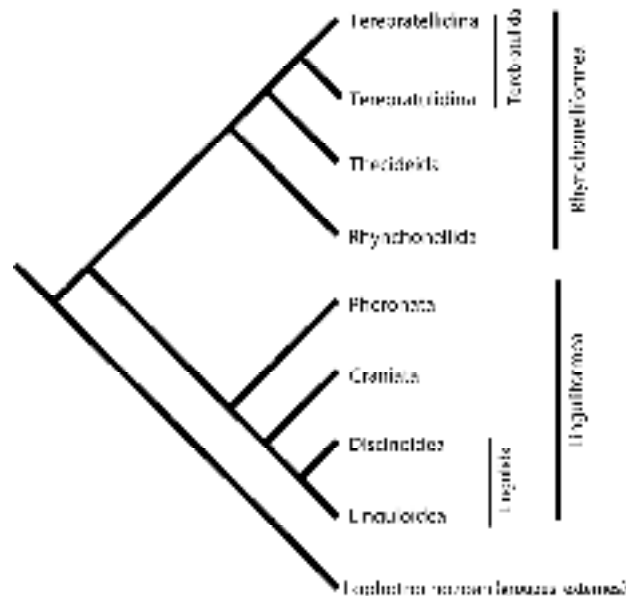
Figure 42 : Anatomie interne d'un brachiopode (modifié d'après Williams & Rowell, 1965).

1.2 – Phylogénie et position taxonomique

Les brachiopodes présentent au moins 12 familles connues dès la base du Cambrien. Ils constituaient un groupe très répandu durant tout le Paléozoïque. Près de 12 000 espèces ont été décrites à partir des enregistrements fossiles (Figure 43). Ces organismes furent durement touchés par la crise Permo-Triasique. Depuis cette époque, le nombre d'espèces reste réduit et leur répartition géographique est devenue ponctuelle.

brachiopodes au sein des lophotrochozoaires a longtemps posé de nombreux problèmes ; on a même pensé qu'ils pourraient faire partie des deutérostomiens.

Figure 44 : Phylogénie des différentes super-familles de brachiopodes actuels (modifié d'après Cohen, 2006). Notons que, dans cette étude basée sur l'observation du gène codant pour l'ARNr 18s, les Craniata font partie des Linguliformea, et que les Phoronata sont inclus au sein des Brachiopoda.



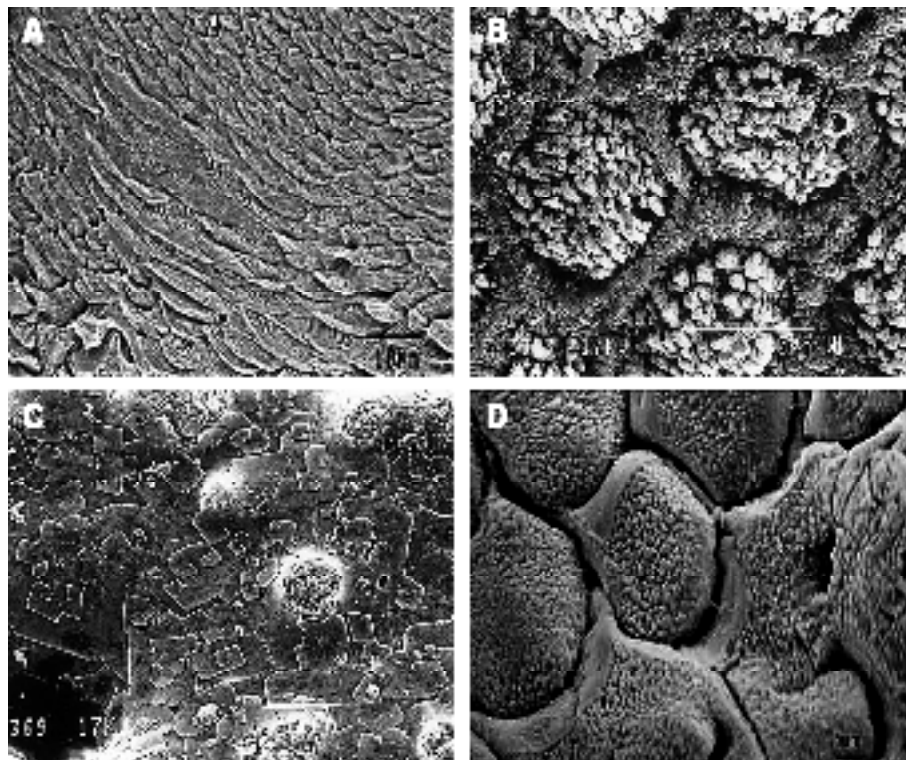
1.3 - Description de la coquille

La coquille calcifiée des brachiopodes ainsi que la couche superficielle de périostracum sont sécrétées continuellement pendant la vie de l'animal par les cellules de l'épithélium du manteau. Dans ce phylum, chacune de ces cellules possède son propre régime de sécrétion qui varie en fonction de sa position relative. Notons que le manteau des brachiopodes n'est pas homologue à celui des mollusques. Le périostracum et la coquille présentent à micro-échelle des structures complexes, organisées en couches différenciées (Figure 45). La première coquille se forme à la métamorphose et est, dans un premier temps, de structure minérale granulaire à laquelle des couches minéralisées fibreuses, laminaires ou prismatiques, vont être ajoutées. Chez de nombreuses espèces appartenant aux Craniiformea et aux Rhynchonelliformea (mais pas aux Linguliformea), la coquille est traversée par des pores régulièrement espacés (les caecae).

Les coquilles sont composées de carbonate de calcium (calcite) chez les Craniata et les Rhynchonelliformea, et de phosphate de calcium chez les Lingulata. La composition et la quantité de matrice organique associée aux coquilles de ces différents groupes sont également

très différentes (Simkiss & Wilbur, 1989). Alors que les coquilles calcaires comprennent 0,5% de protéines, les coquilles phosphatiques sont composées de près de 25% de protéines associées à de la chitine. Notons que les rôles de la matrice organique dans les processus de minéralisation de même que son organisation au sein du biominéral sont très peu connus. Chez les Rhynchonelliformea, des travaux précurseurs (Jope, 1965) ont montré que ces matrices sont composées d'un mélange de protéines et de glycoprotéines. Depuis, un nombre réduit d'études ont permis de caractériser partiellement certains composés protéiques de ces matrices (Curry *et al.*, 1991 ; Cusack *et al.* 1992, 1997 ; Walton *et al.* , 1993 ; Walton & Curry, 1994 ; Walton, 1998), alors que Collins et ses collaborateurs (1988, 1991) ont effectué des études séro-taxonomiques sur ces matrices.

Figure 45 : Diversité des microstructures des coquilles de brachiopodes. (photographies extraites de Gaspard, 2003, 2007). A) Détail d'une structure fibrillaire, observé sur cassure fraîche de coquille de *Terebratulina retusa*. B-C) Détails de structure en tablettes à croissance spiralee et en prismes hexagonaux, respectivement, observés sur la face interne de la valve dorsale de *Novocrania anomala*. D) Détail d'une structure fibrillaire, observé sur cassure fraîche de coquille de *Caloria inconspicua*.

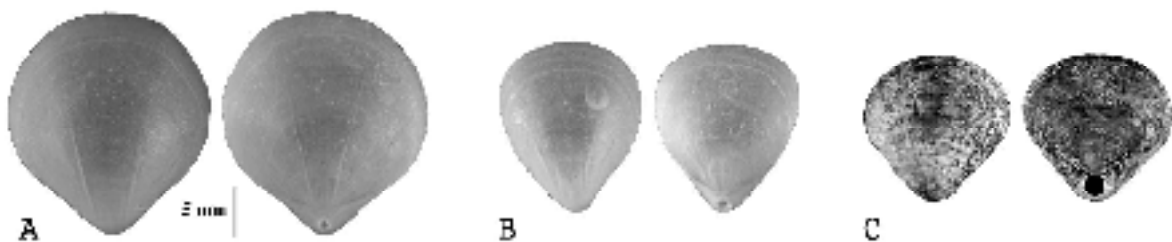


1.4 – Echantillonnage

Tous les échantillons proviennent de la collection personnelle de Danièle Gaspard (Université Paris-Sub, Orsay) ou ont été envoyés par des collègues néo-zélandais. Les individus adultes de *Gryphus vitreus* ont été collectés en mer Méditerranée. Les individus adultes de

Terebratulina retusa ont été collectés en mer d'Ecosse. Les individus adultes de *Liothyrella neozelanica*, *Notosaria nigricans*, *Calloria inconspicua* et *Neothyris lenticularis* ont été collectés sur les côtes de Nouvelle-Zélande (Figure 46). Une fois débarrassées des tissus mous, les coquilles ont été méticuleusement nettoyées par un bain prolongé dans de l'hypochlorite de sodium afin de retirer toutes traces de contaminants exogènes ou de tissus non calcifiés. Les coquilles ont ensuite été abondamment rincées à l'eau déminéralisée, puis séchées, avant d'être étudiées.

Figure 46 : Coquilles d'individus échantillonnés. A) *Notosaria nigricans*. B) *Gryphus vitreus*. C) *Liothyrella neozelanica*.



1.5 – But de l'étude

Notre étude a pour but de caractériser par des techniques de biochimie les différents constituants de la matrice calcifiante extraite de la coquille de différentes espèces de brachiopodes Rhynchonelliformea.

Du fait de l'absence de données moléculaires sur les protéines coquillières de brachiopodes et de la rareté des données biochimiques sur les matrices, notre étude constitue une approche préliminaire et comparative portant sur quelques genres, dans la perspective d'observer les éventuelles similitudes entre les matrices coquillières de brachiopodes et celles de mollusques.

Nous avons concentré notre attention, au sein des deux articles de recherche présentés ci-après, sur l'étude des composés organiques, notamment les protéines et les glycoprotéines afin de souligner leur importance dans les processus de minéralisation des coquilles de carbonate de calcium. Ces articles, présentés ici en langue anglaise dans leur format de publication, sont précédés d'un résumé en français. En conclusion, les résultats de cette étude seront discutés et comparés, dans une optique évolutive et mécanistique, avec ceux obtenus pour les matrices calcifiantes extraites de coquilles de mollusques.

2 – Biochemical characteristics of the shell soluble organic matrix of some recent Rhynchonelliformea (Brachiopoda), In *Biom mineralization: from Paleontology to Materials Science - Proceedings of the 9th International Symposium on Biom mineralization* (2007), pp. 193-204.

Résumé

Pour construire leurs coquilles, les brachiopodes sécrètent une mixture de protéines et de polysaccharides, nommée la matrice organique. Cette matrice est supposée être impliquée dans les processus de calcification en permettant la nucléation des cristaux de calcite et en régulant leur croissance. Les objectifs de ce travail sont d'observer à micro-échelle les interactions entre le minéral et la phase organique, mais aussi de caractériser les matrices acido-solubles chez différents brachiopodes Rhynchonelliformea actuels. Les coquilles de six espèces ont été déminéralisées à l'acide acétique 5% à froid. La caractérisation biochimique de la matrice acido-soluble a été réalisée par SDS-PAGE en conditions dénaturantes. Après électrophorèse, les gels ont été colorés au CBB, au nitrate d'argent, au bleu Alcian, au PAS et au Stains-All. Sur gels, les matrices testées ont présenté certaines similarités, mais aussi des différences frappantes. De plus, les matrices ont été testées pour leur capacité à interagir avec la précipitation de cristaux de carbonate de calcium *in vitro*. Toutes les matrices ont présenté une aptitude à modifier à faible concentration la morphologie des cristaux de calcite néo-formés. Dans une optique évolutive, ces résultats sont comparés à ceux obtenus à partir des coquilles de mollusques.

Biomineralization: from Paleontology to Materials Science
Proceedings of the 9th International Symposium on Biomineralization,
(Eds.) Arias, J.L., Fernández, M.S.
Editorial Universitaria, Santiago, Chile, 2007, pp. 193-204.

Biochemical Characteristics of the Shell Soluble Organic Matrix of Some Recent Rhynchonelliformea (Brachiopoda)

Danièle Gaspard^{1*}, Benjamin Marie², Nathalie Guichard², Gilles Luquet² and Frédéric Marin^{2*}

¹ Université de Paris-Sud, Département des Sciences de la Terre, Bât. 509, F-91405 Orsay Cedex, gaspard@geol.u-psud.fr

² Université de Bourgogne, Laboratoire de Biogéosciences, UMR 5561, 6 Bd. Gabriel, F-21000 Dijon, frederic.marin@u-bourgogne.fr

ABSTRACT

To build up their shell, brachiopods secrete a mixture of proteins and polysaccharides, collectively called the shell organic matrix. This matrix is supposed to mediate the calcification process by allowing the crystal nucleation and elongation and finally, by stopping the crystal growth. The aim of this work is, firstly, to observe at nanoscale the close relationships between the mineral and the organic phases, and secondly, to characterize the acetic acid-soluble matrices extracted from different articulate brachiopods.

Recent articulate brachiopod shells were observed according to a standard procedure, which emphasizes the microstructural details. For the biochemical characterization, the acetic acid-soluble shell matrices were extracted and analyzed by SDS-PAGE. The gels were subsequently stained with CBB, silver nitrate, Alcian Blue, PAS and carbocyanine. Furthermore, the matrices were tested for their ability to interact with the precipitation of calcite in vitro. On gels, the tested matrices exhibited some similarities, but also drastic differences. All the tested matrices modified, at different degrees, the morphology of calcite crystals.

The true mineralogical nature of the early-secreted elementary carbonate calcium structures (granules) is discussed, as well as the properties of the soluble matrices compared to those of mollusks.

INTRODUCTION

The shell built by the Rhynchonelliformea is a biologically controlled mineralisation, according to a classical terminology (Mann, 1983; Lowenstam and Weiner, 1989). The shell is an organo-mineral structure, mainly constituted by Low Magnesium Calcite enclosing a small amount of organic matrix. This matrix is suspected to control, over different scale, the deposition of calcite biocrystals (Jope, 1965). Physiologically, the growth of brachiopod shells is controlled at the mantle margin of both valves, by a conveyor-belt system of outer epithelial secreting cells proliferating at the generative zone (Gaspard, 1988: 67). Each cell of the outer epithelium has a secretory regime, which varies according

Gaspard et al.

to its migration from the generative zone to the tip of the outer mantle lobe. It follows a precise secretory sequence: periostracum, granular primary layer, fibrous secondary layer, and prismatic tertiary layer in some cases (Williams, 1968; Gaspard, 1986).

A precise observation at high magnification pointed out the hierarchical organization of the shell in different layers, which are mainly composed of elements: fibers (with their enclosing sheaths corresponding to the intercrystalline matrix) and prisms, themselves made of elementary units, like "granules" (Gaspard, 1991). Furthermore, a close organization of these elementary units with an intracrystalline matrix is revealed. However, the precise function of this organic phase is poorly understood. Unlike mollusks, for which several molecular data are available (Marin and Luquet, 2004), brachiopod shell matrices caught far less attention. The precursor work of Jope (1965, 1979) pointed out that the matrix is composed of a mixture of proteins. Later, studies of Cusack *et al.* (1992, 1997), Walton *et al.* (1993) further characterized the proteinaceous constituents of the shell matrices of different brachiopods, while Collins *et al.* (1988, 1991) used brachiopod shell matrices for sero-taxonomy and diagenesis studies.

The aim of this study is to characterize at biochemical level the acetic acid-soluble matrices of five different articulate brachiopods in order to understand the role played by the organic matrix in the control of the calcification process.

MATERIALS AND METHODS

SEM observations

The ultrastructure of shells of *Terebratulina retusa* (Linné) from Scotland, *Liothyrella neozelanica* (Thomson), *Neothyris lenticularis* (Deshayes) (rockwalls, Doubtful Sound, Fiordland), *Calloria inconspicua* (Sowerby), and a black ribbed rhynchonellide: *Notosaria nigricans* (Sowerby) (Tikoraki Point) from New Zealand were classically observed using a JEOL Scanning Electron Microscope (SEM). Transverse and longitudinal sections of the different shells were observed, using the SEM, after the following preparation: embedding in epoxy resin, polishing with alumina oxide/diamond powder, etching with RDO or RDC (12.5%) for several seconds and gold coating. Natural surfaces, free of adherent material, were fixed in glutaraldehyde, then rinsed. They were examined after gold coating.

Intracrystalline protein extraction

The organic content of the shells was extracted as follows: the shells were cleaned with a dental drill, before being soaked in sodium hypochlorite solution (0.26 % active chlorine) for four days. The shells were rinsed and roughly crushed. The

Shell organic matrix in brachiopoda

fragments were cleaned overnight with sodium hypochlorite, rinsed with distilled water, and dried. They were crushed and the resulting powder, sieved (200µm-mesh). 17 to 25 grams of shell powder were suspended in distilled water, to which cold dilute acetic acid (10% v/v) was added under constant stirring, at 4°C. The solutions were centrifuged (3900 g). The pellets were thoroughly rinsed with distilled water and freeze-dried. The volumes of the supernatants were reduced by ultrafiltration (Amicon Cell 8400) on a 10 kDa cut-off membrane, at 4°C. The concentrated solutions were dialyzed against distilled water and freeze-dried. The amount of organic matrices was estimated by weighing the lyophilisates.

SDS-PAGE analysis of soluble proteins

The protein extracts were analyzed by standard SDS-PAGE, performed on mini-gels (Bio-Rad, Protean III) in denaturing conditions (Laemmli, 1970). The gels were stained with Coomassie Brilliant Blue, with silver (Morrissey, 1981), with Alcian Blue (Wall and Gyi, 1988) for polyanionic macromolecules, with PAS (Zacharius *et al.*, 1969) for glycoproteins. In addition, the gels were stained with carbocyanine (Campbell *et al.*, 1983) for the detection of putative calcium-binding proteins. At last, one gel was stained with silver after having been partially blotted on PVDF membranes (Immobilon-P, Millipore).

IN VITRO INTERACTION OF ACETIC ACID-SOLUBLE MATRICES WITH CaCO₃ PRECIPITATION

The five acetic acid-soluble shell matrices were tested for their ability to interact in vitro with the precipitation of calcite, according to Albeck *et al.* (1993). The following modification was applied: 500 µl of 10 mM CaCl₂ solutions containing different amounts of soluble matrix (0.1 to 20 µg/ml) were incubated in 8 wells chamber slides (Lab-Tel II) which were covered by pierced parafilm. The chamber slides were placed in a dessicator containing ammonium bicarbonate crystals and left for 48h. Blank tests (without any matrix) were performed in a similar manner. The test was repeated twice. The glass slides were carbon sputtered, and observed using SEM, with a JEOL JSM 6400F.

RESULTS

Localisation of the organic matrix

Observations on brachiopod shells using SEM reveal the structure of complex calcite fibers, which consist in elongated elements of 15-20 µm in diameter. These fibers are composed of stacks of growth units, which are made of "granules". These granules considered as elementary units of the carbonate secretion have an average size of 0.10 to 0.30 µm following the species considered (Fig. 1).

Gaspard et al.

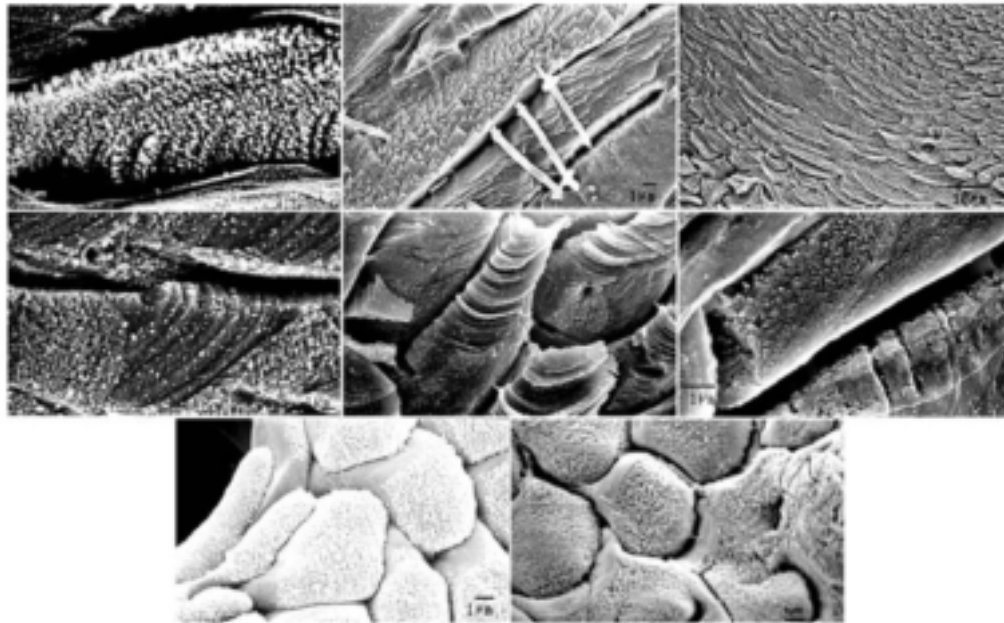


Figure 1. Structural observations using SEM. 1.1: longitudinal section in a calcite fiber of *Notosaria nigricans* revealing granules arranged in well identified microgrowth units; scale = 1 μ m. 1.2: longitudinal section of fibers in a shell of *Neothyris lenticularis* highlighting some early diagenesis, the granules are agglomerated in blocky calcite; scale = 1 μ m. 1.3: various orientations of fiber sections and microgrowth units in a longitudinal section through a shell of *Terebratulina retusa*; scale = 10 μ m. 1.4: detail of microgrowth units and granules of the previous section (compare with 1.1); scale = 1 μ m. 1.5: oblique section of fibers in a shell of *Calloria inconspicua*. The growth units are well identified; scale = 1 μ m. 1.6: detail in a longitudinal section of a shell belonging to the same species. Compare the size of granules with 1.1 and 1.3; scale = 1 μ m. 1.7-8: fiber ends at the boundary with the primary layer respectively in *Calloria inconspicua* and *Liothyrella neozelanica*, allowing to see the granules where the mantle outer epithelial cells are removed using bleach; scale = 1 μ m.

They are particularly emphasized in sections and fractures (Fig. 1. 1-8), or when the intercrystalline matrix is removed by bleach (Gaspard, 1986,1991,1996). On fresh shells, after the withdrawal of the outer epithelium, at the proximal end of each fiber shaping the corresponding outer epithelial cell surface, the granules appear well individualised (Fig. 1. 7, 8), and tightly associated with a light soluble organic matrix. In older specimen as well as in distal parts of fibers, these granules are difficult to visualize because they are closely agglomerated (Fig. 1. 2). Thus the whole intracrystalline matrix cannot be directly observed.

A parallel can be established with the calcite prisms that compose the outer shell layer of pteriomorphid bivalves. Among articulate brachiopods, each fiber appears obviously as a mono-crystal with an intracrystalline matrix.

Shell organic matrix in brachiopoda

Nevertheless, it is difficult to observe the interpenetrations of the internal surface of the organic sheaths (intercrystalline matrix) within the mineralized fraction, as observed in the prisms of mollusks (Cuif *et al.*, 1981). Although it has been clearly pointed out that this organic sheath is secreted at first (Gaspard, 1986: pl.1), a direct contact between these sheaths and the intracrystalline matrix has not been visualized. However, the microgrowth lines in longitudinal sections of fibers reveal regular interruptions in the mineralizing process in correlation with the deposition of a denser intracrystalline matrix (Fig. 1. 1,4-6). The less dense intracrystalline zones would correspond to the matrix directly mediating the calcification process (Fig. 1. 1,3- 5).

Organic matrix extraction

The amount of organic components extracted - both acetic acid-soluble and acetic acid-insoluble - is indicated in Table 1.

Table 1. Quantity of shell organic matrix extracted from the five studied genera. SM: acetic acid-soluble matrix; IM: acetic acid-insoluble matrix.

	SM (% by weight)	IM (% by weight)	SM/IM	Total Matrix (% by weight)
<i>Notosaria nigricans</i>	0.022	0.377	0.058	0.399
<i>Calloria inconspicua</i>	0.013	0.058	0.224	0.071
<i>Liothyrella neozelanica</i>	0.006	0.375	0.016	0.381
<i>Terebratulina retusa</i>	0.014	0.068	0.206	0.082
<i>Neothyris lenticularis</i>	0.010	0.200	0.050	0.210

The soluble matrix represents 0.006 to 0.022 % of the shell powder. These values are similar to those found in previous studies (Collins *et al.*, 1991). Because we use a long cleaning treatment with sodium hypochlorite prior to decalcification, the soluble matrix should be considered as intracrystalline (Collins *et al.*, 1988). The insoluble matrix represents 0.058 (*Calloria inconspicua*) to 0.377 % (*Notosaria nigricans*) of the shell powder. The ratio between the soluble and the insoluble matrix varies in a broad range, from genus to genus. For *Liothyrella*, 98% of the matrix is insoluble, while the soluble matrix represents 22% of the whole matrix of *Calloria*.

Gaspard et al.

Characterization of matrix components on SDS-PAGE

The results of the staining are shown on Figure 2. On CBB-stained gel (Fig. 2. 1), only the matrices of *Notosaria* and of *Terebratulina* stain distinctly, in particular, a band of about 50 kDa in the matrix of *Notosaria* and most of the matrix of *Terebratulina*.

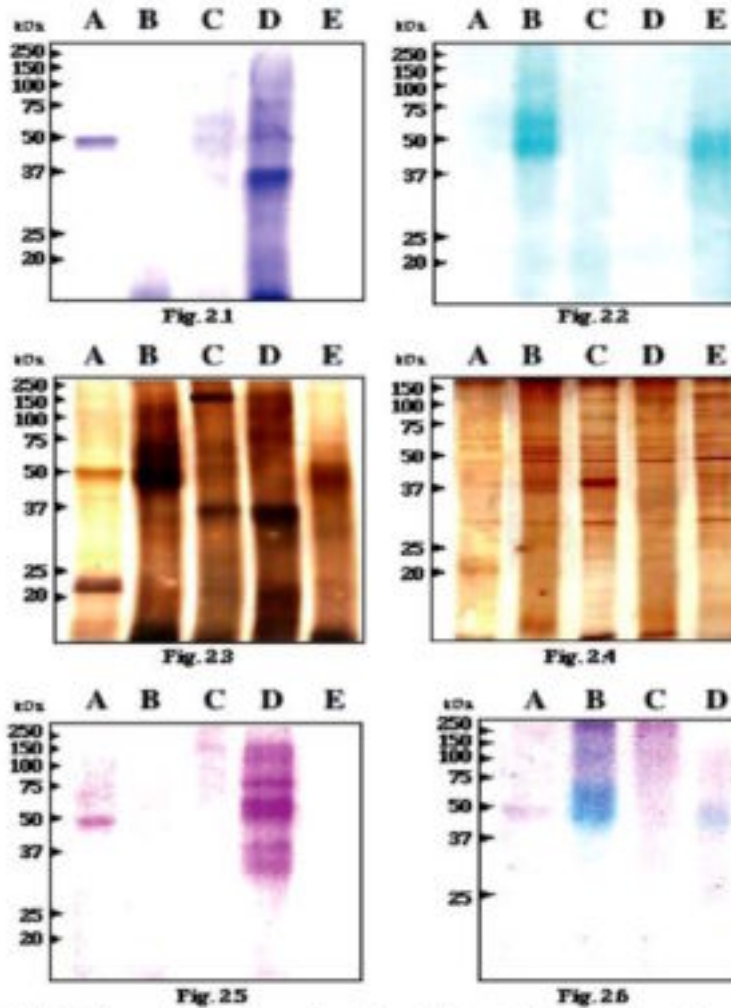


Figure 2. SDS-PAGE analysis of the acetic acid-soluble matrices of five brachiopods. 2.1: CBB-stained gel, all lanes = 40 µg matrix. 2. 2: alcian blue-stained gel, all lanes = 40 µg matrix. 2. 3: silver-stained gel, all lanes = about 30 µg matrix. 2. 4: silver-stained gel, after electrophoretic transfer on nitrocellulose membrane. Interestingly, this gel gives a clearer pattern than gel 2.3, since thin bands can be visualized, that could not be detected on gel 2. 3. 2. 5: PAS-stained gel, all lanes = 40 µg matrix. 2. 6: carbocyanine-stained gel, all lanes = 40 µg matrix.

Shell organic matrix in brachiopoda

For gels 2.1 to 2.5, A: *Notosaria nigricans*; B: *Calloria inconspicua*; C: *Liothyrella neozelanica*; D: *Terebratulina retusa*; E: *Neothyris lenticularis*. For gel 2.6, the SM of *Liothyrella neozelanica* could not be tested. For this gel, A: *Notosaria nigricans*; B: *Calloria inconspicua*; C: *Terebratulina retusa*; D: *Neothyris lenticularis*.

The fact that the three other matrices do not stain is not due to low concentrations. We took care indeed to adjust the concentrations in order to deposit the same amount of matrix in each lane, for all the gels.

On alcian blue-stained gels (Fig. 2. 2), only *Calloria* and *Neothyris* matrices stain around 50 kDa, while the three other samples give a diffuse smear. PAS staining (Fig. 2. 5) is extremely effective with the matrix of *Terebratulina*, where at least five bands stain purple. The 50 kDa band of the *Notosaria* matrix is also intensely stained, while the matrix of *Liothyrella* give a faint staining above 100 kDa. With carbocyanine dye, the matrices of *Calloria* and of *Neothyris* stain blue, suggesting that they exhibit a calcium-binding activity. Interestingly, for *Neothyris*, the staining patterns obtained after alcian blue and after carbocyanine can be superimposed. The two other matrices (*Notosaria* and *Terebratulina*) stain purple.

The case of silver-stained gels is particularly interesting; Fig. 2. 3 represent a gel, which is stained with silver according to a standard protocol. Fig. 2.4 corresponds to a similar gel, which is stained after a partial electrophoretic transfer on nitrocellulose. In the first case, the electrophoretic patterns of the five matrices appear different. From lane to lane, it is difficult to distinguish bands that migrate at the same height. On the contrary, the silver-stained gel after blotting gives a clearer pattern and reveals numerous thin bands, many of which are common to the different samples. This is notably true for a group of four bands around 50 kDa, and for a single band around 30 kDa. These results suggest that the macromolecules of the matrices may be transferred differentially on Western blot. We suggest that a partial electrophoretic transfer remove some of the polydisperse macromolecules that constitute the background staining, with the direct consequence to unmask and emphasize some discrete proteins.

In vitro interaction of acetic acid-soluble matrices with CaCO₃ precipitation

The results of the interference test are shown on Fig. 3. The blank test produces only rhombohedric crystals of calcite (Fig. 3, top right). All the tested matrices interact with the *in vitro*

precipitation of calcite and produce spectacular effects, in particular, the formation of polycrystalline aggregates in association with the formation of terraces. The effects are however not identical for each matrix: in the range [2 µg/ml - 20 µg/ml], the matrix of *Notosaria nigricans* is so effective that it completely inhibits the precipitation of calcite crystals. For this reason, this matrix is tested

Gaspard et al.

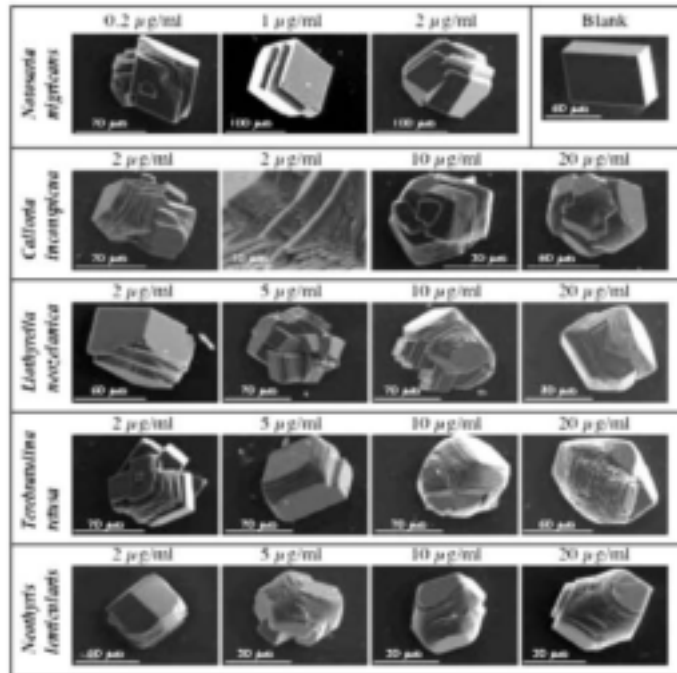


Figure 3. In vitro interaction of the five acetic acid-soluble matrices with CaCO_3 precipitation. All the matrices are tested between 2 and 20 $\mu\text{g/ml}$, with the exception of the matrix of *Notozaria*, which strongly inhibits the precipitation of calcite at these concentrations. The blank tests produce the typical calcite rhomboedral shape (see first line, right).

at lower concentrations (0.2 $\mu\text{l/ml}$ to 2 $\mu\text{g/ml}$). In this range, we observe an increase of the crystal size, from 0.2 to 2 $\mu\text{g/ml}$. In the concentration range [2 $\mu\text{g/ml}$ - 20 $\mu\text{g/ml}$], the soluble matrices of *Calloria inconspicua*, of *Terebratulina retusa* and of *Neothyris lenticularis* behave similarly: decrease of the crystal size (from 100 μm to 40-60 μm), and increase of the number of crystals per surface unit. From 2 to 20 $\mu\text{g/ml}$, the matrix of *Liothyrella neozelanica* tends to exhibit reverse effects: increase of the crystal size (from 70 to 100 μm) correlated to a decrease of the number of crystals per surface unit.

DISCUSSION

Our preliminary study calls for some remarks. First of all, calcite fibers represent the most common structural constituents of the brachiopod shells. Our observations suggest that they result from the coalescence of calcium carbonate granules. These granules are considered as structural elementary units, which are continuously elaborated during growth. They are well

visible at high magnification at the terminal face of each fiber. So far, their exact mineralogical nature, just after their secretion, remains unclear. We wonder about the amorphous nature of these early-secreted calcium carbonate structures (Gaspard, 1986: pl.1), which could transform in calcite with time. Several examples, including mollusks and sea urchins, exist where amorphous calcium carbonate represents an early transient phase, which is replaced by a more stable crystalline phase, calcite or aragonite (Addadi *et al.*, 2003). Beyond the scope of this study, the exact polymorph nature of these granules should be investigated by physical techniques such as X-ray diffraction and Raman spectroscopy.

Another question we address is the control of shell microstructures by brachiopod epithelial cells. As underlined in the introduction, the calcifying cells act as in a conveyor-belt system among brachiopods. They consequently follow a complete sequence in their secretory regime, from the production of the periostracum layer to the synthesis of the secondary, even tertiary layer. This system has an important plasticity. When stressed, cells, that synthesis the tertiary layer, can revert to a past secretion and start again the synthesis of a secondary fibrous layer. Is this change accompanied by a complete reset of the biochemical secretory regime? On the contrary, are the different brachiopod shell microstructures produced by the same set of matrix proteins? So far, we still do not know whether the self-assembling of microstructures is regulated by key-components of the shell matrix, or whether the microstructures are controlled at the supra-molecular level. This question will be tackled only when we will be able to separate the shell layers and compare their protein and sugar content.

At last, the analysis of brachiopod shell matrices calls for a comparison with other calcifying systems, in particular mollusks, for which several molecular data are now available (Marin and Luquet, 2004). Twenty years ago, Carter and Clark (1985) proposed the existence of a "lophophorate-mollusk discontinuity" in biomineralization, based on the fact that all the brachiopod microstructures could be found in mollusks, but that the reverse was not true. According to them, "the capacity of mollusks to imitate common lophophorate microstructures and the apparent inability of lophophorates to reciprocate totally, reflects a fundamental limitation of the evolutionary potential of the lophophorate shell calcification". This assertion, based on morphological considerations, needs obviously to be tested at the molecular level. In particular, it will be fascinating to unveil the primary structure of brachiopod shell proteins, to see whether they are significantly different from those of mollusks, or whether they exhibit similar functional domains. This aspect has remarkable implications on the origin of these two calcifying phyla.

Gaspard et al.

ACKNOWLEDGEMENTS

The work made in Dijon was supported by an ACI (Action Concertée Incitative, JC 3049) awarded by the French "Ministère délégué à la Recherche et aux Nouvelles Technologies" to F. Marin on the scientific theme "the origin of animal calcification". Additional supports were provided by "le Conseil Régional de Bourgogne". The shells from New Zealand were partly provided by Daphne Lee, David MacKinnon and Bruce Marshall to complete Gaspard's collection, while those from Scotland are due to the courtesy of Bernard Cohen and stored at Orsay. In another hand, the SEM observations were made at the faculty Sciences, Orsay and at the University of Paris 6, on a JEOL JSM 840A. The first author is grateful to the CNFG for founding part of the travel to Chile to attend this International Symposium.

REFERENCES

- ADDADI, L., RAZ, S., WEINER, S. (2003). Taking advantage of disorder: amorphous calcium carbonate and its roles in biomineralization. *Adv. Mater.* 15: 959-970.
- ALBECK, S., AIZENBERG, L., ADDADI, L., WEINER, S. (1993). Interactions of various skeletal intracrystalline components with calcite crystals. *J. Amer. Chem. Soc.* 115: 11691-11697.
- CAMPBELL, K., MACLENNAN, D., JORGENSEN, A. (1983). Staining of the Ca²⁺-binding proteins, calsequestrin, calmodulin, troponin C, and S-100, with the cationic carbocyanine dye "Stains-all". *J. Biol. Chem.* 258: 11267-11273.
- CARTER, J.G., CLARK, G.R. II (1985). Classification and phylogenetic significance of molluscan shell microstructure. In: *Mollusks. Notes for a Short Course* (Bottjer, D.J., Hickman, C.S., Ward, P.D. eds), University of Tennessee, Department of Geological Sciences Studies in Geology 13, edited by Broadhead, T.W. The Paleontological Society, pp. 50-71.
- COLLINS, M.J., CURRY, G.B., MUYZER, G., QUINN, R., ZOMERDIJK, T., WESTBROEK, P. (1988). Serotaxonomy of skeletal macromolecules in living terebratulid brachiopods. *Hist. Biology* 1: 207-224.
- COLLINS, M.J., MUYZER, G., CURRY, G.B., SANDBERG, P., WESTBROEK, P. (1991). Macromolecules in brachiopod shells: characterization and diagenesis. *Lethaia* 24: 387-397.
- CUIF, J-P., DENIS, A., GASPARD, D. (1981). Recherche d'une méthode d'analyse ultrastructurale des tests carbonatés d'invertébrés. *Bull. Soc. Géol. France* 23: 525-534.
- CUSACK, M., CURRY, G.B., CLEGG, H., ABBOTT, G. (1992). An intracrystalline chromoprotein from red brachiopod shells: implications for the process of biomineralization. *Comp. Biochem. Physiol.* 102 B: 93-95.
- CUSACK, M., WALTON, D., CURRY, G.B., (1997). Shell Biochemistry. In: *Treatise on Invertebrate Paleontology, Brachiopoda*, 1, (Kaesler, R.L. ed.), University of Kansas Press and the Geological Society of America, Lawrence, Kansas, pp 243-266.
- GASPARD, D. (1986). Aspects figurés de la biominéralisation – unités de base de la sécrétion carbonatée chez des Terebratulida actuels. In : *Les brachiopodes fossiles et actuels*

Shell organic matrix in brachiopoda

- (Racheboeuf, P.R. and Emig, C.C. eds.), Biostratigraphie du Paléozoïque 4, Université de Bretagne Occidentale, Brest, pp. 18-35.
- GASPARD, D. (1988). Sellithyridinae, Terebratulidae du Crétacé d'Europe Occidentale – Dynamique des populations, systématique et évolution. In: *Cahiers de Paléontologie* (CNRS ed.), Paris, 243 p, 28 pls.
- GASPARD, D. (1991). Microstructural organization of the exoskeleton of some Articulate Brachiopods (Terebratulida, Rhynchonellida) – The importance of the calcitic granules and the effect of diagenesis. In: *Biomineralization '90, Mechanisms and phylogeny of mineralization in biological systems* (Suga, S., Nakahara, N. eds.), Springer-Verlag, Tokyo, pp. 35-39.
- GASPARD, D. (1996). Biomineralized structures in Brachiopods and their diagenetic changes through time. In: *Biomineralization '93* (Allemand, D., Cuif, J.-P. eds.), Bull. Institut Océanographique de Monaco, Musée Océanographique, Monaco, sp. n°. 14, 4: 315-324.
- JOPE, M. (1965). Composition of brachiopod shell. In: *Treatise on Invertebrate Paleontology, Brachiopoda, 1* (Moore, R.C. ed.), the University of Kansas Press and the Geological Society of America, Lawrence, Kansas, pp156-163.
- JOPE, M. (1979). The protein of brachiopod shell – VI. C-terminal end groups and sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis: molecular constitution and structure of the protein. *Comp. Biochem. Physiol.* 63B: 163-173.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- LOWENSTAM, H.A., WEINER, S. (1989). On biomineralization. Oxford University Press, New York, 324p.
- MANN, S. (1983). Mineralization in biological systems. *Structure and Bonding* 54: 125-174.
- MARIN, F., LUQUET, G. (2004). Molluscan shell proteins. In: *Biomineralisation: diversité et unité (Palaeobiochemistry), Thematic issue* (de Ricqlès, A., Livage, J. eds.), C. R. Palevol, Elsevier, Paris, 3: 469-492.
- MORRISSEY, J.H. (1981). Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced sensitivity. *Anal. Biochem.* 117: 307-310.
- WALL, R.S., GYL, T.J. (1988). Alcian blue staining of proteoglycans in polyacrylamide gels using the «critical electrolyte concentration» approach. *Anal. Biochem.* 175: 298-299.
- WALTON, D., CUSACK, M., CURRY, G.B. (1993). Implications of the amino-acid composition of Recent New Zealand brachiopods. *Palaeontology* 36: 883-896.
- WILLIAMS, A. (1968). Evolution of the shell structure of articulate brachiopods. *Sp. Papers in Palaeontology* 2:1-55.
- ZACHARIUS, R.M., ZELL, T.E., MORRISON, J.H., WOODLOCK, J.J. (1969). Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 30: 148-152.

