HAL
open science

Caractérisations physico-chimiques des biominéraux carbonatés de Mollusques actuels et fossiles : le cas des structures entrecroisées

Julius Nouet

To cite this version:

Julius Nouet. Caractérisations physico-chimiques des biominéraux carbonatés de Mollusques actuels et fossiles : le cas des structures entrecroisées. Sciences de la Terre. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA112066 . tel-00984962

HAL Id: tel-00984962

https://theses.hal.science/tel-00984962

Submitted on 29 Apr 2014

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 Paris-Sud

Ecole Doctorale 534 Mipege
Laboratoire UMR IDES 8148

Discipline : Sciences de la Terre

Thèse de doctorat

Soutenue le 9 Avril 2014 par

Julius Nouet

Caractérisations physico-chimiques des biominéraux carbonatés de Mollusques actuels et fossiles : le cas des structures entrecroisées.

Directeur de thèse :	Mme. Yannicke Dauphin	MCF (Université Paris Sud)
Composition du jury :		
Président du jury :	M. Alain Baronnet	Professeur (Université Aix-Marseille)
Rapporteurs :	M. Gilles Luquet	Professeur (MNHN)
	M. Luc Ortlieb	Directeur de Recherche (IRD)
Examinateurs :	Mme Cécile Quantin	Professeur (Université Paris Sud)
	Mme Corinne Chevallard	Chercheur CEA (CEA Saclay)
	M. Jean-Philip Brugal	Directeur de Recherche (CNRS)

Table des matières

Introduction **5**

L'évidence du contrôle biologique - Comparaison entre *Pinctada* et *Nerita* **11**
1.1 Introduction à l'analyse microstructurale. 11
1.1.1 La coquille de *Nerita*. 11
1.1.2 Organisation microstructurale. 14
1.1.3 Micro-spectroscopie confocale Raman. 19
1.1.4 Remobilisation de la coquille. 21
1.1.5 *Conclusion* : le contrôle des morphologies des coquilles. 21
1.2 Niveaux du contrôle biologique. 23
1.2.1 Compositions biochimiques (XANES - SRFTIR - RAMAN). 23
Pinctada margaritifera. 23
Compositions biochimiques in-situ dans la coquille de *Nerita undata* 24
1.2.2 Initiation des orientations cristallines. 30
Les centres des prismes chez *Pinctada margaritifera* juvénile. 30
Vers un mécanisme similaire dans l'initiation de l'alternance lamellaire croisée 32
chez *Nerita* ? 32
1.2.3 Des enveloppes organiques délimitant les unités microstructurales ? 36
1.2.4 *Synthèse préliminaire* : La forte spécialisation du manteau 40
1.3 Modalités de cristallisation 43
1.3.1 Propagation de la cohérence chez *Pinctada margaritifera* 43
1.3.2 Propagation de la cohérence cristalline chez *Nerita undata* 47
AFM 47
FEG-SEM / TEM 49
1.3.3 Le rôle des enveloppes 54

Variabilités spécifiques **57**
2.1 Microstructure lamellaire croisée 58
2.1.1 Organisations microstructurales des coquilles 58
Cardium sp. 58
Cypraea leviathan et *Murex sp.* 60
Megathura crenulata 63
Tridacna sp. 67
Patella vulgata 70
2.1.2 Extractions de la matrice organique 72
Caractérisation de la fraction soluble 72
Caractérisation de la fraction insoluble 73
2.1.3 *Conclusion* 73
2.2 Folié croisé : *Patella vulgata* 76
2.2.1 Morphologie et organisation microstructurale 76
Le folié croisé 76
Patella vulgata 76
2.2.2 Composition biochimique in-situ 81

2.2.3 *Synthèse préliminaire* : modalités de cristallisation chez *Patella vulgata.* . . 82

Evolutions diagénétiques **85**
3.1 *Patella sp.* (˜100 ka, El Harhoura 2, Témara, Maroc) 86
3.1.1 Contexte 86
3.1.2 Morphologie et Microstructures 87
3.1.3 Caractérisation biochimique in-situ 92
3.1.4 Extraits organiques 94
3.1.5 Effet de cuisson 95
Spectroscopie FT-IR sur poudre 96
Fraction lipidique 98
3.2 *Velates perversus* (˜ 50 Ma, Mercin-et-Vaux, France) 99
3.2.1 Contexte 99
3.2.2 Morphologie et Microstructure 100
3.2.3 Évolution diagénétique 104
3.2.4 Caractérisations biochimiques 108
FT-IR 108
Microscopie confocale Raman 108
3.3 Diagénèse des microstructures entrecroisées 110

Conclusions et perspectives **113**
4.1 Conclusions 113
4.2 Perspectives 117

Matériels et méthodes **121**
5.1 Matériels 121
5.2 Méthodes 121
5.2.1 Microscopies optiques 121
Microscopie en lumière polarisée analysée. 121
Microscopie de fluorescence. 122
Microscopie confocale à balayage laser. 122
5.2.2 Microscopies électroniques 125
Microscopie Électronique à Balayage (MEB). 125
Microscopie Électronique en Transmission (MET). 126
Microsonde Électronique. 127
5.2.3 Microscopie de force atomique (AFM) 127
Mode contact. 127
Mode tapping. 128
Mode QNM. 129
5.2.4 Spectroscopies 129
Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FT-IR). 129
Micro- spectroscopie confocale Raman. 130
Micro- spectroscopie XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure). . . 131
5.2.5 Chromatographies 131
Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). 131
Chromatographie en phase gazeuse (GC). 132

Bibliographie **132**

Annexes **145**

Introduction

Introduction

Parmi la grande diversité des structures carbonatées produites par les organismes vivants, les coquilles de mollusques ont très tôt suscité un grand intérêt, et soulevé la question fondamentale de leur mode de formation (Réaumur, 1709). Il est en effet établi dès le milieu du 19e siècle (Bowerbank, 1843) que les squelettes et coquilles sont acellulaires, et que leur minéralisation constitue un processus extra-cellulaire : ce dernier résulte de l'activité sécrétrice de cellules de tissus spécialisés (dans le cas qui nous concerne, il s'agit de la bordure du manteau des mollusques). Ces cellules sont capables de produire des unités cristallines très régulièrement arrangées, dont les géométries sont particulièrement bien définies et spécifiques des différentes couches formant les coquilles. Les premières véritables études microstructurales systématiques des coquilles des mollusques (Bøggild, 1930; Taylor *et al.*, 1969) ont par la suite démontré la forte dépendance taxonomique des organisations et morphologies cristallines. Ces premiers éléments ont ainsi très tôt mis en évidence la nécessité de mécanismes de contrôle fort, qui permettent aux mollusques de diriger précisément la formation et la croissance de leurs coquilles : pour autant, les processus fondamentaux de la biominéralisation carbonatée et de son contrôle biologique par l'organisme restent encore, à ce jour, à élucider.

Une deuxième évidence du rôle actif de l'organisme dans la minéralisation de son squelette apparait dès le développement des premiers traceurs paléo-environnementaux : lorsque Urey *et al.* (1951) tentent d'appliquer leur premier paléothermomètre, basé sur le ratio des isotopes de l'oxygène, sur le rostre d'une belemnite du Jurassique, ils constatent une variation significative de la relation de thermo-dépendance par rapport aux mesures réalisées à partir d'expériences de précipitations inorganiques in-vitro (McCrea, 1950). Cette première constatation démontre ainsi que la biominéralisation carbonatée ne peut être expliquée d'après les seuls mécanismes de croissance cristalline en solution. Il sera observé par la suite que cet "effet vital" est lui aussi dépendant de la taxonomie : ainsi différentes espèces de coraux, élevées dans les mêmes conditions, enregistrent bien une variation du ∂^{18}O selon la température, mais avec une pente qui est propre à chaque espèce (Weber et Woodhead, 1972). L'utilisation des traceurs environnementaux dans les biominéraux devient dès lors empirique, et la nécessité d'une calibration corrigeant ce biais systématique, et ce pour chaque espèce étudiée, ne fait que refléter l'incompréhension des processus fondamentaux de biominéralisation (Blamart *et al.*, 2005; Meibom *et al.*, 2007).

Parallèlement, on soupçonne rapidement les matrices organiques présentes dans les coquilles de jouer un rôle majeur dans les processus conduisant à leur formation. La présence de molécules organiques associées à la phase minérale est en effet observée assez tôt dans les biominéraux. Ainsi, dès 1808 De Bournon rapporte la présence d'une matière "gélatineuse placée par l'animal" dans les coquilles, et ces constituants seront par la suite regroupés sous une appellation générique : "conchyoline" (Frémy, 1855). Il faut attendre l'apparition des techniques de biochimie analytique (chromatographie, électrophorèse, etc.) pour que l'on puisse préciser la complexité de ces assemblages moléculaires, à partir de la fraction organique extraite (Abelson, 1954, 1957; Tanaka *et al.*, 1960; Crenshaw, 1972; Weiner, 1979 étant parmi les premiers). Ces investigations ont, là aussi, illustré la forte dépendance taxonomique des compositions biochimiques de ces matrices organiques. Ces premiers résultats ont donc conduit à soupçonner ces assemblages moléculaires, pourtant présents en très petites quantités (quelques % en masse), de constituer en réalité la clé du contrôle biologique : ce serait donc par l'intermédiaire de ces molécules, sécrétées par les cellules de l'organe

minéralisant, que l'organisme pourrait véritablement maitriser la formation de sa coquille.

Les modèles de biominéralisation qui intègrent cette notion d'une phase organique capable de moduler les morphologies et/ou minéralogies de la phase minérale, sont souvent appelés "matrix mediated" ou "organic templated" (Wada, 1961; Lowenstam, 1981; Mann, 1988; Lowenstam et Weiner, 1989; Weiner et Addadi, 1991; Ehrlich, 2010). Mais la multiplicité des modèles que l'on trouve dans la littérature ne fait que refléter notre compréhension encore largement imparfaite des mécanismes à l'œuvre : modèles "organic templated" tel que cité ci-dessus, mais aussi les modèles de "compartimentation" (Nakahara et Bevelander, 1971), d'auto-assemblages de nano-blocs conduisant à des "mésocristaux" (Cölfen et Antonietti, 2008; Vielzeuf *et al.*, 2010; Floquet et Vielzeuf, 2011). Et certains auteurs récents suggèrent encore l'intervention de mécanismes de pure croissance cristalline en solution (Checa, 2000; Rodriguez-Navarro *et al.*, 2011).

Les seules observations microstructurales, ou les seules analyses de la matrice organique extraite des coquilles et décorrélées de l'organisation architecturale, sont insuffisantes pour rendre pleinement compte de la complexité des processus de biominéralisation. Les répartitions des molécules organiques sont hétérogènes dans les coquilles, intimement liées à l'organisation microstructurale des couches ; et, si certains composés sont inter-cristallins, telles les membranes séparant tablettes de nacre (Grégoire, 1957, 1960, 1967) ou prismes (Wada, 1961; Grégoire, 1961, etc.), d'autres sont incorporés dans la phase minérale à des échelles infra-micrométriques (Mutvei, 1969; Krampitz *et al.*, 1976; Cuif *et al.*, 1980; Weiner et Traub, 1984; Kobayashi et Samata, 2006; Weiner, 2008).

La compréhension des mécanismes de biominéralisation passe donc, nécessairement, par l'observation et la caractérisation in-situ des associations organo-minérales à l'échelle où celles-ci interviennent lors de la formation du test, c'est à dire des échelles microstructurales jusqu'à l'échelle moléculaire. Assez tôt, des tentatives ont été réalisées dans ce sens, principalement à l'aide de décalcifications observées par microscopie électronique en transmission (Grégoire *et al.*, 1955; Grégoire et Teichert, 1965; Mutvei, 1969; Uozumi *et al.*, 1971) ou à balayage (Taylor *et al.*, 1969). Ces dernières permettent de localiser les zones enrichies en composés organiques (les membranes ou enveloppes organiques peuvent par exemples être mises en évidence). Quelques caractérisations in-situ ont même été effectuées, à l'aide d'hydrolyses réalisées avec des enzymes (Keller, 1981; Cuif *et al.*, 1981).

Mais c'est véritablement le développement récent des techniques d'imageries, telles les techniques de microspectroscopie XANES (Pickering *et al.*, 1998; Dauphin *et al.*, 2003a, 2005; De Stasio *et al.*, 2005; Dauphin *et al.*, 2008) ou infrarouge (Boskey et Camacho, 2007; Cotte *et al.*, 2008; Dauphin *et al.*, 2008, 2010; Lebon *et al.*, 2011), de microscopies confocales (Dauphin *et al.*, 2008; Nehrke et Nouet, 2011) ou de microspectrométrie de masse (Heim *et al.*, 2009; Farre *et al.*, 2011), etc. qui rendent aujourd'hui possibles des investigations bien plus poussées.

Les principaux types structuraux des Mollusques

Un deuxième point doit être pris en considération. Pour d'évidentes raisons de simplicité, la majorité des études portant sur les mollusques, et donc des modèles de minéralisation qui en découlent, s'est focalisée sur les coquilles ne présentant que des microstructures simples, en général une couche externe composée de larges prismes en calcite (Figure 1a) et une couche interne composée de tablettes de nacre en aragonite (Figure 1b) (Travis, 1968; Nakahara et Bevelander, 1971; Nudelman *et al.*, 2006; Dauphin *et al.*, 2008 etc.).

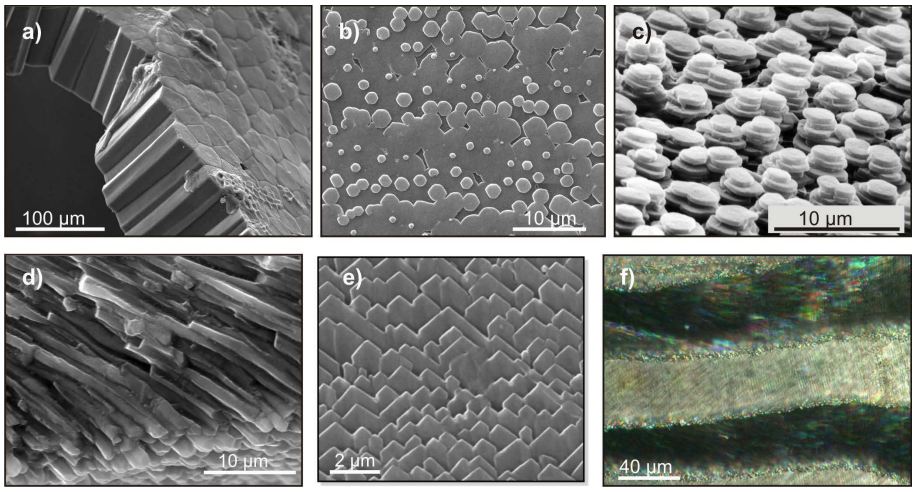


FIGURE 1 – a) Prismes simples (calcite), *Pinna nobilis*. b) Nacre (aragonite), *Pinctada margaritifera*. c) Nacre (aragonite), *Haliotis*. d) Prismes fibreux (calcite), *Mytilus edulis*. e) Folié (calcite), *Crassostrea gigas*. f) Folié croisé (calcite), *Patella vulgata*.

Mais les coquilles de mollusques peuvent être beaucoup plus complexes, présenter un plus grand nombre de couches, associant différents types microstructuraux (Bøggild, 1930; Kobayashi, 1971; Taylor *et al.*, 1973). Au sein des principaux types usuellement décrits (dont quelques exemples sont illustrés figure 1), on notera de plus une grande variabilité : ainsi, les structures prismatiques, qui sont généralement en calcite, peuvent aussi exister en aragonite. La nacre, toujours aragonitique, est très différente chez les bivalves (organisation en mur de brique, figure 1b) et chez les gastéropodes (tablettes superposées en piles d'assiettes, figure 1c). En réalité, le modèle nacro-prismatique ne concerne qu'un nombre restreint de taxons. A l'inverse, les types entrecroisés (lamellaire croisé et folié croisé) sont de loin les plus abondants (Bøggild, 1930) : en ce qui concerne la classe des bivalves par exemple, 50% des familles présentent au moins une couche lamellaire-croisée, et, bien souvent, la totalité de la coquille est composée de multiples couches lamellaires croisées. Par comparaison, 25% seulement présentent une couche nacrée (Figure 2). En ce qui concerne les gastéropodes, la proportion est encore plus faible. Mais ces types restent très peu abordés dans les études de biominéralisation, et ce paradoxe entre l'abondance de données pour une couche assez rare (la nacre) et le peu d'informations disponibles sur la couche la plus fréquente (le lamellaire-croisé) est frappant.

Or il convient bien évidemment, si l'on souhaite aboutir à une meilleure compréhension des mécanismes fondamentaux qui dirigent la (les) biominéralisation(s) des coquilles des mollusques, de vérifier dans quelle mesure les modèles de biominéralisation développés à partir de coquilles "simples" sont aussi applicables à des organisations microstructurales plus complexes.

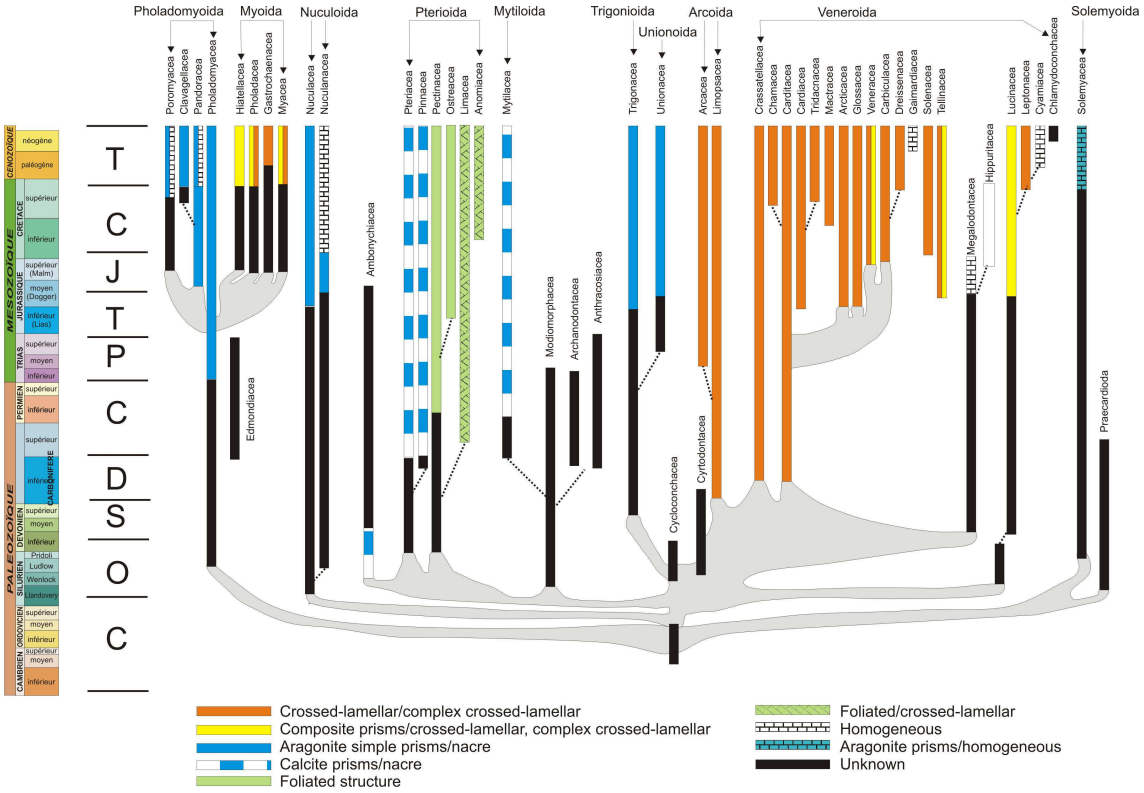


FIGURE 2 – Essai de reconstruction phylogénique des bivalves et distribution des principaux groupes microstructuraux constituant leurs coquilles (modifié d'après Taylor *et al.*, 1973).

La microstructure lamellaire-croisée

L'architecture fondamentale de la microstructure lamellaire croisée (Bowerbank, 1843; Bøggild, 1930; Kobayashi, 1964; Taylor *et al.*, 1969; Denis, 1972; Wilmot *et al.*, 1992) a fait l'objet de plusieurs précisions et corrections. Nous emploierons dans cette étude l'appellation "lamellaire croisée" telle que définie par McClintock (1967) ; ce dernier dissocie la microstructure aragonitique (lamellaire croisée) de la structure calcitique (nommée pour l'occasion folié-croisé), qui avaient été toutes deux auparavant regroupées sous l'appellation "lamellaire-croisé" par Bøggild (1930), ce qui pouvait être source de confusion.

Cette structure est composée d'unités entrelacées à plusieurs ordres de grandeurs distincts. Ses éléments constitutifs de base sont de petites unités cristallines allongées, de 100 à 200 nm de largeur (nommées lamelles ou bâtonnets de 3e ordre), juxtaposées et arrangées en feuillets parallèles (ou lamelles de 2e ordre), et dont l'épaisseur correspond donc à la largeur d'une unité de 3e ordre (Figure 3b). La répétition de ces feuillets constitue les unités plus larges de 1er ordre, de section à peu près rectangulaire ; les feuillets de 2e ordre (et donc des bâtonnets de 3e ordre) constituant chaque lamelle de 1er ordre forment avec la surface de croissance (surface verte sur le schéma 3b) un angle constant compris entre 16° et 44° selon l'espèce considérée (McClintock, 1967) ; ces feuillets de 2e ordre changent de plus alternativement d'orientation une lamelle de 1er ordre sur deux (Figure 3b).

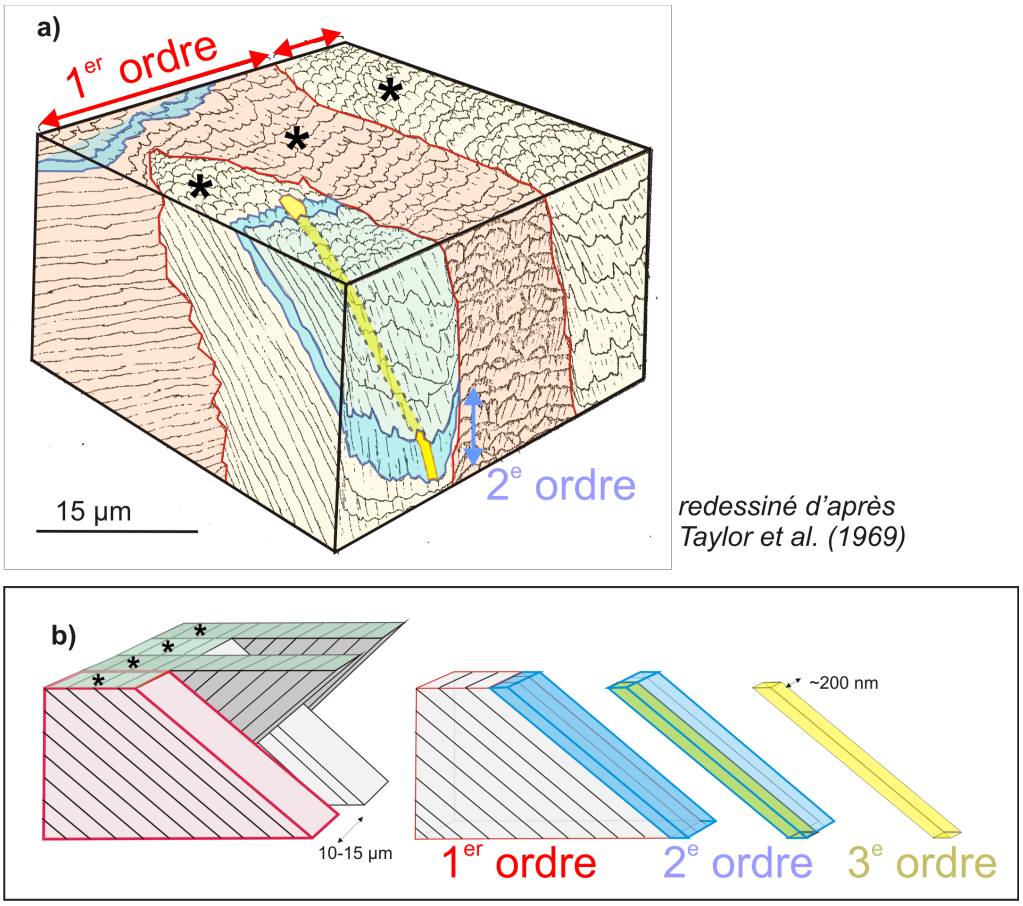


FIGURE 3 – a) Bloc diagramme schématique de la structure lamellaire croisée. b) Schéma de l'agencement respectif des lamelles de 1er (rouge), 2e (bleu) et 3e (jaune) ordre au sein de la microstructure.

Les lamelles de 1er ordre sont relativement fines (largeurs typiquement comprises entre 10 et 15-20 µm, McClintock, 1967) mais peuvent être continues, dans leur longueur, sur toute l'épaisseur de la couche. Les limites entre les lamelles de 1er ordre ne sont pas toujours rectilignes, certaines unités fusionnent ou se terminent en pointe ce qui peut conduire à des motifs parfois complexes, très variables selon l'orientation des coupes (Figure 3a). De plus, l'orientation des lamelles de 1er ordre peut changer selon la couche considérée : elles sont dites longitudinales lorsqu'elles sont perpendiculaires à la bordure de croissance de la coquille, concentriques (ou transverses chez les gastéropodes) lorsqu'elles sont parallèles à la bordure.

Additionnés aux circonvolutions de la surface de croissance chez certaines espèces, et/ou à l'enroulement spiralé typique des gastéropodes, les organisations tridimensionnelles ainsi formées peuvent rapidement devenir complexes, ce qui a conduit à les ignorer largement.

Notre étude se focalise donc sur les microstructures entrecroisées des coquilles des mollusques, dans le but de mettre en évidence les différents niveaux du contrôle biologique exercé par l'organisme sur la formation et la croissance de ces types microstructuraux. A cette fin, nous privilégierons les techniques de caractérisation in-situ (ou, à défaut, de localisation) des assemblages organiques, en relation étroite avec les organisations microstructurales et les modalités de cristallisation à fine échelle.

1. Nous nous concentrerons dans un premier temps sur un cas d'étude, *Nerita* (Neritidae, Gastropoda), petit gastéropode dont la coquille, composée de deux couches (une couche externe calcitique et une couche interne aragonitique), fournit l'occasion d'une comparaison directe avec la transition calcite → aragonite de coquilles nacro-prismatiques telles celle de *Pinctada margaritifera* (Pteriidae, Bivalvia).Mais une étude fine de cette transition chez *Nerita* devrait en outre permettre de préciser les modalités de la mise en place de la microstructure lamellaire-croisée sur la couche calcitique sous-jacente. Finalement, l'étude des associations organo-minérales à échelle sub-micrométrique dans la couche interne de *Nerita* fournira les premiers éléments permettant de préciser certaines des modalités de la cristallisation du type lamellaire-croisé.

2. Nous comparerons ensuite la coquille de *Nerita* à d'autres couches lamellaire-croisées de différents gastéropodes et bivalves, ainsi qu'à la microstructure foliée-croisée (que l'on ne rencontre que chez les Patellinae). Nous tenterons ainsi de dégager les variabilités spécifiques, relatives à la taxonomie, des facteurs partagés par tous les taxons, et qui pourraient suggérer des mécanismes fondamentaux communs.

3. Enfin, nous documenterons certains aspects de la diagénèse/taphonomie des microstructures foliées-croisées et lamellaires-croisées, à travers deux cas d'études : a) des coquilles de *Patella sp.* (Patellidae, Gastropoda) provenant du Paléolithique moyen du Maroc, et b) des coquilles de *Velates perversus* (Neritidae, Gastropoda), issues de l'Éocène du bassin de Paris. Outre la mise en évidence de quelques mécanismes diagénétiques pouvant affecter ces deux types microstructuraux, des critères permettant un diagnostic de leur état de préservation seront dégagés.

Chapitre I

L'évidence du contrôle biologique - Comparaison entre *Nerita* et *Pinctada*

L'évidence du contrôle biologique - Comparaison entre *Nerita* et *Pinctada*

La coquille de *Nerita* (Neritidae, Gastropoda), est choisie comme cas d'étude pour la microstructure lamellaire croisée. Elle sera comparée à la coquille de *Pinctada margaritifera* (Pteriidae, Bivalvia), maintenant bien connue, et présentée comme référence d'une coquille "simple", nacro-prismatique.

1.1 Introduction à l'analyse microstructurale.

Les coquilles des nérites sont, pour des coquilles de gastéropodes, relativement simples. L'analyse de leur architecture générale et des caractéristiques microstructurales de leurs différentes couches nous permettra d'illustrer, dans un premier temps, certains aspects du contrôle biologique, que l'on peut facilement mettre en évidence par une lecture microstructurale détaillée.

1.1.1 La coquille de *Nerita.*

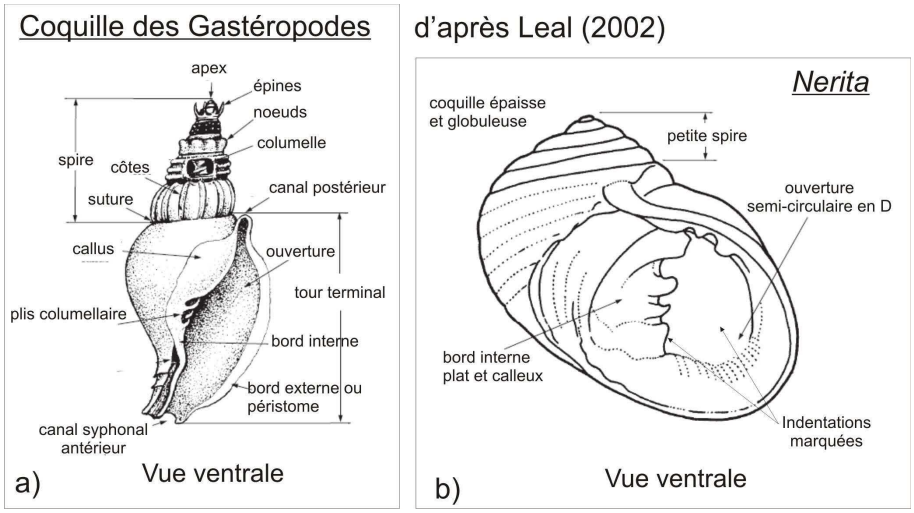


FIGURE 4 – a) Nomenclature générique de coquilles des gastéropodes. b) Caractères morphologiques des coquilles de *Nerita* (d'après Leal, 2002).

Le genre *Nerita* (Neritidae, Gastropoda) est un gastéropode marin qui vit dans les zones intertidales moyennes/hautes en climat tropical, réparti en colonies isolées de quelques dizaines

d'individus le long des rivages rocheux. Les particularités morphologiques de sa coquille sont assez caractéristiques pour les distinguer aisément des autres gastéropodes : assez ovale, celle-ci est épaisse et présente peu de spires, ainsi qu'une surface externe assez lisse (Figure 4a-b). La face ventrale présente un pli columellaire large et une ouverture semi-circulaire en D large et indentée (Figure 5a-b). La couche externe, calcitique, est épaisse (d'épaisseur parfois millimétrique) et peut souvent représenter plus de la moitié de la coquille en masse (Bøggild, 1930). Présente chez tous les Neritoidea, elle constitue d'ailleurs un critère taxonomique discriminant (Suzuki *et al.*, 1991) : cette couche externe est toujours ornementée de motifs colorés, souvent très bien conservés dans le registre fossile (ce qui facilite leur identification taxonomique), à la différence de la couche interne (aragonitique), non pigmentée (Figure 5a-b).

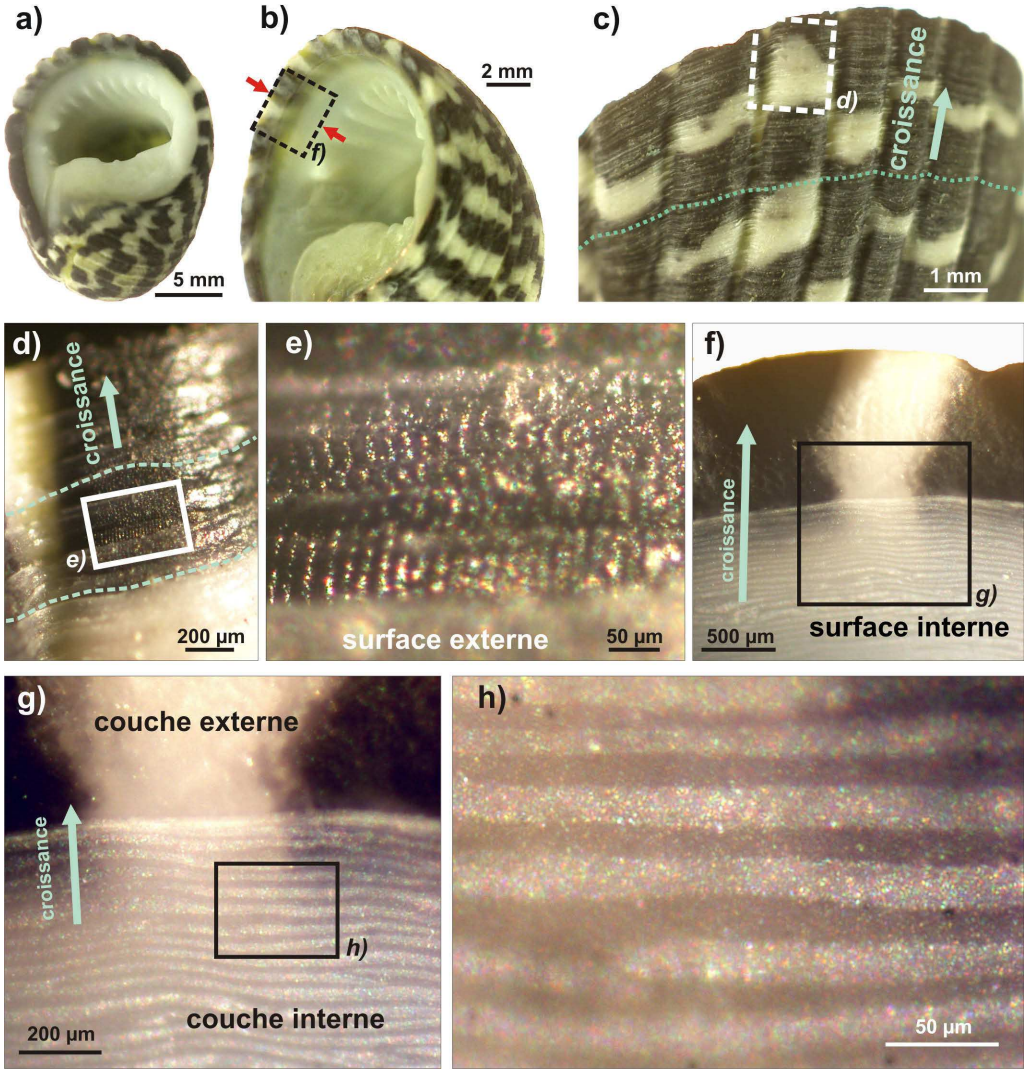


FIGURE 5 – Vue macroscopique d'une coquille de *Nerita sp.* a) Vue ventrale. b-c) Bordure de croissance au bord externe (péristome) de la coquille. d-e) Côtes sur face externe. f-g) Transition couches interne/externe sur face interne. h) couche interne.

Une observation macroscopique met en évidence les principales caractéristiques structurales de la coquille, ainsi que des détails plus fins, comme ces petites ornementations portées par les côtes (Figure 5d-e). L'empreinte des incréments de croissance successifs de la coquille est parfaitement lisible sur la surface externe (Figure 5c).

Le contact entre les couches interne et externe est visible sur la face interne du péristome (Figure 5f), les deux couches étant facilement discernables de par leurs colorations et aspects différents (Figure 5g). Il est déjà possible, sans aucune préparation de la coquille, de caractériser quelques détails microstructuraux (sur la figure 5h, on distingue ainsi déjà les lamelles caractéristiques de la structure lamellaire croisée, de 1er voire même de 3e ordre).

Mais de telles observations sont insuffisantes pour appréhender l'organisation et la mise en place de ces couches, qui nécessitent la réalisation de préparations plus avancées (coupes, caractérisations structurales/cristallographiques/organiques, etc.).

Un autre point d'importance, est de pouvoir visualiser systématiquement la striation de croissance, que l'on tentera de toujours superposer aux microstructures ou cartes de composition ; ce dernier point constituera une préoccupation récurrente tout au cours de cette étude. Les incréments de croissance majeurs sont souvent visibles à l'œil nu (comme sur cette vue macroscopique d'une coupe radiale, Figure 6a-b), mais, à plus petite échelle, il est parfois nécessaire de révéler les stries de croissance à l'aide de traitements spécifiques : attaques acides ménagées (Figure 6c), attaques enzymatiques, colorations, etc. (cf section 5.2).

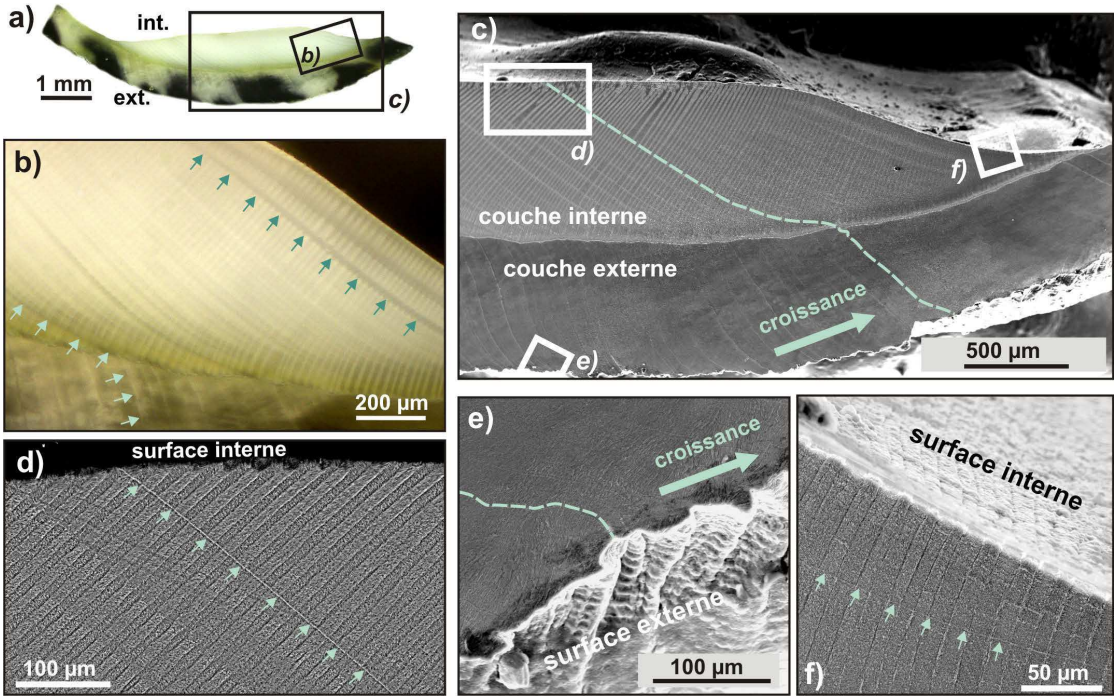


FIGURE 6 – a) Section radiale du péristome. b) et f) Stries de croissance parallèles à la surface de croissance. c) Coupe polie et légèrement attaquée (acide formique 0,1% wt% + glutaraldéhyde 3% v/v, 20 sec). d) Strie de croissance intersectant la surface interne. e) Strie de croissance intersectant la surface externe.

Les coquilles des gastéropodes grandissent principalement par la face interne de leurs bordures, à la fois en longueur et en épaisseur. Dans le cas de *Nerita*, une première série d'observations en section radiale de la bordure de croissance permet de mettre en évidence certaines des modalités de mise en place de la coquille. A l'aide d'attaques acides ménagées, il est possible de révéler le déplacement de la bordure de croissance au cours du temps (Figure 6c,f) ; chaque strie, parallèle à la bordure actuelle, correspond à une position de la surface de croissance à un instant t (la figure 5f présente une vue de la surface actuelle), révélant ainsi la position et la conformation de la partie sécrétrice de l'organe minéralisant (le manteau) à l'instant du dépôt.

Un premier aspect du contrôle biologique qu'exerce l'animal sur la formation de sa coquille, par l'intermédiaire du manteau, apparait alors de façon évidente : l'organe minéralisant est capable de sécréter deux couches distinctes, de par leur minéralogie et leur aspect, et ce de façon parfaitement synchrone - les stries de croissance sont en effet sécantes à la transition entre les deux couches (Figure 6c). Chaque incrément de croissance constitue un lit de minéralisation (Cuif *et al.*, 2008a), dans lequel se déposent simultanément les deux couches : celles-ci sont ainsi sécrétées par deux parties du manteau dont les activités métaboliques diffèrent suffisamment pour engendrer, dans un cas de la calcite, et dans l'autre de l'aragonite. Or si la calcite abiotique est stable dans les Conditions Normales de Température et de Pression (CNTP), l'aragonite abiotique est en revanche un polymorphe instable dans les CNTP.

1.1.2 Organisation microstructurale.

La coquille de *Nerita* présente un double avantage : 1/son organisation simple, composée d'une couche interne lamellaire-croisée transversale (aragonitique) et d'une couche externe prismatique (calcitique), qui permet d'observer les premières étapes de la mise en place de la microstructure lamellaire-croisée. 2/l'organisation lamellaire croisée de la couche interne est des plus simples, avec des lamelles de 1er ordre pratiquement rectilignes (Bøggild, 1930).

Afin de visualiser cette dernière, un bloc est découpé, dont deux faces correspondant aux orientations radiale et transverse (Figure 7a) sont polies et subissent une légère attaque acide, afin de révéler les motifs microstructuraux pour chacune de ces orientations (Figure 7b-c). Les lamelles de 1er ordre constituant la couche interne apparaissent alors, bien rectilignes et orthogonales à la surface de croissance (et donc aux stries de croissance) en coupe radiale ; en coupe transversale (Figure 7c), on observe l'orientation alternée (avec un angle d'environ 80°) des lits de 2e ordre entre 2 lamelles de 1er ordre jointives.

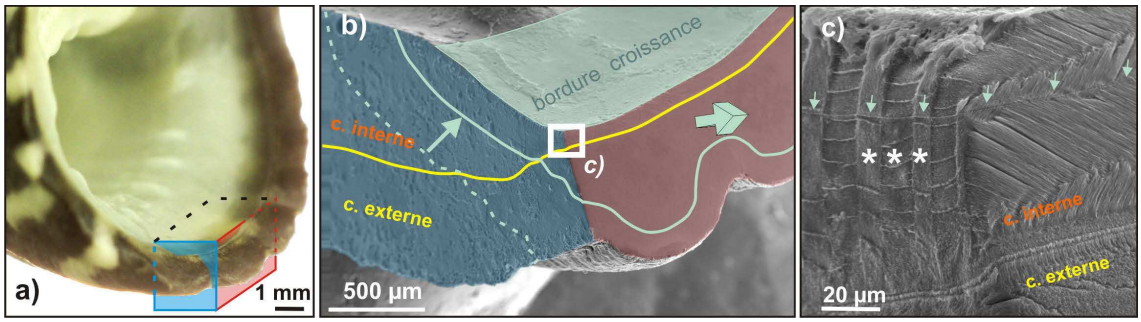


FIGURE 7 – a) Vue ventrale d'une coquille de *Nerita sp.*, figurant les orientations radiales et transverses de deux plans selon lesquels sera coupée la coquille. b) Image MEB du péristome coupé selon ces deux sections orthogonales. c) Vue MEB après légère attaque acide (formique 0,1% wt% + glutaraldéhyde 3% v/v, 30 sec), mettant en évidence la microstructure lamellaire croisée transverse de la couche interne (les * marquent les lamelles de 1er ordre). Les flèches marquent un stade de croissance.

Continuité microstructurale au cours de la croissance.

Les lames minces très peu épaisses (cf section 5.2.1 page 121) offre le double avantage de permettre une lecture fine des microstructures, qui ne se superposent pas (ou très peu comparé à des lames de pétrographie standards de 30 µm d'épaisseur) tout en permettant d'effectuer une première caractérisation de leurs propriétés cristallographiques. En LPNA (Lumière Polarisée Non Analysée), le contraste d'absorption causé par certains composés biochimiques révèle les zones enrichies en matrice organique (et dans certains cas les striations de croissance, comme dans cette zone très pigmentée de la couche externe dans la figure 8a). Le passage en LPA (Lumière Polarisée Analysée) révèle immédiatement les unités cristallines (Figure 8b-c).

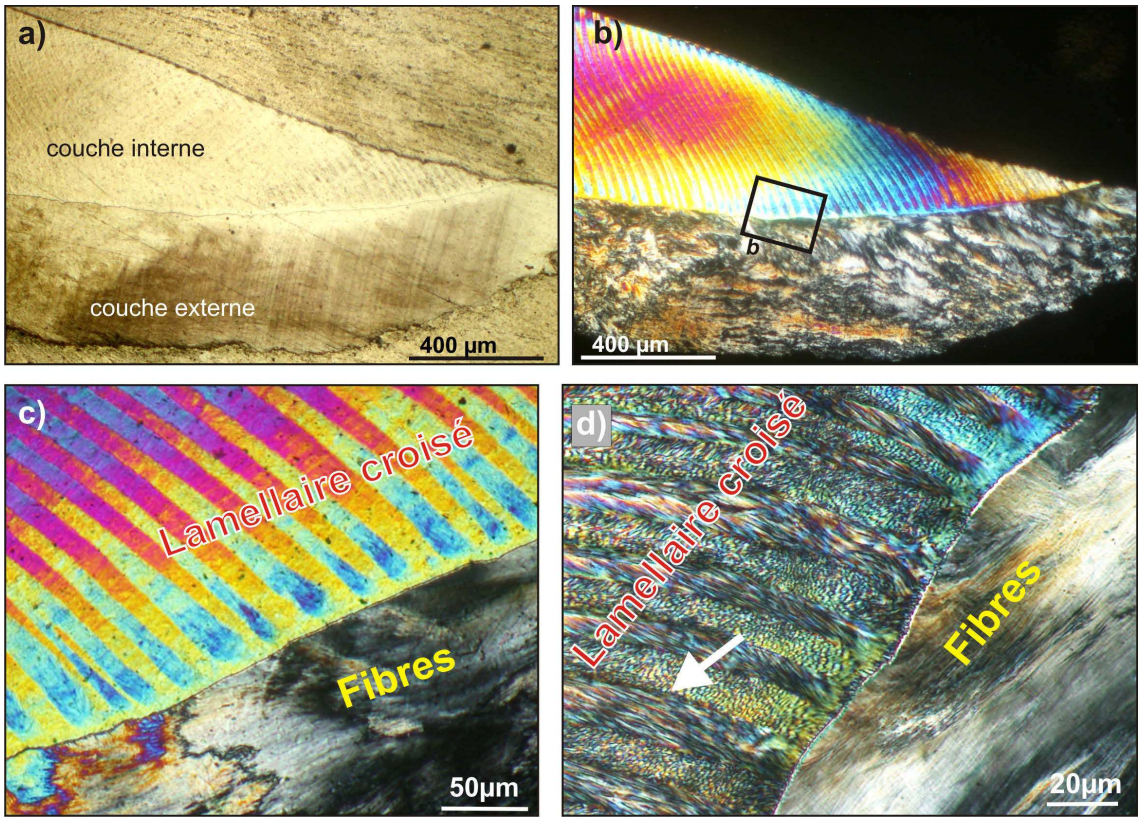


FIGURE 8 – Lame ultra mince d'une section radiale d'une coquille de *Nerita sp.* a) Vue des deux couches constituant la coquille en LPNA b) Même vue en LPA. c-d) transition entre la couche externe fibreuse et la couche interne lamellaire croisée pour différentes rotations des polariseurs croisés. La flèche identifie une lamelle de 1e ordre.

Dans la couche interne, l'orientation alternée typique des lamelles de 1er ordre est visible en LPA (Figure 8c). En jouant sur la rotation des polariseurs croisés(Figure 8d), on peut de plus faire apparaitre les unités de 3e ordre (ainsi que les lits de 2e ordre, lorsqu'ils sont perpendiculaires à la surface de la lame - figure 8d). Lors de la rotation des polariseurs croisés, on observe une extinction des lamelles de 1er ordre (Figure 9a-b), qui apparaissent alors noires. Cette extinction est parfaitement synchrone, une lamelle sur deux (Figure 9c-d), ce qui illustre l'exacte conservation des orientations cristallographiques, latéralement, entre des lamelles qui ne sont pourtant jamais en contact. L'orientation cristallographique au sein de chaque lamelle est de plus conservée lors des incréments de croissance successifs (marqués par des flèches, figure 9b, e) et ce sur toute l'épaisseur de la lamelle (et donc de la couche) : cela sous-entend donc un mécanisme de contrôle fort, capable d'assurer la conservation des orientations cristallines d'unités, qui ne sont pourtant presque jamais jointives entre elles, tout au long de la formation de la couche.

L'observation de la transition, bien délimitée, entre la couche calcitique et la couche aragonitique résume bien la complexité du fonctionnement de la partie sécrétrice du manteau (Figure 9e). Comme vu précédemment, les flèches indiquant deux incréments de croissance successifs marquent la position du manteau à deux instants du dépôt. A l'instant t_1, ce dernier minéralise les deux couches, synthétisant alors de façon synchrone des structures et minéralogies différentes, situées pourtant à moins d'un micron l'une de l'autre. A l'instant t_2, après plusieurs cycles de croissance successifs, le manteau s'est décalé (la partie qui recouvre cette portion de la coquille n'est plus en mesure de sécréter qu'un seul type de dépôt, l'aragonite de structure lamellaire croisée). Malgré ce déplacement, il est pourtant capable d'assurer la continuité des structures initiées précédemment, en conservant leurs orientations respectives (lamelles de 1er ordre marquées d'une "*", figure 9e). De plus, si la transition entre les deux couches est directe, la structure lamellaire-croisée n'est pas présente immédiatement contre la limite : une première couche, d'une épaisseur de l'ordre de 10-15 µm et de couleur de polarisation en nuances de vert en LPA (Figure 9e), se dépose avant que l'alternance des lamelles de 1er ordre ne démarre véritablement. La présence de cette "couche" de transition implique l'existence d'une 3e zone du manteau, dédiée à la sécrétion de cette zone spécifique, située entre les portions sécrétant respectivement la couche fibreuse et la couche lamellaire-croisée : elle illustre le haut degré de spécialisation spatiale des cellules du manteau.

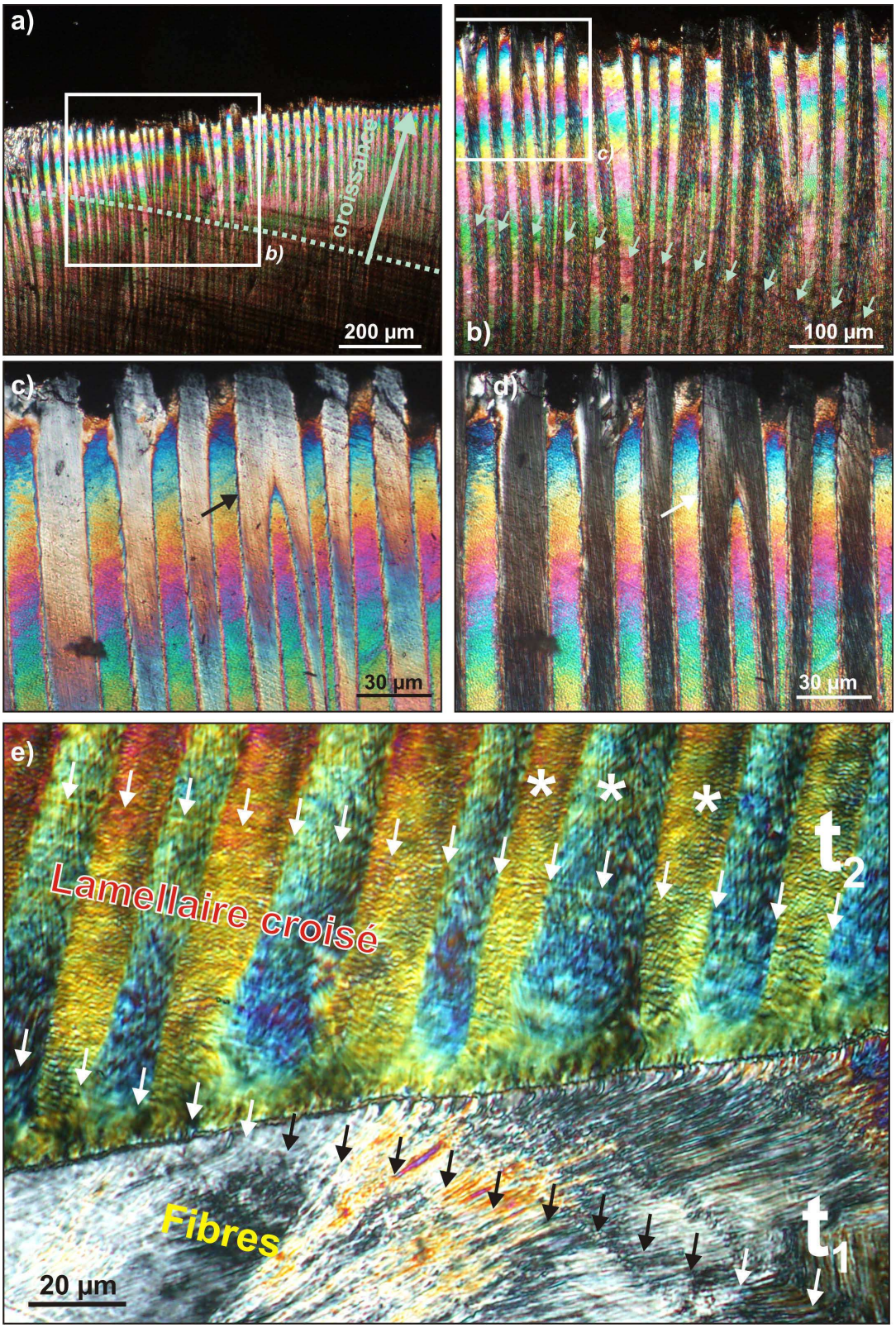


FIGURE 9 – Lame ultra mince d'une section radiale d'une coquille de *Nerita sp.* a-b) coupe de la surface interne du péristome. c-d) Une même série de lamelles de 1er ordre selon deux rotations différentes des polariseurs croisés, illustrant l'extinction simultanée d'une lamelle de 1er ordre sur deux. e) Transition entre les couches calcitique (fibres) et aragonitique (lamellaire croisée).

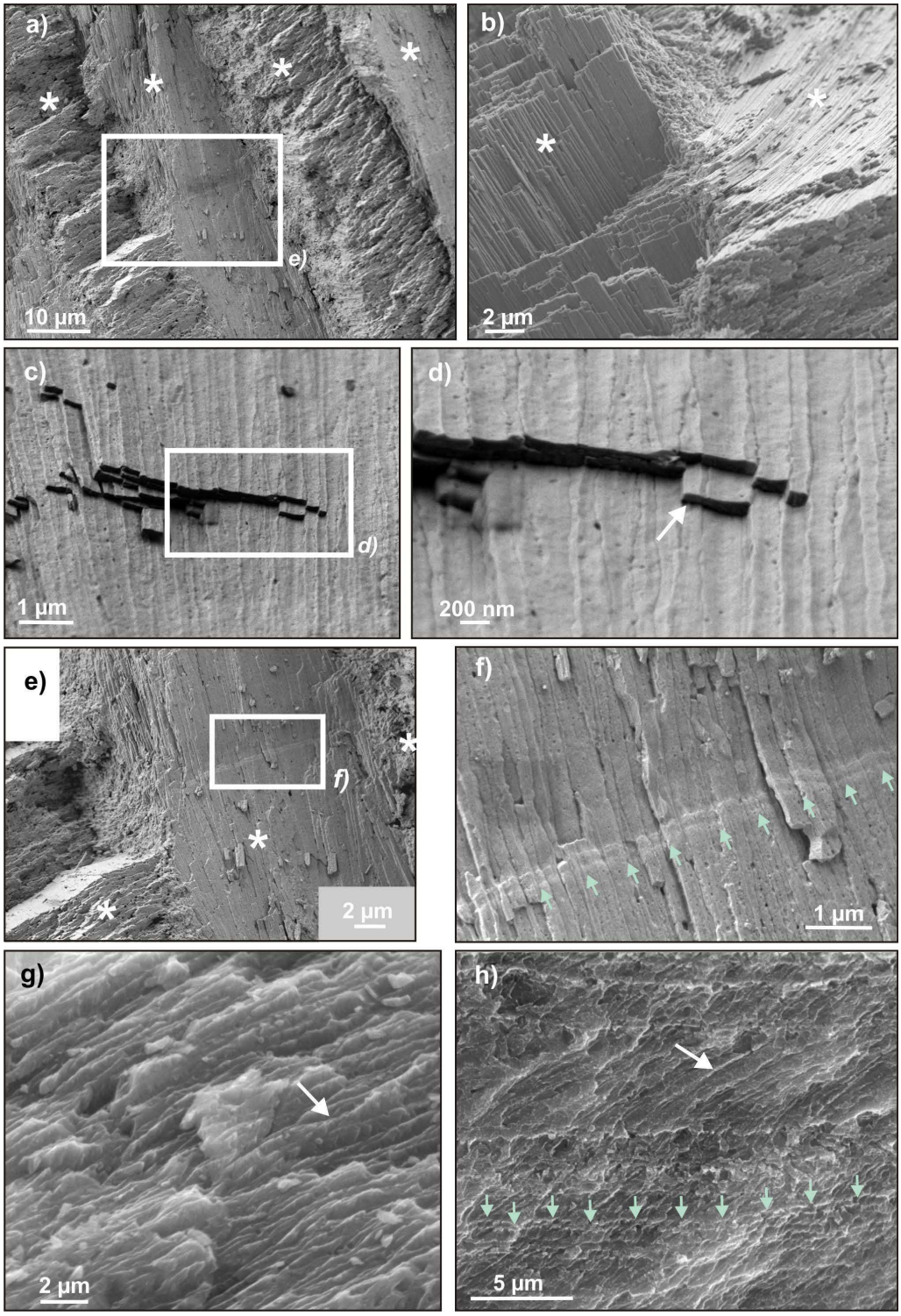


FIGURE 10 – Vues MEB d'une cassure fraiche d'une coquille de *Nerita sp.* selon une section radiale. a-f) Images FEG-SEM de la couche lamellaire croisée interne. a-b) Lamelles de 1er ordre (*), constitués de lits du 2e ordre changeant alternativement d'orientations. c-d) Lits du 2e ordre en vue de surface, constitués par la succession de lamelles unitaires de 3e ordre (flèche blanche). e-f) Une cassure fraiche ayant subi une attaque à la vapeur d'OsO_4, qui révèle deux stries de croissance très marquées (flèches vertes). g-h) Images MEB de la couche fibreuse externe. g) Cassure non attaquée révélant les fibres unitaires (flèche). h) Cassure ayant subi une légère attaque acide (HCl 0.1%, 20 sec), révélant la striation de croissance (flèches vertes).

La capacité du manteau à assurer la continuité des unités microstructurales qui composent les diverses couches de la coquille à travers plusieurs incréments de croissance successifs peut aussi être mise en évidence à plus fine échelle. A première vue, les lamelles de 3e ordre (Figure 10a-d) semblent en effet continues, sur au moins plusieurs microns (Figure 10c). Mais une très légère attaque ménagée permet de révéler quelques stries de croissance marquées (Figure 10e-f), orthogonales aux unités de 3e ordre : ces dernières sont ainsi parfaitement continues à travers la succession des incréments de croissance. De même dans la couche externe, les "prismes" qui apparaissent comme des unités homogènes (Figure 10g) sont en réalité continus à travers la striation de croissance, révélée par attaque ménagée (Figure 10h).

Note concernant la couche externe : Une petite précision doit être apportée quant à la microstructure de la couche externe de *Nerita,* même si celle-ci se situe quelque peu en dehors du champ de notre étude. Il est en effet rapporté, dans la littérature, que cette couche est de type prismatique très irrégulière (Bøggild, 1930), ces prismes étant décrits comme "fins et ondulant d'une manière particulière". Mais toutes les unités observées ici ressemblent d'avantage à des fibres ondulantes et groupées en fagots d'orientations similaires (Figure 8b-c), qu'à des prismes. Nous préfèrerons donc appeler cette couche "couche fibreuse".

1.1.3 Micro-spectroscopie confocale Raman.

La micro-spectroscopie confocale Raman constitue un outil très adapté à la caractérisation microstructurale des coquilles, car elle permet d'identifier et de localiser à la fois les phases minérales et les divers composés organiques, avec une résolution infra-micrométrique (cf section 5.2.4 page 130). Un exemple d'application à la transition entre les couches externes et internes de *Nerita* est présenté figure 11. La calcite est identifiée à l'aide de ses deux modes vibrationnels de maille (vibration en modes translation T_c, 155 cm^{-1}, et libration L_c, à 282 cm^{-1}) et de ses deux modes internes (déformation dans le plan ν_4, à 711 cm^{-1} et élongation symétrique ν_1 à 1085 cm^{-1}), l'aragonite à l'aide de ses deux modes vibrationnels de maille (vibration en modes translation T_A, 152 cm^{-1}, et libration L_A, à 206 cm^{-1}) et de ses deux modes internes (déformation dans le plan ν_4, à 705 cm^{-1} et élongation symétrique ν_1 à 1085 cm^{-1}) (Figure 11a). A la résolution latérale du microscope confocal (de l'ordre de 500 nm pour ces conditions d'acquisition, cf section 5.2.4 page 130), le passage calcite → aragonite est abrupt (Figure 11b, f).

Outre la détermination minéralogique, la spectroscopie Raman localisée permet aussi de fournir des informations relatives aux orientations des phases cristallines (Hopkins et Farrow, 1986). Ainsi, dans l'aragonite, deux types de spectres sont identifiés, pour lesquels les ratios des pics T_a, L_a et ν_1 varient significativement : ces différentes réponses spectrales sont corrélées à deux orientations cristallographiques principales différentes dans l'aragonite, que l'on peut donc caractériser qualitativement et cartographier (Figure 11c-e). Le changement alternatif des orientations des lamelles de 1er ordre peut ainsi être visualisé, tout comme la couche aragonitique de 10 µm d'épaisseur qui suit immédiatement la transition calcite → aragonite, dont l'orientation cristallographique homogène est ainsi confirmée.

Par l'intermédiaire de ces observations, sont mis en évidence deux types de contrôle biologique :

1/ le contrôle de la minéralogie

2/ le contrôle de l'organisation microstructurale.

Dans le cas de la transition entre couches externe et interne de *Nerita*, le changement de minéralogie est ainsi instantané ; mais le changement de microstructure n'est pas aussi immédiat, et la mise en place de l'alternance régulière lamellaire-croisée ne s'établit qu'après plusieurs microns d'un dépôt aragonitique apparemment sans orientation particulière.

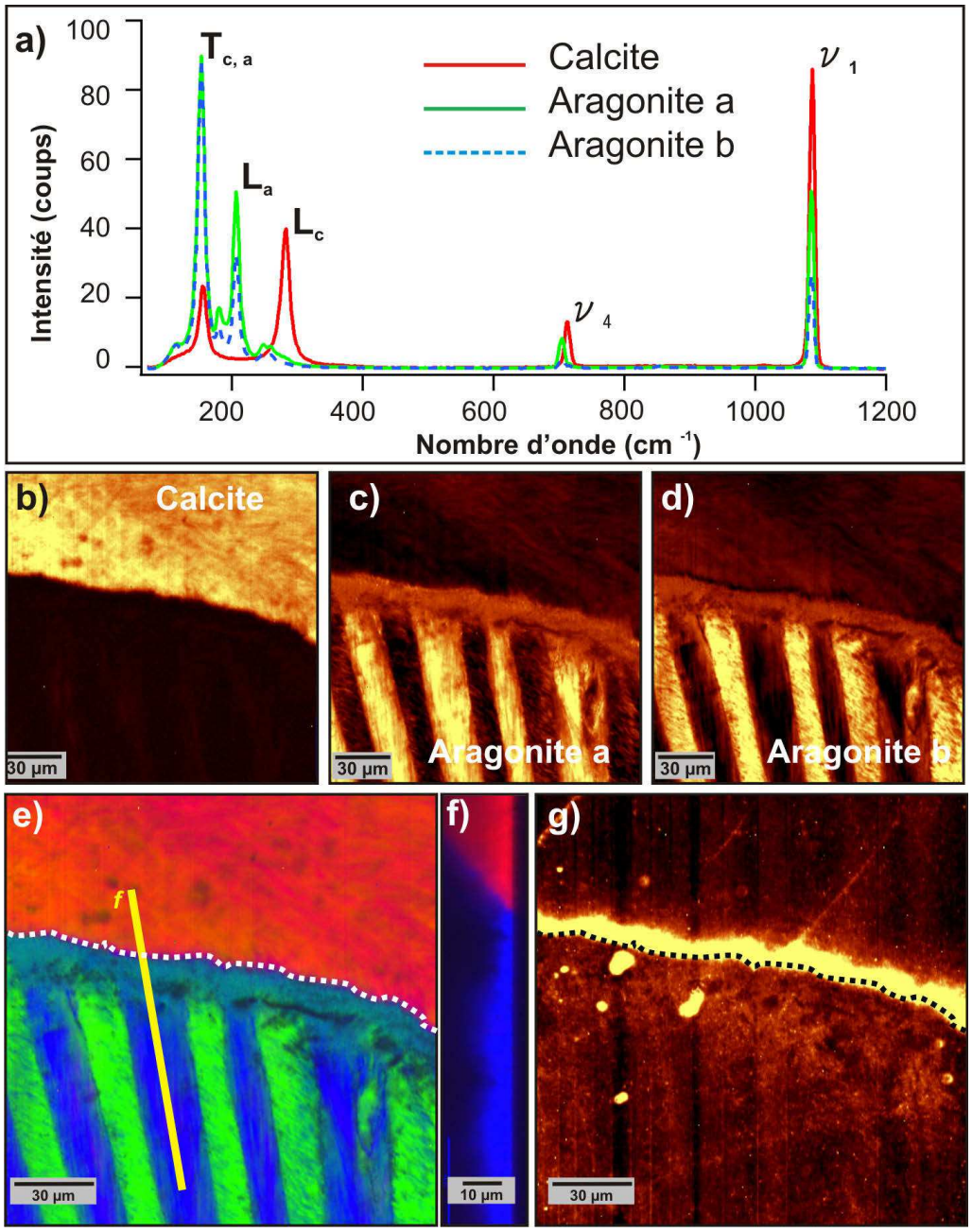


FIGURE 11 – a) Spectres Raman de la couche interne (calcite) et deux lamelles de 1er ordre d'orientations différentes (aragonite_a et aragonite_b) d'une section radiale du péristome d'une coquille de *Nerita undata* ($\lambda = 785$ nm). b) Carte de distribution de la calcite (extraite de l'analyse de la totalité du spectre à l'aide de la routine du logiciel Witec Project). c-d) Carte de distribution des deux orientations différentes de l'aragonite (aragonite_a et aragonite_b) extraites de l'analyse de la totalité du spectre. e) Carte composite en fausses couleurs des cartes b, c et d. La ligne pleine indique le transect, au long duquel un profil est réalisé. La ligne pointillé marque la limite franche calcite → aragonite. f) Carte en fausses couleurs de la distribution de la calcite (rouge) et de l'aragonite (bleu) le long du transect. g) Carte de fluorescence, la ligne pointillée est reportée de la carte e.

1.1.4 Remobilisation de la coquille.

Une dernière évidence microstructurale, simple et décrite de longue date chez les bivalves et les gastéropodes (Wada, 1972) mais souvent méconnue, illustre bien le contrôle biologique que le mollusque peut exercer, par l'intermédiaire de son manteau, pour modeler sa coquille : il s'agit de la remobilisation des parties minéralisées de la coquille, dont l'ampleur peut varier fortement selon les espèces.

Dans le cas des Neritidae, cette remobilisation peut être assez spectaculaire. En effet, au niveau de la bordure externe du péristome (Figure 13a), la coquille est (très) épaisse (Figure 13b). Mais, immédiatement après la bordure de croissance, l'épaisseur de la coquille se réduit : l'animal a déjà détruit une partie de la couche interne, qu'il vient pourtant tout juste de déposer. Cette zone de remobilisation est aisément localisable, correspondant à la partie de la coquille où la surface interne intersecte les striations de croissance (Figure 13b). La surface interne porte alors les traces de cette résorption (Figure 13c-g). On comprendra aisément que l'organisme peut, par l'intermédiaire de ce mécanisme, modeler précisément les indentations présentes sur la face interne de son ouverture (Figure 13c,g) (les stries de croissance, parallèles, affleurantes à la surface de cette zone, permettent de suivre le relief créé, figure 13c).

L'ampleur de cette remobilisation peut s'avérer particulièrement importante : le manteau dissout presque l'intégralité de la couche lamellaire croisée, n'en laissant qu'un fin revêtement sur l'intérieur de la cavité (Figure 13h). Dans quelques rares cas, l'aragonite disparait totalement (Figure 13i) : alors que l'animal sécrète initialement une couche aragonitique plus épaisse que sa couche calcitique, ces coquilles ne sont finalement plus constituées que par une unique couche calcitique.

1.1.5 *Conclusion* : le contrôle des morphologies des coquilles.

Ces quelques mécanismes, que l'ont peut mettre aisément en évidence à l'aide d'une analyse microstructurale préliminaire (comme réalisée ci-dessus pour la coquille de *Nerita*) confèrent aux gastéropodes un contrôle presque total sur la croissance et la conformation de leurs coquilles. La géométrie de la surface sécrétrice du manteau conditionne ainsi les morphologies des surfaces externes et internes de la coquille (Figure 12a-c) ; les circonvolutions réalisées par le manteau peuvent alors engendrer des structures spectaculaires (telles les épines des *Murex*, figure 12d-e). La haute spécialisation du manteau lui permet de déposer simultanément des couches de minéralogies et microstructures variées, et d'assurer la continuité de ces microstructures tout au cours de la croissance de la coquille. Finalement, les mécanismes de dissolution/remobilisation lui permettent de réadapter ultérieurement la conformation initiale de sa coquille à ses besoins (Figure 12f).

