



**Université de Bourgogne**  
**Année Universitaire 2008-2009**

*Biominéralisation de la coquille des mollusques :  
origine, évolution, formation*

*Mémoire présenté par Frédéric MARIN  
pour l'obtention de l'Habilitation à Diriger  
des Recherches (HDR)*

*devant le jury composé de :*

*Bruno DAVID, Directeur de Recherche CNRS 1<sup>ère</sup> Cl., Université de Bourgogne, Dijon*

*Jean-Marc LEBEL, Professeur des Universités, Université de Basse-Normandie, Caen :  
rapporteur*

*Davorin MEDAKOVIC, Chercheur Etranger, Institut Ruder Boskovic, Center for  
Marine Research, Rovinj, Croatie : rapporteur*

*Christian MILET, Maître de Conférence, HDR, MNHN, Paris : rapporteur*

*Pascal NEIGE, Professeur des Universités, Université de Bourgogne, Dijon*

**UMR CNRS 5561, Biogéosciences**

***Vendredi 12 Juin 2009***



*A mes parents, même s'ils ne sont plus là  
A Ismaël, Maria et Fatima  
Au clan MARIN*



*See that my grave is kept clean (Blind Lemon Jefferson).*

*La nuit tomba, je me baissai pour la ramasser (Alphonse Allais).*

*Reason is six-seventh of treason ("Peacelike Mongoose", James Thurber).*

*Plus tu pédales moins vite, moins t'avances plus doucement (Louison Anquetilidor).*

*I wouldn't like to belong to a club which would have me as a member (Groucho Marx).*

*Quand je parle aux gosses, je ne les regarde pas de haut. Je viens du ghetto et j'ai toujours  
ma boîte de cirage à la main (James Brown).*

*Ne regarde pas la brahmapaille fichée dans l'œil de ton voisin, regarde le Brahmapoutre  
couler dans le tien (C. Ladesh-Vhieil-Ganash).*

*Mieux vaut être borgne au royaume des aveugles que bègue au royaume des sourds (Oreste  
Sursafin).*

*L'éternité, c'est long, surtout vers la fin (Woody Allen).*



# Sommaire

Remerciements (à prise rapide) -----	iii
Avant-propos -----	v
Liste des figures et tables -----	vii
<b>I. Parcours scientifique -----</b>	<b>1</b>
I. 1. <i>Curriculum Vitae</i> , en bref...	
I. 2. Production scientifique	
I. 3. Parcours scientifique, en bref...	
I. 4. Responsabilités	
I. 5. Expertises diverses	
I. 6. Missions de terrain et de laboratoire, stages de formation	
<b>II. Encadrement de recherches et mission d'enseignement -----</b>	<b>25</b>
II. 1. Encadrement de recherches	
II. 2. Mission d'enseignement	
<b>III. Une très brève histoire de la biominéralisation à travers quelques concepts-clés -----</b>	<b>39</b>
III.1. La biominéralisation, trois concepts	
III.2. Genèse d'une terminologie	
III.3. Evolution des idées	
<b>IV. Biominéralisation de la coquille des mollusques -----</b>	<b>53</b>
IV.1. Introduction	
IV.2. Phylogénie des mollusques	
IV.3. Origine des mollusques	
IV.4. La coquille des mollusques : développement et physiologie	
IV.5. Les protéines des coquilles de mollusque	
<b>V. Les protéines acides des coquilles de mollusques : exemple de <i>Pinna nobilis</i> -----</b>	<b>87</b>
V.1. Introduction	
V.2. Quelques caractéristiques générales	
V.3. Autres propriétés remarquables	
V.4. Protéines coquillières acides chez <i>P. nobilis</i>	
V.5. Origine et évolution des protéines acides dans la minéralisation	
V.6. Illustration de la recherche par quelques articles	
<b>VI. De la nacre : considérations macro-évolutives -----</b>	<b>163</b>
VI.1. Introduction	
VI.2. Nacre chez les mollusques : origine, répartition et tendances évolutives	
VI.3. Nos modèles d'étude – Résultats	
VI.4. Origine et évolution de la nacre : quelques remarques	
VI.5. Illustration de la recherche par quelques articles	
<b>VII. Perspectives et conclusions -----</b>	<b>227</b>
VII.1. Niveaux d'analyse des biominéralisations	
VII.2. Axe 1 : Origine et évolution des biominéralisations carbonatées	
VII.3. Axe 2 : Contrôle de la biominéralisation par la matrice	
VII.4. Axe 3 : Diagenèse des matrices calcifiantes	
VII.5. Développements techniques	
VII.6. Le futur de la biominéralisation ?	
Table des matières -----	241





## *Remerciements (à prise rapide)*

Certains sont précontraints, d'autres prompts, les miens sont à prise rapide, je veux parler des remerciements, bien sûr. Muni d'une boîte de cirage et de l'accessoire qui fit la fortune d'Ernest Reluire (1654-1732) – il s'agit bien évidemment de la célèbre brosse à Reluire – me voilà paré pour effectuer cet exercice périlleux, qui est au mémoire de thèse ou d'habilitation ce qu'est la Case Départ au Monopoly : un passage obligé.

Bon, trêve de plaisanterie, redevenons sérieux...

Ayant passé près de neuf années (Mai 1994-Décembre 2002) dans des brumes bataves, le pari de mon intégration au sein de Biogéosciences n'était pas forcément gagné. Je tiens à remercier ceux de mes collègues qui ont facilité mon installation à Dijon, en particulier Bruno David et Thierry Rigaud, dont le projet de recherche régional « accueil jeune équipe » en 2002 a permis l'achat du tout premier équipement en biominéralisation. Un grand merci à Alain Godon pour la pertinence de ses analyses rugbystiques.

Un chaleureux merci à Nathalie Guichard et Gilles Luquet qui m'ont aidé à monter le laboratoire de biominéralisation et avec qui la collaboration s'est avérée fructueuse jusqu'à présent. Merci à Benjamin Marie et Nathalie Le Roy de contribuer à faire vivre la thématique. Merci aussi à Gilles Ramstein, d'avoir accepté notre participation à son projet ANR.

J'ai une pensée émue pour les collègues qui ne sont plus là, en particulier, Jean-Paul Loreau. Je l'ai peu connu, assez toutefois pour me souvenir de longues discussions scientifiques avec lui sur la diagenèse des carbonates, en Janvier-Février 2003, en contemplant le paysage de la côte depuis son bureau. Je crois que je me serais bien entendu avec lui.

Mes sentiments les meilleurs vont à mes collègues néerlandais, Peter Westbroek, Liesbeth De Jong, Hans De Vrind, Paul Corstjens et Klaas de Groot, qui ont contribué, d'une manière ou d'une autre, à prolonger ma carrière scientifique dans le domaine de la biominéralisation, alors que le contexte financier étriqué des années 94-95 et 97-99 me poussait à faire autre chose. Peter, je crois avoir beaucoup appris à ton contact.

La science est faite de rencontres. Merci à Ingrid, Emi, Boaz, Lucilia, Christian, Andy, Jurren, Pierre, Danièle, Gérard, Gied, Bang, Matthew et tous les autres avec lesquels j'ai, d'une manière ou d'une autre, interagi. Mention spéciale à mon collègue Croate Davorin Medakovic, alias « Professeur Lindberg », avec qui je partage une bonne pinte de rire accompagnée de quelques pintes de cet excellent breuvage qu'est la bière « Favorit ».

Mes pensées les plus chères vont à mes parents : leur disparition continue de me peser, et je persiste à penser que, s'il y a un p... de Dieu sur cette satanée Terre, il a vraiment dû se gourer dans ses fiches lorsqu'il les a rappelés à lui... Bises fraternelles à mes sœurs Christine, Elisabeth, Monique et Claire, ainsi qu'à mon frère Dominique et à mes huit neveux et nièces. Vous avez mon affection éternelle...

Mes pensées les meilleures vont à ma femme Fatima, et à mes enfants Ismaël et Maria. Message pour ces derniers : « s'il vous plait, ne grandissez pas trop vite ! »

En dernier lieu, je remercie les lecteurs obligés de ce mémoire, je veux parler des membres du jury : j'ai été prolixe, peut-être un peu trop, et j'espère que ma « logorrhée scripturale » ne vous incommodera pas trop...