3 - Biochemical characteristics of the soluble organic matrix from the shell of three recent terebratulid brachiopod species. *Fossils & Strata* (2007), 269-275.

Résumé

Les brachiopodes sécrètent une matrice organique calcifiante, un cocktail de protéines et de polysaccharides, qui est impliqué dans les processus de formation de la coquille, comme la nucléation des cristaux minéraux et la régulation de leur croissance. La microstructure du minéral est également déterminée par cette matrice organique. La coquille des brachiopodes est un assemblage d'une phase minérale calcitique et d'une fraction minoritaire de matériel organique. Les objectifs de ce travail sont: 1) de caractériser les interactions entre le minéral et la phase organique par des observations au microscope électronique à balayage, 2) de caractériser les matrices acido-solubles chez les genres de brachiopodes Terebratulida actuels *Gryphus*, *Liothyrella* and *Neothyris*. Les coquilles ont été déminéralisées à l'acide acétique 5% à froid. La caractérisation biochimique de la matrice acido-soluble a été réalisée par SDS-PAGE en conditions dénaturantes. Les gels ont été colorés au CBB, au nitrate d'argent, au bleu Alcian, au PAS et au Stains-All. De plus, les matrices ont été étudiées pour leur capacité à lier les ions calcium en solution. Les résultats ont montré que chez ces trois genres, la matrice organique représente une très petite fraction de la coquille (<0,05%). Sur gels, les matrices testées ont présenté certaines similarités. Notons tout particulièrement la présence d'un composé discret migrant aux alentours de 50 kDa. Finalement, les matrices ont été testées pour leur capacité à interagir avec la précipitation de cristaux de carbonate de calcium *in vitro*. Toutes ces matrices ont présenté une aptitude à modifier à faible concentration la morphologie des cristaux de calcite néo-formés. Dans une optique évolutive, les propriétés des matrices calcifiantes de ces brachiopodes sont comparées à celles des matrices extraites des coquilles des mollusques.

Biochemical characteristics of the soluble organic matrix from the shell of three Recent terebratulid brachiopod species

DANIÈLE GASPARD, BENJAMIN MARIE, GILLES LUQUET AND FRÉDÉRIC MARIN

Gaspard, D., Marie, B., Luquet, G. & Marin, F. 2008: Biochemical characteristics of the soluble organic matrix from the shell of three Recent terebratulid brachiopod species. *Fossils and Strata*, No. 54, pp. 269–275. ISSN 0024-1164

To build their shells, brachiopods secrete a mixture of proteins and polysaccharides, collectively called the organic matrix. This matrix mediates the calcification process by allowing crystal nucleation followed by elongation and finally by stopping the crystal growth. Ultimately, the matrix controls the different microstructures formed. Brachiopod shells are composites with both organic and inorganic constituents intimately associated. This work represents an attempt to characterize the matrices using two combined approaches: (1) scanning electron microscopy for localization within the shell, (2) analysing extracted matrices at the molecular level to determine their biochemical properties. Representatives of the three terebratulid brachiopod genera: *Gryphaea*, *Liothyrella* and *Noothyris*, were observed according to a standard procedure highlighting the microstructural details. Additionally, the acetic acid-soluble shell matrices were extracted and analyzed by sodium dodecyl polyacrylamide gel electrophoresis. Gels were subsequently stained with silver, Alcian blue and carbocyanine. In addition, the shell matrices were tested for their ability to bind calcium. Finally, functional *in vitro* assays were performed to check for the first time the effect of some of the shell matrices on calcium carbonate precipitation. Results show that the three matrices are extremely minor components (< 0.05 wt %) of the shell and that the three genera exhibit some similarities in the electrophoretic patterns of their soluble matrices. Furthermore, the tested matrices drastically modify the morphology of calcite crystals *in vitro*. Putative similarities between brachiopod and molluscan shell matrices are discussed, as well as the early diagenesis effect that may affect brachiopod matrices. □ *Brachiopods, Biomineralis, calcium-binding, diagenesis, electrophoresis, granules, low magnesium calcite, organic sheath, protein, Rhynchonelliformea, soluble organic matrix.*

Danièle Gaspard [daniele-gaspard@u-psud.fr], Université de Paris-Sud, Département des Sciences de la Terre, Bât. 509, F-91405 Orsay Cedex; Benjamin Marie, Gilles Luquet, Frédéric Marin [Frederic.Marin@u-bourgogne.fr], Université de Bourgogne, Laboratoire de Biogéosciences, UMR 5561, 6 Bd. Gabriel, F-21000 Dijon, France.

The shell of terebratulid brachiopods (Rhynchonelliformea) is an example of biologically controlled mineralization, according to well-accepted terminology (Mann 1983; Lowenstam & Weiner 1989). The shell is an organo-mineral structure, mainly comprising low magnesium calcite enclosing a small amount of organic matrix. This matrix is suspected to control, at various scales, the deposition of calcite biocrystals (Jope 1965). Physiologically, the growth of brachiopod shells is controlled at the mantle margin of both valves, by a conveyor-belt system of outer epithelial secretory cells proliferating at the generative zone (Gaspard 1988, fig. 14). Each cell of the outer epithelium has a secretory regime, which varies according to its position during migration from the generative zone to the tip of the outer mantle lobe. It follows a precise secretory sequence: periostracum, granular primary layer, fibrous secondary layer and prismatic tertiary layer in some cases (Williams 1968; Gaspard 1986).

Observations at high magnification reveal the hierarchical organization of the shell in different layers, which are mainly composed of elements: fibres (with their sheaths corresponding to the inter-crystalline matrix) and prisms, themselves made of elementary units, like «granules» (Gaspard 1991). Furthermore, a close organization of these elementary units with an intra-crystalline matrix is revealed. However, the precise function of this organic phase is poorly understood. Unlike molluscs, for which considerable molecular data are available (Wilt *et al.* 2003; Marin & Luquet 2004), brachiopods shell matrices have been the subject of far fewer studies. The precursor work of Jope (1965, 1967a, b, 1973, 1979) suggests that the matrix is composed of a mixture of proteins. Later, studies by Cusack *et al.* (1992, 1997), Curry *et al.* (1991), Walton *et al.* (1993), Walton & Curry (1994) and Walton (1998) further characterized the proteinaceous constituents of the shell matrices of different

brachiopods, whereas Collins *et al.* (1988, 1991) used brachiopod shell matrices for sero-taxonomy and diagenesis studies.

The aim of our preliminary study is to characterize the biochemistry of the acetic acid-soluble matrices of three terebratulid brachiopod species in order to understand, at the biochemical level, the role played by the organic matrix in the control of the calcification process. Furthermore, our study points out the possibility that short-term diagenetic effects may affect brachiopod skeletal matrices.

Materials and methods

Scanning electron microscope observations

The ultrastructure of shells of Recent *Gryphus vitreus* (Born) from Mediterranean (Boullier *et al.* 1986) and *Liothyrella neozelanica* (Thomson), and *Neothyris lenticularis* (Deshayes) from New Zealand was observed using classical methods on a scanning electron microscope (SEM) (SEM, JEOL, Ltd). Transverse and longitudinal sections of the shells were observed following their embedding in epoxy resin, polishing with aluminium oxide/diamond powder, etching with a 12.5% (v/v) solution of RDC (Laboratoire Moderne) for several seconds and gold coating. Natural surfaces, free of adherent material, were fixed in glutaraldehyde then rinsed. They were examined after gold coating.

Intra-crystalline protein extraction

In parallel to the microstructural observations, the organic content of the shells was analyzed: the shells were carefully cleaned and polished with a dental drill before being soaked in a solution of dilute sodium hypochlorite (0.26% active chlorine). The shells were rinsed, roughly crushed, and the fragments cleaned again with sodium hypochlorite, before being rinsed with distilled water and dried. The shell fragments were crushed to a fine powder under liquid nitrogen. Five to fifteen grams of shell powder were suspended in distilled water, to which cold dilute acetic acid (5% v/v) was dripped by an automatic titrimetre, under constant stirring, at 4 °C. After overnight incubation, the solution (end pH above 4) was centrifuged (3900 g), then filtered (5 µm filter). The decalcification volumes were reduced by ultrafiltration (Amicon Cell, model 8400) on a 10 kDa cut-off membrane, at 4 °C. The concentrated solutions were subsequently dialyzed against distilled water (10 kDa cut-off), for a few days, with several water changes, and freeze-dried. The amount of acetic acid-soluble matrix was estimated by weighing the lyophilisates.

SDS PAGE analysis of soluble proteins

The protein extracts were analyzed by conventional sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE), performed on mini-gels (Bio-Rad, Protean III) in the following way: samples were rehydrated and dissolved in Laemmli buffer (Laemmli 1970) before being denatured by heating (5 min, 100 °C), and fractionated on 10–12% acrylamide gels. These gels were subsequently stained with silver (Morrissey 1981), with Alcian blue (Wall & Gyi 1988) or with carbocyanine ('Stains-All', Campbell *et al.* 1983). Silver stains most of the macromolecular constituents. Alcian blue, a cationic dye, which stains mucopolysaccharides and glycosaminoglycans, is thought to interact with anionic sites of polysaccharides, whereas carbocyanine stains putative calcium-binding proteins in a particular metachromatic blue colour, and proteins with no affinity for calcium, in red. In addition, some gels were blotted on polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Immobilon-P, Millipore) with a Bio-Rad Trans Blot module, at 120 mA, for 90 min. The standards were stained with CBB, whereas the blotted matrix samples were incubated with ⁴⁵Ca according to the procedure of Maruyama *et al.* (1984).

In vitro interaction of acetic acid-soluble matrices with CaCO₃ precipitation

The three acetic acid-soluble shell matrices were tested for their ability to interact *in vitro* with the precipitation of calcite, according to Albeck *et al.* (1993). Briefly, the precipitation of calcite is obtained by slow diffusion of ammonium bicarbonate vapours into a calcium chloride solution. The following modification was applied: the 10 mM CaCl₂ solutions containing different quantities of soluble matrix (0.1 µg to 50 µg/ml) were incubated in chamber slides (Lab-Tel II, eight wells) in which holes were pierced. Blank tests (without any matrix) were performed in a similar manner. The glass slides were carbon sputtered, and observed using SEM, with a JEOL JSM 6400F.

Results

Localization of the organic matrix

Scanning electron microscope observations on brachiopod shells reveal the structure of complex calcite fibres schematically localized in Gaspard (1988, fig. 14), which consist of elongated elements of 15–20 µm in diameter (Fig. 1A–B). These fibres are composed of stacks of growth units, which are made

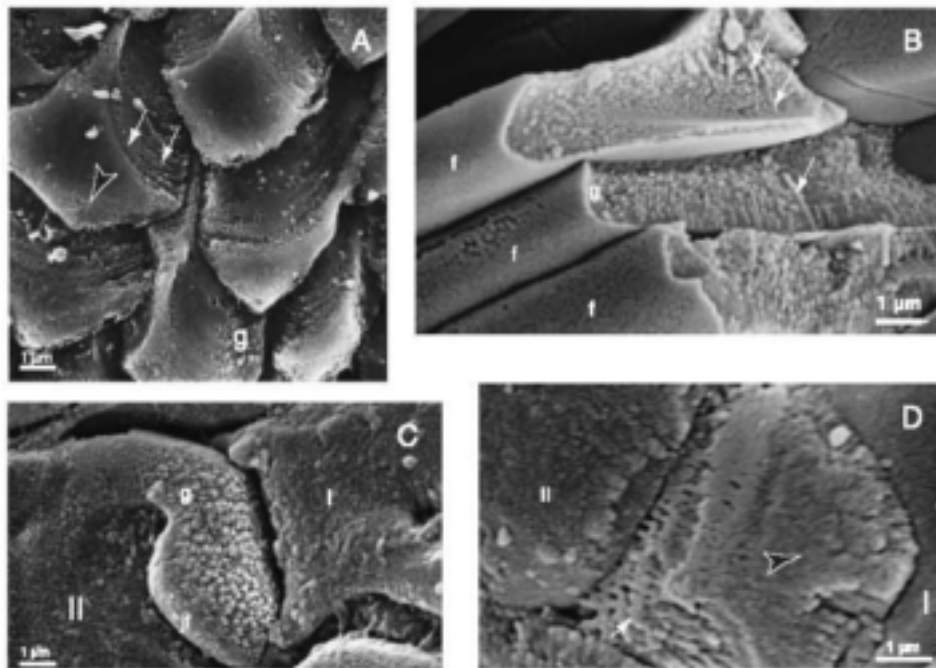


Fig. 2. □A. SEM views of fibres in a *G. vitreus* shell. Terminal face of fibres oriented towards the shell margin (arrow head) and growth units (white arrow) composed of granules (g) revealed on the lateral edges of fibres when the inter-crystalline matrix is removed. Scale bar = 1 µm. □B. Broken fibres (f) revealing growth units (white arrow) composed of granules (g) intimately associated with the intra-crystalline matrix. Scale bar = 1 µm. □C. Granules (g) at the terminal face of a juvenile fibre at the primary (I)/secondary (II) layers boundary, in *L. neozelandica*. Scale bar = 1 µm. □D. Polygonal terminal face of a fibre, and growth units (white arrow), at the primary (I)/secondary (II) layers interface in a shell of *N. lenticularis*. Scale bar = 1 µm. (□B–D: shell margin oriented at the upper right corner).

of granules. These granules, considered as elementary units of the carbonate secretion, have an average diameter of 0.1 to 0.3 µm as seen in Figure 1A–D. The granules are particularly obvious in sections and fractures (Fig. 1B), or when the inter-crystalline matrix is removed by bleach (Gaspard 1986, 1991, 1996). On fresh shells, after the withdrawal of the outer epithelium, at the proximal end of each fibre shaping the corresponding outer epithelial cell surface, the individual granules are obvious (Fig. 1A, C–D), and tightly associated with a light soluble organic matrix. In older specimens, as well as in distal parts of fibres, these granules are difficult to visualize because they are closely aggregated. Thus the whole intra-crystalline matrix cannot be directly observed.

A parallel can be established with the calcite prisms that compose the outer shell layer of pteriomorphid bivalves. Among terebratulids, each fibre appears as a mono-crystal with an intra-crystalline matrix. Nevertheless, it is difficult to observe the inter-penetrations of the internal surface of the organic sheaths (inter-crystalline) within the mineralized fraction, as observed in the prisms of molluscs (Cuif *et al.* 1981). Although this organic sheath is secreted

first (Gaspard 1986: pl.1, figs 2–3), a direct contact between these sheaths and the intra-crystalline matrix has not been visualized. However, the micro-growth lines in longitudinal sections of fibres reveal regular interruptions in the mineralizing process in correlation with the deposition of a denser intra-crystalline matrix. The less dense intra-crystalline zones correspond to the matrix directly mediating the calcification process (Fig. 1A, D).

Biochemical analysis of acetic acid-soluble matrices

The extraction of acetic acid-soluble matrices from the three species yielded very low quantities of organic material. The protocol involves a long cleaning with sodium hypochlorite prior to decalcification. This treatment is necessary for precluding contaminants, like bacteria or micro-borers. Sodium hypochlorite degrades all of the organic components that surround calcium carbonate crystals, without dissolving the mineral phase (Gaffey & Bronnimann 1993). Thus, it is likely that the matrix extracted by our method is intra-crystalline (Collins *et al.* 1988). We estimate that this matrix accounts for less than

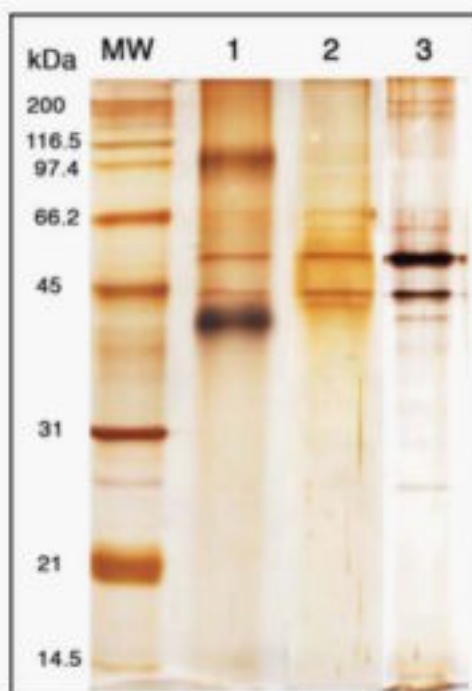


Fig. 2. SDS PAGE analysis of brachiopod shell soluble matrix. Column MW – molecular mass markers; Column 1: *G. vitreus* (Borns); Column 2: *N. lenticularis* (Deshayes); Column 3: *L. neohelena* (Thomson). The gel was stained with silver. The same amount (approx. 5 µg) of matrix was put on top of the gel.

0.05% of the dry weight of the shell. This percentage is close to the 0.03% average values published by Collins et al. (1991), and to those found by Walton et al. (1993). The quantity of recovered matrix is far less

than what can be extracted from nacro-prismatic bivalves for instance, but is in the same range as the amount of organic material extracted from crossed-lamellar bivalve shells.

Sodium dodecyl sulfate PAGE analysis (Fig. 2) indicates that the three electrophoretic profiles exhibit some similarities. In particular, two proteins, around 45 and 50 kDa are observed in the three preparations. In *G. vitreus*, two additional strong, although more diffuse, bands are visible at around 40 and 100 kDa. In the three preparations, other thin bands are observed. For the *Neothyris* and *Liothyrella* preparations, we do not observe bands at 22, 16 and 6.5 kDa, as pointed out by Walton et al. (1993) and Cusack et al. (1997). This discrepancy may have two possible explanations. Because our studied samples are not 'fresh' but composed of specimens dead for several years, we do not exclude the possibility that some shell proteins have been degraded since the death of the animal and, therefore, cannot be visualized on gels. Another explanation could be the loss of the low molecular weight proteins during the concentration steps by ultrafiltration.

The three matrices were stained with Alcian blue, 'Stains-All', and tested for their ability to bind calcium ions. Periodic Acid Schiff (PAS) staining, used for the detection of glycoproteins, was also assayed but did not produce significant results (not shown). Figure 3 shows the results obtained with the matrix of *Neothyris* soluble matrix. The two other matrices did not give clear patterns, and therefore, are not included in the figure. One *Neothyris* fraction, around 50 kDa, is densely stained with Alcian blue, which suggests that this fraction is polyanionic (Wall & Gyi 1988). This

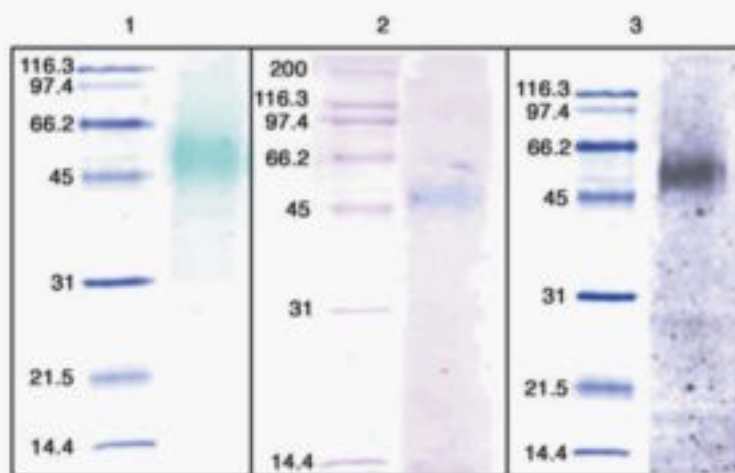


Fig. 3. Biochemical analysis of the shell soluble matrix of *N. lenticularis* (Deshayes). Column 1: Alcian blue staining; Column 2: 'Stains-All' staining; Column 3: calcium-binding test. The molecular weight standards from parts 1 and 3 were stained with CBB. Note that the same fraction (around 50 kDa) stains with Alcian blue and carbocyanine, and that it binds calcium.

fraction also stains blue by 'Stains-all', and strongly binds radioactive calcium. These two last techniques confirm in two independent ways that the 50 kDa fraction is probably a calcium-binding component. Interestingly, a band at 48 kDa was found to bind calcium in the shell matrix of the oyster *Crassostrea virginica* (Myers *et al.* 1996). Further investigations, including purification, amino acid and monosaccharide analysis and sequencing, are needed before we can assess the identity and function of this fraction in the mineralizing process.

Finally, the influence of the three matrices with the calcite precipitation *in vitro* was assessed (Fig. 4). Although the control experiment with no protein produced only rhombohedral crystals of calcite (Fig. 4A), the addition of acetic acid-soluble matrix (of *L. neozelanica*, *N. lenticularis* or *G. vitreus*) produced a spectacular effect, characterized by the formation of bigger crystals (60 to 80 μm), which exhibit thin layering (Fig. 4B–4E). At high protein concentrations, most of the crystals produced are polycrystalline aggregates (Fig. 4F, G, H). Further *in vitro* crystallization experiments will be performed in order to test whether the effect of the matrix is similar to all crystal faces, or whether it may induce the appearance of novel faces.

Discussion and conclusion

SEM observations of granules

The SEM studies indicate that calcite fibres represent the most common structural constituents of brachiopod

shells. Our observations suggest that they result from the coalescence of calcium carbonate granules. These granules are considered as structural elementary units, which are continuously elaborated during growth. The granules are readily visible at high magnification at the terminal face of each fibre. So far, their exact mineralogical nature, just after their secretion, remains unclear. It is possible that these early-secreted calcium carbonate structures are amorphous calcium carbonate (Gaspard 1986, pl. 1, figs 7–9), which could transform into calcite with time. Several examples exist where amorphous calcium carbonate represents an early transient phase, which is replaced by a more stable crystalline phase, calcite or aragonite (Weiner *et al.* 2003). This phenomenon is well documented for molluscs (Weiss *et al.* 2002) and for sea urchins (Politi *et al.* 2004). Beyond the scope of this study, the exact polymorph nature of these granules should be investigated by physical techniques such as X-ray diffraction and Raman spectroscopy.

The soluble shell matrix and its biochemical properties

The second point concerns the intra-crystalline matrix. In our study, the complete integrity of the shell matrix cannot be assessed because of the lapse of time (decade) between the sample collection and the biochemical analysis. In a previous paper, Walton (1998) showed indeed that intra-crystalline proteins from brachiopod shells, although protected by the mineral phase, may degrade more rapidly than expected by the hydrolysis of their peptide bonds.

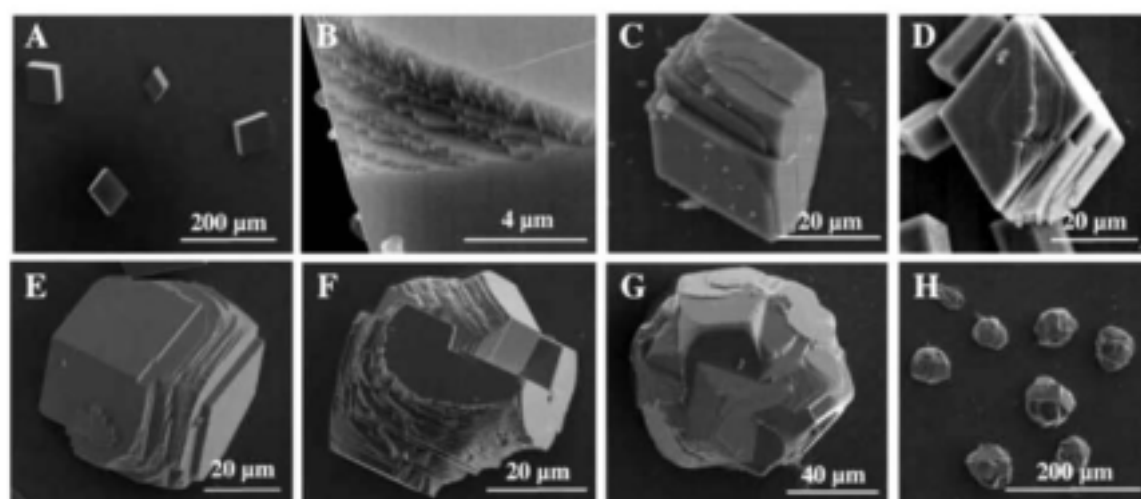


Fig. 4. Effect of brachiopod soluble matrix proteins on *in vitro* CaCO_3 precipitation. □A. Control (without protein). Only rhombohedral calcite crystals are produced. □B. *Liothyrella* 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$. □C. *Liothyrella* 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. □D. *Neothyris* 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. □E–H. *Gryphaea*. □E. 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; □F. 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; □G. 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$; □H. 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. At high concentrations of matrix, most of the crystals formed are polycrystalline aggregates.

However, his analyses were carried out on true fossils, aged 0.12 to 3.3 million years. So far, no kinetic study has been performed on recent shells, of a few decades to a few hundred years old, to check the potential early degradation of their intra-crystalline protein content. Our analyses suggest that the three species retained some biochemical properties, which are commonly encountered with soluble matrices associated with calcium carbonate. In particular, the soluble matrix of *N. lenticularis* is polyanionic and binds calcium ions. Furthermore, all three matrices interfere, in a dose-dependent manner, with the *in vitro* precipitation of calcium carbonate.

Control of brachiopod shell microstructures

The third question we address is the control of shell microstructures by brachiopod epithelial cells. As underlined in the introduction, the calcifying cells act in a conveyor-belt system in brachiopods. They consequently follow a complete sequence in their secretory regime, from the production of the periostracum layer to the synthesis of the secondary and even tertiary layer. This system has an important plasticity. When stressed, cells that synthesize the tertiary layer can revert to a past secretion and repeat the synthesis of a secondary fibrous layer. Is this change accompanied by a complete reset of the biochemical secretory regime? Alternatively, are the different brachiopod shell microstructures produced by the same set of matrix proteins? So far, we still do not know whether the self-assembling of microstructures is regulated by key components of the shell matrix, or whether the microstructures are controlled at the supra-molecular level. This question will only be tackled when we are able to separate the shell layers and compare their protein and sugar content.

Brachiopods versus molluscs

Finally, the analysis of brachiopod shell matrices calls for a comparison with other calcifying systems, in particular molluscs, for which molecular data are progressively becoming available (Marin & Luquet 2004). Carter & Clark (1985, pp. 67–68) proposed the existence of a 'lophophorate-mollusc discontinuity' in biomineralization, based on the fact that all the brachiopod microstructures could be found in molluscs, but that the reverse was not true. According to them, 'the capacity of molluscs to imitate common lophophorate microstructures and the apparent inability of lophophorates to reciprocate totally reflects a fundamental limitation of the evolutionary potential of the lophophorate shell calcification'. This assertion, based primarily on morphological considerations,

obviously needs to be tested at the molecular level. In particular, it will be fascinating to unveil the primary structure of brachiopod shell proteins, to see whether they are significantly different from those of molluscs, or whether they exhibit similar functional domains. This aspect has remarkable implications on the origin of these two calcifying phyla.

Acknowledgements. – The work conducted in Dijon was supported by an ACI (Action Concertée Incitative, JC 3049) awarded by the French 'Ministère délégué à la Recherche et aux Nouvelles Technologies' to F. Marin. Additional support was provided by 'le Conseil Régional de Bourgogne'. Some of the shells from New Zealand were provided by Daphne Lee and David MacKinnon, whereas those from the Mediterranean were dredged by the N/O «Catherine Laurence» and stored at Orsay. SEM observations were made at the University of Paris 6, on a JEOL JSM 840A. The authors thank the two reviewers for their helpful comments.

References

- Albeck, S., Aizenberg, L., Addadi, L. & Weiner, S. 1993: Interactions of various skeletal intracrystalline components with calcite crystals. *Journal of the American Chemical Society* 115, 11691–11697.
- Boullier, A., Delance, J.-H., Emig, C.C., d'Hondt, J.-L., Gaspard, D. & Laurin, B. 1986: Les populations actuelles de *Gryphus vitreus* (Brachiopoda) en Corse-Implications paléontologiques. In Racheboeuf, P.R. & Emig, C.C. (eds): *Les Brachiopodes fossiles et actuels. Biostratigraphie du Paléozoïque* 4, 179–196, Université de Bretagne Occidentale, Brest.
- Campbell, K., MacLennan, D. & Jorgensen, A. 1983: Staining of the Ca²⁺-binding proteins, calsequestrin, calmodulin, troponin C, and S-100, with the cationic carbocyanine dye 'Stains-all'. *Journal of Biological Chemistry* 258, 11267–11273.
- Carter, J.G. & Clark, G.R. II 1985: Classification and phylogenetic significance of molluscan shell microstructure. In Bottjer, D.J., Hickman, C.S. & Ward, P.D. (eds): *Mollusks. Notes for a Short Course*, 50–71, University of Tennessee, Department of Geological Sciences Studies in Geology 13, edited by Broadhead, T.W. The Paleontological Society.
- Collins, M.J., Curry, G.B., Muzzer, G., Quinn, R., Zomerdijs, T. & Westbrook, P. 1988: Sero-taxonomy of skeletal macromolecules in living terebratulid brachiopods. *Historical Biology* 1, 207–224.
- Collins, M.J., Muzzer, G., Curry, G.B., Sandberg, P. & Westbrook, P. 1991: Macromolecules in brachiopod shells: characterization and diagenesis. *Lethaia* 24, 387–397.
- Cuif, J.-P., Denis, A. & Gaspard, D. 1981: Recherche d'une méthode d'analyse ultrastructurale des tests carbonatés d'invertébrés. *Bulletin de la Société Géologique de France* 9, 23, 525–534.
- Curry, G.B., Cusack, M., Endo, K., Walton, D. & Quinn, R. 1991: Intracrystalline molecules from brachiopod shells. In Suga, S. & Nakahara, N. (eds): *Biomineralization '90, Mechanisms and Phylogeny of Mineralization in Biological Systems*, 35–39, Springer-Verlag, Tokyo.
- Cusack, M., Curry, G.B., Clegg, H. & Abbott, G. 1992: An intracrystalline chromoprotein from red brachiopod shells: implications for the process of biomineralization. *Comparative Biochemistry and Physiology* 102 B, 93–95.
- Cusack, M., Walton, D. & Curry, G.B. 1997: Shell biochemistry. In Kaesler, R.L. (ed.): *Treatise on Invertebrate Paleontology, Brachiopoda* 1, H243–H266. Geological Society of America, Boulder, Colorado, and University of Kansas Press, Lawrence, Kansas.
- Gaffey, S.J. & Bronnimann, C.E. 1993: Effect of bleaching on organic and mineral phases in biogenic carbonates. *Journal of Sedimentary Petrology* 63, 752–754.

- Gaspard, D. 1986: Aspects figurés de la biominéralisation – unités de base de la sécrétion carbonatée chez des Terebratulida actuels. In Racheboeuf, P.R. & Enig, C.C. (eds): *Les brachiopodes fossiles et actuels, Biostratigraphie du Paléozoïque* 4, 77–83. Université de Bretagne Occidentale, Brest.
- Gaspard, D. 1988: Sellithyridinae, Terebratulidae du Crétacé d'Europe Occidentale – Dynamique des populations, systématique et évolution. *Cahiers de Paléontologie*, 243 pp. Editions du CNRS, Paris.
- Gaspard, D. 1991: Microstructural organization of the exoskeleton of some Articulate Brachiopods (Terebratulida, Rhynchonellida) – The importance of the calcitic granules and the effect of diagenesis. In Suga, S. & Nakahara, H. (eds): *Biomimetalization '90, Mechanisms and Phylogeny of Mineralization in Biological Systems*, 403–407. Springer-Verlag, Tokyo.
- Gaspard, D. 1996: Biomimetalized structures in Brachiopods and their diagenetic changes through time. In Allemand, D., Cuif, J.-P. (eds): *Biomimetalization '93*, 315–324. *Bulletin de l'Institut Océanographique de Monaco Numéro Spécial 14*, 4. Musée Océanographique, Monaco.
- Jope, M. 1965: Composition of brachiopod shell. In Moore, R.C. (ed.): *Treatise on Invertebrate Paleontology, Brachiopoda 1*, H156–H163. Geological Society of America, Boulder, Colorado, and University of Kansas Press, Lawrence, Kansas.
- Jope, M. 1967a: The protein of brachiopod shell – I. Amino acid composition and implied protein taxonomy. *Comparative Biochemistry and Physiology* 20, 593–600.
- Jope, M. 1967b: The protein of brachiopod shell – II. Shell protein from fossil articulates: amino acid composition. *Comparative Biochemistry and Physiology* 20, 601–605.
- Jope, M. 1973: The protein of brachiopod shell – V. N-terminal end groups. *Comparative Biochemistry and Physiology* 45B, 17–24.
- Jope, M. 1979: The protein of brachiopod shell – VI. C-terminal end groups and sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis: molecular constitution and structure of the protein. *Comparative Biochemistry and Physiology* 63B, 163–173.
- Laemmli, U.K. 1970: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lowenstam, H.A. & Weiner, S. 1989: *On Biomimetalization*, 324 pp. Oxford University Press, New York.
- Mann, S. 1983: Mineralization in biological systems. *Structure and Bonding* 54, 125–174.
- Marin, F. & Loquet, G. 2004: Molluscan shell proteins. In de Ricqlès, A. & Livage, J. (eds): *Biomimetalization: diversité et unité (Palaeobiochemistry)*, Thematic issue. *Comptes Rendus Palevol* 3, 469–492, Elsevier, Paris.
- Matsuyama, K., Mikawa, T. & Ebashi, S. 1984: Detection of the calcium binding proteins by ⁴⁵Ca. Autoradiography on nitrocellulose membrane after sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis. *Journal of Biochemistry* 95, 511–519.
- Morrissey, J.H. 1981: Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Analytical Biochemistry* 117, 307–310.
- Myers, J.M., Veis, A., Salsay, B. & Wheeler, A.P. 1996: A method for enhancing the sensitivity and stability of Stains-All for phosphoproteins separated in sodium-dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 240, 300–302.
- Politi, Y., Arad, T., Klein, E., Weiner, S. & Addadi, L. 2004: Sea Urchin spine calcite forms via a transient amorphous calcium carbonate phase. *Science* 306, 1161–1164.
- Wall, R.S. & Gyi, T.J. 1988: Alcian blue staining of proteoglycans in polyacrylamide gels using the 'critical electrolyte concentration' approach. *Analytical Biochemistry* 175, 298–299.
- Walton, D. 1998: Degradation of intracrystalline proteins and amino acids in fossil brachiopods. *Organic Geochemistry* 28, 389–410.
- Walton, D. & Curry, G.B. 1994: Extraction, analysis and interpretation of intracrystalline amino acids from fossils. *Lethaia* 27, 179–184.
- Walton, D., Cusack, M. & Curry, G.B. 1993: Implications of the amino-acid composition of Recent New Zealand brachiopods. *Palaeontology* 36, 883–896.
- Weiner, S., Levi-Kalishman, Y., Raz, S. & Addadi, L. 2003: Biologically formed amorphous calcium carbonate. *Connective Tissue Research* 44, 214–218.
- Weiss, I.M., Tuross, N., Addadi, L. & Weiner, S. 2002: Mollusc larval shell formation: amorphous calcium carbonate is a precursor phase for aragonite. *Journal of Experimental Zoology* 293, 478–491.
- Williams, A. 1968: Evolution of the shell structure of articulate brachiopods. *Special Papers in Palaeontology* 2, 1–55.
- Wilt, F.H., Killian, C.E. & Livingston, B.T. 2003: Development of calcareous skeletal elements in invertebrates. *Differentiation* 71, 237–250.

4 – Les acquis des travaux effectués chez les brachiopodes

Au terme de cette étude de la matrice organique associée aux coquilles de brachiopodes Rhynchonelliformea (*Gryphus vitreus*, *Terebratulina retusa*, *Liothyrella neozelanica*, *Notosaria nigricans*, *Calloria inconspicua* et *Neothyris lenticularis*), il nous est possible de dégager plusieurs résultats informatifs.

Chez ces différentes espèces, la **matrice acido-insoluble représente entre 0,1 et 0,4% de la masse totale du biominéral, alors que la matrice acido-soluble représente entre 0,01 et 0,02%**. Notons que ces quantités sont au moins dix fois inférieures à celles observées pour la plupart des coquilles de mollusques.

Les expériences *in vitro* nous ont montré que les ASMs extraites des coquilles des différentes espèces étudiées présentaient toutes la capacité à interférer avec la précipitation du CaCO_3 . Ces résultats suggèrent que, chez ces espèces, **l'ASM est impliquée *in vivo* dans les processus de formation du biominéral.**

Au niveau de la composition en macromolécules, nous avons observé que les différentes ASMs extraites présentaient sur gel d'électrophorèse des profils très différents. Alors que **les matrices de *N. nigricans* et de *T. retusa* semblent majoritairement composées de glycoprotéines basiques, celles de *C. inconspicua* et de *N. lenticularis* sont constituées de protéines acides capables de lier les ions calcium *in vitro*.** À l'inverse, les matrices de *G. vitreus* et *L. neozelanica* ne semblent présenter aucun de ces deux types de molécules. **Il est intéressant de noter que ces différences pourraient être liées aux positions phylogénétiques respectives de ces différentes espèces au sein des brachiopodes.** Cependant, nous avons également observé que toutes ces matrices, présentant des composés de masses moléculaires discrètes, semblaient toutes posséder un composé majoritaire migrant aux alentours de 50 kDa. Des études complémentaires de séquençage (MS/MS) seraient nécessaires afin de détecter d'éventuelles homologues de séquences entre ce(s) composé(s) de masse moléculaire apparente voisine chez ces différentes espèces.