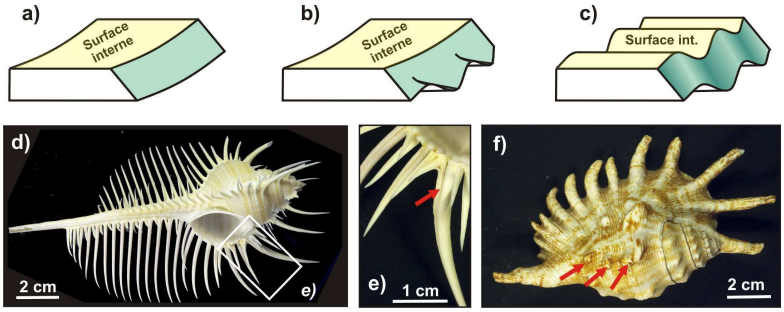


FIGURE 12 – a-c) Effets de la géométrie de la surface de croissance sur la conformation de la coquille. d) *Murex sp.* e) Une épine formée par le repli du manteau. La flèche marque la suture. f) *Strombus sp.* Les flèches marquent les empreintes des épines d'une précédente étape de croissance, résorbées.

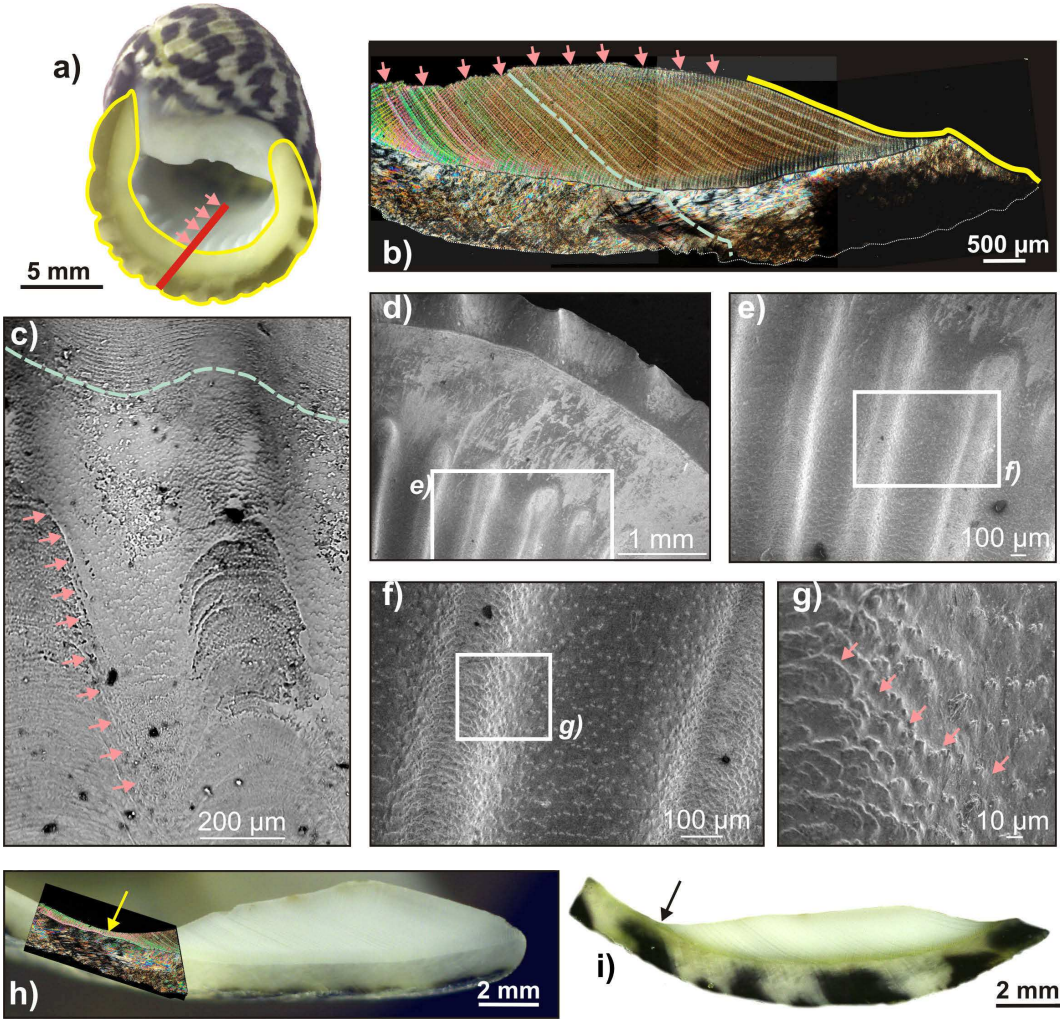


FIGURE 13 – Remobilisation dans une coquille de *Nerita sp.* a) Vue ventrale. En jaune, la bordure de croissance. Le trait rouge indique la section de l'image b, les flèches indiquent la portion remobilisée. b) Lame mince d'une section radiale en LPA. En jaune la bordure de croissance (surface parallèle aux incréments de croissance), les flèches indiquent la zone de dissolution (surface intersectant les incréments de croissance). c) Traces de dissolution découpant les indentations de la surface interne de l'ouverture. d-g) Image MEB de la surface interne de l'ouverture et traces de dissolution. h-i) Sections radiales. La flèche indique la limite à partir de laquelle la coquille cesse d'être remobilisée.

1.2 Niveaux du contrôle biologique.

L'évidence du contrôle biologique exercé continuellement par l'organisme sur sa coquille s'impose dès les premières observations à l'échelle macroscopique, et se retrouve ensuite à toutes étapes d'agrandissement successives.

Pour autant, les mécanismes exacts par lesquels ce contrôle peut s'effectuer sont encore très loin d'être élucidés.

Des caractérisations biochimiques localisées, systématiquement couplées à des observations microstructurales, constitue un outil puissant permettant de mettre en lumière certains points clés d'une régulation métabolique, qui s'effectue à différents niveaux et échelles d'observations.

1.2.1 Compositions biochimiques (XANES - SRFTIR - RAMAN).

Pinctada margaritifera.

La coquille de *Pinctada* possède une architecture simple, ayant fait l'objet de nombreuses investigations (Wada, 1956; Taylor *et al.*, 1969; Nakahara et Bevelander, 1971, etc.), que l'on présentera succinctement ici à titre de référentiel pour décrire les modalités de minéralisation de coquilles plus complexes, telles que la nérite.

La coquille est constituée de deux couches, une couche externe de prismes calcitiques et une couche interne de nacre (aragonite). La géométrie de la surface de croissance est plane, engendrant une géométrie de la coquille simple (Figure 14a). De façon très similaire à la transition entre couches externe et interne de *Nerita*, le changement de minéralogie lors de la transition est rapide, mais la mise en place de la structure nacrée ne se fait que progressivement, après le dépôt d'une couche aragonitique fibreuse distincte de plusieurs microns d'épaisseur (Figure 14b-c).

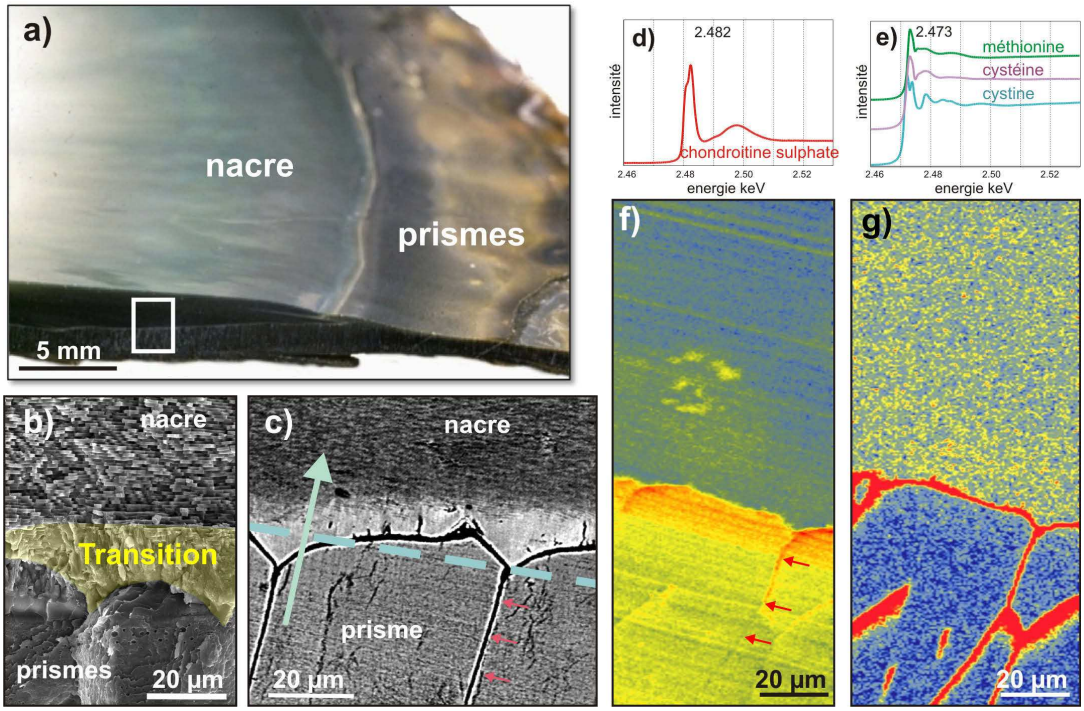


FIGURE 14 – *Pinctada margaritifera.* a) Section radiale du bord palléal. b) Vue MEB (cassure fraiche) de la transition entre couche externe (prismes calcite) et couche interne (nacre aragonite). c) Vue MEB (surface polie, détecteur BSE) de la transition. La flèche indique la croissance de la coquille. d-e) Spectre XANES de standards de composés organiques soufrés au seuil K du S. f) Carte des polysaccharides sulfatés (2482 eV). g) Carte des acides aminés soufrés (2473 eV).

L'utilisation du µ-XANES (Dauphin *et al.*, 2003a,b, 2008) a permis de caractériser la distribution du soufre dans ses différents états de spéciation dans les deux couches de *Pinctada margaritifera*. Des cartes de distribution des polysaccharides sulfatés (Figure 14f) et acides aminés soufrés (Figure 14g) ont été obtenues aux seuils d'absorption de composés de référence pour ces deux types de molécules (Figure 14d-e), soit respectivement 2482 eV et 2473 eV (cf détails section 5.2.4 page 131).

Elles illustrent le changement de l'activité métabolique des deux zones du manteau minéralisant les couches externe et interne : celui-ci sécrète plus de polysaccharides sulfatés dans les prismes que dans la nacre, qui est elle plus riche en acides aminés soufrés. On peut aussi noter que les membranes qui séparent les prismes, mais aussi la calcite de l'aragonite (Figure 14c) sont très riches en acides aminés soufrés. La rythmicité de croissance visible dans la cartographie des polysaccharides sulfatés illustre une activité métabolique cyclique de sécrétion de ces molécules.

Détermination des compositions biochimiques in-situ dans la coquille de *Nerita undata.*

Cartographie XANES : L'utilisation du µ-XANES dans la coquille de *Nerita* fournit des résultats comparables à ceux obtenus sur *Pinctada*. Les spectres d'absorption au seuil K du soufre des couches interne et externe présentent toutes deux un pic principal à 2482 eV (Figure 15c), correspondant aux standards de sulfates organique et inorganique utilisés (Figure 15b). Dans la partie EXAFS du spectre, cependant, les spectres issus de la coquille sont beaucoup plus proches de celui de la chondroitine sulfate, un glycosaminoglycane (GAG) que l'on retrouve souvent dans la composition des glycoprotéines et utilisé ici comme standard de sulfate organique, que du spectre du gypse, qui sert de standard du S inorganique (Figure 15b) : le S présent dans les deux couches (Figure 15c) est donc associé à des composés organiques. Même si moins intense, le signal à 2473 eV correspond aux acides aminés soufrés (Figure 15a).

De même que dans la coquille de *Pinctada margaritifera*, la cartographie des polysaccharides sulfatés à faible agrandissement (E=2482 eV, Figure 15d) indique que ces derniers sont beaucoup plus riches dans la couche externe que dans la couche interne de *Nerita undata* ; les cartes de fluorescence obtenues simultanément indiquent de plus que cette couche externe est aussi enrichie en Sr (Figure 15e) et P (Figure 15f) par rapport à la couche interne. Mais, à la différence de *Pinctada*, la couche interne se révèle aussi moins riche en acides aminés soufrés (E=1473 eV, Figure 15g) que la couche externe (Figure 15k).

La distribution des polysaccharides sulfatés, du Sr et du P présente des stries de croissance bien marquées dans la couche externe (Figure 15d, i) (Figure 15e, m) (Figure 15f, n) ; dans la couche interne, ces bandes sont très faiblement marquées en polysaccharides sulfatés (Figure 15d, h) et en Sr (Figure 15e, i), et invisibles sur les cartes de distribution du P et des acides aminés soufrés.

La similitude avec les résultats obtenus sur la coquille de *Pinctada margaritifera* est frappante. Dans les deux cas, la transition entre couches externe et interne se traduit par un changement marqué de composition, ce qui pourrait laisser supposer une relation directe entre la sécrétion de ce type de molécules organiques soufrées et le contrôle du polymorphisme minéralogique par l'organe sécréteur. Cette corrélation est en fait plus nuancée : si les couches calcitiques de *Nerita undata* et de *Pinctada margaritifera* sont toutes deux enrichies en polysaccharides sulfatés par rapport aux couches aragonitiques, la couche lamellaire croisée (aragonite) de *Nerita undata* est appauvrie en acides aminés soufrés, alors que la couche nacrée (aragonite) de *Pinctada margaritifera* est plus riche que sa couche prismatique en acides aminés soufrés. La seule particularité notable qui semble commune tout autant aux coquilles de bivalves tels *Pinctada margaritifera* ou *Pinna nobilis* (Bivalvia, Pteriomorphia) (Dauphin *et al.*, 2003a) qu'aux coquilles de gastéropodes tels *Haliotis tuberculata* (Gastropoda, Vetigastropoda) (Dauphin *et al.*, 2005), *Concholepas concholepas* (Gastropoda, Sorbeoconcha) (Dauphin *et al.*, 2012) ou *Nerita undata* est que les couches calcitiques prismatiques (que nous préférons appeler couche fibreuse dans le cas de *Nerita,* cf 1.1.2) sont systématiquement enrichies en polysaccharides sulfatés par rapport aux autres types microstructuraux présents dans ces coquilles.

A la différence des prismes de *Pinctada margaritifera*, aucune membrane riche en composés organiques ne semble séparer les lamelles de 1er ordre, qui semblent au contraire appauvries en polysaccharides sulfatés à leurs jonctions (Figure 15h).

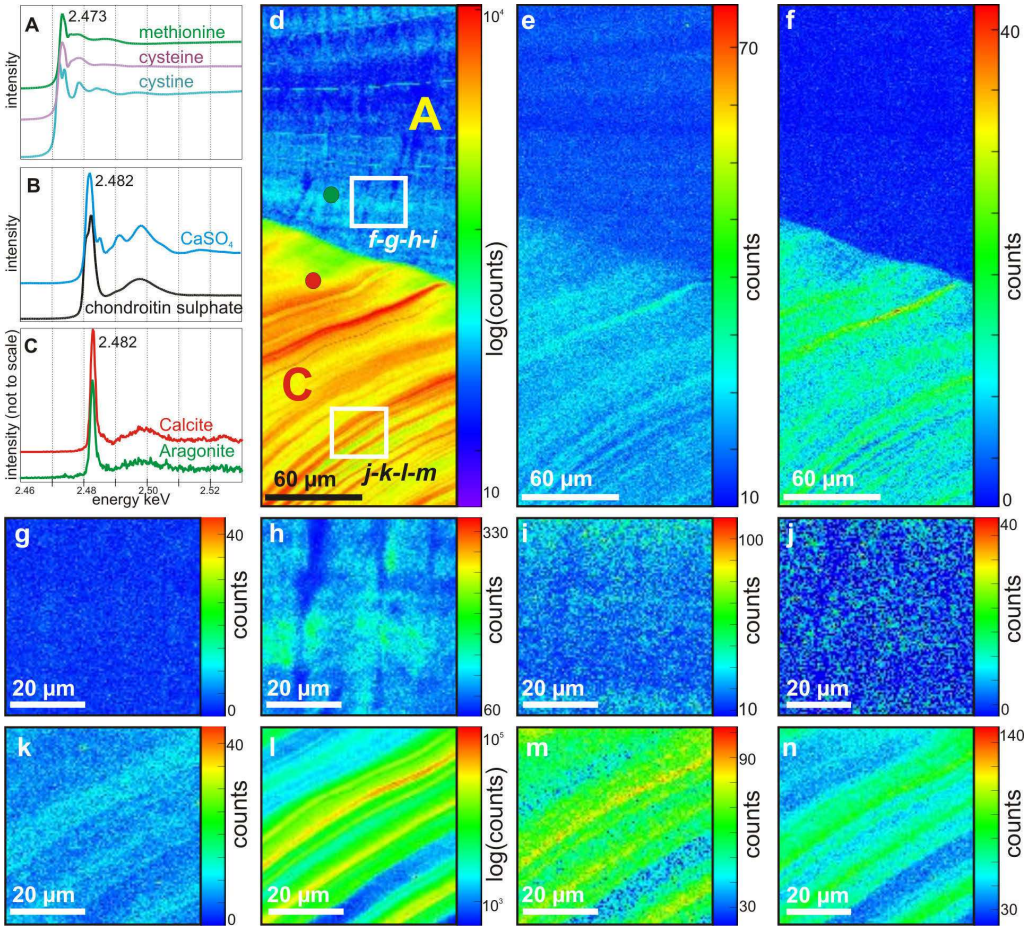


FIGURE 15 – Spéciations du S et cartes élémentaires sur une section radiale de *Nerita undata*. a-b) Spectres XANES de composés de référence. a) Les acides aminés méthionine, cystéine et cystine ont tous un pic principal à 2473 eV. b) La chondroitine sulfate et le $CaSO_4$ ont un pic principal à 2482 eV, mais des signatures EXAFS spécifiques. c) Spectres issus des couches externe et interne, dont la signature EXAFS correspond à celle de la chondroitine sulfate. d-f) Cartes de la transition entre la couche calcitique (bas) et la couche aragonitique (haut) d) Carte des polysaccharides sulfatés (2482 eV). Les localisations des spectres de la figure c sont marquées par des points. e) Carte du Sr. f) Carte du P. g-j) Cartes localisées dans la couche lamellaire croisée g) Carte des acides aminé soufrés (2473 eV). h) Carte des polysaccharides sulfatés (2482 eV). i) Carte du Sr. j) Carte du P. k-n) Cartes localisées dans la couche fibreuse. k) Carte des acides aminé soufrés (2473 eV). l) Carte des polysaccharides sulfatés (2482 eV). m) Carte du Sr. n) Carte du P.

Cartographie FT-IR : Tout comme pour la cartographie XANES, les cartes ont été réalisées à la limite entre couches interne et externe de *Nerita undata* (Figure 16a). Les bandes caractéristiques des vibrations des groupements CO_3^{2-} sont aisément identifiées : la bande ν_3 à ˜1428 cm^{-1}, le doublet ν_2 à 877-848 cm^{-1} et la bande ν_4 à 713 cm^{-1} sont ainsi spécifiques de la calcite, alors que la bande ν_3 à ˜1471 cm^{-1} et les deux doublets ν_2 à 858-844 cm^{-1} et ν_4 à 713-700cm^{-1}, sont spécifiques de l'aragonite (Jones et Jackson, 1993). A noter la présence d'une bande décalée à 864 cm^{-1} dans la couche interne (Figure 16b), tout à fait compatible avec la position moyenne de la bande ν_2 dans les aragonites de mollusques pauvres en Sr (Dauphin, 1997; Suzuki *et al.*, 2011a). La bande ν_3 à ˜1428 cm^{-1}, quant à elle, confirme bien la nature calcitique de la couche externe.

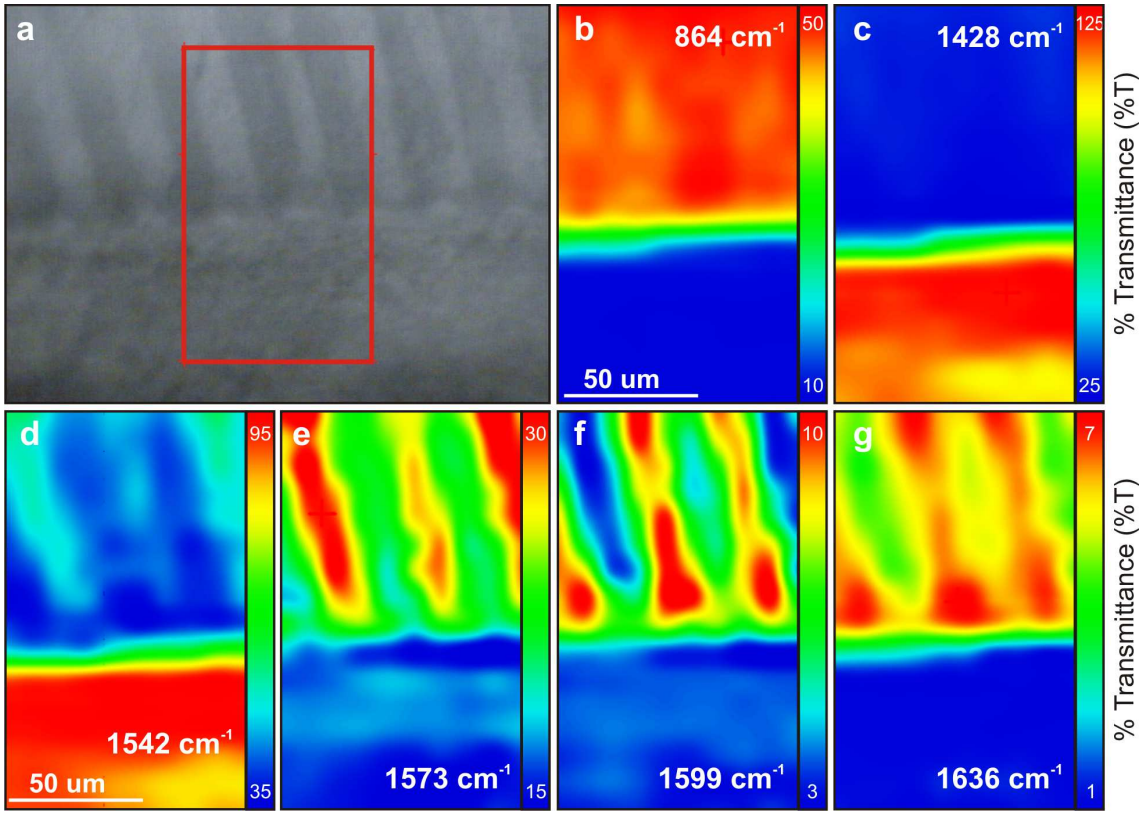


FIGURE 16 – Cartographies FT-IR sur une section radiale de *Nerita undata,* sur la transition calcite (bas) → aragonite (haut). a) Image de localisation. b) Carte IR de la bande ν_2 de l'aragonite à 864 cm^{-1}. c) Carte IR de la bande ν_3 de la calcite à 1428 cm^{-1}. d) Carte IR des bandes amide II à 1542 cm^{-1}. e) Carte IR des bandes amide II à 1573 cm^{-1}. f-g) Cartes IR des bandes amide I à f) 1599 cm^{-1} et g) 1636 cm^{-1}.

Note : Les intensités moyennes enregistrées à la transition (bandes vertes dans les figures 16b et c) ne correspondent pas à une structure, mais sont très probablement liées à un signal mixte : l'inclinaison de la limite entre les deux couches par rapport au plan de surface couplée à une profondeur de pénétration des IR non-négligeable (mais difficilement estimable) permet en effet à la couche sous-jacente de contribuer significativement au signal spectral enregistré, même lorsqu'elle n'affleure pas. On ne retrouve pas cet inconvénient dans les cartographies réalisées en mode confocal ; la microspectrométrie Raman a ainsi démontré précédemment que la transition calcite-aragonite est en fait directe, cf 1.1.2.

. En ce qui concerne la phase organique, une réponse caractéristique des composés azotés est de plus enregistrée dans la gamme spectrale spécifique des groupement amide I (1597-1695 cm^{-1}) et amide II (1515-1580 cm^{-1}). A 1542 cm^{-1}, la cartographie montre que la couche calcitique est enrichie en groupements amide II par rapport à la couche aragonitique (Figure 16d) ; la couche aragonitique est quant à elle enrichie en groupement amide I, comme le montrent les cartographies à 1599 (Figure 16f) et 1636 cm^{-1} (Figure 16g). Ces résultats confirment ainsi, comme observé en microspectroscopie XANES, un changement des compositions organiques à la transition calcite → aragonite.

Il est particulièrement intéressant de noter la distribution alternée de plusieurs bandes organiques (1573, 1599 and 1636 cm^{-1}) dans la couche aragonitique (Figure 16e-g), qui semble correspondre exactement aux alternances des lamelles de 1er ordre. A noter que bien que dans la gamme spectrale des groupements amide II, la bande à 1573 cm^{-1} peut aussi correspondre à l'acide aspartique (COOH) (Dauphin, 2006) ; les bandes entre 1620 et 1640 cm^{-1} sont quant à elles généralement associées aux conformations en feuillets β (Byler et Susi, 1986; Krimm et Bandekar, 1986). Ces distributions alternées sont de plus anti-corrélées entre les bandes amide I et la bande à 1573 cm^{-1} : les lamelles de 1er ordre, les plus riches à 1573 cm^{-1}, sont ainsi les plus pauvres à 1599 et 1636 cm^{-1}, et vice-versa.

Il est admis depuis longtemps que les compositions organiques des différentes couches des coquilles de mollusques sont taxonomiquement spécifiques, et fortement corrélées aux types microstructuraux (Travis *et al.*, 1967; Krampitz *et al.*, 1976; Weiner, 1983; Worms et Weiner, 1986; Samata, 1990) : ces corrélations tendent à prouver que les assemblages de molécules organiques jouent un rôle important dans le contrôle exercé par l'organisme sur la formation de chaque couche de sa coquille, notamment sur la minéralogie. Sans surprise, les caractérisations de la coquille de *Nerita undata* réalisées par microspectroscopies IR et XANES indiquent que celle-ci n'échappe pas à la règle, les deux couches interne et externe présentant des compositions très différentes.
La variation de la distribution de certains composés organiques suivant les motifs microstructuraux, à l'intérieur d'une même couche (Figure 16e-g), est particulièrement intéressante, et constitue un premier argument en faveur d'un contrôle de l'architecture microstructurale par certains assemblages organiques (contrôle qu'il reste encore bien évidemment à élucider).

Cartographie Raman : Comme nous avons pu le voir, la microspectroscopie confocale Raman permet de caractériser finement les distributions et orientations des différents polymorphes cristallins (section 1.1.2 page 15). Le ratio des deux pics de maille de l'aragonite (vibrations en translation T_A, 152 cm^{-1} et libration L_A, à 206 cm^{-1}) permet de cartographier simplement les différentes orientations cristallines de l'aragonite, et de retrouver la couche de transition aragonitique d'orientation homogène (Figure 17a-c) - fait intéressant, une lamelle de 1er ordre sur 2 garde une orientation similaire (couleur jaune sur la figure 17c). Mais la possibilité de détecter et cartographier, simultanément, les distributions de certains composés organiques (Melancon *et al.*, 2005; Borzecka-Prokop *et al.*, 2007; Hild *et al.*, 2008) en font un outil particulièrement puissant pour l'analyse des biominéraux, complémentaire des cartographies FT-IR (mais avec une bien meilleure résolution latérale). Ainsi, la fluorescence induite par les molécules organiques, est souvent considérée comme problématique en microscopie Raman car masquant les pics des composés inorganiques si trop intense : la cartographie de sa distribution peut néanmoins être source d'information, permettant par exemple de révéler en première approche les zones plus enrichies ou les striations de croissance, particulièrement marquées dans la couche calcitique de *Nerita undata* (Figure 17d).

Le réexamen attentif des spectres des régions présentant la fluorescence la plus intense permet de détecter plusieurs pics (1019, 1134, 1525, 2645 et 3038 cm^{-1}) (Figure 17e, λ=532 nm), considérés comme caractéristiques des spectres de résonance Raman (RR) de molécules présentant une chaine centrale polyénique (comme on peut en trouver, par exemple, dans les β-carotènes). De telles molécules ont été souvent décrites dans divers carbonates biogéniques, et souvent considérées comme des pigments (polyènes) (Urmos *et al.*, 1991; Hedegaard *et al.*, 2005; Fritsch et Karampelas, 2008) ; elles sont généralement présentes en très faibles quantités, et ne sont détectées que par l'effet de couplage entre les longueurs d'onde de vibration de la source laser et celle de la molécule lorsque celle-ci entre en résonance, ce qui permet de déceler de très faibles quantités (jusqu'à 10^{-8} M) (Merlin, 1985). Assimilées parfois à des caroténoïdes (Merlin, 1985; Urmos *et al.*, 1991; Fritsch et Karampelas, 2008), ces molécules ont fait l'objet d'études plus approfondies qui ont mis en évidence de légers décalages par rapport aux pics RR de caroténoïdes standards (Hedegaard *et al.*, 2005; Fritsch et Karampelas, 2008; Karampelas, 2008), potentiellement causés par des variations de longueur de la chaine polyénique, du nombre de groupes fonctionnels etc. : ces études illustrent assez bien les difficultés de caractérisations fines des assemblages, souvent complexes, de molécules organiques présentes dans les biominéraux. En se basant sur ces travaux, et notamment la relation entre nombres d'onde des pics des liaisons C-C et C=C établie par Hedegaard *et al.* (2005), les molécules décelées dans la coquille de *Nerita undata* s'apparentent plutôt à des polyènes formant des chaines de 9-10 liaisons doubles C=C conjuguées et possédant des groupes terminaux -CH_3.

La détection de ces polyènes n'est pas une information "nouvelle" : la détection de ces molécules est assez fréquente dans les bio-carbonates, et elles sont peu représentatives des assemblages organiques car elles ne représentent qu'une très faible fraction de ces derniers. De même, une caractérisation aussi précise de leur structure moléculaire n'a finalement que peu d'intérêt. Pourtant, la cartographie de leur distribution (réalisée en cartographiant la distribution du pic à 1525 cm^{-1}, Figure 17f) superposée à la distribution des phases minérales nous fournit des indications fondamentales sur le mode de fonctionnement de l'organe minéralisant. Le principal enrichissement en polyènes est ainsi détecté dans la couche calcitique, formant une bande continue juste avant la transition calcite $\rightarrow$ aragonite (Figure 17f). Il illustre la forte spécialisation de l'activité sécrétrice du manteau : la sécrétion continue de polyènes à proximité de la limite calcite/aragonite dénote en effet un métabolisme différent des dernières cellules responsables de la minéralisation de la couche calcitique, par rapport aux cellules formant la bordure du manteau. Dans la couche de transition aragonitique homogène, aucun polyène n'est détecté. Mais quelques stries de croissances enrichies en polyènes sont visibles dans la couche lamellaire croisée (Figure 17g) : les cellules du manteau responsables de la formation de cette couche sont donc aussi capables de sécréter des polyènes, mais cette fois-ci de façon cyclique et non plus continue au cours du temps.

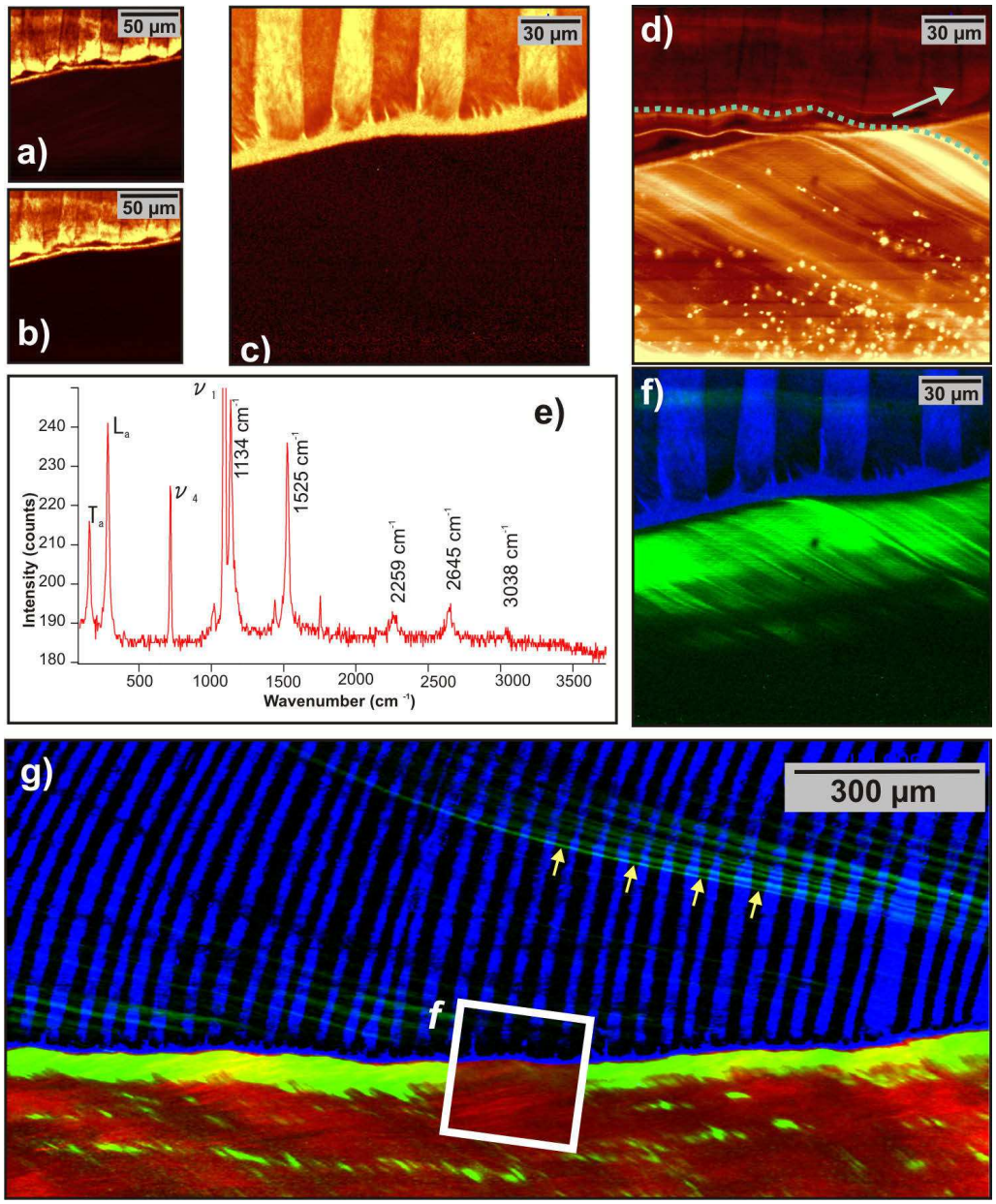


FIGURE 17 – Cartographies en microscopie confocale Raman (excitation 532 nm) d'une section radiale de *Nerita undata*. a) Distribution de l'intensité du pic T_a à 152 cm^{-1} de l'aragonite (mode translation). b) Distribution de l'intensité du pic L_a à 206 cm^{-1} de l'aragonite (mode libration). c) Carte du ratio T_a/L_a. Une couche déjà aragonitique, mais d'orientation homogène, suit directement la transition calcite → aragonite. d) Distribution de l'intensité du bruit de fond, entre 2400 cm^{-1} et 2500 cm^{-1}, corrélée à la fluorescence de l'échantillon. La ligne pointillée marque une strie de croissance. La flèche marque la direction de croissance. e) Spectre Raman présentant les bandes typiques de l'aragonite, et les pics RR de composés polyéniques. f) Carte composite de la distribution des polyènes (pic à 1525 cm^{-1}) en vert, et du ratio T_a/L_a en bleu. g) Carte composite des distributions de la calcite (rouge), du rapport d'orientation T_a/L_a de l'aragonite (bleu) et des polyènes (vert). Les flèches indiquent des incréments de croissance riches en polyènes dans la couche aragonitique.

Ces exemples de déterminations biochimiques in-situ illustrent le potentiel de ces approches pour caractériser finement le fonctionnement de l'organe minéralisant : dans le cas de *Nerita undata*, on peut ainsi identifier plusieurs activités métaboliques différentes, correspondant à une forte spécialisation spatiale des cellules formant la bande minéralisante du manteau, qui sécrètent de façon synchrone des assemblages organiques distincts :

1/ la bordure périphérique de la zone minéralisant les fibres calcitiques, qui sécrète des protéines soufrées, des polysaccharides sulfatés et des molécules contenant des groupements amide II.

2/ une petite frange de la zone minéralisant les fibres, qui sécrète de façon continue des polyènes en plus des molécules citées précédemment.

3/ une bande très étroite de la zone minéralisant la couche aragonitique dont la largeur ne dépasse pas quelques cellules, qui ne sécrètent que des molécules contenant des groupements amide I.

4/une large bande, la plus interne de la zone minéralisante, responsable de la formation de la structure lamellaire croisée, et qui sécrète des molécules contenant des groupements amide I, et connaissant de brefs pulses de sécrétion de polyènes.

1.2.2 Initiation des orientations cristallines.

Un deuxième mécanisme d'intérêt est le contrôle des orientations cristallines. Nous avons pu voir brièvement section 1.1.2 (page 15) que l'organe minéralisant est capable de maintenir l'orientation cristalline de ses unités microstructurales au cours de la croissance ; cette section illustre, à travers deux exemples distincts, qu'il existe aussi un mécanisme de contrôle de l'initiation des orientations cristallographiques de ces unités, même si celui-ci reste encore à élucider.

Les centres des prismes chez *Pinctada margaritifera* juvénile.

Les prismes de la couches externe des coquilles de *Pinctada margaritifera* juvéniles (Figure 18a) constituent un exemple simple. Ils ont en effet à ce stade de développement un comportement optique monocristallin, contrairement aux prismes des *Pinctada* adultes : à chaque prisme correspond une couleur de polarisation (Figure 18b-d). Une légère défocalisation en microscopie optique met en évidence des figures concentriques au sein de chaque prisme (Figure 18c), ainsi que la présence systématique d'une tache en leur centre (Figure 18d). Chaque droite reliant deux centres de prismes voisins est systématiquement perpendiculaire à la membrane séparant ces derniers, formant un diagramme de Voronoï (Figure 18c) : une telle répartition dénote un mécanisme de croissance concentrique à partir de germes initiaux (ici les centres), la limite entre deux prismes n'étant définie que lorsque se réalise le contact entre deux fronts de cristallisation. La position des membranes, et donc la forme des prismes, est ainsi uniquement conditionnée par les positions relatives de ces germes, préexistants, qui ont un rôle déterminant dans le démarrage de la cristallisation, et l'initiation des orientations cristallographiques qui seront ensuite perpétuées au cours des incréments de croissance successifs au sein de chaque prisme (Cuif *et al.*, 2011).

L'empreinte de ces centres est particulièrement bien visible en MEB sur la face externe de la coquille (Figure 18e-g), et sont bien marqués avec une coloration Bodipy (Figure 18h), qui dénote une composante lipidique. Une coupe FIB passant par l'un de ces centres (Figure 18i) permet d'illustrer en MET le contact entre celui-ci et les premiers incréments de croissance (Figure 18j) ; à très haute résolution, l'initiation des premiers rangs d'atomes organisés dans la maille de la calcite est visible (Figure 18k). Une fois initiée, cette orientation cristallographique se perpétue ensuite au cours des premiers incréments de croissance (Figure 18j).

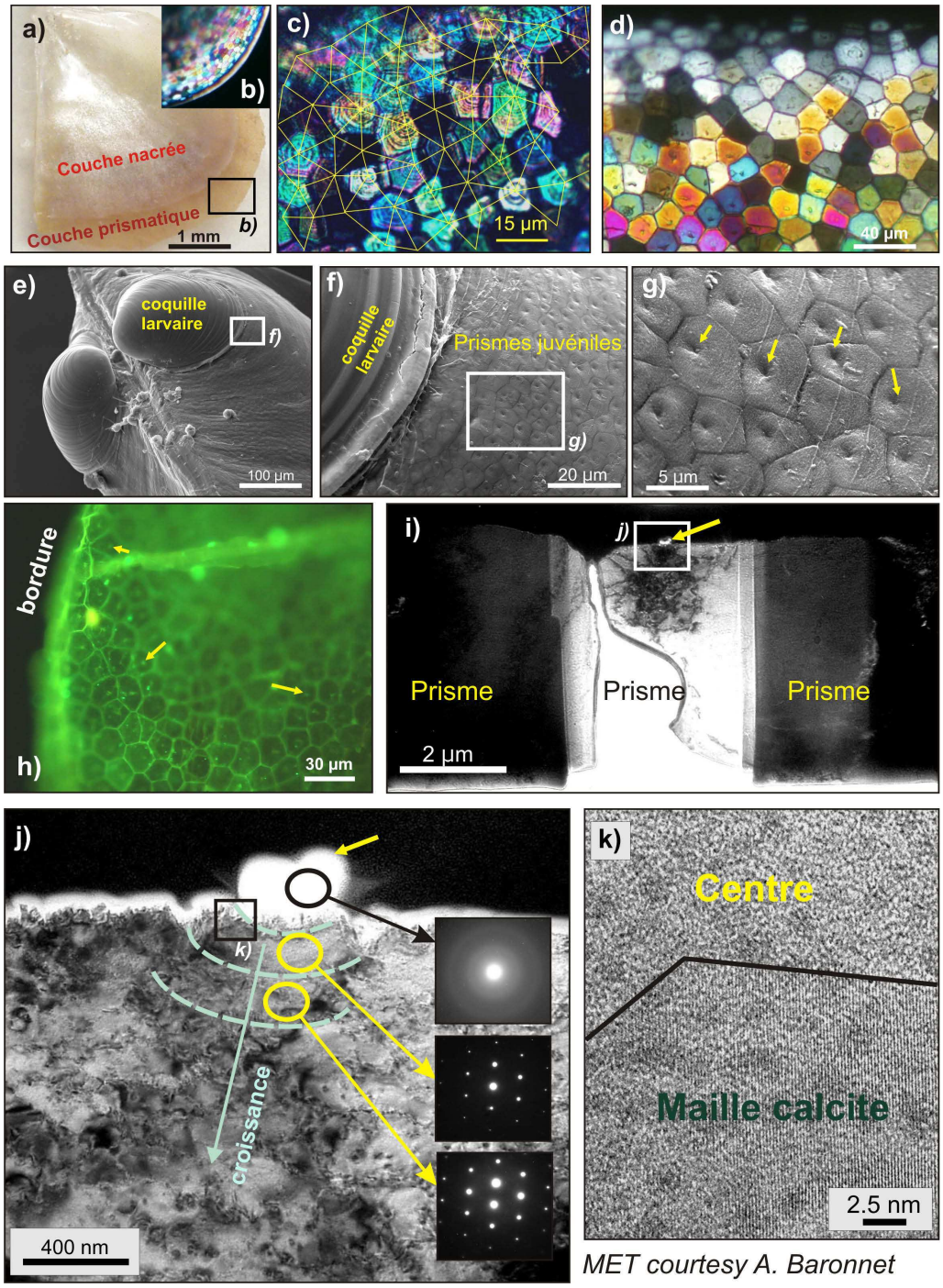


FIGURE 18 – *Pinctada margaritifera* juvénile. a) Face interne d'une valve. b) Vue des premiers prismes bord de croissance en LPA. c-d) Vues en LPA du réseau de points situés chacun au centre de chaque prisme. e-f) Vues MEB de la face externe. g) Vue MEB de l'empreinte en creux des centres des prismes. h) Test de coloration Bodipy® 493/503 en microscopie de fluorescence classique (excitation 365 nm, filtre passe bande 430 nm) (cf section 5.2.1 page 121). Les flèches pointent certains centres colorés. i) Vue MET d'une lame amincie au FIB d'une section d'un prisme contenant encore un centre, marqué par une flèche. j) Vue TEM du centre (marqué d'une flèche) et diffractions localisées dans le centre (motif amorphe) et les deux premiers incréments de croissance (motif de diffraction d'un monocristal, conservation des orientations). k) Vue MET haute résolution du contact entre centre et prisme, et de l'apparition d'une organisation des rangs d'atomes en maille calcitique.

Vers un mécanisme similaire dans l'initiation de l'alternance lamellaire croisée chez *Nerita* ?

Lorsque la structure lamellaire croisée de la couche interne de la coquille de *Nerita* se met en place sur la couche calcitique externe, on observe des ponctuations (Figure 19), d'autant plus marquées en LPA que la lame est épaisse (Figure 19a). Ces ponctuations présentent une forme en dôme (Figure 19c-d), mais ne semblent présentes qu'une lamelle de 1er ordre sur deux (Figure 19g) - or, c'est justement une lamelle de 1er ordre sur deux qu'apparait une nouvelle orientation cristalline (Figures 17c et 9e). Ces ponctuations présentent de plus une forte teneur en composés organiques (forte fluorescence sur la figure 20a-b, fort contraste en lame épaisse sur la figure 19a), et il est ainsi tentant d'effectuer un parallèle avec les centres observés dans les prismes des *Pinctada margaritifera*.

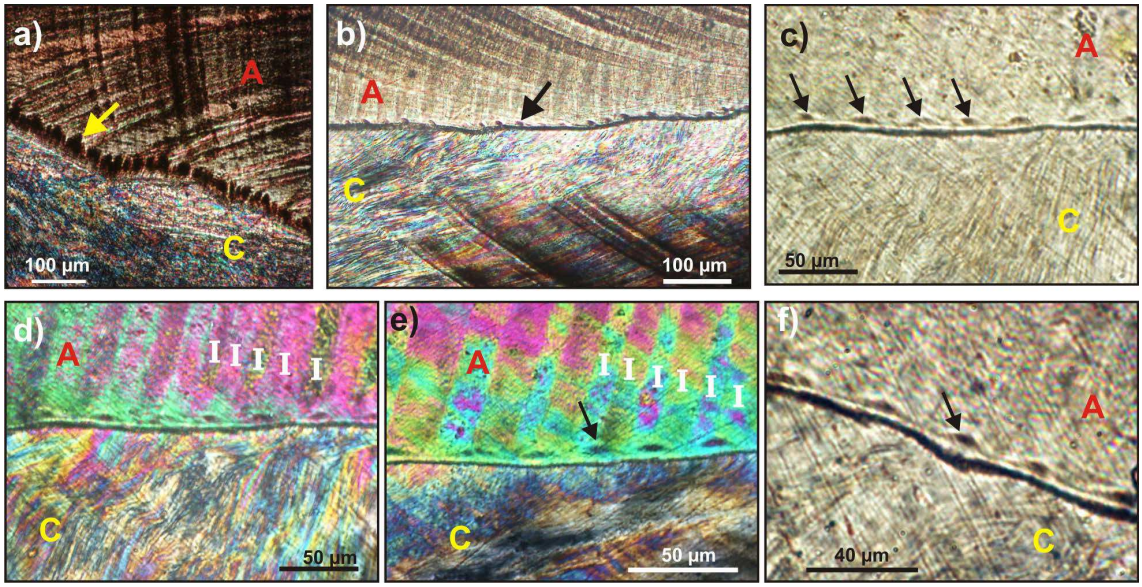


FIGURE 19 – Ponctuations chez *Nerita.* a) Vue en LPA d'une lame mince "épaisse" (30 µm) : le contraste brun, toujours éteint, est bien marqué et permet d'identifier facilement les ponctuations enrichies en composés organiques, mais leurs conformation est mal définie du fait de la superposition des structures. b) Vue en LPA d'une lame mince fine (˜10µm). Les ponctuations sont moins marquées, mais bien présentes. c-d) Vues en LPNA et LPA d'une lame mince fine (˜10 µm), montrant la forme en dômes de ces ponctuations. Les dômes sont présents une lamelle de 1er ordre sur deux. e) Vue en LPA d'une lame mince fine (˜10 µm), montrant les dômes, une lamelle de 1er ordre sur deux. f) Vue en LPNA d'une lame mince fine (˜10 µm) montrant la morphologie des dômes.

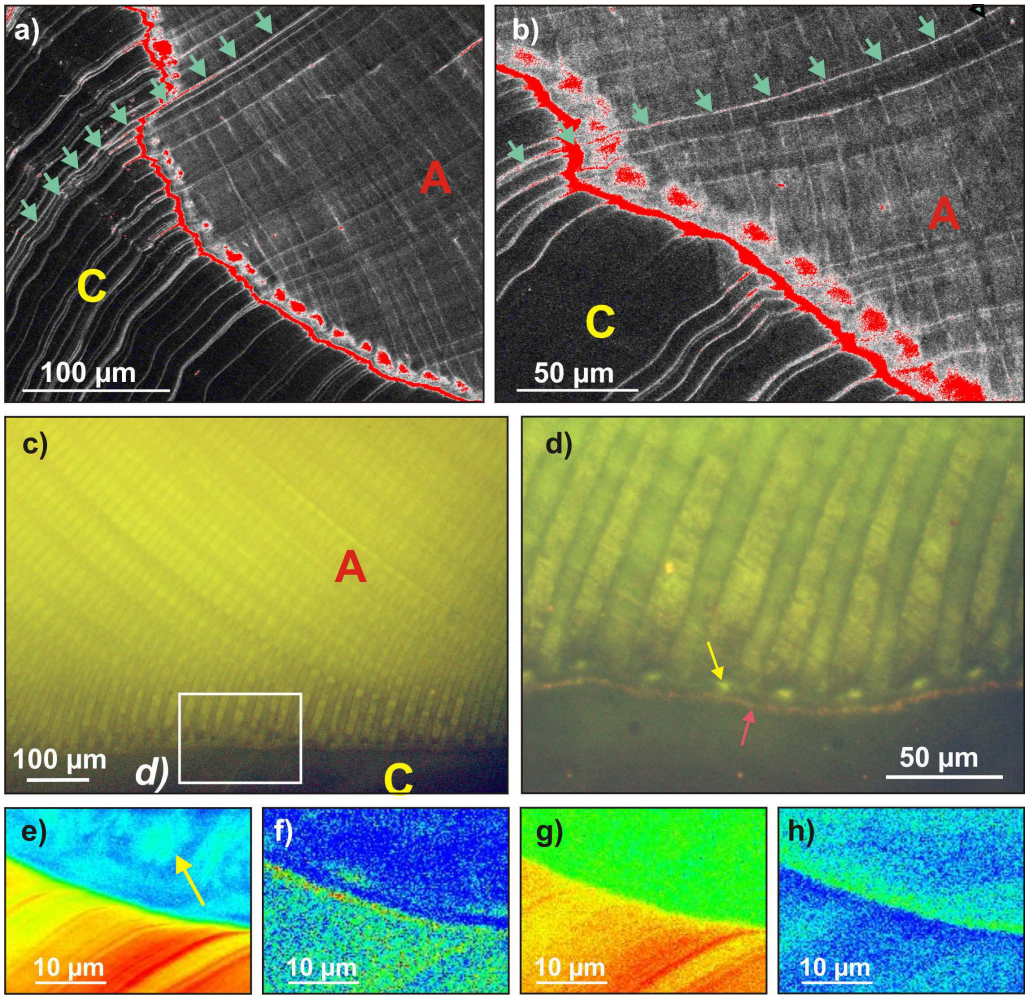


FIGURE 20 – a-b) Images en microscopie confocale laser de la transition calcite → aragonite. Une LUT en fausse couleur (rouge) met en évidence le fort contraste d'autofluorescence des ponctuations, lié à une forte teneur en composés organiques. Une couche continue, fortement fluorescente, marque la transition calcite → aragonite. Les flèches marquent une strie de croissance. c-d) Test de coloration à l'acridine orange. Une fine ligne continue délimitant la transition calcite → aragonite apparait colorée en rouge, les ponctuations sont colorées en vert. e-h) Cartes XRF de la transition calcite (bas) → aragonite (haut). e) Carte des polysaccharides sulfatés (2482 eV), légèrement enrichi au niveau d'une ponctuation. f) Carte des acides aminé soufrés (2473 eV), montrant une très fine zone appauvrie après la transition. g) Carte du Sr. h) Carte du P, montrant un léger enrichissement après la transition.

L'acridine orange colore ces ponctuations en vert (Figure 20d), ce qui laisserait supposer la présence de composés présentant des sites actifs libres et chargés négativement (tels que les glycoprotéines, Brandes et Reale, 1990). Mais l'interprétation des couleurs de fluorescence de l'acridine orange reste ambigüe : en tant que colorant cationique, il émet dans les verts en solution (533 nm) lorsqu'il est présent sous la forme d'un monomère, et dans les rouges (656 nm) lorsqu'il est présent sous la forme d'un polymère (Bradley, 1961) - ce décalage étant causé par un effet de couplage entre deux molécules d'acridine proches. La couleur d'émission dépend donc de la distance entre les molécules cibles (Gautret *et al.*, 2003). Lorsque les molécules d'acridine sont liées à des molécules voisines, où à des sites proches sur la même molécule, leur couleur de fluorescence est orange-rouge ; lorsqu'elles sont liées à des composés isolés, il n'y a peu ou pas de couplage entre les molécules d'acridine et la couleur de fluorescence est verte (Wolf et Aronson, 1961). Sur les carto-

graphies XANES, ces ponctuations pourraient aussi correspondre à des zones légèrement enrichies en polysaccharides sulfatés (Figure 20e).

Note concernant la transition calcite-aragonite :

Ces images de fluorescence semblent indiquer la présence d'une enveloppe continue séparant la couche calcitique de la couche aragonitique, marquée par une très forte autofluorescence (Figure 20a-b), et une coloration rouge à l'acridine orange (Figure 20d). Pour autant, nous n'avons pu mettre en évidence l'existence d'une enveloppe en MEB et MET, nous ne pouvons donc conclure s'il s'agit effectivement d'une enveloppe continue qui isole les deux couches (et qui serait alors très comparable, mais plus fine, à celle isolant couche calcitique et couche aragonitique chez *Pinctada margaritifera*, Figure 14c) ou d'un simple enrichissement en composés organiques discontinus. La couche de transition aragonitique, qui s'établit sur cette <supposée> enveloppe et précède la couche lamellaire croisée proprement dite, présente quant à elle un léger enrichissement en P (Figure 20h) et un très léger appauvrissement en acides aminés soufrés (Figure 20f).

. Les ponctuations en forme de dômes observées sont en fait excentrés, situés pratiquement à la limite entre deux lamelles de 1er ordre (Figure 21a-d), et hétérogènes, constitués par la concentration de tout petits points ou canalicules (contraste noir en BSE, figure 21e-f). Il est surprenant de constater, sur les préparations MET, que ces canalicules contiennent encore un matériel fortement rétracté par l'effet du faisceau (Figure 21g-h) et riche en S (caractérisé par EDS, figure 21i-k). A la différence des centres de *Pinctada margaritifera*, il semble donc plutôt s'agir de l'agglomérat de molécules fibrillaires, ici coupées en sections, et prises dans une gangue minérale.

La couche de transition (Figure 22) n'est, en fait, pas véritablement homogène, et semble déjà constituée de lamelles de même orientation (Figure 22c). L'apparition de l'alternance lamellaire croisée consiste ainsi en une rotation progressive de ces plans de lamelles qui se retrouvent alors avec une orientation orthogonale aux lamelles sous-jacentes, et ce uniquement une lamelle de 1er ordre sur deux (ces plans de lamelles ne tournant pas ou très peu pour les autres paires de lamelles de 1er ordre) (Figure 22d).

A la différence des centres des prismes de *Pinctada margaritifera,* il n'est pas possible d'affirmer que les ponctuations observées chez *Nerita*, constituées d'agglomérats de canalicules riches en composés organiques soufrés (polysaccharides sulfatés, etc.), jouent un rôle actif dans l'initiation de l'alternance des orientations cristallines des lamelles de 1er ordre. La co-localisation exacte de ces ponctuations et du démarrage de cette alternance reste cependant troublante.
Parallèlement, ces observations permettent de préciser la mise en place progressive de la structure lamellaire croisée : comme chez *Pinctada margaritifera*, il semblerait qu'une enveloppe continue, mais plus fine, marque la transition brusque entre calcite et aragonite. Les premiers dépôts aragonitiques qui la surmontent sont en fait structurés en lamelles ou plaquettes, de dimensions similaires aux lamelles de 3e ordre mais partageant toutes une même orientation sur une épaisseur de plusieurs microns ; c'est la rotation de certains de ces plans de plaquettes, une lamelle de 1er ordre sur 2, qui marque véritablement le démarrage de la structure lamellaire croisée proprement dite.

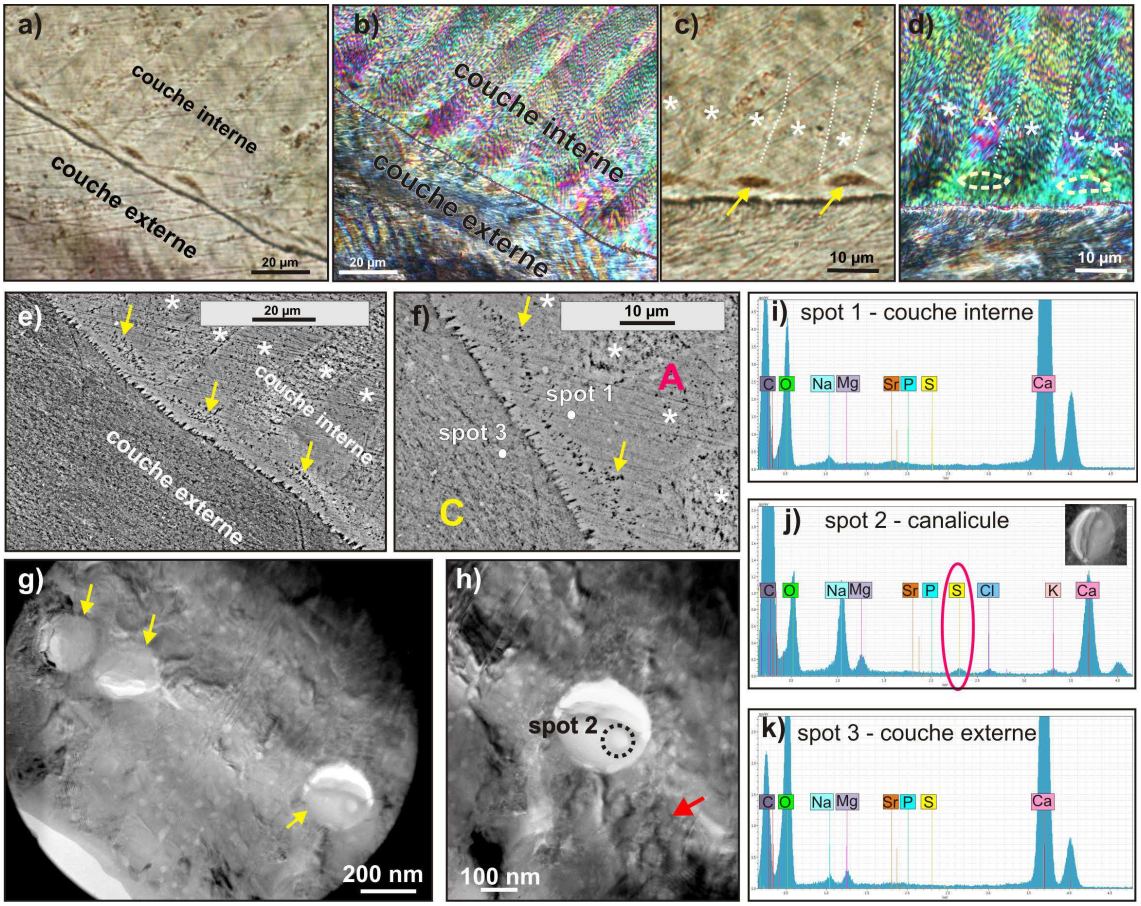


FIGURE 21 – a-d) Vues en LPNA et LPNA d'une lame mince fine (˜10 µm) de la transition entre couches internes et externes, montrant les ponctuations en dômes. c-d) Les dômes sont situés exactement à la limite entre deux lamelles de 1er ordre (marquées par des "*"), mais une lamelle sur deux. e-f) Vue MEB (surface polie, détecteur BSE) de la transition. Les dômes, formés de tout petits points ou canalicules, sont marqués par des flèches, les lamelles de 1er ordre par des "*". g-h) Vues MET des canalicules formant les dômes, remplies d'un matériel se rétractant fortement sous le faisceau. i-k) Spectres EDS localisés en microscopie à transmission. Les spectres i et k sont localisés approximativement sur la figure f. Le spot de focalisation ayant fourni le spectre j est représenté figure h.

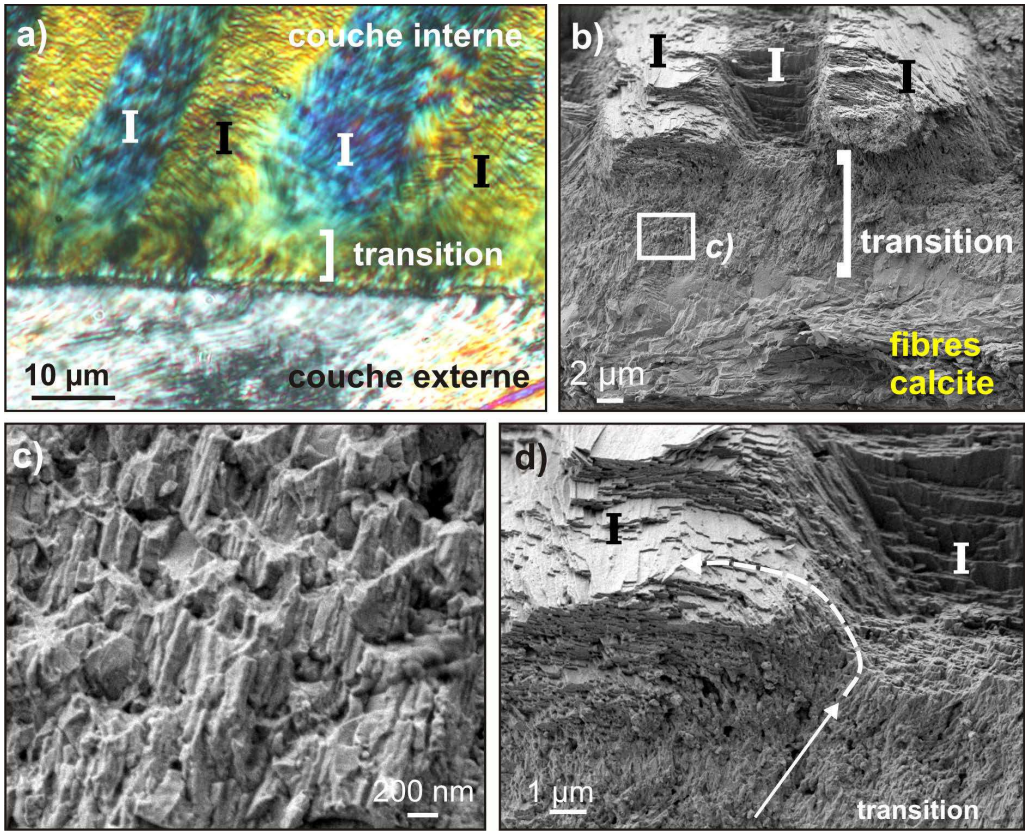


FIGURE 22 – a) Vue en LPA d'une lame mince très fine (5-10 µm) de la transition entre couches interne et externe. Une couche de transition, de couleur de polarisation homogène (vert) précède l'apparition de l'alternance lamellaire croisée (lamelles de 1er ordre marquées d'un I). b-d) Vues MEB d'une fracture fraiche de la zone de transition. c) Organisation de la zone de transition en fibrilles ou plaquettes d'orientation homogène. d) Initiation de l'alternance lamellaire croisée par la rotation progressive des plans de plaquettes une lamelle de 1er ordre sur deux (flèche).

1.2.3 Des enveloppes organiques délimitant les unités microstructurales ?

Dans la coquille de *Pinctada margaritifera*, les unités prismatiques de la couche externe sont totalement isolées les unes des autres par un réseau d'enveloppes continues (Figures 14 et 72) et structurées (Dauphin *et al.*, 2010) ; la propagation des orientations cristallines initiées par chaque centre est latéralement délimitée par ces enveloppes, leur dépôt précédant la cristallisation proprement dite du lit de minéralisation (Cuif *et al.*, 2011).

Dans le cas de la structure lamellaire croisée, on ne trouve aucune description de telles enveloppes séparant les lamelles de 1er ordre dans la littérature, et les attaques ménagées classiques qui devraient révéler la présence de matériel organique entre les lamelles restent infructueuses (Figure 23a-c).

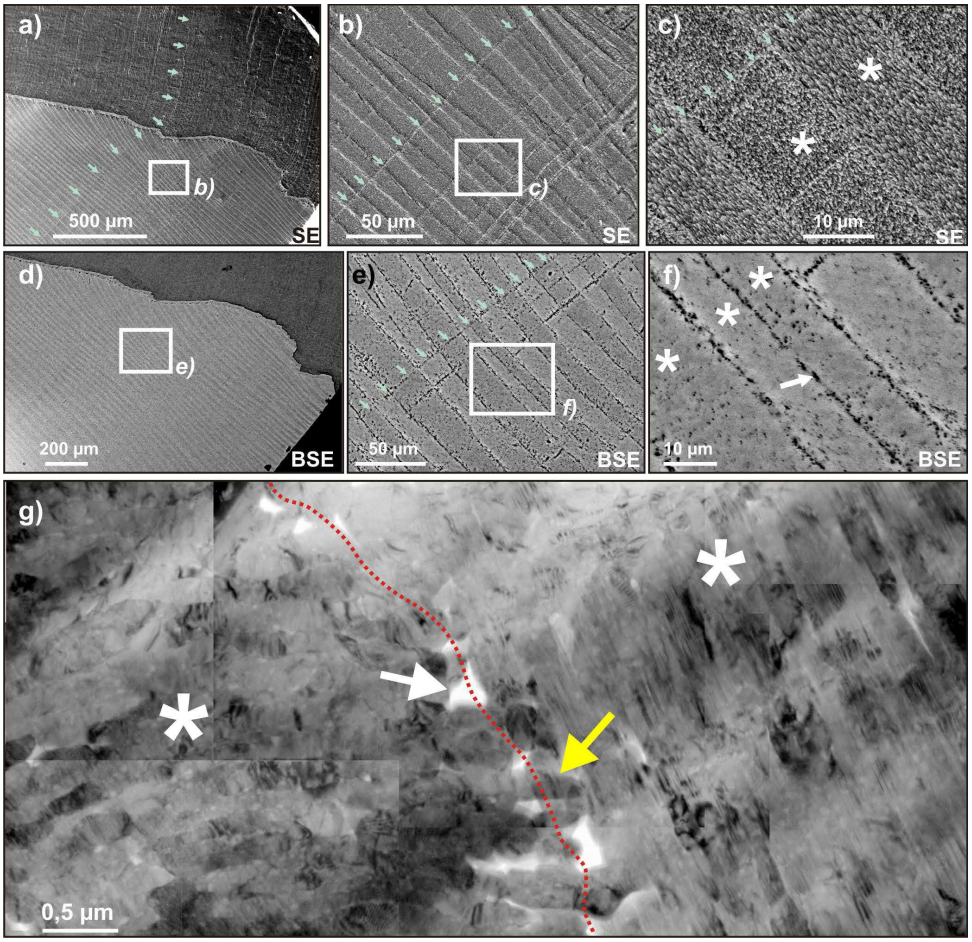


FIGURE 23 – a-c) Vues MEB des lamelles de 1er ordre, après attaque légère (acide acétique 0,2% v/v, 35 sec). d-f) Vues MEB (surface polie, détecteur BSE). Les flèches marquent une strie de croissance, les "*" les lamelles de 1er ordre. f) Les lamelles de 1er ordre sont délimitées par des petites ponctuations discontinues (contraste noir = vide, ou faible poids atomique). g) Vue MET du contact entre deux lamelles de 1er ordre (*). La flèche blanche marque une porosité, la flèche jaune une interpénétration des lamelles de 2e ordre entre les lamelles de 1er ordre.

Les observations en BSE révèlent cependant la présence de petites ponctuations discontinues, en contraste noir, entre les lamelles de 1er ordre (Figure 23d-f) : si ce contraste peut correspondre à un patchwork de composés organiques (poids atomique plus faible que le Ca), il peut tout aussi bien être causé par une porosité entre les lamelles de 1er ordre. Cette interprétation semble d'ailleurs confirmée par les observations MET, où le contact entre deux lamelles de 1er ordre est marqué par des "trous", irréguliers et discontinus (flèche blanche dans la figure 23g) ; entre ces trous, on peut observer une interpénétration des lamelles de 2e ordre - qui apparaissent donc superposées en MET (flèche jaune dans la figure 23g), entre les deux lamelles de 1er ordre.

Après de multiples tentatives infructueuses (etchings, etc.), nous avons finalement pu obtenir les premiers indices confirmant la présence de molécules organiques localisées entre les lamelles de 1er ordre à l'occasion de tests de colorations spécifiques (cf section 5.2). Ainsi, sur une préparation colorée au Bodipy "ratée" (à cause de problèmes de fixation du fluorophore, la coloration n'est en effet pas uniforme sur la surface de l'échantillon), l'observation en microscopie d'épifluorescence confirme que certaines zones sont marquées (Figure 24a), notamment certaines stries de croissance (Figure 24b) et par endroits les limites situées entre les lamelles de 1er ordre (flèche jaune dans la figure 24b).