## **AVANT-PROPOS**

*Depuis mon recrutement au CNRS, à l'Unité de Recherche 5561 « Biogéosciences », six courtes années se sont écoulées. Le temps est donc venu d'effectuer un premier bilan. Un médecin parlerait de « check-up », un garagiste, de « contrôle technique », un agent du fisc de « contrôle fiscal », ici il est de bon ton de parler d'habilitation, ou, pour employer un sigle dont la consonance évoquerait plutôt un parti politique centriste, HDR.*

*Enfin, quelle que soit la terminologie utilisée, ce bilan est à la fois personnel et scientifique. Bien que retraçant l'essentiel de mon parcours, il couvre principalement, pour les aspects scientifiques, les années 2003-2009, correspondant à ma « période dijonnaise » : une première année d'installation (2003) et cinq années effectives d'activité de recherche en laboratoire.*

*Lors de ma prise de fonction au CNRS en Janvier 2003, l'objectif était clair : réimplanter la biominéralisation à Dijon. A la suite du départ d'Eric Verrecchia pour la Suisse, et de la permutation de poste entre Laurent Emmanuel et Christophe Durlet, la biominéralisation dijonnaise avait été mise en sommeil. Grâce à un projet régional « jeune équipe » (Thierry Rigaud), puis, dans la foulée, à une Aide Concertée Incitative (ACI JC 3049), à plusieurs financements régionaux teintés d'un peu de BQR, la machine a pu être lancée sans tarder, et nous avons mis en place, Gilles Luquet, Nathalie Guichard et moi-même, un laboratoire entièrement dédié aux recherches sur les biominéralisations carbonatées. Ce laboratoire est opérationnel depuis Février 2004. Le financement ANR (ACCRO-EARTH, piloté par G. Ramstein, LSCE) a permis de compléter l'équipement.*

*Un second objectif consistait à renforcer l'interface Sciences Vie/Sciences Terre. La biominéralisation occupe en effet une position centrale, puisqu'elle s'appuie sur la biochimie, la cristallographie, la paléontologie, la sédimentologie et les sciences de l'environnement. Il m'est difficile de juger si mon recrutement a renforcé cette interface ou non. J'espère juste que ceux qui ont souhaité mon recrutement et mon intégration à Dijon n'ont pas eu à le regretter par la suite.*

*Depuis 2003, le laboratoire de biominéralisation a publié une trentaine de papiers, dont seize, de rang A, parmi lesquels neuf ont été publiés dans des revues de facteur d'impact supérieur à 3. Il a accueilli 5 stages de Master. Une thèse y a été soutenue, une autre est en préparation. Deux autres thèses « européennes » y sont effectuées, en co-tutelle avec les universités d'Amsterdam et de Nottingham. Nous avons établi de nombreuses collaborations, tant locales, que nationales ou internationales. Dans le cadre de ces collaborations (GDR ADEQUA, collaboration avec l'IUEM de Brest, collaboration avec le CIMAT, Chili), nous accueillons aussi des stagiaires pour de courtes durées. Il me semble qu'une dynamique s'est créée, et je souhaite vivement qu'elle soit entretenue et amplifiée.*

*C'est cette dynamique que je vais essayer de restituer dans ce mémoire, lequel se compose de sept chapitres :*

- un premier chapitre relate l'intégralité de mon parcours scientifique depuis Septembre 1989, date à laquelle j'ai commencé ma thèse de troisième cycle jusqu'à Avril 2009. Ce chapitre fait état de mes publications, de mes participations à des congrès, des conférences auxquelles j'ai été invité, des collaborations, des soutiens financiers, des responsabilités, des expertises diverses, enfin, des missions de terrain.*

- *Un second chapitre décrit mon activité d'encadrement de la recherche et d'enseignement couvrant la période Sept. 1989-Avril 2009.*
- *Les cinq chapitres suivants (III à VII) concernent la recherche dans le domaine des biominéralisations :*
  - *Un chapitre introductif relate l'histoire de la discipline « biominéralisation », en se focalisant sur quelques concepts majeurs.*
  - *Dans le chapitre suivant (IV), je présente plus spécifiquement la biominéralisation de la coquille de mollusques, mon modèle de prédilection. De ce fait, je ne mentionne pas les autres modèles biologiques que nous étudions à Dijon, en particulier les crustacés, qui sont de la compétence de mon collègue Gilles Luquet, et les brachiopodes.*
  - *Le chapitre V concerne les protéines acides dans la biominéralisation de la coquille des mollusques. Quelques-uns des articles que j'ai publiés sur ces protéines concluent ce chapitre.*
  - *Le chapitre VI retrace l'évolution de la nacre des mollusques et fait état des données connues actuellement. Y sont présentés deux modèles, étudiés par B. Marie dans le cadre de sa thèse, ainsi que quelques récentes publications.*
  - *Le dernier chapitre clôt le mémoire sur les perspectives prochaines de développement de la biominéralisation à Dijon, et sur l'avenir de la discipline en général.*

## *Liste des figures et tables*

Le mémoire comporte 8 tables et 18 figures réparties comme suit :

### *Chapitre 1*

Figure 1 : Prix Vening-Meinesz 1998

Table 1 : Les grands axes de la recherche réalisée à Dijon depuis 2003

Table 2 : Sources de financement depuis 2003

### *Chapitre 3*

Figure 2 : Extraits de *Micrographia* de Robert Hooke.

Table 3 : Succession des symposiums internationaux sur la biominéralisation

### *Chapitre 4*

Figure 3 : Phylogénie du phylum Mollusca

Figure 4 : *Kimberella quadratus* et sa reconstitution

Figure 5 : Photos MEB de la larve véligère de *Mytilus galloprovincialis*

Figure 6 : Physiologie de la calcification chez un bivalve nacro-prismatique

Figure 7 : Répartition des protéines coquillières en fonction de leur masse moléculaire calculée et de leur point isoélectrique théorique

Table 4 : Protéines très acides des coquilles de mollusque

Table 5 : Protéines modérément acides des coquilles de mollusque

Table 6 : Protéines basiques des coquilles de mollusque

Table 7 : Protéines de coquille de mollusque partiellement caractérisées

### *Chapitre 5*

Figure 8 : Tests d'inhibition de cristallisation de CaCO<sub>3</sub> et test d'interférence

Table 8 : Position systématique de *Pinna nobilis*

Figure 9 : La coquille de *Pinna nobilis*

Figure 10 : Immunolocalisation de la mucoperline sur section de coquille de *Pinna nobilis*

Figure 11 : Mucine sécrétée

Figure 12 : Gel 2D de la matrice acido-soluble de prismes de *Pinna nobilis*

### *Chapitre 6*

Figure 13 : Structure simplifiée des deux grands types de nacre trouvées chez les mollusques

Figure 14 : Modèle topographique et structurel de croissance de la nacre

Figure 15 : Répartition de la microstructure nacrée au sein des mollusques conchifères actuels

Figure 16 : Modèle *Unio pictorum*

Figure 17 : Modèle *Nautilus macromphalus*

### *Chapitre 7*

Figure 18 : Les différents niveaux d'analyse des biominéralisations chez les métazoaires



# I. PARCOURS SCIENTIFIQUE

## I.1. *Curriculum Vitae*, en bref...

## I.2. Production scientifique

- a. Publications de rang A
- b. Publications de rang B
- c. Chapitres d'ouvrages
- d. Actes de congrès
- e. Bilan chiffré
- f. Participation à des congrès
- g. Résumés de congrès
- h. Conférences invitées
- i. Conférences grand public

## I.3. Parcours scientifique, en bref...

- a. Période 1989-1994 : doctorat et contrat ATER
- b. Période 1994-2002 : post-doctorat néerlandais et secteur privé
- c. Période 2002-2009 : CR1 CNRS, Université de Bourgogne
- d. Collaborations actuelles et financements

## I.4. Responsabilités

- a. Responsabilités au sein de l'UMR
- b. Organisation du symposium « Vie Primitive, Radiations Anciennes, RST »

## I.5. Expertises diverses

- a. Expertises d'articles
- b. Jury de thèses
- c. Expertises de projets scientifiques

## I.6. Missions de terrain et de laboratoire, stages de formation





## I. 1. CURRICULUM VITAE, en bref...

### MARIN Frédéric Gilles

Né le 20/02/1966 à ANTONY (92)

Nationalité française

Marié, deux enfants

#### Adresses:

Personnelle:  
17, Rue Nodot  
21000 Dijon

Professionnelle:  
UMR CNRS 5561 BIOGEOSCIENCES  
Université de Bourgogne  
6, Bd. Gabriel, 21000 DIJON

#### Cursus scolaire et universitaire:

- 1984: Baccalauréat série D, mention Bien.
- 1986: DEUG B, option Géologie, mention A. Bien, Paris VI.
- 1987: Licence Géologie, mention A. Bien, Paris VI.
- 1988: Maîtrise Géologie, mention A. Bien, Paris VI.
- 1989: DEA Paléontologie, mention Bien, Paris VI.
- 1992: Thèse 3<sup>ème</sup> cycle: allocataire MRT, mention Très Honorable + félicitations du Jury, Paris XI.