Conclusions et perspectives

Conclusions et perspectives

La nacre est un biomatériau fascinant qui fait l'objet d'une grande quantité de travaux de recherche dans des disciplines très diverses. C'est une microstructure très ancienne qui est apparue dès le Cambrien dans les coquilles des mollusques.

Dans la partie consacrée à la revue des connaissances, nous avons décrit les principales caractéristiques de la nacre des mollusques. Rappelons que le terme de nacre désigne spécifiquement la couche aragonitique des coquilles, d'aspect iridescent, généralement située en position interne et qui présente une structure bien définie. À micro-échelle, ce biominéral est constitué de la superposition régulière de couches de tablettes d'aragonite coalescentes, mesurant 0,5 μm d'épaisseur chacune et recouvertes d'une fine couche organique de 20 nm d'épaisseur. À nano-échelle, les tablettes apparaissent constituées d'un assemblage compact de granules aragonitiques enrobées dans une fine couche organique périphérique. On pense que cette matrice organique, qui représente 1-5% de la masse du biominéral, est essentiellement composée de protéines et de glycoprotéines acides, de protéines hydrophiles, ainsi que de polysaccharides, dont la chitine. Ces différents composés organiques sont directement impliqués dans les processus de biominéralisation de la nacre et semblent même réguler ces phénomènes. On distingue deux types de nacre ayant des modes différents d'agencement des tablettes entre elles : la nacre en *mur de briques* des bivalves et les monoplacophores et la nacre *columnnaire* des gastéropodes et des céphalopodes.

Les résultats obtenus au cours de cette thèse ont permis d'acquérir des connaissances nouvelles sur les processus de biominéralisation de la coquille chez les mollusques. Ce travail a notamment apporté de nouvelles données importantes pour la compréhension non seulement du rôle des macromolécules de la matrice calcifiante, mais également pour l'étude de leur évolution.

Dans la partie de ce mémoire consacrée à la biominéralisation de la coquille chez *Unio pictorum*, la stratégie basée sur l'étude et la caractérisation biochimique de la matrice organique associée à la couche nacrée nous a tout d'abord permis de montrer que la matrice acido-insoluble est essentiellement constituée de protéines hydrophobes et de chitine. Cette observation confirme les travaux précédents qui présentaient ces différents composés comme

des macromolécules essentielles à la mise en place de la structure tridimensionnelle pré-requise à la formation des tablettes de nacre, aussi bien chez les bivalves que chez les gastéropodes ou les céphalopodes nacriers.

D'autre part, nous avons montré que la matrice acido-soluble est majoritairement composée de trois glycoprotéines acides portant des sucres sulfatés. Crenshaw (1972) fut le premier à observer des groupements sulfates dans les glycoprotéines extraites de la coquille de *Mercenaria mercenaria*, un bivalve à microstructure coquillière lamellaire-croisée. C'est ensuite Samata, qui en 1990, a proposé que ces groupements sulfates étaient impliqués dans la capacité des glycoprotéines à fixer le calcium, sans pouvoir toutefois le démontrer. Plus récemment, Albeck et ses collaborateurs (1996) ont observé que les groupements saccharidiques des protéines de matrices extraites de test d'oursin étaient impliqués dans l'aptitude de ces molécules à interagir avec la précipitation du CaCO_3 . Ces auteurs ont envisagé que cette caractéristique pouvait également être décelée dans les matrices coquillières de mollusques.

Par notre étude, nous avons pu démontrer de façon certaine que, chez *Unio pictorum*, la capacité des macromolécules de la matrice à lier les ions calcium et à interagir avec la précipitation du carbonate de calcium était portée essentiellement par les groupements sacchariques sulfatés des glycoprotéines. Il ressort donc de notre analyse que ces groupements sacchariques sont très probablement impliqués dans la capacité des glycoprotéines de la matrice à interagir *in vivo* avec la formation du biominéral. On peut maintenant se demander si cette caractéristique est commune aux matrices de nacre de l'ensemble des bivalves ou si elle constitue une originalité du modèle *Unio pictorum*.

Il semblerait que les groupements sulfates des glycoprotéines de la matrice interagissent avec la formation du biominéral par le biais de leur capacité à concentrer les ions calcium à proximité des centres de nucléation des cristaux (Addadi *et al.*, 1987). Des travaux de cartographie de ces groupements sulfates, au sein des tablettes de nacre de *Nautilus* et d'*Atrina*, ont montré qu'ils étaient majoritairement présents au centre des tablettes, dans la zone de nucléation et de croissance cristalline majoritairement selon l'axe c (Crenshaw & Ristedt, 1975, Nudelman *et al.*, 2006). Il serait intéressant de localiser les groupement sulfates des glycoprotéines de la matrice d'*Unio pictorum* au sein du biominéral afin de déterminer si cette observation peut être étendue à ce modèle, ce qui permettrait d'envisager une possible généralisation de cette caractéristique à la formation de la nacre de l'ensemble des bivalves nacriers.

Dans ce travail, nous avons également noté que la vingtaine de protéines de l'ASM de la nacre d'*Unio pictorum* présentaient des pIs faiblement basiques ou neutres. Cette observation confirme les données moléculaires sur les protéines extraites de la nacre dont les séquences peptidiques ont été décrites.

Dans leur modèle topographique de la nacre, Weiner, Addadi et leurs collaborateurs (Weiner & Traub, 1984, Levi-Kalisman *et al.*, 2001 ; Addadi *et al.*, 2005), on proposé que la présence de protéines acides au sein de la nacre est un pré-requis à la formation des tablettes d'aragonite. Or il semblerait, au vu de nos observations et des protéines caractérisées chez les bivalves ptériomorphes et les gastéropodes, que les protéines de la nacre forment un groupe homogène de protéines faiblement acides ou neutres. Nous verrons plus loin que ce n'est pas le cas des protéines extraites de la nacre de *Nautilus* et nous discuterons alors ce point plus en détail.

La matrice acido-soluble d'*Unio pictorum* présente une activité enzymatique anhydrase carbonique, à l'instar d'autres bivalves appartenant au genre *Pinctada*. Le constituant de la matrice portant cette activité reste à identifier. Cette protéine a été décrite et nommée Nacrein chez *Pinctada fucata*. Nacrein a son 'homologue' chez le gastéropode *Turbo marmoratus*, sans que l'activité enzymatique de cette dernière protéine n'ait pu être mise en évidence. Il serait particulièrement intéressant de déterminer si l'anhydrase carbonique présente chez *Unio pictorum* appartient elle aussi à la famille des protéines de type Nacrein. Bien que la fonction de cette enzyme semble essentielle à la formation des biominéraux de carbonate de calcium, son implication exacte dans les mécanismes de minéralisation des coquilles reste encore énigmatique. Pour aller plus loin dans cette problématique, on peut envisager de mettre en œuvre une approche par RT-PCR, couplée à une étude par protéomique, ainsi qu'une purification/caractérisation de l'activité enzymatique.

Une analyse protéomique, en cours, semble démontrer qu'une protéine de la matrice d'*Unio pictorum* de faible masse moléculaire, P12, serait une homologue des porines de bactérie. Ce résultat, s'il était confirmé, constituerait la première observation de la présence d'une porine dans les matrices calcifiantes et tendrait à montrer qu'*Unio pictorum* puisse avoir, au moins à cet égard, une machinerie moléculaire originale par rapport à celle des autres bivalves nacriers étudiés. Par ailleurs, nous avons également réalisé une banque d'expression d'ADNc construite à partir de cellules du manteau d'*Unio pictorum*, en vue de la cribler et d'obtenir les séquences primaires des différents constituants protéiques de la matrice calcifiante. Les

premières étapes entreprises sont actuellement poursuivies. Nous espérons que ces deux approches complémentaires nous permettront très prochainement de décrire de nouvelles protéines et de compléter notre étude comparative et évolutionniste des protéines associées à la nacre.

Dans la partie de ce mémoire consacrée à la biominéralisation de la coquille chez *Nautilus macromphalus*, nous avons pu présenter plusieurs résultats qui apportent des informations importantes pour la compréhension des mécanismes de biominéralisation de la nacre et de son évolution au sein des mollusques. Notamment, nos travaux sur la matrice organique extraite de la couche nacrée ont montré que la matrice acido-soluble est majoritairement composée de protéines non glycosylées capables de lier les ions calcium, de glycoprotéines acides sulfatées et probablement de polysaccharides acides portant des groupements sulfates.

Nous avons pu montrer que les groupements saccharidiques sont impliqués dans la capacité de l'ASM à interagir avec la précipitation du minéral. Cependant, nous n'avons pas observé, chez *Nautilus*, que ces groupements pouvaient être impliqués dans l'aptitude à lier les ions calcium, cette propriété étant, dans ce cas, imputée à des protéines non glycosylées. Ce résultat souligne que les résidus saccharidiques des protéines des matrices extraites de la nacre peuvent présenter des fonctions et des propriétés différentes chez des espèces différentes.

Comme nous l'avons précédemment décrit, les protéines extraites de la nacre des bivalves ptériomorphes ou des gastéropodes ont présenté jusqu'à présent des pIs faiblement acides ou neutres, les protéines d'*Unio pictorum* semblant également correspondre à ces critères. Il apparaît cependant que cette règle ne puisse pas être généralisée au cas des nautilus. En effet, nous avons observé que, sur gel 2-D, les protéines extraites de la couche nacrée de *Nautilus macromphalus* présentent des pIs soit très acides (inférieurs ou égales à 3), soit très basiques (supérieurs à 9). La présence de protéines acides dans la nacre des nautilus est un fait connu et établi dès 1979 par Weiner. Les travaux de cet auteur sur les protéines acides des matrices organiques de nacre, effectués à partir d'études de coquilles de *Nautilus* et de *Mytilus*, ont largement participé à la conception de modèles de la nacre intégrant cette propriété, abondamment reprise depuis. Il semble donc que la présence de protéines acides dans la matrice de la nacre soit le fait d'un nombre restreint de taxons, tels les céphalopodes du genre *Nautilus*. Cette propriété ne semble apparemment pas s'appliquer aux modèles *Pinctada* ou

Haliotis, dont nous tirons la très grande majorité des données moléculaires disponibles. Notons aussi que la présence de protéines très basiques dans l'ASM de la nacre de *Nautilus* est une donnée originale, qui ne fait écho à aucune observation précédente. Jusqu'à présent, des protéines très basiques avaient été décrites uniquement dans les couches calcitiques de prismes de *Pinctada*.

D'un point de vue mécanistique, ce résultat souligne la diversité des propriétés des protéines des matrices organiques coquillières chez les différentes classes de mollusques. Il est remarquable de constater que les différentes classes de mollusques semblent capables de former une structure homologue, la nacre, à partir d'assemblages moléculaires de propriétés différentes (notamment en termes de pI et de modifications post-traductionnelles).

Nous avons par ailleurs entrepris un travail de localisation des différents constituants de la matrice de *Nautilus* au sein des tissus calcifiés. Nous avons d'ores et déjà purifié différents composés majoritaires de l'ASM par électrophorèse préparative, et nous sommes en train de poursuivre la caractérisation de la structure primaire de ces protéines par MS/MS. La production d'anticorps polyclonaux dirigés contre ces fractions purifiées devrait nous permettre de localiser ces constituants au sein de la coquille par immuno-détection (immuno-gold). Ces travaux devraient donner des résultats essentiels à la compréhension des mécanismes qui régissent la formation de la nacre, mais aussi de concilier/réconcilier les modèles topographiques de la nacre avec les données moléculaires des séquences de protéines.

Notre approche protéomique, en l'occurrence l'analyse des peptides obtenus après digestion trypsique de l'AIM et de l'ASM et spectrométrie de masse, a démontré que ces deux matrices comportaient de nombreux peptides communs. Des travaux récents (Bédouet *et al.*, 2007) ont montré la présence de peptides homologues à certaines fragments de la séquence de la protéine MSI31 non seulement dans la matrice soluble, mais également dans la matrice insoluble de *Pinctada fucata*. Nos résultats ont démontré que la présence de molécules similaires dans l'ASM et dans l'AIM semblait être un phénomène observable chez d'autres mollusques. À partir de ces observations, nous suggérons que la matrice insoluble présente au sein des coquilles de mollusques pourrait se former, au moins en partie, par polymérisation de protéines solubles, impliquant probablement l'activité d'enzymes de type oxydase, comme les tyrosinases (à l'instar du processus de tannage observable chez les Arthropodes) ou d'enzyme du type transglutaminase. L'étude des processus de formation de la matrice insoluble apporterait les données nécessaires à la compréhension des mécanismes de sécrétion et

d'assemblage de la matrice organique des coquilles. Nous pouvons imaginer qu'une approche par détection et caractérisation d'activités enzymatiques de type oxydase (phénoloxydase, tyrosinase...) au sein des biominéraux en formation permettrait, au moins en partie, de répondre à cette interrogation.

Nos travaux de protéomique sur l'ASM et l'AIM nous ont également permis d'obtenir une quarantaine de séquences partielles de protéines associées à la nacre de *Nautilus*. Nous avons observé que certaines de ces séquences peptidiques présentaient des homologies partielles avec les protéines de type Nacrein, N14/N16, Tyrosinase-like et Mucoperlin, extraites de la nacre de bivalves ptériomorphes (*Pinctada* sp. et *Pinna nobilis*), alors qu'aucune homologie n'a pu être mise en évidence avec les protéines décrites chez les gastéropodes du genre *Haliotis*. Nous discuterons plus bas des implications évolutives soulevées par ce résultat.

Dans la partie de ce mémoire consacrée à la biominéralisation de la coquille des brachiopodes Rhynchonelliformea, nous avons observé que, chez les différentes espèces étudiées, la matrice acido-insoluble constitue entre 0,1 et 0,4% de la masse totale du biominéral, alors que la matrice acido-soluble représente entre 0,01 et 0,02%. Ces différentes matrices organiques présentent toutes la capacité à interférer avec la précipitation du CaCO_3 *in vitro*. Ces résultats suggèrent que l'ASM de la coquille des brachiopodes est directement impliquée dans les processus de formation du biominéral.

En ce qui concerne leur composition, ces différentes matrices semblent formées d'assemblages macromoléculaires bien distincts. Alors que l'ASM de *N. nigricans* et de *T. retusa* semble majoritairement composée de glycoprotéines basiques, celle de *C. inconspicua* et de *N. lenticularis* est constituée de protéines acides capables de lier les ions calcium *in vitro*. D'autre part, la matrice de *G. vitreus* et *L. neozelanica* ne semble présenter aucun de ces deux types de molécules. Ces différences de composition pourraient être liées aux positions phylogénétiques respectives de ces espèces (Cohen & Gawthrop, 1996).

Il est à noter que nous avons également observé, au sein de ces différentes matrices, la présence d'un composé majoritaire migrant aux alentours de 50 kDa. Des études complémentaires de séquençage par MS/MS seront nécessaires afin de détecter d'éventuelles homologies de séquences entre ces composés de comportement électrophorétique similaire chez ces différentes espèces. Cette approche permettrait également d'étudier *in silico* le degré de similitude existant entre les constituants matriciels des coquilles des brachiopodes et ceux

des coquilles des mollusques, voire de structures biominérales développées par d'autres taxons.

Ces travaux nous ont permis d'observer la variabilité de composition des matrices coquillières des brachiopodes. Ces résultats suggèrent que dans ce phylum des structures biominéralisées homologues peuvent se former, comme observé chez les mollusques, via la participation de cocktails glycoprotéiques distincts, même si certains constituants matriciels pourraient être semblables.

L'approche de la caractérisation biochimique des matrices organiques associées aux biominéraux calcifiés de mollusques et de brachiopodes nous a également permis d'aborder plusieurs aspects fondamentaux de la formation de ces biominéralisations concernant :

- Le rôle des modifications post-traductionnelles

La très grande majorité des informations que nous possédons sur les rôles et les fonctions des macromolécules des matrices organiques associées aux biominéraux calcifiés des invertébrés proviennent essentiellement de l'étude des protéines et de la caractérisation de leur structure primaire. Le plus souvent, les fonctions biologiques de ces protéines sont déduites de l'analyse de leurs domaines peptidiques, par comparaison avec des domaines actifs homologues décrits pour d'autres protéines caractérisées dans des systèmes biologiques divers. Il est à noter, et ce particulièrement chez les mollusques, qu'un nombre très limité de travaux ont permis la caractérisation tangible de ces activités ou des modifications post-traductionnelles de ces protéines (Marxen *et al.*, 2003). De nombreux exemples observés chez d'autres organismes ont pu mettre en évidence le rôle des phosphorylations (Hecker *et al.*, 2003) ou des groupements saccharidiques (Ganss & Hoffman, 1993) dans les processus de biominéralisation. Nos travaux ont notamment démontré l'importance de la glycosylation des protéines chez nos deux principaux modèles d'étude. Nous soulignerons ici simplement le fait que les modifications post-traductionnelles peuvent apporter aux protéines de matrice de mollusque leur fonctionnalité biologique, cet aspect restant en grande partie à étudier.

- Les mécanismes évolutifs qui régissent la formation de ces biominéralisations

Nous avons observé que les différentes protéines de l'ASM d'*Unio pictorum* et de *Nautilus macromphalus* possédaient des séquences protéiques partielles identiques entre elles. Ce

résultat nous a inspiré différentes hypothèses permettant d'expliquer ces observations. Il est possible que ces protéines résultent de l'expression de différents gènes qui seraient apparus par duplication d'un premier gène ancestral, comme cela semble être le cas des gènes codant pour les protéines des spicules de larves d'oursin (Livingston *et al.*, 2003). On peut aussi envisager que ces protéines résultent de l'expression différentielle d'un même gène via des mécanismes d'épissage alternatif de l'ARNm (Patthy, 2003). Il serait toutefois envisageable que certaines protéines constituent différents produits de dégradation d'une même protéine, comme observé pour les protéines P50 et P29 de l'ASM d'*Unio pictorum* et comme c'est le cas de certaines protéines des dents de vertébrés (Simmer & Hu, 2002). À ce jour, les mécanismes évolutifs régissant l'évolution des protéines associées aux coquilles de mollusques restent encore totalement inconnus.

- L'évolution de la nacre chez les bivalves

Nous avons précédemment évoqué l'idée selon laquelle l'importance des glycosylations de certains constituants de l'ASM dans les processus de biominéralisation chez *Unio pictorum* puisse être une originalité propre à ce modèle. En effet, aucun travail antérieur ne fait état d'un tel cas chez les autres bivalves ptériomorphes étudiés. Notons cependant que nous avons pu détecter une activité anhydrase carbonique au sein de la matrice de notre modèle, comme c'est également le cas de la matrice de *Pinctada*. De plus, des travaux de biologie moléculaire ont d'ores et déjà permis de décrire des protéines homologues à Nacrein chez d'autres espèces de bivalves ptériomorphes, phylogénétiquement proches de *Pinctada fucata*. Il est probable que d'autres bivalves présentent également cette particularité. Nous avons entrepris une étude globale de l'ASM d'*Unio pictorum* par MS/MS et nous espérons que cette approche pourra, dans un avenir proche, nous permettre de statuer sur d'éventuelles homologies entre ce modèle et les autres bivalves étudiés. Nous pouvons déjà noter que des bivalves des genres *Unio* et *Anodonta* présentent des compositions macromoléculaires très proches de celles de notre modèle. Il semblerait donc que des homologies puisse être plus facilement décelables si l'on examine des espèces phylogénétiquement proches. En effet, l'accumulation de trop nombreuses mutations au cours de l'évolution sur les différents gènes codant pour les protéines de matrice de coquille pourrait compromettre la détection d'homologies entre deux gènes dérivant de la duplication d'un même gène ancestral.

Dans le cas d'espèces ayant divergé depuis des centaines de millions d'années, comme c'est le cas pour *Unio pictorum* et *Pinctada* spp., nous espérons que nos données de protéomique,

une fois complètement analysées, permettront d'évaluer le degré d'homologie des protéines matricielles.

- L'évolution de la nacre chez les mollusques

Dans ce travail, nous avons pris le parti de comparer les outils moléculaires participant à la formation (et constitutifs) de structures biominéralisées homologues, les différentes nacres des classes de mollusques. Notre hypothèse de travail partait de l'idée simple, voire simpliste, que des structures biominérales homologues devaient probablement être formées par des machineries moléculaires homologues. À un niveau microstructural, la nacre 'en mur de briques' des bivalves et des monoplacophores, ainsi que la nacre colonnaire des gastéropodes et des céphalopodes semblent être des structures nécessairement homologues, ces différentes classes de mollusques étant directement apparentées. Au niveau des compositions en macromolécules des matrices associées à ces structures respectives, il semblerait que les deux modèles les plus étudiés et les mieux caractérisés (*Pinctada* chez les bivalves et *Haliotis* chez les gastéropodes) ne possèdent aucune protéine homologue en commun. Une protéine homologue à Nacrein de *Pinctada* a été décrite chez le gastéropode nacrier *Turbo marmoratus*, mais ce résultat isolé reste à vérifier. Notre approche a consisté à étudier les macromolécules de la matrice de la nacre du céphalopode *Nautilus macromphalus*, dans une optique comparative et évolutionniste. Au vu des données de séquences *de novo* obtenues par protéomique, il semblerait que *Nautilus* possède des domaines protéiques similaires à Nacrein, N14, Tyrosinase-like et Mucoperlin, des protéines décrites chez les bivalves exclusivement. D'autre part, aucune homologie avec des protéines de gastéropodes n'a pu être observée. Notons que pour valider pleinement les homologies observées chez *Nautilus*, des séquences plus longues restent à obtenir (par recouvrement de séquences obtenues par MS/MS ou par RT-PCR). Quoi qu'il en soit, ces résultats surprenants nous suggèrent deux hypothèses principales : 1) L'accumulation de trop nombreuses mutations au cours de l'évolution sur les différents gènes codant pour les protéines de matrice de nacre de gastéropodes et/ou de céphalopodes nous empêche d'observer leurs homologies ; 2) Les nacres de ces différentes classes de mollusques ne sont pas homologues et sont le produit de machineries moléculaires analogues et bien distinctes.

La première hypothèse nous permet de reformuler la question inhérente à la pression de sélection qui s'exerce sur les biominéralisations, notamment les coquilles : est-ce que cette pression de sélection s'exerce préférentiellement sur les outils moléculaires de la formation de la coquille et/ou sur le produit final. Ce dernier cas de figure implique que les gènes codant

pour les protéines de matrice de coquille peuvent avoir évolué de manière importante alors que les biominéraux qui résultent de l'expression de ces gènes sont très conservés. Des travaux récents d'étude du transcriptome de cellules du manteau d'*Haliotis asinina* par une approche d'EST ont suggéré que les protéines des matrices coquillières pourraient subir une évolution rapide au sein du genre *Haliotis* (Jackson *et al.*, 2006 ; 2007).

La deuxième hypothèse (scénario extrême inverse) est généralement peu envisagée. Cependant, des travaux récents d'Antonio Checa (non publiés) suggèrent que la nacre des monoplacophores pourrait ne pas être homologue à la nacre des autres classes de mollusques. De plus, on peut observer dans la coquille des *Spirula* (Cephalopoda, Coleoidea) une couche interne d'apparence semblable à de la nacre, mais non homologue à celle de *Nautilus*. L'idée que l'évolution aurait permis l'apparition de structures nacrées analogues très ressemblantes au sein de groupes taxonomiquement proches, même si elle paraît peu vraisemblable, n'est donc pas à exclure.

À l'issue de ce travail, il apparaît que d'autres questions pourraient également faire l'objet, à elles seules, de nouvelles recherches sur l'évolution de la(des) biominéralisation(s) chez les mollusques :

- Afin de caractériser les pressions de sélection qui s'exercent sur les différentes protéines de la nacre, il serait intéressant d'observer la **variabilité des domaines protéiques à une échelle micro-évolutive**. En effet, l'observation et la comparaison de ces composés chez des espèces qui n'auraient divergé que depuis quelques millions d'années permettraient d'observer la variabilité de protéines clairement identifiées comme homologues. Comme nous l'avons proposé plus haut, l'étude de la **variabilité inter-spécifique des protéines de matrice coquillière des Unionoidae européens, appartenant aux genres *Unio*, *Margaritifera* et *Anodonta*** constituerait à notre avis un excellent modèle pour aborder cette problématique. De plus, ces espèces font l'objet depuis une dizaine d'année de nombreuses études phylogénétiques ou biogéographiques. En effet, de nombreuses séquences de gènes codant pour la cytochrome oxydase I ou pour l'ARNr 18S sont maintenant disponibles, constituant une base de comparaison pour déterminer si la dérive génétique est importante ou non pour les gènes des protéines de coquille.

- **Les biominéralisations chez les céphalopodes actuels constitueraient un excellent modèle d'étude pour la comparaison de systèmes biominéralisants *analogues* au sein d'un même taxon.** Cette étude permettrait d'aborder la question de la création/exaptation de nouvelles structures biominéralisantes au cours de l'évolution. Les céphalopodes semblent, à cet égard, être un exemple fascinant. Alors que les Nautiloidae possèdent des coquilles calcifiées externes depuis plus de 500 M.A., la coquille des argonautes est une innovation beaucoup plus récente. Ce dernier taxon dérive d'ancêtres octopodes sans coquille. Notons également, que le manteau sécrète la coquille des nautilus, alors que celle des argonautes est produite par les tentacules des femelles. Cette étude pourrait également prendre en compte le cas des seiches et des spirules aux coquilles internes calcifiées. Remarquons que ce dernier genre présente des coquilles constituées d'une couche comparable, mais apparemment non homologue, à la nacre. **Les comparaisons des systèmes calcifiants chez ces différents organismes permettraient de décrire comment l'évolution a permis à cette sous-classe de créer des structures analogues à plusieurs reprises, et ce, de façon indépendante.**

Participation à d'autres travaux

Molluscan Shell Proteins: Primary Structure, Origin, and Evolution

Frédéric Marin, Gilles Luquet,* Benjamin Marie,* and Davorin Medakovic†*

*UMR CNRS 5561 'Biogéosciences,' Université de Bourgogne
6 Boulevard Gabriel, 21000 DIJON, France

†Center for Marine Research Rovinj, Ruder Boskovic Institute
5 Giordano Paliaga, 52210 ROVINJ, Croatia

- I. Introduction: The Shell, a Biologically Controlled Mineralization
- II. Molluscan Shell Formation: Developmental Aspects
 - A. The Larval Shell
 - B. The Juvenile and Adult Shell
 - C. Transient Amorphous Calcium Carbonate
- III. The Topographic Models of Shell Mineralization
 - A. Early Nacre Descriptions and Models
 - B. Recent Nacre Models and Evolving Views
 - C. Prism Models
- IV. Molluscan Shell Proteins: Characterization of Their Primary Structure
 - A. Extremely Acidic Shell Proteins
 - B. Moderately Acidic Shell Proteins
 - C. Basic Shell Proteins
 - D. Partially Characterized Shell Proteins
 - E. Other Molluscan Proteins: The Extrapallial Fluid and the Mantle
 - F. Remarks on Molluscan Shell Proteins
- V. Origin and Evolution of Molluscan Shell Proteins
 - A. The Cambrian Origin of Mollusk Shell Mineralization
 - B. The "Ancient Heritage" Scenario
 - C. The "Recent Heritage and Fast Evolution" Scenario
 - D. Long-Term Evolution of Shell Matrices and Microstructures: The Bivalve Example
- VI. Concluding Remarks
 - Acknowledgments
 - References

In the last few years, the field of molluscan biomineralization has known a tremendous mutation, regarding fundamental concepts on biomineralization regulation as well as regarding the methods of investigation. The most recent advances deal more particularly with the structure of shell biominerals at nanoscale and the identification of an increasing number of shell matrix protein components. Although the matrix is quantitatively a minor constituent in the



Shell repair process in the green ormer *Haliotis tuberculata*: A histological and microstructural study

C. Fleury^{a,1}, F. Marin^{b,*}, B. Marie^b, G. Luquet^b, J. Thomas^b,
C. Josse^c, A. Serpentine^a, J.M. Lebel^{a,*}

^a Laboratoire de Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, UMR 100 IFREMER, IFR 146 ICORE, Université de Caen Basse Normandie, Esplanade de la Paix, 14032 CAEN Cedex, France

^b Laboratoire de Biogéosciences, UMR CNRS 5561, Université de Bourgogne, 6 Boulevard Gabriel, 21000 Dijon, France

^c Laboratoire de Réactivité des Solides, Bâtiment Mirande, Université de Bourgogne, BP 47870, 21078 Dijon Cedex, France

Received 6 August 2007; received in revised form 12 December 2007; accepted 12 December 2007

Available online 19 February 2008

Abstract

In the present paper, juvenile and adult shells of the green ormer *Haliotis tuberculata* ("Oreille de Saint-Pierre") were perforated in a zone close to the shell edge and the shell repair process was followed at two levels: (1) by observing the histology of the calcifying mantle in the repair zone and (2) by analyzing with SEM the microstructure of the shell repair zone. Histological data clearly show the presence of calcium carbonate granules into the connective tissues, but not in the epithelial cells. This suggests that calcium carbonate granules are synthesized by sub-epithelial cells and actively transported through the epithelium to the repair zone, via a process which may be similar to that described by Mount et al. [Mount, A.S., Wheeler, A.P., Paradkar, R.P., Snider, D., 2004. Hemocyte-mediated shell mineralization in the eastern oyster. *Science* 304, 297–300]. Furthermore, SEM observations show that the repair zone exhibits different stratified microstructures (spherulitic, thin prismatic, blocklike, sub-nacreous, nacreous, foliated-like), some of which are not continuous (*i.e.* lenticular) along the repair zone. This suggests a complex secreting regime of the calcifying mantle and an elaborate geometry of the epithelium involved in shell repair.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Gastropod; Shell repair; Calcium carbonate; Biomineralization; Mantle epithelium; Microstructure

1. Introduction

In the metazoan world, the phylum Mollusca represents without contest a remarkable evolutionary success, by the number of living species – 120,000 and more – by the durability of its constitutive taxa over the different geological periods, and by the extreme adaptability of representatives to different environments. A part of this enduring success relies on a specific organ, the shell, and on the way by which this mineralized exoskeleton is produced. The molluscan shell represents indeed the best example of a solid calcium carbonate biomineralization resulting from the secreting activity of a thin polarized epithelium (Simkiss and Wilbur, 1989). During

calcification periods, this epithelium releases an extracellular organic matrix, which has the remarkable ability to control, over different scales, several aspects of the shell mineralization process (Addadi et al., 2006). It can select the calcium carbonate polymorph used (calcite *versus* aragonite); it can finely regulate the shapes of the crystallites, a process from which emerge different shell textures: nacreous, prismatic, foliated, crossed lamellar, homogeneous, granular.

One aspect that made the molluscan shell biomineralization so successful lies also in the ability of molluscs to rapidly repair shell damages, an undeniable evolutionary advantage for overcoming all kinds of external aggressions: accidental physical shell cracks, shell boring by epibiont organisms (sponges, for example), or active predation by fishes. Although the shell is a 'dead' non-cellular tissue, it exhibits certain plasticity, and the ability of molluscs to slightly 'remodel' their shell – in particular in case of cal-

* Corresponding authors.

E-mail addresses: frederic.marin@u-bourgogne.fr (F. Marin), jean-marc.lebel@unicaen.fr (J.M. Lebel).

¹ These authors contributed equally to this work.

*Biom mineralization: from Paleontology to Materials Science
Proceedings of the 9th International Symposium on Biom mineralization,
(Eds.) Arias, J.L., Fernández, M.S.
Editorial Universitaria, Santiago, Chile, 2007, pp. 319-328.*

Biochemical Characterization of the Soluble Organic Matrix of Gastroliths from Decapods

Gilles Luquet¹, María Soledad Fernández², María J. Navarrete², José L. Arias²,
Nathalie Guichard¹, Benjamin Marie¹ and Frédéric Marin¹

¹ UMR CNRS 5561 Biogéosciences, University of Burgundy, 6 Bd. Gabriel, F-21000 Dijon, France;
gilles.luquet@u-bourgogne.fr

² Faculty of Veterinary and Animal Sciences and Centre for Advanced Interdisciplinary Research in Materials
(CIMAT), University of Chile, Santiago, Chile.

ABSTRACT

Gastroliths are disc-shaped calcium storage structures cyclically elaborated by some decapods in their stomach wall. In the present study, we extracted the gastrolith organic matrix from three different decapods, two crayfishes and one lobster, and began to characterize the soluble matrix obtained after decalcification by acetic acid. By using different staining (silver nitrate, Coomassie Blue, Stains-all) after SDS-PAGE, we evidenced that these soluble fractions are rich in polypeptides, some seems common, others are completely different. Among them, putative calcium binding proteins might be present and have to be further characterized. This soluble organic matrix also interacts in vitro with calcite crystals growth, suggesting its involvement in the calcium carbonate precipitation. The main conclusion of this preliminary study is that close species from the same order of animals have developed very similar calcium storage strategies by elaborating morphologically identical structures, but different in their molecular composition.

INTRODUCTION

Like most of the invertebrates, crustaceans possess a rigid exoskeleton. But their particularity lies on the cyclic renewal of this calcified and unstretchable external skeleton, simply to permit growth. Thus these animals have to cyclically solve a problem of calcification. The origin of the calcium used depends on the way of life of the considered animal. While most crustaceans are aquatic and take the needed calcium from their close environment, terrestrial species, as well as species living in water, have developed calcium storage strategies (Luquet and Marin, 2004). Thus, inside their organism they have a reservoir of calcium ions immediately available after ecdysis, the moment when they leave their old carapace.

The storage structures are as diverse as granules in the hemolymph or in a digestive gland called hepatopancreas, concretions in diverticula of the midgut in amphipods, sternal plates at the level of the four anterior sternites in isopods,

*Biom mineralization: from Paleontology to Materials Science
Proceedings of the 9th International Symposium on Biom mineralization,
(Eds.) Arias, J.L., Fernández, M.S.
Editorial Universitaria, Santiago, Chile, 2007, pp. 281-288.*

Caspartin: Thermal Stability and Occurrence in Mollusk Calcified Tissues

Frédéric Marin¹, Virginie Morin¹, Fred Knap¹, Nathalie Guichard¹, Benjamin Marie¹, Gilles Luquet¹, Peter Westbroek² and Davorin Medakovic³

¹ UMR CNRS 5561 Biogéosciences, University of Burgundy, 6 bd. Gabriel, F-21000 Dijon, France

² Gorlaeus laboratories, Leiden University, Einsteinweg 55, P.O. box 9502, 23000 RA Leiden, The Netherlands

³ Ruder Boskovic Institute, Center for Marine Research Rovinj, Giordano Paliaga 5, 52210 Rovinj, Croatia
frederic.marin@u-bourgogne.fr

ABSTRACT

The fan mussel *Pinna nobilis* secretes a two-layered shell, the external layer of which is composed of long calcitic prisms. The dissolution of these prisms releases an assemblage of acidic intracrystalline proteins, among which caspartin, an Asp-rich protein (Marin et al., 2005). A polyclonal antibody raised against purified caspartin was used for estimating its thermal stability, and for investigating the presence of cross-reacting proteins in the shell matrices of several mollusks.

In the first case, prisms of *Pinna nobilis* were heated at 100°C, for one to eleven days. The degradation of caspartin was followed on SDS-PAGE and on Western-blot. The experiment shows that caspartin is rather stable, and suggests that this protein might be preserved in recent fossil specimen.

In the second case, shell matrices were extracted from numerous mollusks including bivalves, gastropods and cephalopods. They were subsequently tested on ELISA and on dot-blot, to check the presence of caspartin or immunologically related proteins. The pattern obtained is not superimposed with the mollusk phylogeny nor it is strictly correlated with the pattern of shell microstructures. The implications of our findings are briefly discussed.

INTRODUCTION

Among mollusks, the biomineralization of the shell is regulated by a mixture of glycoproteins and polysaccharides, collectively named the shell matrix. This amalgamate is secreted by the calcifying mantle epithelium. It interacts with the mineral ions, to form calcium carbonate biominerals, calcite or aragonite. The matrix remains closely associated with the formed minerals. It can be retrieved by dissolving the mineral phase with a weak acid or with a calcium-chelating agent like EDTA. It is then usually analyzed by classical fractionation techniques, mostly electrophoresis or chromatography. One drawback of these approaches is that they are tedious and time-consuming, and that they do not allow the comparison of numerous matrices at the same time.

Techniques et protocoles d'analyses

Techniques et protocoles d'analyses

1 - Préparation des biominéraux, mesures physiques et observations

- Microscope électronique à balayage (MEB)

Les microstructures des coquilles sont observées sur des fragments fraîchement prélevés. Ces fragments sont recouverts d'une fine couche de carbone ou d'or (application par projection contrôlée, sous vide), puis sont directement observés à l'aide d'un microscope électronique à balayage JEOL 6400 (JEOL Europe SAS, Croissy sur seine, France) en mode secondaire d'électrons rétro-diffusés, au laboratoire de « Réactivité des solides » de l'ESIREM à Dijon.

- Préparation des biominéraux.

Les coquilles sont immergées 24 h dans une solution d'hypochlorite de sodium 0,5% (température ambiante, sous agitation constante). Cette étape essentielle nous permet de retirer toute la matière organique non associée aux biominéraux, tels que le périostacum, tout contaminant exogène bactérien ou des organismes encroûtants. Après avoir été abondamment rincées avec de l'eau ultra-pure et séchées à l'étuve à 30°C, les coquilles sont nettoyées mécaniquement à l'aide d'une scie circulaire rotative équipée d'un disque diamanté, afin de retirer largement la zone du ligament, ou toute zone d'inclusion bactérienne contenue entre les couches de la coquille. Une fois séchées, les différentes couches qui constituent la coquille sont séparées mécaniquement (couche prismatique et couche nacrée pour *Nautilus macromphalus* et *Unio pictorum*). Les fragments de coquilles sont réduits en petits morceaux de 1 mm de large, puis broyés à l'aide d'un broyeur mécanique (Pulverisette 2, Fritsch, Germany) jusqu'à obtention d'une fine poudre qui sera ensuite tamisée au travers d'une grille de 63 micromètres de diamètre de maille.

- Mesures du spectre d'absorption dans les infrarouges

La méthode d'analyse par spectroscopie infrarouge (IR) consiste à mesurer pour un échantillon les longueurs d'ondes et les intensités d'absorption dans la lumière infrarouge. Cette technique permet de déterminer dans un composé la présence et la quantité relative de groupements chimiques dont les longueurs d'onde d'absorption sont caractéristiques. Les spectres d'absorption dans les infrarouges sont directement mesurés à sec sur les échantillons réduits en fines particules, à l'aide d'un spectromètre Brücker Vector 22 (Karlsruhe, Germany) équipé d'un dispositif Golden GateTM ATR (Specac Ltd., Orpington, UK) au

« Laboratoire de synthèse et électrosynthèse organométalliques » de Dijon. Les mesures spectroscopiques des infra-rouges à transformée de Fourier (Fourier Transforms InfraRed, FTIR) sont acquises sur la plage 4000-500 cm^{-1} , à une résolution de 2 cm^{-1} et sont présentées comme la moyenne de 10 mesures successives.