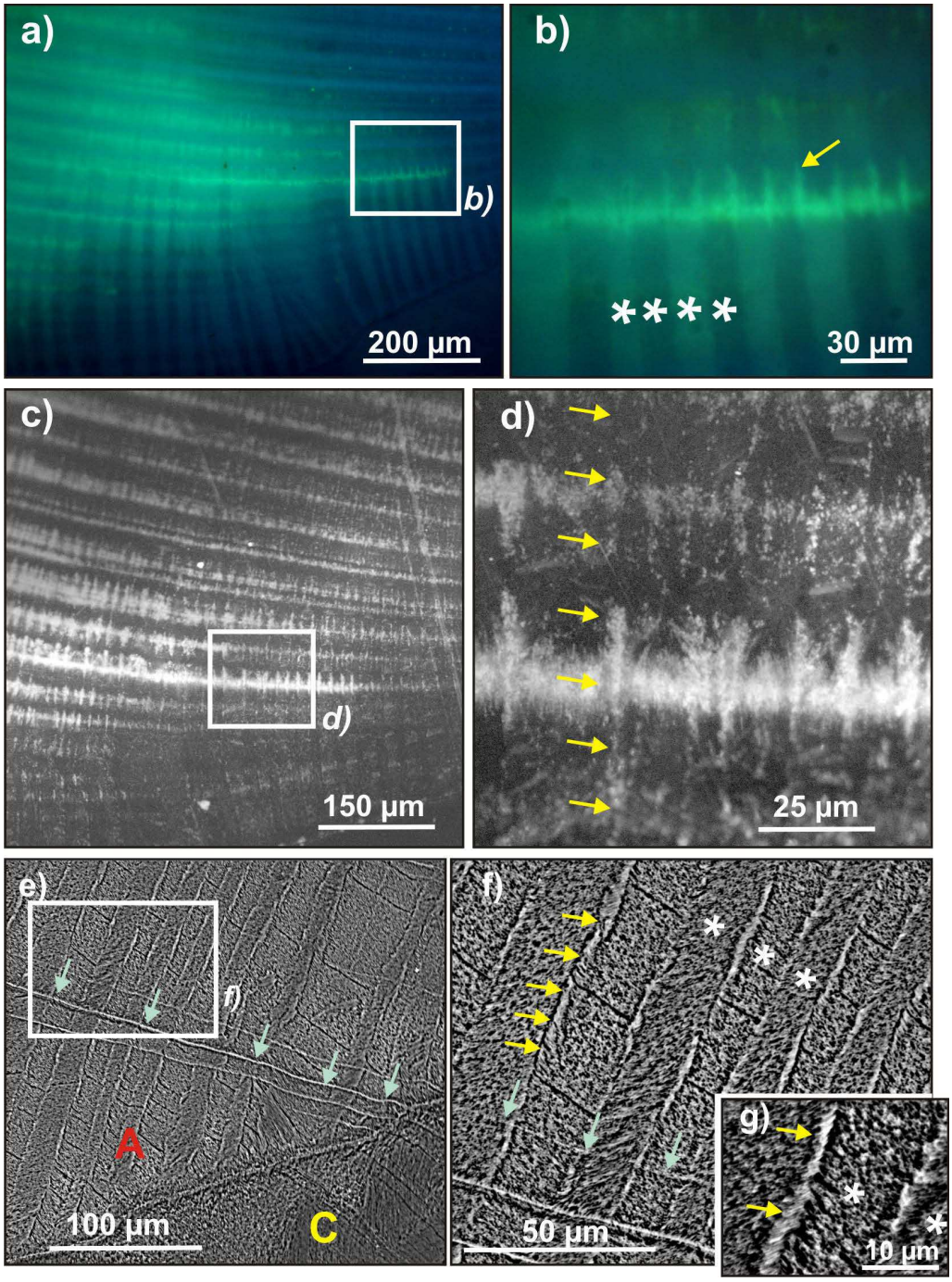


FIGURE 24 – Colorations. a-b) Tests de coloration au Bodipy de la couche lamellaire croisée d'une *Nerita sp.* La flèche marque les enveloppes colorées entre les lamelles de 1er ordre (*). c-d) Observations de la même zone en microscopie confocale laser. Les flèches marquent une enveloppe colorée. e-g) Colorations au citrate de Pb / acétate d'uranyle, observations MEB (surface polie, détecteur BSE). Les flèches vertes indiquent une strie de croissance marquée, et les flèches jaunes une enveloppe colorée entre lamelles de 1er ordre (*).

Les observations sur la même zone en microscopie confocale laser (Figure 24c-d) précisent le caractère discontinu de ces "enveloppes", ou plutôt patchworks organiques (flèches jaunes dans la figure 24d). Sur des surfaces observées en BSE (Figure 24e-g), l'acétate d'uranyle/citrate de plomb colorent certaines stries de croissance, très enrichies en composés organiques (flèches vertes sur la figure 24f), ainsi que les molécules localisées entre les lamelles de 1er ordre (flèches jaunes sur la figure 24f-g).

En microspectroscopie confocale Raman, les ponctuations sont parfaitement visibles en contraste négatif sur une cartographie des carbonates (Figure 25a), et bien localisées à la limite entre les lamelles de 1er ordre (en fausses couleurs sur la figure 25c) - ce qui confirme qu'elles sont en effet vides de tout matériel carbonaté. Sur certains scans cependant, des séries de spectres présentent des pics situés entre 2850 cm^{-1} et 3000 cm^{-1}, correspondant aux vibrations d'élongation des groupements -CH (Smith et Dent, 2005) (Figure 25b). La carte de ces pics (Figure 25d) indique que ces molécules sont localisées préférentiellement dans les dômes situés à l'initiation des orientations cristallines, mais aussi dans ces ponctuations entre les lamelles de 1er ordre, ainsi qu'au niveau de certaines stries de croissance.

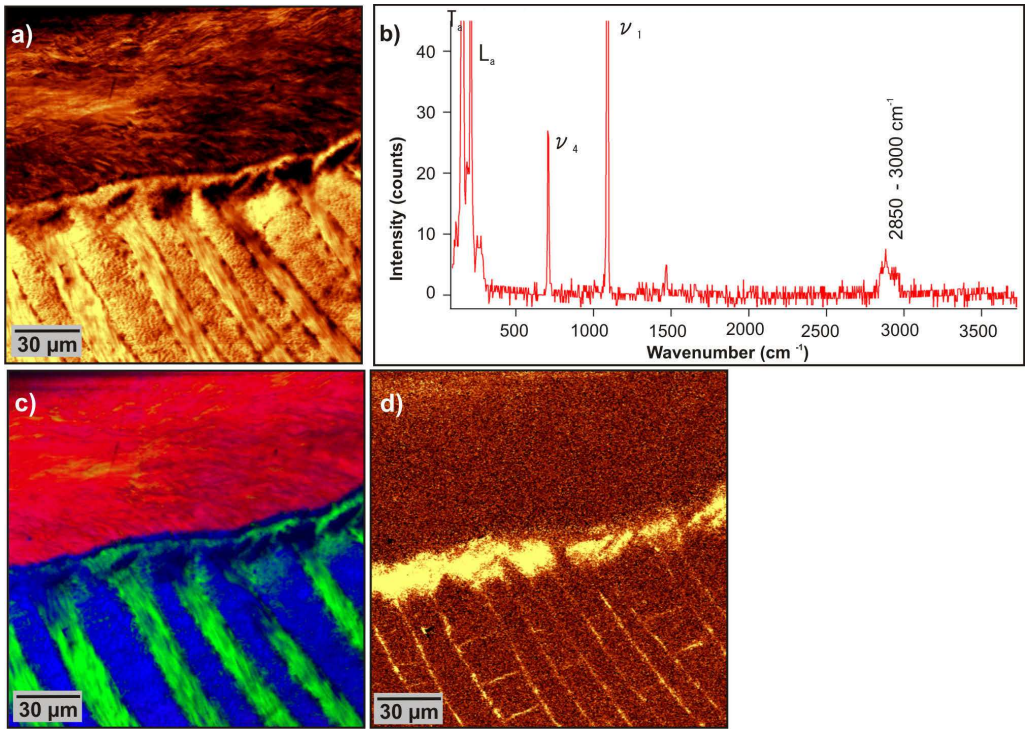


FIGURE 25 – Spectroscopie confocale Raman (excitation 532 nm). a) Carte de distribution de l'intensité du pic ν_1 à 1080 cm^{-1} des carbonates. b) Spectre Raman typique de l'aragonite, et présentant des pics entre 2850 cm^{-1} et 3000 cm^{-1} qui correspondent aux vibrations d'élongation des groupements -CH. c) Carte composite en fausses couleurs montrant la distribution de la calcite (rouge) et de deux orientations d'aragonite (bleu et vert) identifiant les lamelles de 1er ordre. d) Carte de distribution de l'intensité des pics entre 2850 cm^{-1} et 3000 cm^{-1} (vibrations d'élongation des groupements -CH).

Bien que très différentes des enveloppes continues et épaisses séparant les prismes de *Pinctada margaritifera,* ces quelques observations nous permettent de mettre en évidence la présence d'un réseau discontinu de molécules, ou "patchwork" organique, délimitant les unités microstructurales de 1er ordre dans la couche lamellaire croisée de *Nerita*. Ces molécules semblent particulièrement labiles : elles ont ainsi disparu des préparations MET, probablement brulées sous le faisceau ou le canon ionique lors de l'amincissement et ne laissant qu'une porosité résiduelle. Les colorations au Bodipy et cartographies Raman de la distribution des groupements -CH suggèrent que la composition organique de ce "patchwork" contient une composante lipidique non-négligeable.
Les interpénétrations entre lamelles du 1er ordre observées lorsque ces molécules sont absentes (entre les ponctuations donc) suggèrent que cette limite, à la différence des enveloppes prismatiques de *Pinctada margaritifera*, n'exerce qu'un contrôle imparfait sur la délimitation latérale de la morphologie des lamelles de 1er ordre.

1.2.4 La forte spécialisation de l'activité métabolique de la partie minéralisante du manteau

Ces exemples mettent en lumière les corrélations entre les variations de compositions biochimiques et les organisations microstructurales, qui illustrent le rôle fondamental que jouent ces molécules organiques sur la formation de la coquille, processus, rappelons le, extra-cellulaire ; c'est en effet nécessairement par le seul intermédiaire de ces molécules sécrétées par le manteau que ce dernier peut exercer un contrôle sur la sélection du polymorphe minéral, le contrôle des orientations cristallographiques, de la morphologie des unités microstructurales, etc. On comprend ainsi aisément que la localisation précise des assemblages organiques par rapport à l'organisation microstructurale, et leur caractérisation, joue un rôle clé dans la compréhension des différents mécanismes par lesquels ce contrôle peut s'effectuer.

Ces caractérisations biochimiques in-situ sont limitées par rapport aux analyses que l'on peut effectuer sur les phases organiques extraites des coquilles - à noter que l'interprétation de ces dernières est souvent complexe, de par la très grande diversité de molécules, nécessairement mélangées, qui forment ces extraits. Ainsi sur les composés organiques extraits des coquilles, la spectroscopie XANES n'a été jusqu'ici utilisée que pour caractériser les différents états d'oxydation du soufre et ne détecte ainsi que les molécules organiques soufrées, les spectroscopies FT-IR et Raman ne révèlent que la présence de certaines liaisons, et l'interprétation des colorations est souvent délicate (exemple de l'acridine orange) : finalement, ce que l'on détecte par ces procédés in-situ ne représente en fait qu'une composante de la phase organique présente.

Mais, par l'intermédiaire des cartographies de distribution de ces molécules ou groupements fonctionnels, nous pouvons remonter à une information essentielle, qui est la très forte spécialisation spatiale des cellules constituant la bande minéralisante du manteau : ces molécules nous servent de traceurs, qui permettent de remonter ainsi aux différences de métabolisme des cellules constituant les bandes transversales successives qui subdivisent le manteau. Au fur à mesure de la progression du manteau vers la bordure de la coquille qui accompagne l'épaississement de cette dernière (Figure 26a-b), ces bandes se déplacent elles aussi : ce sont ainsi d'autres cellules, dont l'activité sécrétrice est identique, qui continuent les unités initiées préalablement (Figure 26a-b).

On distingue ainsi deux modes de sécrétions :

- les molécules dont la distribution varie selon la striation de croissance, qu'elles soient sécrétées de façon continue ou uniquement lors de pulses individuels.
- les molécules dont la distribution est corrélée à l'organisation des unités microstructurales, ce qui laisse supposer un rôle structurant de ces assemblages ; ces composés peuvent aussi être déposés ponctuellement (ex : dômes situés à l'initiation de l'alternance lamellaire croisée) ou de façon continue (ex : patchworks ou enveloppes organiques).

De manière synthétique, on peut identifier un minimum de 6 bandes successives subdivisant la zone minéralisante du manteau, et qui sécrètent de façon synchrone des assemblages organiques distincts :

1. la bordure périphérique de la zone minéralisant les fibres calcitiques, qui sécrète des protéines soufrées, des polysaccharides sulfatés et des molécules contenant des groupements amide II.
2. une petite frange de la zone minéralisant les fibres, qui sécrète de façon continue des polyènes en plus des molécules citées précédemment.
3. probablement une bande très fine, qui serait responsable de la sécrétion d'une enveloppe organique (riche en composés contenant des sites chargés négativement) isolant les couches calcitique et aragonitique.
4. une bande très étroite de la zone minéralisant la couche aragonitique dont la largeur ne dépasse pas quelques cellules, sécrétant des molécules contenant des groupements amide I.
5. une petite bande, déposant :
   a/ ponctuellement des dômes constitués d'agglomérats de canalicules contenant des polysaccharides sulfatés, des composés comprenant des sites chargés négativement et des groupements -CH.
   b/ en continu, des molécules contenant des groupements amide I.
   c/ des pulses sécrétion de polyènes.
6. une large bande, la plus interne de la zone minéralisante, responsable de la formation de la structure lamellaire croisée, et qui :
   a/ sécrète en continu des molécules constituant les patchworks organiques entre les lamelles de 1er ordre, très probablement lipidiques
   b/ sécrète en continu des molécules contenant des groupements amide I,
   c/ connait de brefs pulses de sécrétion de polyènes.

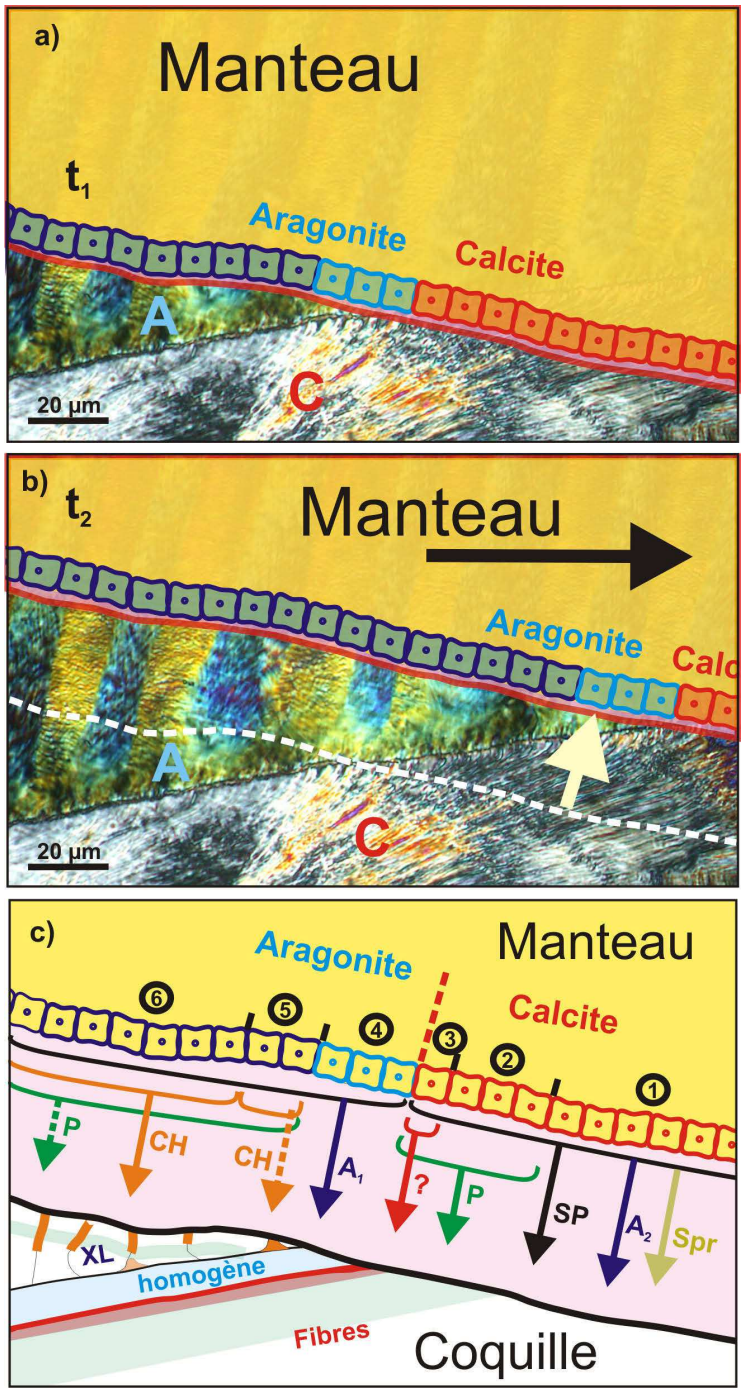


FIGURE 26 – Spécialisation spatiale du manteau.
a) Localisation du tissu minéralisant lors de la formation d'un incrément de croissance. En rouge, les cellules minéralisant la couche fibreuse (calcite), en bleu clair celles minéralisant la couche aragonitique de transition, en bleu foncé celles minéralisant la couche lamellaire croisée (aragonite).
b) Localisation du tissu minéralisant après un temps t+1. La flèche noire indique le sens de déplacement du manteau, la flèche jaune l'épaississement de la coquille pendant ce laps de temps.
c) Schéma éclaté de a. Spr : protéines soufrées. SP : polysaccharides sulfatés. A_1 : molécules présentant des bandes amide 1. A_2 : molécules présentant des bandes amide 2. P : polyènes. CH : molécules contenant des groupements -CH. Les flèches en pointillé indiquent une activité métabolique discontinue dans le temps, les flèches pleines une sécrétion continue des molécules.

1.3 Modalités de cristallisation

L'étude des modalités de cristallisation de la phase minérale et des associations organo-minérales in-situ implique de réaliser un saut dans les échelles d'observation.

La combinaison de deux outils se révèle alors particulièrement intéressante : la microscopie de force atomique (AFM), qui permet de sonder les propriétés physiques et mécaniques et de les corréler aux caractéristiques microstructurales, et la microscopie électronique en transmission (MET), pour une caractérisation fine des paramètres cristallographiques en rapport avec la microstructure, et qui permet dans certains cas de descendre à des résolutions autorisant l'observation des plans d'atomes constituant la maille cristalline (METHR).

1.3.1 Propagation de la cohérence cristalline chez *Pinctada margaritifera*

L'association entre molécules organiques et la phase minérale s'effectue à une échelle très fine, comme le révèlent des observations AFM réalisées sur la couche prismatique de *Pinctada margaritifera* juvénile (Figure 27a-c). Les images en contraste de phase (Figure 27b), révèlent ainsi la présence de sous-unités granulaires irrégulières, de taille variant entre 50 et ˜200 nm, dont la bordure est marquée par un fort contraste de phase révélant une interaction forte entre la pointe et la surface de l'échantillon. L'intérieur des granules présente un contraste de phase hétérogène, sous la forme d'un gradient entre le centre et la bordure (Figure 27c). Un tel contraste de phase peut être attribué à une plus forte visco-élasticité du matériaux (cf section 5.2.3 page 127) ; ces sous-unités ont été interprétées comme des composites organo-minéraux entourés d'un fin cortex constitué de carbonate de calcium amorphe et/ou de matrice organique (Cuif *et al.*, 2011).

De tels granules ovoïdes constituent, sans exception aucune, tous les squelettes ou coquilles formés de carbonates de calcium : on les retrouve dans les coquilles des mollusques (Dauphin, 2008; Li *et al.*, 2013), les squelettes des scléractiniaires (Cuif et Dauphin, 2005), les structures calcaires des spongiaires (Sethmann *et al.*, 2006; Gilis *et al.*, 2011), les tests des échinodermes (Sethmann *et al.*, 2005; Cuif *et al.*, 2011), les coquilles des brachiopodes (Cusack *et al.*, 2008a) ou même les otolithes des poissons (Dauphin et Dufour, 2008).

Les observations MET (Figure 27d-g) confirment la présence de ces sous-domaines granulaires, qui ont été observés à différents degrés de cristallisation : certains, localisés à proximité de l'enveloppe organique en bordure du prisme, sont encore amorphes (Figure 27d-e), alors que d'autres sont déjà fusionnés et complètement cristallins (Figure 27e). La limite entre granules amorphes/cristallisés correspond à un front de cristallisation arrêté (Figure 27e), très probablement par l'action inhibitrice de l'enveloppe organique qui limite latéralement la propagation de la cristallisation ; les granules situés sur ce front (Figure 27e) ne sont que partiellement cristallisés, avec un noyau cristallin mais une bordure externe encore amorphe (Figure 27f-g).

L'interprétation la plus probable est que ce front de cristallisation s'est propagé dans chaque prisme individuel à travers les sous-unités granulaires, pré-existantes, lorsque celles-ci étaient encore amorphes (Baronnet *et al.*, 2008). Or les prismes de *Pinctada margaritifera* juvénile se comportement optiquement comme un monocristal, comme l'indiquent leurs couleurs de polarisation uniformes dans leur section et leur épaisseur en LPA (Figure 27h-i). Afin de construire un tel monocristal "parfait", une inter-connexion forte ente les sous-unités est nécessaire, de façon à pouvoir transmettre la cohérence cristallographique dans les trois dimensions de l'espace, et ce à travers tout le prisme.

Dans un tel scénario, forcément simplifié, les unités granulaires peuvent donc être considérées comme des "blocs de construction" de base, déposés dans un état précurseur, à l'occasion de chaque incrément de croissance.

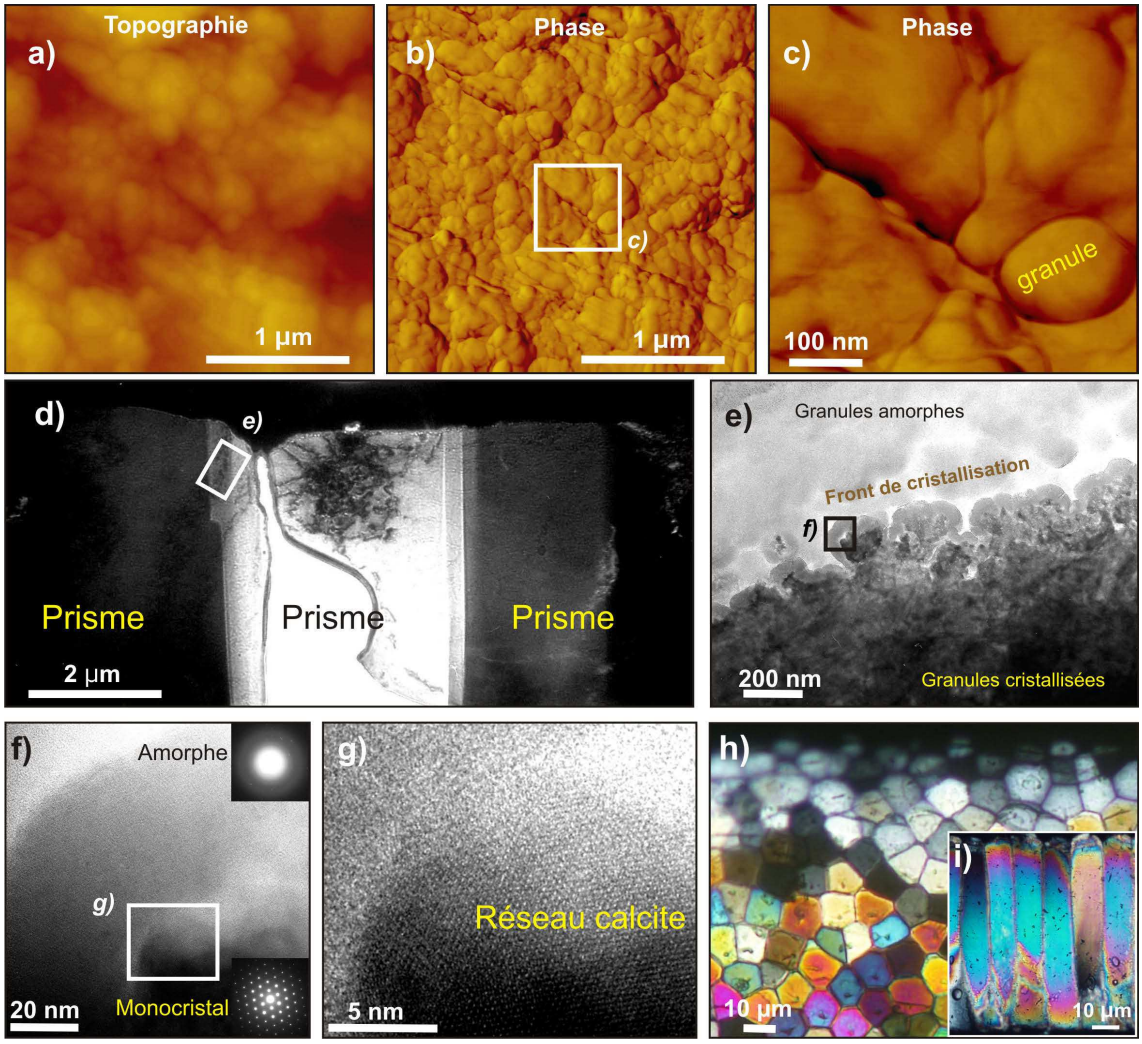


FIGURE 27 – *Pinctada margaritifera* juvénile. a-c) Images AFM (tapping) des granules constituant les prismes de la couche externe. d-g) Vues MET d'une lame amincie au FIB d'une section d'un prisme. d) Localisation. e) Front de propagation de la cristallisation dans les granules amorphes. f) Détail d'un granule, dont le centre est cristallisé (SAED) et la bordure encore amorphe (SAED). g) Image haute résolution du contact entre la maille cristalline et l'amorphe. h) Vue ventrale en LPA des prismes de la bordure de croissance. i) section en lame mince (˜10 µm) des prismes de la couche externe.

En mode contact à l'AFM, la possibilité de réaliser des courbes localisées d'approche-retrait (et des cartographies) permet de mieux contraindre les caractéristiques physiques et mécaniques de ces granules, en particulier l'élasticité et l'adhésion de la surface (Figure 28a-b), que l'on ne peut déconvoluer sur les cartographies de signal de phase en tapping (détails section 5.2.3 page 127).

Sur un transect (Figure 28c), on distingue un premier pôle de courbes, caractérisé par une faible adhésion, suivi par une deuxième série de courbes présentant une élasticité proche, mais dont l'adhésion augmente et peut atteindre des valeurs importantes (Figure 28d). La cartographie des valeurs de déflexion du microlevier pour des positions successives en Z est un moyen simple de visualiser les hétérogénéités de ces deux paramètres sur la surface de l'échantillon (Figure 28e-i). Alors que l'élasticité semble globalement homogène, avec de très faibles variations, sur la surface (Figure 28e), la variation de l'adhésion est importante : le centre des granules correspond au pôle de courbes présentant une faible adhésion (ex : point B sur les figures 28f-i), alors qu'à la bordure des granules (ex : point A sur les figures 28f-i), l'adhésion est la plus forte (Figure 28g-h).

Ces observations nous permettent ainsi d'affiner l'interprétation des cartographies du signal de phase réalisées jusqu'ici en mode tapping : la composante principale du contraste de phase en tapping provient de la forte hétérogénéité des propriétés adhésives de la surface de l'échantillon, alors que les variations d'élasticité restent faibles. L'élasticité au sein des granules varie peu, mais leur cortex est très fortement adhésif.

Toutes ces observations ont été réalisées sous atmosphère ambiante, favorisant l'adsorption de molécules H_20 sur la surface qui peut ainsi former un film d'eau, dont la répartition, à ces échelles, est fortement affectée par les propriétés de la surface : l'épaisseur de ce film étant covariant avec les forces de capillarité induites sur la pointe, le contraste observé illustre un contraste des propriétés hydrophobes/hydrophiles de l'échantillon. Certains des composés organiques contenus dans les biominéraux sont hydrophiles (protéines, sucres), et d'autres par nature hydrophobes, tels les lipides, dont la présence a été rapportée dans plusieurs taxons et structures (Farre et Dauphin, 2009; Farre *et al.*, 2010), dont *Pinctada margaritifera*.

Le contraste de phase observé peut ainsi correspondre à la répartition de ces composés à la surface de l'échantillon (et/ou de carbonate de calcium amorphe ?).

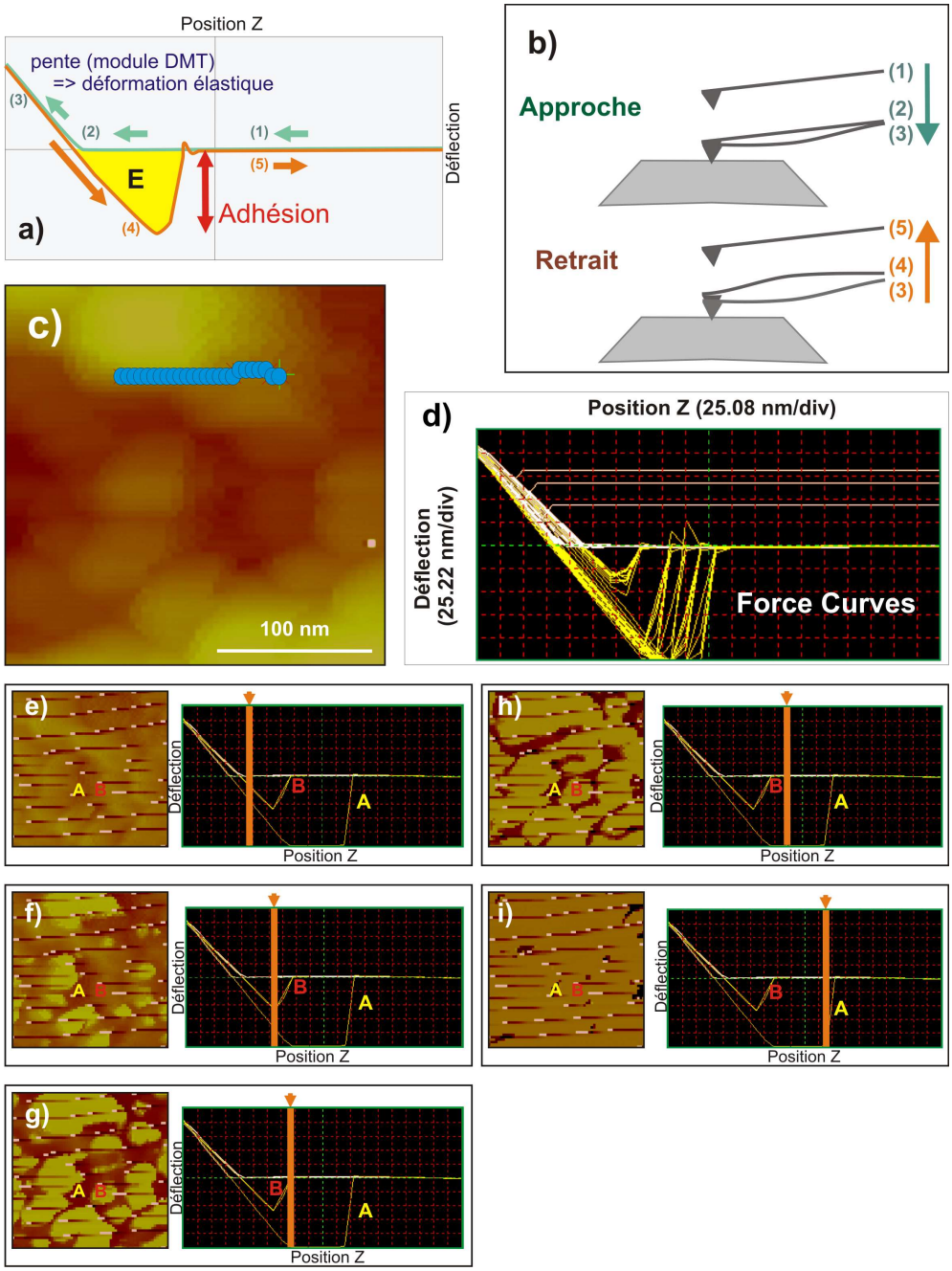


FIGURE 28 – AFM (Force Volume). a) Schéma de principe d'une courbe d'approche-retrait. b) Position en Z du microlevier pour chaque étape du schéma a. c) Image de topographie - les points représentent les localisations des courbes de force de la figure d. d) Courbes de forces mesurées le long du transect indiqué en c. e-i) Cartes de déflexion lors du retrait du levier pour plusieurs positions en Z. La position en Z est marquée par une barre orange. Les points A et B indiquent les localisations des 2 courbes de forces illustrées.

1.3.2 Propagation de la cohérence cristalline chez *Nerita undata*

AFM

Les coquilles de *Nerita* ne font pas exception à la règle, et l'on retrouve, en mode tapping à l'AFM, des granules ovoïdes constituant aussi bien les fibres de la couche externe (Figure 29a-d) que le lamellaire croisé de la couche interne (Figure 29e-j).

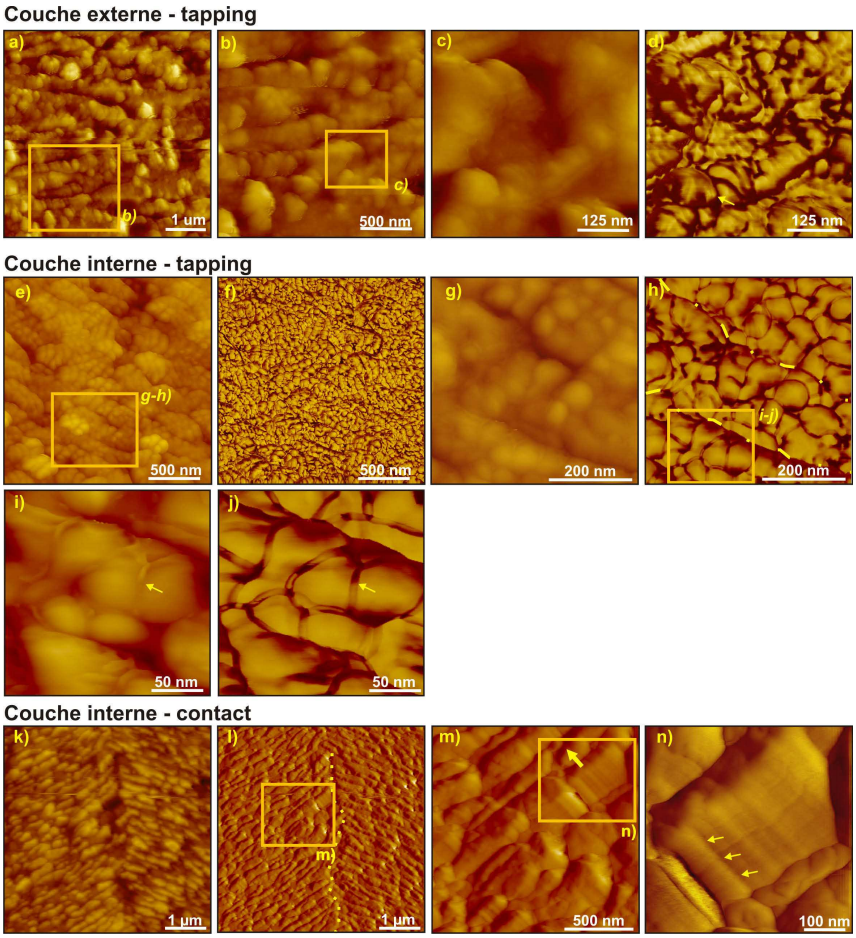


FIGURE 29 – Section radiale de *Nerita undata* à l'AFM. a-d) Image en mode tapping des fibres de la couche externe (attaque à l'acide acétique 0,1% wt., 5 sec). a-c) Images de topographie. d) Image de phase, montrant la composition granulaire. e-j) Images en mode tapping dans la couche lamellaire croisée (attaque acide 5 s dans une solution d'acide acétique 0,1% wt. contenant 3% de glutaraldéhyde). e) Carte de topographie et f) carte du signal de phase des lamelles du 2e ordre. g) Carte de topographie et h) carte de signal de phase illustrant les granules qui composent une lamelle du 2e ordre (délimitée par la ligne pointillée). i) Carte de topographie et j) de signal de phase des granules. La flèche marque le cortex entre deux granules. k-r) Images en mode contact dans la couche lamellaire croisée (attaque acide 1 s dans une solution d'acide acétique 0,1% wt.). k) Carte de topographie et l) carte du signal de déflexion du contact entre deux lamelles du 1er ordre. m) Carte du signal de déflexion montrant les lamelles de 3e ordre, alignées. La flèche marque la direction d'élongation des lamelles 3e ordre. n) Carte du signal de déflexion d'une lamelle de 3e ordre. Les flèches marquent l'affleurement d'un plan de micromacle (110) à la surface d'une lamelle de 3e ordre.

Dans la couche lamellaire croisée, ces sous-unités ont une longueur variant de 0.04 μm à 0.1 μm (Figure 29h) et sont entourées d'un cortex montrant une forte interaction avec la pointe en contraste de phase (Figure 29h, i) ; de faibles contrastes de phase sont aussi visibles à l'intérieur

des granules, dont certains des plus larges semblent composés d'unités plus petites partiellement fusionnées (Figure 29i-j). On note aussi la présence d'un film apparemment continu, présentant une interaction forte avec la pointe, qui semble séparer les lamelles de 2e ordre.

En mode contact (Figure 29k-n), on identifie facilement les lamelles de 3e ordre individuelles (Figure 29m-n) qui composent les alignements de 2e ordre, plongeant dans des directions opposées entre 2 lamelles de 1er ordre jointives (Figure 29k-l). Le signal de déflexion (Figure 29m-n) révèle une segmentation interne des lamelles de 3e ordre : celle-ci correspond à l'affleurement des plans de micromacles (110), que l'on trouve de façon récurrente dans les bio-aragonites (Suzuki *et al.*, 2012), et qui, dans le cas de la microstructure lamellaire-croisée, ont été décrites pour la première fois par Kobayashi et Akai (1994) dans les lamelles de 3e ordre de coquilles de *Barbatia virescens* (Pteriomorpha, Arcidae) et de *Glycymeris yessoensis* (Pteriomorpha, Glycymerididae) (Figure 30).

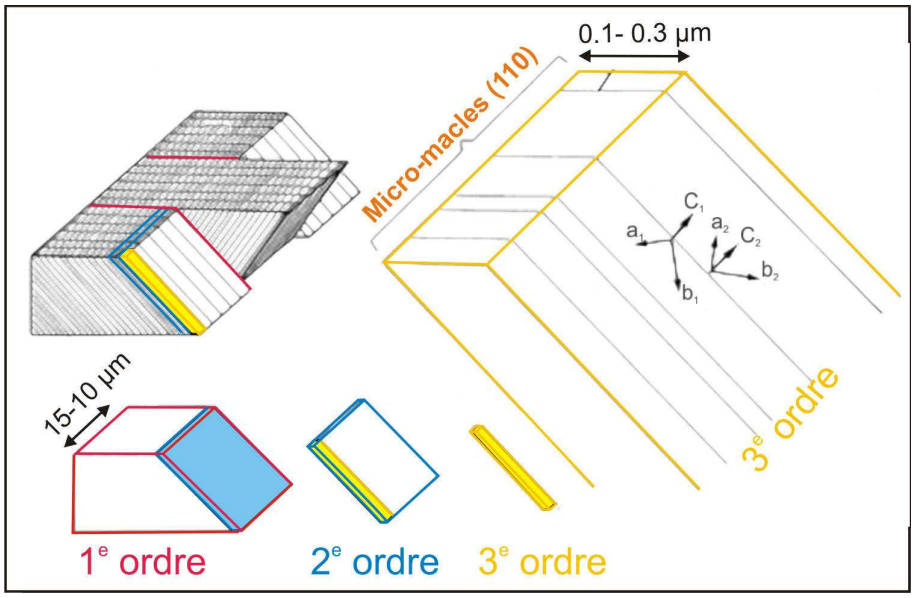


FIGURE 30 – Diagramme schématique des orientations des micromacles (110) dans la structure lamellaire-croisée (modifié d'après Kobayashi et Akai, 1994).

Le mode QNM^{TM} (Quantitative Nanomechanical Property Mapping) permet de réaliser des cartes quantitatives du module DMT (mesure de l'élasticité d'après le modèle de contact Derjaguin-Muller-Toporov) et des forces d'adhésion (Figure 31a-c), corrélables à la topographie (Figure 31a). Dans ce mode, le signal de dissipation correspond à la somme de l'énergie dissipée entre la pointe et la surface de l'échantillon, et peut être assimilée à la somme des interactions correspondant au signal de phase en mode tapping. La carte de dissipation (Figure 31d) est très nettement corrélée avec la carte des forces d'adhésion (Figure 31f), et non avec la carte du module DMT (Figure 31e).Comme dans le cas de *Pinctada margaritifera*, ces résultats confirment que les forces d'adhésion constituent la composante majeure des interactions entre la pointe et l'échantillon observée en modes tapping (contraste de phase) et QNM^{TM} (dissipation), et que les hétérogénéités d'élasticité du matériau n'ont qu'une contribution mineure ; ces dernières semblent d'ailleurs plutôt révéler les micromacles (110). Les granules en partie fusionnés qui constituent les unités de 3e ordre (Figure 31d, f) présentent, comme en mode tapping, une distribution hétérogène en dissipation/adhésion. Mais surtout, ces observations révèlent les enveloppes apparemment continues qui séparent les unités de 3e ordre, caractérisées par un fort contraste d'adhésion (Figure 31f) : comme présenté section 1.3.1 (page 43), ce contraste serait cohérent avec la présence de composés organiques hydrophiles, formant les enveloppes qui, ici, entourent les lamelles de 3e ordre.

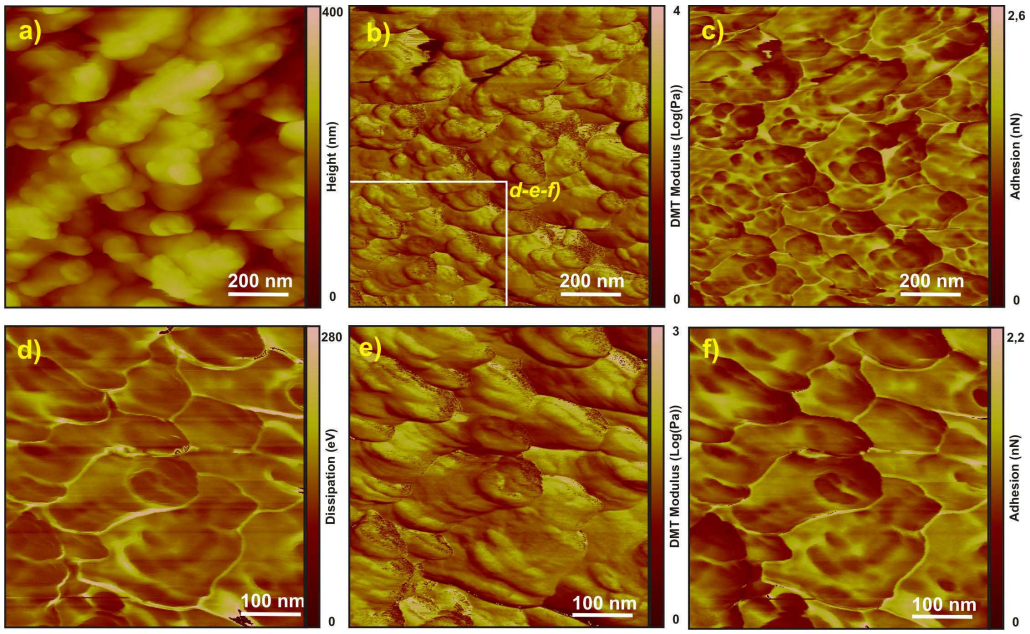


FIGURE 31 – Section radiale de *Nerita undata* à l'AFM en mode QNM^{TM} (attaque acide 1 s dans une solution d'acide acétique 0,1% wt.). a) Signal de topographie. b) Carte du module DMT (déformation élastique). c) Carte du signal d'adhésion. d) Carte du signal de dissipation, e) du module DMT et f) du signal d'adhésion des plusieurs lamelles de 3e ordre.

FEG-SEM / TEM

Les observations MEB à haute résolution de la surface d'une lamelle de 2e ordre montrent le contour ondulé des unités de 3e ordre qui la constituent (Figure 32a-b), séparées l'une de l'autre par une limite sinueuse et ponctuée (Figure 32b). La plus petite largeur observée pour une unité de 3e ordre est par ailleurs compatible avec la taille des granules observés à l'AFM (flèche blanche sur la figure 32b). L'utilisation d'un détecteur Inlens (Figure 32c) (avec lequel les légers effets de charge de surface augmentent "artificiellement" le contraste), met en valeur la morphologie arrondie des bordures d'une lamelle de 3e ordre ; ces observations sont parfaitement cohérentes avec la notion d'unités de 3e ordre constituées par des chapelets de sous-unités ovoïdes.

Les observations MET, réalisées à proximité de la bordure d'amincissement afin de minimiser les superpositions de structures, révèlent aussi la présence de granules ovoïdes (Figure 32d-h) (le tilt de l'échantillon est ici optimisé pour éviter toute diffraction gênante, et favoriser ainsi l'observation des structures) ; leur taille peut varier de ˜0.05 μm (Figure 32f-h) à plus de ˜0.15 μm (Figure 32g), et certaines des plus grosses unités sont là encore composées de petits granules agglutinés (Figure 32g-h). A la limite des lamelles de 2e et de 3e ordre, un réseau de petites bulles est visible (Figure 32d-e). Ces artefacts correspondent à la déstabilisation progressive des composés organiques lors de l'amincissement, et permettent de préciser la localisation de ces molécules par rapport à l'organisation microstructurale, confirmant ainsi les observations AFM précédentes : les limites entre les lamelles de 2e ordre sont riches en composés organiques. La figure 32e présente une orientation et un champ directement comparables à la figure 29h ; elles confirment que les unités de 3e ordre sont bien composées par un empilement de granules, et que leur épaisseur minimum peut se résumer en certains endroits à une seule rangée de granules.

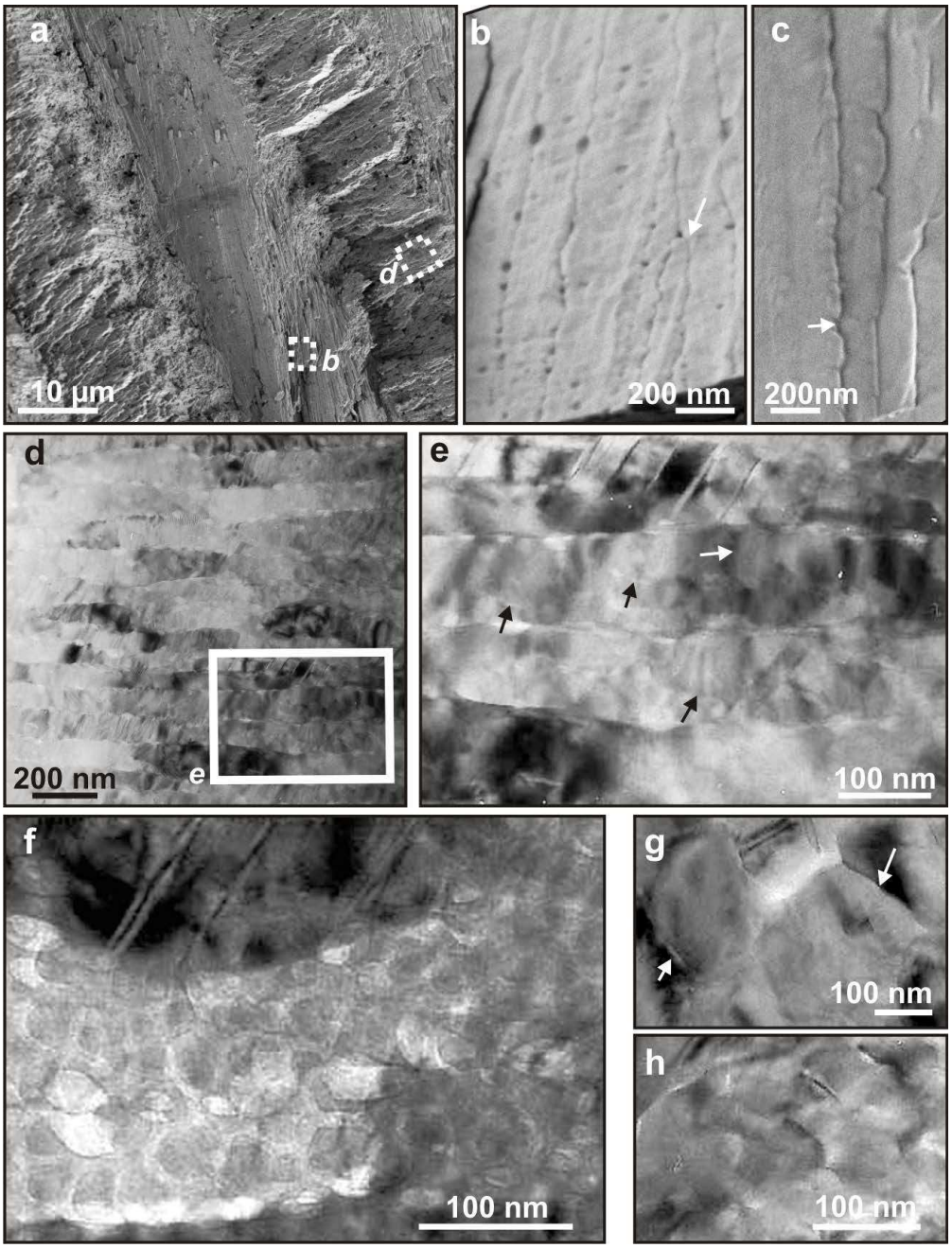


FIGURE 32 – Images MET et MEB des granules dans la couche interne de *Nerita undata.* a-b) Images FEG-SEM (détecteur d'électrons secondaires conventionnel). a) Cassure fraiche d'une section radiale montrant les lamelles de 1er ordre. b) Vue d'une fracture suivant la surface d'une lamelle de 2e ordre, révélant la morphologie des lamelles de 3e ordre la constituant. La flèche indique le démarrage d'une lamelle de 3e ordre ; sa taille et sa forme ovoïde sont, à cet endroit, compatibles avec la taille des granules observés à l'AFM. c) Image FEG-SEM (détecteur d'électrons secondaires InLens) de la surface d'une lamelle de 2e ordre, illustrant la morphologie arrondie des limites d'une lamelle de 3^{e}ordre. d) Vue MET, en coupe transversale aux lamelles de 2e ordre. e) Vue MET des granules constituant deux lamelles de 2e ordre consécutives (même orientation que la figure d). f) Vue MET (non-orientée) illustrant de petits granules superposés dans l'épaisseur de l'échantillon (le contraste est intégralement lié à l'absorption). g) Vue MET (non-orientée) de granules plus gros. La flèche droite indique un granule de grande taille, qui semble composé de petits granules agglomérés. La flèche gauche indique un granule de grande taille plus homogène. h) Vue MET (non-orientée) de petits granules agglomérés.

Dans la figure 33, le tilt est ajusté afin le contraste révèle à la fois les micromacles (110) et l'organisation microstructurale, permettant ainsi de corréler les caractéristiques cristallographiques avec les microstructures.

La continuité des orientations cristallographiques peut être déterminée en réalisant des diffractions localisés (SAED) ; sur une zone incluant plusieurs lamelles de 3e ordre, qui appartiennent à des lits de 2e ordre distincts (Figure 33b), on obtient un cliché typiquement polycristallin (Figure 33c), ce qui révèle une forte désorientation entre les lamelles de 2e ordre. Mais lorsque la zone de diffraction se limite à une unité de 3e ordre (Figure 33b), le cliché correspondant est typiquement monocristallin (Figure 33d) : ceci dénote une excellente cohérence cristallographique à l'intérieur des unités de 3e ordre.

La présence des micromacles (110) (Figure 33e, f, i) constitue de plus un moyen simple et pratique pour estimer ces désorientations : entre lamelles de 3e ordre appartenant à des lits de 2e ordre distincts, celle-ci atteint facilement plusieurs degrés (Figure 33e, f). Cependant, au sein d'une même lamelle de 2e ordre, une très faible désorientation est observée entre les unités de 3e ordre, comme en témoigne la propagation continue de franges de Bragg à travers les lamelles de 3e ordre (Figure 33g), peu déviées lors du passage d'une lamelle à l'autre ; ces paires de franges se croisant dans une lamelle de 2e ordre (Figure 33h) sont pratiquement rectilignes sur de grandes distances, ce qui dénote une relativement bonne cohérence cristalline au sein des lamelles de 2e ordre.

Les micromacles (110) se limitent en fait aux lamelles de 3e ordre (Figure 33i), confirmant l'excellente cohérence cristallographique au sein de ces unités. Elles se propagent de plus de façon continue entre des granules ovoïdes adjacents dans la même unité de 3e ordre (flèche sur la figure 33i) - ce qui démontre que ce micromaclage s'est formé postérieurement au dépôt des granules.

Micromacles (110) : Les micromacles observées dans la couche lamellaire croisée de la coquille de *Nerita undata* ont un espacement variable, pouvant descendre jusqu'à des dimensions de l'ordre de 1-10 nm. Celui-ci est comparable avec les observations MET des couches lamellaires croisées de coquilles de bivalves ou de gastéropodes : *Barbatia virescens* (Pteriomorpha, Arcidae) et *Glycymeris yessoensis* (Pteriomorpha, Glycymerididae) (Kobayashi et Akai, 1994), *Lottia kogamogai* (Patellogastropoda, Lottiidae) (Suzuki *et al.*, 2010), *Oliva sayana* (Sorbeoconcha, Olividae) et *Littorina littorea* (Sorbeoconcha, Littorinidae) (Wilmot *et al.*, 1992).

Deux origines possibles peuvent expliquer ce micromaclage (110). Il peut s'agir : 1/de macles de croissance, se formant au cours de la cristallisation, 2/de macles mécaniques, qui se forment suite à un réarrangement des plans cristallins lorsque l'on applique une contrainte mécanique à un cristal existant.

Or, aux limites entre lamelles du 2e ordre, les micromacles se terminent en suivant exactement la morphologie arrondie des granules ovoïdes (Figure 33i), ce qui ne serait pas le cas si la formation des macle résultait d'une contrainte appliquée au cristal : elles auraient alors formé une limite dentelée en "zigzag". Il s'agit donc très probablement de macles de croissance, formées au cours de la cristallisation : elles permettent de tracer la propagation du front de cristallisation. De telles micromacles (110) ressemblent par ailleurs beaucoup aux macles poly-synthétiques se formant lors de la croissance maclée de cristaux d'aragonites abiotiques (Dana, 1914), si ce n'est l'absence totale de maclage symétrique selon l'orientation $(1\bar{1}0)$, dont l'occurrence devrait pourtant être aussi fréquente puisque le groupe de symétrie de l'aragonite standard est 2/m 2/m 2/m (Bragg, 1924) : l'absence de maclage $(1\bar{1}0)$ constitue ainsi une spécificité supplémentaire de l'aragonite biogénique formant de la microstructure lamellaire croisée.

On peut aussi noter que, dans la direction d'allongement des lamelles de 3e ordre, les micromacles sont continues à travers les granules sur de grandes distances (Figure 33j) ; ce dernier point démontre que la cohérence cristallographique se propage à travers les granules et sur de grandes distances au sein des lamelles de 3e ordre.

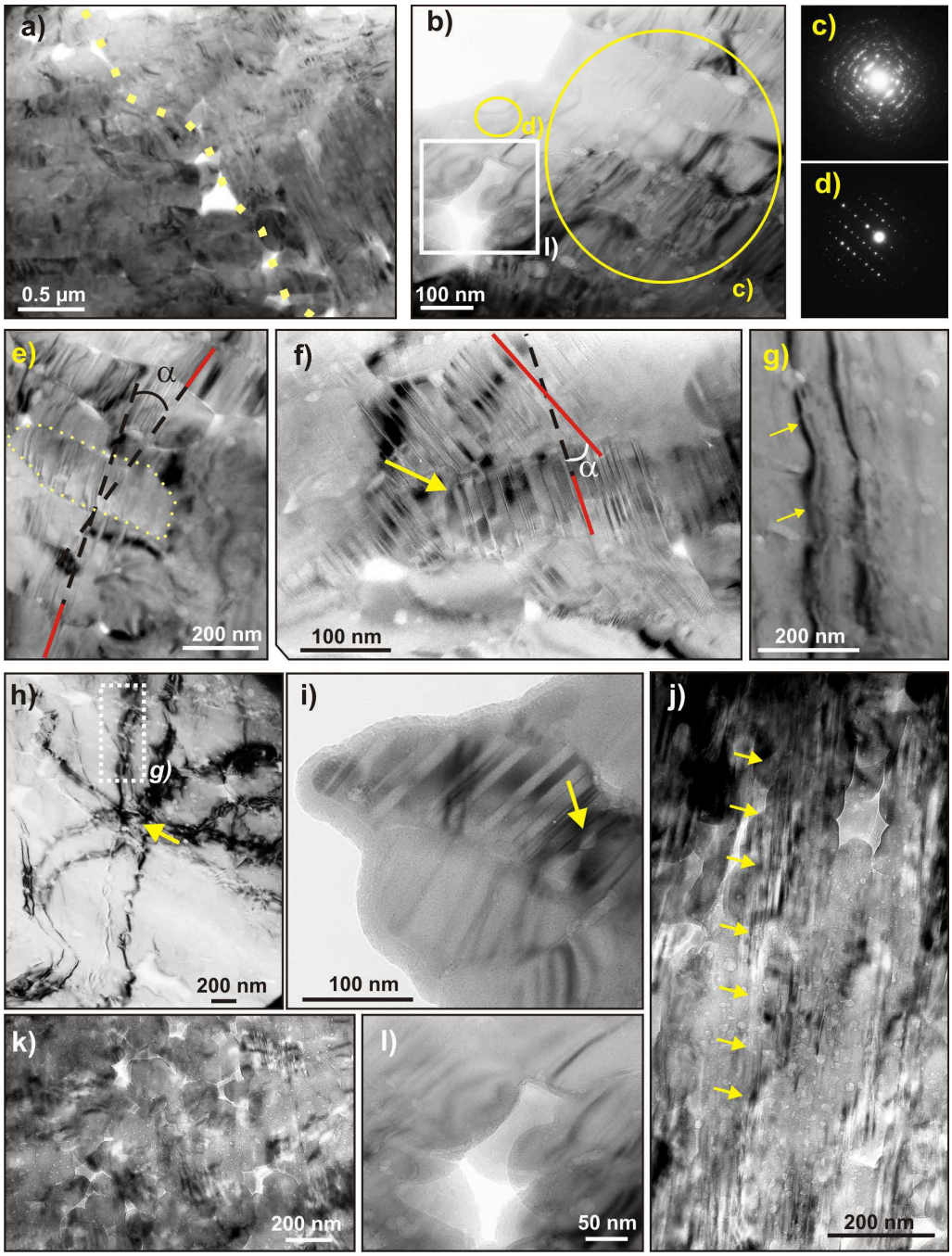


FIGURE 33 – Cohérence cristalline dans la couche interne de *Nerita undata* (MET). a) Limite entre deux lamelles de 1er ordre. b) Lamelles du 3e ordre, en section rectangulaires dont l'alignement forme les lits du 2e ordre, à proximité du biseau d'amincissement. Les cercles indiquent les zones sélectionnées pour les diffractions localisées c et d. c) Cliché de diffraction polycristallin correspondant à la sélection de plusieurs lamelles de 3e ordre. d) Cliché de diffraction d'un cristal unique, correspondant à la sélection d'une seule lamelle de 3e ordre. e) Désalignement progressifs des empilements de macles (110) entre plusieurs lamelles de 2e ordre successives. La ligne pointillée délimite une lamelle de 3e ordre. f) Désalignement des empilements de macles (110) entre deux lamelles de 3e ordre, appartenant à deux lamelles de 2e ordre distinctes. g) Propagation des franges de Bragg, presque rectilignes (flèches), à travers plusieurs lamelles de 3e ordre formant une unique lamelle de 2e ordre. h) Paires de franges de Bragg, presque rectilignes et parallèles, se croisant (flèche) à travers plusieurs lamelles de 3e ordre au sein d'une unique lamelle de 2e ordre, et démontrant la forte cohérence cristallographique dans une lamelle de 2e ordre. i) Micromacles (110) à l'intérieur d'une lamelle de 3e ordre. La flèche indique la continuité d'une micromacle (110) à travers les granules qui constituent la lamelle de 3e ordre. j) Continuité sur de grandes distances des micromacles (110) (flèches) le long des lamelles de 3e ordre. k-l) Granules.

Ces quelques observations à haute résolution mettent en évidence certains caractères fondamentaux du mode de cristallisation des coquilles des mollusques :

. Comme pour toute structure carbonatée d'origine biogénique, les unités microstructurales sont formées par l'assemblage de sous-unités granulaires et hétérogènes. Il s'agit de composites organo-minéraux ovoïdes, entourés d'un cortex riche en amorphe et/ou molécules organiques. Le fort contraste de phase observé à l'AFM en mode tapping correspond principalement à un contraste d'adhésion, qui implique dans notre interprétation la présence d'un matériau hydrophile.

. Lors de la cristallisation des prismes de *Pinctada margaritifera* juvénile, la cohérence cristallographique se transmet à travers les granules pré-existants dans les trois dimensions de l'espace, et ce à travers tout le prisme.

. Dans le cas de la couche lamellaire croisée de *Nerita undata*, les micromacles (110) sont interprétées comme des macles de croissance. Elles permettent ainsi de suivre la propagation de la cohérence cristallographique à travers les granules, qui se trouve être latéralement limitée aux lamelles de 3e ordre.

1.3.3 Le rôle des enveloppes

Le schéma général qui semble se dessiner impliquerait un processus comportant (au moins) deux étapes :

- La première consiste en l'assemblage des sous-unités granulaires, porteuses du Ca sous la forme d'une phase transitoire (supposée amorphe), s'accumulant au cours de chaque incrément de croissance (Cuif *et al.*, 2008a). Par l'intermédiaire du cryo-MEB, Suzuki *et al.* (2011b) ont d'ailleurs mis en évidence la présence d"un lit granulaire continu à la surface de croissance d'une couche lamellaire croisée : cette observation pourrait correspondre au lit transitoire de minéralisation, avant sa cristallisation. L'observation de vésicules contenant du Ca dans les tissus minéralisants de scléractiniaires (Brahmi, 2011) ou de mollusques (Neff, 1972, et Istin et Masoni, 1973, mettent assez tôt en évidence la présence de granules extra-cellulaires, denses aux électrons, dans l'épithelium de plusieurs bivalves), conforte par ailleurs l'existence d'un mécanisme de transport. Le tissu minéralisant pourrait ainsi sécréter des vésicules, véhiculant le Ca dans un état précurseur (amorphe ?), qui s'accumulerait sous cette forme dans le lit de minéralisation avant de cristalliser.
- Dans un deuxième temps, un réseau de connexions s'établit entre les granules (qui n'ont pas encore cristallisé) délimitant ainsi des ensembles de granules connectés, ces ensembles restant isolés les uns des autres (très probablement par des enveloppes ou "mesh" organiques). Un front de cristallisation peut alors se propager et provoquer la coalescence des granules au sein de ces ensembles individuels et compartimentés, qui formeront les unités cristallines microstructurales.

Cette hypothèse, largement simplifiée, permet d'expliquer certaines caractéristiques :

- Pourquoi les micromacles (110) peuvent être parfaitement continues à travers des granules jointifs, et atteindre des dimensions importantes, supérieures à celles des granules ou des incréments de croissance.
- La taille et la forme des compartiments qui enferment les granules coalescés contrôlent directement la taille et la forme des domaines de cohérence. Ainsi dans le cas de *Pinctada margaritifera* juvénile, les granules sont connectés dans les trois dimensions de l'espace à l'intérieur de compartiments de grande taille qui correspondent à la dimension des prismes : un front de cristallisation unique peut ainsi se propager dans toutes les directions jusqu'aux bordures du prisme, conduisant à la formation d'un cristal présentant une bonne cohérence cristalline 3D - ce qui explique le comportement optique monocristallin de ces prismes. Dans le cas de la structure lamellaire croisée de *Nerita undata*, la cristallisation est limitée latéralement aux bordures des lamelles de 3e ordre : la taille du compartiment délimitant les granules coalescés en un cristal, qui présente une véritable cohérence cristallographique, est donc réduite à la dimension d'une lamelle de 3e ordre dans le type microstructural lamellaire croisé.

Une tentative de schéma synthétique (Figure 34a) permet de visualiser les directions de propagation de la cohérence par rapport à la direction de croissance : la propagation latérale de la cohérence est partielle au sein des lamelles de 2e ordre, et ne percole pas entre ces dernières. Une très bonne conservation de la cohérence ne s'effectue ainsi que selon l'allongement des unités de 3e ordre, mais peut être conservée à travers plusieurs incréments de croissance. Sur une lame mince orientée exactement selon l'allongement des lamelles de 3e ordre (Figure 34b-e), on peut suivre ces lamelles sur plusieurs dizaines de microns - elles sont probablement continues sur toute l'épaisseur de la couche : tout comme dans les prismes de *Pinctada margaritifera* juvénile, la cohérence cristalline est ainsi capable de se propager sur de très grandes distance, à travers de nombreux incréments de croissance, mais selon une unique direction de l'espace au sein de ces lamelles de 3e ordre.

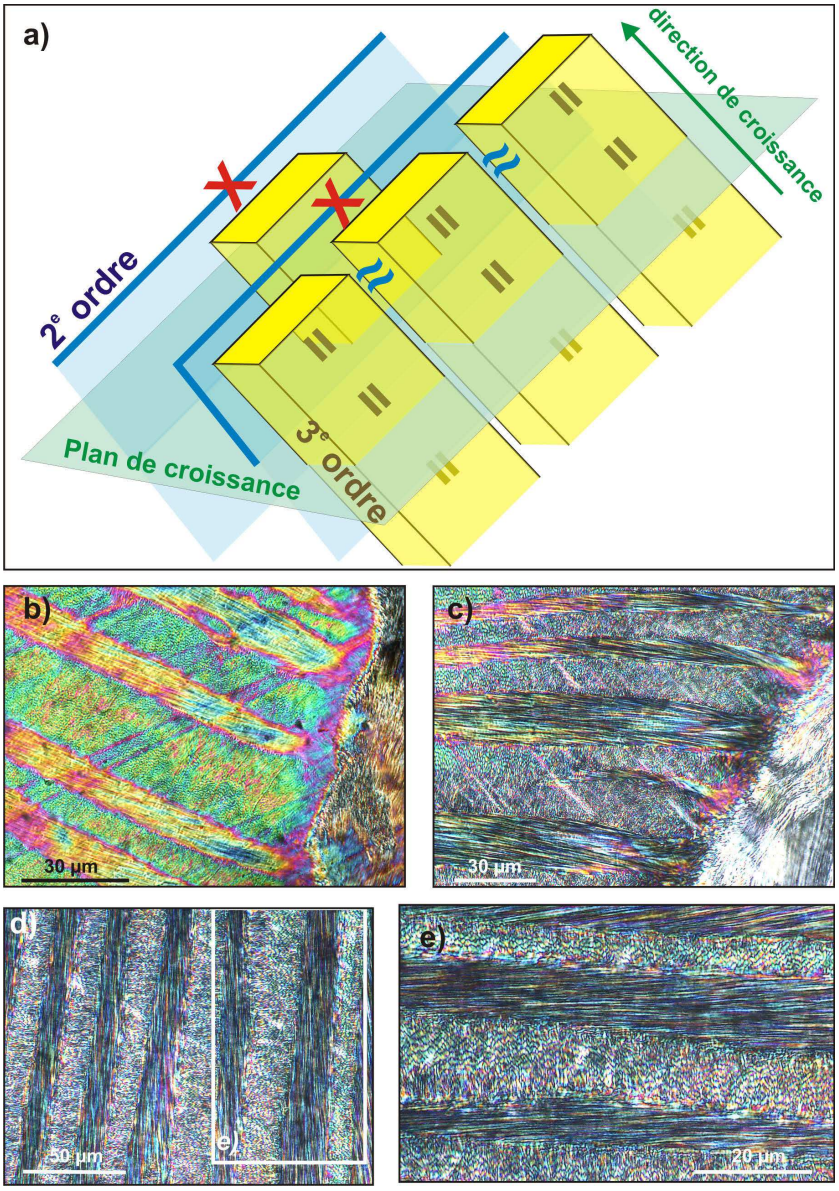


FIGURE 34 – Propagation de la cohérence cristalline. a) Représentation schématique des directions de propagation de la cohérence cristallographique lors de la croissance des unités lamellaire-croisées. "=" indique une très bonne conservation de la cohérence, le long des unités de 3e ordre (révélée par la continuité des micromacles (110)). "≈" indique une bonne conservation de la cohérence, mais avec quelques faibles variation des orientation cristallographiques, au sein des unités de 2e ordre. "X" indique une désorientation entre les unité de 2e ordre. b-e) Lames minces fines (˜10 µm) d'une section de *Nerita sp.* pseudo-radiale, dans une orientation permettant de suivre les unités de 3e ordre dans leur longueur, qui apparaissent continues sur de grandes distances (plusieurs microns). b-c) Initiation des lamelles de 3e ordre à la transition calcite (à droite) → aragonite (à gauche). d-e) Continuité des lamelles de 3e ordre.

Ces observations sont à corréler avec la présence de composés organiques : leurs assemblages en réseaux compartimentant les différentes unités microstructurales serviraient de limites latérales contraignant la propagation de la cristallisation - offrant ainsi le moyen d'un contrôle direct sur la taille et disposition des unités microstructurales. Dans le cas de la couche externe de la coquille de *Pinctada margaritifera* juvénile, ces molécules forment des enveloppes interprismatiques épaisses et continues isolant les prismes (cf section 1.2.3 page 36) ; leur proximité semble inhiber la propagation de la cristallisation, ce qui créé ainsi un front de cristallisation arrêté à son contact (Figure 27e). Mais dans le cas de *Nerita undata*, les granules ne sont que partiellement connectés, ce qui conduit à une propagation anisotropique de la cohérence.

On peut trouver dans la littérature quelques références citant la présence d'enveloppes organiques subdivisant les lamelles de 1er ordre (Kobayashi, 2004), notamment chez certains bivalves : *Hippopus hippopus* (Veneroida, Tridacnidae) (Taylor *et al.*, 1969), *Glycymeris albolineata* (Pteriomorpha, Glycymerididae), *Clinocardium californiense* (Veneroida, Cardiidae) ou *Corbicula japonica* (Veneroidea, Corbiculidae) (Uozumi *et al.*, 1971). Bøggild (1930), déjà, suspectait leur présence, sans pouvoir pousser ses investigations plus avant. Les observations MET réalisées par Uozumi *et al.* (1971) sont en fait les premières à apporter de solides preuves de leurs existence : ces auteurs ont totalement décalcifié puis coloré à l'OsO_4 des lames minces de couches lamellaires croisées, révélant un réseau d'enveloppes organiques à priori continues (Figure 35a-d), qu'il est cependant difficile de corréler avec la microstructure, les unités cristallines ayant disparu. Extrêmement fines, ces enveloppes peuvent facilement passer inaperçues sans traitement adéquat pour les révéler, et certains auteurs signalent leur absence, comme dans le cas du gastéropode *Lottia kogamogai* (Patellogastropoda, Lottiidae) (Suzuki *et al.*, 2010).