#### Service national:

- Accompli du 1er Avril 1992 au 31 Janvier 1993.

#### Post doctorat:

- De Février 1993 à Mars 1994: contrat ATER, Université Paris XI.
- Du 01 Juin 1994 au 31 Janvier 2001: post-doctorat, Université de Leiden, Pays-Bas.

#### Financement du projet post-doctoral:

Mai 1994 à Sept. 1994: Richard Lounsbery Foundation (USA)

Oct. 1994 à Oct. 1995: NWO + subvention ponctuelle Singer-Polignac.

**Févr. 1996 à Juil. 1997: contrat européen TMR "Marie Curie Fellowship".**

Sept. 1997 à Oct. 1999: Société de Secours des Amis des Sciences + Fondation des Treilles + Fondation Singer-Polignac.

1<sup>er</sup> Nov. 1999 au 31 Janvier 2001: Fondation Simone et Cino Del Duca.

**Lauréat du Prix NWO-Vening-Meinesz 1998** (prix de 25 000 florins)

- Du 01 Février 2001 au 31 Décembre 2002: contrat de recherche, IsoTis (Utrecht, Pays-Bas).

Depuis le 01/01/03 : Chargé de Recherches CNRS 1<sup>ère</sup> Classe, UMR 5561 Biogéosciences

#### Expérience d'enseignement:

- Monitorat d'enseignement (CIES): Université Paris XI, Département des Sciences de la Terre: 2 années universitaires consécutives: 1989/90 et 1990/91.
- Contrat ATER: Université Paris XI, Département des Sciences de la Terre: 1er Février 1993 au 31 Mars 1994.
- Cours annuels en biominéralisation dans le cadre d'un DEA du MNHN Paris.
- Cours annuels en biominéralisation dans le cadre du Master 2<sup>ème</sup> année de l'Université de Bourgogne.

#### Langues:

Anglais: lu, écrit, parlé. Allemand: lu, parlé. Néerlandais: lu, écrit, parlé.

NWO

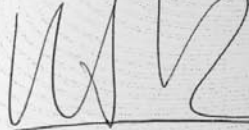
*Veining Meinesz Prijs 1998*

*f 25.000,-*

*Toegewezen aan:*

*Dr. F. Marin*

*Namens het bestuur van de  
Nederlandse Organisatie  
van Wetenschappelijk Onderzoek*



*Dr. R. J. van Duinen*



Fig. 1. Prix Vening-Meinesz 1998.

## I.2. PRODUCTION SCIENTIFIQUE

### a. Publications de rang A

- 1) Gautret, P. & Marin, F., 1990. Composition en acides aminés des phases protéiques solubles et insolubles du squelette calcaire de trois Démosponges actuelles: *Ceratoporella nicholsoni* (Hickson), *Astrosclera willeyana* Lister et *Vaceletia crypta* (Vacelet). **C. R. Acad. Sci. Paris**, 310, Sér. II: 1369-1374.
- 2) Dauphin, Y., Marin, F., Gautret, P. & Cuif, J. P., 1990. Discrimination des biominéralisations aragonitiques fibreuses des Spongiaires, Cnidaires et Mollusques par l'indice de substitution des éléments mineurs dans le réseau carbonaté. **C. R. Acad. Sci. Paris**, 311, Sér. II: 1111-1116.
- 3) Marin, F. & Dauphin, Y., 1991. Composition de la phase protéique soluble des coquilles d'oeufs de Dinosaures du Rognacien (Crétacé) du Sud-Est de la France. **N. Jb. Geol. Pal. Mh.**, 4: 243-254.
- 4) Marin, F. & Dauphin, Y., 1991. Diversité des altérations dans la composition en acides aminés de la phase organique de la nacre des huîtres perlières de Polynésie française (*Pinctada margaritifera*) atteintes par l'épizootie. **C. R. Acad. Sci. Paris**, 312, Sér. III: 483-488.
- 5) Cuif, J. P., Denis, A., Gautret, P., Marin, F., Mastandrea, A. & Russo, F., 1992. Recherches sur l'altération diagénétique des biominéralisations carbonatées: évolution de la phase organique intrasquelettique dans les polypiers aragonitiques de Madréporaires du Cénozoïque (Bassin de Paris) et du Trias supérieur (Dolomites et Turquie). **C. R. Acad. Sci. Paris**, 314, Sér. II: 1097-1102.
- 6) Gautret, P. & Marin, F., 1993a. Tendances diagénétiques des structures aragonitiques fibreuses produites par des Spongiaires et des Madréporaires du Trias supérieur de Turquie. **C. R. Acad. Sci. Paris**, 316, Sér. II: 1319-1325.
- 7) Marin, F. & Gautret, P., 1994. Les teneurs en acides aminés des matrices organiques solubles associées aux squelettes calcaires des Démosponges et des Cnidaires: une implication possible dans leur évolution diagénétique. **Bull. Soc. Géol. Fr.**, 165 (1): 77-84.
- 8) Marin, F., Muyzer, G. & Dauphin, Y., 1994. Caractérisation électrophorétique et immunologique des matrices organiques solubles de deux Bivalves Ptériomorphes actuels, *Pinna nobilis* L. et *Pinctada margaritifera* (L.). **C. R. Acad. Sci. Paris**, 318, Sér. II: 1653-1659.
- 9) Dauphin, Y. & Marin, F., 1995. The compositional analysis of recent cephalopod shell carbohydrates by Fourier transform infrared spectrometry and high performance anion exchange- pulsed amperometric detection. **Experientia**, 51(3): 278-283, (revue rebaptisée après 1997 Cellular and Molecular Life Science)
- 10) Marin, F., Smith, M., Isa, Y., Muyzer, G. & Westbroek, P., 1996. Skeletal matrices, mucin and the origin of Invertebrate calcification. **Proc. natl. Acad. Sci. USA**, 93: 1554-1559.
- 11) Westbroek, P. & Marin, F., 1998. A marriage of bone and nacre. **Nature**, 392: 861-862.
- 12) Marin, F., Corstjens, P., De Gaulejac, B., De Vrind-De Jong, E. & Westbroek, P., 2000. Mucins and molluscan calcification : molecular characterization of mucoperlin, a novel acidic mucin-like protein of the nacreous shell-layer of the fan mussel *Pinna nobilis* (Bivalvia, Pteriomorphia). **J. Biol. Chem.**, 275 (27): 20667-20675.
- 13) Bédouet, L., Schuller, J., Marin, F., Milet, C., Lopez, E., and Giraud, M., 2001. Soluble proteins of the nacre of the giant oyster *Pinctada maxima* and of the abalone *Haliotis tuberculata*: extraction and partial analysis of nacre proteins. **Comp. Biochem. Physiol.**, B, 128 (3): 389-400.
- 14) Marin, F., Pereira, L., and Westbroek, P., 2001. Large-scale purification of molluscan shell matrix. **Prot. Expres. Purif.**, 23: 175-179.