- Mesures de la diffraction des rayons-X

L'observation du profil de diffraction des rayons-X d'un échantillon est une technique non-destructive qui permet sa détermination cristalline. Les déterminations des pics de diffraction observés pour un échantillon permettent de décrire les paramètres de texture et d'orientation cristallines spécifiques. Les différents types de minéraux associés aux poudres de coquilles (< 63 μm) ont été identifiés par une étude de diffraction sur plateau orienté. Les diagrammes de diffraction ont été obtenus à l'aide d'un diffractomètre D500 (Siemens©, Germany) en utilisant les radiation du CuK_α ainsi qu'un filtre de Ni. Pour chaque échantillon, 3 mesures ont été effectuées et moyennées. L'identification des minéraux a été réalisée à partir de la position relative des pics de réflexion de la série (001) sur le profil de diffraction des rayons-X (Brown & Brindley, 1980; Moore & Reynolds, 1989).

2 - Extraction des matrices organiques et analyses globales

- Extraction des matrices

Les matrices organiques associées aux biominéraux sont extraites par dissolution des carbonates de calcium avec de l'acide acétique (ou acide éthanoïque), un acide faible ($\text{pK}_a = 4,75$) couramment utilisée pour une extraction des protéines tout en évitant de provoquer d'hydrolyse des liaisons peptidiques. La poudre (10-25 g) est mise en solution dans un volume d'eau ultra-pure minimum (5-10 mL), puis placée sous agitation à 4°C. Huit cents millilitres d'une solution d'acide acétique 5% sont alors progressivement incorporés à la suspension par injections successives de 100 μL toutes les 5 secondes, contrôlées à l'aide d'un titrateur (Titrimeter; Schott, Germany), afin de progressivement faire décroître le pH jusqu'à une valeur de 4, attestant d'une décalcification complète. La solution obtenue est centrifugée (20 min, 3900 rpm, 4°C) séparant ainsi la fraction organique acido-soluble (le surnageant) de la fraction organique acido-insoluble (le culot). La matrice acido-soluble (acido-soluble matrix, ASM) est filtrée sur membrane de cellulose de diamètre de pore 5,0 μm , puis est ultra-filtrée sur une membrane YM-10 (4°C) qui retient et concentre la fraction supérieure à 10 kDa. Cette fraction est ensuite abondamment dialysée contre de l'eau ultra-

pure (volume 1 L, 6 changements d'eau minimum), puis lyophilisée à froid et pesée à l'aide d'une balance de précision. La quantité de protéines est estimée en solution à l'aide du test à l'acide bicinchoninique (BCA-200 protein Assay kit) développé par la société Pierce Ltd. (Rockford, USA), en utilisant l'albumine bovine (bovine albumin serum, BSA) comme standard. Le culot, quant à lui, est remis en suspension dans 50 mL d'eau ultra-pure, centrifugé 20 min à 3900 rpm (étape répétée au moins 6 fois), afin d'éliminer toutes traces d'acide acétique et de calcium en solution, puis est finalement lyophilisé à froid et pesé à l'aide d'une balance de précision.

- Analyse des compositions en acides aminés.

Les analyses de la composition en acides aminés des fractions solubles et insolubles ont été effectuées par la société Eusequence bv (Groningen, Pays-bas). Les lyophilisats de matrices ont été hydrolysés en phase gazeuse avec de l'acide chlorhydrique 5,7 M (1,5 h, 150°C), puis la quantité des différents acides aminés a été estimée par un détecteur HP1090 Aminoquant (Hewlett-Packard Corp., Palo alto, USA) couplé à 2 colonnes montées en dérivation, utilisant le *O*-phtalaldéhyde et le FMOG (*N*-(9-fluorenyl)methoxycarbonyl) pour dériver les acides aminés primaires et secondaires, respectivement. Les résidus cystéines sont, quant à eux, estimés après oxydation. Notons que cette technique dégrade partiellement les résidus tryptophane dont la quantité est ici sous-estimée. Il est important de noter que la forte hydrolyse mise en œuvre ici (5,7 M HCl, 150°C, 1,5 h) ne permet pas de dissoudre complètement la matrice acido-insoluble.

- Analyse des compositions en monosaccharides

La composition des matrices en monosaccharides basiques, neutres et acides est obtenue à l'aide d'une colonne échangeuse d'anions (séparant les différents composés) couplée à un système de détection par ampérométrie (HPAE-PAD, high performance anion exchange with pulsed amperometric detection). Les matrices lyophilisées (100 ou 500 µg, pour l'ASM et l'AIM, respectivement) sont hydrolysées dans 100 µL d'une solution 2 M d'acide trifluoroacétique (TFA) à 105°C, pendant 4 h. Les échantillons sont ensuite séchés par évaporation (SpeedVac®, Savant) avant d'être mis en solution dans 100 µL de NaOH 20 mM. Les échantillons sont alors analysés sur une colonne CarboPac PA100 (Dionex Corp., Sunnyvale, USA) et les monosaccharides sont quantifiés à partir de courbes étalons réalisées avec les différents standards (fucose, rhamnose, arabinose, galactose, glucose, mannose, xylose, galactosamine, glucosamine, acide galacturonique et acide glucuronique) injectés à 4,

8 ou 16 p.p.m.. Les échantillons sont aussi testés sans hydrolyse afin de détecter une éventuelle contamination des échantillons pendant leur préparation (*e.g.* dialyse, filtration, ultrafiltration). Notons que cette technique ne permet pas de doser les acides sialiques qui sont détruits par l'hydrolyse des échantillons au TFA. Pour la quantification des acides sialiques nous avons réalisé une hydrolyse modérée des échantillons dans une solution de 0,016 M d'acide acétique (80°C, 3 h), comme précédemment décrit (Rohrer, 2000). Les échantillons sont ensuite filtrés à l'aide de cellules Centricon (Millipore, Bedford, USA) de taille de maille interne 3 kDa (centrifugation à 3000 r.p.m.), séchés et dissous dans de l'eau ultra-pure et analysés par HPAE-PAD en utilisant les acides neuraminiques comme standards (Neu5Ac et Neu5Gc).

- Dosage des sucres sulfatés

Les sucres sulfatés sont dosés dans les matrices d'après la technique de détection spectrophotométrique décrite par Barbosa et ses collaborateurs (2003). Cette technique utilisant le bleu de 1,9-diméthylméthylène (DMB) a été adaptée dans le kit BlyscanTM (Biocolor Ltd., Ireland) pour une détection directe à 655 nm sur microplaque et permet aussi bien de détecter les sucres *O*- ou *N*-sulfatés des glycoprotéines, des protéoglycans ou des glycoaminoglycans. La chondroïtine 4-sulfate a été utilisée comme standard pour la quantification des polysaccharides sulfatés.

- Déglycosylation à l'acide trifluorométhanesulfonique (TFMS)

La déglycosylation des glycoprotéines à l'acide trifluorométhanesulfonique (TFMS) permet d'hydrolyser les liaisons covalentes qui relient les mono-saccharides des polysaccharides entre eux, tout en préservant les liaisons peptidiques des protéines, lorsqu'elle est réalisée à 0°C sous atmosphère d'azote comme recommandé par Edge et ses collaborateurs (1981). Cinq milligrammes de matrice organique sont incubés 3 h à 0°C dans un mélange de TFMS/anizole (2:1, v/v) sous agitation permanente. Après neutralisation avec 2 mL de pyridine 50% froide (0°C), la phase aqueuse a été extraite à l'aide de 2 mL de di-éther (2x) avant d'être longuement dialysée contre de l'eau ultra-pure (5 jours). La fétuine a été utilisée comme témoin positif de la déglycosylation. Les échantillons déglycosylés sont ensuite testés sur SDS-PAGE.

3 - Analyses sur gel de polyacrylamide

- Electrophorèse mono-dimensionnelle

La séparation des macromolécules des matrices organiques a été effectuée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyle sulfate (SDS), technique dite SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Le SDS est un agent dénaturant, qui se lie aux protéines et leur confère une charge négative uniforme. Les protéines qui migrent sous l'action d'un champ électrique continu sont séparées en fonction de leur masse, car elles sont plus ou moins retenues selon leur encombrement stérique dans le gel de polyacrylamide qui joue ainsi un rôle de tamis moléculaire. En conditions dénaturantes (en présence de SDS et de β -mercaptoéthanol), la comparaison des distances de migration parcourues par les différents constituants de la matrice à celles de protéines connues permet de déterminer ainsi la masse moléculaire apparente de ces polypeptides. La matrice soluble est directement mise en solution dans un tampon de dénaturation, dit tampon de Laemmli (Tris-HCl 60 mM pH 6,8 ; glycérol 5%, SDS 0,4% ; β -mercaptoéthanol 0,02% ; bleu de bromophénol 0,1%) puis incubé 10 min à 99°C afin d'obtenir une dénaturation complète de l'échantillon. La matrice acido-insoluble subit au préalable une étape de solubilisation dans de l'urée 8 M (60°C, 60 min). Les extraits protéiques (20 μ L, pour un gel analytique à 10 puits) sont déposés sur un mini-gel 10-15% de polyacrylamide (gel de migration, *running*) surmonté d'une zone à 3% de polyacrylamide (gel de concentration, *stacking*), permettant une meilleure pénétration des macromolécules dans le gel de migration. L'étape de pénétration et l'étape de migration s'effectuent dans un système mini-protean 3 (Bio-Rad®), par application d'un courant continu de 100 V ((50-70 min en fonction de la concentration du gel en polyacrylamide) dans un tampon de migration (25mM Tris, 192 mM glycine, 2% SDS).

- Colorations des gels de polyacrylamide

Il existe de nombreux protocoles de coloration des macromolécules présentes dans les gels d'électrophorèse après la migration. Ils sont généralement basés sur la capacité du colorant ou du révélateur utilisé à se lier aux différents groupements chimiques des macromolécules dans les différentes conditions physico-chimiques du protocole (pH, saturation en sels, luminosité,...). Alors que certaines colorations sont spécifiques des groupements acides (Bleu Alcian, Stains-All), d'autres permettent de révéler les composés dithiols des sucres (acide périodique/réactif de schiff, PAS), ou encore les groupements aromatiques des acides aminés aromatiques (Bleu de Coomassie). Il est généralement préconisé de diversifier les types de colorations mise en œuvre afin de révéler les différents composés présents dans les

matrices organiques de coquilles de mollusques. En effet, certaines protéines extraites des coquilles de mollusque, de par l'originalité de leur composition en acides aminés, réagissent mal avec les colorations classiquement utilisés pour les extraits de tissus non-minéralisés.

La coloration au bleu de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue, CBB) est la coloration la plus classiquement utilisée pour révéler les protéines. Le colorant se lie par interactions ioniques avec les groupements chargés positivement des acides aminés. Cette méthode est spécifique de l'arginine, la lysine, l'histidine, le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine (par ordre décroissant d'affinité) et ne convient pas à l'observation des protéines qui contiennent peu d'acides aminés basiques. Il existe différents protocoles de coloration au bleu de Coomassie (R-250, colloïdale ou G-250, en solution aqueuse) de sensibilité et de rapidité de mise en œuvre variable. Dans ce travail, nous avons préférentiellement utilisé la coloration avec le Bleu de Coomassie G-250 Biosafe (Bio-Rad, Hercules, USA).

La coloration au nitrate d'argent (Morrissey, 1981) est sans doute la technique la plus sensible pour révéler les macromolécules sur gel. Elle colore en ocre, brun, gris, noir les composés acides de façon plus ou moins intense en fonction de la quantité de matériel biologique, mais aussi du temps de révélation. Notons cependant que malgré ces avantages en sensibilité de détection, les colorations obtenues sont peu reproductibles d'une expérimentation à l'autre et que certaines protéines très acides peuvent colorer 'négativement' lorsqu'elles sont en quantité importante dans le gel.

La coloration au bleu Alcian (Lev & Spicer, 1964) est spécifique des groupements acides. Sa spécificité dépend du pH auquel elle est mise en œuvre, car elle révèle les protéines ou les sucres qui sont chargés négativement à un pH donné. Réalisé à pH 1, cette coloration est alors spécifique des sucres sulfatés qui, à notre connaissance, sont les seuls à porter des groupements chargés à un tel pH. Lorsque la coloration est effectuée à pH 3, elle révèle aussi bien les sucres acides (*e.g.* sulfatés, sialiques, ...), que les acides aminés chargés négativement (acides aspartique et glutamique).

La couleur magenta obtenue à l'aide du protocole à l'acide périodique/réactif de Schiff (PAS), est spécifique des groupement diols de la majorité des sucres associés aux protéines (Zacharius *et al.*, 1969). Après migration, le gel est rincé deux fois 30 min dans une solution d'acide acétique 10%, puis oxydé dans une solution d'acide périodique 2% (1 h, dans le noir).

Le gel est alors incubé (1 h dans le noir) dans la solution de coloration de Schiff (Sigma-Aldrich, USA), avant d'être décoloré dans des bains successifs d'acide acétique 7% (dans le noir).

La coloration au « Stains-All » (1-éthyl-2-[3-(1-éthyl-napto[1,2d]thiazolin-2-ylidène)-2-méthylpropenyl] naphto[1,2d] thiazolium bromide) a été effectuée selon le protocole établi par Campbell et ses collaborateurs (1983). Cette coloration très sensible permet de colorer les protéines « classiques » en rouge (coloration ténue qui disparaît à la lumière) et les protéines qui potentiellement peuvent lier le calcium en une teinte bleu turquoise caractéristique ; certaines protéines acides pouvant aussi apparaître colorées en bleu foncé. Après migration, le gel est rincé deux fois 1 h dans une solution d'isopropanol 25%. Le gel est ensuite incubé 4 h, dans le noir, dans la solution de coloration fraîchement préparée (isopropanol 25%, formamide 7,5%, 30 mM Tris pH 8,8 et 0,0025% Stains-All), avant d'être décoloré dans plusieurs bains successifs d'eau ultra-pure (dans le noir). Le gel est alors rapidement numérisé car cette coloration disparaît à la lumière.

4 - Test d'interaction avec le carbonate de calcium

- Détection des calciprotéines

Après électro-transfert des protéines sur membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF) suivant le protocole de Matsudaira (1987) (voir plus bas dans la partie Western-blot) la membrane est incubée 3 fois 30 min dans un tampon de saturation (imidazole 10 mM, KCl 60 mM, MgCl₂ 5 mM dans une solution de TRIS-HCl pH 6.8 à 30 mM) selon le protocole de Maruyama et collaborateurs (1984). Ce tampon sature les sites de fixation des cations bivalents non-spécifiques du calcium permettant ainsi de ne révéler par la suite que les calciprotéines capables de fixer le calcium *in vitro*. La membrane est ensuite incubée 30 min dans le même tampon supplémenté par du ⁴⁵CaCl₂ (1 µCi/mL soit 1,4 µM). Elle est ensuite rincée 2 fois 2 min dans une solution d'éthanol 50%. La membrane est ensuite séchée et exposée contre un film (X-Omat, Kodak), pendant une semaine, avant développement. La Troponin C (Ref. T1771; Sigma-Aldrich, USA) ou la calmoduline (Ref. P2277; Sigma-Aldrich, USA) sont utilisées comme témoin positif de la capacité à lier le calcium *in vitro* des protéines.

- Test pH-métrique d'inhibition de la précipitation du CaCO_3

Nous avons testé la capacité de la matrice acido-soluble à inhiber la précipitation du carbonate de calcium *in vitro* en observant (en présence ou non de matrice) les changements de pH dus à l'acidification d'une solution lorsque les ions Ca^{2+} et HCO_3^- précipitent, en relarguant un proton (Wheeler *et al.*, 1981). Trois millilitres d'une solution de CaCl_2 40 mM sont rapidement ajoutés à 3 mL d'une solution de NaHCO_3 40 mM contenant différentes quantités de matrice soluble (1–100 μg). Pour chaque expérimentation, le pH a été enregistré en continu à l'aide d'une électrode couplée à un pH-mètre (model GLP21 ; Crison, France) et reliée à un ordinateur pour l'enregistrement des mesures. Chaque concentration a été testée en triplicat et le résultat correspond à la moyenne des 3 courbes obtenues. L'expérience du contrôle négatif (le blanc) a été effectuée en absence complète de matrice et le contrôle positif a été réalisé avec 10 μg de poly-L-acide aspartique (Sigma).

- Test d'interférence de cristallisation du CaCO_3 par diffusion de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$

Cette technique, simple à mettre en œuvre, est couramment utilisée pour observer les effets des composés organiques extraits de biominéraux sur la cristallisation du carbonate de calcium en solution *in vitro* (Addadi & Weiner, 1985). Les vapeurs de carbonate d'ammonium se décomposent progressivement en dioxyde de carbone et en ammonium qui diffusent alors dans une solution de chlorure de calcium et entraîne la lente précipitation du CaCO_3 . Alors que le CO_2 se transforme en solution en ions carbonates et bicarbonates, les ions ammonium en solution entraînent une augmentation du pH, ce qui permet de stabiliser les ions CO_3^{2-} qui interagissent alors avec les ions Ca^{2+} pour précipiter. Cinq cents microlitres d'une solution de CaCl_2 7,5 mM contenant différentes quantités de matrice organique (0-20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) sont injectés dans des cellules de cultures de 1 cm de côtés, elles-mêmes placées dans un dessiccateur en présence de cristaux de carbonate d'ammonium. Après une incubation de 48 h à 4°C, les cristaux sont rapidement séchés et recouverts d'une fine couche de carbone, avant d'être observés au MEB (comme précédemment décrit).

- Anhydrase carbonique

L'anhydrase carbonique (CA, carbonic anhydrase) est une metallo-enzyme ubiquiste présente aussi bien chez les eucaryotes, les procaryotes et les eubactéries, qui catalyse de façon réversible l'hydratation du CO_2 , $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$. Elle joue un rôle essentiel dans la régulation de la balance acido-basique des cellules et dans les mécanismes de transport des ions CO_2 et carbonates. De plus, elle est impliquée dans des mécanismes essentiels de la

biominéralisation du carbonate de calcium (Wilbur & Jodrey, 1955). Afin de détecter et de quantifier cette activité au sein des matrices organiques extraites des biominéraux, nous avons miniaturisé le test colorimétrique développé par Maren (1960).

Les mesures ont été effectuées à 4°C, sous un flux constant de CO₂. Quatre cents microlitres de rouge de phénol (12.5 mg/L dans une solution de NaHCO₃ 2,6 mM) ont été ajoutés à 300 µL d'eau ultra-pure contenant l'échantillon. La réaction débute lorsqu'on ajoute à cette solution 100 µL de tampon carbonate fraîchement préparé (Na₂CO₃ 0,6 M ; NaHCO₃ 0,4 M) ; on mesure alors l'intervalle de temps que met la solution pour passer du rouge pourpre au jaune pâle. Ce changement de couleur traduit le changement pH de la solution (de 8,3 à 7,2), résultant de la production de protons par la réaction catalysée par l'enzyme ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$). L'unité d'activité enzymatique a été déterminée en fonction de l'équation : Unité Enzymatique (EU) = $(T_0 - T) / T$; quand T et T₀ sont les temps de réaction nécessaires au changement de pH en présence et en absence de catalyseur, respectivement. L'acétazolamide a été utilisée comme inhibiteur spécifique de la réaction et une inactivation par la chaleur (100°C, 10 min) a été réalisée pour les différentes matrices testées.

5 - Immunolocalisation

- Production d'anticorps polyclonaux chez le lapin

La production d'anticorps polyclonaux de lapin a été réalisée par la société Covalab (Lyon, France). Le programme d'immunisation comprend 3 injections de 100 µg d'extrait protéique sur 56 jours. L'antigène est émulsifié dans de l'adjuvant de Freund pour la première immunisation et dans de l'adjuvant incomplet pour les injections suivantes. Des prélèvements sanguins sont réalisés avant injection (sérum préimmun) et 30 et 50 jours après la première injection. L'animal est sacrifié à 60 jours et l'ensemble du sang est alors collecté. Le sang prélevé est laissé à coaguler pendant 30 min à 37°C, puis est conservé à 4°C pendant la nuit. Le caillot formé est alors éliminé après centrifugation de 15 min à 1000 g à 4°C. Le sérum est ensuite centrifugé une deuxième fois pour enlever les dernières impuretés puis est stocké à 4°C, différents aliquots étant par ailleurs conservés à -80°C.

- Test ELISA

Cette technique au principe astucieux permet de détecter et de doser un antigène dans un échantillon, ou aussi bien de déterminer le titre d'un anticorps grâce à la détection par un anticorps couplé à une enzyme. L'antigène est incubé 30 min à 37°C dans une plaque 96-puits spécialement conçue pour les mesures au spectrophotomètre. Les échantillons sont déposés en

triplicats, la quantité d'antigène étant fixée ou inconnue. Après avoir retiré la solution contenant les antigènes des puits, les antigènes adsorbés au plastique de la plaque sont incubés 1,5 h à 37°C dans une solution de blocage (TBS/gélatine 1%). Après avoir retiré la solution de blocage, les antigènes sont incubés 1,5 h à 37°C avec les anticorps primaires de lapin dirigés contre l'antigène (en quantité fixe si l'on veut doser un antigène ou variable si l'on veut tester le titre de l'anticorps par rapport à des quantités fixées d'antigène). Les puits sont alors rincés 5 fois avec une solution de TBS/Tween20 0,5%, avant d'être incubés 1,5 h à 37°C avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-lapin couplé à une enzyme, la phosphatase alcaline. Après avoir rincé 5 fois les puits avec une solution de TBS/tween20 0,5%, l'activité phosphatase alcaline est alors révélée par ajout d'une solution de réaction (100 mM Tris-HCl pH 9,5, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,3 mg.ml⁻¹ BCIP et 0,15 mg.ml⁻¹ NBT) et mesurée à 495 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de multiplaque 96-puits. Des expériences témoins sont réalisées sans anticorps primaire ou en utilisant à la place de l'anticorps primaire un sérum préimmun non dilué.

- Western-blot

Après migration SDS-PAGE en conditions dénaturantes, les protéines sont transférées sur une membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF) suivant le principe décrit par Matsudaria (1987). Les protéines sont chargées négativement et soumises à un champ électrique qui va permettre leur migration de la cathode vers l'anode, les décrochant ainsi du gel et les transférant sur la membrane qui va les retenir.

Le gel est incubé 15 min dans du tampon de transfert (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% méthanol). Une membrane de PVDF (Immobilon™) est mise en contact avec le gel, après hydratation au méthanol 100% et rinçage au TG/20%-méthanol. Le transfert des protéines est réalisé par application d'un courant de 120 mA, pendant 90 min.

Après transfert, la membrane est incubée dans un tampon de blocage (TBS, 1% gélatine) permettant de limiter la fixation aspécifique des anticorps. La membrane est ensuite incubée 1,5h à température ambiante dans un tampon de TBS (0,1% gélatine, 0,5% Tween20) contenant le premier anticorps primaire (IgG de souris anti-épitope d'intérêt, dilué selon le titre approprié). Après 5 rinçages de 10 min (minimum) dans du TBS/0,5%-Tween20, la membrane est incubée 90 min dans un tampon de TBS (0,1% gélatine, 0,5% Tween20) contenant le second anticorps (IgG de chèvre anti-souris couplé à une peroxydase, dilué au 1/12000ème). Après 5 rinçages de 10 min (minimum) dans du TBS/0,5%-Tween20, la membrane est incubée 5 min dans le noir dans une solution contenant du luminol, du

peroxyde d'hydrogène, ainsi que de l'acide pécoumarique. La membrane est alors révélée par incubation dans le noir avec un film photo X-Omat (Kodak®). Un témoin sans anticorps primaire ainsi qu'un témoin utilisant un sérum préimmun non dilué à la place de l'anticorps primaire sont réalisés.

6 - Purification des macromolécules des matrices

- Electrophorèse préparative

Les matrices organiques de coquille de mollusque ont été fractionnées par électrophorèse préparative (8% de poly-acrylamide) d'après le protocole décrit par Marin et ses collaborateurs (2001). Vingt milligrammes de matrice sont incubés 5 min à 100°C dans 4 ml de tampon de dénaturation de Laemmli. La matrice a ensuite été déposée au sommet d'un gel préparatif discontinu (Bio-Rad, model 491 Prep Cell) pour électrophorèse à 250V. Les protéines ont été éluées à la vitesse de 0,5 ml.min⁻¹ et 80 fractions de 5ml ont ainsi été collectées. Un aliquot de 100 µl de chacune des fractions a ensuite été déposé sur une membrane PVDF, afin d'être testés par dot-blot (Bio-Blot apparatus, Bio-Rad). Afin de détecter les fractions contenant les protéines d'intérêt, la membrane a ensuite été incubée avec un anticorps spécifique de certaines des protéines de la matrice puis avec un anticorps secondaire, (chèvre anti-lapin couplé à une peroxydase) avant d'être révélée au contact d'un film Kodak (voir partie description de l'incubation de la technique du Western-blot). Les tubes contenant différentes fractions de la même protéine ont été regroupés, puis dialysés abondamment avant d'être lyophilisés et pesés. La pureté des protéines ainsi purifiées est testée sur gels SDS-PAGE colorés au nitrate d'argent.

- Electrophorèse 2-D

Une électrofocalisation suivie d'une électrophorèse de type SDS-PAGE permet de séparer les macromolécules des matrices en fonction de leurs points isoélectriques (pI) respectifs, dans la première dimension, horizontale, ainsi que de leurs masses moléculaires apparentes, dans la deuxième dimension, verticale.

Des bandes de gel de focalisation à pH immobilisé (IPG strips de 7 cm de pH linéaire 3-10, Bio-Rad®) sont réhydratées dans 150 µl de tampon d'hydratation contenant 80-100 µg de protéines dans un tampon d'hydratation (urée 6M, thiourée 2M, CHAPS 4%, DTT 20 mM, 0,1% d'ampholytes pH 3-10 et 0,001% de bleu de bromophénol), pendant 12-16 h dans un courant de 50V (20°C). Les bandes de gel sont ensuite soumises à une tension de 250V pendant 15 min, suivi d'une étape de focalisation à 8000V, jusqu'à accumulation de

10000V.h. Après électro-focalisation, les gels sont immédiatement équilibrés pendant 10 min dans un tampon d'équilibration (urée 6M, SDS 2%, Tris/Hcl 375 mM pH 8,8, glycérol 20%) contenant 130 mM de DTT, puis 10 min dans le même tampon contenant 135 mM d'iodoacétamine. Les bandes de gel sont ensuite brièvement rincées 10s dans un bain de Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,1% (tampon TGS), puis sont placées au sommet de gels SDS-PAGE précoulés 4-10% NuPAGE® bisTris Novex (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) et fixé par une solution tiède d'overlay contenant 0,5% d'agarose dans du TGS. L'électrophorèse est conduite à 200V pendant 40 min ; les gels sont ensuite directement colorés ou transférés sur une membrane de PVDF comme décrit précédemment.

7 - Analyse par spectrométrie de masse

- ESI MS- MS/MS

La spectrométrie de masse simple (MS) est une technique de détection extrêmement sensible qui permet de déterminer la masse précise d'un composé (au 1/10ème de Dalton près). Elle consiste à irradier les molécules à analyser, ce qui provoque leur désorption (passage à l'état gazeux) et leur ionisation (acquisition d'une charge). À la sortie de la grille, les ions ont une énergie cinétique égale à leur énergie potentielle d'accélération, elle-même proportionnelle à la masse des ions. La vitesse de sortie va donc être inversement proportionnelle à la racine carrée de la masse de chacun des ions, ce qui permet de séparer ces ions selon leur rapport masse/charge (noté m/z).

Une variante de la spectrométrie de masse simple (MS) consiste à utiliser la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) après fragmentation d'un ion préalablement sélectionné, ce qui peut permettre de reconstituer partiellement la structure primaire d'une molécule. Lors de cette étude, les expériences ont été réalisées sur un spectromètre ESI-QqTOF (QSTAR PULSAR, Applied biosystems) en mode nanospray. La source nanospray permet d'étudier des petits volumes d'échantillon (1-2 μ L). L'ionisation a été réalisée en mode positif avec une tension accélératrice de 800 V. L'énergie de collision pour les expériences MS/MS a été appliquée à partir de tensions excitatrices de 10 à 50 V.

Les échantillons ont été observés après réduction/alkylation et hydrolyse avec de la trypsine, une enzyme qui coupe spécifiquement les liaisons peptidiques en N-terminal des résidus K et R. L'observation par MS de ces échantillons permet d'observer la carte de digestion tryptique (peptide mass finger-print, PMF) des composés analysés. Cette cartographie des peptides digérés est spécifique à chaque composé. L'interrogation des

banques de données par des logiciels dédiés, de type MASCOT (<http://www.matrixscience.com>), permet de comparer la signature PMF des composés analysés avec celles de toutes les protéines/transcrits/gènes/ORFs déjà caractérisés. Cette approche permet d'identifier une protéine dans un échantillon si, et seulement si, celle-ci est déjà connue des banques de données.

L'analyse des échantillons en mode MS/MS permet d'isoler les différents peptides issus de la digestion trypsique afin d'observer individuellement leurs spectres d'ionisation, après fractionnement en phase gazeuse. Il est important de noter que l'enzyme utilisée et les conditions d'hydrolyse sont optimisées afin de limiter au maximum l'autolyse de la trypsine. Le principe du fractionnement des peptides permet d'observer les ions (principalement les ions *a*, *b* et *y*) et de retracer ainsi par une lecture de proche en proche la séquence en acides aminés de ces peptides (voir exemples dans les articles présentés précédemment). Ce principe de détermination de la séquence d'un peptide par lecture de son spectre MS/MS est appelé 'séquençage interne *de novo*'. L'utilisation d'outil bioinformatique permet également de comparer les spectres MS/MS obtenus expérimentalement avec ceux simulés à partir des séquences des protéines des banques de données (cette approche ne permettant également que d'identifier des séquences déjà connues).

Les nouvelles séquences obtenues par séquençage *de novo* interne sont comparées à l'aide d'outil bioinformatique du type BLAST (www.expasy.org/tools/blast.html) avec toutes les séquences des protéines (caractérisées ou putatives) présentes dans les banques de données. Cette approche rapide, et sans *a priori*, peut permettre d'identifier par homologie les nouvelles séquences en présentant leurs similitudes avec d'autres familles de protéines déjà décrites. Cependant, dans le cas des protéines de matrice calcifiante de mollusques, il est parfois difficile de trouver des homologies significatives avec des protéines déjà décrites ; souvent, dans ce cas là, aucune identification significative ne peut être obtenue. Cependant, il est toutefois possible de comparer les nouvelles séquences avec celles des protéines de coquille de mollusque déjà caractérisées (revue dans Marin *et al.*, 2008). On effectuera alors des alignements 2 à 2 (www.expasy.org/tools/sim.html) entre ces nouvelles séquences et la soixantaine d'autres séquences déjà décrites, afin d'en dégager des similitudes.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

-A-

Adamkewicz S. L., Harasewych M. G., Blake J., Saudek D. & Bult C. J. (1997) A molecular phylogeny of the bivalve molluscs. *Mol. Biol. Evol.* **14**, 619-629.

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

Addadi L., Raz S. & Weiner S. (2003). Taking advantage of disorder: amorphous calcium carbonate and its roles in biomineralization. *Adv. Mater.* **15**, 959-970.

Addadi L., Joester D., Nudelman F. & Weiner S. (2005) Mollusk shell formation: a source of new concepts for understanding biomineralization processes. *Chem. Eur. J.* **12**, 980-987.

Addadi L., Politi Y., Nudelman F. & Weiner S. (2008) Biomineralization design strategies and mechanisms of mineral formation : operating at the edge of instability. In *Engineering of cristalline materials properties* (J. J. Novoa *et al.* Eds), Springer, Germany, pp.1-15.

Addadi L. & Weiner S. (1985) Interactions between acidic proteins and crystals : stereochemical requirements in biomineralization. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **82**, 4110-4114.

Addadi L. & Weiner S. (1989) Stereochemical and structural relations between macromolecules and crystals in biomineralization, In *Biomineralization - Chemical and Biological Perspectives*, VCH Press, New York, pp. 133-156.

Addadi L., Joester D., Nudelman F. & Weiner S. (2005) Mollusk shell formation: a source of new concepts for understanding biomineralization processes. *Chem. Eur. J.* **12**, 980-987.

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

Albeck S., Weiner S. & Addadi L. (1995) Polysaccharides of intracrystalline glycoproteins modulate calcite crystal growth. *Chem. Eur. J.* **2**, 278-284.

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

Albeck S., Weiner S. & Addadi L. (1996b) Polysaccharides of intracrystalline glycoproteins modulate calcite crystal growth in vitro, *Chem. Eur. J.* **2**, 278-284.

Aldridge D. C. (1999) The morphology, growth and reproduction of Unionidae (Bivalvia) in a fenland waterway. *J. Moll. Stud.* **65**, 47-60.

Arnold J. M., Mutvei H., Landman N. H. & Kuzirian A. M. (1990) Microstructure of the embryonic shell of *Nautilus belauensis* (Cephalopoda): evidence from oxygen plasma etching. *Am. Mus. Novitates* **2974**, 9 pp.

Atlan G., Balmain N., Berland S., Vidal B. & Lopez E. (1997) Reconstruction of human maxillary defects with nacre powder: histological evidence for bone regeneration. *C. R. Acad. Sci. Paris* **320**, 253-258.

Auclair A. C., Lecuyer C., Bucher H. & Sheppard S. M. F. (2004) Carbon and oxygen isotope composition of the *Nautilus macromphalus* : a record of thermocline waters of New Caledonia. *Chem. Geol.* **207**, 91-100.

Ayala F. J., Rzhetsky A. & Ayala F. J. (1998) Origin of the metazoan phyla: molecular clocks confirm paleontological estimates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 606-611.

-B-

Balmain J., Hannoyer B. & Lopez E. (1999) Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and X-ray diffraction analyses of the mineral and organic matrix during heating of mother of pearl (nacre) from the shell of the mollusc *Pinctada maxima*. *J. Biomed. Mater. Res. Applied Mat.* **48**, 749-754.

Barbosa I., Garcia S., Barbier-Chassefière V., Caruelle J.-P., Martelly I. & Papy-Garcia D. (2003) Improved and simple micro assay for sulfated glycoaminoglycans quantification in biological extracts and its use in skin and muscle tissue studies. *Glycobiology* **13**, 647-653.

Bédouet L., Schuller M.-J., Marin F., Milet C., Lopez E. & Giraud, M. (2001) Soluble proteins of the nacre of the giant oyster *Pinctada maxima* and of the abalone *Haliotis tuberculata*: extraction and partial analysis of nacre proteins. *Comp. Biochem. Physiol. B* **128**, 389-400.

Bédouet L., Rusconi F., Rousseau M., Duplas D., Marie A., Dubost L., Le Ny K., Berland S., Péduzzi J. & Lopez E. (2006) Identification of low molecular weight molecules as new components of the nacre organic matrix. *Comp. Biochem. Physiol. B* **144**, 532-543.

Bédouet L., Marie A., Dubost L., Peduzzi J., Duplat D., Berland S., Puisségur H., Rousseau M., Milet C. & Lopez E. (2007) Proteomics analysis of the nacre soluble and insoluble proteins from the oyster *Pinctada margaritifera*. *Mar. Biotechnol.* **9**, 638-649.

Belcher A. M., Wu X., Christensen R., Hansma P. K., Stucky G. & Morse D. (1996) Control of crystal phase switching and orientation by soluble mollusc-shell proteins. *Nature* **381**, 56-58.

Belefield U. & Becker W. (1991) Embryonic development of the shell of *Biomphalaria glabrata* (Say). *Int. J. Dev. Biol.* **35**, 121-131.

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

Blank S., Arnoldi M., Khoshnavaz S., Treccani L., Kuntz M., Mann K., Grathwohl G. & Fritz M. (2003) The nacre protein perlucin nucleates growth of calcium carbonate crystals. *J. Microsc.* **212**, 280-291.

Bonnaud L., Ozouf-Costaz C. & Boucher-Rodoni R. (2004) A molecular and karyological approach to the taxonomy of Nautilus. *C. R. Biol.* **327**, 133-138.

Borowitzka M. A. (1982) Morphological and cytological aspects of algal calcification. *Int. Rev. Cytol.* **74**, 127-160.

Boullier A., Delance J. H., Emig C. C., d'Hondt J. L., Gaspard D. & Laurin B. (1986) Les populations actuelles de *Gryphus vitreus* (Brachiopoda) en Corse - Implications paléontologiques. In *Les Brachiopodes fossiles et actuels* (Eds. Racheboeuf P. R. & Emig C. C.), Biostratigraphie du Paléozoïque **4**, Université de Bretagne Occidentale, Brest, pp.179-196.

Borelli G., Mayer-Gostan N., Merle P. L., De Pontual H., Boeuf G., Allemand D. & Payan P. (2003) Composition of biomineral organic matrix with a special emphasis on turbot (*Psetta maxima*) otolith and endolymph. *Calcif. Tissue Int.* **72**, 717-725.

Broecker W. S. (1974) *Chemical Oceanography*, Harcourt Brace Jovanovich, New York.

Brown G. & Brindley G.W. (1980) X-ray procedures for clay mineral identification, In *Crystal structures of clay minerals and their X-ray identification* (Eds. Brindley G.W., Brown G.), Mineralogical Society, London, pp. 305-309.

Bruet B. J., Qi H. J., Boyce M. C., Panas R., Tai K., Frick L. & Ortiz C. (2005) Nanoscale morphology and indentation of individual nacre tablets from gastropod mollusc *Trochus niloticus*. *J. Mater. Res.* **20**, 2400-2419.

Brusca R. C. & Brusca G. J. (1990) *Invertebrates*, Sinauer associates Inc., Sunderland, Massachusetts.

Byrne M. (2000) Calcium concretions in interstitial tissues of the australian freshwater mussel *Hyridella depressa*. In *The evolutionary biology of the bivalvia* (Eds. E. M. Harper, J. D. Taylor & J. A. Crame), Geological society, London, special publication 177, pp. 329-337.

-C-

Callil C. & Mansur M. C. D. (2005) Ultrastructural analysis of the shells of *Anodontites trapesialis* (Lamarck) and *Anodontites elongates* (Swainson) (Mollusca, Bivalvia, Etherioidea) from the Mato Grosso Pantanal region, Brazil. *Rev. Bral. Zool.* **22**, 724-734.

Campbell K. P., MacLennan D. H. & Jorgensen A. O. (1983) Staining of the Ca²⁺-binding proteins, calsequestrin, calmodulin, troponin C, and S-100, with the cationic carbocyanin dye "Stains-all". *J. Biol. Chem.* **258**, 11267-11273.

Cariolou M. A. & Morse, D. E. (1988) Purification and characterization of calcium-binding conchiolin shell peptides from the mollusc, *Haliotis rufescens*, as a function of development. *J. Comp. Physiol. B* **157**, 717-729.

Carter J.G. (1990) Skeletal biomineralization: patterns, processes and evolutionary trends, Van Nostrand Reinhold, New York.