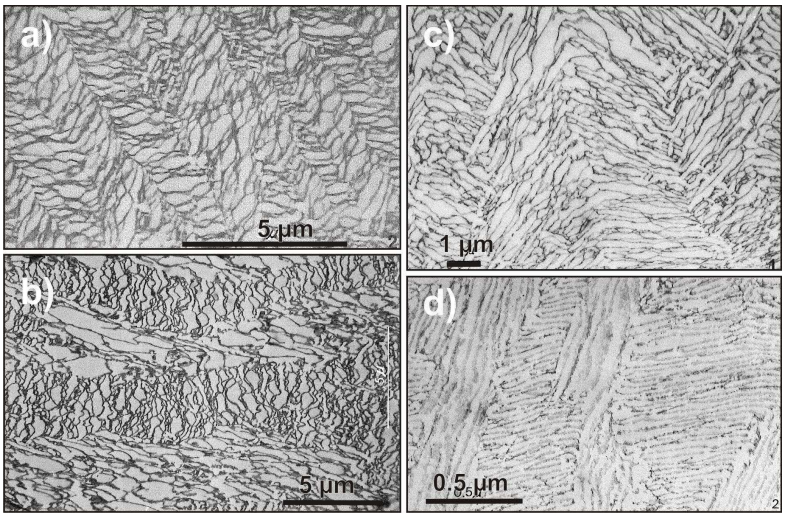


FIGURE 35 – Membranes organiques de couches lamellaire-croisées entièrement déminéralisées, colorées et observées au MET (travaux de Uozumi *et al.*, 1971). a-c) *Corbicula japonica.* d) *Clinocardium californiense.*

Nos observations, réalisées sur des échantillons qui n'ont pas subi une décalcification totale, ont l'avantage de permettre de localiser précisément ces enveloppes par rapport à l'organisation microstructurale, même si leur détection s'avère un peu plus délicate. Ainsi, si l'on arrive à mettre en évidence la présence d'un film continu présentant un contraste de phase entre les lamelles de 2e ordre à l'AFM (mode tapping, figures 29h, i) et un fort contraste d'adhésion entre les lamelles de 3e ordre (mode QNM, figures 31d, f), on ne les observe qu'indirectement au MET : leur présence n'est trahie que par l'apparition progressive de bulles sous le faisceau, issues de la déstabilisation des molécules les constituant, situées aux limites entre lamelles du 2e et du 3e ordre. Nous pouvons ainsi préciser la position de ce tramage organique : il existe des enveloppes continues délimitant les lamelles de 2e ordre, et d'autres situées entre les lamelles de 3e ordre.

Si l'on ne peut, à cette échelle, mettre en évidence une différence de compositions biochimiques entre ces deux types de films moléculaires, nous pouvons les différencier de par leur influence sur la propagation de la cohérence cristalline : les enveloppes entre lamelles de 2e ordre isolent totalement ces dernières les unes des autres, alors que le front de cristallisation semble pouvoir partiellement percoler latéralement entre lamelles de 3e ordre, au sein de ces compartiments isolés.

Chapitre II

Variabilités spécifiques

Variabilités spécifiques

Les caractéristiques fondamentales des microstructures entrecroisées sont très similaires au sein des différentes familles de mollusques (Bøggild, 1930; Taylor *et al.*, 1969; McClintock, 1967), à tel point qu'il est souvent impossible de discriminer les classes ou familles des taxons à partir des seules observations microstructurales de ces couches. Au delà de ces caractéristiques communes, il existe une incroyable variabilité des dimensions, morphologies et arrangements des différentes unités dans les coquilles de chaque taxon, ainsi que de leurs compositions biochimiques (Dauphin et Denis, 2000) : une analyse à fine échelle est donc essentielle, afin de pouvoir discriminer les facteurs partagés par les classes présentant ces types structuraux, qui suggèrent des mécanismes de cristallisation communs, des variabilités développées par chaque famille.

Ce chapitre consiste donc en quelques exemples, développés chacun suivant l'approche et la méthodologie établies au cours du précédent chapitre. Un rapide survol de coquilles de *Cardium*, *Murex* et *Cypraea* permettra dans un premier temps de dégager les principales caractéristiques des arrangements lamellaire-croisés des bivalves et gastéropodes ; des investigations plus focalisées sur des coquilles de *Megathura, Tridacna et Patella,* fourniront l'occasion de déterminer des caractéristiques communes, mais aussi d'illustrer quelques spécificités taxonomiques. Un dernier cas (*Patella vulgata)* nous fournira ensuite l'occasion d'une comparaison avec la microstructure foliée-croisée, variante calcitique de la microstructure lamellaire croisée quasiment exclusive de cette famille.

Un troisième type existe, la microstructure lamellaire croisée complexe, caractérisée par l'absence de lamelles de 1er ordre : cette structure est constituée d'un enchevêtrement désordonné de lits du 2e ordre (Taylor *et al.*, 1969). Ce type microstructural est fréquent, formant souvent une couche interne fine dans les coquilles de lamellibranches et gastéropodes, mais son étude est rendue très complexe par la présence presque systématique d'inter-lits prismatiques ou de couches myostracales très fins, et nous ne l'aborderons pas. Il reste néanmoins intéressant de noter que l'absence de délimitation latérale qui formerait les lamelles de 1er ordre est assez cohérente avec notre théorie de compartimentation développée au cours du précédent chapitre : elle pourrait être directement corrélée à l'absence d'enveloppes ou "patchs" organiques structurants délimitant les unités du 1er ordre.

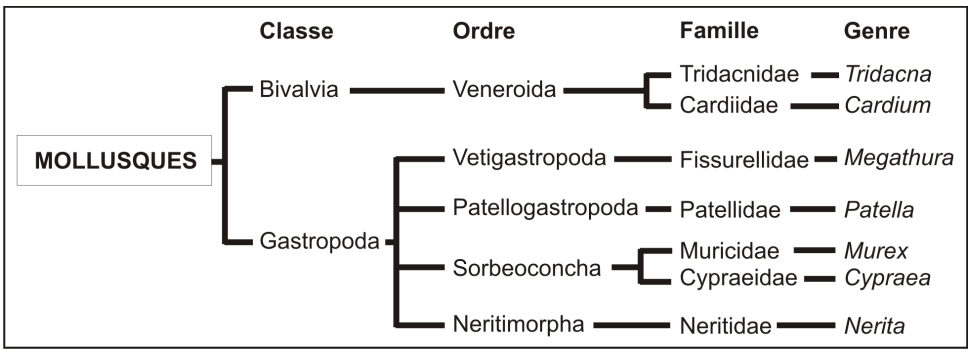


FIGURE 36 – Classification des taxons étudiés.

2.1 Microstructure lamellaire croisée

Quelques tendances générales semblent se dessiner dans les organisations et morphologies des couches lamellaires croisées entre différents taxons : chez les gastéropodes, par exemple, les lamelles de 1er ordre possèdent le plus souvent des limites assez rectilignes et parallèles, alors que ces lamelles sont généralement plus branchues et moins régulières chez les bivalves (Bøggild, 1930). Chez ces derniers, les lamelles de 1er ordre sont fréquemment d'orientation concentrique (mais on les trouve aussi en orientation longitudinale) (Bøggild, 1930), alors que les coquilles de gastéropodes possèdent généralement 3 couches, dont les couches internes et externes sont d'orientation transverse et la couche moyenne d'orientation longitudinale.

Comme précisé plus haut, il ne s'agit là que de "tendances", qui comportent de nombreuses exceptions. La notion de "couche" est aussi quelque peu ambigüe lorsque l'on considère un ensemble formé par la même microstructure : comme nous le verrons, elles consistent souvent simplement en la rotation des orientations des lamelles de 1er ordre, parfois progressive, parfois abrupte, entre deux couches. Ce dernier point est source de confusion : certains auteurs considèrent comme couche unique, un ensemble dans lequel les lamelles changent progressivement d'orientation (exemple de *Tridacna*, tel que décrit par Bøggild, 1930), quand d'autres préfèrent distinguer deux ensembles (exemple de la description des couches m+3 et m+2 de *Patella vulgata* par McClintock, 1967). Comparé à la transition entre deux couches distinctes, comme chez *Nerita*, il n'y a donc pas dans ces cas de séquence de transition et création de nouvelles unités structurales (couche d'accommodation, initiation de nouvelles orientations, etc.), mais la simple rotation d'unités structurales pré-existantes. Ce point établi, nous distinguerons cependant dans un souci de précision les couches présentant des orientations diverses.

2.1.1 Organisations microstructurales des coquilles

Cardium sp.

La coquille de ce Cardiidae constitue l'exemple typique d'une organisation architecturale qui peut rapidement devenir complexe. La couche formant l'intérieur de la coquille (délimitée par la ligne palléale) est de type lamellaire croisé complexe, décrite comme comportant des interlits prismatiques abondants (Bøggild, 1930), associés à des lentilles de couches myostracales (Taylor *et al.*, 1973) qui rendent son architecture tridimensionnelle complexe à interpréter.

La couche externe, qui forme l'intégralité de la bordure externe, est de type lamellaire croisé concentrique ; mais les circonvolutions de la surface de croissance lorsque celle-ci dessine les côtes externes peut conduire à un motif complexe des lamelles de 1er ordre (Taylor *et al.*, 1973), formant ainsi une apparente couche externe "en plumes prismatiques" qui n'est en réalité que le prolongement des unités lamellaires croisées constituant la couche sous-jacente (Bøggild, 1930).

Malgré cette apparente complexité, on reconnait pourtant les motifs de la microstructure lamellaire croisée, comme ici en coupes transversale (Figure 37a-e) et radiale (Figure 37f-h) de la couche externe au niveau de la bordure. Les coupes ayant subi de légères attaques acides révèlent ainsi la striation de croissance et les classiques unités de 1er ordre orthogonales à cette dernière (Figure 37c-d ;f). Aux limites entre lamelles du 1er ordre, on retrouve les interpénétrations irrégulières des lits du 2e ordre entre les lamelles (Figure 37e) ; les contours ondulés des unités de 2e ordre sont là encore bien visibles (Figure 37e,h). Et, comme on l'observe sur une cassure fraiche selon la surface d'une lamelle de 2e ordre (Figure 37i), ces circonvolutions forment aussi les limites entre unités du 3e ordre, épousant le contour des granules qu'elles révèlent ainsi indirectement (Figure 37j). Les observations AFM confirment là encore la présence de granules ovoïdes formant les unités structurales de base (Figure 37k-m).

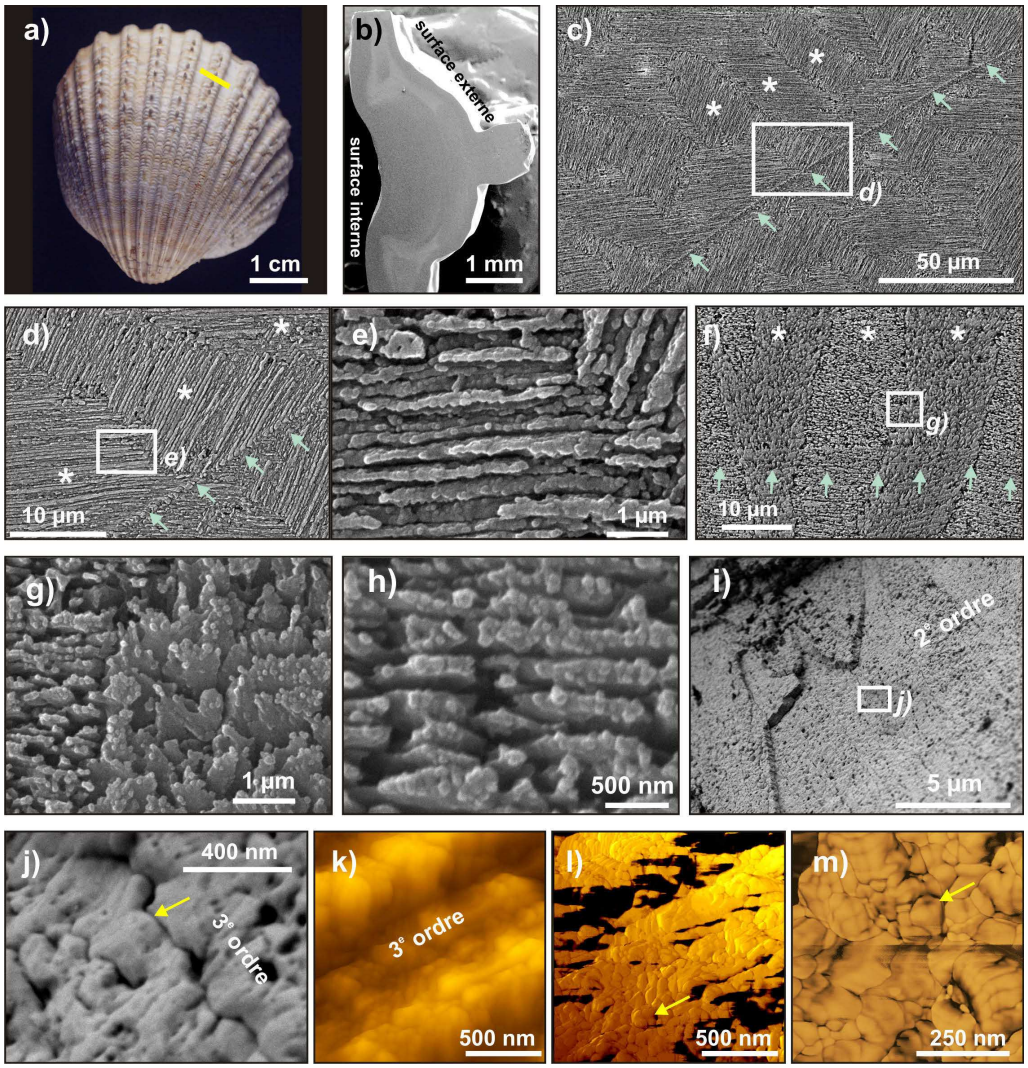


FIGURE 37 – Couche externe de *Cardium sp.* a) Vue macroscopique d'une coquille. b-j) Vues MEB. b-f) Coupe transverse au niveau d'une côte, ayant subi une légère attaque acide (HCl 0.1% v/v, 20 sec) révélant la striation de croissance (flèches vertes) et les unités de 1er ordre (*). e) Composition granulaire au sein des lits de $2^e/3^e$ ordre et interpénétration irrégulière des lits de 2e ordre entre deux lamelles de 1er ordre. f) section radiale ayant subi une légère attaque acide (Acide formique 0.1% v/v + glutaraldéhyde 3% v/v, 10 sec) révélant la striation de croissance (flèches vertes) et les unités de 1er ordre (*). g) Alternance d'orientations des lamelles de 3e ordre. h) Nature granulaire des lits de 3e ordre. i-j) Vues MEB d'une fracture ancienne, cassée suivant la surface d'une lamelle de 2e ordre. j) Morphologie arrondie des limites entre unités de 3e ordre, révélant la forme des granules. k-m) Images AFM (mode tapping). k) Image de topographie des unités de 3e ordre. l-m) Composition granulaire (flèches jaunes).

Cypraea leviathan* et *Murex sp.

Ces deux exemples illustrent l'architecture très classique, que l'on retrouve dans une grande partie des coquilles des gastéropodes. Le changement rapide des directions des lamelles de 1er ordre (qui restent pourtant en continuité) formant l'intégralité de l'épaisseur de la coquille divise celle-ci en trois couches (Bøggild, 1930) : on observe ainsi en bordures de croissance (Figures 38a et 39a), une couche externe d'orientation transversale, une couche moyenne d'orientation longitudinale et une couche interne d'orientation transversale, aisément distinguables sur une simple cassure radiale (Figures 38b et 39b). Bøggild (1930) rapporte la présence d'une couche externe lamellaire extrêmement fine chez certaines espèces de Muricidae, souvent partiellement érodée, que nous n'avons pu observer.

Les lamelles de 1er ordre des couches internes et externes sont rectilignes, de dimensions comparables à celles de *Nerita* (Figures 38c-d et 39c et g) ; les unités de 3e ordre y sont très fines, assez rectilignes et présentent elles encore un contour ondulé (Figures 38h et 39f et h) qui révèle le contour des granules qui les constituent. L'orientation de la couche moyenne révèle aussi, sur ces cassures, les interpénétrations irrégulières des lits du 2e ordre entre deux lamelles de 1er ordre (Figure 38g).

La première conclusion que nous pouvons tirer de ces trois exemples est évidente : malgré des organisations qui peuvent devenir rapidement complexes, souvent structurées en plusieurs couches d'orientations variables, la microstructure lamellaire croisée se résume toujours, à échelle submicrométrique, à des unités de 3e ordre composées par l'assemblage de granules ovoïdes.

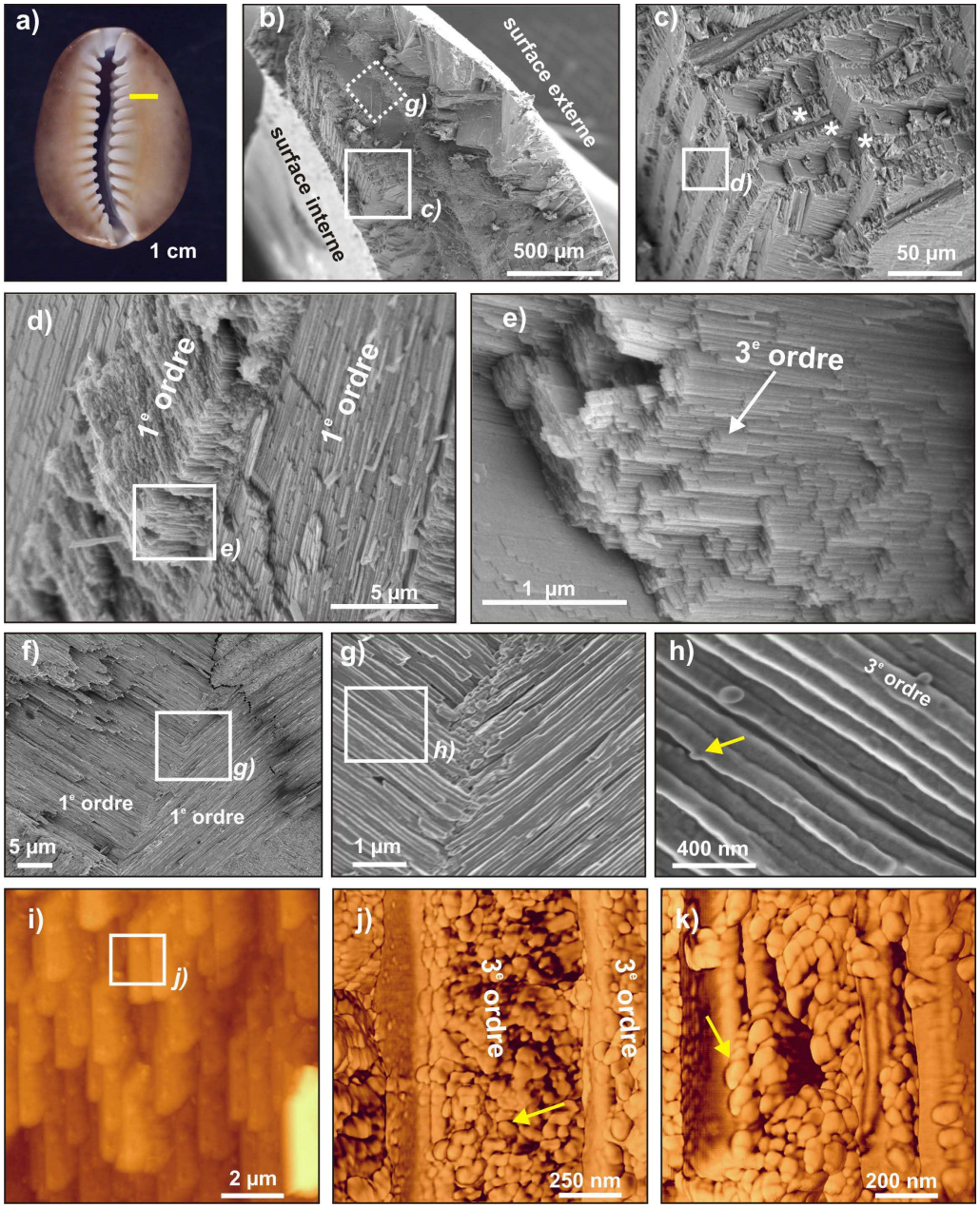


FIGURE 38 – *Cypraea leviathan.* a) Vue macroscopique d'une coquille. b-h) Vues MEB d'une cassure fraiche en section radiale. c) Dans la couche interne, où la cassure révèle les unités de 1er ordre (c) et (d) ainsi que les lamelles de 3e ordre qui les composent (e). f-g) Dans la couche intermédiaire. g) interpénétration irrégulière des lits de 2e ordre entre deux lamelles de 1er ordre. h) Composition granulaire au sein des lamelles de 3e ordre. i-k) Images AFM (mode tapping). i) Image de topographie des unités de 3e ordre. j-k) Composition granulaire (flèches jaunes) des unités de 3e ordre.

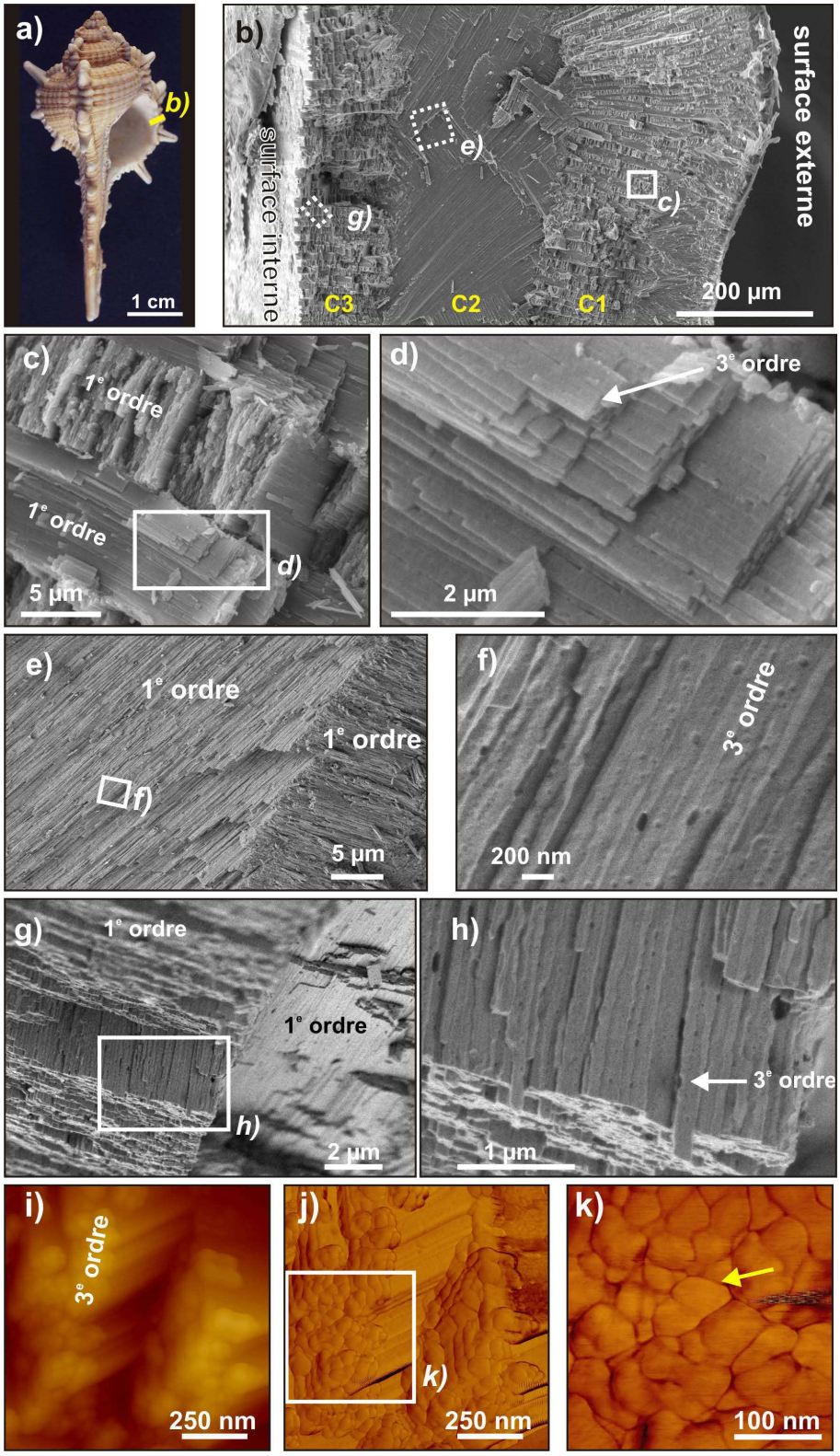


FIGURE 39 – *Murex sp.* a) Vue macroscopique d'une coquille. b-i) Vues MEB d'une fracture fraiche en section radiale. c-d) Couche externe. c) Lamelles de 1er ordre. d) Unités de 3e ordre constituant les lits de 2e ordre. e-f) Couche intermédiaire. e) Lamelles de 1er ordre. f) Lamelles de 3e ordre. g-h) Couche interne. g) Lamelles de 1er ordre. h) Lamelles de 3e ordre. i-k) Images AFM (mode tapping). i) Image de topographie. j-k) Images de phases montrant la composition granulaire (flèche jaune).

Megathura crenulata

Les coquilles des Fissurellidae sont décrites par Bøggild (1930) comme constituées d'une unique couche lamellaire croisée en orientation transversale. Chez *Megathura crenulata* (Vetigastropoda, Fissurellidae) (Figure 40a-b), nous avons distingué deux couches, l'orientation des unités de 1er ordre subissant en effet une rotation progressive entre les couches externe (direction presque horizontale) et interne, où elles finissent pratiquement verticales (Figure 40e). Dans la couche interne, l'extinction synchrone une lamelle de 1er ordre sur deux en LPA (Figure 40c-d) confirme, comme dans le cas de *Nerita*, le changement alternatif des orientations des unités constituant les lamelles de 1er ordre typique de cette organisation microstructurale. Les limites entres lamelles du 1er ordre sont dans cette couche pratiquement rectilignes et parallèles (Figure 40e-g) et les lamelles de 3e ordre qui les composent sont similaires à celles observées chez *Nerita*, légèrement ondulantes et aux bordures arrondies (Figure 40h-j). De même, les limites entre lamelles de 1er ordre sont marquées par des ponctuations irrégulières (contraste noir en BSE sur surface polie, figure 40k-l).

Au MET, les unités de 3e ordre sont là aussi de tailles et conformations comparables à la couche interne de *Nerita* (Figure 41a-b). Les plans des micromacles (110) suivent la bordure arrondie des lamelles (Figure 41c), et une diffraction localisée dans une unique lamelle de 3e ordre présente un cliché typique d'un monocristal maclé (Figure 41d). A noter cependant la présence de fibrilles organiques, détectées de façon indirecte par la porosité qu'elles ont imprimée dans le cristal, en quantités relativement importantes, et qui semblent continues à travers plusieurs unités microstructurales (flèches jaunes dans les figures 41a, b, e, f) ; de tels motifs n'ont été détectés que dans la couche externe de *Megathura crenulata* et semblent spécifiques de ce taxon. La présence de granules ovoïdes formant les unités structurales de base est elle aussi confirmée au MET (Figure 41g) et à l'AFM (Figure 41h-j).

En microscopie sur surface polie non-traitée, on ne détecte pas de variation flagrante de la fluorescence naturelle entre la couche interne et la couche externe (Figure 42a) ; mais lors de tests de coloration à l'acridine orange (Figure 42b), la couche interne n'est presque pas colorée, alors que la coloration de la couche externe dans des teintes orange-vert dénoterait (cf. 1.2.2) la présence de composés présentant des sites actifs libres et chargés négativement (glycoprotéines ? - Brandes et Reale, 1990). De même, les colorations au citrate de Pb / acétate d'uranyle ne marquent que la couche externe (Figure 42c-f), confirmant que cette dernière semble enrichie en composés organiques ; à titre de comparaison, ces colorations, testées sur d'autres couches lamellaires croisées, n'ont que très peu ou pas marqué la coquille. Ces observations sont assez cohérentes avec l'observation des fibrilles organiques décrites précédemment, en quantités non-négligeables, au sein des unités de 3e ordre (Figure 41a, b, e, f). Cette forte teneur en phase organique de la couche lamellaire croisée externe semble ainsi constituer une spécificité de *Megathura,* et confirme au passage qu'il est judicieux de distinguer les couches interne et externe.

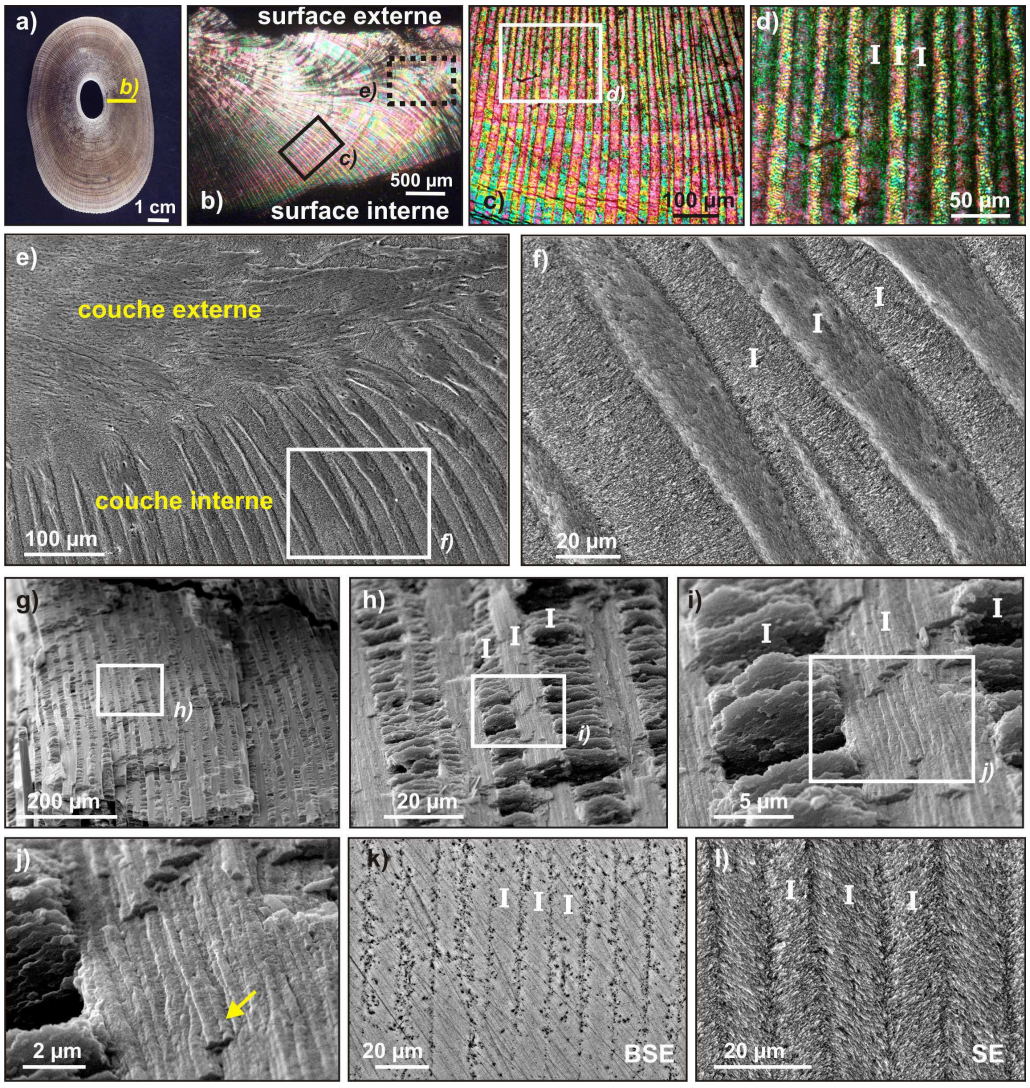


FIGURE 40 – *Megathura crenulata*. Organisation microstructurale. a) Vue macroscopique d'une coquille. b-d) Lame mince fine d'une section radiale (˜10 µm) observée en LPA. b) Section totale. c-d) Structure lamellaire croisée de la couche interne. Les "I" marquent les lamelles de 1er ordre. e-l) Vues MEB. e) Transition entre les couches lamellaires croisées interne et externe, révélée par légère attaque acide (HCl, 1% v/v, 15 sec). f) Lamelles de 1er ordre, révélées par légère attaque acide (HCl, 1% v/v, 15 sec). g-i) Cassure fraiche de la couche interne, révélant les lamelles de 1er ordre, marquées par les "I". j) Cassure fraiche de la couche interne, révélant les unités de 3e ordre (flèche jaune) au sein d'une lamelle de 2e ordre. k) Surface polie (non attaquée) observée avec détecteur BSE. l) une surface équivalente en électrons secondaires, ayant subi une légère attaque (HCl, 1% v/v, 15 sec)

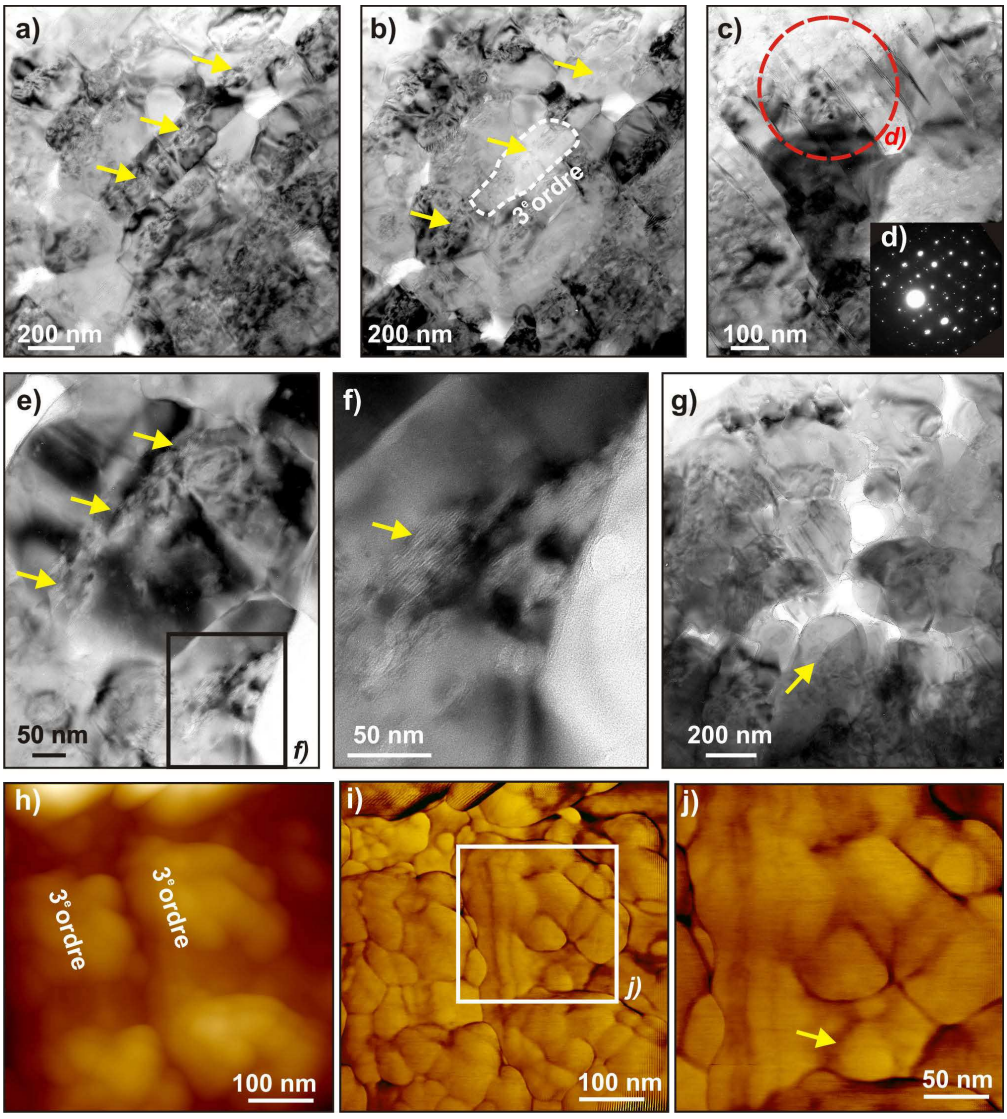


FIGURE 41 – *Megathura crenulata*. AFM-MET. a-b) Vue MET des unités de 3e ordre, traversées par un réseau de fibrilles ondulées (marquées par les flèches jaunes), dans la couche externe. c) Micromacles (110). L'arrêt des plans de macle trace la bordure de la lamelle de 3e ordre. Le cercle rouge marque la zone de diffraction sélectionnée (SAED) dans une lamelle de 3e ordre (couche externe). d) Cliché de diffraction localisé en (c), caractéristique d'un monocristal maclé. e-f) Zoom sur les fibrilles, qui présentent un contraste clair qui correspond à une porosité intracristalline résiduelle causant une lacune de diffraction (couche externe). g) Granules (flèche jaune). h-j) Vues AFM (mode tapping) dans la couche interne. h) Image de topographie des unités de 3e ordre. i-j) Image de phase révélant les granules (flèche jaune).

En microscopie confocale Raman, l'alternance d'orientations permet de localiser aisément les lamelles de 1er ordre, et la porosité marquant leurs limites (Figure 42g). Sur les spectres, on peut noter la présence de deux séries de bandes organiques, respectivement entre 3200 cm^{-1} et 3600 cm^{-1} et entre 2950 cm^{-1} et 3000 cm^{-1} (Figure 42h) : les bandes entre 3200 cm^{-1} et 3600 cm^{-1} pourraient correspondre aux vibrations de groupements amides, très probablement les vibrations en élongation de leurs liaisons N-H (Puranik et Ramiah, 1961). Les bandes entre 2950 cm^{-1} et 3000 cm^{-1} correspondent aux vibrations en élongation des liaisons -CH. Ces deux séries de bandes sont anti-localisées (Figure 42i-k) : les liaisons N-H sont détectées au cœur des lamelles de 1er ordre (Figure 42i), alors que, tout comme dans la couche interne de *Nerita*, les molécules contenant des liaisons -CH sont détectées dans les ponctuations aux limites des lamelles de 1er ordre (Figure 42j), formant là aussi des enveloppes ou patchs organiques (probablement lipidiques) discontinus délimitant ces dernières.

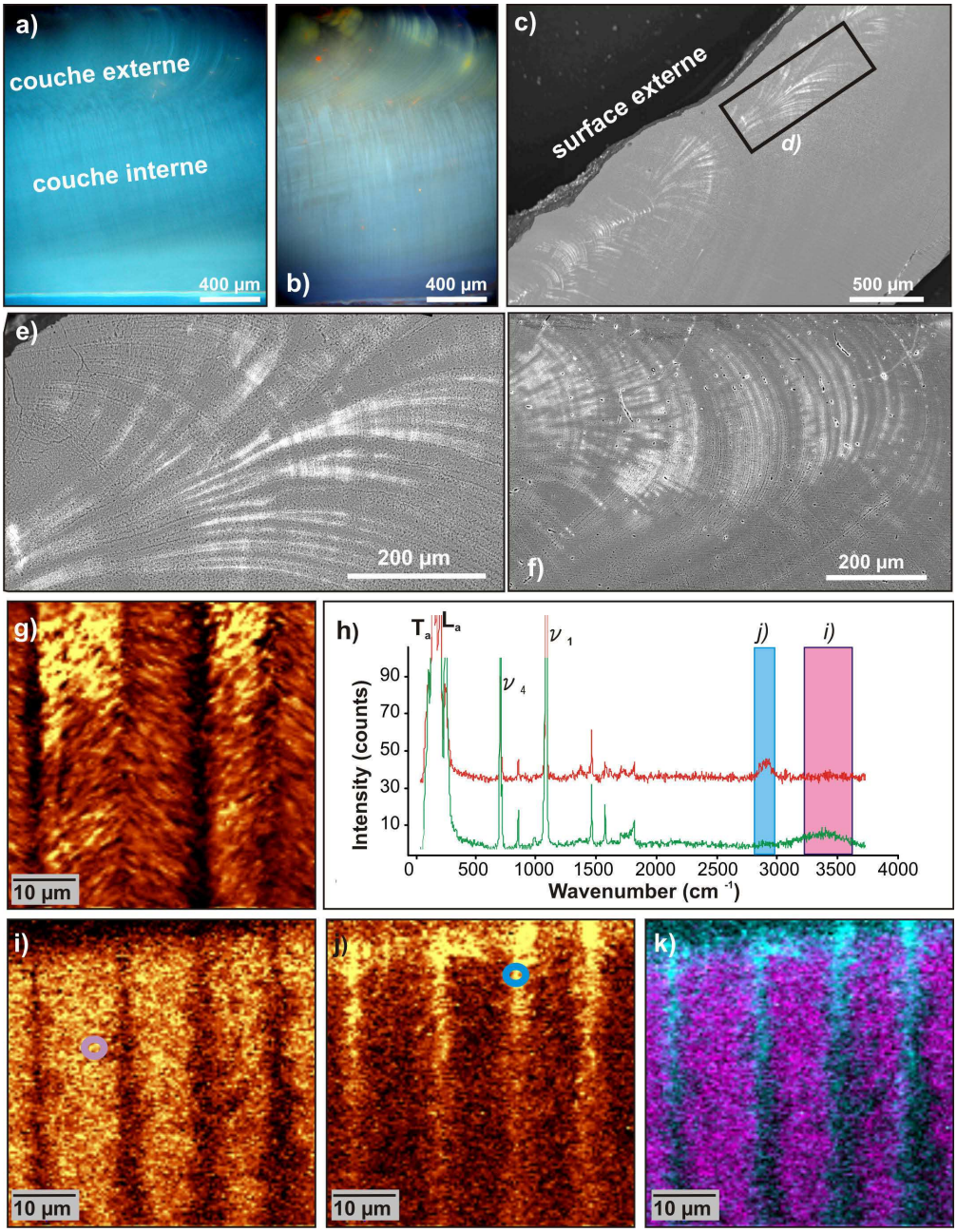


FIGURE 42 – *Megathura crenulata*. Distribution de la phase organique. a) section radiale observée en microscopie d'épifluorescence. b) Même section après coloration à l'acridine orange. c-f) Coloration au citrate de Pb / acétate d'uranyle, observations MEB (surface polie, détecteur BSE). c) Couches externe (colorée) et interne (non colorée). e-f) Zoom dans la couche externe, dont la coloration marque les stries de croissance et quelques lamelles de 1er ordre. g-k) Microscopie confocale Raman. g) Carte du ratio des pics T_a/L_a révélant les lamelles de 1er ordre. h) Spectres Raman issus des zones localisées en bordure (courbe rouge) et au centre (courbe verte) des lamelles de 1er ordre. i) Carte de distribution des bandes comprises entre 3200 cm^{-1} et 3600 cm^{-1} (plage bleue sur la figure h) j) Carte de distribution des bandes comprises entre 2950 cm^{-1} et 3000 cm^{-1} (plage bleue sur la figure h). k) Carte composite en fausses couleurs de i (rose) et j (bleu).

Tridacna sp.

Tout comme les Fissurellidae, les coquilles de Tridacnidae sont décrites par Bøggild (1930) comme constituées d'une unique couche lamellaire croisée concentrique, les lamelles de 1er ordre changeant progressivement d'orientation et finissant presque verticales à proximité de la surface interne (Figure 43b) : il peut donc être là aussi judicieux de dissocier deux couches. Taylor *et al.* (1973) notent de plus la présence d'une couche plus interne lamellaire croisée complexe, entrelacée d'inter-lits de couches myostracales et prismatiques : celle-ci n'est présente qu'en position centrale dans la valve et à proximité de la charnière, et n'est donc pas visible en bordure de croissance (Figure 43a-b).

La striation de croissance est visible à la fois dans les couches externe (Figure 43b-e) et interne (Figure 43f-j), et l'on observe classiquement l'extinction synchrone une lamelle de 1er ordre sur deux en LPA (Figure 43g). Les limites entre lamelles du 1er ordre sont, dans la couche externe, parfois tortueuses, et les lamelles plus branchues (Figure 43b, e). Elles deviennent un peu plus rectilignes dans la couche interne (Figure 43g-i), où elles peuvent néanmoins être parfois aussi sinueuses (Figure 43h-j). A plus fine échelle, une légère attaque ménagée permet de révéler, comme dans les cas précédents, le contour arrondi des unités de $2^e/3^e$ ordre (Figure 43k).

Les observations MET mettent en évidence, comme chez *Nerita,* la présence de composés organiques entre les lamelles de 2e ordre, par l'intermédiaire des bulles issues de leurs déstabilisation sous le faisceau (Figure 44a), ainsi que les granules ovoïdes qui constituent les unités de 3e ordre (Figure 44b). Les limites des micromacles (110) épousent, là aussi, le contour arrondi des lamelles de 3e ordre (flèches jaunes, figures 44c-d), qui correspondent à la morphologie des granules ; on peut de plus constater la présence d'un fin tramage organique aux limites entre deux unités de 3e ordre (flèche rouge, figure 44d). Les observations AFM confirment la composition granulaire des lamelles (Figure 44e-g). A haute résolution, la présence de défauts atomiques ponctuels (rares) et de défauts plans (fréquents) altérant la maille cristallographique (Figure 44i-j) est peut être corrélable à la présence de composés organiques, pris dans le minéral et causant des interactions/déformations à fine échelle. Les unités de 3e ordre sont relativement longues et étroites, aux contours très irréguliers (Figure 44k-l) ; elles présentent une parfaite conservation de la cohérence cristallographique en leur sein, comme le confirment la continuité des plans de micromacle (110) et clichés de diffraction localisés (Figure 44k). Cette cohérence n'est pas conservée latéralement entre unités du 3e ordre appartenant à des lits différents du 2e ordre (non correspondance du motif de macles, figure 44k), même si leurs désorientation reste faible (Figure 44l). L'observation fine du contact entre deux lamelles de 3e ordre au sein d'une même lamelle de 2e ordre (Figure 44m-o) met en évidence une transmission partielle de la cohérence dans les lits de 2e ordre : certains plans de macle se transmettent latéralement (flèches jaunes), mais d'autres sont bloqués (flèches rouges). Dans la figure 44o, les plans d'atomes du motif de l'aragonite sont visibles dans la lamelle de gauche, ce qui révèle la parfaite superposition des atomes sur l'épaisseur de la préparation (nous les voyons, pour rappel, en transmission) ; or, on ne discerne pas ces plans dans la lamelle de droite, qui reste floue (les atomes ne sont plus parfaitement alignés) : cette observation confirme une très légère désorientation de la maille entre unités de 3e ordre successives au sein d'une même lamelle de 2e ordre.

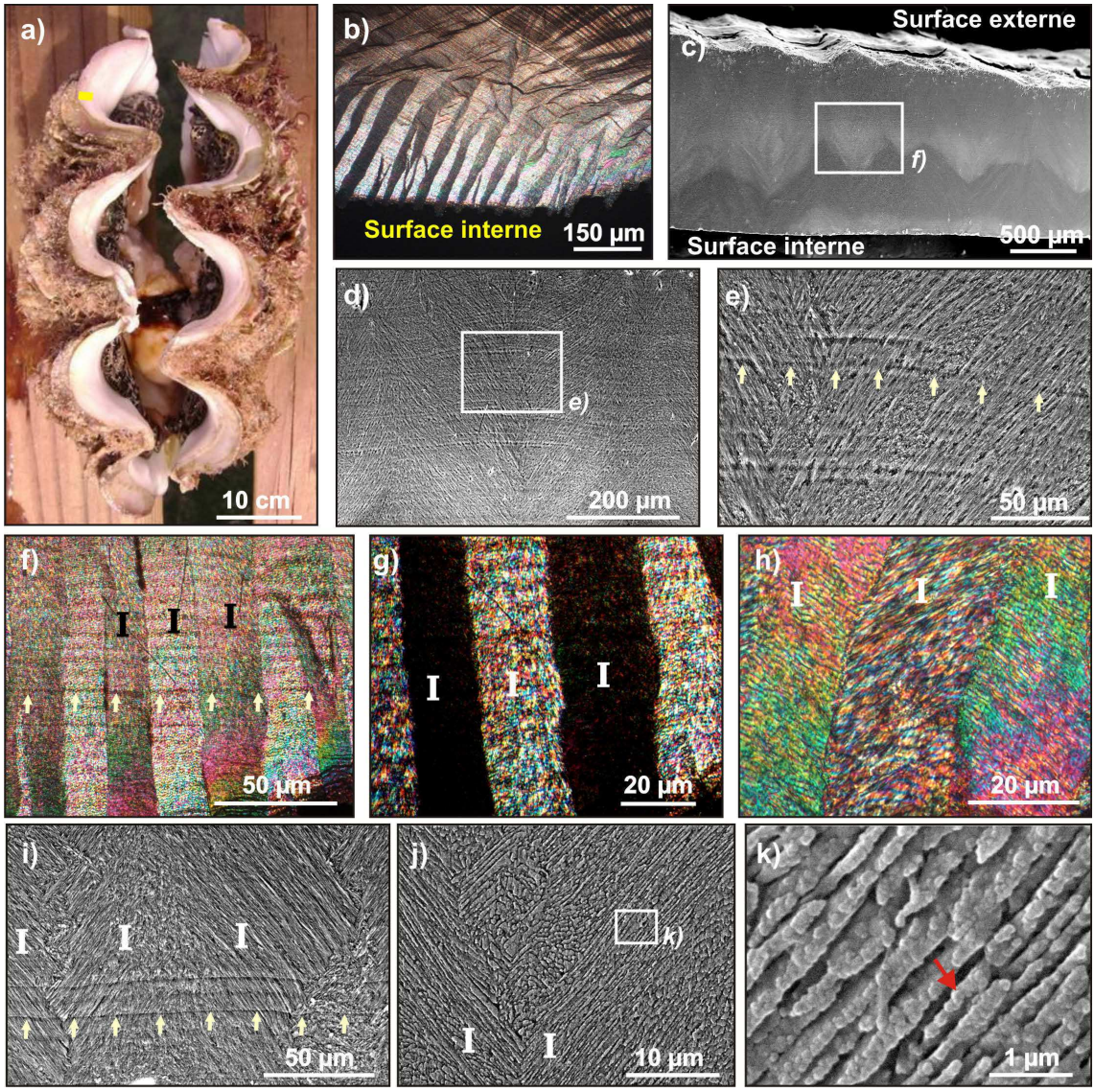


FIGURE 43 – *Tridacna sp.* Microstructure. a) Vue macroscopique d'une coquille. b) Lame mince fine d'une section radiale (˜10 µm) observée en LPA à proximité de la surface interne. c-e) Vues MEB d'une section radiale ayant subi une légère attaque acide (HCl 1% v/v, 10 sec). d-e) Zoom dans la couche externe, où l'attaque acide révèle la striation de croissance (flèches jaunes). f-h) Lame mince fines en LPA. f) montrant les stries de croissance (flèches jaunes) perpendiculaires aux lamelles de 1er ordre (marquées d'un "I"). g) extinction synchrone d'une lamelle de 1er ordre sur deux. h) Zoom révélant l'alternance des lits de 2e ordre. i-k) Vues MEB d'une section radiale ayant subi une très légère attaque acide (HCl 0.1% v/v, 20 sec), révélant à la fois stries de croissance (flèches jaunes) et lamelles de 1er ordre (marquées d'un "I"). k) Zoom montrant la nature granulaire des lamelles de 3e ordre.

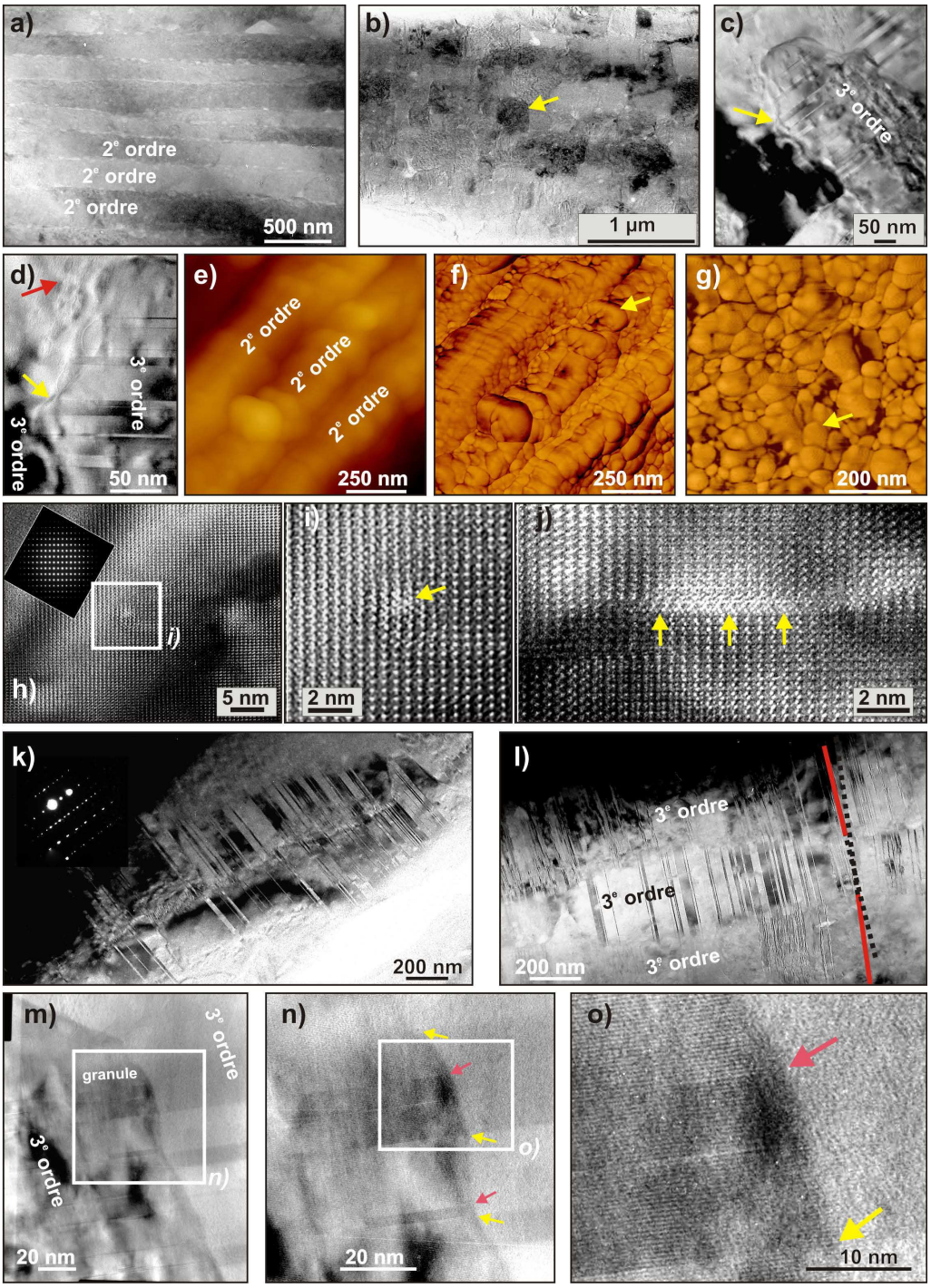


FIGURE 44 – *Tridacna sp.* AFM-TEM. a) Vue MET des lamelles de 2e ordre ; leurs limites sont marquées par des bulles issues de la déstabilisation de composés organiques. b) Granules fusionnés (flèche jaune) formant les unités de 3e ordre. c-d) Limite entre deux lamelles de 3e ordre : les micromacles (110) se terminent en épousant la conformation ovoïde des granules à la limite entre deux lamelles (flèches jaunes). Un fin maillage de fibrilles organiques à la limite entre deux lamelles est rendu visible par la porosité résiduelle qu'il laisse dans le cristal (flèche rouge). e-g) Images AFM (mode tapping). Images de topographie (e) et de phase (f) des lamelles de 2e ordre. g) Image de phase révélant la composition granulaire. h-j) Images haute résolution (METHR) de la maille cristalline et cliché de diffraction monocristallin correspondant (h). On note la présence de défauts localisés ponctuels (i) et plans (j) des plans d'atomes. k) Section de deux lamelles de 3e ordre, chacune parfaitement cohérente (continuité des plans de macle) et cliché de diffraction typique d'un monocristal maclé dans une lamelle. Si elles partagent la même orientation (direction des macles identique), elles ne sont pas en cohérence cristallographique (motifs de macles différents). l) désorientation entre lamelles de 3e ordre dans des unités de 2e ordre distinctes. m-o) Propagation partielle de certains plans de macles (110) (flèches jaunes) entre deux lamelles de 3e ordre au sein d'une lamelle de 2e ordre, alors que d'autres macles ne se propagent pas (flèches rouges).

Patella vulgata

L'organisation structurale de *Patella vulgata* sera présentée plus en détails section 2.2.1 (page 76), dédiée à l'étude des couches foliées croisées spécifiques de ce taxon ; nous présentons néanmoins ici rapidement, à titre comparatif, les observations MET réalisées dans une couche lamellaire croisée (couche m+1) de cette coquille.

Tout comme dans les cas précédents, la présence de composés organiques est révélée par l'intermédiaire des bulles (Figure 45a), entre les lamelles de 2e ordre, qui sont par ailleurs fortement désorientées l'une par rapport à l'autre (Figure 45b). Mais la morphologie des unités de 3e ordre est ici spécifique du taxon : bien qu'aux contours arrondis, leur section est par endroits rectangulaire/carrée (Figure 45c-d), contrastant fortement avec les morphologies plus irrégulières de ces unités vues précédemment (beaucoup plus irrégulières dans le cas de *Tridacna*).

On remarquera, là encore, la porosité résiduelle marquant les ponctuations aux limites entre lamelles de 1er ordre, entre lesquelles les lits de 2e ordre se chevauchent irrégulièrement entre lamelles de 1er ordre (Figure 45e). En certains endroits, qui semblent coïncider avec des enrichissements locaux en phase organique, les granules sont particulièrement visibles, perturbant l'organisation microstructurale auparavant régulière, si bien que l'on ne la distingue plus que par l'intermédiaire des micromacles (110) (Figure 45f-g). Par moment, on ne distingue plus qu'un ensemble indistinct de granules coalescés, traversés par un maclage extrêmement dense (Figure 45h). En vues haute résolution (METHR) (Figure 45i-k), ces micromacles (110) ne se résument parfois plus qu'à des fautes d'empilement épaisses de seulement quelques rangées d'atomes (”*” sur la figure 45k). Une telle densité peut être indicative d'éléments perturbant la cristallisation lors de la propagation du front de cristallisation, et serait cohérente avec un enrichissement local en phase organique, incluse dans le cristal à fine échelle.

Ces observations confirment ainsi certaines des observations réalisées dans la coquille de *Nerita* : les lits du 2e ordre ne sont jamais en cohérence cristallographique (même si dans certains cas, comme pour *Tridacna*, les désorientations restent faibles). Au sein d'un même lit du 2e ordre, en revanche, il existe une transmission partielle de la cohérence entre les lamelles de 3e ordre : ceci confirme la nature fondamentalement différente des deux types d'enveloppes qui séparent respectivement les unités de 2e et 3e ordre, les premières formant des compartiments clos alors que les deuxièmes permettent une propagation latérale partielle de la cohérence.
Ces observations confirment aussi la présence d'une ponctuation irrégulière entre les unités de 1er ordre, ainsi que des interpénétrations partielles des lits de 2e ordre entre deux lamelles de 1er ordre jointives. Dans le cas de *Megathura*, nous avons en outre pu confirmer la présence de composés organiques contenant des groupements -CH dans ces ponctuations, comme dans les coquilles de *Nerita*. Ces résultats laissent supposer que la mauvaise délimitation latérale des unités de 1er ordre constitue un caractère général de la microstructure lamellaire croisée.

Outre la grande variabilité des architectures constatée (orientations, nombre de couches etc.), on remarque qu'il peut exister aussi une variabilité spécifique à fine échelle : ainsi, la couche externe de *Megathura* est particulièrement riche en composés organiques, et présente par ailleurs un réseau de fibrilles incluses dans les lamelles de 3e ordre que l'on n'a retrouvé chez aucune autre espèce. De même, il existe une variété morphologique des unités de 3e ordre (particulièrement flagrante entre *Tridacna* et *Patella)*, ainsi qu'une variation notable des densités de maclage (110) entre les espèces.

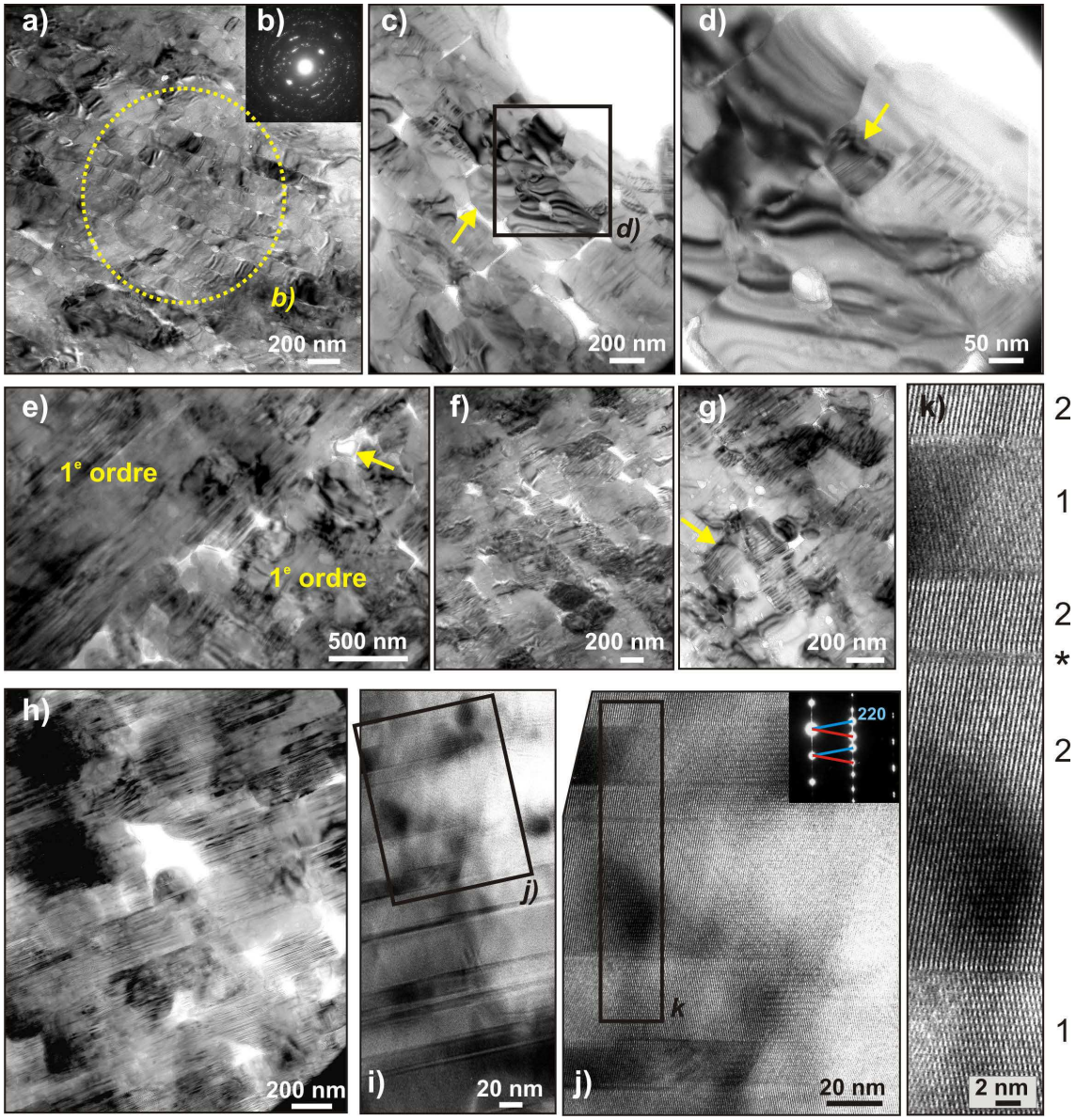


FIGURE 45 – Couche lamellaire croisée (m+1, cf section 2.2.1 page 76) de *Patella vulgata* observée au MET. a) Vue des lamelles de 2e ordre, dont les limites sont marquées par la présence de bulles résultant de la déstabilisation de composés organiques. b) Cliché de diffraction localisée sur plusieurs lamelles de 2e ordre, montrant un motif polycristallin. c) Section des lamelles de 3e ordre, de morphologie carrée-arrondie. d) les micromacles (110) se terminent en épousant la conformation ovoïde des granules à la limite d'une lamelle de 3e ordre (flèche jaune). e) Contact entre deux lamelles de 1er ordre, présentant une porosité résiduelle entre les ponctuations (flèche jaune), ainsi que des inter-pénétrations des lits de 2e ordre entre les lamelles de 1er ordre. f-g) Granules constituant les unités de 3e ordre. h) Micromaclage abondant traversant des ensembles de granules coalescés. i-k) Vues haute résolution (METHR) des micromacles (110). k) Zoom permettant de visualiser l'alternance des orientations des plans d'atomes pour chaque famille (1 et 2) de macles. L"'*" marque une faute d'empilement.

2.1.2 Extractions de la matrice organique

Les caractérisations organiques in-situ, si elles ont permis de préciser les relations entre phases minérales et certains composés organiques et mettre ainsi en lumière certains mécanismes clés, ne donnent en revanche qu'un aperçu des compositions organiques des coquilles. La microspectroscopie Raman en constitue un bon exemple : cette technique, qui a permis de caractériser spécifiquement et de localiser des molécules polyéniques, et préciser ainsi la forte spécialisation spatiale du manteau chez *Nerita*, ne peut rendre compte de la diversité des molécules présentes et qui restent indécelables par son seul intermédiaire.

Afin de pouvoir illustrer la variation des compositions organiques de couches microstructuralement identiques, nous avons donc réalisé des extractions de la totalité de la phase organique par décalcification, suivant le protocole décrit section 5.2.5 (page 131). Les fractions solubles (MOS) et insolubles (MOI) sont analysées séparément par chromatographie et spectroscopie infrarouge.

Note : La complexité architecturale de certaines de ces coquilles rend toute analyse couche par couche illusoire : dans la majorité des cas, il est impossible de les séparer proprement, aussi les analyses sont réalisées en broyant la totalité des couches lamellaires croisées. Ceci n'est pas sans conséquence : comme nous avons pu le voir dans le cas de *Megathura crenulata*, deux couches lamellaires croisées différentes n'ont pas forcément une composition biochimique identique (qualitativement et/ou quantitativement).

Dans le cas de la coquille des *Nerita,* il a fallu éliminer la couche calcitique (seuls des fragments de péristomes, où l'épaisseur de la couche interne est la plus importante, ont été utilisés) : cette séparation mécanique n'est pas évidente, et il n'est pas à exclure que nous n'ayons pu éliminer totalement la couche externe, avec des risques de contamination par la matrice organique de la couche fibreuse.

Caractérisation de la fraction soluble

En chromatographie d'exclusion stérique, les molécules solubles sont séparées selon leurs poids moléculaires, puis détectées à différentes longueurs d'onde et par réfractométrie : le signal à 226 nm est ainsi plus spécifique des peptides, celui à 280 nm des protéines contenant des acides aromatiques, alors que le signal de réfractomètre permet de détecter les sucres et glycoprotéines.

La séparation des poids moléculaires obtenue par HPLC est assez mauvaise, ce qui est assez classique des matrices extraites de coquilles ou de polypiers coralliens (Dauphin et Denis, 2000; Dauphin, 2001) : cela traduit essentiellement la présence d'un grand nombre de molécules de tailles variables, qui s'étalent ainsi sur une grande gamme de poids moléculaires (Figure 46a-b). On retrouve aussi ce phénomène en électrophorèse 1D ou 2D (Marxen et Becker, 1997).

La calibration des temps de rétention à partir de standards de poids moléculaires connus (Figure 46c) n'est qu'approximative : elle n'est théoriquement valable que pour des composés globulaires, alors que nous ne pouvons exclure la présence de molécules filamenteuses dans nos assemblages. Il ne s'agit donc que d'une première estimation grossière des poids moléculaires (cf section 5.2.5), malgré tout utile à titre indicatif et pour comparaisons entre taxons.

Les sucres, détectés par réfractométrie, sont relativement petits mais de tailles variables selon les taxons : les pics principaux se situent aux alentours de 50 - 15 kDa (Figure 46d), alors qu'il existe des protéines bien plus grosses, jusqu'à plus d'1,5 MDa (probablement des glycoprotéines ou des protéoglycanes). Pour un même spécimen (Figure 46a), les profils UV restent assez semblables ce qui dénote la présence d'une majorité de protéines assez complexes pour être détectées de façon synchrone à plusieurs longueurs d'ondes.

On observe cependant une grande variabilité entre les taxons : la position du pic principal varie généralement entre 150 et 50 kDa, mais l'on trouve dans le *Cardium sp.* une majorité de petites molécules, dont les PM se situent aux alentours de 2,5 kDa.

Cette importante variabilité spécifique s'illustre de façon plus flagrante par les rapports d'aires des pics relatifs aux différentes catégories de molécules (par exemple, à 226 nm, comme présenté figure 46h-i) : *Murex sp., Nerita sp. et Cypraea sp.* sont les seuls à présenter des assemblages supérieurs à 500 kDa, le *Cardium sp.* est particulier avec une majorité de petites (˜25 kDa) à très petites molécules (˜2,5 kDa). Le *Tridacna sp.* et le *Murex sp.* sont de plus les seuls à contenir des molécules aux alentours de 14 kDa, visibles à 226 nm et non à 280 nm : il s'agit ainsi probablement de composés peptidiques dénués d'acides aromatiques.

Caractérisation de la fraction insoluble

Une première estimation des compositions de la MOI, impropre pour toute analyse par HPLC d'exclusion stérique, peut être obtenue par spectroscopie infrarouge. On distinguera trois catégories principales de bandes :

- Les bandes entre 2850 et 3000 cm^{-1} correspondent généralement aux longues chaines carbonées que l'on trouve dans les lipides (acides gras, triglycérides, etc.), dont elles constituent souvent la bande principale (Figure 47a) ; elles n'en sont cependant pas exclusives (elles peuvent ainsi correspondre à la présence d'acides carboxyliques).
- Les différentes bandes amides (Amides A, I et II) traduisent la présence de ces molécules, qui contiennent des groupes carbonyles líes a des atomes d'azote.
- Enfin les bandes entre 950 et 1100 cm^{-1} sont généralement considérées comme caractéristiques de la présence de sucres (Worms et Weiner, 1986).