- 15) Hecker, A., Testenière, O., Marin, F., and Luquet, G., 2003. Phosphorylation of serine residues is fundamental for the calcium-binding ability of Orchestin, a soluble matrix protein from crustacean calcium storage structures. **FEBS Letters**, 535: 49-54.
- 16) Marin, F., Westbroek, P., and De Groot, K., 2003. Screening molluscan cDNA expression libraries with anti-shell matrix antibodies. **Prot. Expres. Purif.**, 30 (2): 246-252.
- 17) Marin, F., 2003. Molluscan shell matrix characterization by preparative SDS-PAGE. **The Scientific World Journal**, 3: 342-347.
- 18) Marin, F., Luquet, G., 2004. Molluscan shell proteins. **C. R. Palevol.**, 3: 469-492.
- 19) Luquet, G., Marin, F., 2004. Biomineralization in Crustaceans: storage strategies. **C. R. Palevol.**, 3: 515-534.
- 20) Marin, F., Luquet, G., 2005. Molluscan biomineralization: the proteinaceous shell constituents of *Pinna nobilis*. **Material Science & Engineering C: Biomimetic and Supramolecular Systems.**, 25: 105-111.
- 21) Marin, F., Amons, R., Guichard, N., Stigter, M., Hecker, A., Luquet, G., Layrolle, P., Alcaraz, G., Riondet, C. and Westbroek, P., 2005. Caspartin and calprismis, two proteins of the shell calcitic prisms of the Mediterranean fan mussel *Pinna nobilis*. **J. Biol. Chem.**, 280 (40): 33895-33908.
- 22) Pokroy, B., Fitch, A. N., Marin, F., Kapon, M., Adir, N. and Zolotoyabko, E., 2006. Anisotropic lattice distortions in biogenic calcite induced by intra-crystalline organic molecules. **J. Struct. Biol.**, 155: 96-103.
- 23) Marin, F., Pokroy, B., Luquet, G., Layrolle, P., De Groot, K., 2007. Protein mapping of calcium carbonate biominerals by immunogold. **Biomaterials**, 28: 2368-2377.
- 24) Pokroy, B., Kapon, M., Marin, F., Adir, N., and Zolotoyabko, E., 2007. Protein-induced, previously unidentified twin form of calcite. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 104 (18): 7337-7341.
- 25) Marie, B., Luquet, G., Pais De Barros, J. P., Guichard, N., Morel, S., Alcaraz, G., Bollache, L. and Marin, F., 2007. The shell matrix of the freshwater mussel *Unio pictorum* (Paleoheterodonta, Unionoida). Involvement of acidic polysaccharides from glycoproteins in nacre mineralization. **FEBS Journal**, 274 : 2933-2945.
- 26) Gaspard, D., Marin, F., Guichard, N., Morel, S., Alcaraz, G. and Luquet, G., 2008 (for 2007). Shell matrices from Recent rhynchonelliform brachiopods: microstructures and glycosylation studies, In « Brachiopod Research into the Third Millennium – Sir Alwyn Williams Memorial Issue », **Trans. R. Soc. Edinburgh (Earth & Environ. Sci.)**, 98: 415-424.
- 27) Marin, F., Luquet, G., Marie, B. and Medakovic, D., 2008. Molluscan shell proteins : primary structure, origin and evolution. **Curr. Top. Dev. Biol.**, 80: 209-276.
- 28) Fleury, C., Marin, F., Marie, B., Luquet, G., Thomas, J., Josse, C., Serpentin, A., and Lebel, J. M., 2008. Shell repair process in the green ormer *Haliotis tuberculata* : a histological and microstructural study. **Tissue and Cell**, 40: 207-218.
- 29) Marie, B., Luquet G., Bédouet, L., Milet C., Guichard, N., Medakovic, D., and Marin, F., 2008. Nacre calcification in the freshwater mussel *Unio pictorum*: carbonic anhydrase activity and purification of a 95-kDa calcium-binding glycoprotein. **ChemBiochem**, 9: 2515-2523.
- 30) Marie, B., Marin, F., Marie, A., Bédouet, L., Dubost L., Alcaraz G., Milet C. and Luquet G. Evolution of nacre: biochemistry and 'shellomics' of the shell organic matrix of the cephalopod *Nautilus macromphalus*. **ChemBiochem**, *accepté pour publication*.

## **b. Publications de rang B**

- 31) Marin, F. & Dauphin, Y., 1992. Malformations de la couche nacrée de l'huître perlière *Pinctada margaritifera* (L.) de Polynésie française: rapports entre altérations microstructurales et composition en acides aminés. **Ann. Sci. Nat., Zoologie, Paris, 13<sup>e</sup> série, vol. 13, fasc. 4: 157-168.**
- 32) Gautret, P. & Marin, F., 1993b. Evaluation of diagenesis in Scleractinian Corals and calcified Demosponges by substitution index measurement and intraskeletal organic matrix analyses. VI Int. Symp. on Fossil Cnidaria, Münster, 9-14 Sept 1991. **Cour. Forsch. Inst. Senckenberg, 164: 317-327.**
- 33) Reitner, J., Gautret, P., Marin, F. & Neuweiler, F., 1995. Automicrites in a modern microbialite. Formation model via organic matrices (Lizard Island, Great Barrier Reef, Australia). **Bull. Inst. Océanogr. Monaco, n° spécial 14 (2): 237-263.**
- 34) Larvor, H., Cuif, J. P., Dauphin, Y., Denis, A., Devauchelle, N., Gautret, P. & Marin, F., 1996. Development of a brown internal coloration in the scallop shell (*Pecten maximus*). Study of microstructural characteristics and analyses of crystal organic matrices. **Bull. Inst. Océanogr. Monaco, n° spécial 14 (4): 171-182.**
- 35) Gautret, P., Reitner, J. & Marin, F., 1996. Mineralization events during growth of the coralline sponges *Acanthochaetetes* and *Vaceletia*. **Bull. Inst. Océanogr. Monaco, n° spécial 14 (4): 325-334.**
- 36) Cuif, J. P., Dauphin, Y., Denis, A., Gautret, P. & Marin, F., 1996. The organo-mineral structure of coral skeletons: a potential source of new criteria for scleractinian taxonomy. **Bull. Inst. Océanogr. Monaco, n° spécial 14 (4): 359-367.**
- 37) Marin, F., Gillibert, M., Wesbroek, P., Muyzer, G. & Dauphin, Y., 1999. Evolution: disjunct degeneration of immunological determinants. **Geol. Mijnbouw., 78 (2): 135-139.**
- 38) Gaspard, D., Marie, B., Marin, F., and Luquet, G., 2008. Preliminary analysis of soluble matrix in some recent Terebratulid Brachiopoda. **Fossils & Strata, 54 : 269-275.**

## **c. Chapitres d'ouvrages**

- 39) Du, C., Tichelaar, F. D., Marin, F., Hofland, I., Cui, F. Z., De Groot, K., and Layrolle, P., 2002. Self-assembly apatite and composites: a model system relevant to biomineralization and biomimetic synthesis. In « Biomimetic composites for bone substitution », C. Du PhD Thesis, Leiden University, Chapter 8 : 111-128.
- 40) Marin, F., Luquet, G., 2007. Unusually acidic proteins in biomineralization, In "Handbook of Biomineralization, Vol 1: the Biology of Biominerals Structure Formation", E. Baeuerlein ed., Chapter 16: 273-290.
- 41) Weiss, I. M., and Marin, F., 2008. The role of enzymes in biomineralization processes. **Met. Ions Life Sci., 4 : 71-126.**

## **d. Actes de congrès**

- 42) Cuif, J. P., Gautret, P. & Marin, F., 1991. Correlation between the size of crystals and the molecular weight of organic fractions in the soluble matrices of Mollusc, Coral and Sponge carbonate skeletons. "Mechanisms & Phylogeny of Mineralization in Biological Systems" (S. Suga & H. Nakahara eds.), Springer Verlag, Tokyo: 391-395.
- 43) Marin, F., van de Valk, C., Hofland, I., Koerts, J., Layrolle, P., and de Groot, K., 2002. Molluscan shell matrices, a potential source of bioactive factors for bone reconstruction. Proceedings of the 17<sup>th</sup> European Conference in Biomaterials, ESB2002, Barcelona, Spain : p212.