- Carter J. G. & Clark G. R. II (1985) Classification and phylogenetic significance of mollusk shell microstructures. In *Mollusk, Note for a Short Course* (Ed. T. W. Broadhead), Studies in Geology 13, Dpt. of Geological Sciences, University of Tennessee Press, Tennessee, pp. 50-71.
- Chateigner D., Hedegaard C., & Wenk H. (2000) Mollusc shell microstructures and crystallographic textures. *J. Struct. Geol.* **22**, 1723-1735.
- Checa A. (2000) A new model for periostracum and shell formation in Unionidae (Bivalvia, Mollusca). *Tissue Cell* **32**, 405-416.
- Checa A. & Rodriguez-Navarro A. (2000) Geometrical and crystallographic constraints determine the self-organization of shell microstructures in Unionidae (Bivalvia, Mollusca). *Proc. R. Soc. Lond. B* **268**, 771-778.
- Checa A., Jiménez-Lopez C., Rodriguez-Navarro A. & Machado J. P. (2006) Precipitation of aragonite by calcitic bivalves in Mg-enriched marine waters. *Mar. Biol.* **150**, 819-827.
- Checa A. G., Okamoto T. & Ramirez J. (2006) Organization pattern of nacre in Pteriidae (Bivalvia : Mollusca) explained by crystal competition. *Proc. R. Soc. Lond. B* **273**, 1329-1337.
- Chétail M. & Fournier J. (1969) Shell-boring mechanism of the gastropod, *Purpura* (Thais) *lapillus*: a physiological demonstration of the role of carbonic anhydrase in the dissolution of CaCO₃. *Am. Zool.* **1969**, 9, 983-990.
- Clark II G. R. (1999) Organic matrix taphonomy in some molluscan shell microstructures. *Paleogeogr. Paleocl. Paleoecol.* **149**, 305-312.
- Cohen B. L. (2006) Brachiopoda. *Encycl. Life Sci.*, 1-8.
- Cohen B. L. & Gawthrop A. B. (1996) Brachiopod molecular phylogeny, In *Third international brachiopod congress* (Eds. Cooper P. & Jin J.), Sudbury Canada, pp. 73-80.
- Collins M. J., Curry G. B., Muyzer G., Quinn R., Zomerdijk T. & Westbroek P. (1988) Serotaxonomy of skeletal macromolecules in living terebratulid brachiopods. *Histor. Biol.* **1**, 207-224.
- Collins M. J., Muyzer G., Curry G. B., Sandberg P. & Westbroek P. (1991) Macromolecules in brachiopod shells: characterization and diagenesis. *Lethaia* **24**, 387-397.
- Cope J. C. W. (1996) The early evolution of the bivalvia, in *Origin and Evolutionary Radiation of the Mollusca* (ed. Taylor J. D.), Oxford University Press, Oxford, pp. 361-370.
- Crenshaw M. (1972) The soluble matrix of *Mercenaria mercenaria* shell, *Biomineral. Res. Rep.* **6**, 6-11.
- Crenshaw M. & Ristedt H. (1975) Histochemical and structural study of nautiloid septal nacre. *Biomineral. Res. Rep.* **8**, 1-8.

Crenshaw M. & Ristedt H. (1976) The histochemical localization of reactive groups in septal nacre from *Nautilus pompilius*. In *The Mechanisms of Mineralization in the Invertebrates and Plants* (Eds. N. Watabe & K.M. Wilbur, Editors), University of South Carolina Press, Colombia, pp. 355–367.

Crick R. E., Burkart B., Chamberlain J. A. & Mann K. O. (1985) Chemistry of calcified portions of *Nautilus pompilius*. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* **65**, 415-420.

Cuif J.-P., Denis A. & Gaspard D. (1981) Recherche d'une méthode d'analyse ultrastructurale des tests carbonatés d'invertébrés. *Bull. Soc. Géol. France* **9**, 525-534.

Cummings K. S. & Mayer C. A. (1992) *Field guide to freshwater mussels of the Midwest*, Illinois Natural History Survey Manual 5, 194 pp.

Cusack M., Curry G. B., Clegg H. & Abbott G. (1992) An intracrystalline chromoprotein from red brachiopod shells: implications for the process of biomineralization. *Comp. Biochem. Physiol. B* **102**, 93-95.

Cusack M., Walton D. & Curry G. B. (1997) Shell Biochemistry. In *Treatise on Invertebrate Paleontology, Brachiopoda* (Eds. Kaesler R.L.), University of Kansas Press and the Geological Society of America, Kansas. pp.243-266.

Curry G. B., Cusack M., Endo K., Walton D. & Quinn R (1991) Intracrystalline molecules from brachiopod shells. In *Biomineralization '90, Mechanisms and phylogeny of mineralization in biological systems* (Eds. Suga S. & Nakahara N.), Springer-Verlag, Tokyo, pp.35-39.

-D-

Dang C., Shin C., Bell W., Nagaswami C. & Weisel J. (1989) Fibrinogen sialic acid residues are low affinity calcium-binding sites that influence fibrin assembly. *J. Biol. Chem.* **264**, 15104-15108.

Dauphin Y. (2003). Soluble organic matrices of the calcitic prismatic shell layers of two pteriomorphid bivalves. *J. Biol. Chem.* **278**, 15168-15177.

Dauphin Y. (2006) Structure and composition of the septal nacreous layer of *Nautilus macromphalus* L. (Mollusca, Cephalopoda). *Zoology* **109**, 85-95.

Dauphin Y., Cuif J.-P., Doucet J., Salomé M., Susini J. & Williams C. T. (2003) *In situ* chemical speciation of sulfur in calcitic biominerals and simple prism concept. *J. Struct. Biol.* **142**, 272-9280.

Dauphin Y. & Marin F. (1995) The compositional analysis of recent cephalopod shell carbohydrates by Fourier Transform InfraRed Spectrometry and High Performance Anion Exchange-Pulsed Amperometric Detection. *Experientia* **51**, 278-283.

Dauphin Y., Williams C. T. & Braskov I. S. (2007) Aragonitic rostra of the turonian belemnite *Goniocamax*: arguments from diagenesis. *Acta Palaeontol. Pol.* **52**, 85-97.

Degens E. T. & Spencer D. W. (1967) Paleochemistry of molluscan shell proteins. *Comp. Biochem. Physiol. B* **20**, 553-579.

Degens E.T., Johannesson B.W. & Meyer R.W. (1967) Mineralization progresses in molluscs and their paleontological significance. *Naturewissenschaften* **24**, 638-640.

De Jong E. W., Bosch L. & Westbroek P. (1976) Isolation and characterization of a Ca²⁺-binding polysaccharide associated with coccoliths of *Eumiliana huxleyi* (Lohmann) Kemptner. *Eur. J. Biochem.* **70**, 611-621.

Deman, J., Mareel, M. & Bruyneel, E. (1973) Effects of calcium and bound sialic acid on the viscosity of mucin. *Biochim. Biophys. Acta* **297**, 486-490.

Didymus J., Oliver P., Mann S., DeVries A., Hauschka P. & Westbroek P. (1993) Influence of low-molecular-weight and macromolecular organic additives on the morphology of calcium carbonate. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **98**, 2891-2900.

Dionex Corp. (1993) Analysis of carbohydrates by high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAE-PAD). *Technical note* **20**, 1-6, Sunnyvale, CA.

Dionex Corp. (2000) Analysis of sialic acids using high-performance anion-exchange chromatography. *Technical note* **41**, 1-8, Sunnyvale, CA.

Domingo A., Gonzales-Jurado J., Maroto M., Diaz C., Vinos J., Carrasco C., Cervera M. & Marco R. (1998) Troponin-T is a calcium-binding protein in insect muscle: *in vivo* phosphorylation, muscle-specific isoforms and developmental profile in *Drosophila melanogaster*. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **19**, 393-403.

Donachy J. E., Drake B. & Sikes C. S. (1992) Sequence and atomic-force microscopy analysis of a matrix protein from the shell of the oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol.* **114**, 423-428.

Douglas S. D., Isenberg H. D., Lavine L. S. & Spicer S. S. (1967) Correlation between the presence of sulphated polysaccharides and mineralization in a marine coccolithophorid protozoon: histochemical and autoradiographic studies. *J. Histochem. Cytochem.* **15**, 285-291.

Durholtz M.D., Kretsinger R. H. & Lipinski M. R. (1999) Unique protein from the statoliths of *Loliguncula brevis* (Cephalopoda : Loliginidae). *Comp. Biochem. Physiol. B*, **123**, 381-488.

-E-

Edge A. S. B., Faltynek C. R., Hof L., Reichert L. E. & Weber P. (1981) Deglycosylation of glycoproteins by trifluoromethanesulfonic acid. *Anal. Biochem.* **118**, 131-137.

Edge A. S. (2003) Deglycosylation of glycoproteins with trifluoromethanesulphonic acid: elucidation of molecular structure and function. *Biochem. J.* **376**, 339-350.

Ellis A. E. (1978) British freshwater bivalve Mollusca, London: The Linnean Society of London, Academic Press.

Erben H. K. (1972). Über die Bildung und das Wachstum von Perlmutter. *Biomineralization* **4**, 15-46.

-F-

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

Farach-Carson M., Carson D., Collier J., Lennarz W., Park H. & Wright G. (1989) A calcium-binding, asparagin-linked oligosaccharide is involved in skeleton formation in the sea urchin embryo. *J. Cell Biol.* **109**, 1289-1299.

Fedonkin M.A. & Waggoner B.M. (1997) The late Precambrian fossil *Kimberella* is a mollusc-like bilaterian organism. *Nature* **388**, 868.

Feng Q. L., Pu G., Pei Y., Cui F. Z., Li H. D. & Kim T. N. (2000) Polymorph and morphology of calcium carbonate crystals induced by proteins extracted from mollusk shell. *J. Cryst. Growth* **216**, 459-465.

Feng W. & Sun W. (2003) Phosphate replicated and replaced microstructure of molluscan shells from the earliest Cambrian of China. *Acta Palaeontol. Pol.* **48**, 21-30.

Fournié J. & Chetail M. (1982) Accumulation calcique au niveau cellulaire chez les mollusques. *Malacologia* **22**, 265-284.

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

Fryda J., Weitschat W., Tycova P., Haloda J. & Mapes R. H. (2007) Crystallographic texture of cephalopod nacre: its evolution, time stability and phylogenetic significance, in *7th Intern. Symp. Cephalopods - Present and Past, Abstracts Vol.*, Hokkaido University, Sapporo, pp.56-57.

Fu G., Qiu S. R., Orme C. A., Morse D. E. & De Yoreo J. J. (2005) Acceleration of calcite kinetics by abalone nacre proteins. *Adv. Mater.* **17**, 2678-2683.

-G-

Gaffey S.J. & Bronnimann C.E. (1993) Effect of bleaching on organic and mineral phases in biogenic carbonates. *J. Sed. Petrol.* **63**, 752-754.

Ganss B. & Hoffman W. (1993) Calcium binding to sialic acids and its effect on the conformation of ependymins. *Eur. J. Biochem.* **217**, 275-280.

Gaspard D. (1986) Aspects figurés de la biominéralisation – unités de base de la sécrétion carbonatée chez des Terebratulida actuels. In *Les Brachiopodes fossiles et actuels* (Eds. Racheboeuf P. R. & Emig C. C.), Biostratigraphie du Paléozoïque **4**, Université de Bretagne Occidentale, Brest, pp.18-85.

- Gaspard D. (1988) Sellithyridinae, Terebratulidae du Crétacé d'Europe Occidentale – Dynamique des populations, systématique et évolution. *Cahiers Pal.* **243**, 1-28.
- Gaspard D. (1991) Microstructural organization of the exoskeleton of some Articulate Brachiopods (Terebratulida, Rhynchonellida) – The importance of the calcitic granules and the effect of diagenesis. In *Biomineralization '90, Mechanisms and phylogeny of mineralization in biological systems* (Eds. Suga S. & Nakahara N.), Springer-Verlag, Tokyo, pp.403-407.
- Gaspard D. (1996) Biomineralized structures in Brachiopods and their diagenetic changes through time. In *Biomineralization '93* (Eds. Allemand, D. & Cuif, J.-P.), Bulletin de l'Institut Océanographique de Monaco **14**, Musée Océanographique, Monaco, pp.315-324.
- Gaspard D. (2003) Recent brachiopods collected during the “SEAMOUNT 1” cruise of Portugal and ibero-moroccan gulf (Northeastern Atlantic) in 1987. *Geobios* **36**, 285-304.
- Goffinet G. (1969) Etude au microscope électronique de structures organisées des constituants de la conchioline de nacre de *Nautilus macromphalus* Sowerby. *Comp. Biochem. Physiol.* **29**, 835-839.
- Goffinet G. & Jeuniaux, C. (1979) Distribution et importance quantitative de la chitine dans les coquilles de mollusques. *Cahiers Biol. Mar.* **20**, 341–349.
- Gotliv B. A., Addadi L. & Weiner S. (2003) Mollusk shell acidic proteins: in search of individual functions. *ChemBiochem.* **4**, 522-529.
- Gotliv B. A., Kessler N., Sumerel J. L., Morse D. E., Tuross N., Addadi L. & Weiner S. (2005) Asprich: a novel aspartic acid-rich protein family from the prismatic shell matrix of the bivalve *Atrina rigida*. *ChemBiochem.* **6**, 304-314.
- Graf F. (1978) Les sources de calcium pour les crustacés venant de muer. *Arch. Zool. Exp. Gen.* **119**, 143-161.
- Graf D. L. (2001) A phylogeny perspective on the evolution of the Unionoida (Mollusca, Bivalvia, palaeoheterodonta): using pattern to test hypothesis of macroevolutionary process. *Thesis*, University of Michigan, 271pp.
- Graf D. L. & Cummings K. S. (2006) Palaeoheterodont diversity (Mollusca: Trigonioida + Unionoida): what we know and what we wish we knew about freshwater mussel evolution. *Zool. J. Linn. Soc.* **148**, 343-394.
- Greenaway P. (1971) Calcium regulation in freshwater mollusc *Lymnea stagnalis* (Gastropod: Pulmonata). *J. exp. Biol.* **54**, 609-620.
- Greenfield E., Wilson D. & Crenshaw M. (1984) Ionotropic nucleation of calcium carbonate by molluscan matrix. *Am. Zool.* **24**, 925-932.
- Grégoire C., Duchateau G. H. & Florkin M. (1955) La trame protidique des nacres et des perles. *Ann. Inst. Oceanogr. Monaco* **31**, 1-36.

Grégoire C (1972) Structure of the molluscan shell, In *Chemical zoology* (ed. M Florkin & B Scheer), Vol 7, New York: Academic press, pp. 45-102

Grégoire C. (1987) Ultrastructure of the Nautilus shell. In *Nautilus, the biology and paleontology of a living fossil* (Eds. Saunders W. B. & Landman N. H.), Topics in Geology vol.6, Plenum press, New York, pp. 463-486.

-H-

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

Hare P. E. (1963) Amino acids in the proteins from aragonite and calcite in the shells of *Mytilus californianus*. *Science* **139**, 216-217.

Hare P. E. & Abelson P. H. (1965) Amino acid composition of some calcified proteins. *Carnegie Inst. Wash. Year Book* **64**, 223-234.

Hasegawa Y. & Uchiyama K. (2005) cDNA cloning of shell matrix proteins from scallop shell. *Fish. Sci.* **71**, 1174-1178.

Haszprunar G. (2000) In the Aplacophora monophyletic? A cladistic point of view. *Am. Malac. Bull.* **15**, 115–130.

Hecker A., Testenière O., Marin F. & 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.

Heinemann F. (2005) Nukleation und wachstum von modulierten kalziumkarbonate kristallen durch biopolymere, *Thesis*, Institut of biophysics, University of Bremen.

House M. R. (1988) Major Features of Cephalopod Evolution, In *Cephalopods—Present and Past*, Schweizerbart, Stuttgart, pp. 1–16.

-J-

Jackson A. P., Vincent J. V. F. & Turner R. M. (1988) The mechanical design of nacre. *Proc. R. Soc. Lond.* **234**, 415-440.

Jackson D., McDougall C., Green K., Simpson F., Wörheide G. & Degnan B. (2006) A rapidly evolving secretome builds and patterns a sea shell. *BMC Biol.* **4**, 40-49.

Jackson D. J., Wörheide G. & Degnan B. M. (2007) Dynamic expression of ancient and novel molluscan shell genes during ecological transitions. *BMC Evol. Biol.* **10**, 1-17.

Jolly C., Berland S., Milet C., Borzeix S., Lopez E. & Doumenc D. (2004) Zonal localization of shell matrix proteins in mantle of *Haliotis tuberculata* (Mollusca, Gastropoda). *Mar. Biotechnol.* **6**, 541-551.

Joep M. (1965) Composition of brachiopod shell. In *Treatise on Invertebrate Paleontology, Brachiopoda* (Ed. Moore R.C.), University of Kansas Press and the Geological Society of America, Lawrence, Kansas, pp.156-163.

Joep M. (1967a) The protein of brachiopod shell – I. Amino acid composition and implied protein taxonomy. *Comp. Biochem. Physiol.* **20**, 593-600.

Joep M. (1967b) The protein of brachiopod shell – II. Shell protein from fossil articulates: amino acid composition. *Comp. Biochem. Physiol.* **20**, 601-605.

Joep M. (1973) The protein of brachiopod shell – V. N-terminal end groups. *Comp. Biochem. Physiol. B* **45**, 17-24.

Joep M. (1979) The protein of brachiopod shell – VI. C-terminal end groups and sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis: molecular constitution and structure of the protein. *Comp. Biochem. Physiol. B* **63**, 163-173.

-K-

Källersjö M., von Proschwitz T., Lundberg S., Eldenäs P. & Erséus C. (2005) Evaluation of ITS rDNA as a complement to mitochondrial gene sequences for phylogenetic studies in freshwater mussels: an example using Unionidae from north-western Europe. *Zool. Scripta* **34**, 415-424.

Kasai H. & Ohta N. (1981) Relationship between organic matrices and shell structures in recent bivalves In *Study of molluscan paleobiology* (Eds. Habe T. & Omori M.), Kokusai Insatsu, Tokyo, pp.101-106

Keith J., Stockwell, S., Ball, D., Remillard, K., Kaplan, D., Thannhauser, T. & Sherwood, R. (1993) Comparative analysis of macromolecules in mollusc shells. *Comp. Biochem. Physiol. B* **105**, 487-496.

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

Kim I. W., Morse D. E. & Evans J. S. (2004) Molecular characterization of the 30-AA N-terminal mineral interaction domain of the biomineralization protein AP7. *Langmuir* **20**, 11664-11673.

Kobayashi I. (1991) Evolutionary trends of shell microstructure in bivalve molluscs. In *Mechanisms and Phylogeny of Mineralization in Biological Systems* (S. Suga, and H. Nakahara, Eds.), Springer-Verlag, Tokyo, pp 415-419.

Koene J. M. & Schulenburg H. (2005) Shooting darts: co-evolution and counter-adaptation in hermaphroditic snails. *BMC Evol. Biol.* **5**, 1-13.

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

Kouchinsky A (2000) Shell microstructures in early Cambrian molluscs. *Act. Pal. Pol.* **45**(2), 119-150.

Kunigelis S. C. & Saleuddin A. S. M. (1978) Regulation of shell growth in the pulmonate gastropod *Helisoma duryi*. *Can. J. Zool.* **56**, 1975-1980.

-L-

Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lambert G. & Lambert C. C. (1996). Antibodies to echinoid larval spicule proteins cross react with the spicular complex in the ascidian *Herdmania momus*. *Bull. Inst. Océanogr. Monaco* **14** (4), 253-261.

Landman N. H., Arnold J. M. & Mutvei, H (1989) Description of the embryonic shell of *Nautilus belauensis* (Cephalopoda). *Am. Mus. Novitates* **2960**, 16 pp.

Landman N. H., Rye D. M. & Shelton K. L. (2003) Early ontogeny of eutrephoceras compared to recent nautilus and mesozoic ammonites: evidence from shell morphology and light stable isotopes. *Paleobiology* **9**, 269-279.

Lelong C., Mathieu M. & Favrel P. (2000) Structure and expression of mGDF, a new member of the transforming growth factor- β superfamily in the bivalve mollusc *Crassostrea gigas*. *Eur. J. Biochem.* **267**, 3986-3993.

Lev R. & Spicer S. (1964) Specific staining of sulfate groups with Alcian blue at low pH. *J. Histochem. Cytochem.* **12**, 309.

Levi Y, Albeck S, Brack A, Weiner S & Addadi L (1998) Control over aragonite nucleation and growth: an *in vitro* study of biomineralization. *Chem. Eur. J.* **4**, 389-396.

Levi-Kalishman Y., Falini G., Addadi L. & Weiner S. (2001) Structure of the nacreous organic matrix of a bivalve mollusk shell examined in the hydrated state using cryo-TEM. *J. Struct. Biol.* **135**, 8-17.

Lin A. & Meyers M.A. (2005) Growth and structure in abalone shell. *Mater. Sci. Eng.* **390**, 27-41.

Lindgren A. R., Giribet G. & Nishiguchi M. K. (2004) A combined approach to the phylogeny of Cephalopoda (Mollusca). *Cladistics* **20**, 454-486.

Lindskog S. (1997) Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacol. Ther.* **74**, 1-20.

Liu W., Chen L., Zhu J. & Rodgers G. (2006) The glycoprotein hGC-1 binds to cadherin and lectins. *Exp. Cell Res.* **312**, 1785-97.

Livingston B. T., Killian C. E., Wilt F., Cameron A., Landrum M. J., Ermolaeva O., Sapojnikov V., Maglott D. R., Buchanan A. M. & Etensohn, C. A. (2006). A genome-wide

analysis of biomineralization-related proteins in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev. Biol.* **300**, 335-48.

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

Lowenstam H. A. (1954) Environmental relations of modification compositions of certain carbonate secreting marine invertebrates. *Zool.* **40**, 39-48.

Lowenstam H. A. (1962) Magnetite in denticle capping in recent chitons (Polyplacophora). *Bull. Geol. Soc. Am.* **13**, 435-438.

Lowenstam H. A. & Abbott D. P. (1977) Vaterite: a mineralization product of the hard tissues of a marine organism (Ascodiaceae). *Science* **188**, 363-365.

Lowenstam H. A. & Margulis L. (1980). Evolutionary prerequisites for early Phanerozoic calcareous skeletons. *Biosystems* **12**, 27-41.

Lowenstam H. A., Traub W. & Weiner S. (1984) *Nautilus* hard parts: a study of the mineral and organic constituents. *Palaeobiology* **10**, 268-279.

Lowenstam H. A., and Weiner S. (1989). On Biomineralization. Oxford University Press, New-York.

Lucas J. M. & Knapp L. W. (1996) Biochemical characterization of purified carbonic anhydrase from the octocoral *Leptogorgia virgulata*. *Mar. Biol.* **126**, 471-477

Luquet G. & Marin F. (2004) Biomineralizations in crustaceans: storage strategies. *C. R. Palevol.* **3**, 515-534.

Lutz R. A. & Rhoads D. C. (1977) Anaerobiosis and a theory of growth line formation. *Science* **198**, 1222-1227.

-M-

Ma Z., Huang J., Sun J., Wang G., Li C., Xie L. & Zhang R. (2007) A novel extrapallial fluid protein controls the morphology of nacre lamellae in the pearl oyster *Pinctada fucata*. *J. Biol. Chem.* **282**, 23253-23263.

Machado J., Reis M., Coimbra R. & Sa C. (1991) Studies on chitin and calcification in the inner layers of the shell of *Anodonta cygnea*. *J. Comp. Physiol. B* **161**, 413-418.

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

Mann S. (2001). Biomineralization. Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry. Oxford University Press, Oxford.

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

- Mann K., Siedler F., Treccani L., Heinnemann F. & Fritz M. (2007) Perlinhibin, a cysteine-, histidine, and arginine-rich miniprotein from abalone (*Haliotis laevis*) nacre, inhibits *in vitro* calcium carbonate crystallization. *Biophys. J.* **93**, 1246-1246.
- Marin F., Gillibert M., Westbroek P., Muyer G. & Dauphin Y. (1999) Evolution: disjunct degeneration of immunological determinants. *Geol. Mijnbouw* **78**, 135-139.
- Marin F., Corstjens B., Gaulejac E., De Vring-de Jong E. & Westbroek P. (2000) Mucins and molluscan calcification - 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.
- Marin F., Pereira L. & Westbroek P. (2001) Large-scale fractionation of molluscan shell matrix. *Protein Expr. Purif.* **23**, 175-179.
- Marin F., De Groot K. & Westbroek P. (2003) Screening molluscan cDNA expression library with anti-shell matrix antibodies. *Protein Expr. Purif.*, **30**, 246-252.
- Marin F., Layrolle P., De Groot K. & Westbroek P. (2003) The Origin of metazoan skeleton, In *Biomineralization: Formation, Diversity, Evolution and Application* (Eds. I. Kobayashi & H. Osawa), Tokai University Press, Kanagawa, pp. 50-53
- Marin F., Amons R., Guichard N., Stiger M., Hecker A., Luquet G., Layrolle P., Alcaraz G., Riondet C. & Westbroek P. (2005) Caspartin and Calprismin, two proteins of the shell calcitic prisms of the mediterranean fan mussel *Pinna nobilis*. *J. Biol. Chem.*, **280**, 33895-33908.
- Marin F. & Luquet G. (2004) Molluscan shell proteins. *C. R. Palevol.* **3**, 469-492.
- Marin F. & Luquet G. (2007) Unusually acidic proteins in biomineralization. In *Handbook of Biomineralization, vol 1 : The biology of biominerals structure formation* (Ed. E. Baeuerlein), pp.273-290.
- Marin F., Luquet G., Marie B. & Medakovic D. (2008) Molluscan shell proteins: primary structure, origin and evolution. *Curr. Top. Dev. Biol.* **80**, 209-276.
- Marin F., Smith M., Isa Y., Muzer G. & Westbroek P. (1996) Skeletal matrices, mucin, and the origin of invertebrate calcification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 1554-1559.
- Marin F., Pokroy B., Luquet G., Layrolle P. & De Groot K. (2007) Protein mapping of calcium carbonate biominerals by immunogold. *Biomaterials* **28**, 2368-2377.
- Martoja M. (1995) Mollusque, Institut Océanographique, Monaco.
- Maruyama K., Mikawa T. & Ebashi S. (1984) Detection of the calcium-binding proteins by ⁴⁵Ca: autoradiography on nitrocellulose membrane after sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis. *J. Biochem.* **95**, 511-519.

- Marxen J. & Becker W. (1997) The organic shell matrix of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. *Comp. Biochem. Physiol. B* **11**, 23-33.
- Marxen J., Hammer M., Gehrke T. & Becker, W. (1998) Carbohydrates of the organic shell matrix and the shell-forming tissue of the snail *Biomphalaria glabrata* (Say) *Biol. Bull.* **194**, 231-240.
- Marxen J. C., Becker W., Finke D., Hasse B. & Epple M. (2003) Early mineralization in *Biomphalaria glabrata*: microscopic and structural results. *J. Moll. Stud.* **69**, 113-121.
- Marxen J., Nimtz M., Becker W. & Mann K. (2003) The major soluble 19.6 kDa protein of the organic shell matrix of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* is an N-glycosylated dermatopontin. *Biochim. Biophys. Acta* **1650**, 92-98.
- Matsushiro A., Miyashita T., Miyamoto H., Morimoto K., Tonomura B., Tanaka A. & Sato K. (2003) Presence of protein complex is prerequisite for aragonite crystallization in the nacreous layer. *Mar. Biotechnol.* **5**, 37-44.
- Matshushiro A. & Miyashita T. (2004) Evolution of hard-tissue mineralization: comparison of the inner skeletal system and the outer shell system. *J. Bone Miner. Metab.* **22**, 163-9.
- Matsudaira P. (1987) Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* **262**, 10035-10038.
- Medakovic D., Popovic S., Grzeta B., Plazonic M. & Hrs-Brenko M. (1997) X-ray diffraction study of calcification processes in embryos and larvae of the brooding oyster *Ostrea edulis*. *Mar. Biol.* **129**, 615-623.
- Meenakshi V. R., Donnay G., Blackwelder P. L. & Wilbur K. M. (1974) The influence of substrata on calcification patterns in molluscan shell. *Calcif. Tissue. Res.* **15**, 31-44.
- Meenakshi V. R., Martin A. W. & Wilbur K. M. (1974) Shell repair in *Nautilus macromphalus*. *Mar. Biol.* **27**, 27-35.
- Meyran J. C., Graf F. & Fournié J. (1987) Carbonic anhydrase activity in a calcium-mobilizing epithelium of the crustacean *Orchestia cavimana* during molting. *Histochemistry* **87**, 419-429.
- Michenfelder M., Fu G., Lawrence C., Weaver J., Wustman B., Taranto L., Evans J. & Morse D. (2003) Characterization of two crystal-modulating biomineralization proteins and identification of putative mineral binding domains. *Biopolymers* **70**, 522-533; erratum in *Biopolymers* (2004) **73**, 291.
- Mitchel P. R. & Phakey P. P. (1995) Notes on the microstructure of the Nautilus shell. *Scanning Microsc.* **9**, 215-230.
- Mitsunaga K., Akasaka K., Shimada H., Fujino Y., Yasumasu I. & Numanoi H. (1986) Carbonic anhydrase activity in developing sea urchin embryos with special reference to calcification of spicules. *Cell Differ.* **18**, 257-262.

- Miyamoto H., Miyashita T., Okushima M., Nakano S., Morita T. & Matsushiro A. (1996) A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9657-9660.
- Miyamoto H., Yano M. & Miyashita T. (2003) Similarities in the structure of nacrein, the shell-matrix protein, in a bivalve and a gastropod. *J. Moll. Stud.* **69**, 87-89.
- Miyamoto H., Miyoshi F. & Kohno J. (2005) The carbonic anhydrase domain protein nacrein is expressed in the epithelial cells of the mantle and acts as a negative regulator in calcification in the mollusc *Pinctada fucata*. *Zool. Sci.* **22**, 311-315.
- Miyashita T., Takagi R., Okushima M., Nakano S., Miyamoto H., Nishikawa E. & Matsushiro A. (2000) Complementary DNA cloning and characterization of pearlín, a new class of matrix protein in the nacreous layer of oyster pearls. *Mar. Biotechnol.* **2**, 409-418.
- Miyashita T., Takagi R., Miyamoto H. & Matsushiro A. (2002) Identical carbonic anhydrase contributes to nacreous or prismatic layer formation in *Pinctada fucata* (Mollusca: Bivalvia). *The Veliger* **45**, 250-255.
- Miyashita T., Hanashita T., Toriyama M., Takagi R., Akashika T. & Higashikubo N. (2008) Gene cloning and biochemical characterization of the BMP-2 pf *Pinctada fucata*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 37-47.
- Moore D. M. & Reynolds R. C. (1989) X-ray diffraction and the identification and the analysis of clays minerals. Oxford University Press, Oxford.
- Morrissey J. H. (1981) Silver stains for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.* **117**, 307-310.
- Mount A. M., Wheeler A. P., Paradkar R. P. & Snider D. (2004) Hemocyte-mediated mineralization in the eastern oyster. *Science*, **304**, 297-300.
- Moura G., Vilarinho L., Guedes R. & Machado J. (2000) The action of some heavy metals on the calcification process of *Anodonta cygnea* (Unionidae): nacre morphology and composition changes. *Haliotis* **29**, 43-53.
- Mutvei H. (1980) The nacreous layer in molluscan shells, In *The mechanisms of biomineralization in animals and plants* (Eds. Omori M. & Watabe N.), Proc. 3rd Int. Biomineralization Symp., Tokai University Press, Tokyo, pp. 49-56.
- Myers J. M., Veis A., Sabsay B. & Wheeler A. P. (1996) A method for enhancing the sensitivity and stability of Stains-All for phosphoproteins separated in sodium-dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **240**, 300-302.
- N-
- Nagai K., Yano M., Morimoto K. & Miyamoto H. (2007) Tyrosinase localization in mollusc shells. *Comp. Biochem. Physiol.* **146**, 207-214.

Nakahara H. (1983) Calcification of gastropod nacre. In *Biomineralization and biological metal accumulation* (Eds. Woestboek P. & De Jong E. W.), Reidel, Dordrecht, pp. 225-230.

Nakahara H. (1991) Nacre formation in bivalve and gastropod molluscs, In *Mechanisms and Phylogeny of Mineralization in Biological Systems* (Eds. S. Suga & H. Nakahara), Springer-Verlag, New York, pp. 343-350.

Nakahara H., Bevelander G. & Kakei M. (1982) Electron microscopic and amino acid studies on the outer and inner shell layers of *Haliotis rufescens*. *Venus* **41**, 33-46.

Nassif N., Pinna N., Gehrke N., Antonietti M., Jaeger C. & Coelfen H. (2005) Amorphous layer around aragonite platelets in nacre *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **102**, 12653-13655.

Nederbragt A. J., Van Loon A. E. & Dictus W. J. A. G. (2002) Expression of *Patella vulgata* orthologs of engrailed and dpp-BMP2/4 in adjacent domains during molluscan shell development suggests a conserved compartment boundary mechanism. *Dev. Biol.*, **246**, 341-355.

Neuhoff V., Arold N., Taube D. & 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.

Norman M.D. (2000) Cephalopods: a world guide. IKAN publishing, Frankfurt.

Nudelman F., Gotliv B., Addadi L. & Weiner S. (2006) Mollusk shell formation: mapping the distribution of organic matrix components underlying a single aragonitic tablet in nacre. *J. Struct. Biol.* **153**, 176-187.

-O-

Oaki Y. & Imai H. (2005) The hierarchical architecture of nacre and its mimetic material. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **44**, 6571-6575.

-P-

Palmer A. R. (1992). Calcification in marine molluscs: how costly is it? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1379-1382.

Patthy L. (2003) Modular assembly of genes and the evolution of new functions. *Genetica* **118**, 217-231.

Pedroso H. A., Schwartz Z., Dean D. D., Harrison J. L., Campbell J. W., Wiederhold M. L. & Boyan B. D. (1997) Evidence for the involvement of carbonic anhydrase and urea in the calcium carbonate formation in the gravity-sensing organ of *Aplysia californica*. *Calcif. Tissue Int.* **61**, 247-255.

Percot A., Viton C. & Domard A. (2003) Characterization of shrimp shell deproteinization. *Biomacromolecules* **4**, 1380-1385.

Pereira-Mouriès L., Almeida M.-J., Robeiro C., Peduzzi J., Bathélemy M., Milet C. & Lopez E. (2002) Soluble Silk-like organic matrix in the nacreous layer of the bivalve *Pinctada maxima*. *Eur. J. Biochem.* **269**, 4994-5003.

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

Petit H. P. (1981) Survol de la minéralisation chez les unionidae. *Haliotis* **11**, 181-195.

Pokroy B., Fitch A. N., Marin F., Kapon N., Adir N., and Zolotoyabko E. (2006a). Anisotropic lattice distortion in biogenic calcite induced by intra-crystalline organic molecules. *J. Struct. Biol.* **155**, 96-103.

Pokroy B., Zolotoyabko E., and Adir N. (2006b) Purification and functional analysis of a 40-kDa protein extracted from the *Strombus decorus persicus* mollusc shell. *Biomacromolecules* **7**, 550-556.

Politi Y., Arad T., Klein E., Weiner S. & Addadi L. (2004) Sea Urchin spine calcite forms via a transient amorphous calcium carbonate phase. *Science* **306**, 1161-1164.

Ponder W. & Lindberg D. (1997) Towards a phylogeny of gastropod molluscs: an analysis using morphological characters. *Zool. J. Linn. Soc.* **119**, 83-256.

Prothero D. R. (1998) Bringing fossils to life, In *An Introduction to Paleobiology* (ed. WCB), McGraw-Hill, U.S.A., pp.4-11.

-R-

Rahman M. A., Isa Y. & Uehara T. (2005) Proteins of calcified endoskeleton: II Partial amino acid sequences of endoskeletal proteins and the characterization of proteinaceous organic matrix of spicules from the alcyonarian, *Synularia polydactyla*. *Proteomics* **5**, 885-893.

Raman R., Sasisekharan V. & Sasisekharan R. (2005) Structural insights into biological roles of protein-glycosaminoglycan interactions. *Chem. Biol.* **12**, 267-277

Ravera O., Cenci R., Beone G. M., Dants M. & Lodigiani P. (2003) Trace element concentrations in freshwater mussels and macrophytes as related to those in their environment. *J. Limnol.* **62**, 61-70.

Ravindranath M. & Ravindranath R. (1974) The chemical nature of the shell of molluscs: 1. Prismatic and nacreous layers of a bivalve *Lamellidans marginalis* (Unionidae). *Acta Histochem.* **48**, 26-41.

Ravindranath R. M. H. & Basilrose S. R. M. (2005) Localisation of sulphated sialic acid in the dentinal tubules during tooth formation in mice. *Acta Histochem.* **107**, 43-56.

Ricken W., Steuber T., Freitag H., Hirschfeld M. & Niedenzu B. (2003) Recent and historical discharge of a large european river system – oxygen isotopic composition of river water and skeletal aragonite of Unionoidae in the Rhine. *Pal. Pal. Pal.* **193**, 73-86.

Rohrer J. (2000) Analysing sialic acids using high-performance anion-exchange chromatography. *Anal. Biochem.* **283**, 3-9.

Rousseau M., Lopez E., Stempflé P., Brendlé M., Franke L., Guette A., Naslain R. & Bourrat X. (2005) Multiscale structure of sheet nacre. *Biomaterials* **26**, 6254-62.

Rousseau M., Bédouet L., Lati E., Gasser P., Le Ny K. & Lopez E. (2006) Restoration of stratum corneum with nacre lipids. *Comp. Biochem. Physiol. B* **145**, 1-9.

Rusenko K. W., Donachy J. E. & 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* (C. S. Sikes, and A. P. Wheeler, Eds.), ACS Symposium Series 444, Washington, DC, pp. 107-124

-S-

Saleuddin A. S. M. & Petit H. P. (1983) The mode of formation and the structure of the periostracum, In *The Mollusca, Vol. 4: Physiology* (Eds. A. S. M. Saleuddin & K. M. Wilbur), Academic Press, New York, pp 199-233.

Samata T. (1990) Ca-binding glycoproteins in molluscan shells with different types of ultrastructure. *Veliger* **33**, 190–201.

Samata T., Hayashi N., Kono M., Hasegawa K., Horita C. & Akera S. (1999) A new matrix protein family related to the nacreous layer formation of *pinctada fucata*. *FEBS Lett.* **462**, 225-229.

Sarashina I. & Endo K. (1998) Primary structure of a soluble matrix protein of scallop shell: implications for calcium carbonate biomineralization. *Am. Mineral.* **83**, 1510–1515.

Sarashina I. & Endo K. (2001) The complete primary structure of Molluscan Shell Protein 1 (MSP-1), an acidic glycoprotein in the shell matrix of the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Mar. Biotechnol.* **3**, 362-369.

Sarashina I., Yamaguchi H., Haga T., Iijima M., Chiba S. & Endo, K (2006) Molecular evolution and functionally important structures of molluscan dermatopontin: implications for the origins of molluscan shell matrix proteins. *J. Mol. Evol.* **62**, 307-318.

Schäffer T. E., Ionescu-Zanetti C., Proksch R., Fritz M., Walters D. A., Almqvist N., Zaremba C. M., Belcher A. M., Smith B. L., Stucky G. D., Morse D. E. & Hansma P. K. (1997) Does abalone nacre form by heteroepitaxial nucleation or by growth through mineral bridges ? *Chem. Mater.* **9**, 1731-1740.

Schonitzer V. & Weiss I. M. (2007) The structure of mollusc larval shells formed in the presence of the chitine synthase inhibitor Nikkomycin Z. *BMC Struct. Biol.* **7**, 1-28.

Schuster J. (1988) Determination of amino acids in biological, pharmaceutical, plant and food samples by automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **431**, 271-284.

Seibel B.A., Goffredi S.K., Thuesen E.V., Childress J.J. & Robison B.H (2004) Ammonium content and buoyancy in midwater cephalopods. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **313**, 375-387.

Sellinger A., Weiss P. M., Nguyen A., Lu Y., Assink R. A., Gong W. & Brinker C. J. (1998) Continuous self-assembly of organic-inorganic nanocomposite coatings that mimic nacre. *Nature* **394**, 256-260.