La comparaison entre les taxons illustre les très grandes variations de compositions de la fraction insoluble de la matrice organique de leurs couches lamellaires croisées. Les groupements amides sont particulièrement représentés dans les MOI de *Megathura crenulata* (Figure 47b), *Cardium sp. et Cypraea sp.* (Figure 47c) ; la MOI de *Cardium sp.*, notamment, est particulièrement riche en bandes amides I et II. Les bandes des sucres sont, elles, surtout visibles chez *Megathura crenulata*, *Murex sp.*, et *Tridacna sp.* (Figure 47b-d). Enfin, abondantes dans certains taxons comme *Tridacna sp.* (Figure 47d), les bandes entre 2850 et 3000 cm^{-1} sont plus faibles chez les autres taxons, voire pratiquement indétectables dans *Cardium sp.* (Figure 47c).

2.1.3 *Conclusion*

Les microstructures lamellaires croisées provenant de taxons différents, sont finalement similaires sous bien des aspects :

- les unités de 1er ordre sont toujours séparées par des patchworks organiques, et latéralement mal délimitées, autorisant une interpénétration partielle des lits de 2e ordre entre deux unités jointives. Dans les cas de *Nerita sp.* et *Megathura crenulata*, nous avons pu mettre en évidence que ces patchworks contiennent une composante organique riche en liaisons -CH (et probablement lipidique).
- les lits du 2e ordre ne sont jamais en cohérence cristallographique entre eux, alors qu'il existe toujours une transmission partielle de la cohérence en leur sein.
- les unités de 3e ordre sont toujours composées des mêmes sous-unités ovoïdes, arrangées en chapelets et de dimensions semblables entre taxons.

La variabilité spécifique s'exprime donc essentiellement, au niveau microstructural, par une certaine diversité morphologique des unités microstructurales (notamment des dimensions et formes des unités de 3e ordre) ainsi que des architectures de coquilles variées, formées par l'assemblage de couches dont les quantités, épaisseurs ou orientations fluctuent largement d'un taxon à l'autre.

Par comparaison à cette relative homogénéité microstructurale, les compositions biochimiques présentent en revanche une grande variabilité, tant dans la fraction soluble qu'insoluble : les assemblages organiques, éminemment complexes, peuvent varier fortement d'une coquille à l'autre, sans que l'on puisse pour autant à ce stade discerner de tendance taxonomique générale.

Cette grande variabilité conduit à s'interroger sur les molécules par lesquelles s'exercent les différents niveaux de contrôle présentés précédemment (contrôle du polymorphe cristallin, contrôle morphologique, etc.), et deux hypothèses sont à envisager :

- les molécules jouant un rôle majeur sont les mêmes (ou proches) dans des taxons différents, mais, noyées dans une masse de molécules n'ayant pas nécessairement de lien direct avec les mécanismes de biominéralisation, peuvent passer inaperçues dans les analyses sur extrait total.
- Mais il est aussi possible que des molécules différentes de par leurs tailles, conformations, groupements fonctionnels ou autre, soient finalement capables de remplir le même rôle physiologique.

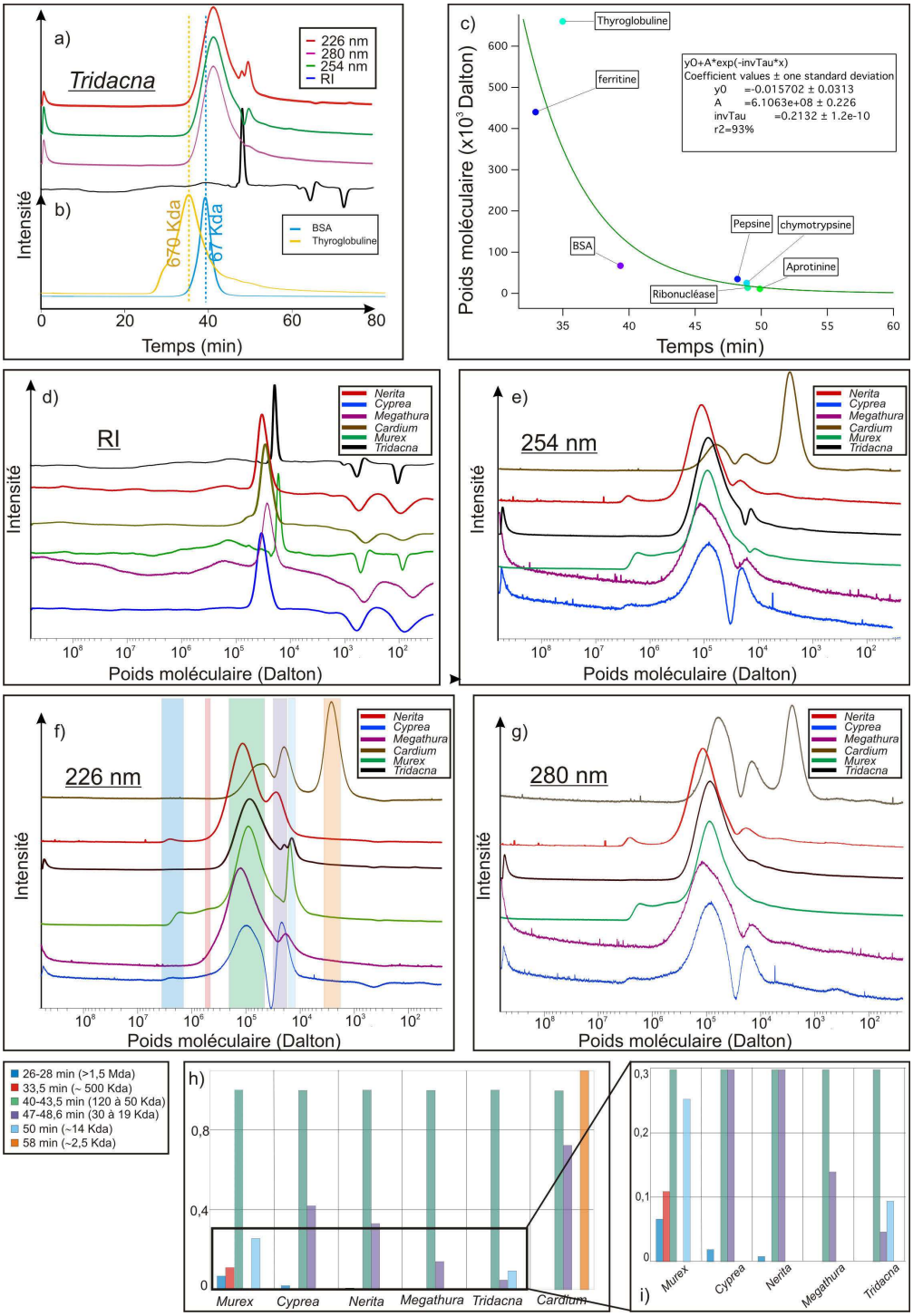


FIGURE 46 – Chromatographie liquide (HPLC) de la fraction soluble de la phase organique extraite des couches lamellaires croisées des coquilles de différents mollusques. a) Chromatogrammes de la MOS de *Tridacna sp.* à différentes longueurs d'onde, et signal de réfractomètre. Les chromatogrammes de la BSA et de la thyroglobuline sont indicatifs des temps de rétention de standards de poids moléculaires connus. b) Droite de calibration des temps de rétention à partir de standards de PM connus. d-g) Comparaison des chromatogrammes à 254 nm, 226 nm, 280 nm et RI des MOS des différents taxons, donnés en poids moléculaires estimatifs. h) Rapports d'aires des différents pics (gammes de poids moléculaires proches) rapportés au pic correspondant à la gamme 120 - 50 kDa détectés à 226 nm. i) Zoom de h.

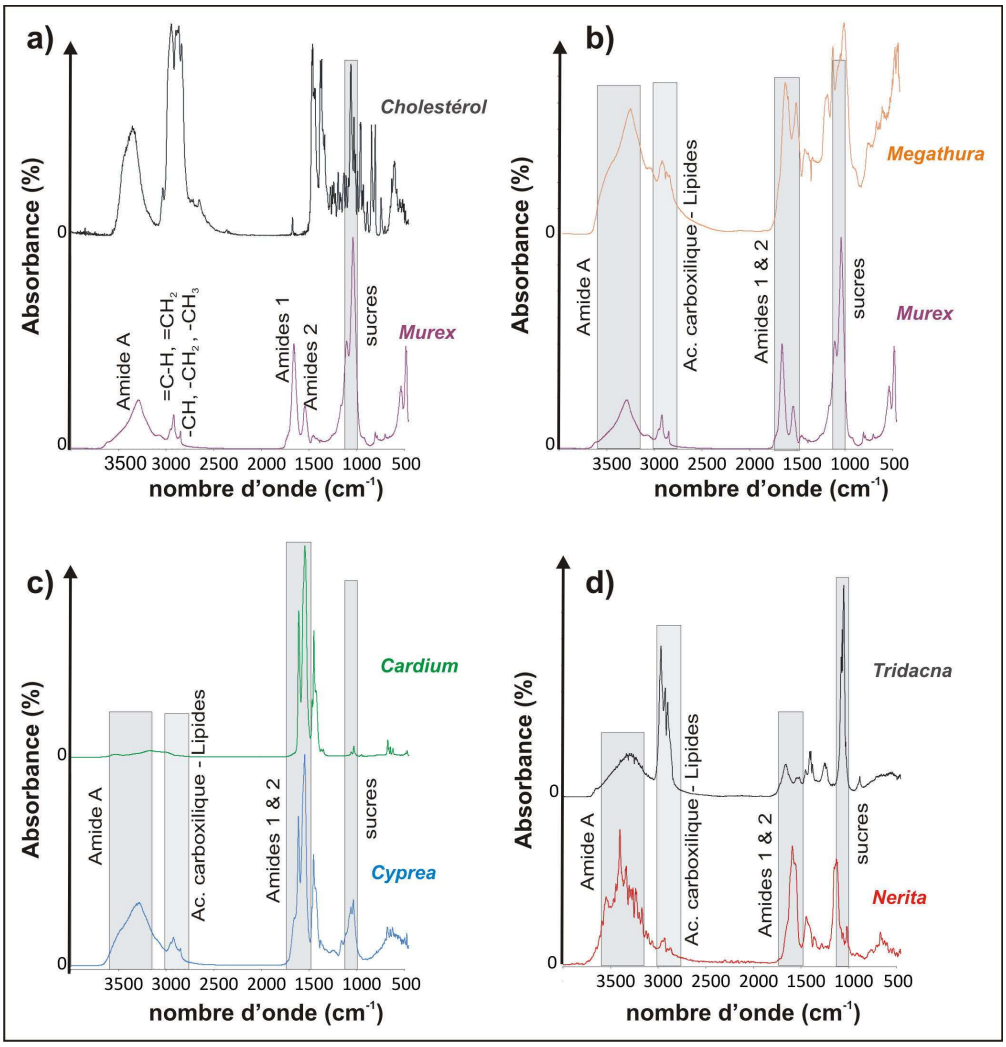


FIGURE 47 – Spectroscopie FT-IR de la fraction insoluble (SOM) de la matrice organique extraites des coquilles de : a) *Murex sp.*, comparé à un standard de cholestérol. b) *Megathura crenulata* et *Murex sp.* c) *Cypraea leviathan* et *Cardium sp.* d) *Tridacna sp.* et *Nerita sp.*

2.2 Folié croisé : *Patella vulgata*

Ce type microstructural appelé "lamellaire croisé calcitique" par Bøggild (1930), est décrit comme la contrepartie calcitique de la microstructure lamellaire croisée aragonitique commune ; toujours d'après Bøggild (1930), on le rencontre principalement chez les Patellidae, mais aussi chez certains Aviculidae et Ostreidae. Au sein des Patellidae, McClintock (1967) précise que seuls les représentants de la sous-famille des Patellinae présentent une ou plusieurs couches de ce type microstructural, qu'il renomme pour l'occasion folié-croisé et en fait ainsi un type à part entière.

2.2.1 Morphologie et organisation microstructurale

Le folié croisé

La microstructure foliée croisée partage la même architecture tridimensionnelle que le lamellaire croisé, mais avec deux exceptions notables :

1. les lamelles de 1er ordre sont bien plus larges, de l'ordre de ˜80 µm - elles atteignent même chez *Patella mexicana* des tailles millimétriques (Figure 49b).
2. l'angle que forment les lits du 2e ordre entre deux lamelles de 1er ordre est considérablement plus faible (Figure 48), de l'ordre de 13° (McClintock, 1967; Fuchigami et Sasaki, 2005), alors qu'il est de ˜41° (Wilmot *et al.*, 1992) dans la microstructure lamellaire croisée.

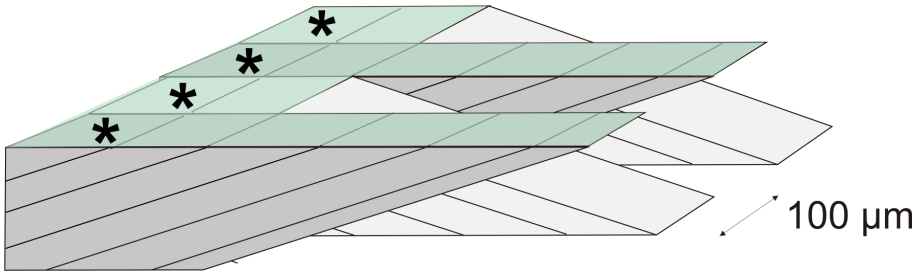


FIGURE 48 – Schéma de l'agencement respectif des lamelles de 1er ordre (*) formant la microstructure foliée croisée.

Patella vulgata

Morphologie Dans un souci de cohérence avec la littérature existante, nous reprendrons ici le système de notation développé par McClintock (1967), où les couches sont numérotées selon leurs positions respectives par rapport à la couche myostracale, ici composée de lits prismatiques et sphérulitiques d'aragonite : celle-ci est aisément identifiable, le muscle laissant une empreinte en fer à cheval typique sur la face interne de la coquille (Pramatarova, 2003). On notera ainsi m+3 la couche la plus externe, m+2 la suivante, etc. Chez les Patellinae, on trouve la microstructure foliée croisée principalement répartie entre les couches m+3 et m+2, et dans certains cas au sein d'une très fine couche interne (m-2) (Figure 49a). L'orientation des lamelles de 1er ordre est longitudinale dans la couche m+3, avant de s'orienter rapidement selon une direction transversale dans la couche m+2 (Figure 49b-c).

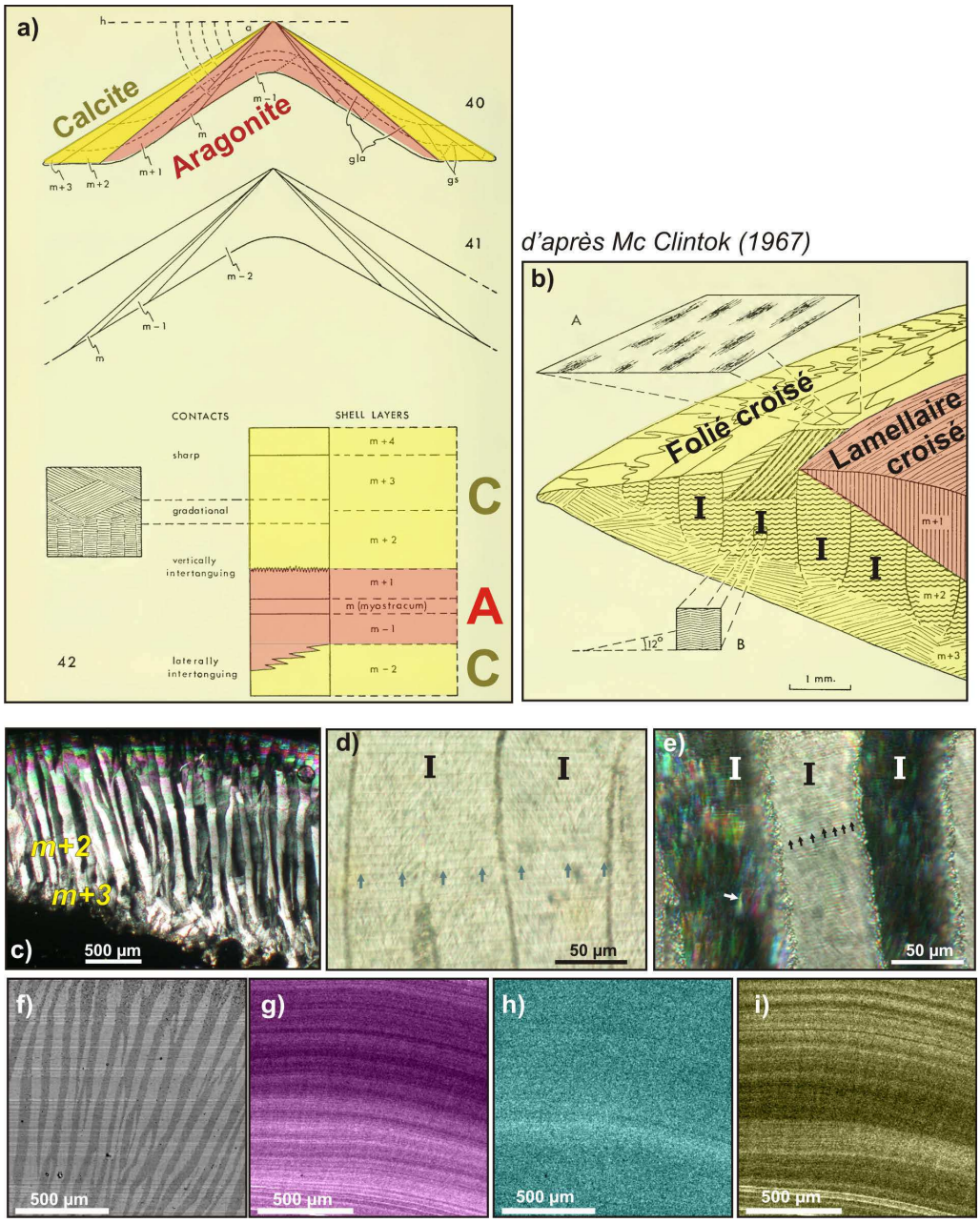


FIGURE 49 – Microstructure foliée-croisée des Patellinae. a) Système de notification des couches chez les Patellinae d'après McClintock (1967). En jaune les couches calcitiques, en rouge les couches aragonitiques. b) Exemple des couches m+3 (couche externe), m+2 et m+1 dans la coquille de *Patella mexicana*. c) Lame mince des couches calcitiques externes de la coquille de *Patella vulgata* en section radiale (LPA). d) Vue de deux lamelles de 1er ordre consécutives en LPNA. Les flèches marquent une strie de croissance. e) Vue de trois lamelles de 1er ordre consécutives en LPA, présentant l'extinction typique une lamelle de 1er ordre sur deux. Les lits de lamelles de 2e ordre sont visibles (flèches noires), tout comme les unités de 3e ordre lorsqu'elles sont très faiblement désorientées (flèche blanche). f-i) Cartes réalisées à la microsonde électronique. f) Image en BSE, montrant l'alternance des lamelles de 1er ordre. g) Distribution du Mg en bandes correspondant à la striation de croissance. h) Distribution du Sr, présentant des stries très faiblement marquées. i) Distribution du S, marquant faiblement la microstructure foliée-croisée, mais fortement la striation de croissance.

Microstructure La couche m+3 est relativement fine chez *Patella vulgata*, et l'épaisseur de la bordure de croissance est principalement constituée par la couche m+2, au travers de laquelle les lamelles de 1er ordre sont relativement continues et rectilignes (Figure 49c). Comparée aux couches lamellaires croisées observées jusqu'ici, la striation de croissance est particulièrement régulière et bien marquée, immédiatement visible en LPNA (Figure 49d). Comme dans le lamellaire croisé, on observe l'extinction synchrone d'une lamelle de 1er ordre sur deux en LPA, ainsi que les lits de 2e ordre, et même les lamelles de 3e ordre (Figure 49e).

La distribution de certains éléments traces marque la striation de croissance : Mg (Figure 49g) présente notamment un fort contraste, et Sr un contraste très léger (Figure 49h). S marque lui fortement la striation de croissance, mais aussi légèrement les lamelles de 1er ordre.

Une simple cassure révèle l'organisation microstructurale en lamelles du 1er, 2e et 3e ordre du folié croisé, parfaitement comparable à l'architecture lamellaire croisée (Figure 50a-d). Une première distinction apparait néanmoins : les unités de 3e ordre sont beaucoup plus régulières et rectilignes (Figure 50e) que celles observées dans la structure lamellaire croisée, souvent ondulées (Figures 32b-c, 38i et 39l).

Une coloration citrate de Pb / acétate d'uranyle permet de révéler les incréments de croissance, particulièrement marqués et réguliers (Figure 50g-h) mais aussi un réseau de membranes organiques, apparemment continues et assez rectilignes, séparant les lamelles de 1er ordre (Figure 50i). Sur une cassure fraiche exposée à de la vapeur d'OsO_4, la légère attaque induite sur les surfaces des lamelles de 2e ordre révèle de très fines enveloppes, là encore apparemment continues, séparant les unités de 3e ordre (Figure 50j-l).

Sur les images AFM enfin, les stries de croissances sont assez marquées pour être visibles ; il s'agit du seul échantillon que nous ayons observé sur lequel les incréments de croissance soient suffisamment enrichis en composés organiques pour être visibles en contraste de phase (Figure 50m), et les lits du 2e ordre sont aisément identifiables (Figure 50n-o).Là encore, on peut mettre en évidence une fine enveloppe continue, présentant un fort contraste de phase, et séparant les lamelles du 2e ordre. Si la délimitation entre les unités de 3e ordre est peu marquée sur ces images, la présence de granules ovoïdes irréguliers et hétérogènes constituant les unités structurales de base est là encore mise en évidence.

Sur une préparation MET réalisée à proximité du contact entre deux lamelles de 1er ordre de la couche m+2 (Figure 51a-e), les lattes de 3e ordre dessinent un motif, là aussi plus régulier que ce que l'on a pu observer, dans les mêmes conditions, sur les différentes couches de type lamellaire croisé. Les granules ovoïdes coalescés qui constituent ces lattes de 3e ordre sont plus difficiles à distinguer, mais sont néanmoins présents, souvent trahis par le contour légèrement arrondi des lattes (Figure 51g-i). La préparation est particulièrement riche en bulles issues de la déstabilisation de composés organiques, réparties régulièrement entre unités de 2e ordre et de 3e ordre (Figure 51j-k). Mais on n'observe pas, au contact entre lamelles de 1er ordre, d'interpénétrations des lits du 2e ordre s'alternant avec des ponctuations (porosité résiduelle), que l'on avait su mettre en évidence dans les couches lamellaires croisées de plusieurs taxons : les unités structurales semblent se terminer, assez irrégulièrement, au contact d'une zone très riche en composés organiques (ces derniers trahis par la forte porosité résiduelle qu'ils laissent en transmission, figure 51l).

En ce qui concerne les modalités de cristallisation, l'absence de motifs de macles similaires aux micromacles (110) de l'aragonite que l'on trouve dans la microstructure lamellaire croisée ne nous permet pas de tracer aussi finement la propagation latérale d'un front de cristallisation, et les relations cristallographiques entre les unités. Néanmoins, la bonne propagation des franges de Bragg, presque rectilignes à travers plusieurs lits du 2e ordre (Figure 51m) plaide pour une bonne propagation de la cohérence entre lamelles du 2e ordre. De même, une diffraction localisée sur plusieurs lits du 2e ordre (SAED) présente un cliché qui, s'il n'est pas monocristallin, révèle tout de même une très faible désorientation (faible rotation des taches de diffraction, figure 51o).

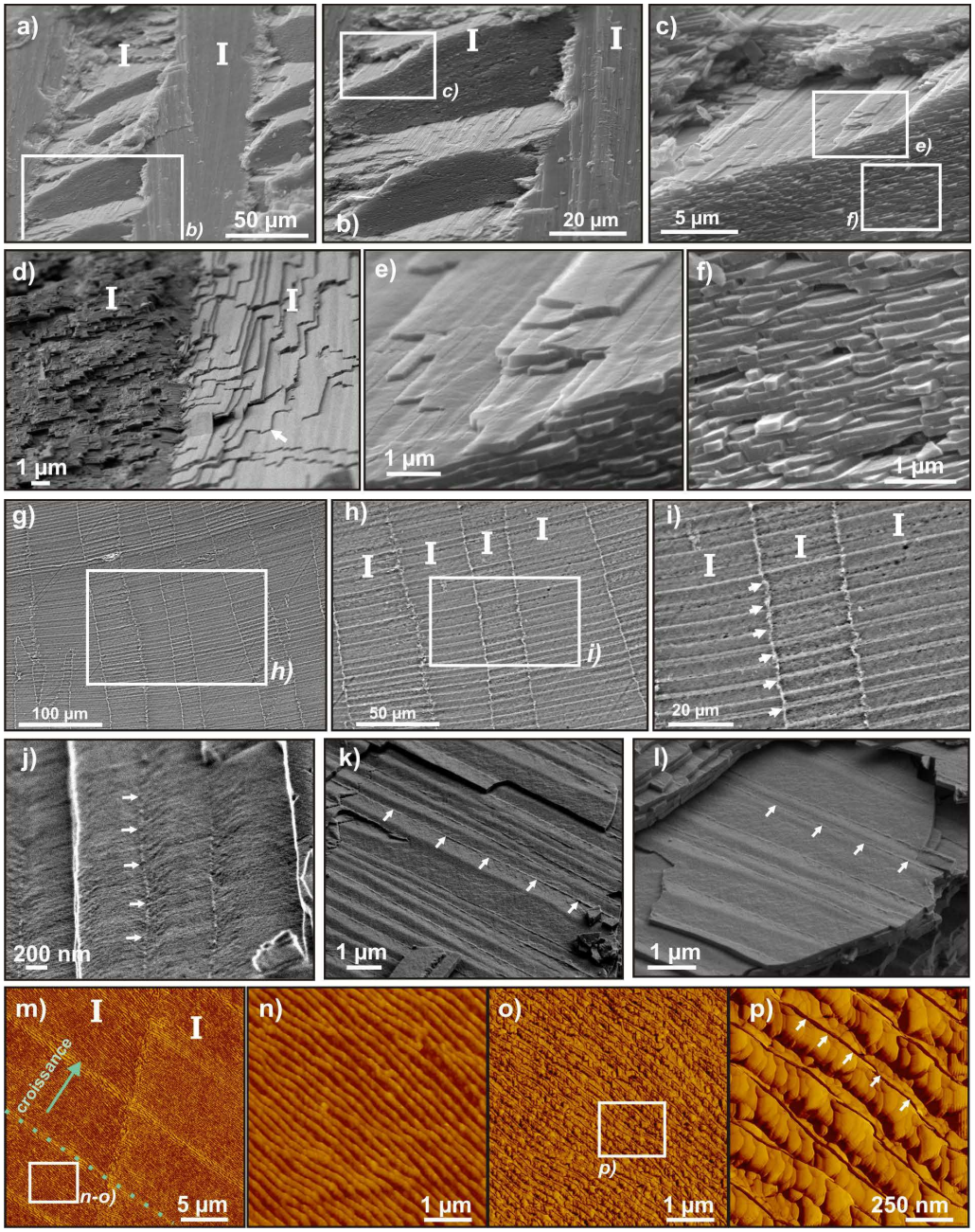


FIGURE 50 – Microstructure foliée-croisée de la couche m+2 de *Patella vulgata*. a-f) Cassure fraiche en section radiale observée au MEB. a-b) Lamelles de 1er ordre. c) Lits du 2e ordre. d) Contact entre deux lamelles de 1er ordre montrant le changement d'orientation des unités de 3e ordre les constituant (flèche blanche). e) Vue de la surface des lits de 2e ordre. f) Vue des lits de 2e ordre superposés. g-i) Test de coloration au citrate de Pb / acétate d'uranyle observé au MEB (surface polie, détecteur BSE). h) Les lamelles de 1er ordre sont marquées par un "I". i) La coloration révèle des incréments de croissance réguliers et très fortement marqués, ainsi que des enveloppes apparemment continues délimitant les lamelles de 1er ordre. j-l) Images FEG-SEM d'une cassure fraiche en section radiale ayant subi une attaque à la vapeur d'OsO_4, révélant à la surface des lamelles de 2e ordre les très fines enveloppes organiques séparant les lattes de 3e ordre individuelles (flèches blanches). m-p) Images AFM (mode tapping). m) Image de phase du contact en deux lamelles de 1er ordre, montrant les incréments de croissance très marqués (ligne verte discontinue). n-o) Images de topographie et de phase des lamelles de 2e ordre. p) Image de phase de plusieurs lamelles de 2e ordre, constituées de granules, et séparées par des enveloppes apparemment continues et présentant une forte affinité avec la pointe (flèches blanches).

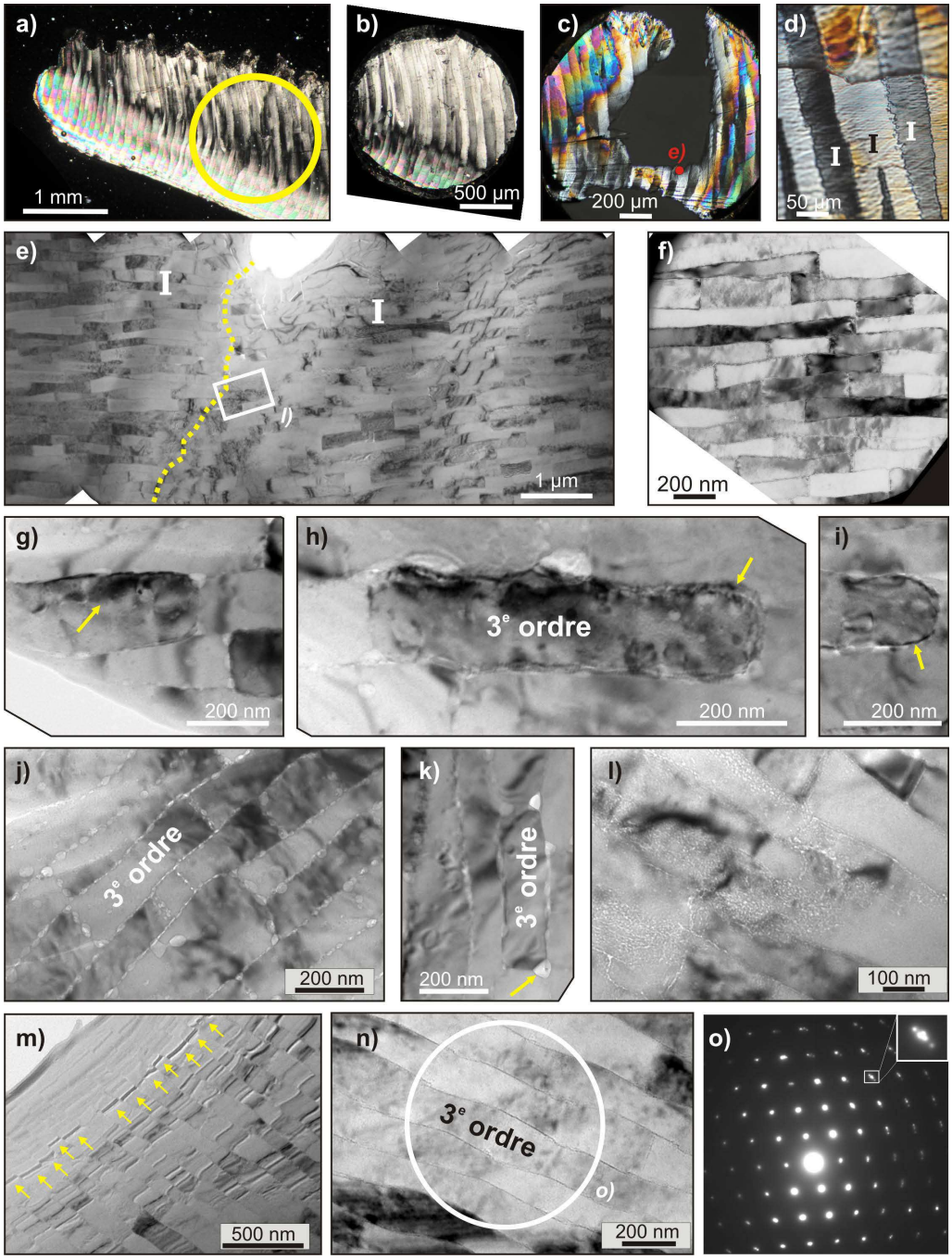


FIGURE 51 – *Patella vulgata*. Observation MET de la microstructure foliée-croisée. a-b) Emplacement de la grille MET sur la lame mince en LPA. c) Préparation après amincissement au PIPS. d) Lames de 1er ordre sur une lame ultrafine en LAP. e) Contact entre deux lamelles du 1er ordre localisé sur c. f) Lits du 2e ordre, constitué de l'alignement de lattes du 3e ordre. g-i) Granules ovoïdes coalescés formant les unités de 3e ordre (flèches jaunes). j) Bulles issues de la déstabilisation de composés organiques sous le faisceau, marquant les limites entre lamelles de 2e et de 3e ordre. k) Une bulle en "coin", formant un trièdre typique d'un contact triple. l) Forte porosité résiduelle, trahissant localement une forte teneur en composés organiques, à la limite entre deux lamelles de 1er ordre. m) Propagation d'une frange de Bragg, presque continue, à travers plusieurs lamelles de 2e ordre. n-o) Cliché de diffraction localisé (SAED) sur des lattes de 3e ordre appartenant à des lamelles de 2e ordre distinctes, présentant une très faible désorientation (cliché pratiquement monocristallin).

2.2.2 Composition biochimique in-situ

Il est intéressant de noter, à titre de comparaison ultérieure avec les fossiles, que les surfaces externes des coquilles de *Patella vulgata* sont particulièrement érodées, ne laissant souvent affleurer à leurs apex que les couches les plus internes. Elles sont de plus attaquées par des organismes microperforants, qui peuvent pénétrer sur une épaisseur importante, laissant ainsi un réseau de canalicules (Figure 52a) encore remplis de matériels organiques qui présentent une forte fluorescence naturelle (Figure 52b). Cette contamination est d'autant moins négligeable que les couches foliées croisées sont relativement pauvres en phase organique et ne présentent pas une fluorescence marquée sous excitation UV (Figure 52c-d), à l'exception de quelques incréments de croissance.

Une coloration à l'acridine orange marque fortement les canalicules laissés par les microperforants (colorés en orange-rouge) (Figure 52e-f) ; les microstructures foliées croisées sont quant à elles légèrement colorées en teintes vert-orange, marquant les incréments de croissance réguliers (Figure 52g-h), mais aussi les lamelles de 1er ordre, et même celles de 2e / 3e ordre (Figure 52g-h).

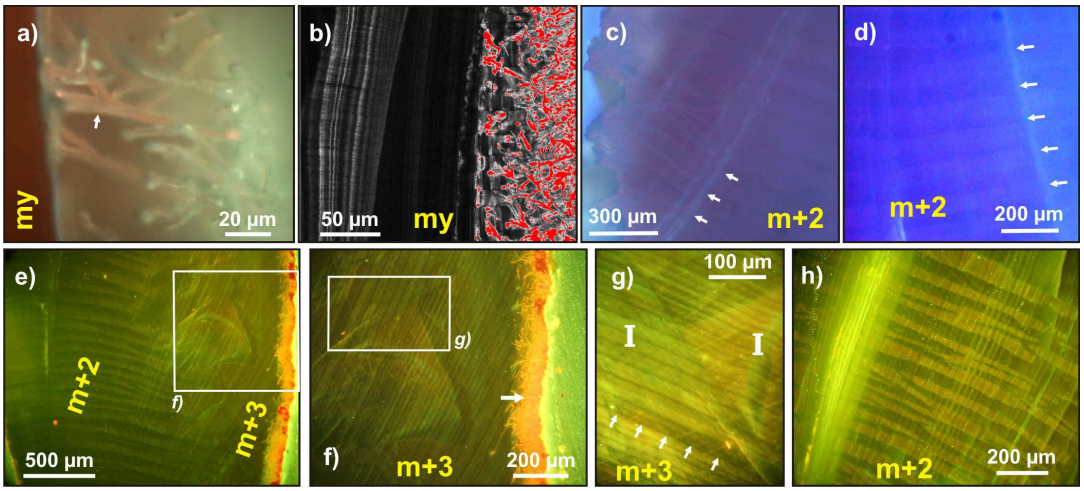


FIGURE 52 – Microscopie de fluorescence sur les couches externes calcitiques d'une coquille de *Patella vulgata*. a-b) Canalicules laissés par des organismes microperforants sur la surface externe de la coquille, montrant une forte autofluorescence en microscopie confocale laser (b) (excitation 488 nm). c-d) Quelques stries de croissance sont marquées par une autofluorescence plus forte (excitation UV). e-h) Tests de coloration à l'acridine orange. e-) Les canalicules laissés par les microperforants dans la surface externe présentent une teinte de coloration orange-rouge. g-h) La coloration marque fortement la striation de croissance en vert-orange (flèches blanches), et plus faiblement les lamelles de $1^{er}/2^{e}$ ordre.

Les observations de microscopie confocale laser sur un échantillon non coloré révèlent la forte fluorescence naturelle des incréments de croissance, mais aussi des enveloppes, apparemment continues, qui séparent les lamelles de 1er ordre (Figure 53a).

Sur les spectres réalisés au microscope confocal Raman, les pics usuels de la calcite sont détectés, mais aussi les pics à 1134 cm^{-1} et 1525 cm^{-1} (vibrations en élongation des liaisons C-C et C=C) caractéristiques en résonance Raman (RR) de la présence de molécules polyéniques (Figure 53b). Le ratio des pics L_c/ν_1 permet de localiser rapidement les lamelles de 1er ordre par l'alternance de leurs orientations (Figure 53c), que l'on peut ainsi corréler précisément aux cartes de distributions suivantes : cartes de la bande à 1134 cm^{-1}, représentative des polyènes enrichis en liaisons C-C (Figure 53d) et de la bande à 1525 cm^{-1}, représentative des polyènes plus riches en liaisons C=C (Figure 53e), que l'on peut aussi superposer en fausses couleurs (Figure 53f). Il apparait ainsi que ces deux types de molécules sont co-localisées dans les stries de croissances enrichies (en rose, issu de la superposition du bleu et du rouge, sur la figure 53f). Elles sont par contre anti-localisées aux limites des lamelles de 1er ordre, qui correspondent à la position des enveloppes continues mises en évidence précédemment : ces dernières ne contiennent ainsi que des molécules polyéniques

possédant un fort ratio des liaisons C-C/C=C. Si les incréments de croissance présentent une forte fluorescence totale (Figure 53g), les intensités de fluorescence ne correspondent pas à la distribution des polyènes au sein de ces incréments (ainsi, les incréments les plus riches en polyènes, en haut du scan 53f, présentent une assez faible fluorescence totale). Les polyènes, s'ils sont en effet détectables en faibles quantités en spectroscopie de résonnance Raman, ne représentent au final qu'une faible pourcentage de la composition biochimique totale.

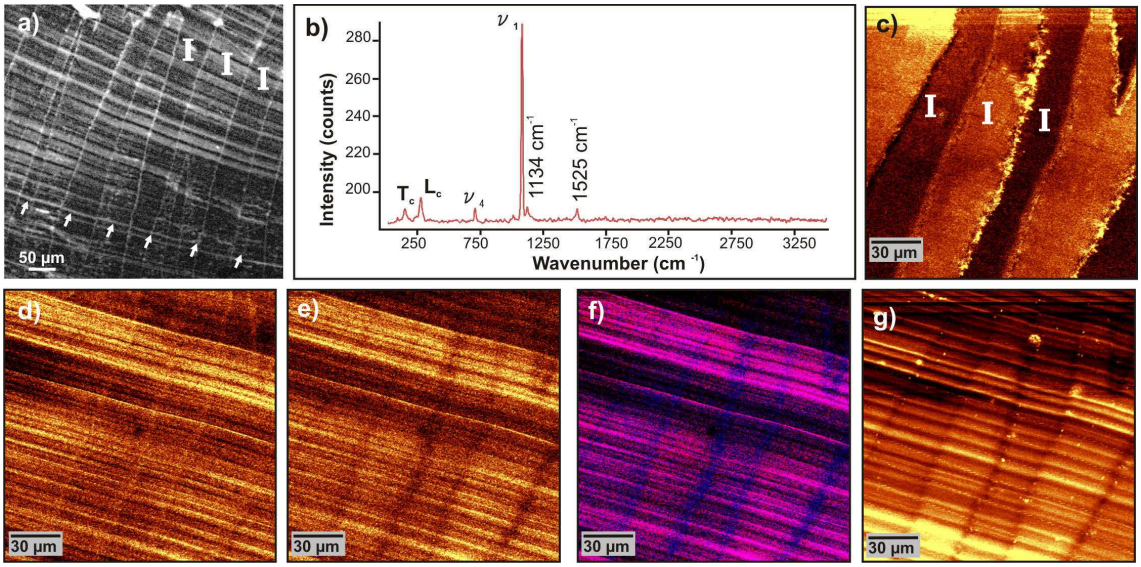


FIGURE 53 – Microscopie confocale laser sur la couche m+2 d'une coquille de *Patella vulgata.* a) Image de la fluorescence naturelle des stries de croissance (flèches blanches) et des enveloppes séparant les lamelles de 1er ordre (marquées d'un "I") sous une excitation de 488 nm en microscopie confocale laser. b) Un spectre Raman issu d'un des scans suivants, présentant les pics de la calcite et les deux bandes des polyènes à 1134 et 1525 cm^{-1}. c) Carte confocal Raman de distribution du ratio des pics L_c (mode libration, 282 cm^{-1}) / ν_1 (élongation symétrique en mode interne, 1085 cm^{-1}), mettant en valeur les changements alternatifs d'orientation entre lamelles du 1er ordre. d) Carte de distribution de la bande à 1134 cm^{-1} des polyènes. e) Carte de distribution de la bande à 1525 cm^{-1} des polyènes. f) Carte composite de (d) (en bleu) et (e) (en rouge) montrant les anti et co-localisations des molécules polyéniques. g) Carte de distribution de l'intensité de bruit de fond entre 2400 et 2500 cm^{-1}, corrélées à la fluorescence de l'échantillon.

2.2.3 *Synthèse préliminaire* : spécificités et modalités de cristallisation chez *Patella vulgata.*

La microstructure foliée croisée, telle qu'on a pu l'observer dans la couche m+2 de coquilles de *Patella vulgata*, semble donc au premier abord (et tel que décrit dans la littérature) très semblable à la microstructure lamellaire croisée.

Nous avons cependant pu mettre en évidence un certain nombre de subtiles variations :
- Les incréments de croissance sont remarquablement réguliers et très enrichis en composés organiques.
- Les lamelles ou lattes de 3e ordre sont bien plus régulières et rectilignes que celles trouvées jusqu'ici dans la microstructure lamellaire croisée.

- La coloration à l'acridine orange semble avoir une affinité légèrement plus marquée sur le folié croisé (on ne retrouve un tel marquage réussi que dans la couche externe de *Megathura crenulata,* par ailleurs assez particulière), ce qui indiquerait une composition biochimique un peu plus riche en molécules présentant des sites de liaisons chargés négativement.
- Nous avons pu, dans cet exemple, mettre en évidence in-situ la présence d'enveloppes organiques, apparemment continues, séparant systématiquement les unités de 3e, 2e et 1er ordre, de façon très similaire à celles des couches lamellaires croisées de plusieurs taxons. Celles-ci présentent toutefois des spécificités propres à la microstructure foliée croisée : ainsi, les enveloppes séparant les unités de 1er ordre ne sont pas ponctuées mais continues, et ne contiennent pas de molécules possédant des groupements -CH, mais des polyènes. On n'observe pas non plus d'interpénétrations irrégulières au contact des lamelles, les unités microstructurales viennent plutôt "mourir" dans une zone extrêmement enrichie en molécules organiques : ces "enveloppes" semblent donc mieux contraindre l'extension latérale des unités de 1er ordre, là où le patchwork observé dans la microstructure lamellaire croisée n'exerce qu'un contrôle latéral imparfait. Enfin, les enveloppes séparant les lits de 2e ordre ne jouent pas ici le rôle de barrières limitant complètement la propagation latérale de la cohérence cristalline, et celle-ci peut partiellement percoler entre lamelles de 2e ordre, conduisant ainsi, à la différence du lamellaire croisé, à une très bonne conservation des orientations cristallines entre plusieurs lits de 2e ordre (Figure 54).

Malgré leurs différences minéralogiques, ces deux types microstructuraux semblent donc partager un même mécanisme fondamental de mise en place : la coalescence de sous-unités granulaires pré-existantes au cours de la propagation d'un front de cristallisation au sein des unités de 3e ordre, latéralement délimité par un réseau organique définissant leurs morphologies à différentes échelles et modulant la continuité de la cohérence cristallographique entre les unités. Ce dernier point confirme, s'il le fallait encore, l'existence de deux types de contrôle exercés par l'organisme sur sa coquille : le contrôle de la minéralogie est dissocié de celui de la morphologie et de la mise en place des unités microstructurales.

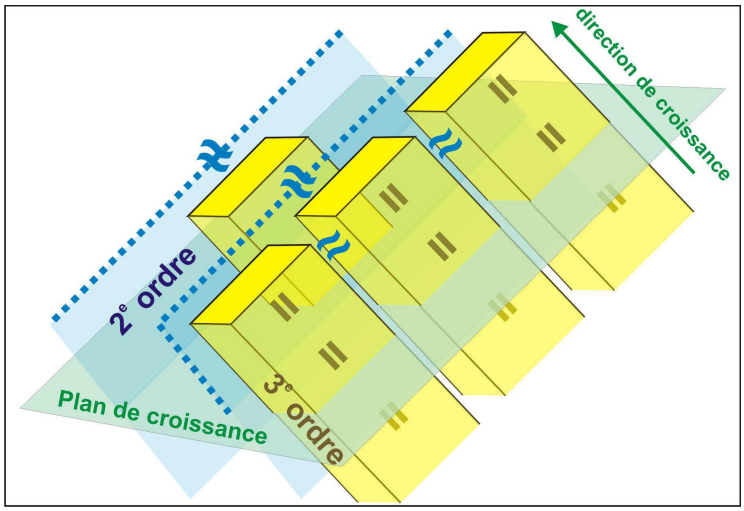


FIGURE 54 – Représentation schématique des directions de propagation de la cohérence cristallographique lors de la croissance des unités foliées-croisées. "≈" indique une bonne conservation de la cohérence, mais avec quelques faibles variations des orientation cristallographiques, au sein et entre les unités de 2e ordre.

Chapitre III

Evolutions diagénétiques

Evolutions diagénétiques

Les études menées à partir des coquilles de mollusques fossiles sont aussi abondantes que variées : archéomalacologie, reconstructions des listes faunistiques, reconstitutions paléogéographiques, paléoécologiques, paléoenvironnementales, datations, etc. Toutes ces études, dont la liste est ici loin d'être exhaustive, partagent une même problématique récurrente : l'état de préservation des coquilles, dont les éventuelles modifications (même mineures) sont susceptibles d'altérer l'information véhiculée, et donner ainsi naissance à des biais taphonomiques majeurs.

L'exemple de certaines reconstitutions géochronologiques en est particulièrement démonstratif. L'utilisation de la composante minérale des coquilles pour dater des dépôts sédimentaires est en effet considérée comme particulièrement peu fiable, que ce soit à travers les séries de désintégrations de l'uranium (Kaufman *et al.*, 1971; Plaziat *et al.*, 2008) ou le radiocarbone (Siani *et al.*, 2001) : Plaziat *et al.* (2008) soulignent par exemple l'incohérence des âges obtenus à partir de différentes coquilles appartenant pourtant à un même site, qu'il attribue à des évolutions diagénétiques différentes au sein de ces assemblages.

Si les compositions isotopiques (∂^{18}O) ou en éléments traces (Mg/Ca, Sr/Ca) des coquilles sont souvent considérées, malgré l'effet vital (Urey *et al.*, 1951), comme des proxies pertinents de l'évolution des températures et salinités de l'eau de mer (Weiner, 2010), ils n'en sont pas moins très sensibles aux évolutions de la phase minérale des coquilles.

Même des investigations plus classiques, telles les études sclérochronologiques (Coutts, 1970) ne sont pas à l'abri de biais : par exemple lorsque la conservation des stries de croissance est affectée comme, nous le verrons, cela peut être le cas (cf figure 59, page 93).

Cette problématique est d'autant plus fondamentale que les mécanismes de diagénèse/taphonomie qui peuvent affecter les coquilles s'avèrent particulièrement complexes et contre-intuitifs, dépendants fortement des conditions locales d'enfouissement (Philippon et Sabrier, 1979) : ces dernières déterminent, dès les premiers jours, l'évolution diagénétique/taphonomique. Ces facteurs s'additionnent de plus aux complexités et variabilités spécifiques que l'on retrouve au sein des coquilles des mollusques : celles-ci présentent presque systématiquement plusieurs couches de minéralogies, microstructures ou compositions différentes, qui peuvent ainsi être affectées différemment par les mécanismes d'altération.

Deux cas illustrant deux évolutions diagénétiques possibles des microstructures entrecroisées sont présentés : l'évolution des couches foliées croisées de coquilles de *Patella sp.* récentes, provenant d'un site archéologique marocain, et de la couche lamellaire-croisée de coquilles de *Velates perversus*, issues de l'Éocène du bassin de Paris. Ces spécimens sont, d'apparence, très bien préservés. En guise de référentiels de comparaison, nécessaires à la mise en évidence des effets diagénétiques qui les ont pourtant affectés, nous utiliserons les exemples de *Nerita* (à défaut d'un représentant actuel du genre) et *Patella,* développés au cours des chapitres précédents.

En plus des conditions spécifiques de chaque site, les particularités de la genèse des structures entrecroisées, dont certains mécanismes ont été illustrés à l'occasion de l'étude des coquilles actuelles, semblent en effet conditionner fortement leurs évolutions diagénétiques/taphonomiques, qui peuvent s'avérer parfois assez originales, dans ces coquilles fossiles.

3.1 *Patella sp.* (˜100 ka, El Harhoura 2, Témara, Maroc)

3.1.1 Contexte

La grotte El Harhoura 2 fait partie d'un ensemble de grottes d'intérêt archéologique situé sur la côte atlantique nord du Maroc (Figure 55a-b), à proximité de la localité de Témara, un peu au sud de Rabat. Creusée à la base de l'une des barres de calcarénite alignées le long de la côte que l'on peut suivre de Rabat jusqu'à Skhirat, cette grotte s'est formée, par érosion, avant la transgression marine du stade isotopique 5e (˜125 ka) et s'est ensuite progressivement comblée de dépôts sédimentaires au cours de la dernière période glaciaire, principalement des dépôts sableux issus de cordons dunaires (Boudad *et al.*, in prep.).

A la suite de plusieurs campagnes de fouilles successives, le contexte archéologique du site est maintenant bien établi (Nespoulet *et al.*, 2007, 2008; El Hajraoui *et al.*, in press) ; une occupation humaine intermittente est notamment avérée depuis le Paléolithique moyen (Atérien) jusqu'au Néolithique (˜105 ka to 5 ka ; Schwenninger *et al.* 2010 ; Jacobs *et al.* 2012 ; Janati-Idrissi *et al.* 2012). Le sondage de reconnaissance n'a toujours pas atteint le substrat rocheux (Figure 55c-d), mais le site a déjà fourni un nombre important d'os de la faune et de la microfaune, qui ont servi de base à de nombreuses études paléoécologiques, archéozoologiques et taphonomiques (Campmas et Beauval, 2008; Michel *et al.*, 2010; Stoetzel *et al.*, 2011; Campmas, 2012; Stoetzel *et al.*, 2012), ainsi que de nombreuses coquilles de mollusques.

En particulier, le niveau 8 (Figure 55d-e) présente un intérêt majeur : daté entre 92 +11/-9 ka (méthode ESR-Uth ; Janati-Idrissi *et al.* 2012) et 106.7 +/- 6.6 ka (méthode OSL ; Jacobs *et al.* 2012), il recèle en effet de nombreuses coquilles de Patellidae fossiles, s'accumulant principalement dans la légère dépression que forme la surface supérieure de la couche 8 (Figure 55f) en compagnie de nombreux restes osseux issus de la faune/microfaune et de fragments d'objets lithiques (Figure 55g). De telles accumulations, que l'on trouve assez communément dans les sites archéologiques en milieu côtier (Klein *et al.*, 2004; Fa, 2008; Hunt *et al.*, 2011; Steele et Álvarez-Fernández, 2011), sont souvent d'origine anthropique, issues des activités de collecte des populations humaines littorales. En particulier, les mollusques vivant en milieu intertidal et sur substrat rocheux (tels que les patelles) sont très faciles à repérer et à ramasser (Yesner *et al.*, 1980), et constituent donc une composante significative du régime alimentaire de ces populations littorales : on les retrouve ainsi en abondance dans ce type de dépôts (Fa, 2008).

Jeunes (au regard des temps géologiques) ces fossiles constituent un cas intéressant pour l'analyse des premières étapes de l'évolution diagénétique de la microstructure foliée croisée. Collectés vivants sur le rivage, les coquilles n'ont pas été longtemps exposées aux processus d'érosion, de fragmentation et de diagénèse précoce qui, habituellement, altèrent rapidement les coquilles abandonnées en milieu marin lors de la mort de l'animal (dissolutions/recristallisations massives par l'eau de mer, érosion/fragmentation par l'action des vagues et des courants, prédation, etc.). Leur consommation par des populations humaines suggère au contraire un court laps de temps entre la récolte et le dépôt/enfouissement des coquilles dans la grotte. Cette dernière, creusée dans un encaissant calcaire (calcarénite), favorise de plus une bonne préservation des structures carbonatées : les eaux de précipitation qui s'infiltrent et percolent dans la grotte sont en effet tamponnées avant d'atteindre le niveau des coquilles, ce qui limite fortement les effets de dissolution/recristallisation. Un tel contexte suggère donc des coquilles normalement mieux préservées que celles que l'on peut trouver dans des dépôts sédimentaires usuels.

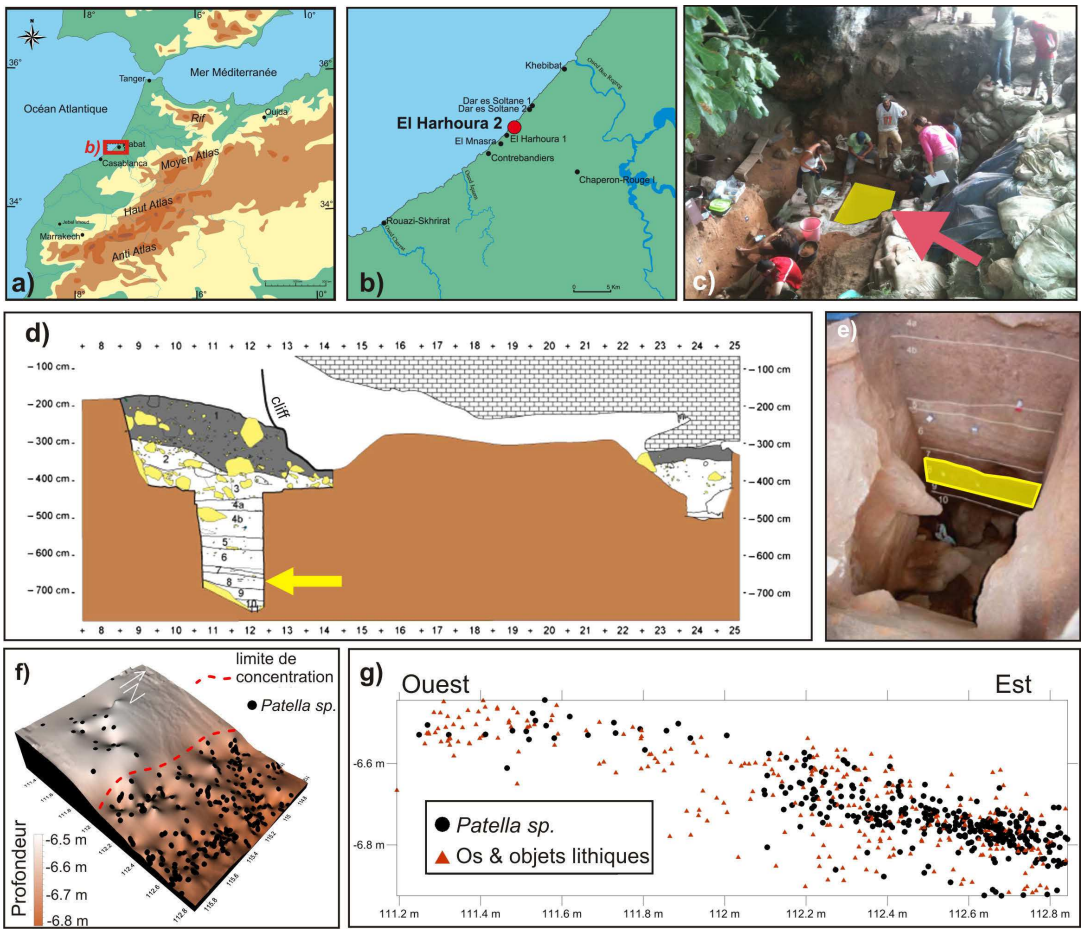


FIGURE 55 – La grotte EL Harhoura 2. a) Carte du Maroc du Nord. b) Localisation des grottes d'intérêt archéologique sur la côte Atlantique de Rabat-Témara. c) Photo des fouilles à l'entrée de la grotte d'El Harhoura 2. La flèche rouge marque la localisation du sondage. d) Section stratigraphique de la grotte, illustrant la profondeur atteinte par le sondage. La flèche marque le niveau d'intérêt 8. e) Photo du sondage, la couche 8 est délimitée en jaune. f) Topographie de la surface de la couche 8 explorée lors du sondage. Les points noirs marquent la localisation des spécimens de *Patella sp.* g) Profil est-ouest dans l'épaisseur sondée de la couche 8, montrant la concentration des spécimens de *Patella sp.* (points noirs), ainsi que des os et matériels lithiques (entiers ou fragmentés) (points rouges).

3.1.2 Morphologie et Microstructures

Morphologie

Les coquilles semblent bien préservées à première vue ; elles sont cependant toutes dépigmentées, ayant acquis une couleur ocre proche de celle du sédiment formant la couche 8 (Figure 56). Bien que les coquilles soient dans l'ensemble complètes (Figure 56a-d), un nombre significatif de spécimens présente une cassure de forme semi-circulaire assez typique au niveau de la bordure externe, parfois importante (Figure 56e-i), mais parfois discrète (Figure 56j-n). Ces marques sont probablement d'origine anthropique, issues de la collecte : le pied des patelles possédant une capacité d'adhésion importante, qui peut atteindre jusqu'à 980 N (Fa, 2008) si l'animal n'est pas pris "par surprise", il est alors nécessaire d'utiliser pour les décoller un ustensile susceptible de laisser ce type d'empreintes (ce que nous avons d'ailleurs pu vérifier lors de nos collectes d'échantillons).

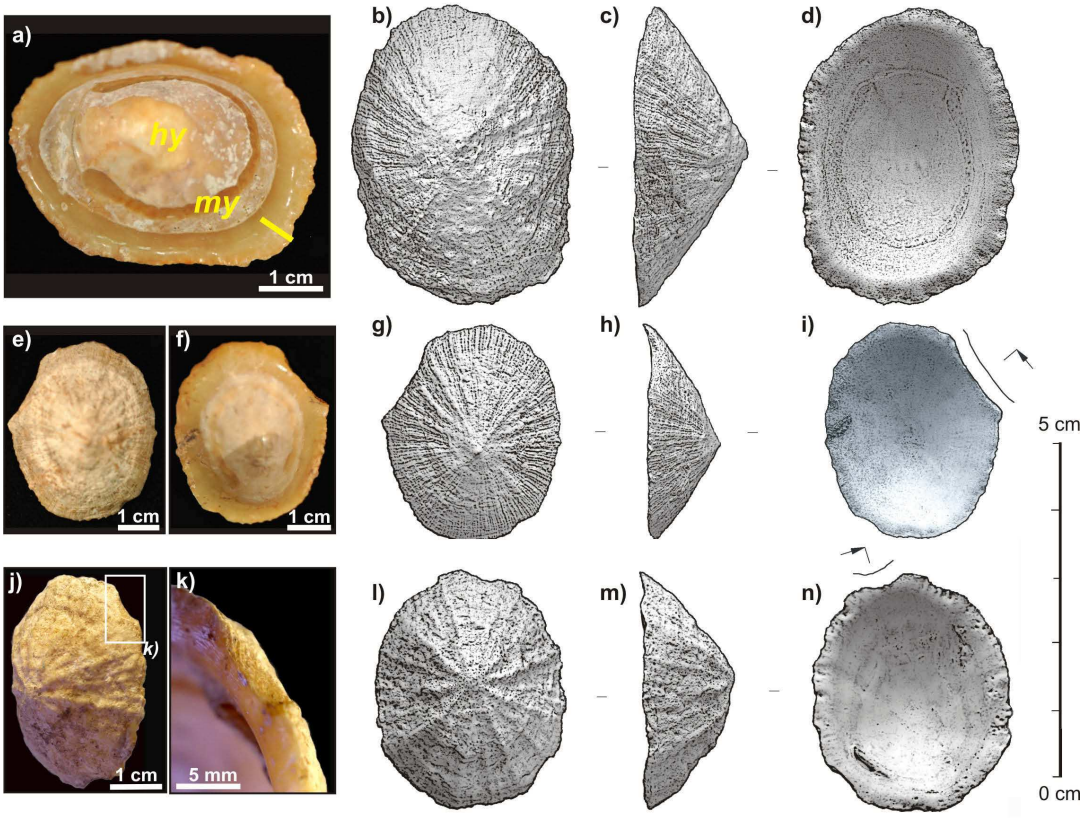


FIGURE 56 – Morphologie des *Patella* fossiles issues de la couche 8 de la grotte d'EL Harhoura 2. a-d) Un spécimen non-cassé. my : myostracum. hy : hypostracum. barre jaune : section de la figure 57. e-i) Un spécimen présentant une cassure large en bordure de la coquille. j-n) Un spécimen présentant une petite empreinte sur sa bordure.

Note sur la détermination taxonomique : Les spécimens sont dans l'ensemble larges et épais, et pourraient aussi bien correspondre à des *Patella rustica* qu'à des *Patella vulgata* (Linnaeus, 1758), toutes deux présentes sur les rivages marocains. Les critères classiques de taxonomie étant essentiellement anatomiques (ratio des tailles coquille/radula, taille et forme du pied, etc.) ou basés sur les motifs colorés, l'absence de tissus mous et la dépigmentation totale des coquilles rend toute détermination taxonomique sujette à caution - nous nommerons donc ces spécimens *Patella sp.*

Microstructures

La minéralogie de la coquille est préservée : une rapide coloration de Feigl confirme que les couches internes (m-2 à m+1) sont toujours aragonitiques, et que les couches externes (m+2 et m+3) sont bien calcitiques (Figure 57a-c). L'aragonite étant en effet un polymorphe instable du carbonate de calcium dans les CNTP, les couches aragonitiques des coquilles fossiles ont ainsi tendance à recristalliser en calcite (polymorphe stable dans les CNTP), sur de longues périodes de temps, et la présence d'aragonite est considérée par certains auteurs comme un indice de leurs bonne préservation (Weiner, 2010).

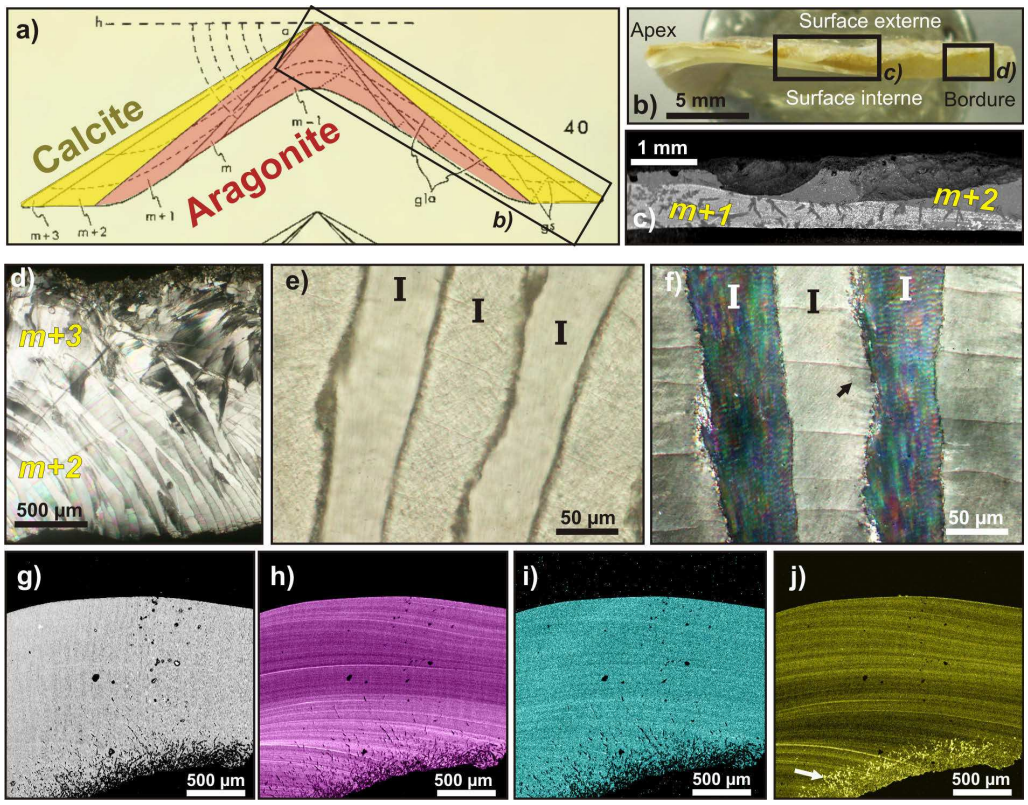


FIGURE 57 – Microstructure foliée-croisée d'une *Patella sp.* fossile. a) Schéma théorique des couches calcitiques et aragonitiques. b) Section radiale d'un spécimen. c) Coloration Feigl appliquée sur la section (b), observée en BSE : la couche m+1, colorée avec succès, est toujours aragonitique, et la couche m+2 est bien calcitique. d) Lame mince des couches calcitiques externes de la coquille en section radiale (LPA). e) Vue de plusieurs lamelles de 1er ordre consécutives (marquées d'un "I") en LPNA. f) Vue de la même zone en LPA, présentant l'extinction typique une lamelle de 1er ordre sur deux. Les unités de 3e ordre individuelles sont visibles lorsqu'elles sont très faiblement désorientées. La flèche noire marque une région de possible recristallisation. g-j) Cartes réalisées à la microsonde électronique. g) Image en BSE, montrant l'alternance des lamelles de 1er ordre. h) Distribution du Mg en bandes correspondant à la striation de croissance. i) Distribution du Sr, présentant des stries très faiblement marquées. j) Distribution du S, enrichi dans certaines stries de croissance, mais aussi dans les canalicules forés dans la surface externe (flèche blanche).

Si la couche m+3 apparait légèrement plus épaisse que sur notre échantillon actuel de référence (Figure 49c), et le changement d'orientation entre les couches m+3 et m+2 plus progressif (Figure 57d), on retrouve sinon une organisation foliée croisée globalement bien préservée. Les classiques unités de 1er ordre (Figure 57e) présentent toujours une extinction synchrone une lamelle sur deux, ce qui révèle ainsi une bonne conservation des orientations cristallographiques des unités de 2e ordre et de 3e ordre qui les constituent (Figure 57f). On notera cependant la disparition des incréments de croissance (Figure 57f), si réguliers et marqués, qui étaient observables en LPNA sur un spécimen actuel (Figure 49d). A la place, un réseau de fractures discontinues segmente irrégulièrement les unités de 1er ordre, dans la direction générale où l'on aurait dû observer les stries de croissance (Figure 57f). Enfin, certaines rotations des polariseurs croisés révèlent de fines désorientations cristallographiques, localisées aux bordures des unités de 1er ordre, qui ne sont pas liées à la structure mais pourraient correspondre à des zones de recristallisation à fine échelle (flèche sur la figure 57f).

Les distributions des éléments traces dans la coquille sont bien conservées, marquant toujours la striation de croissance (Figure 57g-j) ; de façon assez surprenante, on remarque que les canalicules laissés par les organismes microperforants contiennent encore du matériel organique, trahi par les fortes teneurs en S des canalicules (Figure 57j).

La coloration au citrate de Pb / acétate d'uranyle ne révèle cette fois-ci aucun incrément de croissance régulier, ni aucune des enveloppes organiques (Figure 58a) isolant les unités de 1er ordre mises en évidence dans la microstructure foliée croisée (Figure 50g-i). Et, si la microstructure semble a priori préservée à fine échelle (Figure 58b), on remarquera plusieurs anomalies (que l'on retrouve toujours à proximité du contact entre lamelles du 1er ordre) :

- En de rares endroits, une cassure suivant la surface d'un lit de 2e ordre peut mettre en évidence des sous-unités aux contours anguleux dans les lamelles de 3e ordre, à la place de nos granules ovoïdes : celles-ci présentent même un angle à 120° caractéristique des cristaux rhomboédriques idiomorphes de calcite (Figure 58c-e).
- Le réseau de fines enveloppes délimitant les unités de $2^{e}/3^{e}$ ordre n'a quant à lui pu être révélé à l'aide de la vapeur d'osmium (la préparation a pourtant subi le même traitement qu'en figure 50j-l, les deux échantillons ayant été exposées en même temps), et semble avoir disparu.
- Toujours à proximité du contact entre lamelles de 1er ordre (Figure 58f), les unités de 2e ordre sont anormalement épaisses (elles peuvent parfois atteindre plusieurs microns d'épaisseur, comme sur la figure 58g), et semblent résulter de la fusion de plusieurs lits superposés. Ces zones semblent correspondre aux localisations des zones de recristallisation identifiées en LPA (Figure 57f).

Au cœur des lamelles de 1er ordre, on retrouve l'aspect granulaire usuel aisément reconnaissable à l'AFM (Figure 58h-j) qui compose les unités de 3e ordre (Figure 58j) ; mais on ne retrouve pas, là non plus, de trace des enveloppes présentant un fort contraste de visco-élasticité qui séparent les lits de 2e ordre dans la structure foliée croisée (Figure 50p).