- 44) Marin, F., Westbroek, P., and de Groot, K., 2003. The proteinaceous constituents of the shell of *Pinna nobilis* L. In « First International Meeting on the Mediterranean Fan-Shell *Pinna nobilis* 10-12 Oct. 2002, Ile des Embiez» **Mémoires de l'Institut Océanographique Paul Ricard** : 77- 90.
- 45) Marin, F., Layrolle, P., De Groot, K., and Westbroek, P., 2003. The origin of metazoan skeleton. In “Biom mineralization : Formation, Diversity, Evolution and Application”. Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Symposium on Biom mineralization (Kobayashi I. and Ozawa H. eds.), Tokai University Press, Kanagawa: 50-53.
- 46) Pereira-Mouries, L., Almeida, M. J., Marin, F., Gay, M., Milet, C., and Lopez, E., 2003. Soluble proteins of the nacre from the giant oyster *Pinctada maxima*, with highly hydrophobic amino acids. In “Biom mineralization : Formation, Diversity, Evolution and Application”. Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Symposium on Biom mineralization (Kobayashi I. and Ozawa H. eds.), Tokai University Press, Kanagawa: 145-148.
- 47) Westbroek, P., and Marin, F., 2003. The geologic history of calcification. In “Biom mineralization : Formation, Diversity, Evolution and Application”. Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Symposium on Biom mineralization (Kobayashi I. and Ozawa H. eds.), Tokai University Press, Kanagawa: 3-7.
- 48) Luquet, G., Hecker, A., and Marin, F., 2005. Orchestin, a key calcium-binding phosphoprotein in the cyclic elaboration of two different ACC storage structures by the crustacean *Orchestia cavimana*. Proceedings of the 8<sup>th</sup> ICCBMT 2004, Banff, Alberta, Canada: 111-114.
- 49) Gaspard, D., Marie, B., Marin, F., and Luquet, G., 2007. Biochemical characteristics of the shell soluble organic matrix of some recent terebratulid brachiopods. In: *Biom mineralization, from Paleontology to Materials Science*, (Arias J.L., Fernandez M.S., eds), Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Symposium on Biom mineralization, Editorial Universitaria, Santiago de Chile: 193-203.
- 50) Marie, B., Guichard, N., Luquet, G., and Marin, F., 2007. Calcification in the shell of the freshwater bivalve *Unio pictorum*. In: *Biom mineralization, from Paleontology to Materials Science*, (Arias J.L., Fernandez M.S., eds), Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Symposium on Biom mineralization, Editorial Universitaria, Santiago de Chile: 273-280.
- 51) Marin, F., Morin, V., Knap, F., Guichard, N., Marie, B., Luquet, L., Westbroek, P., and Medakovic, D., 2007. Caspartin: Thermal Stability and Occurrence in Mollusk Calcified Tissues. In: *Biom mineralization, from Paleontology to Materials Science*, (Arias J.L., Fernandez M.S., eds), Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Symposium on Biom mineralization, Editorial Universitaria, Santiago de Chile: 281-288.
- 52) Luquet, G., Fernandez, M. S., Arias, J. L., Guichard, N., Marie, B., and Marin, F., 2007. Biochemical characterization of the soluble organic matrix of gastroliths from decapods. In: *Biom mineralization, from Paleontology to Materials Science*, (Arias J.L., Fernandez M.S., eds), Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Symposium on Biom mineralization, Editorial Universitaria, Santiago de Chile: 319-328.
- 53) Marie, B., Le Roy, N., Marie, A., Dubost, L., Milet, C., Bédouet, L., Becchi, M., Zanella-Cléon, I., Jackson, D., Degnan, B., Luquet, G., and Marin, F. Nacre evolution: a proteomic approach. Materials Research Society, Spring Meeting, April 2009. *Soumis*.
- 54) Luquet, G., Le Roy, N., Zanella-Cléon, I., Becchi, M., Bucarey, S., Fernandez, M. S., Arias, J. L., Guichard, N., Marie, B., and Marin, F. Characterization of Crustacyanin-32 subunit as a component of the organic matrix of gastroliths from the crayfish *Cherax quadricarinatus*. Materials Research Society, Spring Meeting, April 2009. *Soumis*.
- 55) Trinkler, N., Marin, F., Guichard, N., Labonne, M., Bardeau, J. F., and Paillard, C. Shell repair in the clam *Ruditapes philippinarum*, affected by the Brown Ring Disease (BRD): a biochemical and serological study. Materials Research Society, Spring Meeting, April 2009. *Soumis*.

### e. Bilan chiffré

**Je suis auteur ou co-auteur de 52 publications, dont 30, de rang A.**

**6 des papiers dont je suis auteur ou co-auteur sont publiés dans des revues de facteur d'impact supérieur à 5.**

**12 sont publiés dans des revues de facteur d'impact supérieur à 3.**

### **Papiers les plus cités, au 22/02/2009**

Auteurs	Référence	Année	Nbre de citations
Westbroek, P., & Marin, F.	<i>Nature</i> , 392 : 861-862	1998	76
Marin, F., <i>et al.</i>	<i>J. Biol. Chem.</i> , 275 : 20667-20675	2000	69
Marin, F. <i>et al.</i>	<i>J. Biol. Chem.</i> , 280 : 33895-33908	2005	34
Marin, F., & Luquet, G.	<i>C. R. Palevol</i> , 3 : 469-492	2004	32
Bédouet, L., <i>et al.</i>	<i>Comp. Biochem. Physiol.</i> , 128 : 389-400	2001	26
Pokroy, B., <i>et al.</i>	<i>J. Struct. Biol.</i> , 155 : 96-103	2006	22
Dauphin, Y., & Marin, F.	<i>Experientia</i> , 51 : 278-283	1995	19
Marin, F., <i>et al.</i>	<i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 93 : 1554-1559	1996	17
Marin, F., <i>et al.</i>	<i>C. R. Acad. Sci. Paris, sér. II</i> , 318 : 1653-1659	1994	17
Hecker, <i>et al.</i>	<i>FEBS Lett.</i> , 535 : 49-54	2003	15
Luquet, G., & Marin, F.	<i>C. R. Palevol.</i> , 3 : 515-534	2004	12
Marin, F. <i>et al.</i>	<i>Prot. Expr. Purif.</i> , 30 : 246-252	2003	11

## f. Participation à des congrès

1990. Paris : 1<sup>er</sup> Congrès National de Paléontologie, 17-19 Mai (1 communication orale).
1991. Strasbourg : EUG 6, 24-28 Mars (1 communication orale).
1991. Lyon : Réunion annuelle de la Société Française de Cristallographie, 9-11 Juillet (1 communication orale).
1991. Münster, Allemagne : VI Int. Symp. on Fossil Cnidaria. 9-14 Septembre (1 poster).
1993. Strasbourg : EUG 7 (1 poster).
1993. Monaco : 7th International Biomineralization Symposium 17-20 Novembre ( 3 posters).
1994. Nancy : 15<sup>èmes</sup> RST, 28 Avril (1 communication orale).
1994. Amsterdam : NSG Symposium, 17 Novembre (1 poster).
1995. Strasbourg : EUG 8, 9-13 Avril (1 poster).
1996. Veldhoven, Pays-Bas : 3<sup>e</sup> Nederlands Aardwetenschappelijk Congres, 2-3 Mai, (1 poster).
1996. Amsterdam, 3<sup>e</sup> Annual NSG Symposium, 4 Octobre (1 poster).
1996. Paris, 2<sup>ème</sup> Congrès National de Paléontologie 13-15 Novembre (1 communication orale).
1997. Strasbourg, EUG 9, 23-27 Mars (1 communication orale).
1997. Tourtour, France, « Biomineralization : its role in the Cambrian diversification of life », Fondation des Treilles, 5-11 Mai (1 communication orale).
1997. Amsterdam, 4<sup>e</sup> Annual NSG Symposium, 16 Décembre (1 communication orale).
1998. Veldhoven, Pays-Bas, 4<sup>e</sup> Nederlands Aardwetenschappelijk Congres, 7-8 Mai (1 communication orale + 1 poster).
1999. Strasbourg, EUG 10, 29 Mars (1 communication orale).
1999. Tourtour, France «Biological participation in the global carbonate cycle », Fondation des Treilles, 12-13 Septembre (1 communication orale).
2000. Colby Sawyer College, New London, NH, USA, Gordon Conference on Biomineralization, 13-18 Août (1 communication orale + 1 poster).
2000. Amsterdam, 5<sup>e</sup> NSG Symposium, 14 Décembre (1 poster).
2001. Utrecht, Symposium on Biochemistry, 18 Septembre (1 poster).
2001. Niigata, Japan, Biom2001, 25-28 Septembre (1 communication orale + 2 posters).
2002. Paris, 5<sup>èmes</sup> Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés (JFBTM). 24-25 Mai. 1 poster.
2002. Barcelona. 17th ESB meeting (European Society for Biomaterials). 1 poster.
2002. Ile des Embiez. Séminaire *Pinna nobilis*. 1 communication orale + 1 poster.
2003. Nice, 6<sup>èmes</sup> Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés (JFBTM), 12-13 Juin, 1 communication orale.
2003. Alvor, Portugal. NATO-Advanced Study Institute « Learning from Nature how to design new implantable biomaterials : from biomineralization fundamentals to biomimetic materials and processing routes », 13-24 Octobre : 1 communication orale.
2004. Arcachon, 7<sup>èmes</sup> Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés (JFBTM), 25-27 Mars: 1 poster.
2004. Colby Sawyer College, New London, NH, USA, Gordon Conference on Biomineralization, 8-13 Août: 1 poster.
2004. Banff Centre, Alberta, Canada. 8<sup>th</sup> ICCBMT (International Conference on the Chemistry and Biology of Mineralized Tissues), 17-22 Octobre: 1 poster.
2005. Le Croisic, 8<sup>èmes</sup> Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés (JFBTM), 20-21 Mai: 2 posters.
2005. St John's, Newfoundland. International Marine Biotechnology Conference (IMBC 2005). 7-12 Juin: 1 communication orale.
2005. Copenhagen, Danemark. 5<sup>th</sup> International Brachiopod Congress, 4-8 Juillet : 1 communication orale (D. Gaspard).
2005. Paris, MNHN. 4<sup>th</sup> European Conference on Marine Natural Products, 12-16 Septembre : 1 poster.
2005. Pucon, Chili, 9<sup>th</sup> International Symposium on Biomineralization "from Paleontology to Material Science", 6-9 Decembre 2005 : 2 communications orales et 3 posters.
2006. Université Claude Bernard, Lyon, 2<sup>ème</sup> congrès commun SFTC/JFBTM, 18-20 Mai : 3 posters.
2006. ENSG, Nancy, "Biominéralisation 2006", Société Française de Minéralogie et Cristallographie (SFMC), 4-5 Juillet : 1 communication orale + 2 posters.
2006. Colby Sawyer College, New London, NH, USA. Gordon Conference on Biomineralization, 30 Juillet - 04 Août : 1 poster.
2006. 21<sup>ème</sup> Réunion des Sciences de la Terre (RST), Dijon, 4-8 Décembre : 2 communications orales + 1 poster.