Shen X., Belcher A., Hansma P. K., Stucky G. & 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.

Simmer J. P. & Hu J. C. (2002) Expression, structure and function of enamel proteinases. *Connect. Tissue Res.* **43**, 441-449.

Simkiss K. (1965) The organic matrix of the oyster shell. *Comp. Biochem. Physiol.* **16**, 427-435.

Simkiss K. & Wilbur K. M. (1989) Biomineralization - Cell biology and mineral deposition, Academic Press, Inc., San Diego, pp. 1-337.

Sire J.-Y., Delgado S. & Girondot M. (2006) The amelogenin story: origin and evolution. *Eur. J. Oral Sci.* **114**, 64-77.

Smith P., Krohn R., Hermanson G., Mallia A., Gartner F., Provenzano M., Fujimoto E., Goeke, N., Olson B. & Klenk D. (1985) Measurement of protein using biocinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85.

Sud D., Doumenc D., Lopez E. & Milet C. (2001) Role of water-soluble matrix fraction, extracted from the nacre of *Pinctada maxima*, in the regulation of cell activity in abalone mantle cell culture (*Haliotis tuberculata*). *Tissue Cell* **33**, 154-160.

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

Suzuki M., Murayama E., Inoue H., Ozaki N., Tohse H., Kogure T. & Nagasawa H. (2004) Characterization of Prismaticin-14, a novel matrix protein from the prismatic layer of the Japanese pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Biochem. J.* **382**, 205-213.

Suzuki M. & Nagasawa H. (2007) The structure-function relationship analysis of prismaticin-14 from the prismatic layer of Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata*. *FEBS J.* **274**, 5158-5166.

-T-

Takeuchi T. & Endo K. (2005) Biphasic and dually coordinated expression of the genes encoding major shell matrix proteins in the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Mar. Biotech.* **8**, 52-61.

Tambutté S., Tambutté E., Zoccola D., Caminiti N., Lotto S., Moya A., Allemand D., Adkins J. (2007) Characterization and role of carbonic anhydrase in the calcification process of the azooxanthellate coral *Tubastrea aurea*. *Mar. Biol.* **151**, 71-83.

Tao Y., Zhang L. & Cheung P. (2006) Physicochemical properties and antitumor activities of water-soluble native and sulfated hyperbranched mushroom polysaccharides. *Carbohydr. Res.* **341**, 2261-2269.

Taylor J. D. (1973) The structural evolution of the bivalve shell. *Palaeontology* **16**, 519-534.

Taylor J. D., Kennedy W. J. & Hall A. (1969) The shell structure and mineralogy of the bivalvia. Introduction. Nuculacea-Trigonacea. *Bull. Brit. Mus. (Nat. Hist.) Zool. Lond. suppl.* **3**, 1-125.

Timmermans L. P. M. (1969) Studies on shell formation in molluscs. *Netherl. J. Zool.* **19**, 417-523.

Tompa A. (1974) A comparative study of the ultrastructure and mineralogy of calcified land snail eggs. *J. Morph.* **150**, 661-688.

Towe K. & Hamilton G. (1968) Ultrastructure and inferred calcification of the mature and the developing nacre in bivalve molluscs. *Calcif. Tissue. Res.* **1**, 306-318.

Treccani L., Mann K., Heinemann F. & Fritz M. (2006) Perlwapin, an abalone nacre protein with three four-disulfide core (WAP) domains, inhibits the growth of calcium carbonate crystals. *Biophys. J.* **91**, 2601-2608.

Tsukamoto D., Sarashina I. & Endo K. (2004) Structure and expression of an unusually acidic matrix protein of pearl oyster shells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**, 1175-1180.

-V-

Veis A. (1984) Bones and teeth, In *Extracellular Matrix Biochemistry* (Eds. K. A. Piez & A. H. Reddi), Elsevier, Amsterdam, pp. 329-374.

Velazquez-Castillo R. R., Reyes-Gasga J., Garcia-Gutierrez D. I. & Jose-Yacaman M. (2006) Crystal structure characterization of nautilus shell at different length scales. *Biomaterials* **27**, 4508-4517.

Velazquez-Castillo R. R., Reyes-Gasga J., Garcia-Gutierrez D. I. & Jose-Yacaman M. (2006) Nanoscale characterization of nautilus shell structure: An example of natural self-assembly. *J. Mater. Res.* **21**, 1484-1489.

Voss-Foucart M. F. (1968) Essais de solubilisation et de fractionnement d'une conchioline (nacre murale de *Nautilus pompilius*, Mollusque Céphalopode). *Comp. Biochem. Physiol.* **26**, 877-886.

Voss-Foucart M. F. & Grégoire C. (1975) On biochemical and structural alterations of the nacre conchiolin in the nautilus shell under conditions of protracted, moderate heating and pressure. *Arch. Int. Physiol. Biochem.* **83**, 43-52.

-W-

Waite J. H. (1983) Quinone-tanned scleroproteins. In *The Mollusca, vol. 4: Physiology* (A. S. M. Saleuddin, and K. M. Wilbur, Eds.), Academic Press, New York, pp. 467-504.

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

Wall R. S. & Gyi T. J. (1988) Alcian blue staining of proteoglycans in polyacrylamide gels using the "Critical electrolyte concentration" approach. *Anal. Biochem.* **175**, 298-299.

Walton D. (1998) Degradation of intracrystalline proteins and amino acids in fossil brachiopods. *Organic. Geochem.* **28**, 389-410.

Walton D., Cusack M. & Curry G. B. (1993) Implications of the amino-acid composition of Recent New Zealand brachiopods. *Palaeontology* **36**, 883-896.

Walton D. & Curry G. B. (1994) Extraction, analysis and interpretation of intracrystalline amino acids from fossils. *Lethaia* **27**, 179-184.

Weedon M. J. & Taylor P. D. (1995) Calcitic nacreous ultrastructures in bryozoans: implications for comparative biomineralization of lophophorates and molluscs. *Biol. Bull.* **188**, 281-292.

Weiner S. (1983) Mollusk shell formation: isolation of two organic matrix proteins associated with calcite deposition in the bivalve *Mytilus californianus*. *Biochemistry* **22**, 4139-4145.

Weiner S. (1986) Organisation of extracellularly mineralized tissues: a comparative study of biological crystal growth. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **20**, 365-408.

Weiner S. & Hood L. (1975) Soluble protein of the organic matrix of mollusk shells: a potential template for shell formation. *Science* **190**, 987-988.

Weiner S., Lowenstam H. A. & Hood L. (1976) Characterization of 80-million-year-old mollusk shell proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 2541-2545.

Weiner S. & Lowenstam H. A. (1976) Discrete molecular weight components of the organic matrices of mollusc shells. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **30**, 45-51.

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

Weiner S. & Traub W. (1984) Macromolecules in mollusc shells and their functions in

biomineralization. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **304**, 425-434.

Weiner S., Gotliv B. A., Levi-Kalishman Y., Raz S., Weiss I. M. & Addadi L. (2003) Mollusk shell nacre: Overview of the structure and the functions of the organic matrix in shell formation, In *Biomineralization (Biom2001) : formation, diversity, evolution and application, proceeding of the 8th international symposium on biomineralization* (Eds. Kobayashi I. & Ozawa H.), Tokai Univ., Press, Kanagawa, pp. 8-13.

Weiner S., Levi-Kalishman Y., Raz S. & Addadi L. (2003) Biologically formed amorphous calcium carbonate. *Connect. Tiss. Res.* **44**, 214-218.

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

Weiss I. M., Göhring W., Fritz M. & Mann K. (2001) Perlustrin, a *Haliotis laevis* (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.

Weiss I. M., Tuross N., Addadi L., and Weiner S. (2002) Mollusc larval shell formation: amorphous calcium carbonate is a precursor phase for aragonite. *J. Exp. Zool.*, **293**, 478-491.

Westbroek P. & Marin F. (1998) A marriage of bone and nacre. *Nature* **392**, 861-862.

Westermann B., Beck-Schildwächter I., Beuerlein K., Kelata E.F., Schipp, R. (2004) Shell growth and chamber formation of aquarium-reared *Nautilus pompilius* (Mollusca, Cephalopoda) by X-ray analysis. *J. Exp. Zool.* **301**, 930-937.

Westermann B., Schmidtberg H. & Beuerlein K. (2005) Functional morphology of the mantle of *Nautilus pompilius* (Mollusca, Cephalopoda). *J. Morphol.* **264**, 277-285.

Wheeler A. P., George J. W., & Evans C. A. (1981) Control of CaCO₃ nucleation and crystal growth by soluble matrix of oyster shell. *Science* **212**, 1397-1398.

Wilbur K. M. & Jodrey L. H. (1952) Studies on shell formation. I. Measurement of the shell formation using ⁴⁵Ca. *Biol. Bull.* **103**, 169-176.

Williams A. (1968) Evolution of the shell structure of articulate brachiopods. *Spec. Pap. Palaeontol.* **2**, 1-55.

Williams A. & Rowell A. J. (1965) Brachiopod Anatomy, In *Treatise on Invertebrate Paleontology, Part H, Brachiopoda* (Ed. Moore R. C.), University of Kansas Press. pp. 6-57.

Williams A., Carlson S. J., Brunton C. H. C., Holmer L. & Popov L. (1996) A supra-ordinal classification of brachiopoda. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **351**, 1171-1193.

Wilt F. H. (2005) Developmental biology meets materials science: Morphogenesis of biomineralized structures. *Dev. Biol.* **280**, 15-25.

Wilt F. H., Killian C. E., & Livingston B. T. (2003). Development of calcareous skeletal elements in invertebrates. *Differentiation* **71**, 237-250.

Wise S. W. (1970) Microarchitecture and mode of formation of nacre (mother-of-pearl) in pelecypods, gastropods and cephalopods. *Eclogae Geol. Helv.* **63**, 775-797.

Worms D. & Weiner S. (1986) Mollusk shell organic matrix: Fourier transform infrared study of the acidic macromolecules. *J. Exp. Zool.* **237**, 11-20.

Würtz M. (1989) *Le Nautilé*, (Ed. Progetto R.), Musée Océanographique, Principauté de Monaco.

Wustman B. A., Morse D. E. & Evans J. S. (2004) Structural characterization of the N-terminal mineral modification domains from the molluscan crystal-modulating biomineralization proteins, AP7 and AP24. *Biopolymers* **74** 363-376.

Wray C. G., Landman N. H., Saunders W.B. & Bonacum J. (1995) Genetic divergence and geographic diversification in *Nautilus*. *Paleobiology* **21**, 220-228.

Wray G. A., Levinton J. S. & Sapiro L. H. (1996) Molecular evidence for deep precambrian divergences among metazoan phyla. *Science* **274**, 568-573.

-Y-

Yan Z., Jing G., Gong N., Li C., Zhou Y., Xie L. & Zhang R. (2007) N40, a novel nonacidic matrix protein from pearl oyster nacre, facilitates nucleation of aragonite *in vitro*. *Biomacromolecules* **8**, 3597-3601.

Yano M., Nagai K., Morimoto K. & Miyamoto, H. (2006) Shematin: a family of glycine-rich structural proteins in the shell of the pearl oyster. *Comp. Biochem. Physiol.* **144**, 254-262.

Yano M., Nagai K., Morimoto K. & Miyamoto H. (2007) A novel nacre protein N19 in the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **362**, 158-163.

Yin Y., Huang J., Paine M. L., Reinhold V. N. & Chasteen D. (2005) Structural characterization of the major extrapallial fluid protein of the mollusc *Mytilus edulis*: implication for function. *Biochemistry* **44**, 10720- 10731.

-Z-

Zacharius R. M., Zell T. E., Morrison J. H. & Woodlock J. J. (1969) Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **30**, 148-152.

Zentz F., Bédouet L., Schuller M. J., Milet C., Lopez E. & Giraud, M. (2001) Characterization and quantification of chitosan extracted from nacre of the abalone *Haliotis tuberculata* and the oyster *Pinctada maxima*. *Mar. Biotechnol.* **3**, 36-44.

Zhang C., Xie L., Meng Q., Jiang T., Pu R., Chen L. & Zhang R. (2003) A novel matrix protein participating in the nacre framework formation of pearl oyster, *Pinctada fucata*. *Comp. Biochem. Physiol.* **133**, 565-573.

Zhang C., Xie L., Huang J., Liu X. & Zhang R. (2006) A novel matrix protein family participating in the prismatic layer formation of pearl oyster, *Pinctada fucata*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **344**, 735-740.

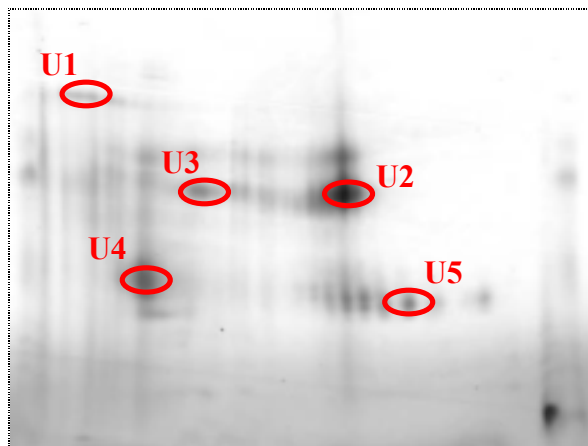
Zhang C. & Zhang R. (2006) Matrix proteins in the outer shells of the molluscs. *Mar. Biotechnol.* **8**, 1-15.

Zhao H., Samata T., Takakura D., Hashimoto R., Miyazaki Y., Nozawa T. & Hikita Y. (2003) Organic matrix proteins preserved in fossil molluscan shells, In *Biom mineralization (BIOM2001) : formation, diversity, evolution and application* (Eds. Kobayashi I. & Ozawa H.), Tokai Univ. Press, Kanagawa, pp. 108-111.

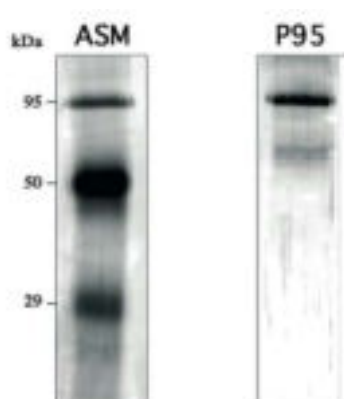
Annexes

1 – Analyses MALDI-TOF/TOF de l'ASM d'*Unio pictorum*

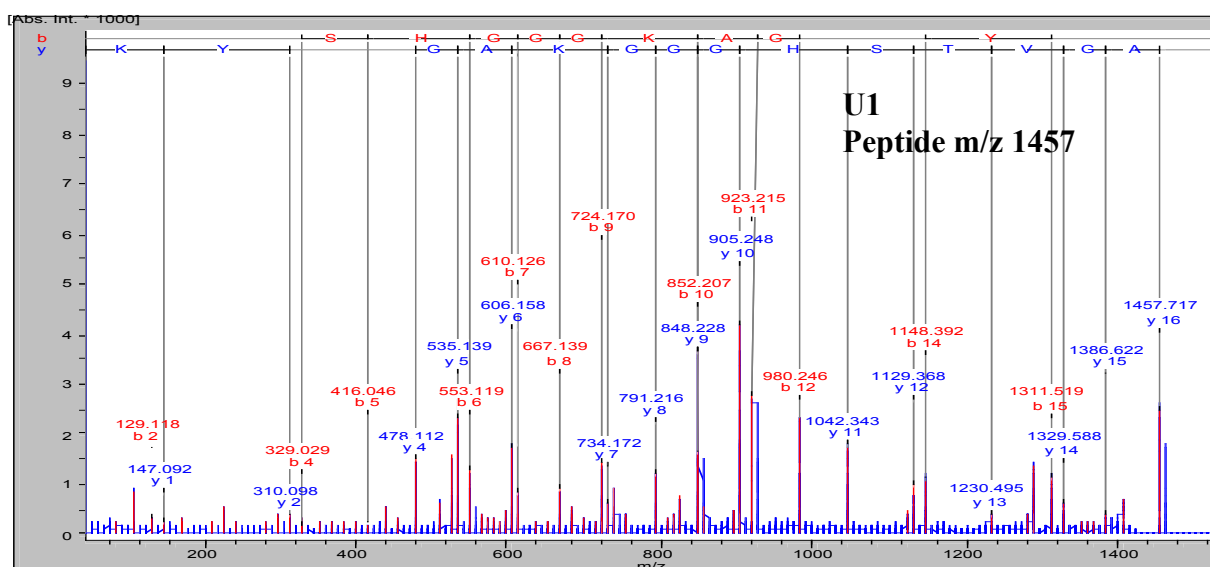
2-D Gel de l'ASM d'*Unio pictorum*



Protéine purifiée par électrophorèse préparative



Samples	m/z fragmented on MSMS	MSMS spectra used for <i>de novo</i> sequencing	Obtained sequence
Unio Pictorum			
U1 spot	2029,9838 2069,9988		
U1 purified protein	1025.590 1457.718 1687.829 2069.982 2399.215 2421.170	x x x	Unsignificant score A(GV)TSHGGGKAG(PAYK) KSKLLDVDNYHSLR
U2	1130,4762 1286,3165 1313,6785 1363,6931 1379,6878 1531,5603 1647,7073 1805,8365 1842,9155 2176,9489	x x x	KDALEHTGFAPK KDGEHVEWNYN(K) 2 molecular ion species
U3	1130,4669 1313,6704 1326,0445 1805,8249		
U4	1130,4812 1313,6938 1363,7126 1647,7254 1805,8604		
U5	1313.669 1647.696 1805.830 1819.835 1842.910	x x x	Same sequence as 1313 of U2 2 molecular ion species Methylated of the 1805

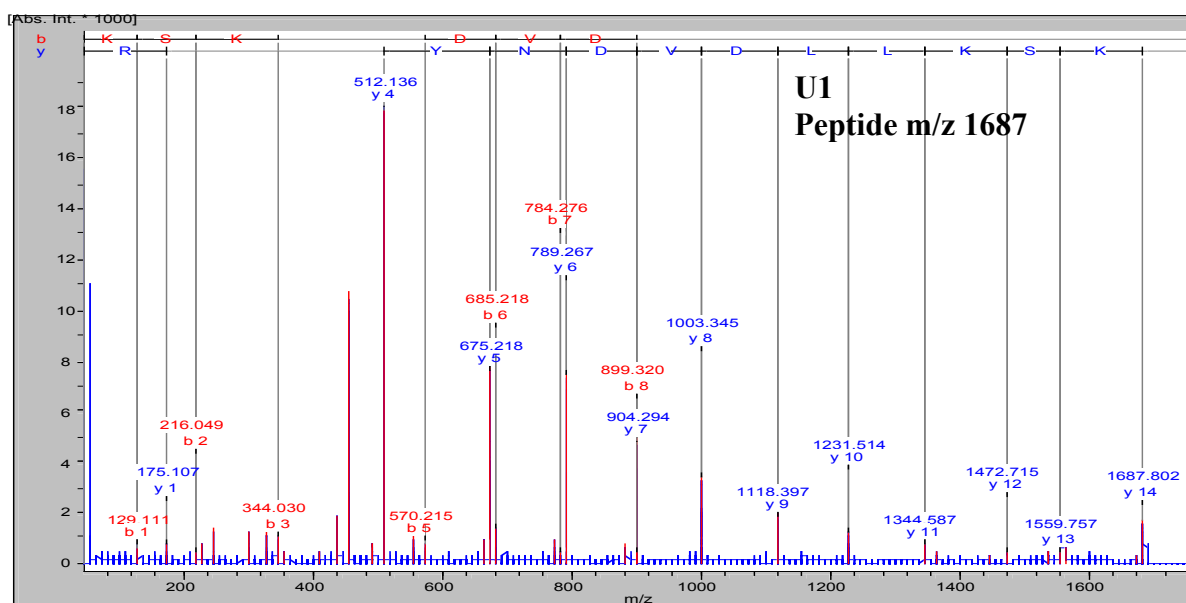


De Novo Results

Search Parameter: MS Tol.: 50.0 ppm, MSMS Tol.: 0.4 Da

Calc.

Tree hierarchy	MH+	Meas. Mr	Calc. Mr	Dev.(Da)	Score	Sequence (N ter - C ter)
MSMS 1	1457.750	1456.702	1456.742	-0.040	8404	A(GV)TSHGGGKAG(PAYK)

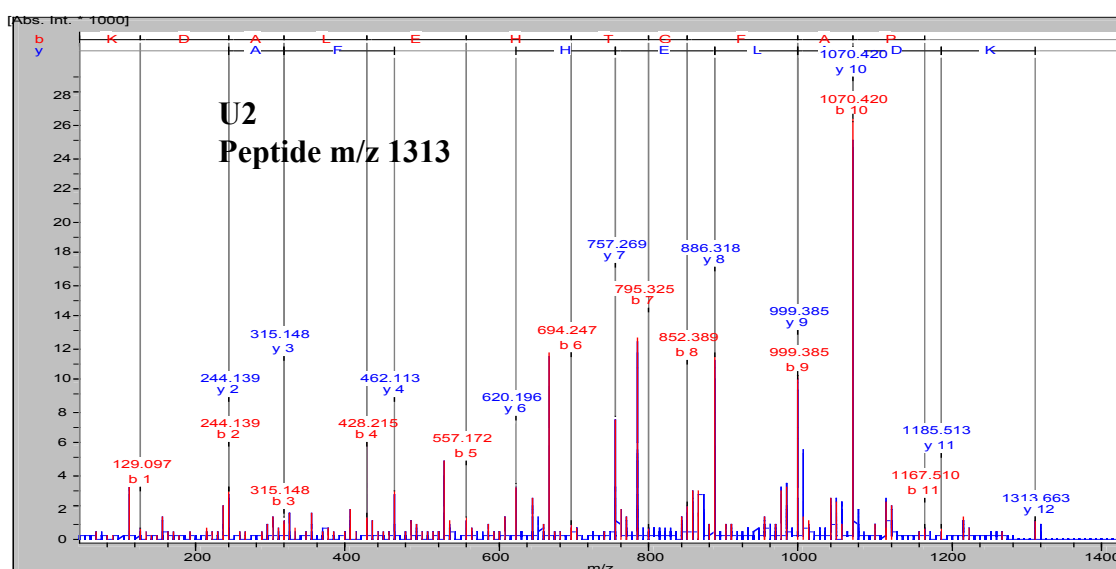


De Novo Results

Search Parameter: MS Tol.: 50.0 ppm, MSMS Tol.: 0.4 Da

Calc.

Tree hierarchy	MH+	Meas. Mr	Calc. Mr	Dev.(Da)	Score	Sequence (N ter - C ter)
MSMS 1	1687.913	1686.812	1686.905	-0.093	2073	KSKLLDVDNY(HSL)R

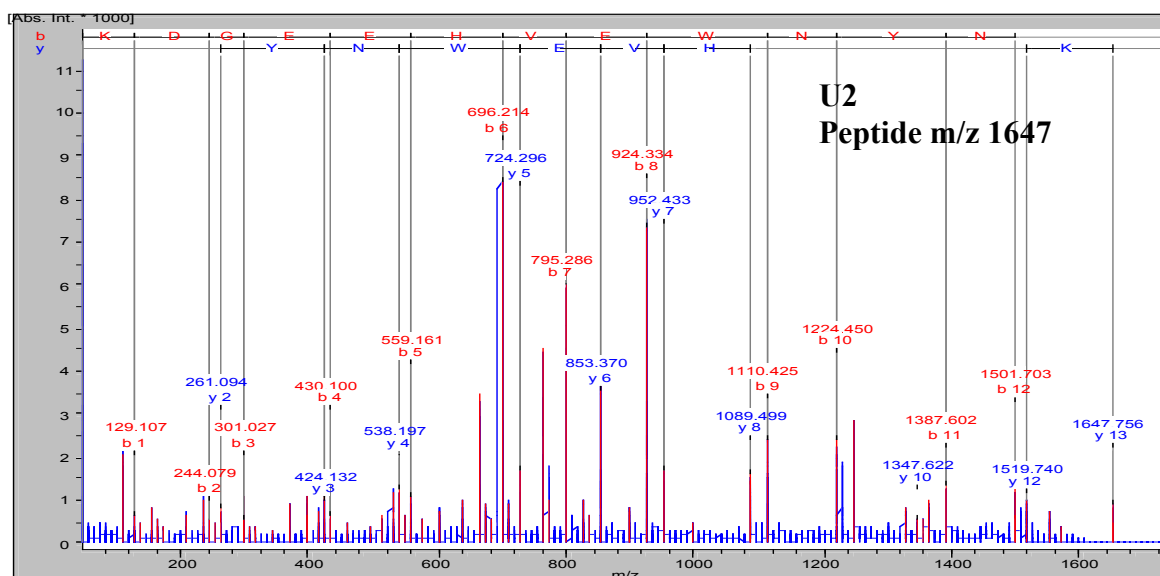


De Novo Results

Search Parameter: MS Tol.: 50.0 ppm, MSMS Tol.: 0.4 Da

Calc.

Tree hierarchy	MH+	Meas. Mr	Calc. Mr	Dev.(Da)	Score	Sequence (N ter - C ter)
MSMS 1	1313.685	1312.662	1312.678	-0.015	2198	KDALEHTGFAPK



De Novo Results

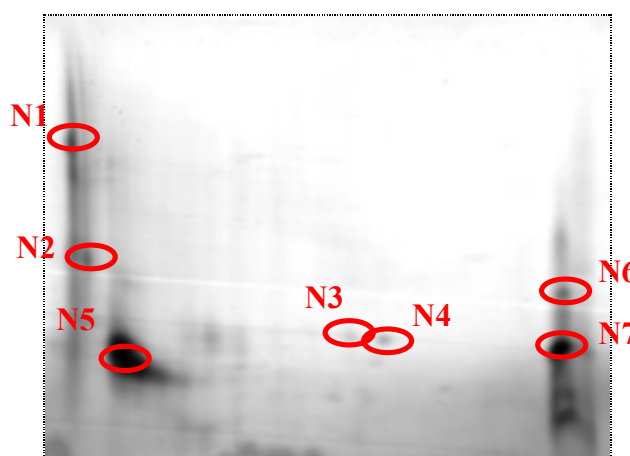
Search Parameter: MS Tol.: 50.0 ppm, MSMS Tol.: 0.4 Da

Calc.

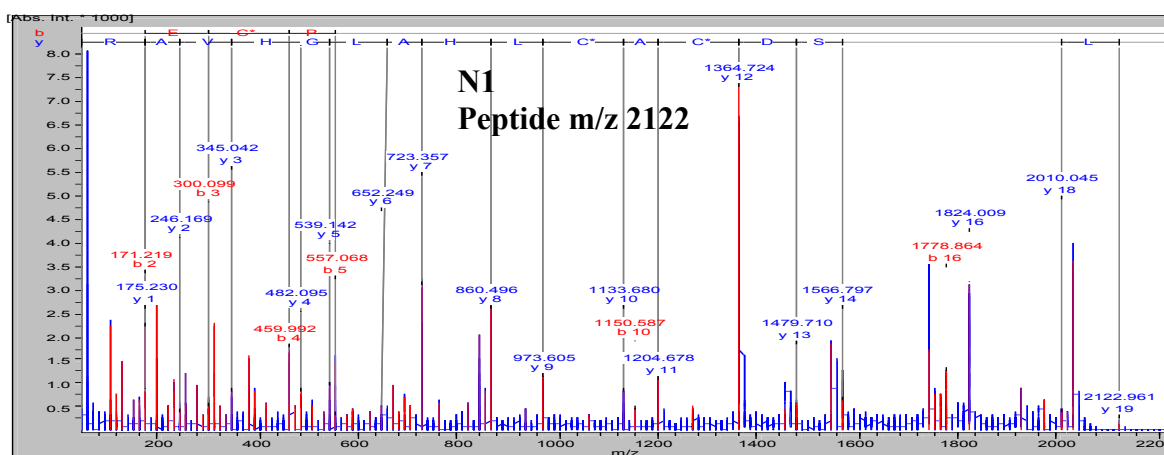
Tree hierarchy	MH+	Meas. Mr	Calc. Mr	Dev.(Da)	Score	Sequence (N ter - C ter)
MSMS 1	1647.740	1646.692	1646.732	-0.040	4242	KDGEHVEWNYN(K)

2 - Analyses MALDI-TOF/TOF de l'ASM de *Nautilus macromphalus*

2-D gel of the ASM of *Nautilus macromphalus*



Samples	m/z fragmented	MSMS spectra used for <i>de novo</i> sequencing	Obtained sequence
Nautilus macromphalus			
N1	1356,846 1512,944 1550,882 1758,887 2122,939	x x x	Unsignificant score Unsignificant score (LGSSDP)SDCACLHALGHVAR
N2	1361,814 1512,917 3162,276		
N3	1998,937 2711,166		
N4	1584,727 1998,952 2711,206		
N5	1003,37 1524,587 1836,955 1874,763 2033,015	x	(RHDDVP)DGDDGDGD(PH)R
N6	1188,635 1260,542 1274,548 2309,037		
N7	1286,32 1425,641 1482,674 1702,474 1819,762 1876,794 1893,789 1914,739 3127,38	x x	(AGGGD)EKGYNPYVR (SSN)DMYSDNLGLCDN(R)

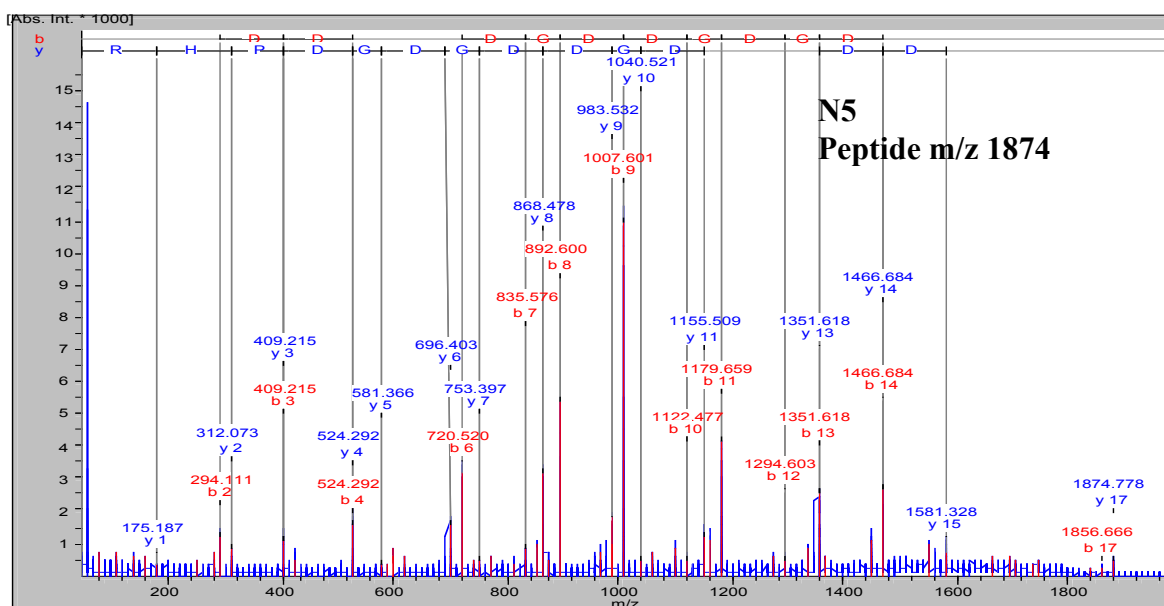


De Novo Results

Search Parameter: MS Tol.: 50.0 ppm, MSMS Tol.: 0.4 Da

Tree Calc.

hierarchy	MH+	Meas. Mr	Calc. Mr	Dev.(Da)	Score	Sequence (N ter – C ter)
MSMS 1	2122.976	2121.922	2121.968	-0.046	16411	(LGSSDP)SDCACLHALGHVAR

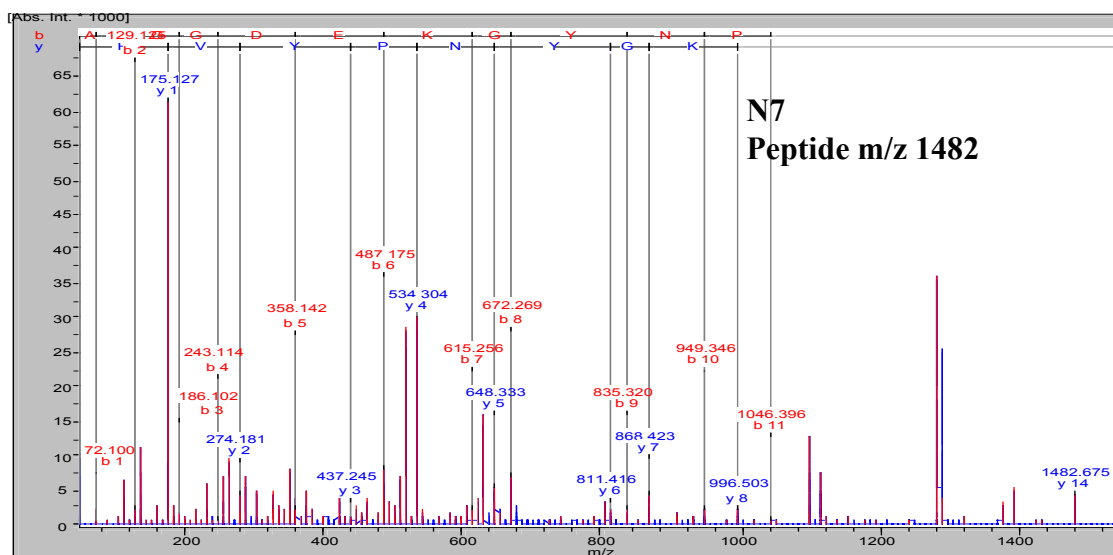


De Novo Results

Search Parameter: MS Tol.: 50.0 ppm, MSMS Tol.: 0.4 Da

Tree Calc.

hierarchy	MH+	Meas. Mr	Calc. Mr	Dev.(Da)	Score	Sequence (N ter – C ter)
MSMS 1	1874.765	1873.752	1873.758	-0.005	2838	(RHDDVP)DGDDGDGD(PH)R

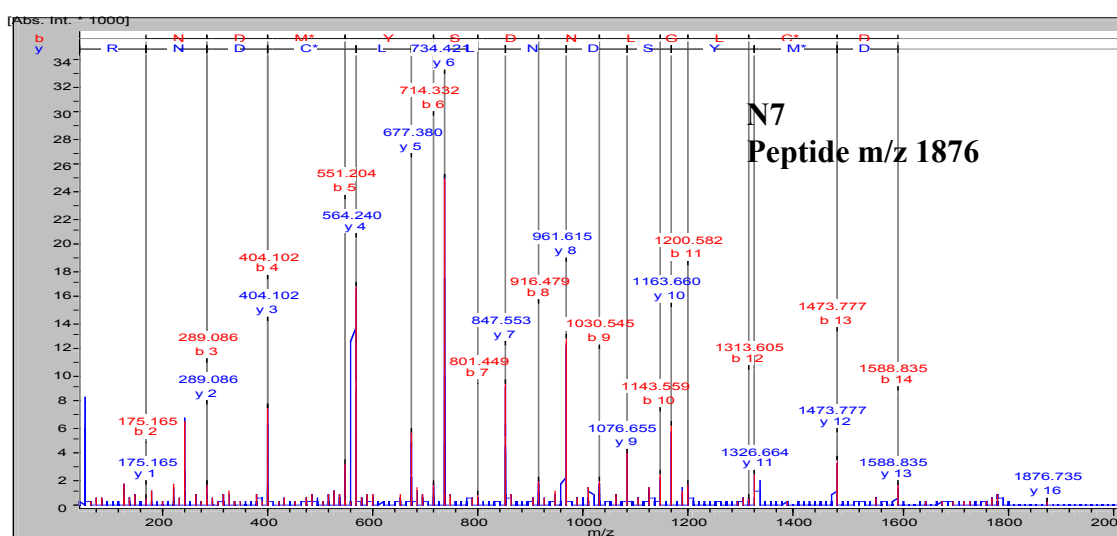


De Novo Results

Search Parameter: MS Tol.: 50.0 ppm, MSMS Tol.: 0.4 Da

Calc.