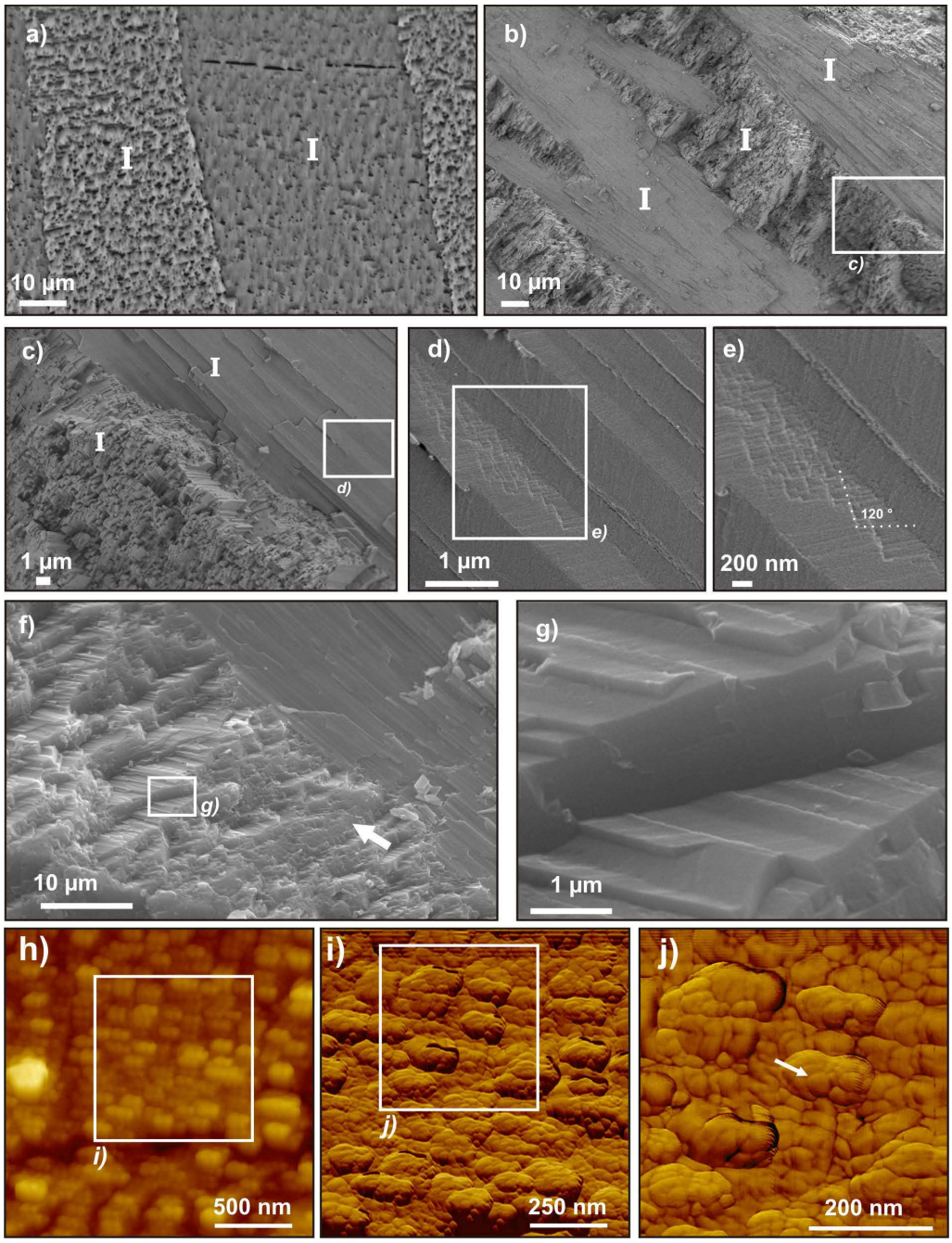


FIGURE 58 – Microstructure foliée-croisée d'une *Patella sp.* fossile. a) Test de coloration au citrate de Pb / acétate d'uranyle observé au MEB (surface polie, détecteur BSE), ne révélant aucune enveloppe entre les lamelles de 1er ordre (marquée d'un "I"). b-e) Images FEG-SEM d'une cassure fraiche selon une section radiale. b) Lamelles de 1er ordre. c) Limite entre deux lamelles de 1er ordre et changement d'orientation des unités de 3e ordre les constituant. d) Vue de surface des lattes de 3e ordre formant une rangée du 2e ordre. e) Vue de la surface d'une unité de 3e ordre, présentant des sous-unités à facettes anguleuses. f) Vue MEB d'un contact anormal entre deux lamelles de 1er ordre : certaines zones (flèche blanche) présentent des unités de $2^{e}/3^{e}$ ordre partiellement fusionnées. g) Zoom sur des lamelles de 2e ordre anormalement épaisses, probablement constituées de plusieurs lamelles de 2e ordre fusionnées. h-j) Images AFM (mode tapping). h) Image de topographie dans une lamelle de 1er ordre. i) Image de phase des unités de 3e ordre. j) Image de phase montrant leur composition granulaire (flèche blanche).

3.1.3 Caractérisation biochimique in-situ

Les canalicules (Figure 59a) laissés, du vivant de l'animal, par les organismes microperforants ayant attaqué la face externe de sa coquille, présentent toujours une réponse de fluorescence sous excitation UV, confirmant la présence de matériel organique (riche en S, comme on a pu le voir précédemment). L'acridine orange ne colore d'ailleurs plus que ces canalicules, et ne présente plus aucune affinité avec la surface : la coloration ne révèle aucune organisation microstructurale (Figure 59e).

De même, si les couches calcitiques présentent une fluorescence très intense (Figure 59b), celle-ci ne révèle aucun motif microstructural particulier. Les causes d'une telle fluorescence, homogène et indépendante de la microstructure, peuvent être variées ; Shopov (2004) a ainsi listé plus de 24 activateurs potentiels de fluorescence dans les calcites géologiques, les plus communs étant généralement des cations en substitution dans la maille cristalline en très faibles quantités (Mn^{2+}, Fe^{3+}, Pb^{2+}, Ce^{3+}, etc.) (Sidike *et al.*, 2006), ou bien des molécules (acides humiques, fulviques, esters organiques, etc.) ou radicaux libres adsorbés dans les défauts cristallins. Les recolorations ocres-brunes que l'on peut observer se propageant depuis la surface externe, parfois limitées à une fine couche et disparaissant progressivement (Figure 59c), ou se propageant sur une grande épaisseur pour s'arrêter suivant un front marqué (Figure 59d), sont ainsi probablement liées à la migration d'acides humiques/fulviques ou de Fe/Mn en provenance du sédiment. L'origine de la fluorescence intrinsèque de la calcite est moins claire, mais pourrait indiquer une modification fondamentale de la maille cristalline, nécessaire afin d'inclure de nouveaux atomes en substitution, telle qu'on l'observe fréquemment dans les calcites géologiques (spéléothèmes, etc.). Il faut bien préciser que, si une telle altération a réellement eu lieu, cette dernière s'est produite en conservant les motifs de la microstructure foliée croisée à toutes les échelles, et impliquerait donc une recristallisation (partielle ? ?) particulièrement fine - observation d'ailleurs assez cohérente avec la présence de sous-unités anguleuses dans les lattes de 3e ordre.

Il faut avoir recours à la microscopie confocale pour trouver la trace de composés organiques conservés in-situ, dont le signal de fluorescence est trop faible et se perd dans le bruit de fond de fluorescence. On peut observer que certaines stries de croissance, très irrégulièrement réparties, présentent encore une autofluorescence naturelle (Figure 59f). Ces observations confirment aussi la disparition des enveloppes organiques entre lamelles du 1er ordre (Figure 59f). Sur les spectres réalisés au microscope confocal Raman, seuls les pics usuels de la calcite sont détectés (Figure 59g) ; l'alternance des orientations ente les lamelles du 1er ordre est conservée, comme l'on peut le confirmer par la distribution du ratio des pics L_c/ν_1 (Figure 59h). Aucune autre phase minérale ou organique n'est détectée, et, en particulier, les pics des polyènes à 1134 cm^{-1} et 1525 cm^{-1} sont absents (Figure 59i) : les polyènes contenant de nombreuses familles de pigments (caroténoïdes, etc.), cette observation concorde avec la dépigmentation générale de la coquille. Seules certaines stries de croissance présentent encore une fluorescence marquée, alors que de grandes zones en sont pratiquement dépourvues (Figure 59j), confirmant une conservation très hétérogène des composés organiques : les molécules préservées le sont par contre in-situ, au sein de certaines stries de croissance.

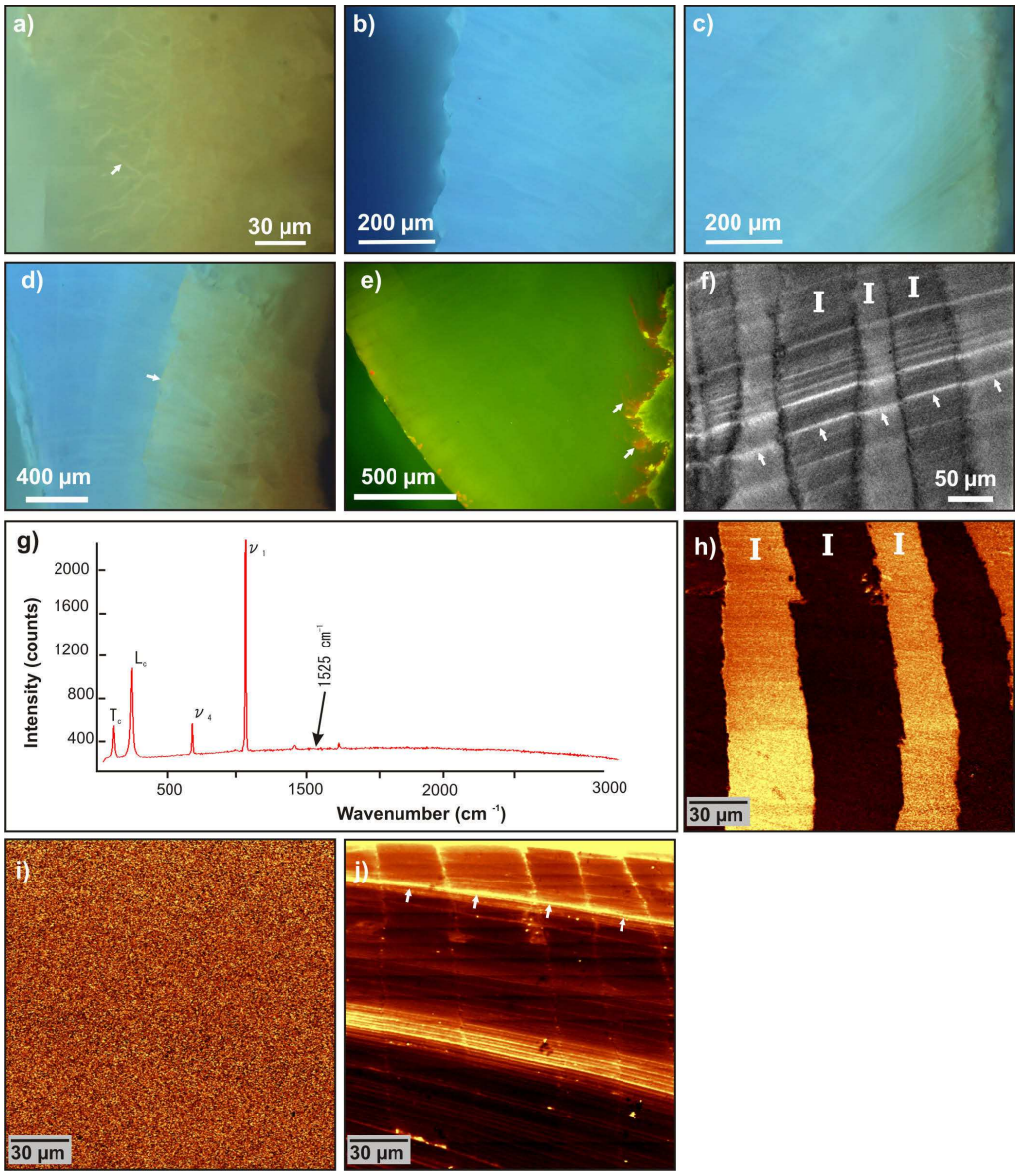


FIGURE 59 – Microscopie de fluorescence et confocale laser sur les couches externes calcitiques d'une coquille de *Patella sp.* fossile. a) Fluorescence résiduelle des canalicules laissés par des organismes microperforants sur la surface externe de la coquille (excitation UV). b) Forte fluorescence intrinsèque, sur la face interne de la couche m+2. c-d) Changements subtil (c) et marqué (d) de la couleur de fluorescence à proximité du contact avec le sédiment. e) Test de coloration à l'acridine orange. Quelques canalicules laissés par les microperforants sont colorés en orange-rouge ; ni la striation de croissance, ni la microstructure ne sont colorées. f) Image de fluorescence naturelle (excitation de 488 nm) en microscopie confocale laser : quelques stries de croissance présentent une forte fluorescence (flèches blanches) mais aucune enveloppe séparant les lamelles de 1er ordre (marquées d'un "I") n'est visible. g) Un spectre Raman issu d'un des scans suivants, présentant les pics de la calcite mais aucune bandes de polyènes. h) Carte confocale Raman de distribution du ratio des pics L_c (mode libration, 282 cm^{-1}) / ν_1 (élongation symétrique en mode interne, 1085 cm^{-1}), mettant en valeur les changements alternatifs conservés d'orientation entre lamelles du 1er ordre. i) Carte de distribution à 1525 cm^{-1} (position théorique d'un pic des polyènes) j) Carte de distribution de l'intensité de bruit de fond entre 2400 et 2500 cm^{-1}, corrélées à la fluorescence de l'échantillon. Les flèches marquent une strie de croissance conservée.

Ces coquilles de *Patella sp.* apparaissent ainsi à première vue bien conservées (minéralogie des couches, distribution des éléments traces, etc.). En particulier, la microstructure des couches foliées croisées semblent bien préservée, où l'on retrouve l'organisation usuelle des lamelles de 1er, 2e et 3e ordre. Même le matériel organique emplissant les canalicules laissés par les microperforants est conservé.

L'effet sur la matrice organique des couches foliées croisées est plus notable. Celle-ci a subi une diagénèse différentielle marquée par la disparition systématique du réseau d'enveloppes organiques qui enveloppaient les unités microstructurales à toutes les échelles. D'autres composés organiques ont par ailleurs aussi disparu, ou ont été assez altérés pour ne plus être détectables ; pourtant, une partie substantielle de la phase organique est néanmoins conservée, qui plus est in-situ, distribuée dans certaines stries de croissance.

Mais cette diagénèse de la matrice organique n'est pas sans effet sur la phase minérale, et la disparition des enveloppes organiques peut être corrélée à une diagénèse subtile des unités microstructurales à leur contact. Des traces d'une recristallisation très fine sont ainsi détectées aux contacts entre lamelles du 1er ordre, comme la présence de sous-unités présentant des facettes cristallines dans les lattes de 3e ordre, ainsi qu'une fusion partielle des lits de 2e ordre, corrélable à la disparition des enveloppes délimitant les lamelles de $2^{e}/3^{e}$ ordre.
Ces enveloppes ont, comme on a pu le voir dans les chapitres précédents, un rôle fondamental dans la délimitation latérale des unités structurales au cours de la cristallisation ; leur disparition constitue une étape importante dans l'évolution diagénétique/taphonomique des coquilles, même récentes.

Cette diagénèse différentielle de la phase organique est somme toute logique : les molécules constituant les enveloppes "purement" organiques sont plus labiles que les molécules qui sont incluses dans le minéral à fine échelle, et sont donc dégradées en premier lors des processus de fossilisation (hydrolyse, etc.). Un exemple classique illustre d'ailleurs assez bien ce phénomène : la dégradation des enveloppes séparant les prismes de *Pinna* conduit ainsi à leur dissociation, et, finalement, à la disparition très rapide de la couche prismatique peu après la mort de l'animal (Cuif et Dauphin, 2003).

3.1.4 Extraits organiques

Au vu des faibles teneurs en composés organiques que l'on peut escompter extraire des coquilles fossiles et le nombre limité de spécimens, la totalité des couches est broyée pour réaliser l'extraction et l'analyse de la fraction organique soluble, et tenter de détecter un effet diagénétique sur les compositions biochimiques.

En chromatographie d'exclusion stérique, on observe une relative bonne conservation qualitative des familles de molécules séparées selon leurs poids moléculaires ; même si difficilement quantifiable, la teneur en composés organiques des coquilles fossiles n'est pas négligeable (Figure 60).

Deux effets diagénétiques majeurs sont observés :

1. La disparition des molécules les plus grosses (dont le poids molécule dépasse, environ, les 100 kDa).
2. La disparition conjointe des faibles poids moléculaires, qui se traduit par l'affinement asymétrique des pics sur le diffractogramme.

Notre hypothèse d'une diagénèse différentielle semble ainsi se confirmer, peut être liée à l'action d'une circulation fluide. Celle-ci aurait ainsi pour effet : 1/l'hydrolyse préférentielle des plus grosses molécules qui se retrouvent alors fragmentées en plus petites molécules, facilement mobilisables. 2/le lessivage des plus petits poids moléculaires.

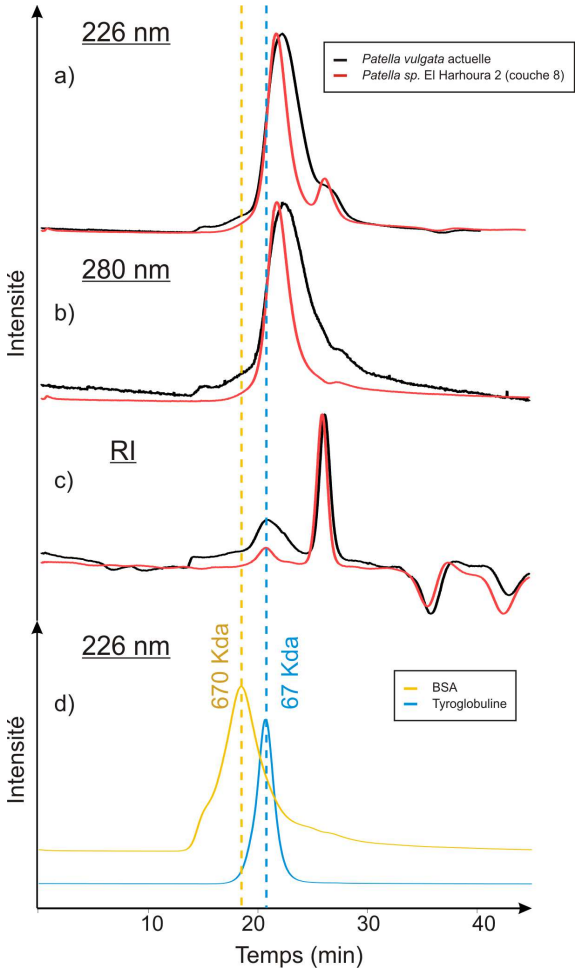


FIGURE 60 – Chromatographie liquide (HPLC) de la fraction soluble (MOS) de la phase organique extraite de toute la coquille d'une *Patella vulgata* actuelle et d'une *Patella sp.* fossile (Couche 8 de la grotte El Harhoura 2). Chromatogrammes à : 226 nm (a), 280 nm (b) et signal de réfractomètre (c). d) Les chromatogrammes de la BSA et de la thyroglobuline sont indicatifs des temps de rétention de standards de poids moléculaires connus.

3.1.5 Effet de cuisson

Une question en particulier, relative aux habitudes culinaires des populations atériennes ayant consommé ces patelles, s'est posée : à savoir si ces dernières avaient été cuites ou consommées crues et si l'on pouvait, par l'intermédiaire des coquilles, mettre en évidence des indices de cuisson. Tout indice potentiel d'une utilisation du feu, il y a ~100 ka dans le nord du Maroc, semble en effet susciter un certain intérêt de la part des archéologues.

Si les effets d'une forte cuisson sont aisément détectables sur les coquilles de mollusques (transformation de la phase minérale, modifications structurales/microstructurales, etc. - Bonizzoni *et al.*, 2009; Collins, 2012) et ne nous aurait probablement pas échappé lors des investigations décrites ci-dessus, les effets d'une cuisson rapide et/ou peu intense pourraient être plus subtils. Comme vu précédemment, la diagénèse différentielle de la phase organique a conduit, dans ces fossiles, à une relative bonne préservation in-situ de certaines molécules (notamment au sein des stries de croissance) : nous tenterons ainsi de déterminer si la composition de cette phase organique préservée peut servir de traceur potentiel de cuisson.

Spectroscopie FT-IR sur poudre

En première approche, le couplage de la spectroscopie FT-IR sur poudre (coquille totale) avec la thermogravimétrie (ATG) semble constituer un bon moyen de tracer l'évolution des molécules organiques selon la température de cuisson : les spectres d'une coquille actuelle et d'une coquille fossile révèlent en effet déjà de notables différences, dont la disparition de certaines bandes amide I (Figure 61b) mais aussi la conservation des bandes liées aux groupements -CH (Figure 61a).

L'effet d'un chauffage à 550°C est flagrant sur la poudre issue d'une coquille actuelle : on provoque ainsi la disparition complète des bandes amide I et amide A, alors que les bandes des groupements -CH sont conservées (Figure 61c-e).

Nous pouvons suivre l'évolution du dégazage au cours de la montée en température en ATG, le montage permettant de détecter de très faibles quantités de gaz émis (on peut par exemple suivre la disparition des bandes IR d'eau, qui correspondent à l'adsorption de l'humidité ambiante sur la poudre au contact de l'air aux alentours de 100°C, figure 61f).

Sur l'échantillon actuel préalablement chauffé, on n'observe le dégazage des groupements -CH qu'après avoir dépassé la barre des 600 °C (Figure 61f) - c'est à dire bien après le début du dégazage du CO_2, qui trace la température du début de la déstabilisation de la calcite lors de sa transformation en chaux vive ($CaCO_3 \rightarrow CaO + CO_2$) : les molécules contenant ces groupements sont très probablement associées assez intimement avec le minéral, pour n'être libérées que lors de la transformation reconstructive de ce dernier, qui détruit complètement la structure carbonatée. On notera, lors de la chauffe d'un échantillon actuel (Figure 61f) le dégazage aux alentours de 350 °C d'un composé, qui présente deux pics marqués à 930 et 965 cm^{-1} : ce dernier correspond parfaitement avec un standard de NH_3 (Figure 61g), que l'on corrèlera au dégazage issu de la déstabilisation des molécules contenant des groupements amide (c'est à dire des composés contenant au moins un groupe carbonyle lié à un atome d'azote). Sur un échantillon fossile, seul le dégazage des molécules contenant des groupements -CH est visible (Figure 61h).

Les molécules contenant des groupements -CH (dont les lipides constituent la majeure partie) semblent ainsi résister assez bien au chauffage : il faut des températures assez élevées pour parvenir à les détruire (au contraire des molécules contenant des groupements amide, qui disparaissent assez vite).

On retrouve en outre ces composés contenant des groupements -CH dans les coquilles fossiles ; assez résistantes pour ne pas être détruites par la chauffe, elles ne sont pas moins susceptibles de légères modifications, et l'évolution de leur composition biochimique pourrait ainsi constituer un traceur potentiel.

Note : L'analyse thermogravimétrique couplée à la spectroscopie FT-IR a donné lieu, dans la littérature, à des estimations de la teneur en matériel organique des tests carbonatés d'origine biogénique (de l'ordre de 2,5%, estimé par exemple pour les coraux, Cuif *et al.*, 2004). Mais ces estimations ne se basent que sur la perte en poids observée entre 250 °C et 450 °C, et ne prennent ainsi pas en compte les molécules, qui ne partent qu'après la déstabilisation de la phase minérale vers 550-600 °C (telles les molécules contenant des groupements -CH) : ces teneurs sont donc potentiellement sous-estimées.

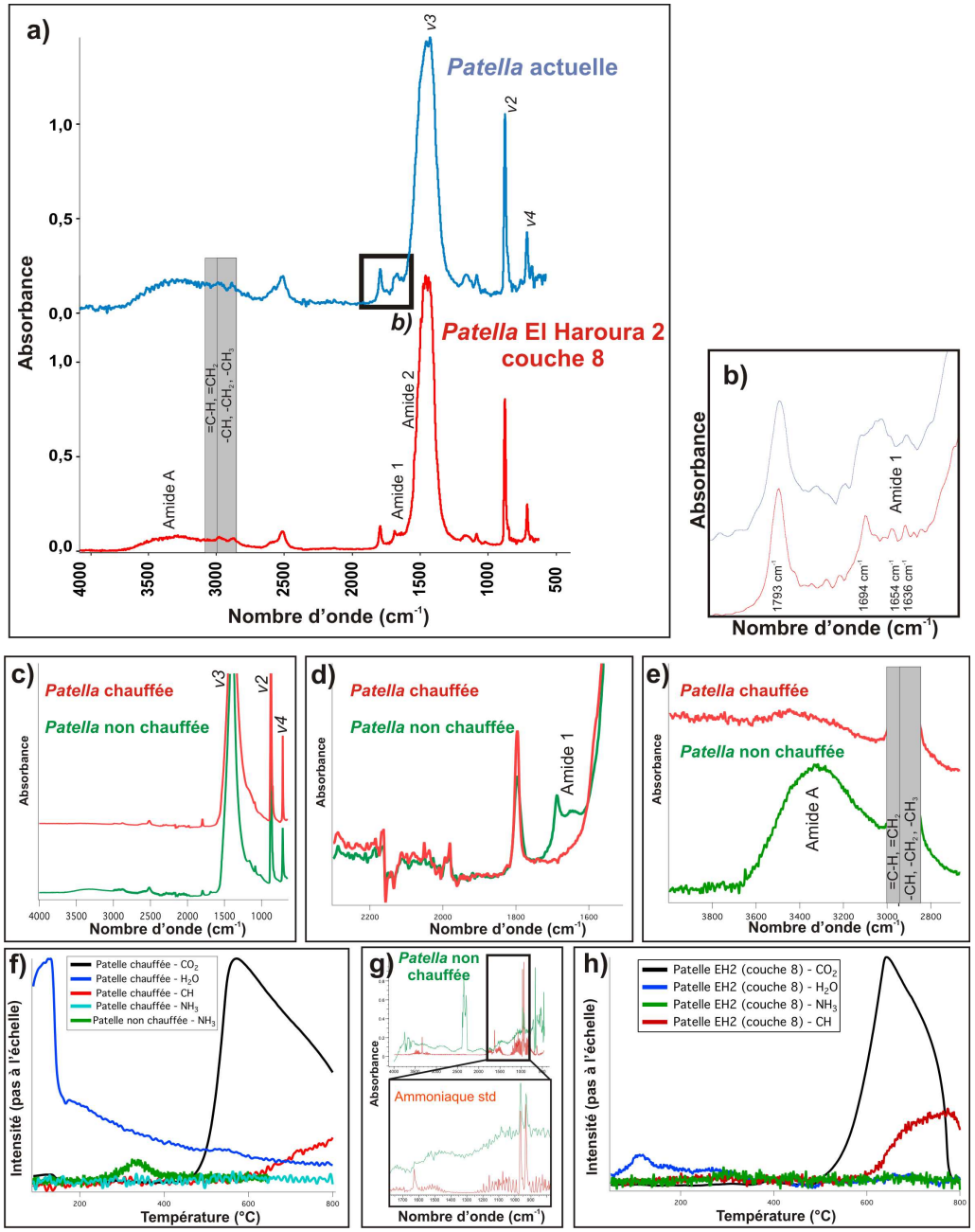


FIGURE 61 – Test de cuisson - Spectroscopie FT-IR. a) Spectres sur poudre totale issue d'une *Patella vulgata* actuelle et d'une *Patella sp.* fossile (Couche 8, grotte El Harhoura 2). b) Zoom sur la gamme des pics correspondant aux vibrations des groupements amide I. c-e) Spectres sur poudre totale d'une coquille de *Patella vulgata* actuelle, avant et après chauffage à 550 °C pendant 30 min. c) Spectres totaux. d) Zoom sur la gamme des pics correspondant aux vibrations des groupements amide I. e) Zoom sur la gamme des pics correspondant aux vibrations des groupements amide A et groupements -CH. f-h) Couplage ATG-FT-IR sur poudre totale issue d'une *Patella vulgata* actuelle, chauffée préalablement ou non (f) et d'une *Patella sp.* fossile (Couche 8, grotte El Harhoura 2) (h) . g) Spectre du dégazage à 350 °C d'une *Patella vulgata* actuelle non chauffée comparée à un standard de NH_3.

Fraction lipidique

Des analyses en chromatographie gazeuse (GC) sont réalisées sur la fraction lipidique de la phase organique extraite de la totalité de coquilles actuelles que l'on aura, pour tenter de s'approcher au mieux des pratiques des populations atériennes, chauffées ou non au feu de bois (5 min) avant broyage.

Les résultats confirment la bonne tenue de la fraction lipidique lors de la chauffe : elle est dans l'ensemble peu modifiée (Figure 62). Si la majorité des molécules est conservée, on notera tout de même quelques variations : ainsi, une petite partie des molécules à fort encombrement stérique (ou très fonctionnalisées, temps de rétention de 115 à 120 min) disparait lors de la cuisson, probablement altérées en molécules plus petites/moins fonctionnalisées, que l'on voit apparaitre sur le chromatogramme de l'échantillon cuit (temps de rétention entre 30 et 40 min). Cette dégradation sélective lors de la chauffe pourrait bien constituer un bon traceur de cuisson.

Malheureusement l'interprétation du chromatogramme de l'échantillon fossile n'est pas si évidente : on notera ainsi la présence de nouveaux pics, absents des échantillons actuels (molécules modifiées par la diagénèse ?), entre 105 et 115 min. On détecte cependant la présence du pic des molécules à fort encombrement stérique/très fonctionnalisées qui auraient dû disparaitre lors de la chauffe (ainsi que l'absence du pic correspondant aux molécules petites/moins fonctionnalisées qui devraient résulter de la déstabilisation des précédentes) :

Les résultats de ces études préliminaires semblent donc indiquer que ces patelles fossiles (malheureusement pour nos archéologues) aient été consommées crues.

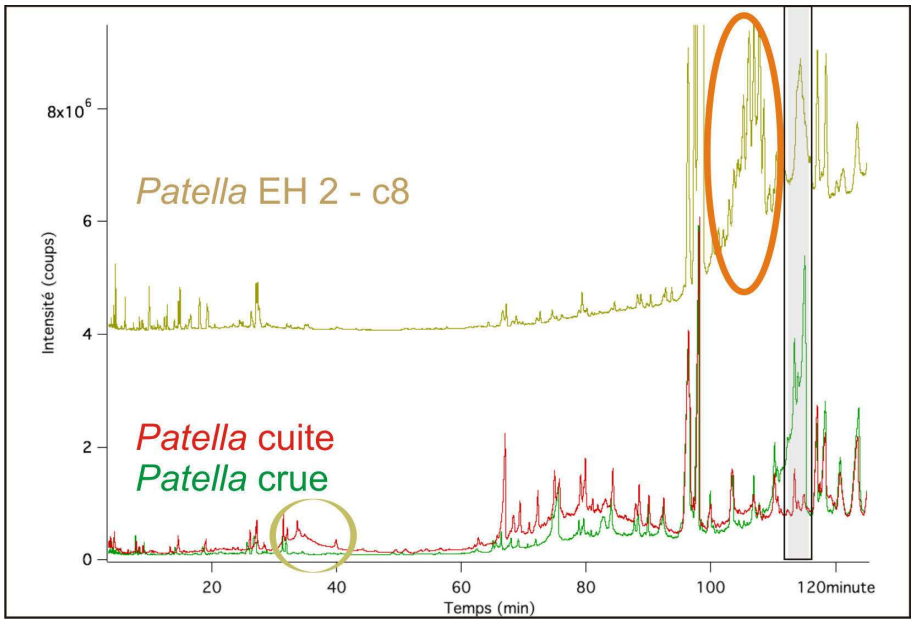


FIGURE 62 – Test de cuisson - Chromatographie en phase gazeuse des fractions lipidiques issues de coquilles de *Patella sp.* fossile (Couche 8, grotte El Harhoura 2), et de coquilles de *Patella vulgata* actuelles cuites ou non au feu de bois.

3.2 *Velates perversus* (˜ 50 Ma, Mercin-et-Vaux, France)

3.2.1 Contexte

Faisant partie de la famille des Neritidae, le genre *Velates* est aujourd'hui éteint : son extension stratigraphique s'étend du Paléocène moyen (Thanétien) jusqu'à l'Éocène supérieur (Priabonien), mais certaines identifications controversées pourraient la prolonger jusqu'à l'Oligocène moyen, ce qui lui confèrerait ainsi l'une des longévités les plus importantes (25 Ma) constatées chez un Prosobranche (Plaziat, 2012). Son extension géographique est de même considérable pour une espèce benthique : réputé caractéristique des peuplements de mers chaudes de type téthysien, on en trouve des spécimens de la Californie à Java, en passant par l'Europe et le domaine himalayen.

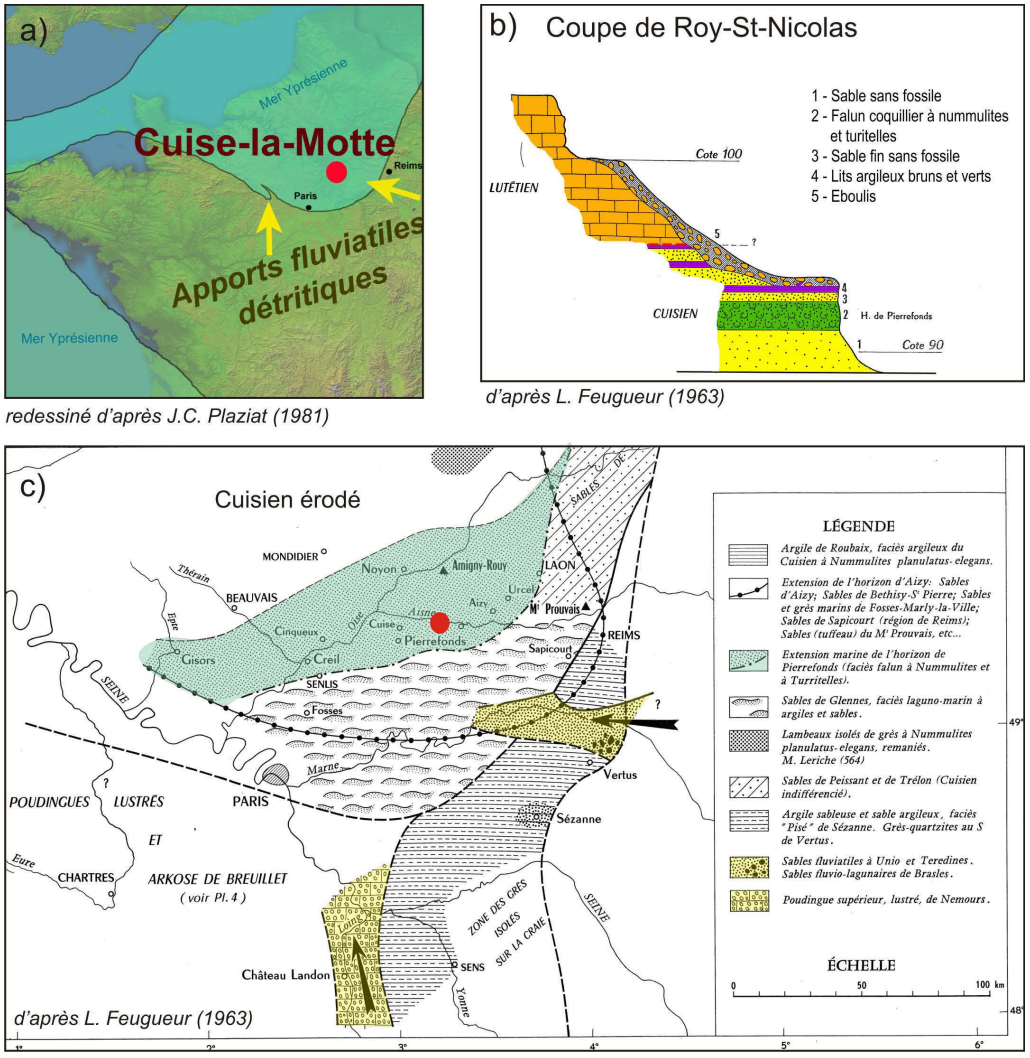


FIGURE 63 – Contexte du gisement de *Velates perversus* (faluns de Pierrefonds). a) Carte du bassin de Paris lors du maximum de la transgression marine du Cuisien moyen et localisation du stratotype du Cuisien (Cuise-la-Motte), d'après Plaziat (1981). Les directions des apports fluviatiles majeurs sont indiquées d'une flèche. b) Un exemple de stratigraphie de l'Yprésien-Lutétien Soissonnais : coupe de la carrière de Roy-St-Nicolas (horizon de Pierrefonds en vert), d'après Feugueur (1963). c) Paléogéographie de l'Yprésien Supérieur : Cuisien supérieur (horizon d'Aizy) et inférieur (horizon de Pierrefonds - en vert), d'après Feugueur (1963). En jaunes les dépôts fluviatiles détritiques.

Le grand *Velates* de l'Yprésien du bassin de Paris est le représentant le plus célèbre (et l'espèce-type) du genre, connu depuis plus de 200 ans, mais ayant changé de dénomination à de multiples reprises : *Nerita schmideliana* (Chemnitz *et al.*, 1788), *Nerita perversa* (Gmelin, 1788), *Nerita conoidea* (Lamarck, 1804), avant que De Montfort (1810) ne lui attribue un genre propre, *Velates*. La taxonomie des espèces est extrêmement confuse, ce même taxon (à l'origine formant un genre monospécifique) étant alternativement nommé *V. schmidtdeli, V. schmiedeli, V. schmidelianus* (Cossmann et Pissarro, 1910-1913) ou *V. perversus* (s'y sont par la suite ajoutés des taxons appartenant à des espèces différentes, changeant allègrement de dénomination et d'espèce...) *:* nous reprendrons dans cette étude l'appellation *V. perversus* communément acceptée pour ce taxon.

Les spécimens proviennent de l'Est du bassin parisien (Mercin-et-Vaux, Aisne) ; ils sont issus des faluns de Pierrefonds que l'on peut trouver dans les sables du Cuisien (53-49 Ma). Ce site se trouvait, au cours de la transgression marine du Cuisien moyen, situé à proximité de la côte, au large de l'embouchure probable d'un système fluviatile important (Figure 63a). L'horizon de Pierrefonds (˜1 m d'épaisseur), sableux avec une forte composante argileuse, y présente une macrofaune abondante (notamment en Nummulites et Turritelles, mais aussi en *Velates perversus*) et particulièrement bien préservée : il se distingue d'ailleurs très aisément des sables cuisiens des niveaux supérieurs et inférieurs, peu fossilifères.

L'état de préservation des coquilles, assez exceptionnel, peut être en partie expliqué par le contexte géologique. Comme l'illustre cette coupe réalisée non loin du lieu de collecte (d'après Feugueur (1963), figure 63b), la présence d'inter-lits argileux en alternance avec les bancs sableux (eux aussi fortement argileux) a pu permettre de préserver localement certains faciès des eaux d'infiltration. Ces dernières doivent de plus, avant d'atteindre les sables du Cuisien, percoler à travers une épaisseur importante de calcaires blancs, déposée au cours de la transgression marine lutétienne : elles sont ainsi tamponnées par l'encaissant avec d'atteindre les niveaux fossilifères, préservant ces derniers de phénomènes de dissolution majeurs.

Plusieurs indices tendent de plus à faire soupçonner un enfouissement assez rapide des coquilles : la présence d'un granoclassement au sein de l'horizon de Pierrefonds, associé à des traces d'usure typiques sur une grande partie des coquilles, laissent supposer la déstabilisation suivie du transport des sédiments formant initialement le dépôt coquillifère. Ces processus rapides sont favorisés par les apports détritiques importants que l'on est en droit d'attendre à l'embouchure d'un fleuve, dont la présence est par ailleurs attestée par le dépôt synchrone de sédiments fluviatiles au sud et à l'est du bassin (sables fluvio-lagunaires, poudingues, etc. figure 63c). Cet enfouissement rapide aurait ainsi préservé les coquilles des effets de diagénèse précoce, qui altèrent rapidement les coquilles abandonnées sur le fond marin après la mort de l'animal.

3.2.2 Morphologie et Microstructure

Les coquilles des *Velates* sont caractéristiques de par leur forme "patelliforme" (en cône aplati), et la présence d'un cal qui couvre la face interne du dernier tour de spire formant la base de la coquille et leur enroulement (Figure 64a), dont la direction varie au cours de l'ontogénèse (Woodward, 1892). La surface externe n'est pas ornementée.

Les coquilles issues du gisement de Mercin-et-Vaux possèdent encore toutes leur couche externe calcitique, caractéristique des Neritacea (Suzuki *et al.*, 1991), très fine et de plus vernissée chez *Velates* (Figure 64b-c) ; la couche interne est, elle, toujours aragonitique (Figure 64d).

Les processus de remobilisation (cf section 1.1.4 page 21) sont particulièrement développés chez ce taxon, ce qui complexifie l'architecture de la coquille : dans les coquilles adultes, la columelle a par exemple pratiquement disparu, remplacée par un pilier néoformé (Plaziat, 2012). Pour nous affranchir de cette complexité, et par souci de comparaison directe avec *Nerita* (cf Chapitre 1), nous limiterons les observations à la bordure externe du péristome (Figure 64e).

Cette dernière est parfois incomplète (Figure 64a,c), souvent fracturée (Figure 64f). On observe par endroits des recristallisations importantes sur sa face interne (Figure 64f) mais, dans l'ensemble, on voit toujours affleurer à fine échelle les motifs transverses des lamelles de 1er ordre de la microstructure lamellaire-croisée (toujours aragonitique), qui constituent la couche interne (Figure 64g). Une simple surface polie d'une section radiale (Figure 64h) permet de révéler les striations de croissance dans les couches interne et externe, et les lamelles de 1er ordre formant l'épaisseur de la couche interne (Figure 64i).

Un premier effet de l'altération diagénétique est déjà visible à l'œil nu sur cette section radiale : des lentilles blanchâtres sont apparentes dans l'épaisseur de la couche interne (Figure 64h), d'aspect crayeux, alors que la partie la plus proche de la surface interne semble à première vue bien mieux préservée (Figure 64j).

Les observations en LPA (Figure 65a) et en fluorescence (Figure 65b) révèlent une bonne conservation des microstructures des deux couches, ainsi que de la striation de croissance, notamment très visible en fluorescence dans la couche externe (Figure 65b) ; les fibres constituant cette dernière (là encore, nous préférons cette appellation à celle de "prismatique", telle qu'est décrite la couche externe des Neritidae dans la littérature - Bøggild, 1930) sont radiaires (Figure 65c-d) et semblent à première vue parfaitement conservées (Figure 65e). De même pour la structure lamellaire-croisée de la couche interne : on reconnait aisément l'alternance d'orientations des lits du 2e ordre entre lamelles du 1er ordre (Figure 65f), et les unités de 3e ordre individuelles (Figure 65g), continues à travers des incréments de croissance successifs (Figure 65h). Les incréments de croissance sont encore bien marqués, même en LPNA (Figure 65i-j).

Les incréments de croissance majeurs des coquilles des *Velates* (Figure 64e) fournissent l'occasion d'une observation particulièrement intéressante concernant les mécanismes de biominéralisation. Ces accidents sont en effet les marques de phases de retrait partiel du manteau, au cours desquelles la limite entre parties sécrétant les couches calcitique et aragonitique recule (le manteau sécrète alors de la calcite au dessus de l'aragonite, comme illustré figure 65k). C'est en fait toute la série de cellules hautement spécialisées (que l'on a pu mettre en évidence dans le cas de la nérite, section 1.2.4 page 40) qui recule, et ce sur toute la surface de minéralisation le long de la strie de croissance correspondante. Ce retrait (pourtant la marque d'une discontinuité de sécrétion) n'affecte pas, en amont, la continuité des unités de 1er ordre, qui se prolongent à travers cette strie de croissance (Figure 65l) - alors que celles-ci sont sécrétées par des zones différentes du manteau. En aval, cependant, la structure de l'une des lamelles de 1er ordre est perturbée lorsque le manteau prograde de nouveau (Figure 65m) : il n'est alors capable de prolonger qu'une seule des deux limites de la lamelle, la seconde étant masquée par la calcite déposée à l'occasion du retrait (Figure 65m), et cette unité s'étend ainsi latéralement sur plusieurs centaines de microns (Figure 65l). Cet exemple illustre le rôle fondamental des enveloppes entre unités de 1er ordre, comme délimiteurs latéraux des unités structurales.

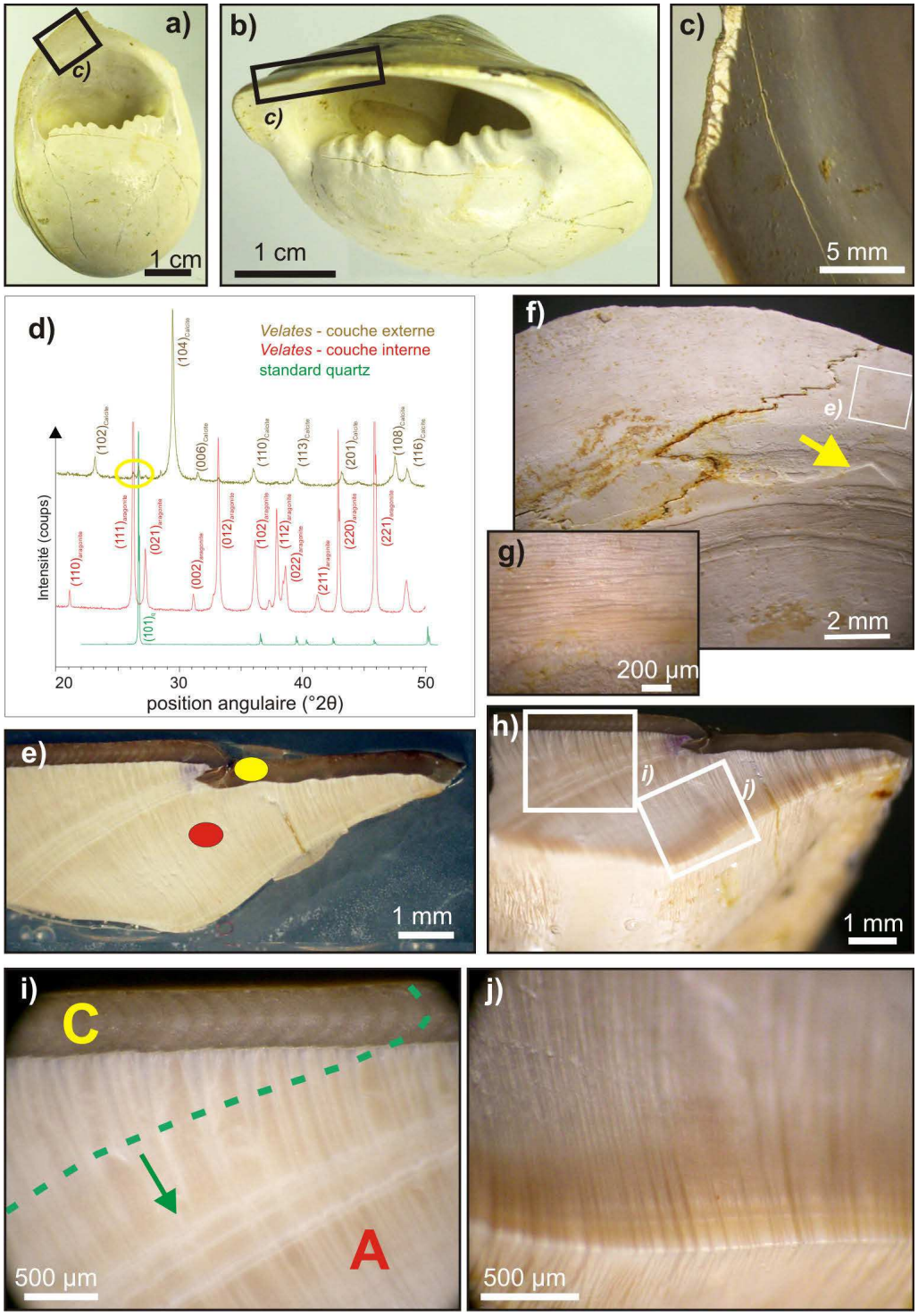


FIGURE 64 – État apparent d'une coquille de *Velates perversus* (Mercin-et Vaux, Cuisien). a) Vue ventrale. b) Vue de l'ouverture. c) Cassure radiale proche de la bordure de croissance. d) Diffractogrammes RX des couches externes (calcite) et internes (aragonite). Des traces de quartz sont détectées dans la couche externe. e) Section radiale polie de la bordure de croissance au péristome de la coquille. f) Surface de la couche interne du péristome. La flèche marque une figure de recristallisation (facettes d'un cristal idiomorphe) sur la surface interne. g) Affleurement des lamelles de 1er ordre transverses sur la surface de croissance. h) Section radiale polie de la bordure de croissance au péristome. Une zone blanchâtre d'aspect crayeux est visible au cœur de la couche interne. i) Transition entre les couches calcitiques (C) et aragonitique (A), et striation de croissance (ligne verte discontinue). j) Zone "indurée" sur une petite épaisseur à partir de la surface interne, et zone d'aspect crayeux dans l'épaisseur de la couche interne.

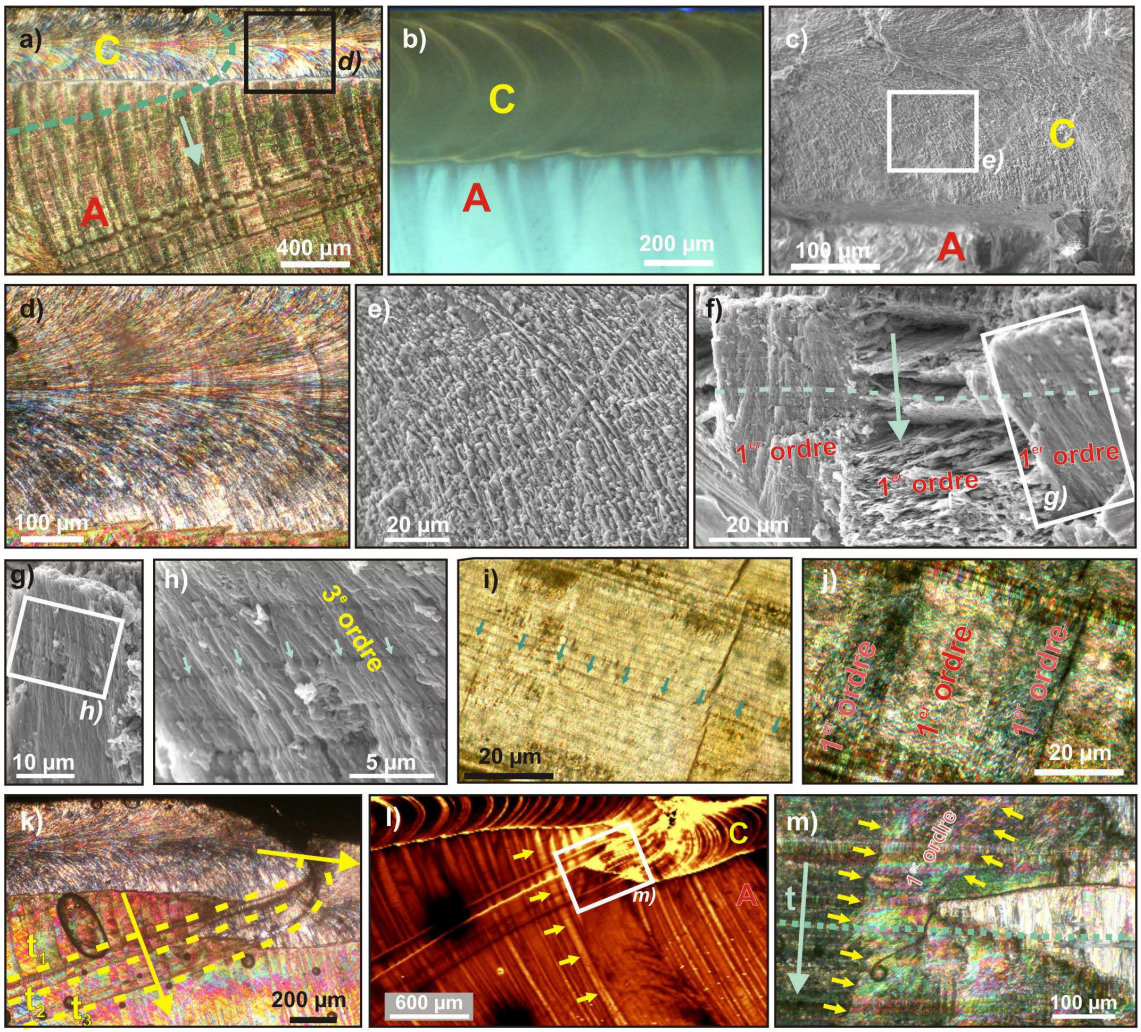


FIGURE 65 – Microstructure d'une coquille de *Velates perversus* (Mercin-et Vaux, Cuisien). a) Lame mince fine en LPA de la transition entre les couches calcitiques (C) et aragonitique (A), et striation de croissance (ligne verte discontinue). b-c) Images en microscopie d'épifluorescence (b) et MEB (c) (cassure fraiche non traitée) de la transition. d-e) Vues en lame mince (LPA) (d) et MEB (e) des fibres radiaires calcitiques constituant la couche externe. f) Vue MEB (cassure fraiche non traitée) de l'alternance d'orientation entre lamelles de 1er ordre constituant la couche interne à proximité de la transition. g-h) Zooms montrant les unités de 3e ordre continues à travers plusieurs incréments de croissance (flèches vertes). i-j) Vues LPNA (i) et LPA (j) en lame mince des lamelles de 1er ordre et de la striation de croissance (flèches vertes). k-m) Retrait du manteau. k) Lame mince fine en LPA. Les flèches marquent les directions d'allongement et d'épaississement de la coquille. Les lignes pointillées marquent les positions successives du manteau. l) Carte confocal Raman de fluorescence (distribution de l'intensité de bruit de fond entre 2400 et 2500 cm^{-1}). Les flèches jaunes marquent une lamelle de 1er ordre continue malgré le retrait du manteau. m) Lame mince fine en LPA. Les flèches marquent les deux limites d'une unité de 1er ordre, la première continue, la seconde s'arrêtant au moment du retrait du manteau.

3.2.3 Évolution diagénétique

Les observations MEB d'une surface polie confirment une forte porosité au sein des lentilles d'apparence "crayeuses" et blanchâtres à l'œil nu (Figure 66a-c). La transition est d'ailleurs assez rapide entre les zones altérées et les zones apparemment plus indurées, proches de la surface interne (Figure 66d). En lames minces, dans cette zone indurée, on distingue nettement une deuxième phase minérale recristallisée entre les lamelles de 1er ordre en LPA (Figure 66e). Si aucune lame mince n'a pu être effectuée dans la zone poreuse (trop fragile), à proximité de celle-ci, on peut tout de même discerner que ces recristallisations ne sont plus tout à fait continues (Figure 66f).

En effet, la zone "crayeuse" correspond à une porosité, qui est localisée entre les lamelles de 1er ordre : celle-ci résulte probablement de la disparition des enveloppes (ou "patchworks") discontinues séparant les unités de 1er ordre dans la microstructure lamellaire-croisée (cf section 2.1). Cette porosité est localement comblée par des cristaux néoformés, discontinus dans la zone crayeuse et présentant des morphologies anguleuses et des facettes cristallines (Figure 66g) ; l'utilisation de la microscopie confocale Raman confirme par ailleurs leur minéralogie aragonitique (Figure 66h). Dans les zones indurées, qui étaient en apparence mieux préservées à proximité de la surface interne, ces recristallisations existent toujours : elles ont simplement comblé l'intégralité de la porosité pré-existante et sont connectées (Figure 66i-l).

Ces observations suggèrent ainsi un mécanisme en deux phases : 1/une phase de dissolution des bordures des lamelles de 1er ordre, à la suite de la disparition des enveloppes organiques entre les lamelles : celle-ci a alors libéré un espace préférentiel pour la circulation de fluides (légèrement acides), qui ont ainsi pu creuser une porosité dans l'épaisseur de la couche lamellaire-croisée. 2/la recristallisation d'une seconde phase aragonitique néoformée dans la porosité créée précédemment, qui a comblé intégralement cette dernière à proximité de la surface interne, mais qui a laissé une porosité résiduelle dans les zones les plus centrales.

D'autres traces de recristallisations sont par ailleurs visibles :

- au niveau de la zone de transition entre couches interne et externe (Figure 66m), d'où des flammèches de recristallisations partent et se propagent entre les unités de 1er ordre.
- dans certaines porosités importantes dans la couche externe (Figure 66n).

Une coloration de Feigl confirme par ailleurs les mesures RX : il n'y a pas de traces de calcite dans la couche interne (ni d'aragonite dans la couche externe) (Figure 66o-p).

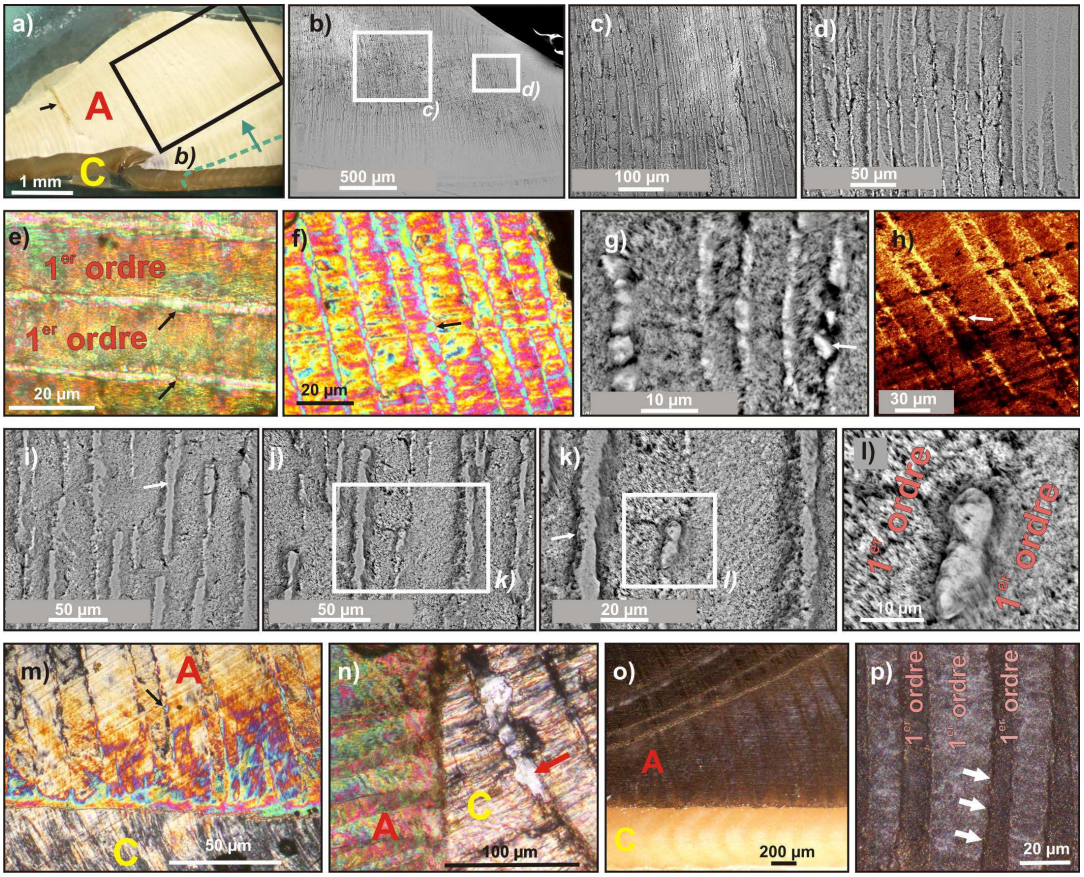


FIGURE 66 – *Velates perversus* (Mercin-et Vaux, Cuisien) - effet de diagénèse. a) Section radiale polie du péristome. b-d) Vue MEB (surface polie non traitée) de (a). b-c) Porosité de la zone crayeuse. d) Disparition de la porosité, latéralement, à proximité de la surface interne. e-f) Lame mince fine en LPA des lamelles de 1er ordre en bordure de la zone crayeuse. Les flèches marquent une seconde phase recristallisée (couleur de polarisation uniforme) entre les lamelles de 1er ordre. g) Vue MEB des cristaux cristallisés dans la porosité résiduelle entre les lamelles de 1er ordre dans la zone crayeuse. La flèche indique des cristaux isolés présentant des facettes anguleuses. h) Carte confocale Raman de distribution de l'intensité du pic de libration L de l'aragonite (206 cm^{-1}), confirmant la nature aragonitique de la phase recristallisée dans la porosité. i-l) Vues MEB des recristallisations en dehors de la zone crayeuse, qui comblent presque intégralement la porosité entre les lamelles de 1er ordre (l). m) Flammèches de recristallisation de la zone de transition entre couches calcitique (C) et aragonitique (A) (se propageant ente les lamelles de 1er ordre). n) Une recristallisation massive dans la calcite. o-p) Coloration Feigl, confirmant à petite échelle la nature toujours aragonitique de la couche interne.

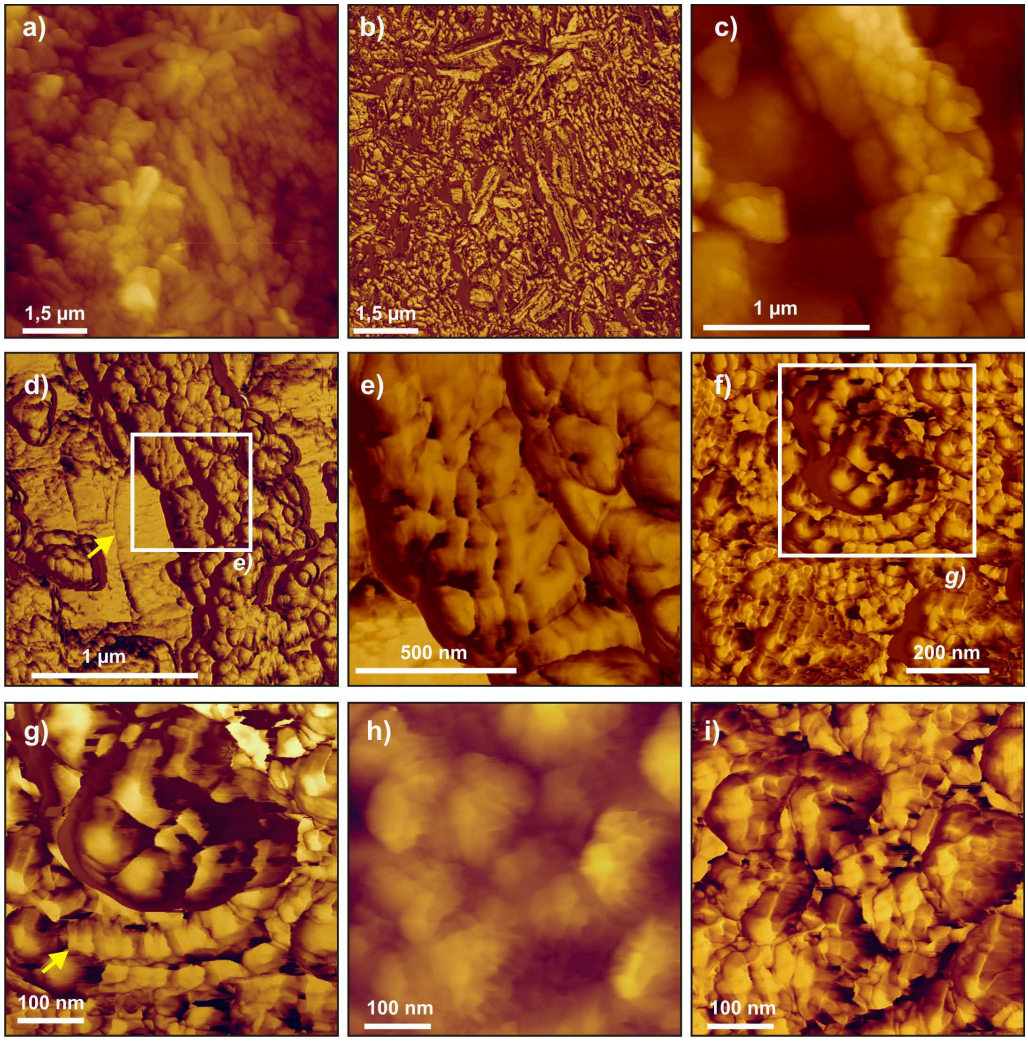


FIGURE 67 – Diagénèse à l'échelle sub-micrométrique dans une coquille de *Velates perversus* (Mercin-et Vaux, Cuisien). a-e) Images AFM (mode tapping) de la couche interne lamellaire-croisée. a-b) Images de topographie (a) et de phase (b) des cristaux de recristallisation au contact entre deux lamelles de 1er ordre. c-e) Images de topographie c) et de phase (d-) des cristaux de recristallisation de remplissage présentant des faces de croissances anguleuses (flèche). e) Zoom sur une zone où les sous-unités granulaires ont été préservées. f-i) Images AFM (mode tapping) de la couche externe calcitique. f-g) Images de phase d'une zone partiellement préservée, présentant des sous-unités granulaires préservées (g), au contact de très petits cristaux de recristallisation idiomorphes. h-i) Images de topographie (h) et de phase (i) d'une zone recristallisée, présentant des cristaux à facettes et arêtes.

A l'échelle sub-micrométrique, on observe bien dans la couche lamellaire-croisée interne les cristaux d'aragonite néoformés décrits précédemment : ils comblent la porosité de façon désordonnée (Figure 67a-b) et présentent une morphologie de cristaux de remplissage avec des facettes idiomorphes (Figure 67c-d). Au contact de cette phase néoformée, on retrouve néanmoins le motif typique des sous-unités granulaires ovoïdes qui constituent encore les unités de 3e ordre (Figure 67e).

On trouve aussi par endroits, dans la couche externe calcitique, des ilots où la composition granulaire des fibres (que l'on avait pu établir dans la couche externe d'une coquille actuelle de *Nerita*, cf figure 29a-d) est préservée (Figure 67f-g). Au contact immédiat des granules, toutefois, on observe des sous-unités à facettes idiomorphes (Figure 67g), de très petites dimensions ($<$ 100

nm) : celles-ci forment en fait la majeure partie de la surface de l'échantillon observée, qui présente ainsi à l'AFM un relief constitué de facettes et d'arêtes cristallines (Figure 67h-i).

Ces coquilles de *Velates perversus* (Mercin-et-Vaux), malgré leur bon état de préservation apparent, présentent néanmoins des transformations diagénétiques importantes à l'échelle microstructurale.

On notera principalement deux phases diagénétiques distinctes :
1/ la formation d'une porosité entre lamelles de 1er ordre lors d'une phase de dissolution
2/ le remplissage (partiel ou non) de cette porosité par une phase minérale néoformée.

La disparition des enveloppes entre les unités de 1er ordre a probablement précédé, et favorisé, cette dissolution préférentielle au niveau des bordures des lamelles de 1er ordre.

Le résultat de cette diagénèse n'est pas, apriori, intuitif : on notera ainsi que la microstructure à proximité de la surface interne, qui semblait à l'œil mieux préservée, est en réalité celle contenant une plus grande quantité de cristaux néoformés, alors que les lentilles "crayeuses" blanchâtres situées dans l'épaisseur de la couche sont restées les moins affectées par la phase de recristallisation (la cimentation de la porosité n'a pu atteindre le cœur de la couche).

A échelle sub-micrométrique, on retrouve dans les deux couches interne et externe des traces des sous-unités granulaires composant à l'origine leurs microstructures respectives. On notera cependant la recristallisation, à très fine échelle mais néanmoins importante, de la couche calcitique : or celle-ci s'est effectuée tout en conservant parfaitement la microstructure fibrillaire de la couche externe.
Ce point souligne la nécessité d'une caractérisation à fine échelle (ici sub-micrométrique) des motifs structuraux, si l'on veut caractériser correctement l'état diagénétique d'une coquille de mollusque.

Encore moins intuitif, ces deux recristallisations (à échelle 1/microscopique dans la couche interne, 2/sub-micrométrique dans la couche externe) se sont effectuées sans changement de polymorphe : cimentation d'aragonite dans le lamellaire croisée aragonitique, et recristallisation en calcite des fibres calcitiques. Ce dernier point illustre la complexité des mécanismes diagénétiques, intimement liés au comportement de la phase organique, et les difficultés de leurs diagnostics : la seule détermination polymorphique des couches interne et externe - un critère pourtant courant d'évaluation de l'état diagénétique (Weiner, 2010) - aurait ici conclu à la parfaite conservation de la phase minérale de la coquille, et par conséquent à son excellent état de conservation.

3.2.4 Caractérisations biochimiques

FT-IR

La phase organique semble mal préservée dans la couche interne lamellaire-croisée des coquilles de *Velates perversus* (Mercin-et-Vaux). En spectroscopie FT-IR sur poudre, on ne distingue ainsi pratiquement pas d'autres bandes que celles de l'aragonite à ˜1471 cm^{-1} (ν_3), 858-844 cm^{-1} (ν_2) et 713-700cm^{-1} (ν_4) (Figure 68a) : les bandes amides, en particulier, semblent avoir disparu à part, peut-être, une bande amide II au pied de la bande ν_3 de l'aragonite (Figure 68c). On devine peut-être aussi de faibles bandes -CH (Figure 68b).

Etant donné le petit nombre de coquilles à disposition, et des faibles quantités de matériel organique qui semblent préservées dans leurs couches internes, nous n'avons pas tenté ici d'extractions organiques spécifiques ni de caractérisations chromatographiques plus poussées.