2007. 10èmes JFBTM, Saint-Valéry sur Somme, 24-26 Mai : 1 poster (avec Univ. Caen) + 1 communication orale (Benjamin Marie).
2007. The Crustacean Society Mid-year Meeting, La Serena, Coquimbo (Chile), 14-17 Novembre : communication orale (Gilles Luquet).
2008. Physiomar 08, Brest, 01-04 Septembre : 2 communications orales (Benjamin Marie + Nolwenn Trinkler) + 1 poster (Benjamin Marie).
2009. 11èmes JFBTM, Nice, 19-21 Mars : 2 posters (Nathalie Le Roy et Nolwenn Trinkler).
2009. MRS Spring Meeting « Symposium Structure-Property Relationships in Biomineralized and Biomimetic Composites », San Francisco, CA, 13-17 Avril : 2 posters (Nathalie Le Roy, Nolwenn Trinkler) et 1 communication orale (Benjamin Marie).

### **g. Résumés de congrès**

- 1) **Marin F.** 1990. Composition en acides aminés des phases protéiques solubles et insolubles du squelette calcaire de trois démosponges actuelles. Congrès National de Paléontologie: 74.
- 2) **Marin, F.**, 1991. Diagenesis evaluation in calcareous fossil skeletons through biochemical analysis of their crystal-linked organic compounds. **Terra Nova, Abstr. suppl.**, 3/11: 509.
- 3) **Marin, F.**, 1991. Méthodes de caractérisation des phases organiques associées aux biominéralisations carbonatées. **Bull. Liais. Soc. Fr. Min. Crist.**, vol 2: 45.
- 4) Gautret, P. & **Marin, F.**, 1991. Evaluation of diagenesis in Scleractinian corals and calcified Demosponges by substitution index measurement and intraskeletal organic matrix analysis (VI Int. Symp. on Fossil Cnidaria, Münster :1p.
- 5) Cuif, J. P., Dauphin, Y., Gautret, P. & **Marin, F.**, 1993. Incipient diagenesis and organic remains in triassic biogenic aragonites. **Terra Nova, Abstract Suppl.** n° 1, 5: 705.
- 6) Cuif, J. P., Dauphin, Y., Gautret, P. & **Marin, F.**, 1993. Evolution diagénétique des carbonates biogéniques. Incidence de leur architecture organo-minérale sur les paramètres minéralogiques et biochimiques au cours de la diagenèse précoce. Réunion spéciale SGF "Carbonates Intertropicaux" : 30-31.
- 7) Larvor, H., Cuif, J. P., Dauphin, Y., Denis, A., Devauchelle, N., Gautret, P. & **Marin, F.**, 1993. Development of brown internal coloration in the scallop shell *Pecten maximus*. Biomineralization 93, Program and Abstracts : 108.
- 8) Gautret, P., Reitner, J. & **Marin, F.**, 1993. Mineralization events during growth of the coralline sponges *Acanthochaetetes* and *Vaceletia*, Biomineralization 93, Program and Abstracts : 60.
- 9) Cuif, J. P., Dauphin, Y., Denis, A., Gautret, P. & **Marin, F.**, 1993. Fibre cristallinity, skeletal organic contents and taxonomy in some recent scleractinian corals, Biomineralization 93, Program and Abstracts : 82.
- 10) **Marin, F.**, 1994. Ultrastructure et composition chimique des biocristaux calcaires d'Invertébrés marins: applications taxinomiques et sédimentologiques. 15ème Réunion des Sciences de la Terre : 18.
- 11) **Marin, F.**, Smith, M., Westbroek, P. & Isa, Y., 1995. Invertebrate muci: an origin for calcifying systems ? EUG 8. **Terra Nova**, Abstracts suppl. n°1 to vol. 7: 236.
- 12) **Marin, F.** & Westbroek, P., 1996. Mucus, skeletal matrices and the origin of invertebrate calcification : an immunological / molecular biology approach. 3e Nederlands Aardwetenschappelijk Congres, Trends in de Geowetenschappen : 1p.
- 13) **Marin, F.** & Westbroek, P., 1996. Anti-calcification et l'explosion cambrienne: les données de l'immunologie et de la biologie moléculaire. Deuxième Congrès National de Paléontologie. Paléontologie, histoire récente et perspectives à l'aube de l'an 2000 : 43.

- 14) **Marin, F.** & Westbroek, P., 1997. Birth of metazoan calcification at the dawn of cambrian times : a molecular genetic approach. **Terra Nova**, 9 (Abstract suppl. n°1): 277.
- 15) **Marin, F.**, Corstjens, P., Westbroek, P., Milet, Ch., Lopez, E., Knoll, A. & Simkiss, K., 1997. New insights into the cambrian explosion. *Sedimentary Geology : from reconstructions to predictions* : 15-16.
- 16) Westbroek, P., Knoll, A. **Marin, F.**, Simkiss, K., Milet, C., and Lopez, E., 1997. The origin of animal skeletons. *Abstracts of the Geological Society of America, Annual Meeting*, 29, 6 : 54.
- 17) **Marin, F.**, Corstjens, P., Westbroek, P., Milet, C., Lopez, E., Knoll, A. & Simkiss, K., 1998. The origin of animal skeletons. *Geowetenschappelijke Grensgevallen, Vierde Nederlands Aardwetenschappelijk Congres*: 2.28.
- 18) **Marin, F.**, Westbroek, P., Milet, C., Lopez, E., Knoll, A. & Simkiss, K., 1999. The origin of animal skeleton. **J. Conf. Abs.**, 4: 264.
- 19) **Marin, F.**, 2001. L'origine de la calcification chez les métazoaires. 4èmes Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés (JFTBM). Strasbourg : 1p.
- 20) **Marin, F.**, Layrolle, P., De Groot, K., and Westbroek, P., 2001. The origin of metazoan skeleton. *Biom2001, Niigata, Japan* : 20-21.
- 21) Pereira-Mouries, L., Almeida, M. J., **Marin, F.**, Gay, M., Milet, C., and Lopez, E., 2001. Soluble proteins of the nacre from the giant oyster *Pinctada maxima*, with highly hydrophobic amino acids. *Biom2001, Niigata, Japan* : 101-102.
- 22) Westbroek, P., and **Marin, F.**, 2001. The geologic history of calcification. *Biom2001, Niigata, Japan* : 11.
- 23) **Marin, F.**, and Westbroek, P., 2001. On the origin(s) of metazoan skeletons. 7<sup>th</sup> International Conference on the Chemistry and Biology of Mineralized Tissues (7<sup>th</sup> ICCBMT), Sawgrass Marriott Resort, Ponte Vedra Beach, Florida, USA, 4-9 November 2001 : p144.
- 24) **Marin, F.**, Amons, R., Layrolle, P., Stigter, M., Westbroek, P., and De Groot, K., 2002. Les protéines de la matrice soluble de prismes calcitiques de *Pinna nobilis* (Mollusca, Bivalvia). 5<sup>èmes</sup> JFBTM, 23-24 Mai, Montrouge. Livre des résumés : p30.
- 25) **Marin, F.**, and Luquet, G., 2003. Molluscan shell proteins : origin, evolution, application. NATO/ASI « Learning from Nature how to design new implantable biomaterials : from biomineralization fundamentals to biomimetic materials and processing routes », 13-24 October 2003, Alvor, Algarve, Portugal. Abstract book : p 33.
- 26) **Marin, F.**, Hecker, A., Luquet, G., Amons, R., Layrolle, P., De Groot, K., and Westbroek, P., 2003. Comment se forme la coquille des mollusques. 6èmes JFBTM, 12-13 Juin, Nice. Livre des résumés : p 27.
- 27) **Marin, F.**, Hecker, A., Guichard, N., Luquet, G., 2004. Two new proteins of the calcitic prismatic layer of *Pinna nobilis* (Mollusca, Bivalvia). 8th ICCBMT, October 17-22, Banff Centre, Alberta, Canada : p 258.
- 28) **Marin, F.**, Morin, V., Marie, B., Guichard, N., Luquet, G., 2005. Immunologie, taxonomie et microstructures, coquillères chez les mollusques. 8èmes JFBTM, 20-21 Mai, Le Croisic. Livre des résumés : p 71.
- 29) Marie, B., Guichard, N., Luquet, G., **Marin, F.**, 2005. Calcification de la coquille chez le bivalve d'eau douce *Unio pictorum*. 8èmes JFBTM, 20-21 Mai, Le Croisic. Livre des résumés : p 70.
- 30) **Marin, F.**, Amons, R., Guichard, N., Luquet, G., Alcaraz, G., Westbroek, P., 2005. The acidic shell proteins of nacro-prismatic bivalves : the example of *Pinna nobilis*. IMBC 2005, 7-12 June, St John's, Newfoundland, Canada. Abstract book : 126.
- 31) Marie, B., Guichard, N., Luquet, G., and **Marin, F.**, 2005. Calcification in the shell of the freshwater bivalve *Unio pictorum*. *Biom09*, 06-09 December, Pucon, Chile, Abstract Th15.