Tree hierarchy	MH+	Meas. Mr	Calc. Mr	Dev.(Da)	Score	Sequence (N ter - C ter)
MSMS 1	1482.697	1481.662	1481.690	-0.028	2357	(AGGGD)EKGYNPYVR



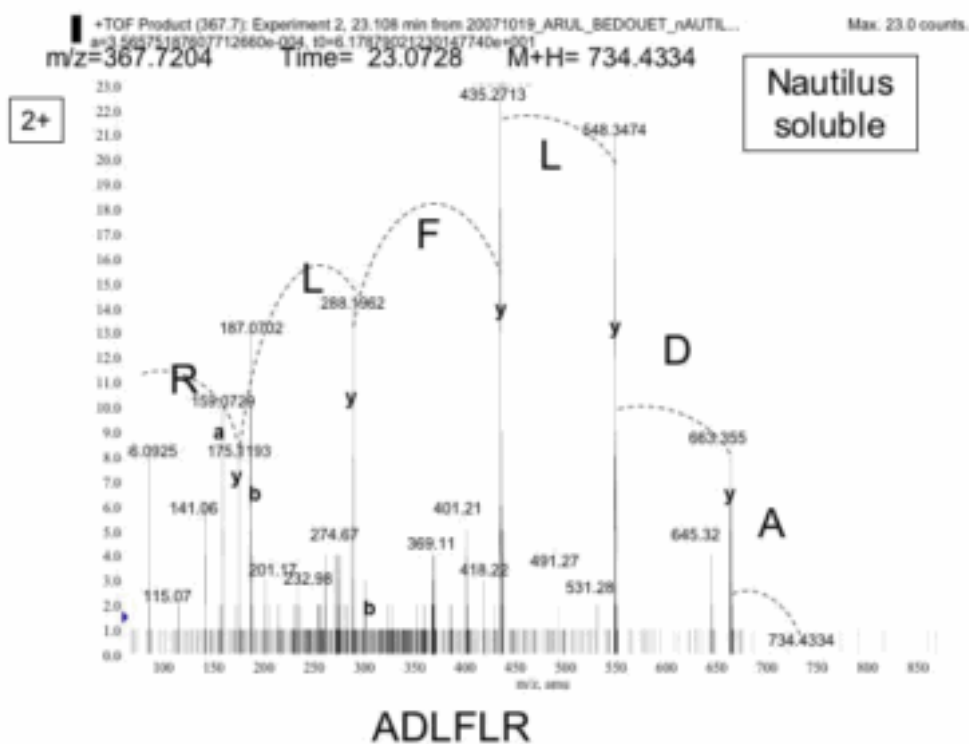
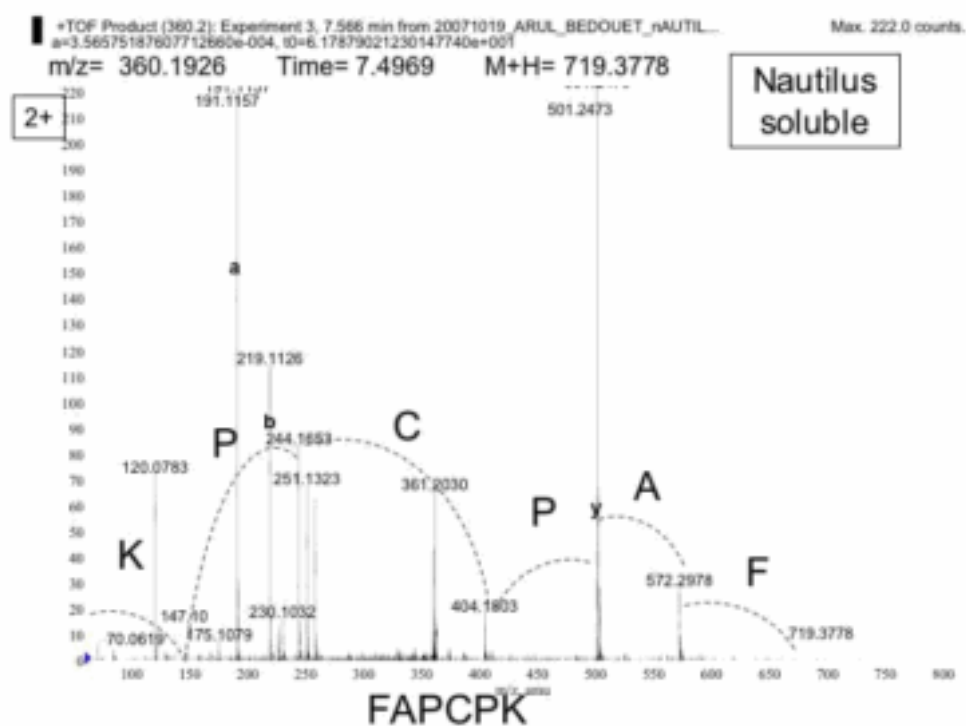
De Novo Results

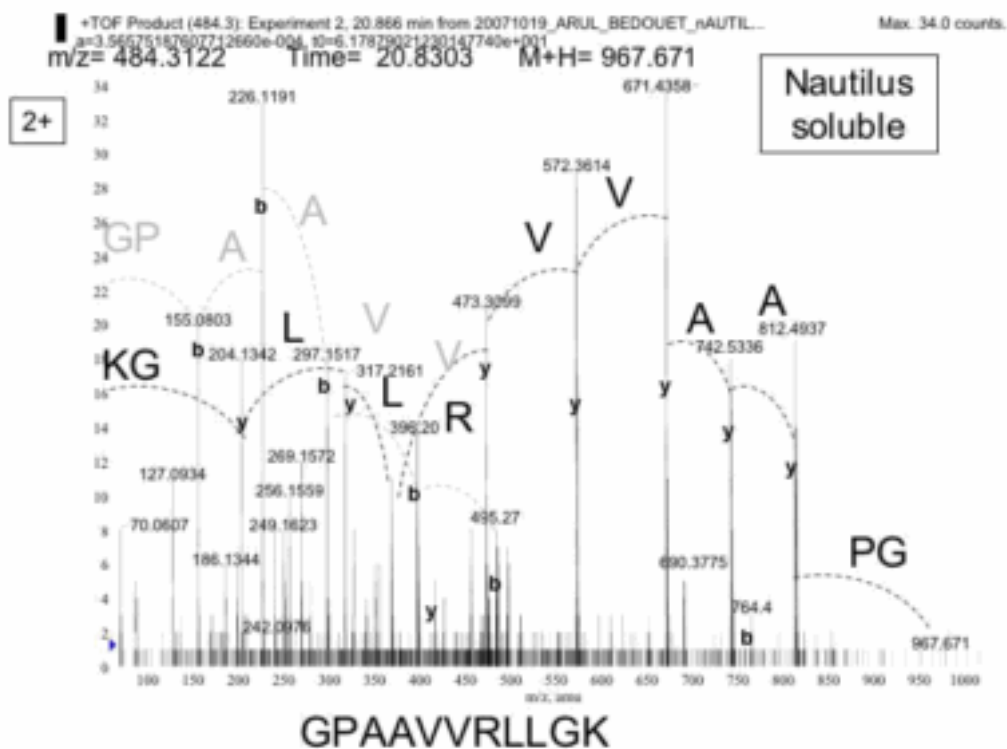
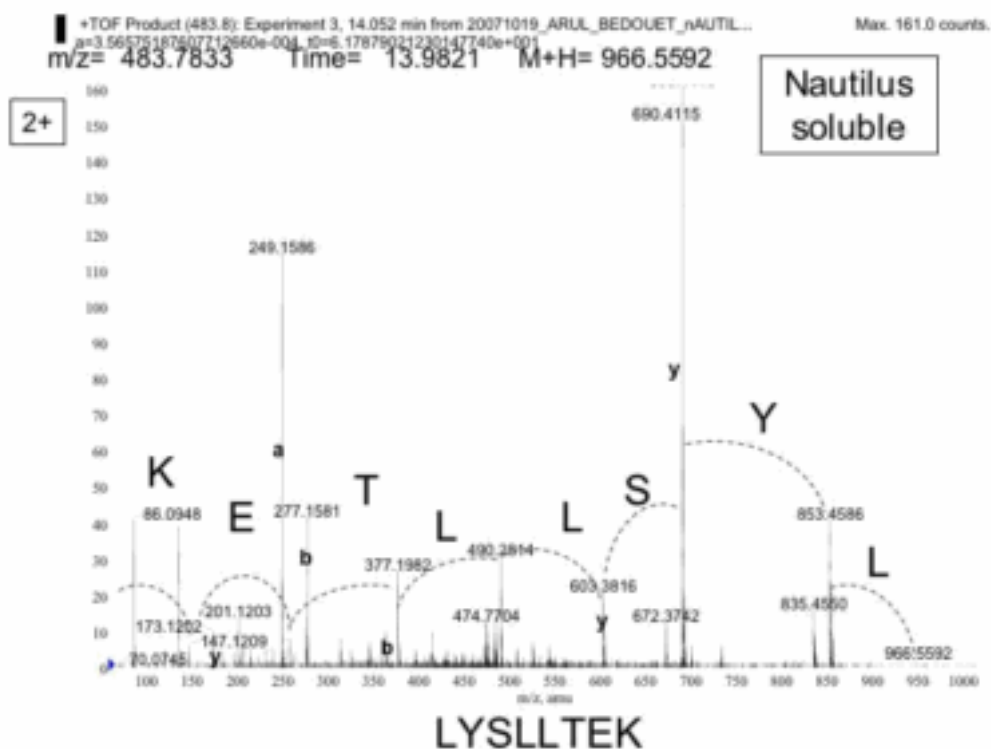
Search Parameter: MS Tol.: 50.0 ppm, MSMS Tol.: 0.4 Da

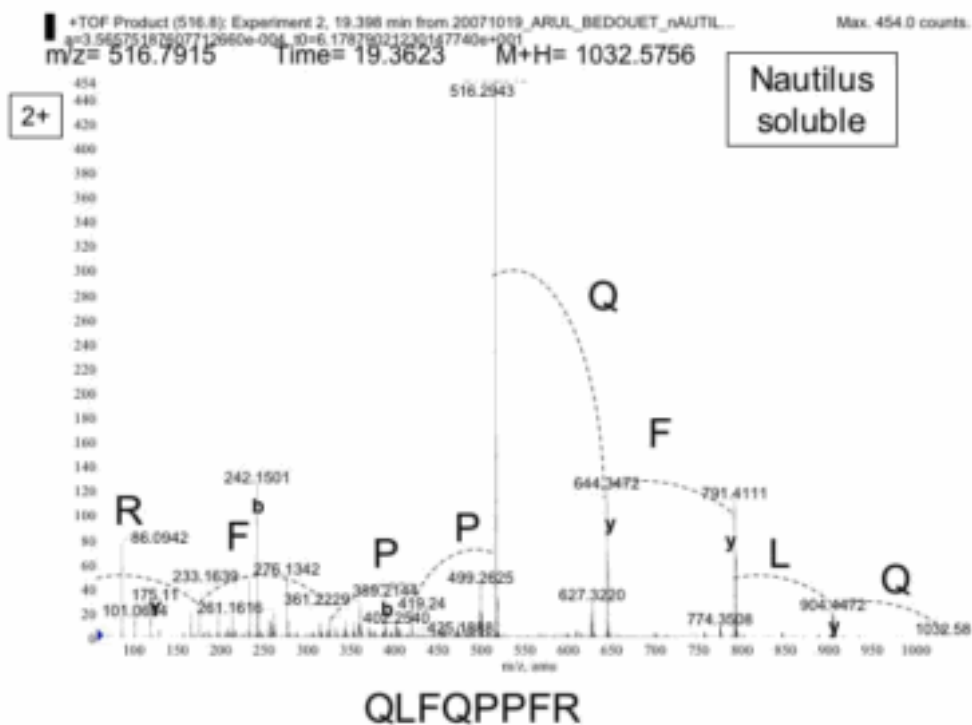
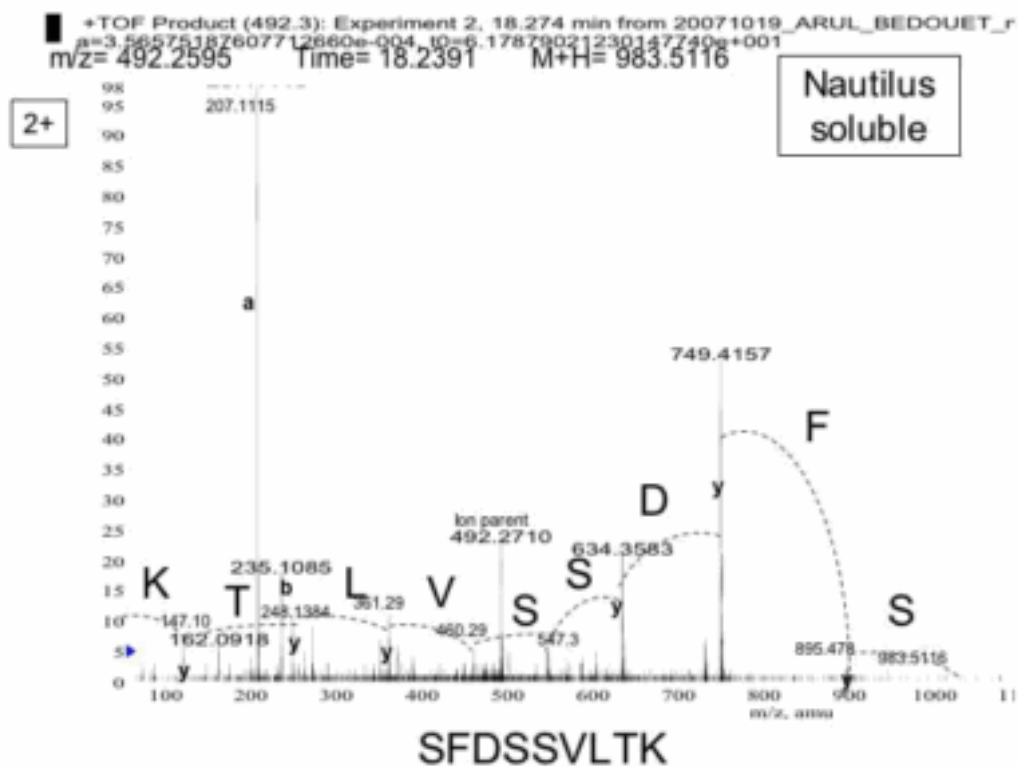
Tree Calc.

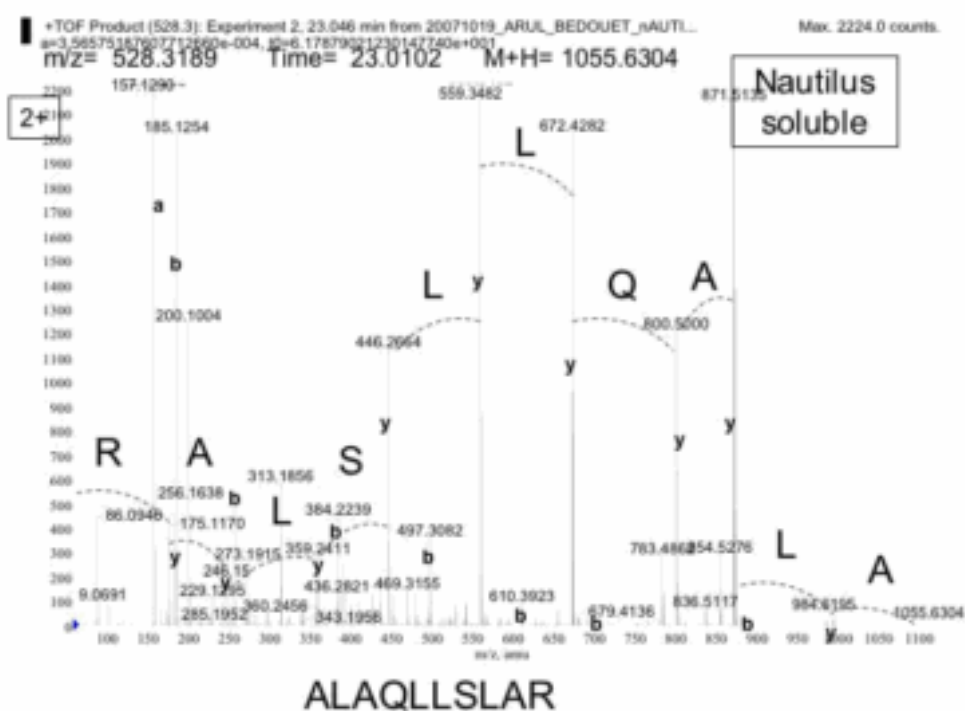
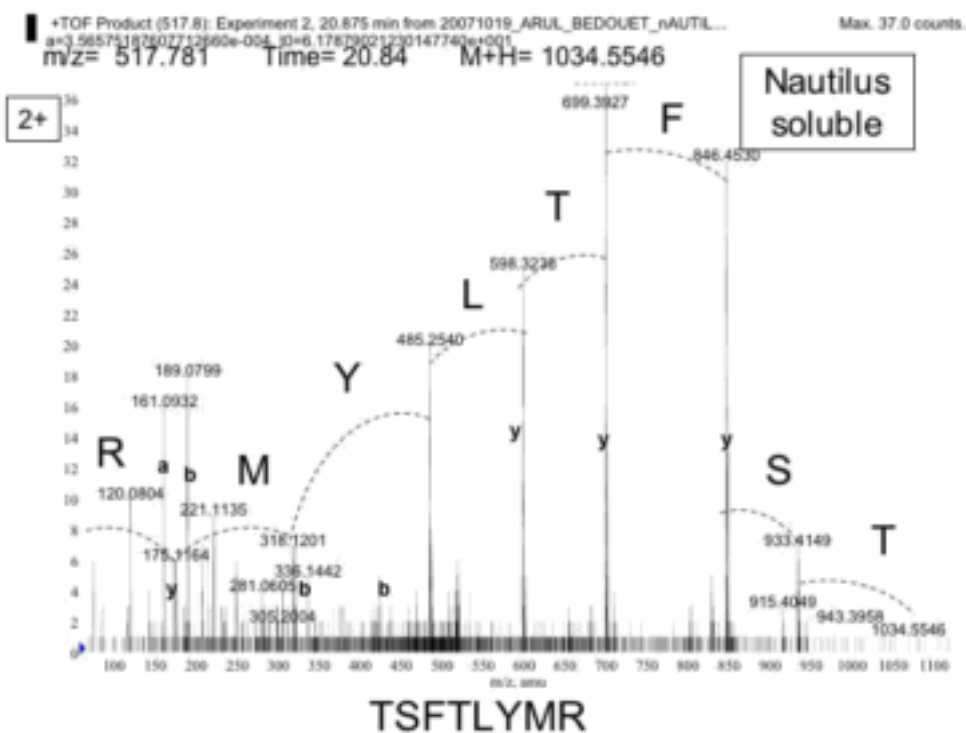
Tree hierarchy	MH+	Meas. Mr	Calc. Mr	Dev.(Da)	Score	Sequence (N ter - C ter)
MSMS 1	1876.744	1875.782	1875.736	0.046	16433	(SSN)DMYSDNLGLCDN(R)

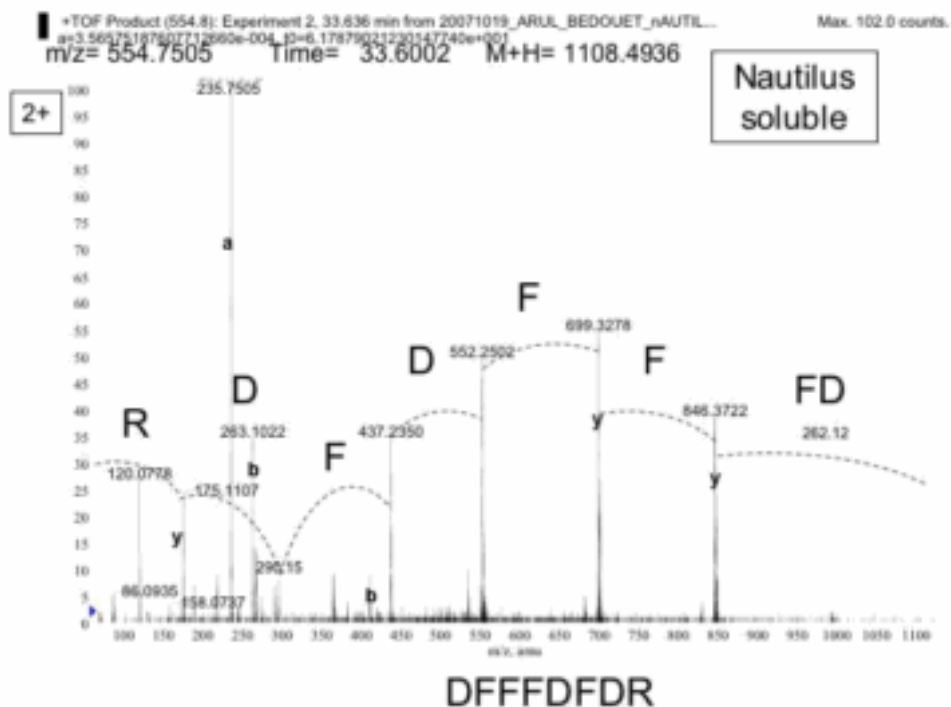
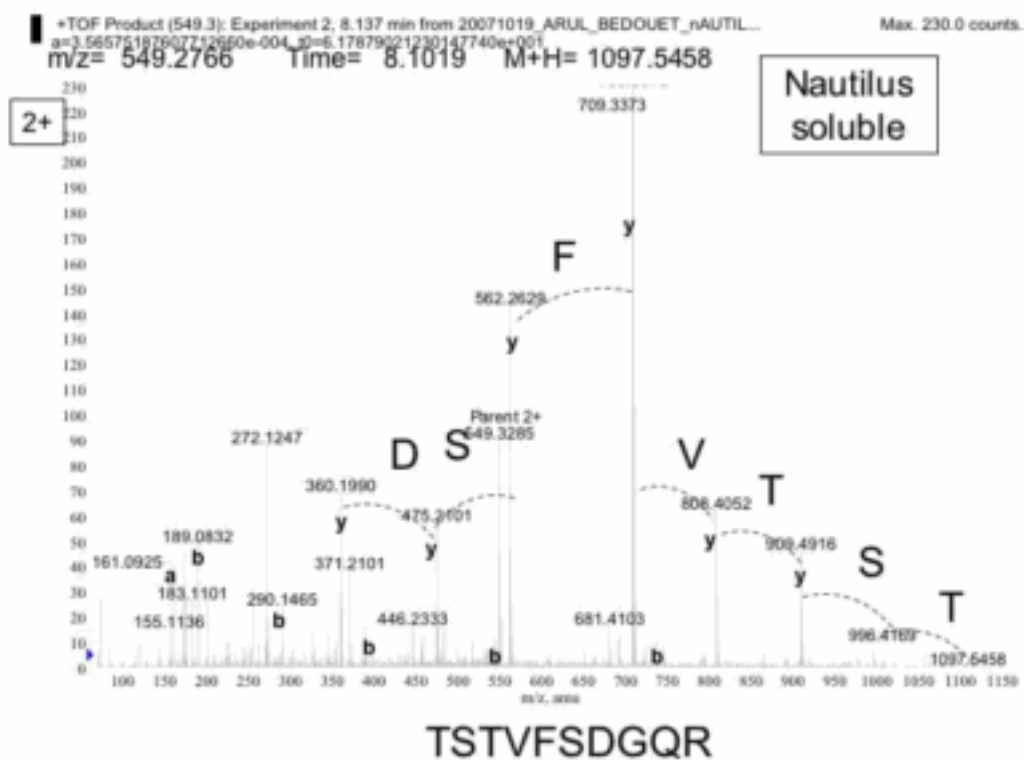
3 - Analyses ESI-QqTOF/TOF de l'ASM de *Nautilus macromphalus*

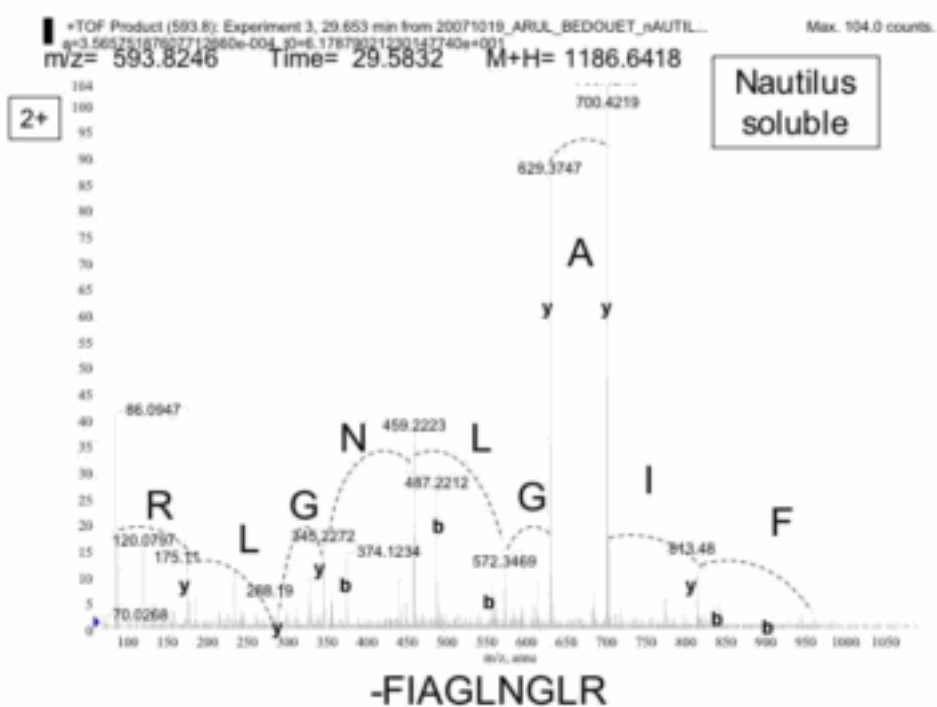
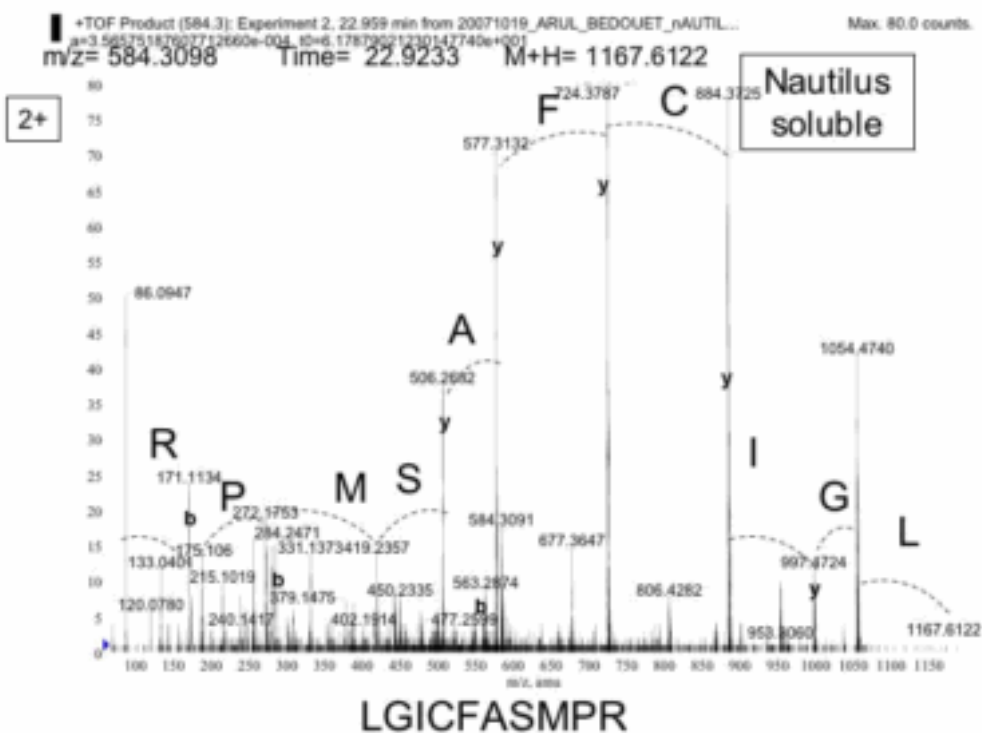


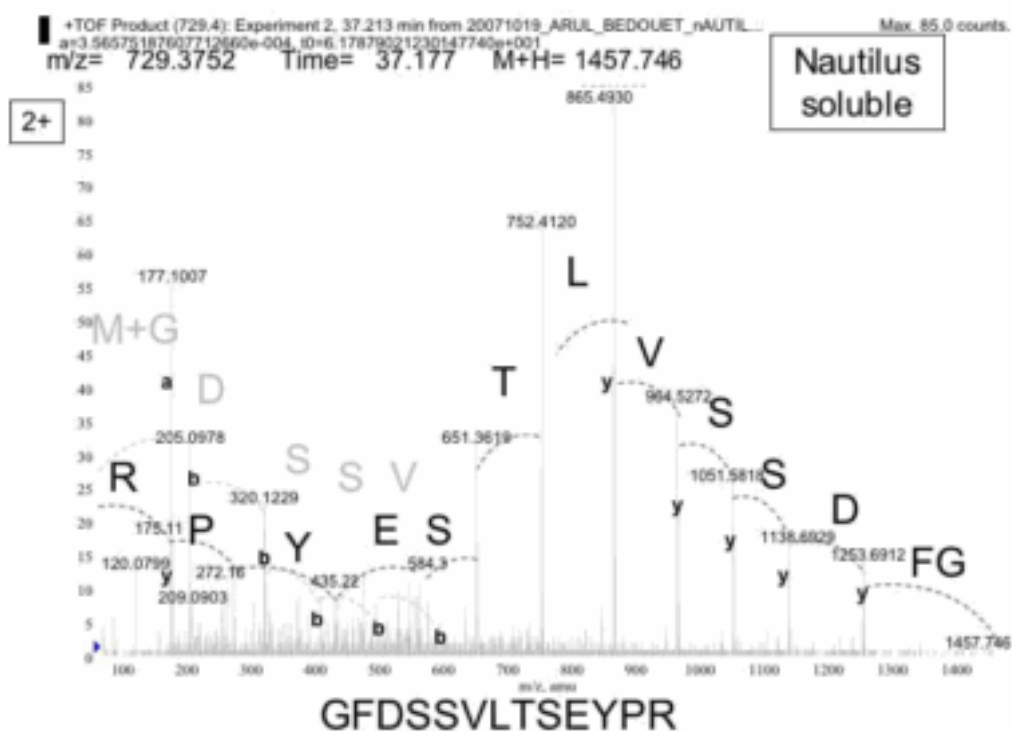
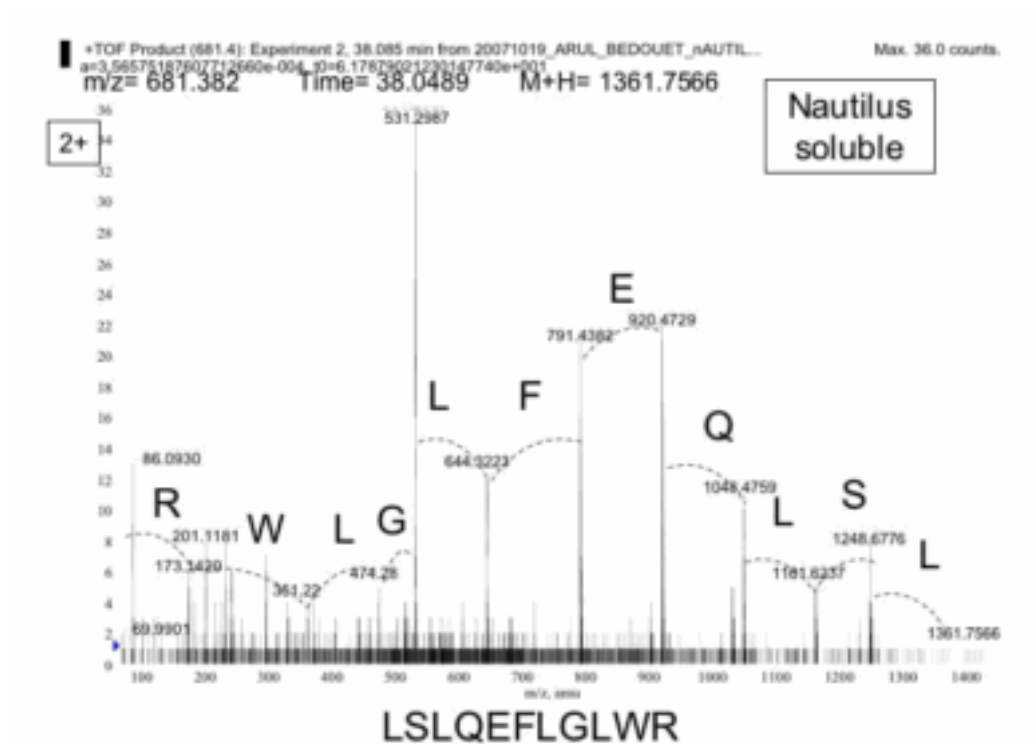


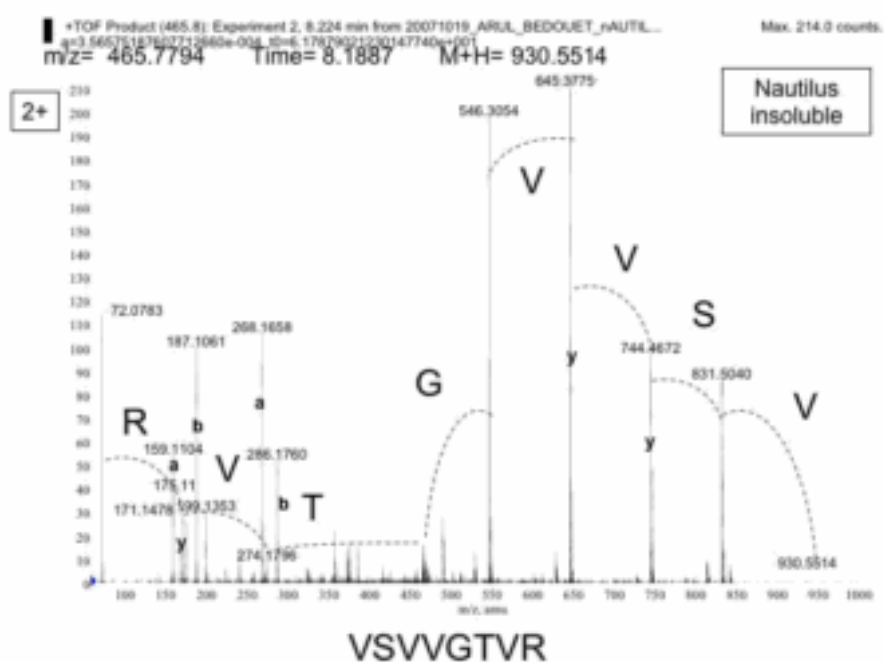
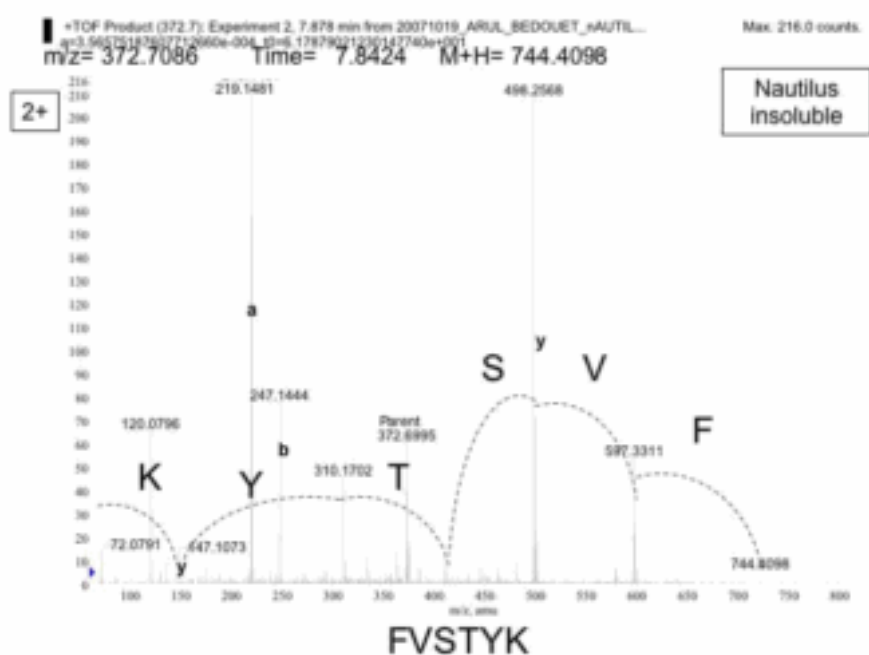


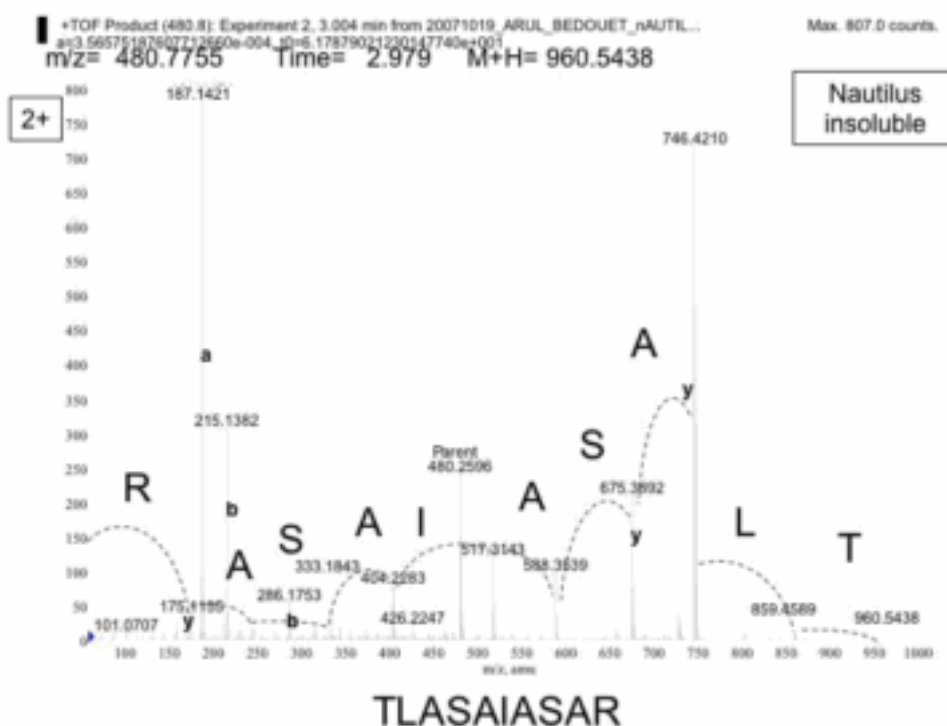
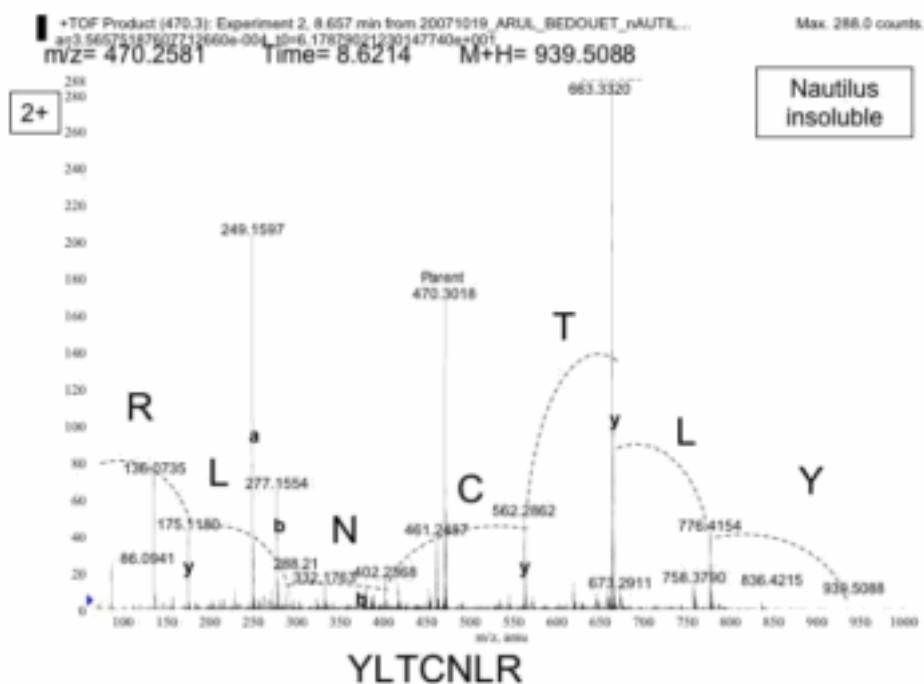