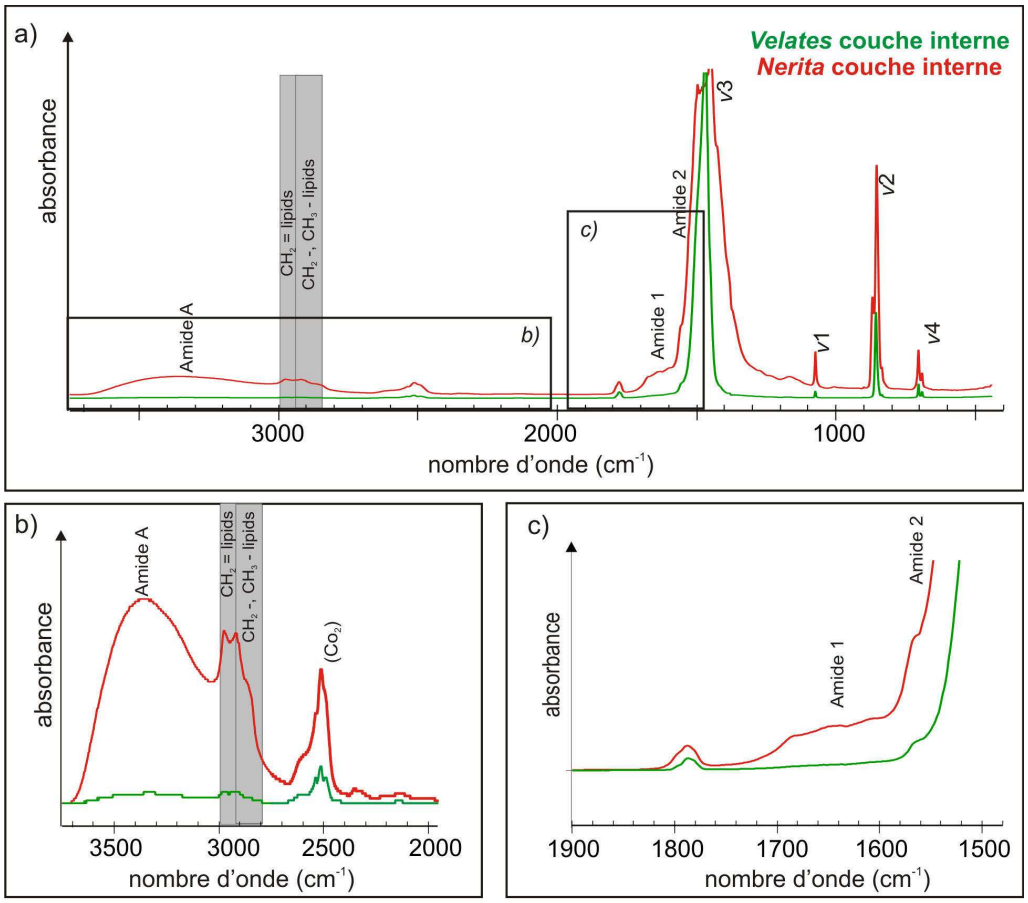


FIGURE 68 – Spectroscopie FT-IR sur poudres issues des couches lamellaires-croisées de coquilles de *Velates perversus* et *Nerita sp.* a) Spectres totaux. b) Zoom sur la gamme des pics correspondant aux vibrations des groupements amide A et -CH. c) Zoom sur la gamme des pics correspondant aux vibrations des groupements amide I et II.

Microscopie confocale Raman

Nous avons malgré tout tenté quelques investigations en microscopie confocale Raman, beaucoup moins vorace en matériel. Les premières observations confirment les compositions uniquement calcitique et aragonitique des couches externe et interne, ainsi que la présence d'une couche de transition, aragonitique mais d'orientation homogène (Figure 69a-b), exactement comparable à celle que l'on observe chez *Nerita* (cf chapitre I). Mais on retrouve en outre, là encore de façon parfaite-

ment comparable aux coquilles de *Nerita*, une fine zone enrichie en composés organiques (bandes organiques non-identifiées entre 3700 cm^{-1} et 3900 cm^{-1}, figure 69c) entre les deux couches ; la superposition avec les cartes précédentes permet de préciser sa position exacte, dans la couche externe à proximité immédiate de la limite calcite/aragonite (Figure 69d). Et là encore, comme pour *Nerita*, cette couche présente une fluorescence marquée (Figure 69e).

La diagénèse de la phase organique contenue dans les coquilles de *Velates perversus* issues du gisement de Mercin-et-Vaux est donc importante. Mais si la majorité des composés organiques initialement présents dans la couche lamellaire croisée interne semble avoir disparue, nous pouvons néanmoins mettre en évidence la présence de composés organiques préservés in-situ dans la couche calcitique externe, juste avant la transition calcite → aragonite.

Note : il existe une très faible variation de fluorescence entre unités de 1er ordre jointives, qui n'est pas sans rappeler les compositions organiques, qui semblaient spécifiques une lamelle de 1er ordre sur deux dans une coquille de *Nerita undata* actuelle (Figure 16e-g) : cette dernière n'est ici visible qu'en contrastant très fortement la carte de fluorescence (Figure 69f) au sein des lamelles de 1er ordre.

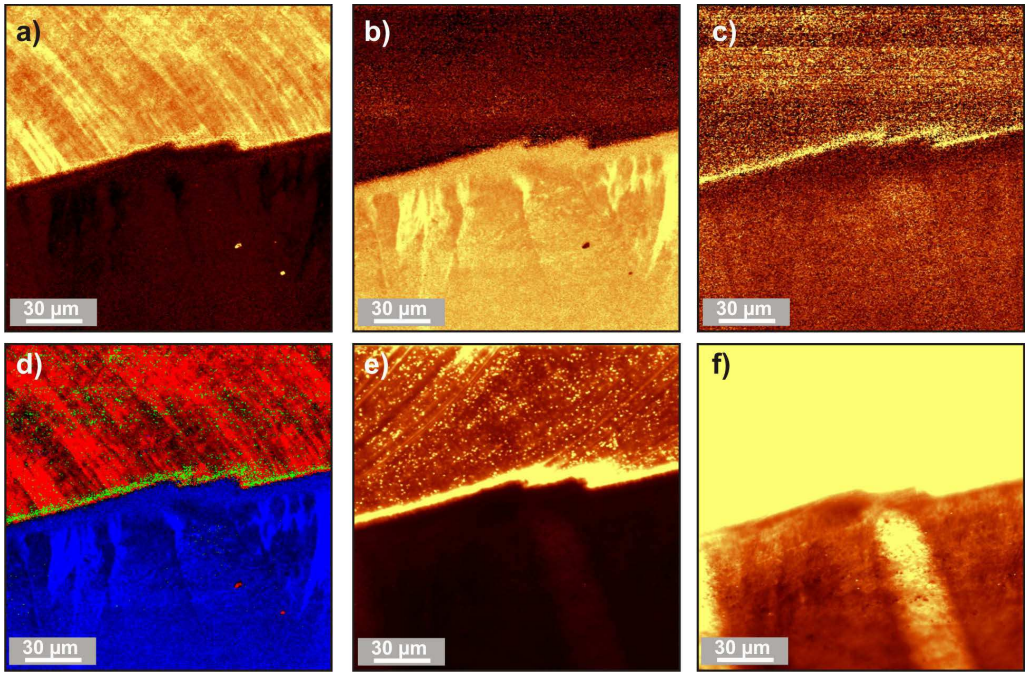


FIGURE 69 – Microspectroscopie Raman à la transition entre couches interne et externe d'une coquille de *Velates perversus* (Mercin-et Vaux, Cuisien). a) Carte de distribution du ratio des pics L_c (mode libration, 282 cm^{-1}) / ν_1 (élongation symétrique en mode interne, 1085 cm^{-1}) de la calcite. b) Carte de distribution du ratio des pics T_a (mode translation, 152 cm^{-1}) / L_a (mode libration, 206 cm^{-1}) de l'aragonite. c) Carte de distribution des bandes comprises entre 3700 cm^{-1} et 3900 cm^{-1} (bandes organiques). d) Carte composite en fausses couleurs de (a) (rouge) (b) (bleue) et (c) (verte) montrant la localisation des composés organiques résiduels par rapport à la microstructure. e) Carte fluorescence (distribution de l'intensité de bruit de fond entre 2400 et 2500 cm^{-1}) montrant la forte fluorescence de la zone enrichie en bandes organiques (c). f) Même carte que (e) très fortement contrastée, révélant l'alternance les lamelles de 1er ordre en intensités de fluorescence.

3.3 Diagénèse des microstructures entrecroisées

Ces deux cas, *Patella* et *Velates,* présentent des microstructures entrecroisées relativement bien préservées, dont l'architecture est parfaitement reconnaissable : les morphologies et orientations cristallographiques des unités microstructurales sont en effet conservées jusqu'aux unités microstructurales de 3e ordre.

Cette relative bonne conservation de la phase minérale, du moins en première approche, est à mettre en corrélation avec le contexte géologique des gisements. Dans les deux cas, on soupçonne un transport suivi d'un enfouissement rapide, dans des sables à forte composante argileuse. La présence d'un encaissant carbonaté est aussi un facteur commun : les *Patella sp.*, qui ne présentent pas de traces de dissolution, sont en effet enfouies directement dans une grotte creusée sous une barre calcarénite, qui tamponne ainsi les eaux de percolation avant que celles-ci n'atteignent et dissolvent les coquilles. Dans le cas des *Velates perversus*, il faut attendre quelques millions d'années avant que la formation cuisienne ne soit chapeautée par les calcaires blancs issus de la transgression lutétienne, à qui l'on peut prêter un rôle très similaire. Ce délai peut expliquer une première phase de dissolution, affectant préférentiellement les bordures des unités de 1er ordre des couches internes des coquilles ; mais une fois en présence de cet encaissant carbonaté, les eaux d'infiltrations, alors tamponnées, auraient dans un second temps favorisé une phase de cimentation de cette porosité initialement créée.

Un tel contexte, s'il est plutôt favorable à la conservation de la phase minérale, semble cependant peu propice à la préservation de la phase organique, qui subit une diagénèse différentielle, perceptible même dans les coquilles de *Patella sp.*, et plus avancée dans les coquilles plus âgées de *Velates perversus.*

On retrouve cependant à chaque fois des molécules organiques, qui semblent préservées, ou du moins assez peu altérées, in-situ.

Mais dans les deux cas, les mécanismes de dissolution et/ou recristallisation de la phase minérale semblent s'effectuer corrélativement à la disparition des enveloppes (ou patchworks) organiques qui séparent les unités des microstructures entrecroisées : celles-ci semblent donc jouer un rôle majeur, aussi, dans les modalités de préservation de ces types microstructuraux lors des processus d'altérations.

Il faut aussi souligner que les recristallisations observées s'effectuent à chaque fois dans le même polymorphe de carbonate de calcium que celui composant initialement la couche incriminée. Très logique dans le cas des couches foliées croisées de *Patella sp.* et fibrillaires de *Velates perversus* (la calcite abiotique étant un polymorphe stable dans les CNTP, c'est la phase de recristallisation naturellement attendue), les recristallisations en aragonite n'en restent pas moins contre-intuitives, sinon surprenantes, dans la couche lamellaire-croisée de *Velates perversus* : celui-ci présentera au final deux couches, toutes deux recristallisées, mais chacune dans son polymorphe d'origine.... Nous pouvons ainsi confirmer les conclusions de Guzman *et al.* (2008) : la seule conservation du polymorphe cristallin, si elle est effectivement un critère nécessaire au diagnostic de l'état diagénétique, est très loin d'être suffisante.

La conservation des sous-unités granulaires ovoïdes semble, en revanche, constituer un bon moyen de diagnostic de l'état de préservation des différentes couches de coquilles : c'est d'ailleurs le seul critère nous ayant permis de détecter la recristallisation, pourtant importante, de la couche externe des coquilles de *Velates perversus.*

Comparaison avec les données de la littérature

La conservation des couches aragonitiques est surprenante : métastable sous toutes les pressions que l'on peut s'attendre à rencontrer lors de la formation/diagenèse des roches sédimentaires, l'aragonite devrait en effet être remplacée par la calcite au cours de la diagénèse des coquilles, soit par dissolution/recristallisation, soit par transformation directe, à une échéance variant de 100 ka à quelques Ma (Brown *et al.*, 1962).

Pourtant, cette stabilitié de l'aragonite biogénique n'est pas inhabituelle : nombre de fossiles biocarbonatés, parfois anciens, a conservé leurs tests aragonitiques (exemple d'une distribution stratigraphique de fossiles aragonitiques par Hall et Kennedy, 1967). La bonne conservation de l'aragonite dans certains fossiles semble étroitement liée à la nature de l'encaissant (notamment, à la présence d'argiles), mais pas uniquement : la matrice organique est fortement soupçonnée de jouer un rôle essentiel. D'après Hall et Kennedy (1967), c'est en l'isolant de tout contact avec des molécules d'eau, que les composés organiques enrobant la phase minérale pourraient ainsi limiter sa recristallisation. Il est intéressant de noter que la conservation de l'aragonite est souvent étroitement liée à la préservation de la phase organique : certains des plus vieux fossiles en aragonite, datant du Carbonifère, proviennent de schistes bitumeux, dont les conditions réductrices ont permis de préserver en partie de la matrice organique associée au minéral (Gregoire, 1959).

L'état de ces composés organiques n'est certainement pas anodin quant à la conservation (ou non) des bioaragonites. Certains composés sont assez bien préservés, pour pouvoir être caractérisés dans des fossiles assez anciens : Weiner *et al.* (1976), rapportent ainsi la présence de glycoprotéines fossiles dans une coquille de mollusque du Crétacé ; Cuif *et al.* (2008b) rapportent la présence de polysaccharides sulfatés dans des coraux du Trias. Mais ces molécules "fossiles" n'en sont pas pour autant intactes et sont souvent modifiées (Voss-Foucart, 1972), parfois très dégradées (Zhao *et al.*, 2004). Au delà de sa composition, la conformation morphologique de la matrice organique conservée doit aussi être prise en considération. Si l'hypothèse de Hall et Kennedy (1967) est correcte, l'état de préservation des membranes isolant les unités microstructurales joue un rôle crucial. Or celles-ci peuvent évoluer très différemment, selon les conditions de fossilisation, pour un même type microstructural. Iwata (1975) illustre ainsi l'évolution morphologique des membranes séparant les dalles de nacre dans plusieurs coquilles de mollusques fossiles (datant du Carbonifère au Pleistocène). Même si elles sont globalement conservées, celles-ci se sont réorganisées sous différentes formes dont les capacités isolantes seront très variables : 1/membranes fibrillaires perforées. 2/membranes compactes formées de granules agglutinés. 3/membranes devenues très fines, mais restées continues.

Un deuxième point, la cimentation de la porosité par une phase aragonitique néoformée que nous observons chez *Velates,* reste énigmatique. Un cas similaire est rapporté dans la littérature, où les membranes séparant les tablettes de nacre d'un mollusque fossile, *Acita divaricata* (Bivalvia) ont été remplacées par une aragonite secondaire (Hikida *et al.*, 1992). Même si les membranes séparant les tablettes de nacre sont continues et beaucoup plus épaisses que celles, discontinues, séparant les lamelles de 1er ordre dans le lamellaire croisé, ce deuxième exemple est très similaire à nos résultats et semble bien conforter l'existence d'un mécanisme diagénétique commun influant sur la sélection polymorphique lors de la cimentation (il est nommé "perminéralisation" par ces auteurs).

Des surcroissances par épitaxie peuvent peut être expliquer ce phénomène. Mais il n'est pas non plus exclu que certains composés organiques encore présents dans ces couches puissent induire la cristallisation en aragonite de cette phase secondaire (ou inhiber la cristallisation de calcite ?), dans un processus qui ne serait alors peut être pas si éloigné du mécanisme de contrôle du polymorphisme lors de la sécrétion des couches aragonitiques par l'animal - piste attrayante, mais qu'il reste à explorer.

Conclusions et Perspectives

Conclusions et perspectives

4.1 Conclusions

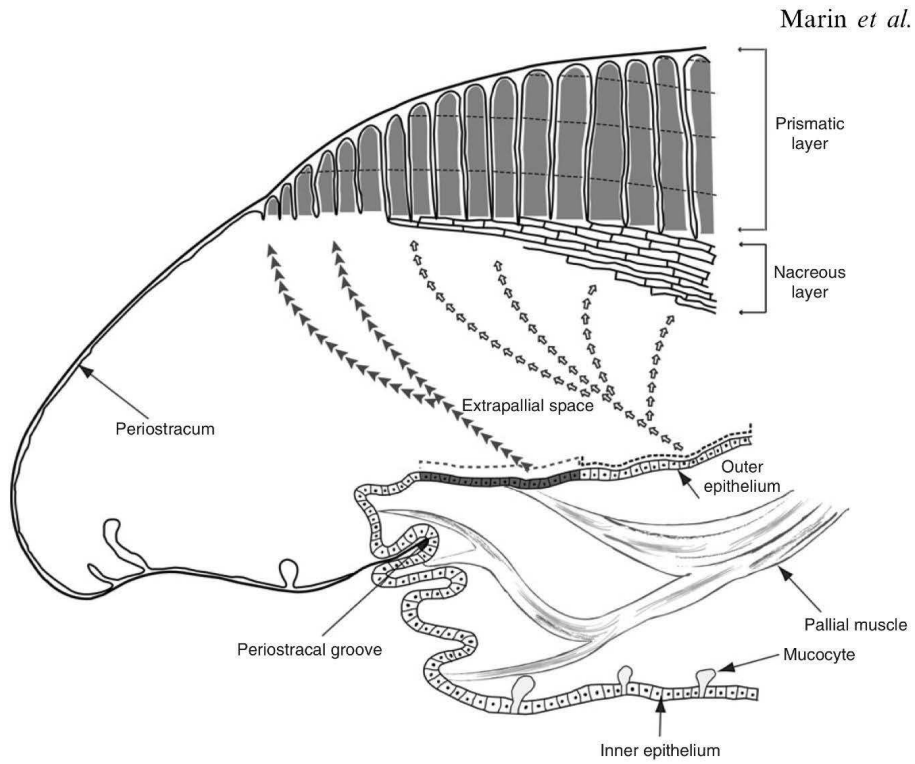
Nous avons illustré différents aspects du contrôle qu'exercent les mollusques sur la formation de leurs coquilles et que l'on retrouve, omniprésent, des échelles macroscopiques à sub-micrométriques. C'est à travers les assemblages moléculaires sécrétés par le tissu minéralisant que ce contrôle s'effectue : l'analyse des compositions et/ou répartitions de ces composés organiques, in-situ dans les différentes couches des coquilles auxquels ils sont incorporés, en relation avec l'organisation microstructurale et les propriétés cristallographiques de la phase minérale, nous a permis de dégager plusieurs résultats, interprétations ou hypothèses :

Spécialisation du manteau

La synthèse des caractérisations microstructurales couplées aux caractérisations biochimiques in-situ réalisées dans des coquilles de *Nerita* a permis de démontrer la forte spécialisation spatiale des cellules composant la bande minéralisante du manteau : celle-ci apparait ainsi segmentée en (au moins) six sections, chacune sécrétant de façon synchrone son propre assemblage de molécules organiques, qui induisent, in fine, la formation des couches / sous-couches de microstructures et compositions organiques très spécifiques. Ce métabolisme très spécialisé du manteau est rarement évoqué dans la littérature. Pour *Pinctada margaritifera*, les descriptions se résument souvent à une subdivision fonctionnelle de la bande minéralisante en deux parties, les cellules minéralisant les prismes, et celles minéralisant la nacre, et ce même dans les études fonctionnelles du métabolisme du manteau (Joubert *et al.*, 2010). Comme illustré section 1.2.1 (page 23), on peut pourtant montrer qu'il existe chez *Pinctada* une variation de l'activité sécrétrice à proximité de la transition entre les deux couches.

Ces résultats, qui permettent indirectement d'illustrer la complexité du métabolisme de cette zone du manteau, rendent bien compte de la nécessité de la réalisation de caractérisations biochimiques localisées, rendues possibles par les évolutions techniques de ces dernières années/décennies : aucune étude de la matrice organique extraite des coquilles, telle qu'on les trouve classiquement dans la littérature (Krampitz *et al.*, 1976; Samata *et al.*, 1980; Cuif *et al.*, 1989; Mann *et al.*, 2012), n'aurait en effet permis à elle seule de mettre en évidence cette organisation complexe de l'organe minéralisant.

Ces résultats se révèlent contradictoires avec une idée pourtant assez communément admise : celle d'une minéralisation qui aurait lieu au sein d'un fluide extrapalléal, contenu dans un espace extrapalléal de grande dimension. Cette notion est ancienne (Saleuddin et Petit, 1983), mais on la retrouve néanmoins régulièrement reprise dans les publications récentes (Marin *et al.*, 2007). Or, si l'on accepte cette hypothèse, comment expliquer que les différents assemblages de molécules organiques, sécrétées par des régions distinctes du manteau, puissent voyager à travers le fluide extrapalléal sur de grandes distances (ainsi qu'illustré par exemple figure 70), tout en contrôlant la minéralisation à des échelles micrométriques ? La zonation mise en évidence dans le manteau de *Nerita* implique au contraire que cet organe soit très proche, sinon au contact direct, de la coquille - les plus petites bandes individuelles présentant un métabolisme spécifique n'excèdent en effet pas plus d'une dizaine de microns de largeur, soit la largeur de quelques cellules à peine (Figure 26).



Physiology of the shell calcification in a nacro-prismatic bivalve, redrawn from Saleuddin and Petit (1983). The calcification takes place at the distal border of the shell in the extrapallial space. In the outer epithelium, the cells responsible for the deposition of nacre are not localized in the same area as the ones responsible for the secretion of prism precursors. The prisms and nacre tablets are not drawn to scale.

FIGURE 70 – La biominéralisation dans la chambre extrapalléale de *Pinctada*, d'après (Saleuddin et Petit, 1983), modifié par Marin *et al.* (2007).

Illustrée dès 1964 parWilbur, la notion d'un espace de minéralisation très fin commence enfin à être reprise dans la littérature récente (Volkmer, 2007 ou Nudelman *et al.*, 2008, en ce qui concerne l'espace extrapalléal des mollusques). Cette évolution des mentalités est encore plus flagrante dans le cas des coraux : les observations histologiques ou FESEM contredisent en effet les 10 µm d'épaisseur, considérés comme nécessaires par Adkins *et al.* (2003) pour modéliser l'effet vital, et réduisent celle-ci à une épaisseur largement sub-micrométrique (Clode et Marschall, 2002; Tambutté *et al.*, 2011; Rollion-Bard, 2011). Cette dernière devient alors compatible avec le niveau de contrôle à fine échelle mis en évidence.

Mécanismes de biocristallisation

Les mécanismes de biocristallisation restent encore en grande partie à élucider : nous ne prétendons en aucun cas présenter ici de "modèle" de "la" biominéralisation des structures entrecroisées. Par exemple, il est toujours impossible à l'heure actuelle de préciser, parmi les quelques centaines de molécules qui composent la phase organique, lesquelles sont véritablement impliquées dans les processus de biominéralisation. Les études récentes se focalisent sur le rôle des protéines, à cause notamment des dernières avancées techniques dans ce domaine (PCR, etc.), et sous-estiment ainsi très certainement le rôle potentiel joué par les sucres et les lipides, particulièrement peu étudiés.

Mais, parmi les différents concepts que l'on trouve dans la littérature (très souvent controversés)

certains sont plus que d'autres en accord avec nos résultats ; la plupart se basant essentiellement sur les coquilles présentant des couches nacro-prismatiques, il semble utile de préciser lesquels semblent compatibles avec les mécanismes identifiés dans les microstructures entrecroisées, afin de commencer à dégager ce qui pourrait constituer la base d'un mécanisme commun à tous types microstructuraux.

Certaines des théories avancées sont assez clairement incompatibles avec nos résultats : en particulier les modèles basés sur l'auto-assemblage de nano-blocs préexistants, qui pour leurs auteurs conduiraient à la formation de mésocristaux à plus grande échelle (Cölfen et Antonietti, 2008; Vielzeuf *et al.*, 2010; Floquet et Vielzeuf, 2011). Deux points, en particulier, attirent l'attention :

- Ce modèle impliquerait, lorsque l'on descend dans les échelles d'observation, de rencontrer à un moment ou à un autre des unités à facettes cristallographiques, correspondant à des "blocs" de construction de base. A aucun moment nous n'avons rencontré de telles unités, hormis dans les coquilles fossiles, où, justement, la présence de cristaux idiomorphes à facettes tend à démontrer une modification ultérieure de la structure biogénique initiale. Les sous-unités dont la coalescence forme les unités microstructurales entrecroisées (mais aussi fibreuses dans la couche externe de *Nerita*, prismatiques dans la couche externe de *Pinctada*, etc.) sont au contraire des composites organo-minéraux systématiquement ovoïdes, qui ne présentent jamais de facette cristallographique.
- Si les unités de 3e ordre étaient effectivement formées par l'agencement de sous-unités préalablement cristallisées, il faudrait alors expliquer comment la cohérence cristallographique peut se propager a postériori entre ces sous unités, telle qu'elle est révélée par la continuité des micromacles de croissance (110) au sein des unités de 3e ordre. La continuité des micromacles de croissance ne peut en effet se propager qu'au cours de la cristallisation, à travers des sous-unités pré-existantes, qui ne sont pas encore cristallisées.

Certaines notions empruntées aux mécanismes de croissance cristalline inorganique en solution sont aussi parfois avancées, afin de tenter d'expliquer la formation de microstructures biogéniques. Ainsi pour Taylor *et al.* (1969), la formation de la couche prismatique des bivalves serait explicable sur la base des principes de compétition de croissance sphérulitique, qui peut aboutir dans des systèmes inorganiques à la formation de structures prismatiques (Grigorev, 1965). De même pour Checa (2000) la nucléation des premières tablettes de nacre sur la couche de transition calcite $\rightarrow$ aragonite s'effectue par épitaxie. Ces concepts conventionnels semblent peu compatibles avec la finesse du niveau de contrôle que nous observons dans les microstructures entrecroisées, nous poussant à chercher ailleurs des hypothèses plausibles.

Le rôle potentiel des composés organiques ne peut être ignoré ; il est d'ailleurs central dans les modèles "communs" de biominéralisation, tels que ceux invoquant des effets de "template" de la matrice organique sur la phase minérale (repris par de nombreux auteurs, depuis Weiner et Addadi, 1991 jusqu'à Ehrlich, 2010), qui semblent ainsi, par exemple, capables d'induire la nucléation de cristaux spécifiquement orientés.

Mais la piste la plus séduisante réside dans le rôle potentiellement joué par les enveloppes organiques, non pas en terme d'initiateurs de la cristallisation, mais en tant qu'inhibiteurs de la propagation latérale de la cristallisation. Ce concept, que l'on peut appeler "théorie de la compartimentation", a été initialement formulé par Nakahara et Bevelander (1971) :

> ".....Prisms are elaborated in chambers bounded by the periostracum and the inner lamella <<of the mantle>> on the outer and inner surface respectively and laterally by the interprismatic walls. Aside from the presence of this latter structure, that in effect packages the crystals into columns....."

Cette notion de délimitation de la propagation latérale de la cristallisation par les enveloppes est parfaitement compatible avec nos observations d'enveloppes, soit continues soit en "patchworks", que l'on retrouve séparant systématiquement les unités de 1er, 2^eet 3e ordre dans les microstructures foliées-croisées et lamellaires croisées. Nos résultats indiquent que ces enveloppes délimitent en effet latéralement la propagation de la cristallisation, contrôlent la morphologie des unités structurales et modulent la conservation des propriétés cristallographiques.

Le fait que l'on retrouve ce même système d'enveloppes, qui induisent des morphologies extrêmement proches (lamellaire-croisé, folié-croisé), mais constituées de polymorphes de $CaCO_3$ différents, tend à démontrer l'aspect fondamental de ce mécanisme de contrôle morphologique, parfaitement découplé du contrôle minéralogique.

S'il semble ainsi se dégager un mécanisme commun à la formation des microstructures prismatiques et entrecroisées, sous la forme d'un système d'enveloppe ou de réseau organique délimitant, celui-ci reste loin d'être uniforme. On observe en effet une forte variabilité spécifique, tant dans la structure que dans la composition de ces enveloppes : épaisses, constituées d'au moins trois couches et continues dans les couches prismatiques (Dauphin *et al.*, 2010), elles sont fines et continues entre lamelles du 1er ordre dans les couches foliées-croisées, et constituées de "patchworks" organiques discontinus entre lamelles du 1er ordre dans les couches lamellaires-croisées. Au contraire des enveloppes entre lamelles du 1er ordre dans les couches lamellaires-croisées, on ne trouve trace de composés riches en liaisons -CH dans leurs équivalentes foliées-croisées : celles-ci semblent, au contraire, contenir plutôt des molécules polyéniques. Ces résultats semblent confirmer le fait que des assemblages organiques différents soient in fine capables de remplir un rôle similaire.

Enfin, concernant le mode de transport du Ca jusqu'au site de biominéralisation, nos résultats n'apportent pas de nouvelles données. Ils permettent en revanche d'établir sans équivoque la préexistence de l'assemblage des sous-unités granulaires et du tramage des enveloppes organiques par rapport à la phase de cristallisation proprement dite : c'est en effet lors de la coalescence des granules, pendant la propagation d'un front de cristallisation, que les micromacles de croissance se forment, et peuvent être ainsi continues à travers plusieurs granules préexistants.

Quant à l'origine des granules, on ne peut que fortement soupçonner leur sécrétion sous une forme de précurseur ($CaCO_3$ amorphe ? Gel organo-calcique ?) par le manteau, mécanisme qui, s'il est séduisant, reste encore à démontrer.

Altérations diagénétiques

Si les enveloppes organiques jouent ainsi un rôle clé dans la genèse des microstructures entrecroisées, leur disparition/altération semble aussi jouer un rôle majeur lors des mécanismes diagénétiques qui affectent les coquilles lors de leur fossilisation. Dans les deux cas présentés, les traces de dissolution et/ou recristallisation observées sont en effet directement corrélables à la disparition de ces enveloppes : l'altération de la compartimentalisation biochimique conditionne ainsi l'évolution de la phase minérale.

L'exemple de *Velates perversus* illustre de plus le caractère contre-intuitif des mécanismes de diagénèse/taphonomie qui peuvent affecter les coquilles des mollusques :

- Bien que la couche lamellaire-croisée ait subi une dissolution importante, la cimentation de la porosité qui a suivi s'est effectuée dans le même polymorphe (aragonite), et la microstructure initiale résiduelle est bien préservée. On aurait pu s'attendre à ce que cette couche, constituée d'un polymorphe métastable de $CaCO_3$, soit affectée prioritairement par la diagénèse, et recristallise partiellement en calcite ; or c'est paradoxalement la couche fibreuse, calcitique et théoriquement plus stable à l'échelle des temps géologiques, qui a subi une recristallisation importante - cette dernière n'est de plus décelable qu'à des échelles sub-micrométriques.
- Lors des observations macroscopiques préliminaires, l'aspect lustré et compact de la coquille à proximité de la surface interne de la couche lamellaire-croisée tranche avec les lentilles d'aspect crayeux et blanchâtre que l'on observe au cœur de cette couche. D'emblée, il peut ainsi sembler que ces lentilles soient plus altérées que les parties plus périphériques. Or ces dernières résultent simplement d'une cimentation incomplète, qui n'a pu atteindre le cœur de la couche : ce sont en réalité les parties périphériques, complètement cimentées, qui contiennent la plus grande proportion de phase secondaire de recristallisation - et risquent d'induire un biais diagénétique plus important lors des analyses.

Si l'on recherchait des traceurs paléoenvironnementaux dans ces coquilles de *Velates*, il faudrait réaliser des analyses in-situ non pas dans la couche calcitique, mais dans la couche aragonitique, et de plus dans les zones crayeuses friables et blanchâtres de cette dernière - celles qui semblent, à première vue, les plus altérées de la coquille.

4.2 Perspectives

Cette étude n'a rien d'exhaustif, et reste encore à compléter : des comparaisons à un plus grand nombre de taxons seraient évidemment souhaitables pour confirmer/infirmer nos hypothèses, de même qu'une extension à d'autres types microstructuraux en appliquant le même panel de méthodes de caractérisations in-situ résolutives. Il est en effet fondamental de dégager les mécanismes, qui semblent participer d'un patrimoine commun utilisé par tous les organismes construisant des structures carbonatées biogéniques, des diverses stratégies plus spécifiques mises en place çà et là par certains groupes. Au delà de ces études systématiques à mener, d'autres perspectives à plus court terme semblent envisageables, sinon prometteuses :

Caractérisations biochimiques des enveloppes

Certaines des techniques utilisées ont permis de préciser la nature biochimique de certains constituants des enveloppes séparant les unités de 1er ordre dans les microstructures entrecroisées : composés contenant des liaisons -CH (a priori lipidiques) dans le lamellaire-croisé, et composés polyéniques dans le folié-croisé. Mais aucune de ces techniques n'offre aujourd'hui une résolution suffisante pour envisager de caractériser les compositions des enveloppes séparant les unités de $2^e/3^e$ ordre. Or ces enveloppes sont certainement différentes, car elles impactent de façon différente la propagation de la cohérence cristallographique entre les unités qu'elles séparent : cette différence peut aussi bien être structurale (enveloppes continues ou discontinues) que liée à leurs compositions propres.

Une telle caractérisation de la structure et composition internes des enveloppes permettrait de mieux appréhender les associations organo-minérales, et notamment les contraintes que ces assemblages moléculaires semblent capables d'exercer sur la propagation (ou l'inhibition) de la cristallisation de la phase minérale.

Il est pour l'instant difficile d'envisager des techniques résolutives suffisantes pour résoudre cette problématique :

1. Une première approche pourrait consister en des colorations au MET de ces enveloppes, in-situ ou même sur section décalcifiée : nous avons réalisé quelques expérimentations en ce sens, à ce jour sans résultat probant (les recettes de "colorations" utilisées, empruntées aux études de biologie cellulaire, se sont révélées plus décalcifiantes que colorantes....).
2. La réalisation de marquages isotopiques in-vivo, qui rendent ensuite possible des cartographies détaillées des tests calcifiés au NanoSIMS (Gorzelak *et al.*, 2011) pourraient aussi permettre de préciser la structure de ces enveloppes - ce procédé nécessite toutefois d'utiliser un élément qui leur soit exclusif (S ?).
3. Mais le progrès constant dans le développement des techniques analytiques in situ de pointe permet d'envisager d'autres solutions : les résolutions de cartographies XANES annoncées pour la future ligne de lumière Microscopiµm (SOLEIL), aux alentours de 50 nm, pourraient s'avérer suffisante pour ce type d'investigations.
4. Les progrès récents ou à venir en microscopie optique confocale ne sont pas non plus à négliger, certaines techniques permettant d'ores et déjà d'atteindre des résolutions suffisantes (mais avec des contraintes fortes, et semblent pour l'instant peu applicables à nos échantillons) : microscopie multiphoton, microscopie STED, illumination structurée, etc.

Traceurs biochimiques

La richesse et la complexité des assemblages organiques ouvrent des perspectives intéressantes dans l'interprétation du registre fossile. Cette vaste panoplie de molécules présente ainsi des comportements divers face aux mécanismes diagénétiques : certaines très dégradables et/ou peu liées à la phase minérale vont disparaitre rapidement, alors que d'autres, plus résistantes et/ou intimement associées à la phase minérale, seront globalement préservées, tout en ayant peut être subi des modifications mineures, et pourraient constituer ainsi des proxies permettant de retracer divers processus.

Les premiers résultats exploratoires obtenus en tentant d'utiliser la fraction lipidique de la matrice organique comme proxy de cuisson de la coquille semblent prometteurs : là aussi, une étude plus systématique peut être envisagée (différentes températures de cuisson, etc.), ainsi qu'un meilleur ciblage des molécules thermosensibles à étudier, afin de déterminer la fiabilité de ce traceur potentiel.

Certains auteurs suivent d'ailleurs d'autres pistes concernant l'utilisation de la matrice organique comme traceur potentiel de divers mécanismes : ainsi, les récents travaux de Demarchi *et al.* (2012) semblent démontrer que la matrice organique des coquilles de *Patella* pourrait constituer un proxy fiable pour les reconstructions géochronologiques, par l'analyse de la diagénèse des protéines "intra"cristallines (IcPD).

Ces approches passent nécessairement par une meilleure compréhension des mécanismes de diagénèse/taphonomie qui peuvent affecter les différentes microstructures composant les coquilles : cette dernière nécessite, malheureusement, l'utilisation systématique de techniques de caractérisation in situ afin de pouvoir observer finement les évolutions conjointes des phases organiques et minérales, fortement interdépendantes l'une de l'autre, et ce dans des contextes sédimentaires bien plus variés que ceux que nous avons rencontrés à l'occasion de nos deux cas d'études.

Mécanisme de transport

Mais l'une des questions clés concernant les processus de biominéralisation reste aujourd'hui la problématique du (des ?) mécanisme(s) de transport du Ca (intracellulaire) jusqu'au site de minéralisation (extracellulaire). Le Ca est-il transporté sous la forme d'un précurseur (peut-être du carbonate de calcium amorphe), ou bien lié à des molécules organiques ? Est-il concentré au sein de vésicules dans (ou entre) les cellules formant les tissus minéralisants, qui pourraient correspondre au vésicules riches en Ca observées par Brahmi (2011) dans l'ectoderme basal de scléractiniaires, et par Neff (1972) et Istin et Masoni (1973) dans le manteau de mollusques ? Ces vésicules correspondent-elles aux granules que nous observons, et dont l'accumulation semble former tous les carbonates d'origine biogénique ?

La réponse à ces questions passe bien entendu par l'étude des tissus minéralisants, et notamment les techniques classiques d'histologie et de coloration en microscopie électronique en transmission. Mais celles-ci, qui nécessitent souvent une déminéralisation totale, ne sont pas favorables à l'observation des relations tissu/squelette (ou coquille).

La cryo-microscopie MET et MEB, qui ne nécessite pas de décalcification des tissus, permettrait dans un premier temps de contourner ce problème : d'autres difficultés inhérentes à cette technique (comme la petite taille des objets, nécessaire pour leur bon refroidissement) la rendent toutefois contraignante.

Les récents progrès en microscopie optique confocale offrent aussi de nouvelles perspectives : un projet d'étude serait réalisable sur des coquilles juvéniles, dont la bordure est assez fine pour être transparente au laser et donne ainsi accès à une visualisation du lit de minéralisation en train de se former. L'utilisation de fluorophores spécifiques du Ca devrait ainsi permettre de visualiser le trajet du Ca, d'abord à travers l'organisme jusqu'au tissu minéralisant, puis du tissu au site de minéralisation. Les résolutions théoriques conventionnelles sont, sur le papier, même suffisantes pour détecter les vésicules décrites dans la littérature. Les techniques à haute résolution temporelle (en particulier, le "spinning disc") devrait permettre de suivre le processus dans le temps, voire même, dans un cas idéal, une visualisation tridimensionnelle du site de minéralisation.

De façon similaire, la microspectroscopie Raman pourrait s'avérer utile en permettant de s'affranchir de l'usage de colorants, en détectant directement la signature Raman d'une phase de carbonate de calcium.

Une dernière approche consiste à tenter de caractériser la liaison entre l'ion Ca^{++} et la matrice organique : en effet, lors de la décalcification des coquilles de mollusques (ou squelettes coralliens), on a pu constater que la MOS extraite contient une part non-négligeable de Ca, issu de la décalcification, qui reste associé à certaines molécules. Les matrices de différents taxons ont ainsi fait l'objet d'une étude par Spectroscopie RX (XPS) sur synchrotron (session sur la ligne TEMPO, SOLEIL), qui semble révéler une importante variation des énergies de liaison Ca2p d'une espèce à

l'autre (Cuif *et al.*, 2013). La possibilité de caractériser ainsi l'influence des assemblages organiques sur la phase minérale pourrait offrir, là encore, des perspectives prometteuses pour une approche fonctionnelle des processus de biominéralisation.

Au delà des quelques exemples développés ci-dessus, ces résultats ont des implications potentielles, et gagneraient à être pris en compte, dans d'autres domaines d'études :

Paléoenvironnements La disparition des granules au profit de cristaux à facettes idiomorphes néoformés lors de la diagénèse constitue un bon critère de diagnostique de l'état de conservation de la phase minérale, à l'échelle submicrométrique. Ce dernier est probablement applicable à tous les tests carbonatés d'origine biologique. Il constituerait alors un critère robuste pour limiter les biais taphonomiques lors des reconstitutions environnementales basées sur des biocarbonates, actuels ou fossiles, en permettant de délimiter les zones non recristallisées, où les mesures in situ des divers proxies seront les plus fiables.

Biomimétisme Les microstructures entrecroisées ont des propriétés mécaniques étonnantes : elles sont par exemple plusieurs dizaines de fois plus résistantes qu'un carbonate massif (Li *et al.*, 2013). Cette caractéristique est probablement liée au comportement ductile des unités de 3e ordre, dû à leur composition granulaire (Li *et al.*, 2013), ainsi qu'à l'organisation architecturale tridimensionnelle, qui limite la propagation des fractures au sein de très petites unités (Menig *et al.*, 2001; Kamat *et al.*, 2004). Les applications technologiques de tels matériaux sont potentiellement nombreuses ; mais on est aujourd'hui encore loin de pouvoir reproduire en laboratoire des arrangements cristallins aussi complexes.
La mise en évidence du rôle fondamental des enveloppes organiques dans la formation des microstructures entrecroisées pourrait ainsi ouvrir quelques pistes intéressantes dans les recherches en biomimétique : en particulier, leur capacité à contraindre la morphologie des unités cristallines en délimitant latéralement la propagation de la cristallisation.

Matériels et méthodes

Matériels et méthodes

5.1 Matériels

Gastéropodes : Les échantillons de *Nerita undata* (Linnaeus, 1758) (Neritimorpha, Neritidae) ont été récoltés non vivants dans l'archipel des Tuamotu (Polynésie française), et des échantillons de *Nerita* sp. ont été récoltés vivants à la Martinique (Antilles françaises). Les animaux ont été retirés des coquilles, lesquelles ont été rincées à l'eau distillée et plongées 20 sec dans un bain à ultrasons. Les coquilles de *Megathura crenulata* (G.B. Sowerby, 1825) (Vetigastropoda, Fissurellidae) proviennent de cultures (centre expérimental du Syndicat Mixte pour l'Equipement du Littoral, Blainville sur Mer), et celles de *Cypraea leviathan* (Burgess and Arnelle, 1981) (Sorbeoconcha, Cypraeidae) et de *Murex sp.* : (Sorbeoconcha, Muricidae) proviennent des collections de paléontologie de l'UMR IDES.

Les *Patella vulgata* (Linnaeus, 1758) (Patellogastropoda, Patellidae) ont été récoltées vivantes sur les plages aux alentours de St Cast - Le Guildo (Bretagne). Les animaux ont été retirés des coquilles, lesquelles ont été rincées à l'eau distillée et plongées 20 sec dans un bain à ultrasons.

Les spécimens de *Patella* fossiles ont été collectées lors de la campagne de fouilles 2010 de la grotte El Harhoura 2 (Témara, Maroc) dans le cadre de l'ANR MOHMIE, et proviennent toutes du niveau 8 (Paléolithique moyen, entre 92 +11/-9 et 106,7 +/- 6,6 ka), accessible par le sondage effectué à l'entrée de la grotte. Les coquilles ont été rincées à l'eau distillée et plongées 20 sec dans un bain à ultrasons afin d'éliminer toute trace de sédiments.

Les coquilles de *Velates perversus* (Neritimorpha, Neritidae) sont issues de l'horizon de Pierrefonds de l'est du bassin parisien (Mercin-et-Vaux, Aisne) - collection J.C. Plaziat. Les spécimens ont été rincés à l'eau distillée et plongées 20 sec dans un bain à ultrasons.

Lamellibranches : Les échantillons de *Tridacna* sp. (Veneroida, Tridacnidae) *et de Cardium sp.* (Veneroida, Cardiidae) proviennent de l'archipel des Tuamotu (Polynésie française).

5.2 Méthodes

5.2.1 Microscopies optiques

Microscopie en lumière polarisée analysée.

Réalisation de lames minces : La finesse des unités microstructurales rencontrées dans les carbonates biogéniques rendent peu adaptées les lames minces réalisées aux standards de pétrologie (28 µm d'épaisseur) : les observations détaillées sont en effet beaucoup plus complexes, car les structures se superposent facilement et les teintes de Newton au 3e ordre (et supérieur) sont indistinctes. Nous avons donc opté pour une réalisation artisanale de lames plus fines (5 à 10 µm d'épaisseur), qui n'est pas sans défauts : les lames sont en effet rarement intactes sur toute l'épaisseur de la coquille, et bien souvent inexploitables ce qui requiert de nombreux essais. Ces préparations rendent toutefois possible, sur les quelques lames réussies, des observations très fines, avec des teintes du 2e ordre beaucoup plus sensibles (les lamelles de 3e ordre des structures entrecroisées sont ainsi souvent visibles individuellement). La séquence préparatoire est la suivante : 1/des sections radiales épaisses sont réalisées dans les coquilles. 2/la surface d'étude est dépolie (papiers abrasifs

SiC Hermes P1200, puis P2400, à l'eau) puis collée sur une lame de verre dépolie (émeri, taille de grains 15 µm) à chaud à l'aide d'une résine thermo-réversible (Crystalbond^{TM} 509). 3/la section est d'abord réduite à une épaisseur de ˜50 µm à l'aide d'une scie diamantée, puis précautionneusement ajustée à l'épaisseur souhaitée à l'aide de papiers abrasifs (Hermes P1200, puis P2400). 4/la surface est enfin légèrement polie (abrasif Hermes P4000, et lorsque l'état de la lame le permet, suspensions de diamants polycristallins Buehler 3 µm et 1 µm).

Les observations sont effectuées sur un microscope polarisant classique (Zeiss Universal) en Lumière Polarisée Non Analysée (LPNA) et Lumière Polarisée Analysée (LPA), en utilisant deux polariseurs croisés à 90°.

Microscopie de fluorescence.

Des surfaces polies sont réalisées suivant la séquence de polissage suivante : 1/ abrasion sous eau et sur papiers SiC Hermes P1200 (taille de grains ˜15 µm), P2400 (taille de grains ˜8 µm), puis P4000 (taille de grains ˜5 µm). 2/pré-polissage avec solutions de diamants polycristallins Buehler en suspension (3 µm et 1 µm) sur support tissé TexMet (Buehler). 3/phase de polissage proprement dite, avec suspensions d'alumine (taille de grains ˜300 nm) et de silice colloïdale (taille de grains ˜50 nm) sur supports TexMet. Les surfaces sont ensuite soigneusement rincées à l'eau déminéralisée.

Les observations sont réalisées sur un microscope Zeiss Universal équipé d'objectifs en fluorine x6 (N.A. 0,2) et x20 (N.A. 0,6), et d'une lampe à vapeur de mercure. Deux jeux de filtres sont disponibles : 1/un filtre d'excitation à 365 nm (UV) couplé à un filtre d'émission passe-haut à partir de 430 nm. 2/un filtre d'excitation à 435 nm (bleu) couplé à un filtre d'émission passe-haut à partir de 510 nm.

Microscopie confocale à balayage laser.

Les préparations sont réalisées suivant le même protocole que pour la microscopie de fluorescence classique. Les observations sont réalisées sur un microscope confocal Olympus FV-1000 inversé (instrument hébergé au LIONS, CEA-Saclay, France ; collaboration C. Chevallard et P. Guenoun), équipé de plusieurs lasers d'excitation (les lasers utilisés dans cette étude sont deux lasers He-Ne, émettant à $\lambda = 488$ nm et 543 nm). Deux objectifs sont utilisés, un objectif x20 (Olympus UPLSAPO, NA=0.75) et un x40 (Olympus UPLFLN, NA=0.75), pour lesquels l'ouverture confocale est respectivement fixée à 80 et 130 µm (correspondant au diamètre de la tache de Airy pour ces objectifs). Le plan d'observation est focalisé environ 2 µm sous la surface de l'échantillon, afin d'éviter toute contribution potentielle de polluants ou résidus de polissage au signal lumineux. La lumière réémise par la surface est soit collectée à l'aide d'un filtre passe-haut BA 560 IF, soit dans certains cas à l'aide d'un module d'analyse spectrale (disponible tardivement sur l'installation) par pas de 10 nm. La résolution latérale théorique maximale est variable selon la longueur d'onde d'excitation et les objectifs utilisés, elle peut être calculée d'après le critère de Rayleigh pour une ouverture circulaire :

$$r_{xy} = 0,61 * \lambda / N.A. \tag{5.1}$$

La présence d'un diaphragme réglable dans le plan image entraine une amélioration de la résolution latérale (Benoit *et al.*, 2011) :

$$r_{xy} = 0,4 * \lambda / N.A. \tag{5.2}$$

La résolution maximale théorique est donc, dans nos conditions d'acquisition, de 260 nm à $\lambda = 488$ nm et de 290 nm à $\lambda = 543$ nm pour les deux objectifs.

Colorations :

L'épifluorescence naturelle de certains constituants organiques des coquilles de mollusques rend souvent possible l'observation de leurs organisations microstructurales, sans pour autant avoir recours à un traitement spécifique. Mais l'interprétation de ces résultats reste limitée, plusieurs

dizaines (voire centaines) de composés étant susceptibles de fournir une réponse pour une longueur d'onde d'excitation donnée, rendant toute tentative de caractérisation par épifluorescence naturelle illusoire. Des colorations plus spécifiques sont néanmoins possibles à l'aide de fluorophores, molécules fluorescentes équipées d'une sonde moléculaire possédant une affinité plus ou moins sélective avec certains composés organiques, et qui sont très largement utilisées en biologie moléculaire (séquençages, marquages immunologiques, etc.). Il existe ainsi une vaste gamme de produits disponibles dans le commerce. Malheureusement ceux-ci sont optimisés pour des applications biologiques, ils sont ainsi très spécifiques d'une ou plusieurs molécules cibles, souvent présentes en quantité et donc facilement colorable, même avec une faible quantité de marqueurs (fluorophore peu intense/faible concentration) dans les préparations histologiques ou cytologiques : ces composés sont ainsi très mal adaptés pour la coloration de bio-carbonates, dans lesquels les composés organiques ne représentent qu'un faible pourcentage de la masse totale, mais sont extrêmement diversifiés.

Trois fluorophores ont été testés dans notre étude : les surfaces d'études polies sont au préalable très légèrement attaquées en présence d'un fixateur organique (solution d'acide formique, 0,1 wt.% + glutaraldéhyde, 5% v/v ; 10 sec) afin de dégager la matrice organique et de favoriser l'adsorption du traceur.

1 - Bodipy® 493/503 (excitation/émission) (In Vitrogen). Cette molécule est doublement intéressante : 1/elle fait preuve d'une intense fluorescence, dont le rendement n'est pas diminué dans l'eau, et est donc particulièrement adaptée pour la coloration de molécules en faibles quantités 2/elle est intrinsèquement lipophile, et peut donc être utilisée telle quelle pour la détection de lipides, sans nécessité de la combiner à une sonde moléculaire (Molecular Probes Handbook, 2010). Il a ainsi été montré, en cytométrie de flux, que des colorations réalisées avec cette molécule sont plus spécifiques des gouttelettes lipidiques intracellulaires que les colorations avec du rouge Nil (Gocze et Freeman, 1994). La solution de stockage est réalisée par dissolution dans l'éthanol (10 mg dans 10 ml), la coloration est réalisée avec une solution diluée à (100 µg/ml) pendant une durée variant de 10 min à 30 min.

Le fluorophore est détecté de deux façons : dans un premier temps, la présence d'un pied à 360 nm dans le pic d'excitation (˜10% du pic principal, figure 71f) nous permet d'utiliser le jeu de filtres UV (365/430). Cette étape permet d'identifier visuellement le fluorophore (vert intense), et surtout de le dissocier du fond d'autofluorescence de l'échantillon (le shift de Stokes de la majorité des composés provoque alors une fluorescence majoritairement bleue à cette longueur d'onde d'excitation), même si le potentiel du fluorophore est "gâché" (10% seulement de son intensité de fluorescence à 493 nm). Cette étape préliminaire est nécessaire avant de réaliser, dans un second temps, une visualisation par microscopie confocale, avec tous les avantages inhérents à cette technique (meilleure résolution, restitutions 3D, etc.) et où le plein potentiel du fluorophore s'exprime (sous une excitation - laser vert He-Ne, $\lambda = 488$ nm).

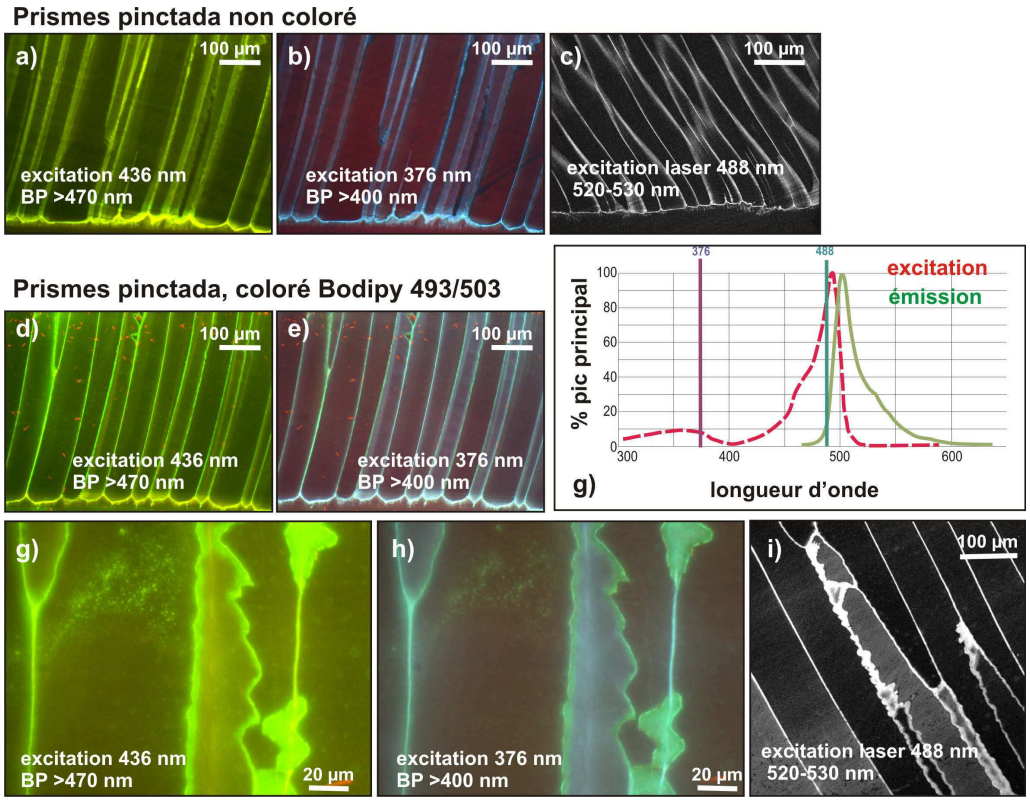


FIGURE 71 – Tests de coloration au Bodipy® 493/503 sur la couche prismatique d'une coquille de *Pinctada margaritifera*. a-c) Fluorescence naturelle des enveloppes des prismes à 436 nm (a), 376 nm (b) d'excitation, et en microscopie confocale à 488 nm d'excitation (c). d-e) Fluorescences additionnées du fluorophore et des enveloppes à 436 nm (d) et 376 nm (e) d'excitation. f) Spectres d'émission et d'absorption du Bodipy®. g) à 436 nm, les deux fluorescences ne sont pas discernables l'une de l'autre. h) à 376 nm, la couleur de fluorescence caractéristique du Bodipy®, faiblement excité par les UV, permet de le discerner des la fluorescence naturelle de la coquille. i) A 488 nm au confocal laser, les deux fluorescences ne sont pas discernables.

2 - Acridine Orange 500/533-656 (excitation/émission). L'acridine orange est un colorant cationique communément utilisé (Marlowe et Dillaman, 1995; Gautret *et al.*, 2003) pour détecter différents composés présentant des sites actifs libres et chargés négativement (tels que les glycoprotéines (Brandes et Reale, 1990)). Son interprétation n'est pourtant pas évidente, puisque la couleur d'émission peut varier du vert au rouge selon l'environnement direct de la molécule (cf section 1.2.2), et compliquant le travail sous microscope confocal (plusieurs jeux de filtres, ou un analyseur spectral, sont requis). Les préparations sont colorées 30 min dans une solution à 200 µg/ml (20 mg dissous dans 95 ml d'eau et 5 ml d'éthanol).

3- Rouge Nil 549/628 (In Vitrogen). Le rouge Nil est classiquement utilisé comme colorant des composés lipidiques, et son spectre de fluorescence dépend lui aussi de son environnement physico-chimique : il réémet ainsi dans le jaune lorsqu'il est en contact avec des triglycérides neutres, et dans le rouge lorsqu'il s'insère dans des membranes phospholipidiques (Benoit *et al.*, 2011). Les tests, réalisés à diverses concentrations (de 10 µg/ml à 1 mg/ml, solvant Dimethyl Sulfoxide - DMSO) pendant 10 min à 1h, se sont révélés infructueux sur nos coquilles, avec pour cause probable la trop faible intensité de fluorescence du fluorophore, qui le rend difficilement discernable du fond de fluorescence de l'échantillon en microscopie classique et confocale.

Note : Ces tests de coloration étaient initialement prévus pour une étude en microscopie confocale, et sont encore largement perfectibles, notamment en ce qui concerne la fixation du colorant sur la préparation qui reste hétérogène malgré une attaque préalable. Le biais principal, comme cela s'est révélé être le cas avec les tests au rouge Nil, est lié à l'autofluorescence de la coquille, qui peut parfois masquer la signature du fluorophore. Avec un jeu de filtres classique en microscopie confocale, il peut ainsi s'avérer très délicat de séparer les deux signaux et c'est, paradoxalement, sous microscope classique avec un simple capteur CCD RVB que l'information est la plus pertinente, la couleur de réponse spécifique du fluorophore étant bien plus facile à distinguer pour un œil habitué. Nous avons donc systématiquement effectué les observations en microscopie classique, et n'avons finalement réalisé qu'occasionnellement des observations en mode confocal laser, sur des zones où la coloration a été confirmée dans un premier temps.

Par chance, le Bodipy® 493/503 émet une réponse dans les verts, lorsqu'il est excité sous UV (λ=360 nm) (Figure 71h), ce qui nous procure un bon moyen de distinguer ce fluorophore du fond de fluorescence de la coquille, statistiquement situé dans les bleus pour cette longueur d'onde d'excitation (décalage moyen de Stokes).

L'adjonction récente d'un module d'analyse spectrale, acheté en 2012, sur l'Olympus FV-1000 inversé devrait à terme permettre d'identifier et de séparer les réponses spectrales, ce qui devrait faciliter l'utilisation du protocole de marquage développé dans cette étude en microscopie confocale laser à un plus large spectre de carbonates biogéniques.

5.2.2 Microscopies électroniques

Microscopie Électronique à Balayage (MEB).

Pour les observations en microscopie électronique à balayage, le protocole de préparation des échantillons dépend de plusieurs paramètres (type microstructural, minéralogie, taxon, type de détecteur, objectif de la préparation, ...), ce qui nous a conduit à adapter, à chaque fois, le traitement pour chaque préparation. Les observations en électrons rétrodiffusés (BSE) sont généralement réalisées sur des surfaces polies suivant la séquence : papiers Hermes P1200, P2400 et P4000, suspensions de diamants polycristallins (3 µm et 1 µm), suspensions d'alumine (taille de grains ˜300 nm) et de silice colloïdale (taille de grains ˜50 nm). Les observations en électrons secondaires sont réalisées soit sur des fractures fraiches, soit sur des section polies, ayant subi ou non des attaques ménagées : les types et durées d'attaques sont systématiquement précisés en légende des figures.

Les observations ont été réalisées sur :

1 - un microscope Philips XL 30 équipé d'un détecteur d'électrons secondaires (SE) et/ou d'un détecteur d'électrons rétrodiffusés (BSE). La distance de travail est de 10 mm avec une tension d'accélération le plus souvent fixée à 25 keV (30 keV pour les images BSE). Pour les observations en électrons secondaires, les échantillons sont métallisés à l'Au/Pd ; pour les observations en électrons rétrodiffusés, les surfaces sont recouvertes d'un film de carbone (Polaron Sputter-coater E5100).

2 - Un microscope Carl Zeiss Ultra Plus à émission de champ (FEG-SEM) équipé de détecteurs d'électrons secondaires (SE) et rétrodiffusés (BSE) classiques et InLens, qui est hébergé au National History Museum de Londres, UK. Le microscope est utilisé avec une tension d'accélération de 1 keV, l'échantillon est placé à une distance de travail de 4 mm. Les échantillons ne sont pas métallisés/carbonés. Ces mesures ont été financées dans le cadre d'un projet Synthesis (collaboration A. Ball et L. Howard).

3 - Un microscope de table Phenom Pro X équipé d'une pointe CeB6 et d'un détecteur d'électrons rétrodiffusés (BSE). Le microscope est utilisé avec une tension d'accélération de 15 keV et d'un système de réduction de charges, qui permet de ne pas avoir à carboner/métalliser la surface.

Colorations :

Des tentatives de colorations, basées sur l'utilisation d'éléments très lourds ayant une affinité marquée pour certains composés organiques, ont été réalisées. Nous nous sommes pour cela basés sur les techniques de préparation de tissus mous pour microscopie électronique en transmission, qui sont couramment utilisées en biologie, en les adaptant pour nos préparations. Deux colorations ont été testées :

1 - uranyle/Plomb : Des sections radiales épaisses sont réalisées, puis polies suivant la séquence : papiers Hermes P1200, P2400 et P4000, suspensions de diamants polycristallins (3 µm et 1 µm), suspensions d'alumine (taille de grains ˜300 nm) et de silice colloïdale (taille de grains ˜50 nm), avant d'être soigneusement rincées à l'eau déminéralisée. Les surfaces d'étude sont tout d'abord légèrement attaquées dans une solution d'acide formique diluée (0,1 % wt.) en présence d'un fixateur organique (glutaraldéhyde, 3% v/v) pendant 20 sec, afin de dégager très légèrement la matrice organique de la phase minérale et de favoriser l'adsorption du traceur. Elles sont ensuite plongées dans une solution de citrate de plomb (0,4 g dilués dans 100 ml d'eau + 10 ml de NaOH 1M) pendant 30 min, rincées à l'eau déminéralisée et soigneusement séchées, avant d'être de nouveau plongées dans une solution d'acétate d'uranyle (6 g dilués dans 90 ml d'une solution eau + éthanol, 50/50 v/v) pendant 20 min. Les surfaces sont ensuite soigneusement rincées à l'eau déminéralisée et séchées, puis observées en électrons rétrodiffusés (BSE - sensibilité au poids atomique).

2 - Tétroxyde d'osmium : D'après les premiers tests sur surface polie, il apparait que cette coloration est trop aggressive en solution, et dissout les surfaces lorsqu'elles entrent en contact avec celle-ci, même après dilutions successives. Néanmoins, lors d'un essai d'exposition de trois échantillons (cassures fraiches de *Nerita* et *Patella* actuelles, et *Patella* fossile) à de la vapeur d'osmium, effectué en les plaçant à proximité d'une solution saturée (4% vol. diluée dans l'eau) qui dégaze dans une enceinte scellée pendant 1h, cette technique s'est révélée capable de réaliser des attaques ménagées extrêmement légères et de révéler des détails microstructuraux inaccessibles avec les attaques ménagées en solution (Figure 50j-l). Ce protocole a de plus permis de colorer des incréments de croissance dans une des préparations ci-dessus (Figure 10e-f).

Coloration de Feigl : Cette coloration, à base de sulfates d'argent et de manganèse et préparée suivant la recette de Friedman (1959), engendre la formation d'un précipité au contact de l'aragonite, ce qui permet de distinguer cette dernière des autres carbonates (calcite + dolomite). Ce précipité formé est gris-noir, ce qui permet de caractériser le polymorphe de carbonate de calcium exprimé à l'œil nu ou en microscopie optique, mais il est aussi riche en Ag et Mn, dont le poids atomique supérieur au Ca crée un fort contraste en électrons rétrodiffusés (BSE) et permet ainsi de réaliser cette caractérisation à plus fine échelle au MEB. Bien qu'accessoire, cette technique s'est révélée parfois très utile pour caractériser rapidement la présence d'aragonite dans un échantillon.

Microscopie Électronique en Transmission (MET).

Pour les observations en microscopie électronique en transmission, des lames minces de sections radiales sont préparées suivant le protocole décrit section 5.2.1, jusqu'à ce que leur épaisseur soit réduite au minimum (entre 5 et 10 µm). Les sections d'intérêt sont ensuite forées dans la lame en disques de 3 mm de diamètre, puis collées sur une grille simple perforée de microscopie (Cu) à l'aide d'une résine époxy (Figure 51a-c). Les préparations sont ensuite réduite à l'épaisseur requise pour devenir transparentes aux électrons rapides à l'aide d'un amincisseur ionique Gatan Precision Ion Polishing System (PIPS) : les deux canons à ions Ar^+ (inclinés à 7° et 4°, tension d'accélération à 5 keV pendant la phase de réduction d'épaisseur, puis à 2.5 keV lors de la phase finale) créent un trou, dont la bordure biseautée extrêmement fine est particulièrement appropriée pour la microscopie MET. Un fin dépôt de carbone (˜15 nm) est ensuite réalisé par évaporation sur la surface pour permettre l'évacuation des charges dans le microscope.

Les observations sont réalisées sur un microscope JEOL 3010 et un JEOL 2011 (hébergés au CINAM, Marseille ; collaboration A. Baronnet) équipé d'un filament LaB_6, avec des tensions

d'accélérations fixées respectivement à 300 keV et 200 keV. La dose d'exposition est minimisée en effectuant les réglages hors champs de la zone d'étude, afin de limiter les dégâts générés par le faisceau. La lentille-objectif est légèrement défocalisée, ce qui émule du contraste de phase et révèle ainsi certains détails microstructuraux. Les clichés de diffraction localisés (SAED) sont orientés grâce à un porte-échantillon double tilt. Le JEOL 2011 est équipé d'un détecteur Bruker à dispersion d'énergie (EDS) permettant de réaliser des déterminations de compositions élémentaires localisées.

Microsonde Électronique.

Des sections radiales sont inclues dans une résine époxy, puis coupées et polies avec papiers Hermes P1200, P2400 et P4000, et suspensions de diamants polycristallins (3 µm et 1 µm). Les surfaces sont soigneusement rincées à l'eau déminéralisée et recouvertes d'un fin dépôt de carbone (sous évaporateur) assurant l'évacuation des charges. Les cartes de distributions de Ca, Mg, Sr et S sont collectées sur une microsonde électronique à dispersion de longueur d'onde (WDS) Cameca SX100 (hébergée au National History Museum de Londres, UK). La tension d'accélération des électrons est fixée à 15 keV, pour un courant de fuite de 20 nA. Ces mesures ont été financées dans le cadre d'un projet Synthesis (collaboration J. Spratt).

5.2.3 Microscopie de force atomique (AFM)

Des sections d'une épaisseur d'environ 5 mm sont réalisées et polies avec papiers Hermes P1200, P2400 et P4000, et suspensions de diamants polycristallins (3 µm et 1 µm), et dans certains cas de suspensions d'alumine (taille de grains ~300 nm). Les surfaces sont ensuite très faiblement attaquées à l'aide d'une solution d'acide acétique diluée, parfois en présence d'un fixateur organique (glutaraldéhyde), afin d'éliminer les résidus de polissage ; ce procédé n'induit pas d'artéfact majeur (Dauphin et Dufour, 2008). Le comportement des échantillons lors de ces attaques ménagées varie fortement selon les espèces et/le mode d'opération du microscope, les durées d'attaque et solutions utilisées sont donc précisées pour chaque cas en légende des figures.

Les observations sont réalisées sur un microscope Veeco (Bruker) Dimension 3100 en modes contact et tapping, et sur un Multimode 8 en mode QNM (matériel de démonstration Bruker).

Mode contact.

En mode contact, la pointe reste en permanence au contact de l'échantillon au cours du balayage, la déflexion verticale est maintenue constante et le déplacement en z du levier fournit donc une image directe de la topographie de la surface de l'échantillon (la déflexion horizontale renseigne alors sur la friction entre la pointe et la surface). Le signal d'erreur de déflexion est aussi enregistré : il correspond à la soustraction du signal enregistré par la photodiode par la valeur de setpoint du système de feedback de l'AFM. Il fournit ainsi une image des changements abrupts de pente corrigés de la hauteur moyenne, ce qui révèle les faibles contrastes relatifs aux organisations structurales. Son principal inconvénient est la dégradation rapide des échantillons/pointes fragiles, et les artefacts qui en résultent ; il permet néanmoins de cartographier des détails topographiques fins.

Ce mode offre aussi la possibilité de réaliser des courbes ponctuelles d'approche-retrait, qui permettent de déterminer localement certaines propriétés . En particulier :

L'élasticité Lorsque la pointe entre en contact avec la surface puis la déforme au cours de la phase d'approche (courbe verte, étape (2) à (3), figure 28a-b), le microlevier subit une flexion, dont la pente équivalente sur la courbe de force est proportionnelle à la déformation subie par le matériau. Dans le cas d'une déformation purement élastique, la pointe suit exactement la même pente lors de la phase de retrait (courbe rouge, figure 28a-b), et celle-ci est alors proportionnelle au module de Young/DMT du matériau, ce qui permet de caractériser son élasticité. Si l'on poursuit la flexion (ou dans le cas d'un matériaux dur) la pointe marque alors la surface d'une indentation, qui créé un décalage en Z entre les courbes d'approche et

de retrait : on conclut ainsi que le matériau a subi une déformation élastique, suivie d'une déformation inélastique.

L'adhésion Lorsque la surface exerce une attraction forte sur la pointe, celle-ci peut rester "collée" sur la surface lors du retrait du microlevier ce qui provoque un fléchissement inverse de ce dernier, jusqu'au décrochement (accompagné d'un léger ressaut) qui se situe bien après le point de contact initial (courbe verte, étape (4), figure 28a-b). La variation de déflexion du levier lors du décrochage est alors proportionnelle aux forces d'adhésions exercées par la surface, permettant de les caractériser. L'aire comprise entre les courbes d'approche et de retrait (surface jaune, figure 28a) est quant à elle proportionnelle à l'énergie dissipée entre la pointe et la surface (qui peut être assimilée à la somme des interactions correspondant au signal de phase en mode tapping).

Dans le cadre de cette étude, nous n'avons pu calibrer correctement le microlevier, et ne pouvons donc déterminer de valeurs quantitatives de ces deux paramètres ; les cartographies permettent néanmoins de comparer qualitativement leurs variations relatives dans l'échantillon.

Ces courbes d'approche-retrait peuvent être en effet, dans une certaine limite, réalisées en cartographie (mode dit Force Volume, cartes de 16x16, 32x32 ou 64x64 points) : ces cartes prennent néanmoins plusieurs heures, pendant lesquelles aucune dérive de l'échantillon ne doit se produire (ce qui est pratiquement impossible à petite échelle, la simple dilatation thermique ayantalors un impact fort) et se révèlent donc particulièrement délicates à réaliser, surtout à des échelles sub-micrométriques. Ces dérives sont plus réduites dans le cas de grands champs : certaines microstructures simples et de grande dimension peuvent alors être caractérisées en utilisant ce mode, comme l'illustrent la cartographie d'une membrane séparant deux prismes de *Pinctada margaritifera* ci-dessous. Celle-ci, composée uniquement de molécules organiques, apparait fortement adhésive (contraste noir, figure 72b).