- 32) **Marin, F.**, Morin, V., Knap, F., Guichard, N., Marie, B., Luquet, L., Westbroek, P., and Medakovic, D., 2005. Caspartin: Thermal Stability and Occurrence in Mollusk Calcified Tissues. Biom09, 06-09 December, Pucon, Chile, Abstract Th16.
- 33) Luquet, G., Fernandez, M. S., Arias, J. L., Guichard, N., Marie, B., and **Marin, F.**, 2005. Biochemical characterization of the soluble organic matrix of gastroliths from decapods. Biom09, 06-09 December, Pucon, Chile, Abstract Th26.
- 34) Gaspard, D., Marie, B., **Marin, F.**, and Luquet, G., 2005. Biochemical characteristics of the shell soluble organic matrix of some recent terebratulid brachiopods. Biom09, 06-09 December, Pucon, Chile, Abstract Fr03.
- 35) Pokroy, B., Fitch, N. A., Lee, P. L., Caspi, E. N., **Marin, F.**, Zolotoyabko, E., 2005. On the structure of mollusk-made aragonite and calcite. Biom09, 06-09 December, Pucon, Chile, Abstract Fr22.
- 36) **Marin, F.**, Gaspard, D., Alcaraz, G., Morel, S., Marie, B., Guichard, N., Luquet, G., 2006. Biochimie des matrices coquillères calcifiantes chez les brachiopodes Rhynchonelliformea. 9èmes JFBTM, 18-20 Mai, Lyon. Livre des résumés : p 115.
- 37) Luquet, G., Fernandez, M. S., Navarette, M. J., Arias, J. L., Guichard, N., Marie, B., **Marin, F.**, 2006. Caractérisation biochimique de la matrice organique de gastrolithes de crustacés décapodes. 9èmes JFBTM, 18-20 Mai, Lyon. Livre des résumés : p 110.
- 38) Marie, B., Guichard, N., Pais de Barros, J. P., Luquet, G., **Marin, F.**, 2006. Calcification de la coquille chez le bivalve d'eau douce *Unio pictorum*. 9èmes JFBTM, 18-20 Mai, Lyon. Livre des résumés : p 99.
- 39) Luquet, G., **Marin, F.**, 2006. Biominéralisations carbonatées chez les crustacés et les mollusques : processus biologiquement contrôlés. Biom2006, 4-5 Juillet, Nancy. Livre des résumés : p 4-5.
- 40) **Marin, F.**, Marie, B., Luquet, G., 2006. On the origin of metazoan calcium carbonate biominerals. 21st RST Meeting, 04-08 December, Dijon. Abstract book : p 39.
- 41) Marie, B., Guichard, N., Pais de Barros, J. P., Luquet, G., **Marin, F.**, 2006. Calcification chez les mollusques : étude de la matrice organique de la coquille chez le bivalve d'eau douce *Unio pictorum*. 21st RST Meeting, 04-08 December, Dijon. Abstract book : p 197.
- 42) Marie, B., Luquet, G., Pais de Barros, J. P., Guichard ; N., Morel, S., Alcaraz, G., **Marin, F.**, 2007. Etude de la matrice organique de la coquille du bivalve *Unio pictorum* : implication des polysaccharides associés aux glycoprotéines dans la minéralisation de la nacre. 10èmes JFBTM, 24-26 Mai, St-Valéry sur Somme. Livre des résumés : p 24.
- 43) Fleury, C., **Marin, F.**, Serpentine, A., Marie, B., Luquet, G., Lebel, J. M., 2007. Variation de l'expression des transcrits d'un collagène fibrillaire et d'un collagène non fibrillaire au cours de la réparation de la coquille du mollusque gastéropode *Haliotis tuberculata*. 10èmes JFBTM, 24-26 Mai, St-Valéry sur Somme. Livre des résumés : p 49.
- 44) Marie, B., Marie, A., Luquet, G., Bédouet, L., Dubost, L., Milet, C., and **Marin, F.**, 2008. Evolution and formation of *Nautilus macromphalus* nacre : biochemistry and proteomic of the shell organic matrix. Physiomar 08, 1-4 Sept., Brest, France. Abstract book : p 50 et p 135.
- 45) Trinkler, N., Bardeau, J. F., Sinquin, G., **Marin, F.**, Labonne, M., and Paillard, C., 2008. Characterization and description of stages of *Ruditapes philippinarum* shell repair face front to the Brown Ring Disease explained with SEM and Raman spectroscopy. Physiomar 08, 1-4 Sept., Brest, France. Abstract book : p 81.

## *h. Conférences invitées*

*Sont encadrées les conférences invitées les plus importantes.*

1995. University of Leiden : « Invertebrate muci : the key for the origin of calcifying systems ? » Biochemistry Symposium, 16 Juin.

1995. Hospedale San Raffaele, Milano, Italie : « Mucus substances, skeletal matrices and the origin of calcification among invertebrates », 29 Sept. , conf. invitée dans le cadre d'un projet EMBO.

1995. Université Libre de Bruxelles (ULB), Belgique : « Mucus, matrices squelettiques et l'origine de la calcification chez les invertébrés », 17 Nov.

1997. Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris. « Anticalcification et calcification, caractérisation de la matrice des invertébrés ». Séminaire Biominéralisation, 20 Janv.

1997. Tourtour, France, Fondation des Treilles. « Biomineralization : its role in the Cambrian diversification of life », 5-11 Mai.

1998. Université de Göttingen, Allemagne, Département des Sciences de la Terre. « The Cambrian explosion: a molecular biology approach », 29 Janv.

1998. Veldhoven, Pays-Bas, 4<sup>e</sup> Nederlands Aardwetenschappelijk Congres. « The origin of Animal Skeleton », 7-8 Mai.

1998. Academisch Ziekenhuis, Leiden. « Molluscan calcification : evolutionary and applied perspectives », 10 Juin.

1998. Bilthoven, Pays-Bas, Compagnie IsoTis, NV. « Molluscan calcification: evolutionary and applied perspectives », 29 Sept.

1999. Sylvius Laboratoria, Medisch Genetisch Centrum, Leiden. « The origin of animal calcification », 12 Févr.

1999. Tourtour, France, Fondation des Treilles. « Biological participation in the global carbonate cycle », 12-17 Sept.

1999. Paris, MNHN, DEA "Activités biologiques des substances naturelles. Reconnaissance moléculaire et communications cellulaires". « Biominéralisations chez les métazoaires: aspects évolutifs et appliqués », 15 Déc.

2000. Paris, MNHN, Séminaires du Laboratoire de Physiologie Générale et Comparée. « Les protéines de coquille de mollusques », 9 Mai.

2000. Paris, MNHN, DEA "Activités biologiques des substances naturelles. Reconnaissance moléculaire et communications cellulaires". « Biominéralisations chez les métazoaires: aspects évolutifs et appliqués », 12 Déc.

2001. Université d'Utrecht, Laboratoire de Géochimie. « The origin of metazoan skeleton », 5 Avril.

2001. Strasbourg, 4<sup>e</sup> Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés (JFBTM). « L'origine de la calcification chez les métazoaires », 17-18 Mai.

2001. Paris, MNHN, DEA "Activités biologiques des substances naturelles. Reconnaissance moléculaire et communications cellulaires". « Biominéralisations chez les métazoaires: aspects évolutifs et appliqués », 23 Oct.

2001. Roscoff, Ecole thématique du CNRS : « Géologie sédimentaire: tendances actuelles et prospectives ». « L'origine du squelette animal » 9-13 Juil.