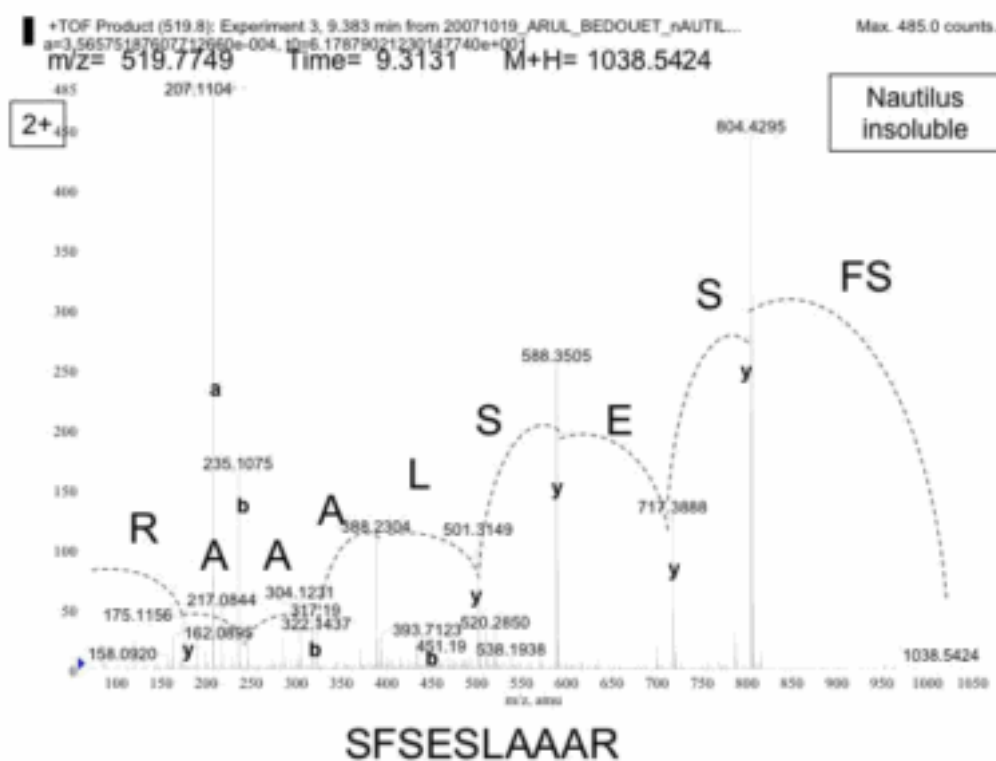
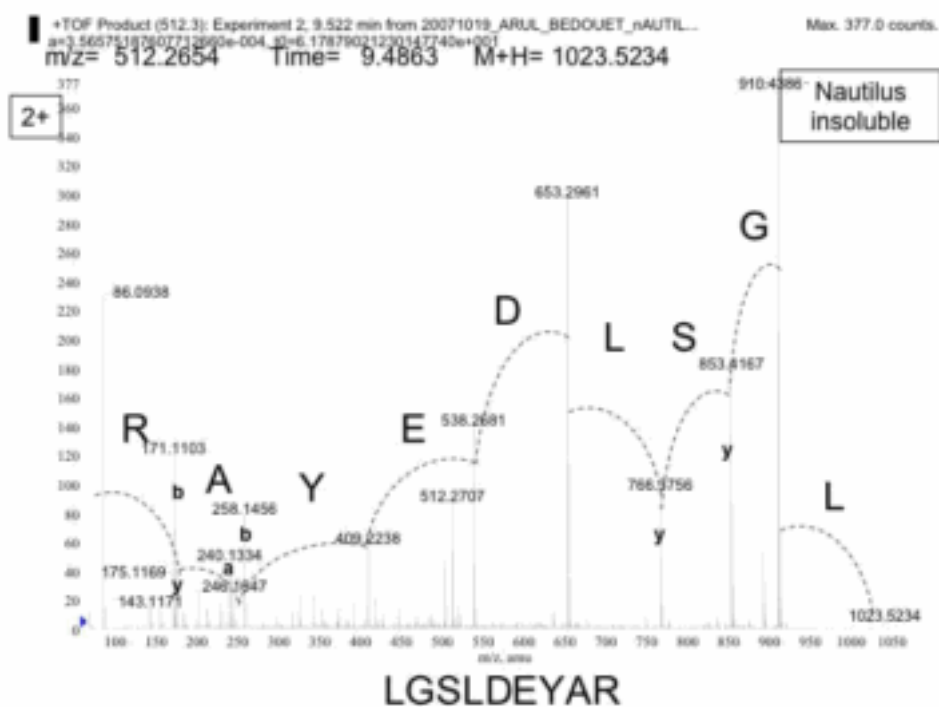


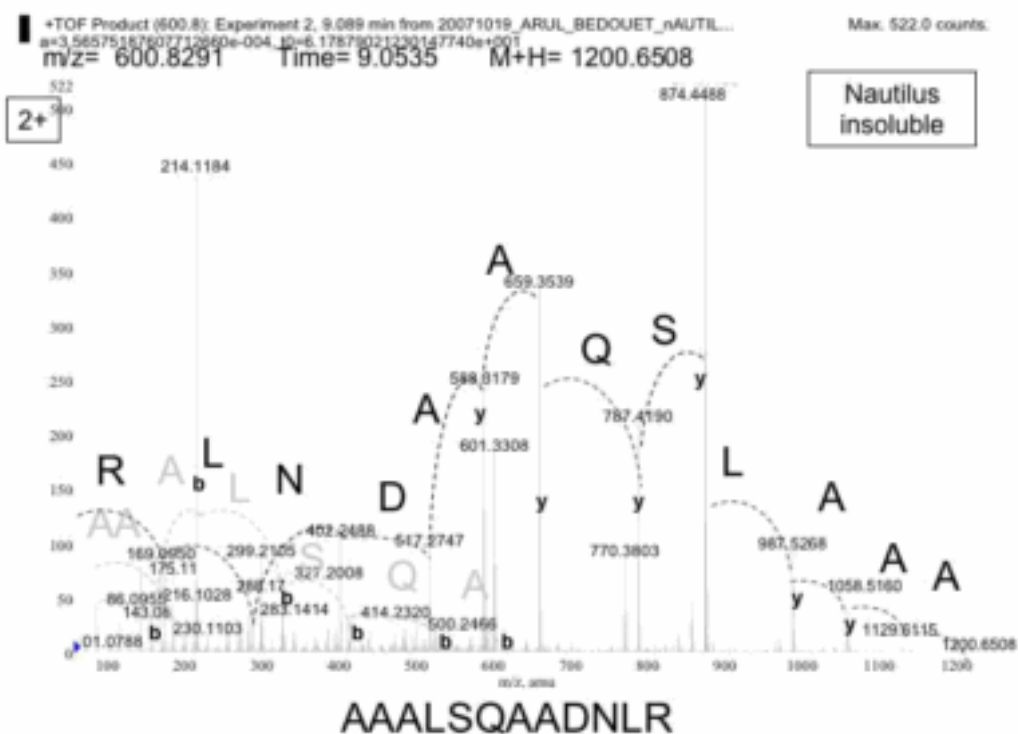
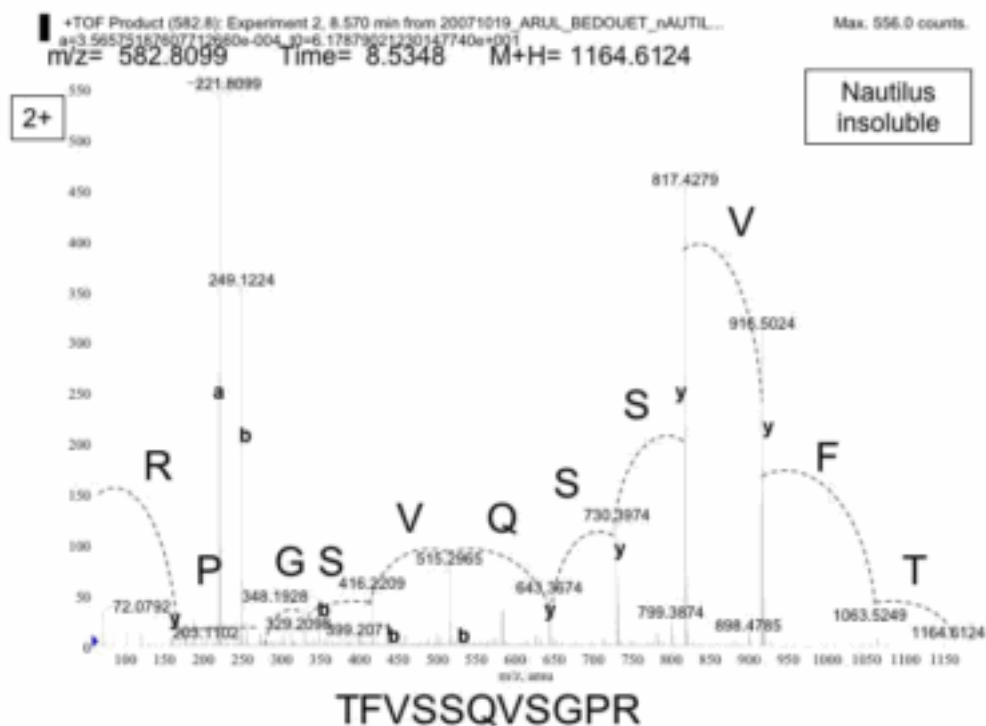


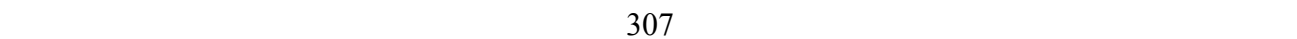


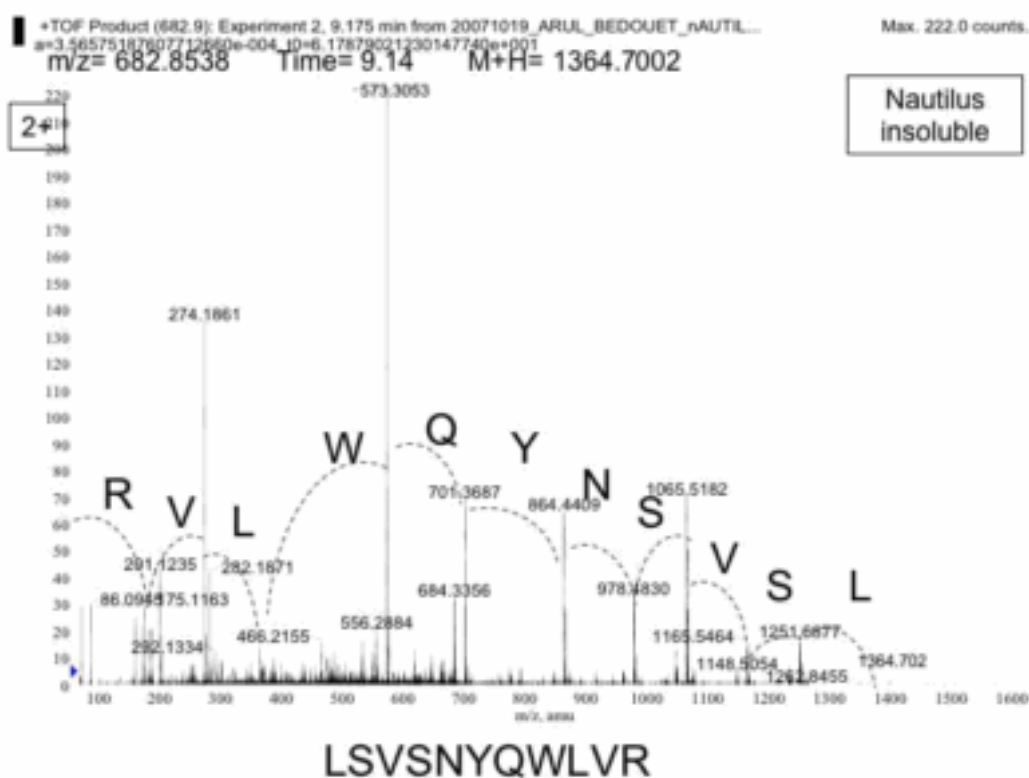
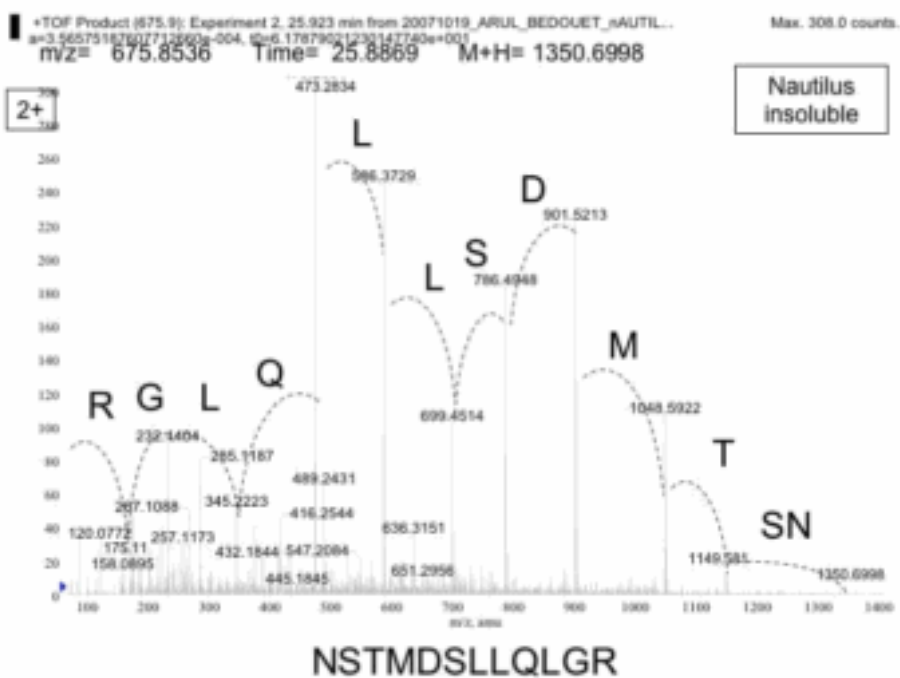
4 - Analyses ESI-QqTOF/TOF de l'ASM de *Nautilus macromphalus*

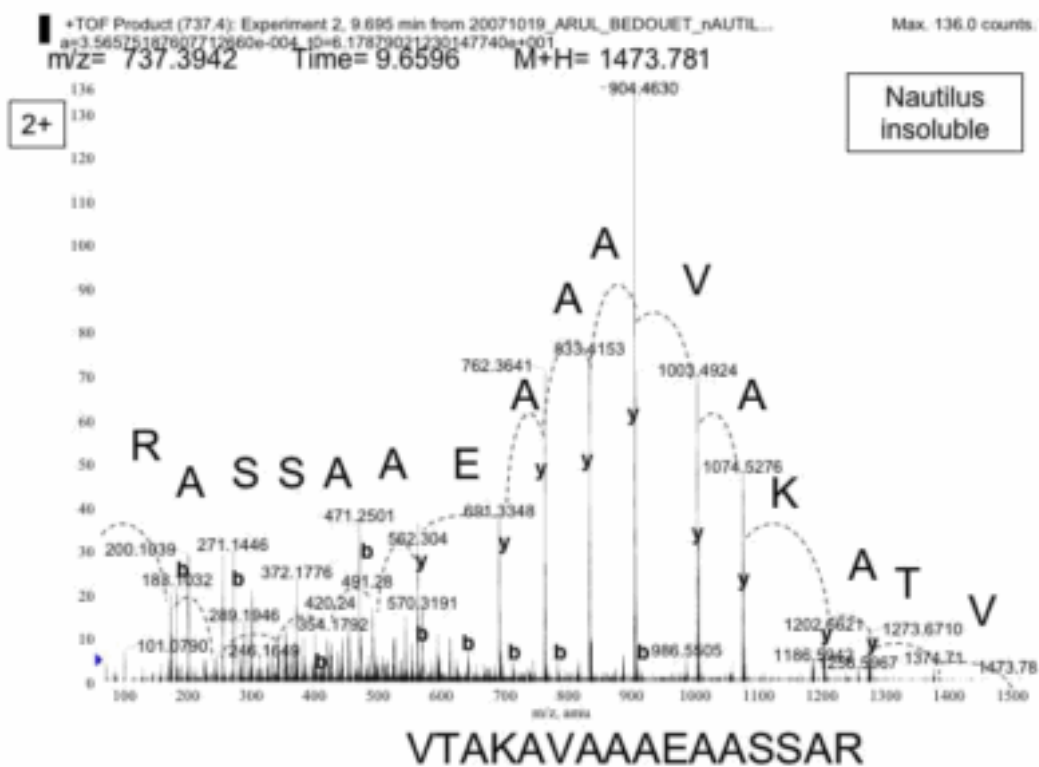
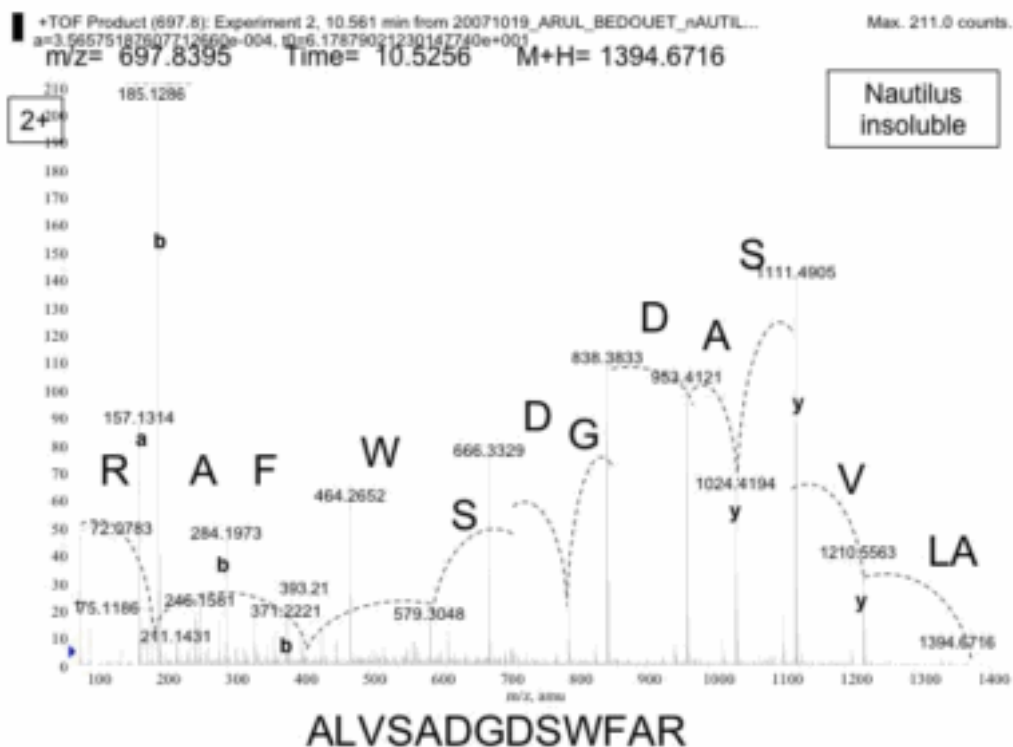


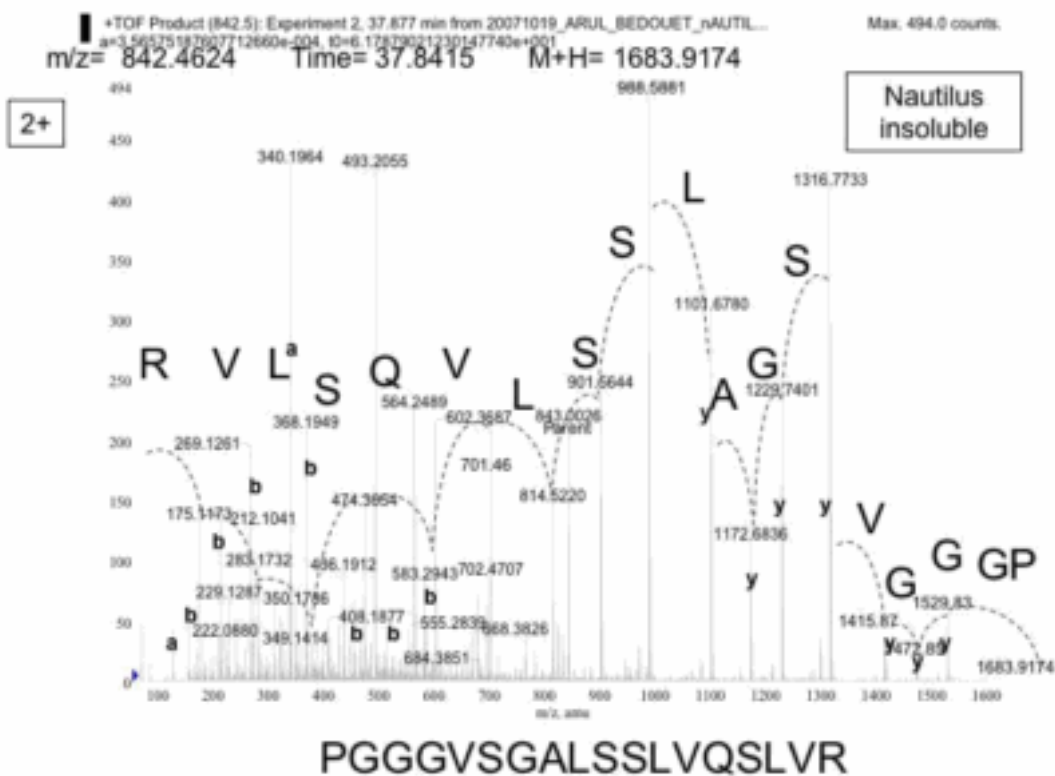
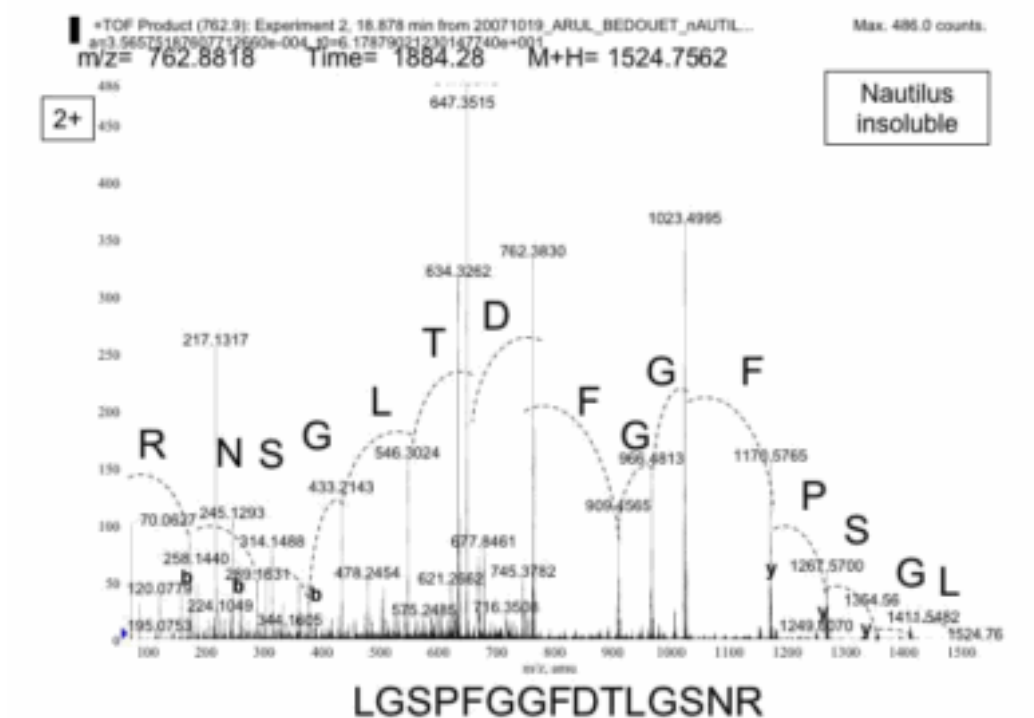


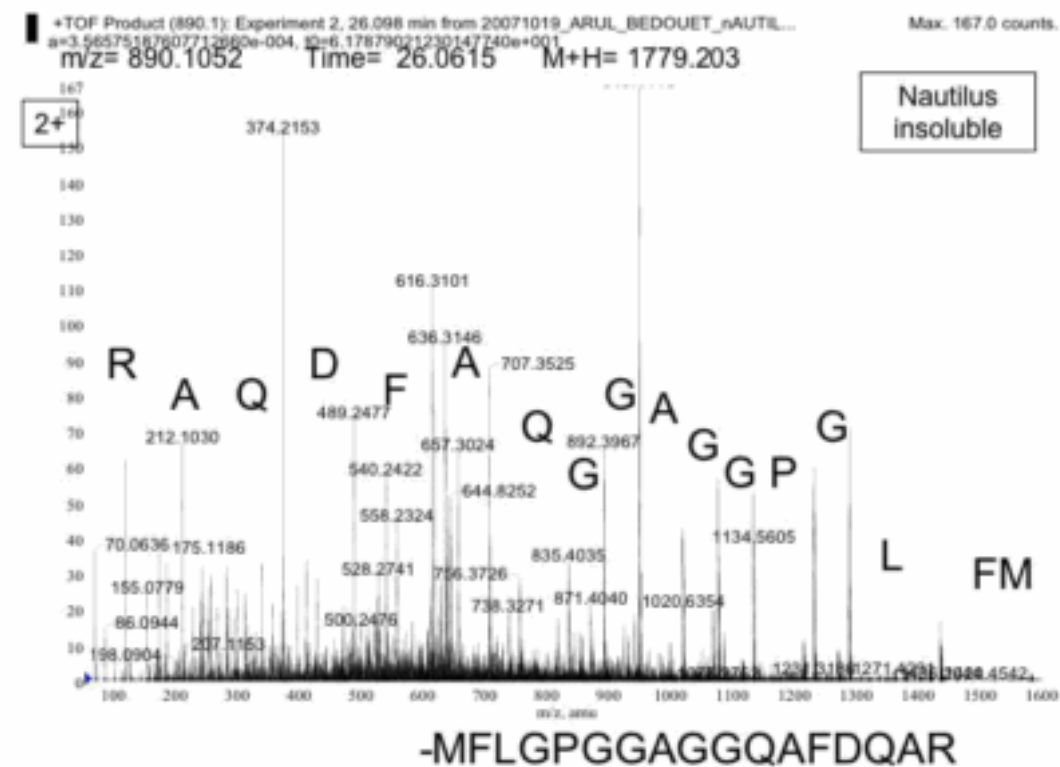
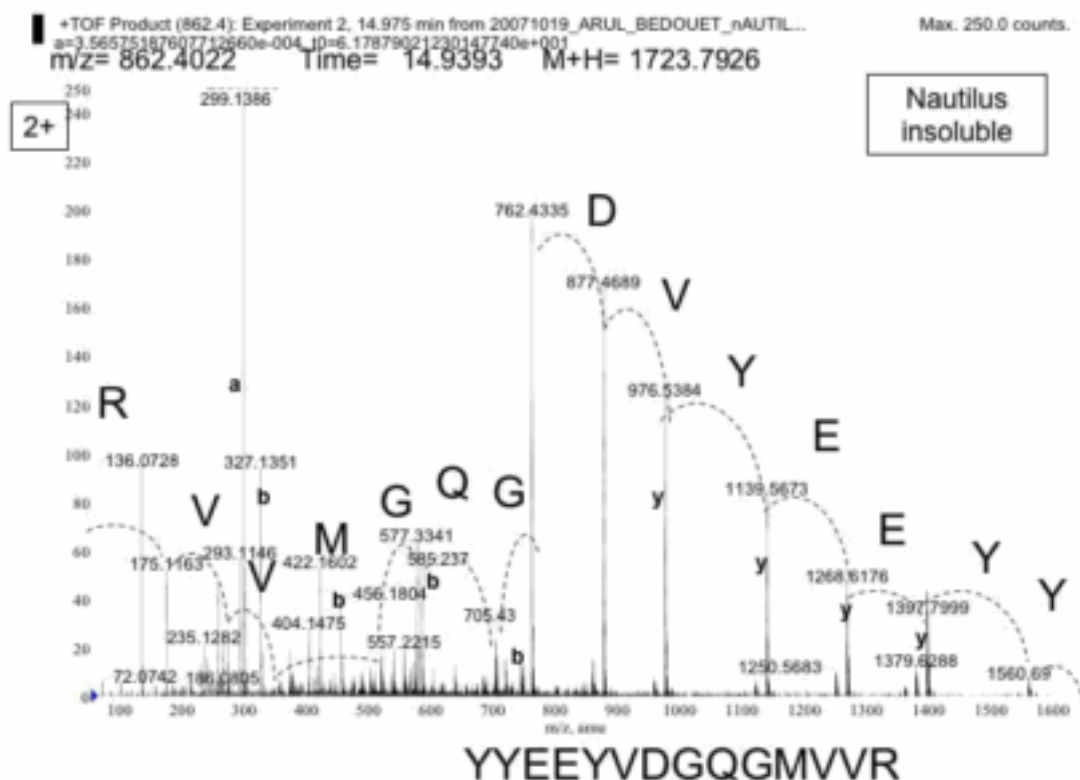


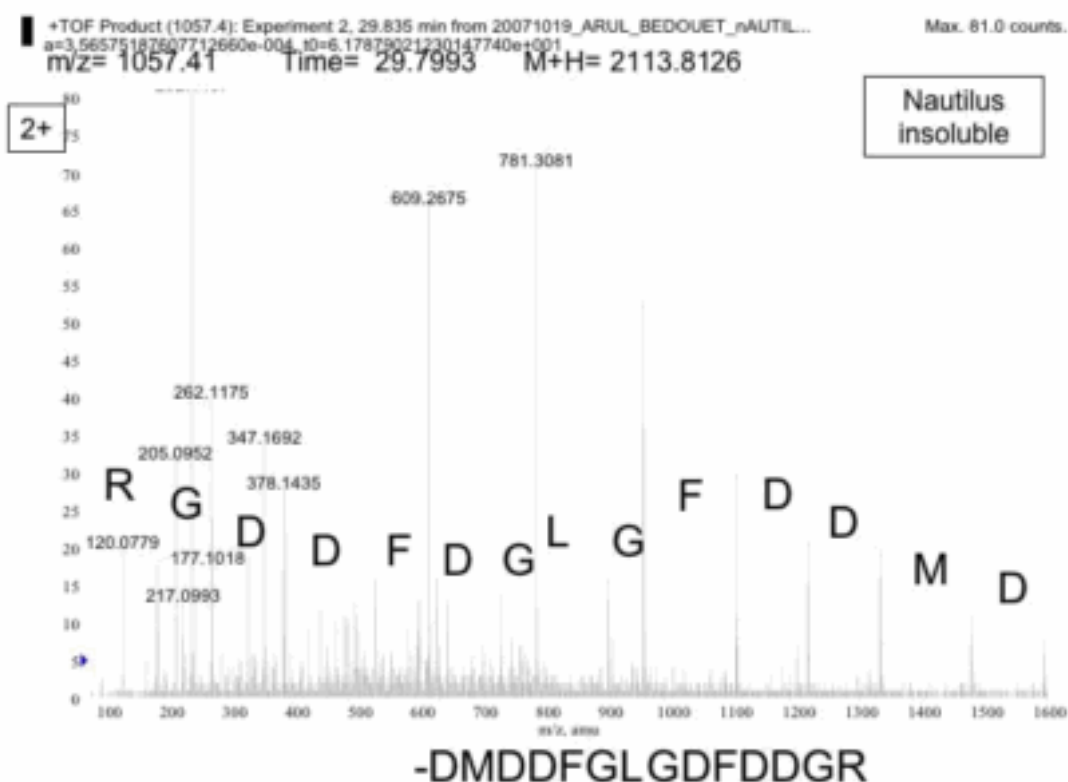
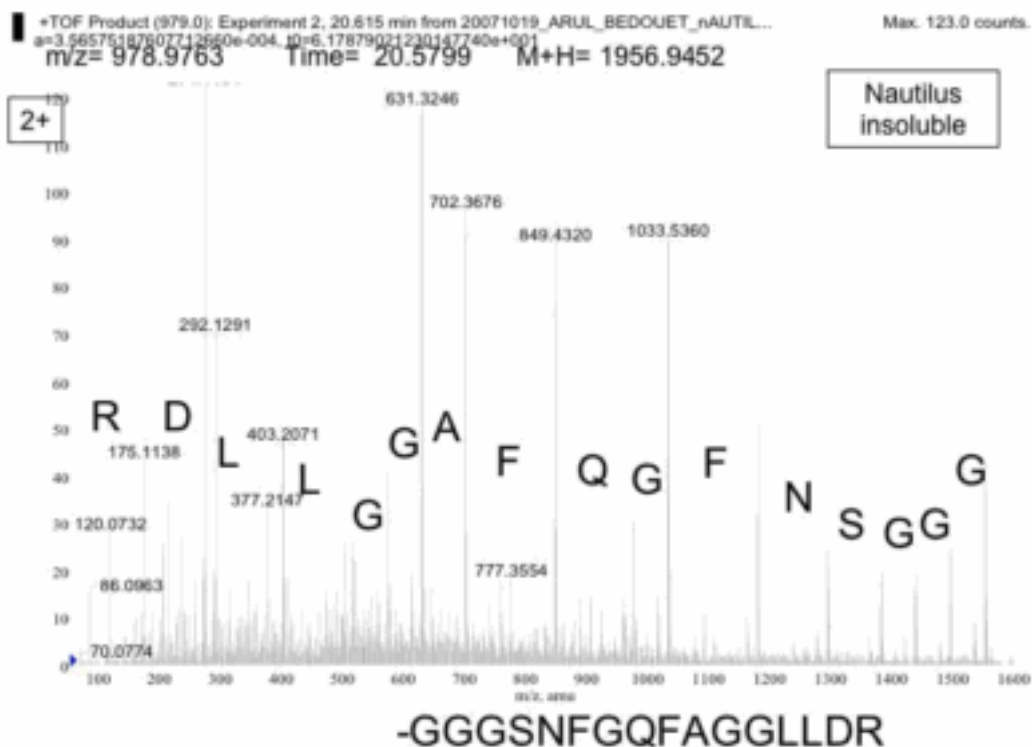












Abstract

In metazoan, molluscan shells are one of the most fascinating examples for the investigation of the calcium carbonate biomineralization phenomenon. These exoskeletons are secreted by the outer epithelium of the calcifying mantle. They are composed of 95% of mineral – calcite and/or aragonite -, the rest of the shells being constituted by a mixture of proteins, glycoproteins and polysaccharides, called the organic matrix. This calcifying matrix is directly involved in biomineralization.

This PhD work is focussed on the characterization of organic components associated to the nacreous layer. In molluscs, the nacre is observed in shells of extent species of bivalves, gastropods, cephalopods and also monoplacophorans. Most of the published data on macromolecular compounds of the nacre matrices are based on few species belonging to the genera *Pinctada* and *Pinna* for bivalves, and to the genus *Haliotis* for gastropods. In this study, we investigated the characterization of these compounds in two new models, the freshwater mussel *Unio pictorum* and the cephalopod *Nautilus macromphalus*. We think that this comparative approach highlights the molecular mechanisms of nacre formation and their evolutionary story within nacreous shell molluscs.

Unio pictorum is a freshwater bivalve, very common in Burgundy, which exhibits a nacro-prismatic shell exclusively composed of aragonite. Its nacre-associated organic matrix exhibits a remarkable carbonic anhydrase activity, a key enzyme in calcification processes, which had already been detected in the shell of *Pinctada* sp.. SDS-PAGE run under denaturing conditions shows that the acido-soluble nacre matrix is mainly composed of 5 discrete proteins of 95, 50, 29, 16 and 12 kDa apparent molecular weight. A glycosylation study shows that the three heaviest components are substantially glycosylated proteins bearing acidic residues, which are directly involved in mineralization processes. Notably, the 95-kDa protein, which is specific of the nacreous layer, carries sulfated sugars implicated in calcium-binding activity and in the capacity to interact with *in vitro* CaCO₃ crystal precipitation. Partial internal sequences of the nacre-associated proteins were described with mass spectrometry approach.

The nacro-prismatic shell of the cephalopod *Nautilus macromphalus* is fully aragonitic. SDS-PAGE shows that the acido-soluble matrix is composed of high molecular weight polysaccharides, 63- and 57-kDa glycoproteins and 3-4 calcium-binding proteins migrating between 20 and 10 kDa. On 2-DE, the different components of the nacre matrix migrate either at very acidic or at very basic pI. Partial sequences were obtained by mass spectrometry analysis from purified proteins and complete acido-soluble and acido-insoluble matrix after tryptic digestion. The new sequences exhibit partial similarities with bivalvian nacre proteins, but no homology was detected with gastropod nacre proteins.

Furthermore, we performed a preliminary study of acido-soluble matrices from Rhynchonelliformean brachiopod shells. This work shows that in this phylum the mechanisms of shell formation involve the production of a shell-associated calcifying matrix, which is composed of discrete macromolecular compounds exhibiting various biochemical properties.

Key words: Biomineralization, mollusk, nacre, organic matrix, evolution, biochemistry, glycosylation, mass spectrometry, *Unio pictorum*, *Nautilus macromphalus*, brachiopodes.

Résumé

Chez les métazoaires, la coquille des mollusques constitue un objet d'étude de référence pour comprendre les phénomènes de formation des biominéralisations carbonatées. La coquille, sécrétée par l'épithélium minéralisant du manteau, est constituée à plus de 95% de carbonate de calcium - calcite et/ou aragonite, et de moins de 5% d'une matrice organique composée de protéines, de glycoprotéines et de polysaccharides. Cette matrice calcifiante est directement impliquée dans les processus de formation du biominéral.

Ce travail de thèse consiste en l'étude de la matrice organique associée à la couche nacrée. Chez les mollusques, la nacre est présente dans les coquilles de certains représentants actuels des bivalves, des gastéropodes, des céphalopodes, mais aussi des monoplacophores. La très grande majorité des données publiées sur les constituants macromoléculaires des matrices associées à la nacre concerne exclusivement les genres *Pinctada* et *Pinna*, pour les bivalves, et le genre *Haliotis*, pour les gastéropodes. Ce travail met en œuvre une approche comparative de ces composés à travers la caractérisation biochimique des matrices de deux nouveaux modèles. Nous considérons que cette approche comparative nous permettra de proposer de nouvelles hypothèses quant aux mécanismes de formation de la nacre, mais également quant à l'évolution de ces constituants organiques au sein des mollusques nacrés.

Le premier modèle étudié est le mollusque d'eau douce *Unio pictorum*, un bivalve à coquille nacro-prismatique très commun des cours d'eau bourguignons. La matrice organique acido-soluble extraite de la couche nacrée présente une activité enzymatique de type anhydrase carbonique, une enzyme essentielle aux processus de calcification, déjà observée par ailleurs chez *Pinctada* sp.. Des électrophorèses réalisées en conditions dénaturantes sur cette matrice acido-soluble montrent la présence de cinq protéines majoritaires de masses moléculaires apparentes 95, 50, 29, 16 et 12 kDa. L'étude de la glycosylation de ces protéines nous a montré que les protéines de masses moléculaires 95, 50 et 29 kDa, étaient des glycoprotéines fortement glycosylées et que leurs ramifications saccharidiques étaient directement impliquées dans les processus de minéralisation. Notamment, la glycoprotéine de 95 kDa, spécifique de la couche nacrée, porte une quantité remarquable de sucres sulfatés qui sont impliqués dans sa capacité à lier les ions Ca_2^+ ou à interagir avec la précipitation du CaCO_3 *in vitro*. Des séquences partielles internes ont pu être obtenues pour les différentes protéines de la matrice acido-soluble de la nacre grâce à des analyses par spectrométrie de masse.

Le second modèle est le céphalopode *Nautilus macromphalus* dont la coquille nacro-prismatique est entièrement composée d'aragonite. Des électrophorèses de la matrice acido-soluble ont montré qu'elle est composée de polysaccharides de haut poids moléculaire, de glycoprotéines migrant aux alentours de 60-50 kDa et de 3-4 protéines de masses moléculaires apparentes comprises entre 20 et 10 kDa, capables de lier le calcium *in vitro*. Sur gel d'électrophorèse à deux dimensions, les différents constituants organiques de la matrice acido-soluble migrent soit à des valeurs de *pI* très acides (inférieur ou égal à 3 unités), soit à des *pI* très basiques (supérieur à 9), alors que chez les autres mollusques non céphalopodes, les protéines de nacre sont faiblement acides ou neutres. Des séquences partielles de ces protéines ont été obtenues par séquençage *de novo* à partir de protéines purifiées par électrophorèses 2-D et de matrice complète analysées par spectrométrie de masse après digestion trypsique. Les nouvelles séquences observées présentent des similitudes avec des protéines de nacre décrites chez les bivalves Pteriomorpha, mais aucune homologie n'a pu être détectée avec les protéines décrites chez les gastéropodes.

Nous avons également décrit, dans une étude préliminaire, les matrices acido-solubles extraites des coquilles de brachiopodes Rhynchonelliformea. Ce travail montre que, chez ce groupe externe aux mollusques, les mécanismes moléculaires de calcification impliquent également la production d'une matrice calcifiante composée de macromolécules aux propriétés biochimiques diverses.

Mots clés : Biominéralisation, mollusque, nacre, matrice organique, biochimie, glycosylation, spectrométrie de masse, évolution, *Unio pictorum*, *Nautilus macromphalus*.