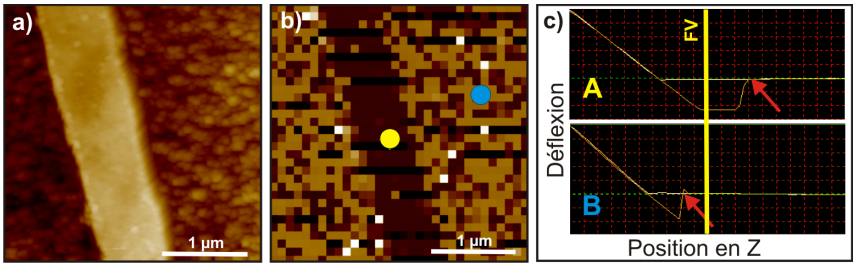


FIGURE 72 – Membrane interprismatique de *Pinctada margaritifera* observée en mode contact (etching acide acétique. a) Image de topographie (512x512). b) Cartographie de l'adhésion (32x32). c) Courbes de forces localisées dans la membrane (A) et dans le prisme (B) ; la ligne jaune marque la position en Z pour b.

Mode tapping.

En mode tapping, la pointe oscille à fréquence de résonance du microlevier, et n'est donc plus qu'en contact intermittent avec la surface. La topographie de l'échantillon peut donc être imagée avec un minimum de dégradations, raison pour laquelle ce mode est souvent préféré au mode contact. En outre, le retard de phase entre la période de l'oscillation imposée par le module de contrôle et celle enregistrée, en chaque point, est causé par les multiples interactions qui peuvent se produire entre la pointe et la surface de l'échantillon. S'il n'est pas possible, dans ce mode, de déconvoluer, les forts contrastes de phase enregistrés sont, en première approximation, associés à des variations des propriétés de déformation élastique ou d'adhésion de la surface, regroupées sous le terme de "propriétés visco-élastiques". Dans le cas des bio-carbonates, les forts contrastes de visco-élasticité peuvent être associés à la présence de composés organiques et/ou de carbonate de calcium amorphe (fortement visco-élastiques) (Dauphin, 2008).

Mode QNM.

Le mode Quantitative Nanomechanical Property Mapping (QNM^{TM}) est un mode de cartographie de courbes de forces très rapide. Il s'agit en fait d'un mode tapping "évolué" : la pointe oscille à fréquence de résonance du microlevier et balaye donc la surface de l'échantillon en contact intermittent, mais réalise de plus pour chaque période de l'oscillation une courbe complète d'approche retrait. La pointe étant calibrée, ce mode permet de réaliser en quelques minutes des cartes 512x512 quantitatives d'élasticité (module DMT ou module de Young) et d'adhésion de la surface.

Note : Ce mode ne nous a été disponible que lors d'une journée de démonstration de la société Bruker, qui nous a proposé de réaliser quelques cartes sur nos échantillons (collaboration M. Febvre, Bruker nano-optics).

5.2.4 Spectroscopies

Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FT-IR).

Spectroscopie FT-IR sur poudres : Les échantillons sont décontaminés dans un bain de NaClO pendant 1h, puis placés dans un bain à ultrasons pendant 1 min. Ils sont ensuite rincés à l'eau déminéralisée, finement broyés à l'aide d'un broyeur électrique à billes, puis séchés sous étuve à 40°C pendant 2 jours. Ils sont ensuite mélangés avec du KBr de granulométrie équivalente (ratio échantillon/KBr $\approx$ 5 %).

Les spectres sont enregistrés sur un spectromètre FT-IR Frontier (Perkin-Elmer) entre 4000 cm^{-1} et 450 cm^{-1}, avec une résolution spectrale de 4 cm^{-1}, moyennés sur 16 scans et avec une forte apodisation. Ce spectromètre est équipé d'un accessoire de réflexion diffuse (DRIFT), qui permet de s'affranchir de l'étape de préparation de pastilles de KBr utilisées en transmission, cette dernière pouvant par effets de pression localisée dénaturer certaines protéines. Les spectres obtenus sont normalisés et corrigés par la fonction de Kubelka-Munk, qui permet de comparer les données obtenues en DRIFT entre elles et avec celles obtenues en transmission.

Les spectres FT-IR permettent de caractériser la phase minérale, les vibrations du groupe CO_3^{2-}présentant en effet des bandes caractéristiques du polymorphe de carbonate de calcium exprimé : la calcite présente des bandes ν_3 à ˜1428 cm^{-1}, un doublet ν_2 à 877-848 cm^{-1}, et une bande ν_4 à 713 cm^{-1}, alors que l'aragonite présente une bande ν_3 à ˜1471 cm^{-1} et deux doublets, ν_2 à 858-844 cm^{-1} et ν_4 à 713-700cm^{-1} (Jones et Jackson, 1993).

Les molécules organiques, ou tout du moins certains groupes moléculaires qu'elles contiennent, présentent elles aussi des signatures FT-IR très spécifiques. La spectroscopie FT-IR est ainsi une technique très puissante de caractérisation des composés organiques. Les groupement amides des molécules azotés présentent des séries de vibrations caractéristiques (entre 1597 et 1695 cm^{-1} pour les bandes amide I, entre 1515 et 1580 cm^{-1} pour les bandes amide II, aux alentours de 3500 cm^{-1} pour les bandes amides A), de même que les groupements CH, que l'on trouve en abondance dans les lipides - mais aussi dans d'autres molécules (entre 2850 cm^{-1} et 3000 cm^{-1} pour les groupements -CH, entre 3000 et 3100 cm^{-1} pour les groupements =CH). Les sucres peuvent eux présenter une vaste de série de bandes, s'étalant de 800 à 1100 cm^{-1}, et sont souvent complexes à étudier en spectroscopie IR.

Thermogravimétrie couplée FT-IR : Les échantillons sont décontaminés dans un bain de NaClO pendant 1h, dans un bain à ultrasons pendant 1 min. Ils sont ensuite rincés à l'eau déminéralisée, finement broyés à l'aide d'un broyeur électrique à billes, puis séchés sous étuve à 40°C pendant 2 jours. Les mesures sont réalisées sur un couplage TGA-FTIR TL 8000 (Perkin Elmer), avec un chauffage de 70°C à 800°C et un gradient de 25°C/min. Les gaz dégagés lors du chauffage sont simultanément analysés par le spectromètre FT-IR entre 450 cm^{-1} et 4000 cm^{-1}. Le montage est particulièrement sensible et permet de détecter de très faibles émissions gazeuses ; on peut ainsi suivre au cours du temps le dégazage de molécules d'H_2O (1580 cm^{-1}), de CO_2 (2350 cm^{-1}), de NH_3 (vibrations à 950 et 975 cm^{-1}) et de CH_4 (vibrations entre 2900 et 2930 cm^{-1}).

Note : Ce matériel ne nous a été disponible que lors d'une journée de démonstration de la société Perkin Elmer.

Micro- spectroscopie SR-FT-IR : Une section radiale de l'échantillon est préparée et polie avec papiers Hermes P1200, P2400 et P4000, et suspensions de diamants polycristallins (3 µm et 1 µm), soigneusement rincée à l'eau déminéralisée puis légèrement attaquée dans une solution d'acide acétique (1% v/v) pendant 5 sec afin d'éliminer les pollutions de surface et/ou résidus de polissage. Les cartographies ont été réalisées sur la ligne de lumière ID21 de l'European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, France), sur un microscope IR Continuµm couplé à un spectromètre à transformée de Fourier Nexus (Thermo Nicolet), et équipé d'objectifs de focalisation et de collecte Schwarzschild x32 (NA 0,65). Le microscope est équipé d'une platine motorisée informatisée. Les cartographies ont été réalisées en mode réflexion, avec un pas d'échantillonnage x/y de 10 µm (taille du diaphragme de 10x10 µm^2) ; 256 spectres sont accumulés pour chaque pas, enregistrés entre 700 cm^{-1} et 4000 cm^{-1} avec une résolution spectrale de 8 cm^{-1}.

Le logiciel Omnic (Thermo Nicolet) est utilisé pour le traitement des données.

Micro- spectroscopie confocale Raman.

Des sections radiales épaisses sont réalisées dans les coquilles, et polies suivant la séquence de polissage : disques abrasifs, suspensions diamantées, suspension d'alumine. Une série de mesures (Figures 11 et 25) est réalisée sur une lame mince fine (˜10-15 µm) d'une section radiale de *Nerita undata*, réalisée suivant notre protocole standard. Toutes les préparations sont ensuite plongées dans un bain à ultrasons (˜30 s) puis soigneusement rincées à l'eau déminéralisée.

Les observations sont réalisées sur un microscope confocal Raman WITec alpha 300 R (WITec GmbH, Allemagne), instrument hébergé à l'Alfred Wegener Institut (AWI, collaboration G. Nehrke). Les cartes haute résolution sont réalisées à l'aide une table piézoélectrique (champ maximal : 200 µm x 200 µm) possédant un pas minimal de 4 nm en latéral et 0.5 nm en vertical, et les cartes grand champ avec une table motorisée (champ maximal : 2.5 cm x 2.5 cm) possédant un pas minimal de 100 nm. Le microscope est couplé à un spectromètre très haut débit (UHTS 300, WITec, Allemagne). Les cartes grand champ sont réalisées avec un objectif Nikon 20x (NA 0.4) et un pas latéral d'échantillonnage de 3,33 µm ; les cartes hautes résolutions sont réalisées avec un objectif Nikon 100x (NA 0.9) et un pas de 370 nm. Deux lasers d'excitations différentes (532 nm et 785 nm) sont disponibles. Le laser proche infrarouge (785 nm) est généralement utilisé pour les échantillons présentant une épifluorescence trop forte à 532 nm, celle-ci étant bien plus réduite à 785 nm. Mais lorsque la fluorescence de l'échantillon le permet, l'utilisation du laser vert (532 nm) améliore légèrement la résolution spatiale tout en donnant accès à une plus large gamme spectrale : de 70 cm^{-1} (domaine typique des modes vibrationnels externes des mailles de composés massifs) jusqu'à 3600 cm^{-1} (domaine plus typique des modes vibrationnels internes de groupes fonctionnels des molécules). Ce dispositif est donc généralement préféré, car il rend possible la caractérisation d'un plus grand nombre de groupes fonctionnels de la phase organique. Le polymorphe de carbonate de calcium exprimé est quant à lui facilement identifié par ses modes externes et/ou internes (Bischoff *et al.*, 1985; Behrens *et al.*, 1995).

Le logiciel WITecProject (verion 2.04) est utilisé pour le traitement des spectres et des cartographies ; les positions des pics Raman sont raffinées en utilisant la routine "Mulipeak Fitting 2" du logiciel IGOR Pro (v 6.11, WaveMetrics, Inc. USA), en sélectionnant comme fonction d'ajustement une fonction de répartition gaussienne.

Note concernant la résolution : La résolution latérale est variable selon les objectifs utilisés ; en l'absence de diaphragme réglable dans le plan image (il s'agit d'un pinhole calibré de dimension fixe), nous pouvons l'estimer par le critère de Rayleigh (cf équation 5.1) : elle est ainsi par exemple de 520 nm, si l'on utilise une longueur d'onde d'excitation de 785 nm et l'objectif 100x (N.A. 0,9). Avec un pas de 370 nm, les cartes sont donc légèrement sur-échantillonnées à cette longueur d'onde.

Micro- spectroscopie XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure).

Une section radiale de l'échantillon est préparée et polie avec papiers Hermes P1200, P2400 et P4000, suspensions de diamants polycristallins (3 µm et 1 µm), puis soigneusement rincée à l'eau déminéralisée et légèrement attaquée à l'aide d'une solution d'acide acétique (1% v/v) pendant 5 sec afin d'éliminer les pollutions de surface et/ou résidus de polissage.

Les observations sont réalisées sur la ligne de lumière ID21 de l'ESRF (Grenoble, France)qui offre une fenêtre d'énergies disponibles allant de 2 à 9 keV. L'énergie du faisceau X est ici réglée pour le seuil d'absorption K du soufre (2472 eV) à l'aide d'un monochromateur à deux cristaux de Si (111), dont la grande résolution en énergie ($\Delta E/E=10^{-4}$) est nécessaire pour accéder aux détails spectroscopiques fins à proximité du front d'absorption X ; le flux de photons est de 2.5×10^9 photon/s. Le microscope X à balayage (SXM) (Susini *et al.*, 2002) utilise une optique focalisante constituées de lentilles diffractives de Fresnel, qui permettent d'obtenir un faisceau submicrométrique (0.2x0.7 µm). Les observations sont réalisées sous vide poussé, afin d'éviter toute absorption des raies spectrales du soufre par l'air. Un détecteur HPGe (germanium de haute pureté) à dispersion en énergie (Princeton Gamma-Tech, New Jersey) est monté dans le plan horizontal perpendiculaire au faisceau pour collecter les photons X de fluorescence émis par la surface de l'échantillon (la géométrie de ce montage permettant de réduire au minimum toute contribution liée à la diffusion élastique).

Le µ-XANES permet de cartographier les distributions du soufre dans ses différents états de spéciation avec une résolution spatiale micro/sub-micrométrique (Pickering *et al.*, 1998, Dauphin *et al.*, 2003a, Dauphin *et al.*, 2005, De Stasio *et al.*, 2005, Cusack *et al.*, 2008b). Pour ce faire, des spectres de référence sont réalisés sur des standards riches en soufre autour du seuil K du soufre (entre 2450 et 2540 eV) avec un faisceau défocalisé : la chondroïtine sulfate est utilisée comme référence des polysaccharides sulfatés, le gypse comme référence des sulfates inorganiques, et la méthionine, cystéine et cystine comme références pour des acides aminés soufrés. Les spectres d'absorption au seuil K du S de la méthionine, de la cystéine et de la cystine présentent tous un pic principal à 2473 eV. Les spectres d'absorption au seuil K du S de la chondroïtine sulfate et du gypse présentent tous deux un pic principal à 2482 eV, mais chacun avec une structuration bien spécifique dans la partie EXAFS du spectre (Figure 15b). Lorsque l'on prend soin de vérifier que les signatures spectrales de l'échantillon à 2473 eV et 2482 eV correspondent bien aux profils des standards organiques (pic principal + partie EXAFS), des cartographies réalisées à ces deux énergies permettent ainsi de visualiser les distributions des ces deux types de composés organiques, acides aminés soufrés et polysaccharides sulfatés, dans l'échantillon. Ces cartes ne sont pas quantitatives.

Puisque d'autres éléments dont les seuils d'absorption sont plus bas que le seuil K du soufre sont aussi excité à 2,5 keV, et réémettent donc des photons X de fluorescence, certaines compositions élémentaires (Sr, P) peuvent ainsi être déterminées simultanément à l'acquisition des cartes du S. Mais les cartes de distributions obtenues pour ces éléments ne sont pas, elle non plus, quantitatives.

5.2.5 Chromatographies

Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).

Les échantillons sont décontaminés dans un bain de NaClO (5% v/v) pendant 1h, puis placés dans un bain à ultrasons pendant 1 min. Ils sont ensuite rincés à l'eau déminéralisée, étuvés à 40°C pendant 24h, puis finement broyés à l'aide d'un broyeur électrique à billes. La poudre obtenue est ensuite mise en suspension dans 10 ml d'eau déminéralisée, puis subit une décalcification modérée par l'adjonction progressive d'acide acétique (50% v/v) de façon à maintenir un pH supérieur à 4. Lorsque la décalcification est complète, le soluté est centrifugé à 18 000 g pendant 15 min afin de séparer la matrice organique soluble (MOS) de la matrice organique insoluble (MOI). Alors que la MOI, impropre à l'analyse en HLPC, est rincée puis directement lyophilisée et stockée pour d'autres analyses (FT-IR), la MOS est totalement dessalée à l'eau déminéralisée dans des cellules d'ultrafiltration (Filtron) équipées de membranes séparatrice 3 kDa (équivalent pour tailles de molécules globulaires) : les très petits poids moléculaires (< 3 kDa) sont ainsi éliminés en même temps que les sels de décalcification, et donc perdus. La SOM est ensuite lyophilisée, puis stockées.

Pour analyse, le lyophilisat de SOM est dissous dans un tampon de Tris (0,2 mM, pH=7,5) pendant une nuit. Les analyses sont effectués à température ambiante, à l'aide de deux colonnes TSK-gel montées en série (TSK G5000PWXL et G3000PWXL) qui permettent une séparation théorique des protéines dont le poids moléculaire est compris entre 200 et 1.10^6 Da. Le flux est de 0.4 ml/min (0.8 ml/min dans le cas de la section 3.1.4). Les molécules sont détectées à l'aide : 1/d'un réfractomètre à haute sensibilité PE 200 (Perkin Elmer) et d'un détecteur barrette de diodes série 1200 (Agilent) dont les canaux sont fixés à 210, 226, 254 et 278 nm.

La calibration des poids moléculaires (PM) s'effectue en étalonnant les colonnes avec un jeu de standards (Biorad) de poids moléculaires connus : aprotinine (PM=10,8 kDa), ribonucléase (PM= 13,7 kDa), chymotrypsine (PM=25 kDa), pepsine (PM=34,7 kDa), BSA (PM=67 kDa), ferritine (PM=440 kDa) et thyroglobuline (PM=660 kDa).

Note : Les molécules utilisées comme standards étant globulaires, les poids moléculaires ainsi calculés ne sont théoriquement valables que pour des molécules de formes similaires, ce qui n'est pas forcément le cas de la vaste majorité des molécules constituant les SOM extraites de nos coquilles. Ceci peut ainsi conduire à des biais très significatifs, difficilement quantifiables : les poids donnés sont donc purement estimatifs.

Chromatographie en phase gazeuse (GC).

Les coquilles sont décontaminées dans un bain de NaClO (5% v/v) pendant 1h, puis placées dans un bain à ultrasons pendant 1 min. Elles sont ensuite rincées à l'eau déminéralisée, étuvées à 40°C pendant 24h, puis finement broyées à l'aide d'un broyeur électrique à billes. La poudre obtenue est ensuite placée dans des timbales d'extraction en cellulose. L'extraction de la phase lipidique est réalisée au chloroforme à l'aide d'un extracteur Soxhlet SER148 (Agilent) : la timbale est trempée dans 30 ml de solvant pendant 30 min, qui est ensuite porté à ébullition à 160°C ; la phase de séchage finale est réalisée à 60°C sur platine chauffante.

La fraction lipidique obtenue est finalement solubilisée dans l'hexane et injectée dans un GC 7820A (Agilent) équipé d'une colonne apolaire HP-5 (Agilent) et d'un détecteur à flamme (FID), en utilisant l'hydrogène comme gaz vecteur (injection en mode splitless, pression de 10 psi). Un gradient de 3°C/min est appliqué, en respectant une série de plateaux de stabilisation (50°C - 10 min ; 110°C - 20 min ; 240°C - 10 min).

Les molécules sont ainsi séparées à la fois selon leur encombrement stérique et le nombre/répartition de leurs groupements fonctionnels. Cette double dépendance du temps de rétention, associée à la complexité des assemblages lipidiques, rendent les chromatogrammes difficilement interprétables en première approche, et la comparaison à des standards simples peu informative. Si l'interprétation reste ainsi peu évidente et limitée, la comparaison entre échantillons permet toutefois de révéler des différences significatives (Figure 62).

Financements :

Ces travaux ont été soutenus :
- par le CNRS par l'intermédiaire de l'action interdisciplinaire AIR-Archéométrie.
- par le programme SYNTHESIS II (http ://www.synthesis.info/), financé par l'Infrastructure de Recherche de la Communauté Européenne (Programme FP7, projet n° GB-TAF-1525 "Characterization of the micro-structural organization and very fine-scale patterns of biocarbonated mollusk shells").
- par l'Institut National des Sciences de l'Archéologie et du Patrimoine (dir. A. Akerraz) et le Ministère de la Culture du Maroc, ainsi que la Mission archéologique El Harhoura-Témara, financée par la Commission consultative des recherches archéologiques à l'étranger du Ministère des Affaires Etrangères et Européennes (France) - pour l'obtention d'échantillons archéologiques.
- par l'Agence Nationale de la Recherche, à travers le programme 'La 6e Extinction', (ANR-09-PEXT-004 MOHMIE, sous la direction de C. Denys) pour la prise en charge d'une partie des missions de terrain.

Bibliographie

Bibliographie

A guide to fluorescent probes and labeling technologies. The Molecular Probes® Handbook, 11e édition, 2010.

P.H. Abelson : Amino acids in fossils. *Science*, 119, 576, 1954.

P.H. Abelson : Organic constituents of fossils. *Treatise on marine ecol. and paleoecol. vol.2 paleoecology, LADD H.S. ed. Geol. Soc. America Mem.*, 67, 87–92, 1957.

J.F. Adkins, E.A. Boyle, W.B. Curry et A. Lutringer : Stable isotopes in deep-sea corals and a new mechanism for "vital effects". *Geochim. Cosmochim. Acta 67/6 : 1129-1143*, 2003.

A. Baronnet, JP Cuif, Y. Dauphin, B. Farre et J. Nouet : Crystallization of biogenic Ca-carbonate within organo-mineral micro-domains. structure of the calcite prisms of the Pelecypod *Pinctada margaritifera* (Mollusca) at the submicron to nanometre ranges. *Mineralogical Magazine*, 72(2):617–626, 2008.

G. Behrens, L.T. Kuhn, R. Ubic et A.H. Heuer : Raman spectra of vateritic calcium carbonate. *Spectroscopy letters*, 28(6):983–995, 1995.

E. Benoit, S. Brown, J. Dompierre, B. Satiat-jeunemaitre et M.-N. Soler : Formation : Atelier de microscopie confocale. *Formation permanente, CNRS Ile de France Sud*, 2011.

W.D. Bischoff, S.K. Sharma et F.T. Mackenzie : Carbonate ion disorder in synthetic and biogenic magnesian calcites : a Raman spectral study. *Amer. Mineralogist*, 70, 581–589, 1985.

D. Blamart, C. Rollion-Bard, J.P. Cuif, A. Juillet-Leclerc, A. Lutringer, T.C.E. van Weering et J.P. Henriet : C and O isotopes in a deep-sea coral (*Lophelia pertusa*) related to skeletal microstructure. *Coldwater Corals and Ecosystems. Springer-Verlag Publ., Berlin*, 1005–1020, 2005.

0.B. Bøggild : The shell structure of the molluscs. *D. Kgl. Danske Vidensk. Selsk. Skr., naturvidensk. og mathem.*, 9(2, 2):231–326., 1930.

L. Bonizzoni, S. Bruni, A. Girod et V. Guglielmi : Archaeometric study of shells of Helicidae from the Edera cave (Northeasteern Italy). *Archaeometry*, 51(1):151–173, 2009.

B. Borzecka-Prokop, A. Weselucha-Birczynska et E. Koszowska : MicroRaman, PXRD, EDS and microscopic investigation of magnesium calcite biomineral phases. The case of sea urchin biominerals. *J. Mol. Struct.*, 828, 80–90, 2007.

A. Boskey et N.P. Camacho : FT-IR imaging of native and tissue-engineered bone and cartilage. *Biomaterials*, doi :10.1016/j.biomaterials.2006.11.043, 2007.

L. Boudad, A. Lenoble, D. Chahid, A. Chakroun, Z. Jacobs, L. Sitzia, R. Nespoulet et M. A. El-Hajraoui : Contexte géologique et nouvelles données des environnements des Hommes préhistoriques de la côte atlantique région de Rabat-Skhirat, au cours du dernier interglaciaire. in prep.

J.S. Bowerbank : On the structure of the shells of molluscous and conchiferous animals. *Transactions of the Microscopical Society*, 1, 123–154, 1843.

DF Bradley : Molecular biophysics of dye-polymer complexes. *Trans. NY Acad. Sci*, 24(64-74):9, 1961.

W.L. Bragg : The structure of aragonite. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, 16–39, 1924. ISSN 0950-1207.

C. Brahmi : Study of Scleractinian coral biomineralization using 86 Sr-labeling and NanoSIMS ion-microprobe imaging. *PhD Thesis*, 2011.

G. Brandes et E. Reale : The reaction of acridine orange with proteoglycans in the articular cartilage of the rat. *The Histochemical Journal*, 22(2):106–112, 1990.

WH Brown, WS Fyfe et FJ Turner : Aragonite in california glaucophane schists, and the kinetics of the aragonite-calcite transformation. *Journal of Petrology*, 3(3):566–582, 1962.

D.M. Byler et H. Susi : Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers*, 25(3):469–487, 1986.

E. Campmas : Caractérisation de l'occupation des sites de la région de Témara (Maroc) au Pléistocène supérieur et nouvelles données sur la subsistance des Hommes du Paléolithique moyen d'Afrique du Nord : Exemples des approches taphonomiques et archéozoologiques menées sur les faunes d'El Harhoura 2 et d'El Mnasra. *Unpublished PhD Thesis, University of Bordeaux 1, France.*, 2012.

É. Campmas et C. Beauval : Consommation osseuse des carnivores : résultats de l'étude de l'exploitation de carcasses de bœufs (*Bos taurus*) par des loups captifs. *In Annales de paléontologie*, volume 94, 167–186. Elsevier, 2008.

A.G. Checa : A new model for periostracum and shell formation in Unionidae (Bivalvia, Mollusca). *Tissue & Cell 32/5 :405-416*, 2000.

J.H. Chemnitz, J.S. Schröder et F.H.W. Martini : *Neues systematisches Conchylien-Cabinet.* Raspe, 1788.

P.L. Clode et A.T. Marschall : Low temperatures FESEM of the calcifying interface of a scleractinian coral. *Tissue & Cell*, 34, 3, 187–198, 2002.

H. Cölfen et M. Antonietti : Mesocrystals and nonclassical crystallization. *Wiley Eds.*, 276 p., 2008.

J.D. Collins : Assessing mussel Shell diagenesis in the modern vadose Zone at LYONS Bluff (22OK520), northeast Mississippi. *Journal of Archaeological Science*, 39:3694–3705, 2012.

M Cossmann et G Pissarro : Iconographie completé des coquilles fossiles de l'Eocène des environs de Paris. 2, 1910-1913.

M. Cotte, E. Checroun, V. Mazel, VA Solé, P. Richardin, Y. Taniguchi, P. Walter et J. Susini : Combination of FTIR and X-RAYS Synchrotron-Based Micro-Imaging Techniques for the Study of Ancient Paintings. A Practical Point of View. *E-Preservation Science*, 6, 2008.

P.J.F. Coutts : Bivalve-growth patterning as a method for seasonal dating in archaeology. *Nature*, 226:874, 1970.

M.A. Crenshaw : The soluble matrix from *Mercenaria mercenaria* shell. *Biomineralization*, 6, 6–11, 1972.

J.-P. Cuif et Y. Dauphin : The two-step mode of growth in the scleractinian coral skeletons from the micrometre to the overall scale. *J Struct Biol*, 150(3):319–331, 2005. ISSN 1047-8477 (Print).

J.-P. Cuif, Y. Dauphin, A. Denis, D. Gaspard et J.-P. Keller : Continuité et périodicité du réseau organique intraprismatique dans le test de *Pinna muricata* Linné (Lamellibranches). *C. R. Acad. Sci. Paris*, 290(D):759–762, 1980.

J. P. Cuif, Y. Dauphin, B. Farre, G. Nehrke, J. Nouet et M. Salomé : Distribution of sulphated polysaccharides within calcareous biominerals suggests a widely shared two-step crystallization process for the microstructural growth units. *Mineralogical Magazine*, 72(1):233–237, 2008a.

J. P. Cuif, Y. Dauphin, A. Meibom, C. Rollion-Bard, M. Salomé, J. Susini et C. T. Williams : diagenesis over crystallfine-scale growth patterns in coral skeletons : biochemical control. *2008Geological Society, London, Special Publications*, 303(87-96), 2008b.

J.-P. Cuif, Y. Dauphin et J.E. Sorauf : Biominerals and fossils through time. *Cambridge University Press*, ISBN : 9780521874731, 2011.

J.-P. Cuif, A. Denis et D. Gaspard : Recherche d'une méthode d'analyse ultrastructurale des tests carbonatés d'invertébrés. *Bull. Soc. géol. Fr.*, 13, 5, 525–534, 1981.

Jean-Pierre Cuif, Azzedine Bendounan, Yannicke Dauphin, Julius Nouet et Fausto Sirotti : Synchrotron-based photoelectron spectroscopy provides evidence for a molecular bond between calcium and mineralizing organic phases in invertebrate calcareous skeletons. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 405(27):8739–8748, 2013.

J.P. Cuif et Y. Dauphin : *Les étapes de la découverte des rapports entre la terre et la vie : une introduction à la paléontologie*. Éd. Scientifiques GB, 2003.

J.P. Cuif, Y. Dauphin, P. Berthet et J. Jegoudez : Associated water and organic compounds in coral skeletons : quantitative thermogravimetry coupled to infrared absorption spectrometry. *Geochem. Geophys. Geosyst.*, doi :10.1029/2004GC000783, 2004.

J.P. Cuif, Y. Dauphin, P. Gautret et A. Raguideau : Intérets d'une procédure d'extraction et de fractionnement chromatographique de la composante organique des tests carbonatés actuels et fossiles. *Bull. Soc. géol. Fr.*, 8, V(3):569–575, 1989.

M Cusack, Y Dauphin, P Chung, A Perez-Huerta et J-P Cuif : Multiscale structure of calcite fibres of the shell of the brachiopod *Terebratulina retusa*. *J Struct Biol*, 164(1):96–100, Oct 2008a. ISSN 1095-8657 (Electronic).

M. Cusack, Y. Dauphin, J.-P. Cuif, M. Salomé, A. Freer et H. Yin : Micro-XANES mapping of sulphur and its association with magnesium and phosphorus in the shell of the brachiopod, *Terebratulina retusa*. *Chem. Geol.*, 253:172–179, 2008b.

E.S. Dana : The system of mineralogy of James Dwight Dana. *John Wiley & Sons, Inc., London*, 1134 p., 1914.

Y. Dauphin : Infrared spectra and elemental composition in recent carbonate skeletons : relationships between the 2 band wavenumber and Sr and Mg concentrations. *Appl. Spectrosc.*, 51 (2):253–258, 1997.

Y. Dauphin : Comparative studies of skeletal soluble matrices from some scleractinian corals and molluscs. *International journal of biological macromolecules*, 28(4):293–304, 2001.

Y. Dauphin : Mineralizing matrices in the skeletal axes of two Corallium species (Alcyonacea). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 145(1):54–64, Sep 2006. ISSN 1095-6433 (Print).

Y. Dauphin : The nanostructural unity of mollusc shells. *Mineralogical Magazine*, DOI : 10.1180/minmag.2008.072.1.243, 2008.

Y. Dauphin, A.D. Ball, M. Cotte, J.-P. Cuif, A Meibom, M. Salomé, J. Susini et C.T. Williams : Structure and composition of the nacre-prisms transition in the shell of *Pinctada margaritifera* (Mollusca, Bivalvia). *Anal. Bioanal. Chem.*, 390(6):1659–1669, Mar 2008. ISSN 1618-2650 (Electronic).

Y. Dauphin, A. Brunelle, M. Cotte, JP Cuif, B. Farre, O. Laprévote, A. Meibom, M. Salomé et CT Williams : A layered structure in the organic envelopes of the prismatic layer of the shell of the pearl oyster *Pinctada margaritifera* (Mollusca, Bivalvia). *Microscopy and Microanalysis*, 16(01):91–98, 2010. ISSN 1435-8115.

Y. Dauphin, J. Cuif, J. Doucet, M. Salomé, J. Susini et C. Williams : In situ mapping of growth lines in the calcitic prismatic layers of mollusc shells using X-ray absorption near-edge structure (XANES) spectroscopy at the sulphur K-edge. *Marine Biol.*, 142(2):299–304, 2003a.

Y. Dauphin, J.-P. Cuif, M. Cotte et M. Salomé : Structure and composition of the boundary zone between aragonitic crossed lamellar and calcitic prism layers in the shell of *Concholepas concholepas* (Mollusca, Gastropoda). *Invertebrate Biology*, 131(3):165–176, 2012.

Y. Dauphin, J.-P. Cuif, J. Doucet, M. Salomé, J. Susini et C.T. Willams : In situ chemical speciation of sulfur in calcitic biominerals and the simple prism concept. *Journal of structural biology*, 142(2):272–280, 2003b.

Y. Dauphin, J.-P. Cuif, M. Salomé et J. Susini : Speciation and distribution of sulfur in a mollusk shell as revealed by in situ maps using X-ray absorption near-edge structure (XANES) spectroscopy at the S K-edge. *Amer. Min.*, 90:1748–1758., 2005.

Y. Dauphin et A. Denis : Structure and composition of the aragonitic crossed lamellar layers in six species of Bivalvia and Gastropoda. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 126 (3):367–377, 2000.

Y. Dauphin et E. Dufour : Nanostructures of the aragonitic otolith of cod *(Gadus morhua). Micron*, 39(7):891–896, Oct 2008. ISSN 0968-4328 (Print).

J.L. De Bournon : Traité complet de la chaux carbonatée et de l'arragonite. *Eds : William Phillips, London*, 3 vols, 1808.

P.D. De Montfort : Conchyliologie systématique, et classification méthodique des coquilles : offrant leurs figures, leur arrangement générique, leurs descriptions caractt eristiques, leurs noms, ainsi que leur synonymie en plusieurs langues. *Ed F. Schœll*, 1810.

G. De Stasio, M.A. Schmitt et S.H. Gellman : Spectromicroscopy at the organic-inorganic interface in biominerals. *Amer. J. Sci.*, 305:673–686, 2005.

B. Demarchi, K. Rogers, DA Fa, CJ Finlayson, N. Milner et KEH Penkman : Intracrystalline protein diagenesis (IcPD) in *Patella vulgata*. Part I : Isolation and testing of the closed system. *Quaternary Geochronology*, in press, 2012.

A. Denis : Essai sur la microstructure du test de lamellibranches. *Thèse 3e cycle Univ. Paris sud*, 85 p., 1972.

H. Ehrlich : Biological materials of marine origin. *Springer*, ISBN :978–90–481–9129–1 DOI :10.1007/978/90/481/9130, 2010.

M. A. El Hajraoui, R. Nespoulet, A. Debénath et H.L. Dibble : Préhistoire de la région de Rabat-Témara, Études et Travaux d'Archéologie Marocaine, Rabat. in press.

D.A. Fa : Effects of tidal amplitude on intertidal resource availability and dispersal pressure in prehistoric human coastal populations : the Mediterranean-Atlantic transition. *Quaternary Science Reviews*, 27(23-24):2194–2209, 2008.

B. Farre, A. Brunelle, O. Laprévote, J.P. Cuif, C.T. Williams et Y. Dauphin : Shell layers of the black-lip pearl oyster *Pinctada margaritifera* : Matching microstructure and composition. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Biochemistry and Molecular Biology*, 2011. ISSN 1096-4959.

B. Farre, J.-P. Cuif et Y. Dauphin : Occurence and diversity of lipids in modern coral skeletons. *Zoology*, doi :10.1016/j.zool.2009.11.004, 2010.

B. Farre et Y. Dauphin : Lipids from the nacreous and prismatic layers of two Pteriomorpha Mollusc shells. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 152(2):103–109, 2009.

L. Feugueur : L'Yprésien du Bassin de Paris : essai de monographie stratigraphique. *Mémoires pour servir à l'explication de la carte géologique détaillée de la France*, 600 p., 1963.

N. Floquet et D. Vielzeuf : Mesoscale twinning and crystallographic registers in biominerals. *American Mineralogist*, 96(8-9):1228, 2011.

E. Frémy : Recherches chimiques sur les os. *Ann. Chim. Paris*, 43, 13è sér., 47–107, 1855.

G.M. Friedman : Identification of carbonate minerals by staining methods. *J. Sed. petrol.*, 29, 1, 87–97, 1959.

E. Fritsch et S. Karampelas : Comment on "determination of carotenoid as the purple pigment in *Gorgonia ventalina* sclerites using Raman spectroscopy" [Leverette et al., Spectrochim. acta A, 69 (2008) 1058-61]. *Spectrochim. acta*, doi :10.1016/j.saa.2008.05.004, 2008.

T. Fuchigami et T. Sasaki : The shell structure of the recent Patellogastropoda (Mollusca : Gastropoda). *Paleontological Research*, 9(2):143–168, 2005.

P. Gautret, J.-P. Cuif et J. Stolarski : Organic components of the skeleton of scleractinian corals - evidence from in situ acridine orange staining. *Acta Palaeontol. Pol.*, 45(2):107–118, 2003.

M. Gilis, O. Grauby, P. Willenz, P. Dubois, L. Legras, V. Heresanu et A. Baronnet : Multi-scale mineralogical characterization of the hypercalcified sponge *Petrobiona massiliana* (Calcarea, Calcaronea). *Journal of Structural Biology*, 2011.

J.F. Gmelin : Systema Naturea per Regna tria Naturae (Linne, Editie Decima Tertia, Aucta Reformata). *Leipzig.)(Not read.)*, 1788.

P.M. Gocze et D.A. Freeman : Factors underlying the variability of lipid droplet fluorescence in MA-10 leydig tumor cells. *Cytometry*, 17(2):151–158, 1994.

Przemysław Gorzelak, Jarosław Stolarski, Philippe Dubois, Christophe Kopp et Anders Meibom : 26 Mg labeling of the sea urchin regenerating spine : Insights into echinoderm biomineralization process. *Journal of Structural Biology*, 176(1):119–126, 2011.

C. Grégoire : Topography of the organic components in mother-of-pearl. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 3, 5, 798–808, 1957.

C. Gregoire : Conchiolin remnants in mother-of-pearl from fossil Cephalopoda. *Nature, Lond.*, (184):1157–58, 1959.

C. Grégoire : Further studies on structure of the organic components in mother-of-pearl, especially in Pelecypods. *Bull. Inst. Roy. Sci. nat. Belg.*, 36, 23, 1–22, 1960.

C. Grégoire : Sur la structure submicroscopique de la conchioline associée aux prismes des coquilles de mollusques. *Inst. Roy. Sc. Nat. Belg. Bull.*, 37, 3, 1–34, 1961.

C. Grégoire : Sur la structure des matrices organiques des coquilles de mollusques. *Biol. Rev.*, 42, 653–687, 1967.

C. Grégoire, G. Duchateau et M. Florkin : La trame protidique des nacres et des perles. *Ann. Inst. Océanogr.*, 31:1–36., 1955.

C. Grégoire et C. Teichert : Conchiolin membranes in shell and cameral deposits of Pennsylvanian Cephalopods, Oklahoma. *Oklahoma Geol. Notes*, 25, 7, 174–204, 1965.

D.P. Grigorev : Ontogeny of minerals. *Israel Program for Scientific Translations : Jerusalem*, 1965.

N. Guzman, Y. Dauphin, J. P. Cuif, A. Denis et L. Ortlieb : Diagenetic changes in *Concholepas concholepas* shells (Gastropoda, Muricidae) in the hyper-arid conditions of Northern Chile - Implications for palaeoenvironmental reconstructions. *Biogeosciences Discuss.*, 5:1–30, 2008.

A. Hall et W.J. Kennedy : Aragonite in fossils. *Proc. Royal Society of London*, B, 168, 1013, 377–412, 1967.

C. Hedegaard, C. Bardeau et J.F. Chateigner : Molluscan shell pigments : an in situ resonance raman study. *J. Molluscan Stud.*, 72, 157–162, 2005.

C. Heim, P. Sjövall, J. Lausmaa, T. Leefmann et V. Thiel : Spectral characterisation of eight glycerolipids and their detection in natural samples using time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23(17):2741–2753, 2009. ISSN 1097-0231.

Y. Hikida, S. Suzuki, Y. Togo et M. Shimamoto : Secondary aragonite replacing organic matrices of nacreous layer in the fossil shells of *Acila divaricata* (Mollusca : Bivalvia). *29th Intern. Geol. Congr. Abs 24 Aug. - 3 sept. 1992, Kyoto Jap., vol. 2 of 3, II-3-2 P-4, p. 343*, 1992.

S. Hild, O. Marti et A. Ziegler : Spatial distribution of calcite and amorphous calcium carbonate in the cuticle of the terrestrial crustaceans *Porcellio scaber* and *Armadillidium vulgare*. *J. Struct. Biol.*, 163, 100–108, 2008.

JB Hopkins et LA Farrow : Raman microprobe determination of local crystal orientation. *Journal of applied physics*, 59(4):1103–1110, 1986.

CO Hunt, TG Reynolds, HA El-Rishi, A. Buzaian, E. Hill et GW Barker : Resource pressure and environmental change on the North African littoral : Epipalaeolithic to Roman gastropods from Cyrenaica, Libya. *Quaternary International*, 244(1):15–26, 2011.

M. Istin et A. Masoni : Absorption et redistribution du calcium dans le manteau des lamellibranches en relation avec la structure. *Calcified tissue research*, 11(2):151–162, 1973.

K. Iwata : Ultrastructural disintegration trend of fossil conchiolin. *J. Geol. Soc. Japan*, 81, 3, 155–164, 1975.

Z. Jacobs, R.G. Roberts, R. Nespoulet, M.A. El Hajraoui et A. Debénath : Single-grain OSL chronologies for Middle Palaeolithic deposits at El Mnasra and El Harhoura 2, Morocco : Implications for Late Pleistocene human–environment interactions along the Atlantic coast of northwest Africa. *Journal of human evolution*, 2012.

N. Janati-Idrissi, C. Falguères, M. Haddad, R. Nespoulet, M.A. El-Hajraoui, A. Debenath, L. Bejjit, J.J. Bahain, P. Michel et T. Garcia : Datation par ESR-U/Th combinées de dents fossiles des grottes d'El Mnasra et d'El Harhoura 2, région de Rabat-Témara. Implications chronologiques sur le peuplement du Maroc Atlantique au Pléistocène supérieur et son environnement. *Quaternaire*, 23(1):25–35, 2012.

G.C. Jones et B. Jackson : *Infrared transmission spectra of carbonate minerals.* Springer, 1993.

C. Joubert, D. Piquemal, B. Marie, L. Manchon, F. Pierrat, I. Zanella-Cleon, N. Cochennec-Laureau, Y. Gueguen et C. Montagnani : Transcriptome and proteome analysis of *Pinctada margaritifera* calcifying mantle and shell : focus on biomineralization. *B.M.C. Genomics*, 11, 613, 2010.

S. Kamat, H. Kessler, R. Ballarini, M. Nassirou et A.H. Heuer : Fracture mechanisms of the *Strombus gigas* conch shell : II-micromechanics analyses of multiple cracking and large-scale crack bridging. *Acta Materialia*, 52:2395–2406, 2004.

S. Karampelas : Etude du changement de couleur des perles par traitement. *PhD Thesis*, 2008.

A. Kaufman, WS Broecker, T.L. Ku et DL Thurber : The status of U-series methods of mollusk dating. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 35(11):1155–1183, 1971.

J.P. Keller : Le dégagement du matériel minéral des tests d'invertébrés (Bivalves) par protéolyse enzymatique de la trame organique. *Geobios*, 14, 2, 269–273, 1981.

R.G. Klein, G. Avery, K. Cruz-Uribe, D. Halkett, J.E. Parkington, T. Steele, T.P. Volman et R. Yates : The Ysterfontein 1 Middle Stone Age site, South Africa, and early human exploitation of coastal resources. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(16):5708–5715, 2004.

I. Kobayashi : Introduction to the shell structure of bivalvian molluscs. *Earth Science*, 73:1–12, 1964.

I. Kobayashi : Internal shell microstructure of recent bivalvian molluscs. *Sci. Reports Niigata Univ.*, ser. E(2):27–50., 1971.

I. Kobayashi : Nacreous and crossed lamellar layers of Bivalvia : diversity and evolution. *in : Biomineralization (BIOM2001) : formation, diversity, evolution and application, Proc. of the 8th Int. Symp. on Biomineralization, KOBAYASHI I. & OZAWA H. eds, Tokai Univ. Press, Kanagawa, 88-91*, 2004.

I. Kobayashi et J. Akai : Twinned aragonite crystals found in the bivalvian crossed lamellar shell structure. *J. Geol. Soc. Japan*, 100(2):177–179, 1994.

I. Kobayashi et T. Samata : Bivalve shell structure and organic matrix. *Mat. Sci. Engineer.*, C (26):692–698, 2006.

G. Krampitz, J. Engels et C. Cazaux : Biochemical studies on water-soluble proteins and related components of gastropod shells. *The mechanisms of mineralization in the invertebrates and plants, Watabe N. and Wilbur K.M. eds., The Belle Baruch Library in Marine Science, Univ. of South Carolina Press*, 5:155–173, 1976.

S. Krimm et J. Bandekar : Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Adv. Protein Chem.*, 38(181):364, 1986.

JB de Lamarck : Suite des mémoires sur les fossiles des environs de Paris. *In Annales du Museum*, volume 5, 179–180, 1804.

J.H. Leal : Gastropods. *The living marine resources of the western central Atlantic, Vol. 1 - Introduction, molluscs, crustaceans, hagfisches, sharks, batoid fishes and chimaeras, K.E. Carpenter (eds.).*, ISSN 1020-6868, 2002.

M. Lebon, K. Müller, J.J. Bahain, F. Fröhlich, C. Falguères, L. Bertrand, C. Sandt et I. Reiche : Imaging fossil bone alterations at the microscale by SR-FTIR microspectroscopy. *J. Anal. At. Spectrom.*, doi :10.1039/c0ja00250j, 2011.

Haoze Li, Zhi-Hui Xu et Xiaodong Li : Multiscale Hierarchical Assembly Strategy and Mechanical Prowess in Conch Shells (*Busycon carica*). *Journal of Structural Biology*, 184:409–416, 2013.

H.A. Lowenstam : Minerals formed by organisms. *Science*, 211, 1126–1131, 1981.

H.A. Lowenstam et S. Weiner : On biomineralization. *Oxford University Press, 324 p.*, 1989.

K. Mann, E. Edsinger-Gonzales et M. Mann : In-depth proteomic analysis of a mollusk shell : acid-soluble and acid-insoluble matrix of the limpet *Lottia gigantea*. *Proteome Sci.*, 10, 28, 1–18, 2012.

S. Mann : Molecular recognition in biomineralization. *Nature*, 332 : 119–124, 1988.

F. Marin, G. Luquet, B. Marie et D. Medakovic : Molluscan shell proteins : primary structure, origin, and evolution. *Current topics in developmental biology*, 80:209–276, 2007.

R.L. Marlowe et R.M. Dillaman : Acridine orange staining of decapod crustacean cuticle. *Invertebrate Biol. 114/1 : 79-82*, 1995.

J.C. Marxen et W. Becker : The organic shell matrix of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. *Comp. Biochem. Physiol. 118B/1 : 23-33*, 1997.

C. McClintock : Shell structure of patelloid and bellerophontoid gastropods (Mollusca). *Bull. Pea- body Mus. Nat. Hist. Yale Univ.*, 22:1–140, 1967.

J.M. McCrea : On the isotopic chemistry of carbonates and a paleotemperature scale. *The Journal of Chemical Physics*, 18:849, 1950.

A. Meibom, S. Mostefaoui, J.P. Cuif, Y. Dauphin, F. Houlbrèque, R. Dunbar et B. Constantz : Biological forcing controls the chemistry of reef-building coral skeleton. *Geophys. Res. Lett.*, doi :10.1029/2006GL028657, 2007.

S. Melancon, B.J. Fryer, S.A. Ludsin, J.E. Gagnon et Z. Yang : Effects of crystal structure on the uptake of metals by lake trout (*Salvelinus namaycush*) otoliths. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 62(11):2609–2619, 2005.

R. Menig, M.H. Meyers, M.A. Meyers et K.S. Vecchio : Quasi-static and dynamic mechanical response of *Strombus gigas* (conch) shells. *Materials Science and Engineering*, A(297):203–211, 2001.

J.C. Merlin : Resonance raman spectroscopy of carotenoids and carotenoid-containing systems. *Pure Appl. Chem.*, 57, 5, 785–792, 1985.

P. Michel, E. Campmas, E. Stoetzel, R. Nespoulet, M.A. El Hajraoui et F. Amani : Upper Palaeolithic (layer 2) and Middle Palaeolithic (layer 3) large faunas from El Harhoura 2 Cave (Temara, Morocco) : paleontological, paleoecological and paleoclimatic data. *Historical Biology*, 22(1):327–340, 2010. ISSN 0891-2963.

H. Mutvei : On the micro- and ultrastructure of the conchiolin in the nacreous layer of some recent and fossil molluscs. *Stockholm Contr. Geol.*, 20(1):1–17, 1969.

H. Nakahara et G. Bevelander : The formation and growth of the prismatic layer of *Pinctada radiata*. *Calc.Tiss. Res.*, 7:31–45, 1971.

J.M. Neff : Ultrastructure of the outer epithelium of the mantle in the clam *Mercernaria mercenaria* in relation to calcification of the shell. *Tissue & Cell*, 4, 4, 591–600, 1972.

G. Nehrke et J. Nouet : Confocal raman microscope mapping as a tool to describe different mineral and organic phases at high spatial resolution within marine biogenic carbonates : case study on *Nerita undata* (Gastropoda, Neritopsina). *Biogeosciences*, 8:3761–3769, 2011.

R. Nespoulet, A. Debénath, MA El Hajraoui, P. Michel, E. Campmas, A. Oujaa, A. Ben-Ncer, J.P. Lacombe, F. Amani et E. Stoetzel : Le contexte archéologique des restes humains atériens de la région de Rabat–Témara (Maroc) : apport des fouilles des grottes d'El Mnasra et d'El Harhoura 2. *Le Quaternaire marocain dans son contexte méditerranéen. Actes des Quatriemes Rencontres des Quaternaristes Marocains (RQM4). Oujda*, 15–17, 2007.

R. Nespoulet, M.A. El Hajraoui, F. Amani, A. Ben Ncer, A. Debénath, A. El Idrissi, J.P. Lacombe, P. Michel, A. Oujaa et E. Stoetzel : Palaeolithic and neolithic occupations in the Temara region (Rabat, Morocco) : Recent data on Hominin contexts and behavior. *African Archaeological Review*, 25(1):21–39, 2008. ISSN 0263-0338.

F. Nudelman, B.A. Gotliv, L. Addadi et S. Weiner : Mollusk shell formation : mapping the distribution of organic matrix components underlying a single aragonitic tablet in nacre. *J. Struct. Biol.*, 153:176–187, 2006.

F. Nudelman, E. Shimoni, E. Klein, M. Rousseau, X. Bourrat, E. Lopez, L. Addadi et S. Weiner : Forming nacreous layer of the shells of the bivalves *Atrina rigida* and *Pinctada margaritifera* : An environmental- and cryo-scanning electron microscopy study. *J. Struct. Biol.*, doi :10.1016/j.jsb.2008.018, 2008.

J. Philippon et R. Sabrier : Evolution des compositions minéralogiques et chimiques de coquilles de Gastropodes marins en relation avec la fossilisation. *Bull. Soc. hist. nat. Toulouse*, 115, 1–2, 93–98, 1979.

I.J. Pickering, R.C. Prince, T. Divers et G.N. George : Sulfur K-edge X-ray absorption spectroscopy for determining the chemical speciation of sulfur in biological systems. *FEBS Lett.*, 441:11–14, 1998.

J.-C. Plaziat : Late Cretaceous to Late Eocene palaeogeographic evolution of southwest Europe. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 36(3):263–320, 1981.

J.-C. Plaziat : Le genre *Velates* (Gastropoda, Neritoidea) : études des caractéristiques morphologiques et structurales des espèces et perspectives taxinomiques. Répartition stratigraphique et paléogéographique du genre. *Cossmanniana - Publication du groupe d'études et de recherches Macrofaune Cénozoïque, Paris*, 14:3–50, 2012.

J.C. Plaziat, M. Aberkan, M. Ahmamou et A. Choukri : The quaternary deposits of Morocco. *Continental Evolution : The Geology of Morocco*, 359–376, 2008.

R. Pramatarova : The lamellar structure of the shell of *Patella crenata* : a crystallographic study. *Thesis*, 2003.

PG Puranik et K Venkata Ramiah : The infra-red and Raman spectroscopic studies of amides. *In Proceedings of the Indian Academy of Sciences*, volume A(54), 69–79. Springer, 1961.

M. Réaumur : De la formation et de l'accroissement des coquilles des animaux, tant terrestres qu'aquatiques, soit de mer soit de rivière. *Hist. Acad. Roy. Sci.*, 364–397, 1709.

A.B. Rodriguez-Navarro, A. Checa, M.G. Willinger, R. Bolmaro et J. Bonarski : Crystallographic relationships in the crossed-lamellar microstructure of the shell of the gastropod *Conus marmoreus*. *Acta Biomaterialia*, 8:830–835, 2011.

C. Rollion-Bard : Processus de biominéralisation dans les carbonates biogéniques et impact sur les traceurs environnementaux. *Mémoire présenté en vue de l'obtention de l'H.D.R.*, 2011.

A.S.M. Saleuddin et H. Petit : The mode of formation of the periostracum. *Saleuddin ASM, Wilbur KM (eds) The Mollusca, Academic Press, New York*, 4, Physiology(Part 1):199–234, 1983.

T. Samata : Ca-binding glycoproteins in molluscan shells with different types of ultrastructure. *The Veliger 33/2 : 190-201*, 1990.

T. Samata, P. Sanguansri, C. Cazaux, M. Hamm, J. Engels et G. Krampitz : Biochemical studies on components of molluscs shells. *The mechanisms of biomineralization in animals and plants, Proc. Third Intern. Biomin. Symp., OMORI M. & WATABE N. ed., Tokai Univ. Press*, 37–47, 1980.

J.L. Schwenninger, S.N. Collcutt, N. Barton, A. Bouzouggar, L. Clark-Balzan, MA El Hajraoui, R. Nespoulet et A. Debénath : A new luminescence chronology for Aterian cave sites on the Atlantic coast of Morocco. *South-Eastern Mediterranean peoples between 130,000 and 10,000 years ago*, 18–36, 2010.

I. Sethmann, R. Hinrichs, G. Worheide et A. Putnis : Nano-cluster composite structure of calcitic sponge spicules–a case study of basic characteristics of biominerals. *Journal of inorganic biochemistry*, 100(1):88–96, 2006.

I. Sethmann, A. Putnis, O. Grassmann et P. Lobmann : Observation of nano-clustered calcite growth via a transient phase mediated by organic polyanions : a close match for biomineralization. *Amer. Min.*, 90:1213–1217, 2005.

YY Shopov : Activators of luminescence in speleothems as source of major mistakes in interpretation of luminescent paleoclimatic records. *Int. J. Speleol.*, 1, 4, 25-33, 2004.

G. Siani, M. Paterne, E. Michel, R. Sulpizio, A. Sbrana, M. Arnold et G. Haddad : Mediterranean sea surface radiocarbon reservoir age changes since the Last Glacial Maximum. *Science*, 294(5548):1917–1920, 2001.

A. Sidike, X.M. Wang, A. Sawuti, H.J. Zhu, I. Kusachi et N. Yamashita : Energy transfer among Pb, Ce and Mn in fluorescent calcite from Kuerle, Xinjiang, China. *Physics and chemistry of minerals*, 33(8):559–566, 2006.

E. Smith et G. Dent : *Modern Raman spectroscopy : a practical approach.* Wiley, 2005.

T.E. Steele et E. Álvarez-Fernández : Initial investigations into the exploitation of coastal resources in North Africa during the Late Pleistocene at Grotte des Contrebandiers, Morocco. *Trekking the Shore*, 383–403, 2011.

E. Stoetzel, C. Denys, S. Bailon, MA El Hajraoui et R. Nespoulet : Taphonomic Analysis of Amphibian and Squamate Remains from El Harhoura 2 (Rabat-Témara, Morocco) : Contributions to Palaeoecological and Archaeological Interpretations. *International Journal of Osteoarchaeology*, 22(5):616–635, 2012.

E. Stoetzel, L. Marion, R. Nespoulet, M.A. El Hajraoui et C. Denys : Taphonomy and palaeoecology of the late Pleistocene to middle Holocene small mammal succession of El Harhoura 2 cave (Rabat-Témara, Morocco). *Journal of Human Evolution*, 60(1):1–33, 2011.

J. Susini, M. Salomé, B. Fayard, R. Ortega et B. Kaulich : The scanning X-ray microprobe at the ESRF" X-ray microscopy" beamline. *Surf. Rev. and Lett.*, 9(1):203–212, 2002.

M. Suzuki, Y. Dauphin, L. Addadi et S. Weiner : Atomic order of aragonite crystals formed by mollusks. *Cryst. Eng. Comm.*, 13(22):6780–6786, 2011a.

M. Suzuki, J. Kameda, T. Sasaki, K. Saruwatari, H. Nagasawa et T. Kogure : Characterization of the multilayered shell of a limpet, *Lottia kogamogai* (Mollusca : Patellogastropoda), using SEM-EBSD and FIB-TEM techniques. *Journal of Structural Biology*, 171:223–230, 2010. ISSN 1047-8477.

M. Suzuki, H. Kim, H. Mukai, H. Nagasawa et T. Kogure : Quantitative XRD analysis of {110} twin density in biotic aragonites. *Journal of Structural Biology*, 180:458–468, 2012.

Michio Suzuki, Toshihiro Kogure, Steve Weiner et Lia Addadi : Formation of aragonite crystals in the crossed lamellar microstructure of limpet shells. *Crystal Growth & Design*, 11 (11):4850–4859, 2011b.

S. Suzuki, Y. Togo et S. Uozumi : Exoskeletal adaptations for life environment in neritacean gastropods. *in : "Mechanisms and phylogeny of mineralization in biological systems" - Proc. of the Sixth Int. Symp. on biomineralization, Odawara, Oct. 8-12 1990, SUGA S. & NAKAHARA H. eds, Springer Verlag, 397-401*, 1991.

S. Tambutté, M. Holcomb, C. Ferrier-Pagès, S. Reynaud, E. Tambutté, D. Zoccola et D. Allemand : Coral biomineralization : From the gene to the environment. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, doi :10.1016/j.jembe.2011.07.026, 2011.

S. Tanaka, H. Hatano et O. Itasaka : Biochemical Studies on pearl. IX. Amino acid composition of conchiolin in pearl and shell. *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 33, 4, 543–545, 1960.

J.D. Taylor, W.J. Kennedy et A. Hall : The shell structure and mineralogy of the Bivalvia.I.Introduction. Nuculacae - Trigonacae. *Bull. Br. Mus. nat. hist. Zool.*, 3, 1–125, 1969.

J.D. Taylor, W.J. Kennedy et A. Hall : The shell structure and mineralogy of the Bivalvia.II. Lucinacea-Clavagellacea. Conclusions. *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. Zool.*, 22:253–294, 1973.

D.F. Travis : The structure and organization of, and the relationships between, the inorganic crystals and the organic matrix of the prismatic region of *Mytilus edulis*. *J. Ultrastructure Res.*, 23:183–215, 1968.

D.F. Travis, C.J. Francois, L.C. Bonar et M.J. Glimcher : Comparative studies of the organic matrices of invertebrate mineralized tissues. *J. Ultrastructure Res.*, 18, 518–550, 1967.

S. Uozumi, K. Iwata et Y. Togo : The ultrastructure of the mineral in and the construction of the crossed-lamellar layer in molluscan shell. *Contrib. Dept. Geol. mineral. Fac. Sci. Hokkaido Univ.*, 1236:447–455, 1971.

H.C. Urey, H.A. Lowenstam, S. Epstein et C.R. McKinney : Measurement of paleotemperatures and temperatures of the upper cretaceous of England, Denmark, and the southeastern United States. *Geol. Soc. Amer. Bull. 62 : 399-416*, 1951.

J. Urmos, S.K. Sharma et F.T. Mackenzie : Characterization of some biogenic carbonates with Raman spectroscopy. *American Mineralogist*, 76, 641–646, 1991.

D. Vielzeuf, N. Floquet, D. Chatain, F. Bonnete, D. Ferry, J. Garrabou et E.M. Stolper : Multilevel modular mesocrystalline organization in red coral. *American Mineralogist*, 95 (2-3):242, 2010.

D. Volkmer : Biologically inspired crystallization of calcium carbonate beneath monolayers : a critical overview. *Wiley - Handbook of biomineralization : Biological aspects and structure formation*, 65–88, 2007.

M.F. Voss-Foucart : Constituants organiques des coquilles de mollusques actuels et fossiles. *Haliotis*, 2, 2, 81–88, 1972.

K. Wada : Electron-microscopic observations on the shell structure of pearl oyster (*Pinctada martensii*). Observations of the calcite crystals in prismatic layers (with engl. sum.). *Bull. Natl. Pearl Res. Lab.*, 1, 1–6, 1956.

K. Wada : Crystal growth of molluscan shells. *Bull. Natl. Pearl Res. Laboratory*, 36, 7, 703–828, 1961.

K. Wada : Nucleation and growth of aragonite crystals in the nacre of some bivalve molluscs. *Biomineralization*, 6, 141–159, 1972.

J.N. Weber et P.M. Woodhead : Temperature dependence of oxygen-18 concentration in reef coral carbonates. *J. Geophys. Res. 77/3 : 463-473.*, 1972.

S. Weiner : Mollusk shell formation : isolation of two organic matrix proteins associated with calcite depositionin the bivalve *Mytilus californianus. Biochemistry*, 22, 4139–4145, 1983.

S. Weiner : Biomineralization : a structural perspective. *J. Struct. Biol.*, 163(3):229–234, Sep 2008. ISSN 1095-8657 (Electronic).

S. Weiner : *Microarchaeology : beyond the visible archaeological record.* Cambridge University Press, 2010.

S. Weiner et L. Addadi : Acidic macromolecules of mineralized tissues : the controllers of crystal formation. *Trends in Biochemical Sciences (TIBS) : 252-53*, 1991.

S. Weiner, H.A. Lowenstam et L. Hood : Characterization of 80-million-year-old mollusk shell proteins. *Proc. Natl. Acad. USA*, 73, 8, 2541–2545, 1976.

S. Weiner et W. Traub : Macromolecules in mollusc shells and their functions in biomineralization. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, B(304):425–434, 1984.

S.W. Weiner : Aspartic acid-rich proteins : major components of the soluble organic matrix of mollusk shells. *Calcif. Tissue Int.*, 29, 167–193, 1979.

Karl M Wilbur : Physiology of Mollusca. *Ed Academic Press*, 1964.

N.V. Wilmot, D.J. Barber, J.D. Taylor et A.L. Graham : Electron microscopy of molluscan crossed-lamellar microstructure. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, B(337):21–35, 1992.

M.K. Wolf et S.B. Aronson : Growth, fluorescence and metachromasy of cells cultured in the presence of acridine orange. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 9(1):22–29, 1961.

B.B. Woodward : On the Mode of Growth and the Structure of the Shell in *Velates conoideus*, Lamk., and other Neritidae. *In Proceedings of the Zoological Society of London*, volume 60, 528–540. Wiley Online Library, 1892.

D. Worms et S. Weiner : Mollusk shell organic matrix : Fourier transform infrared study of the acidic macromolecules. *J. Exp. Zool.*, 237, 11–20, 1986.

D.R. Yesner, W.S. Ayres, D.L. Carlson, R.S. Davis, R. Dewar, M.R.G. Morales, F.A. Hassan, B. Hayden, J.J. Lischka, P.D. Sheets *et al.* : Maritime hunter-gatherers : ecology and prehistory [and comments and reply]. *Current Anthropology*, 727–750, 1980.

H. Zhao, T. Samata, D. Takakura, R. Hashimoto, Y. Miyazaki, T. Nozawa et Y. Hikita : Organic matrix proteins preserved in fossil molluscan shells. *in : Biomineralization (BIOM2001) : formation, diversity, evolution and application, Proc. of the 8th Int. Symp. on Biomineralization, KOBAYASHI I. & OZAWA H. eds, Tokai Univ. Press, Kanagawa, 108-111*, 2004.

Annexes

Annexes

Publications relatives au travail de thèse

NOUET J., Baronnet A., Howard L., 2012. Crystallization in organo-mineral micro-domains in the crossed-lamllar layer of Nerita undata (Gastropoda, Neritopsina).*Micron* 43 : 456-462.

NOUET J., Cotte M., Cuif J.P., Dauphin Y., Salome M., 2012. Biochemical change at the setting-up of the crossed-lamellar layer in Nerita undata (Mollusca, Gastropoda). *Minerals*, 2 : 85-99.

Nehrke G., NOUET J., 2011. Confocal Raman microscope mapping as a tool to describe different mineral and organic phases at high spatial resolution within marine biogenic carbonates : case study on Nerita undata (Gastropoda, Neritopsina). *Biogeosciences* 8 : 3761-3769.

En Préparation : NOUET J., Chevallard C., Farre B., Nehrke G., Stoetzel E., El Hajraoui M.A., Nespoulet R. Preservation state of crossed-foliated layers from fossil limpet shells (El Harhoura 2 cave, Témara, Morocco).

Publications annexes (rang A, IF $\rangle$ 1)

Cuif J.P., Bendounan A., Dauphin Y., NOUET J., Sirotti F., 2013. Synchrotron-based photoelectron spectroscopy provides evidence for a molecular bond between calcium and mineralizing organic phases in invertebrate calcareous skeletons. *Anal. Bioanal. Chem.* 405 : 8739-8748, DOI 10.1007/s00216-013-7312-4

Cuif J.P., Dauphin Y., Nehrke G., NOUET J., Perez-Huerta A., 2012. Layered growth and crystallization in calcareous biominerals : impact of structural and chemical evidence on two major concepts in invertebrate biomineralization studies. *Minerals* 2 : 11-39.

Dauphin Y., NOUET J., 2012. Fits and misfits in organic matrix analyses : case of the soluble matrices of the nacreous layer of Pinctada margaritifera (Mollusca). *Minerals* 2 : 40-54.

Cuif J.P., Dauphin Y., Howard L., NOUET J., Rouzière S., Salomé M., 2011. Is the pearl layer a reversed shell ? A re-examination of the theory of pearl formation through physical characterizations of pearl and shell developmental stages in Pinctada margaritifera. *Aquatic Living Resources* 24 (4) : 411 – 424.

Genty D., Konik S., Valladas H., Blamart D., Hellstrom J., Touma M., Moreau C., Dumoulin J.P., NOUET J., Dauphin Y., Weil R., 2011. Dating the Lascaux cave gour formation. *Radiocarbon* 53 (3) : 479-500.

Boussetta S., Bassinot F., Sabbatini A., Caillon N., Nouet J., Kallel K., Rebaubier H., Klinkhammer G., Labeyrie L., 2011. Diagenetic Mg-rich calcite in Mediterranean sediments : Quantification and impact on foraminiferal Mg/Ca thermometry *Marine Geology*, doi :10.1016/ j.margeo. 2010.12.011

Sabbatini, A., Bassinot, F., Boussetta, S., Negri, A., Rebaubier, H., Dewilde, F., Nouet, J., Caillon, N., and Morigi, C., 2011. Further constraints on the diagenetic influences and salinity effect on Globigerinoides ruber (white) Mg/Ca thermometry : Implications in the Mediterranean Sea. *Geochem. Geophys. Geosyst.*, 12(10).

Brahmi C., Meibom A., Smith D., Stolarski J., Auzoux-Bordenave S., NOUET J., Doumenc D., Djediat C., Domart-Coulon I., 2010. Skeletal growth, ultrastructure and composition of the azooxanthellate scleractinian coral Balanophyllia regia. *Coral Reefs*, 29 (1) :175-189.

Selo M., Valladas H., Mercier N., Joron J.L., Bassinot F., Person A., NOUET J., 2009. Investigations of uranium distributions in flints. *Radiation Measur.* 44 : 615-619.

Dissard D., Nehrke G., Reichart G.J., NOUET J., Bijma J., 2009. Effect of fluorescent indicator calcein on Mg and Sr incorporation into foraminiferal calcite. *Geochemistry Geophysics Geosystems* 10 (11) : 13 p.

Cuif J.P., Ball A.D., Dauphin Y., Farre B., NOUET J., Perez-Huerta A., Salome M., Williams C.T., 2008. Structural, Mineralogical, and Biochemical Diversity in the Lower Part of the Pearl Layer of Cultivated Seawater Pearls from Polynesia. *Microscopy and Microanalysis* 14 : 405-417 doi :10.1017/S1431927608080859.

Baronnet A., Cuif J.-P., Dauphin Y., Farre B., NOUET J., 2008. Crystallization of biogenic Ca-carbonate within organo-mineral micro-domains. Structure of the calcite prisms of the Pelecypod Pinctada margaritifera (Mollusca) at the submicron to nanometre ranges. *Mineral. Mag.* 72(2) : 617–626.

Cuif J.P., Dauphin Y., Farre B., Nehrke G., NOUET J., Salome M., 2008. Distribution of sulphated polysaccharides within calcareous biominerals indicates a widely shared layered growth-mode for the Invertebrate skeletons and suggest a two-step crystallization process for the mineral growth units. *Mineral. Mag.* 72 (1) : 233-237.

NOUET J., Bassinot F., 2007. Dissolution effects on the crystallography and Mg/Ca content of planktonic foraminifera Globorotalia tumida (Rotaliina) revealed by X-ray diffractometry. *Geochemistry Geophysics Geosystems,* 8, 10, Q10007, doi :10.1029/2007GC001647.

Jouzel J., V. Masson-Delmotte, O. Cattani, G. Dreyfus, S. Falourd, G. Hoffmann, B. Minster, J. NOUET, J. M. Barnola, J. Chapellaz, H. Fischer, J.C. Gallet, S. Johnsen, M. Leuenberger, L. Loulerque, D. Luethi, H. Oerter, F. Parrenin, G. Raisbek, D. Raynaud, A. Schilt, J. Schander, E. Selmo, R. Souchez, R. Spahni, B. Stauffer, J. P. Steffensen, B. Stenni, T. F. Stocker, J. L. Tison, M. Werner, E. W. Wolff, 2007. Orbital and Millennial Antarctic Climate Variability over the Past 800,000 Years. *Science*, doi : 10.1126/science.1141038, 317, 793-796.

Masson-Delmotte, V., G. Dreyfus, P. Braconnot, S. Johnsen, J. Jouzel, M. Kageyama, A. Landais, M.-F. Loutre, J. NOUET, F. Parrenin, D. Raynaud, B. Stenni, E. Tuenter, 2006. Past temperature reconstructions from deep ice cores : relevance for future climate change. *Climate of the Past* 2 : 145-165.

A tous ceux que j'aime.

A toi,
Qui donne tout son sens
A cette petite pierre de plus
Ajoutée à l'édifice de notre vie.
Maisha Yangu.