2002. Paris, MNHN, DEA "Activités biologiques des substances naturelles. Reconnaissance moléculaire et communications cellulaires". « Biominéralisations chez les métazoaires: aspects évolutifs et appliqués », 25 Oct.

2003. Paris, Collège de France. Séminaire Biominéralisations, organisé par A. de Riquès et J. Livage. « Les protéines des coquilles de mollusque, aspects évolutifs et appliqués ». 15-16 Mai.

2003. Neuchâtel, Université de Neuchâtel. Séminaire « les protéines de coquilles de mollusques : aspects évolutifs et appliqués », 27 Octobre.

2003. Bremen, Allemagne. Molluscan shell proteins: an open window on the origin of metazoan skeleton. Conférence invitée dans le cadre du « workshop » : « Molecular Biology and protein Chemistry in Biomineralization Research », 4-5 Décembre.

2004. CUSO Meeting, Abbaye de la Bussière, Côte d'Or, 11-13 Mai. 2 interventions de 45 min. "L'origine de la calcification chez les métazoaires" et "Techniques d'étude des minéralisations biologiquement contrôlées".

2006. Université Johannes Gutenberg, Mayence, Abteilung Angewandte Molekularbiologie, 22 Février: « Molluscan shell proteins: a kit of multifunctional tools ».

2006. Gordon Research Conference on Biomineralization, 30 Juillet - 4 Août, Colby Sawyer College, NH, USA : « Molluscan shell proteins: origin, evolution, and diagenesis ».

2006. Ecole Galerne 2006, "Matériaux et Biologie II", Bollwiller, Ht-Rhin, 11-14 Septembre : « Biominéralisation carbonatée chez les invertébrés: l'exemple des mollusques ».

2006. Université des Antilles, campus de Fouillole, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, 21 Novembre : « Biominéralisation carbonatée chez les mollusques ».
2006. Bioloski Institut Jovana Hadzija, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovénie, 28 Novembre : « Molluscan shell proteins ».
2007. ESF (European Science Foundation) Exploratory Workshop : « Biomineralization : from Biology to Materials », Aarhus University, Denmark, 11-14 May : « Molluscan Shell Proteins : origin, evolution and applications ».
2007. 10èmes JFBTM, Saint Valéry sur Somme : De l'intérêt des protéines des coquilles de mollusques, conférence plénière de 45 min. (26 Mai).
2007. Ecole thématique CNRS-CEA « les climats du pré-Quaternaire : des premières glaciations jusqu'à l'apparition des premiers hominidés », Propriano, Corse, 7-12 Octobre. Conférence sur « Climat et évolution biologique : origine de la biominéralisation des métazoaires », 8 Octobre.
2008. World Biomaterials Congress, RAI Convention Center, Amsterdam, Pays-Bas, 28 Mai-01 Juin, keynote lecture « the molluscan shell, a natural organo-mineral composite », NBTE honorary symposium « Klaas de Groot, nucleator of biomineralization research ».
2008. Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM), Brest : conférence invitée : « Les protéines des coquilles de mollusques », 04 Juin.
2008. Centar za prirodno naslijede, Bosna Forum International, Sarajevo. Calcium carbonate biomineralizations, 18 Novembre.
2008. Zemalski Museum Sarajevo. Biologically-controlled mineralizations: the molluscan shell example. 20 Novembre.
2009. Brussels, COST Office, TDP-SAB Hearings, 12 Mars. Understanding and manipulating enzymatic and proteomic processes in biomineralization. Présentation commune avec D. Medakovic et D. Lyons.
2009. Lyon, Univ. Claude Bernard, 30 Mars. Biominéralisation de la coquille des mollusques : origine, évolution, formation.

**Bilan : depuis 1995, j'ai été invité à 37 conférences dont 19 à l'étranger.  
Les conférences les plus importantes (audience la plus large et la plus internationale)  
ont été le congrès de Veldhoven (1998), la Gordon Conferences (2006) et le World  
Biomaterials Congress (2008).**

### *i. Conférences grand public*

Jusqu'à présent, je me suis peu impliqué dans cette activité. J'ai eu toutefois l'opportunité de donner quelques conférences grand public auprès d'associations :

1999. Salle des associations, Juvisy, France. Association Magma. La Terre : 4,6 milliards d'années d'histoire (et 3,5 milliards d'années d'inventions biologiques). 2 conférences, 20 et 21 Novembre.

En Janvier 2004, j'ai donné une conférence auprès d'une association Dijonnaise « Association des Amis de la Nature et du Paysage » sur le thème « La Terre, 4,6 milliards d'années d'histoire ». A la suite de cette conférence, j'ai écrit un article dans une revue locale « La Feuille ».

F. Marin, 2005. La Terre, une histoire de 4,6 milliards d'années. La Feuille, 17 : 16-20.

J'ai participé à l'élaboration d'un poster sur les biominéralisations, intitulé « Evolution au cœur des matériaux, les biominéralisations », dans le cadre de la Fête de la Science, les 13 et 14 Octobre 2007.

Récemment, j'ai donné une conférence (invitée) auprès de l'association Bosna Forum (Centar za prirodno naslijede, Bosna Forum International), à Sarajevo, le 18 Novembre 2008. Cette conférence, intitulée « calcium carbonate biomineralizations » donnera lieu à un article dans la revue bosniaque « Forum Bosnae ».

## **I.3. PARCOURS SCIENTIFIQUE, en bref...**

### **a. Période 1989-1994 : doctorat et contrat ATER**

*Cette 1<sup>ère</sup> phase couvre les années 89-92, puis, après le Service National, la période Févr. 93-Mars 94.*

**Sujet de thèse :** *Essai de caractérisation chromatographique et immunologique des constituants organiques associés aux biocristaux carbonatés des squelettes de mollusques, cnidaires et spongiaires.*

**Problématique :** chez les métazoaires, l'élaboration d'un squelette minéralisé est un processus régulé par une trame organique extracellulaire, qui reste incluse dans le squelette une fois celui-ci formé. Cette trame est un mélange complexe de protéines, glycoprotéines et polysaccharides. Elle contrôle la morphologie des cristaux, leur taille, ainsi que leur agencement en microstructures bien définies. La thèse a donné lieu à trois questionnements scientifiques :

- Cette matrice a-t-elle une valeur taxonomique, chez les spongiaires, les cnidaires, les mollusques ?
- Nous donne-t-elle des informations sur les processus de biominéralisation, à l'échelle moléculaire ?
- Comment cette matrice évolue-t-elle lors des processus de fossilisation et de diagenèse ?

Pour tenter de répondre à ces questions, j'ai développé un protocole d'analyse des matrices calcifiantes par chromatographie d'exclusion stérique, par échange d'ions, par analyse d'acides aminés et par analyse de monosaccharides. J'ai également élaboré des anticorps polyclonaux contre des matrices calcifiantes purifiées de mollusques. Ces anticorps ont été testés contre des matrices de nombreux organismes calcifiants par ELISA. Des caractérisations électrophorétiques et d'immuno-transfert ont été réalisées.

**Résultats majeurs :** *ils reprennent les 3 questionnements énoncés plus haut.*

*Valeur taxonomique - Nos analyses biochimiques ont montré que les matrices calcifiantes pouvaient, dans certains cas, être utilisées dans une perspective taxonomique. Leurs compositions en acides aminés et monosaccharides discriminent les formes qui les ont produites. Dans quelques cas, nous avons mis en évidence une signature biochimique du squelette, en particulier, une signature collagénique de la matrice calcifiante de certaines démosponges.*

*Processus de minéralisation - Plusieurs modèles biologiques ont été abordés : mollusque, cnidaires, spongiaires, microbialithes. Dans chaque cas, nous avons essayé de comprendre les fonctions des matrices calcifiantes. Chez les mollusques, nous avons pu montrer que des déficiences de la minéralisation coquillière (huîtres perlières ; coquilles Saint-Jacques) étaient liées à des modifications des propriétés biochimiques des matrices associées, en particulier, à une diminution des teneurs en acide aspartique, ligand des ions calcium. Les approches immunologiques et électrophorétiques nous ont permis de distinguer des matrices calcifiantes extraites de microstructures différentes coexistant dans une même coquille, chez 2 bivalves nacropismatiques.*

*Diagenèse des carbonates biogéniques – l'évolution diagénétique des carbonates biogéniques a été abordée. En particulier, les analyses d'acides aminés sur des fossiles*

ont montré qu'il existe une matrice résiduelle : œuf de dinosaures, cnidaires, spongiaires. Cette matrice a pu influencer l'évolution diagénétique des squelettes.

## **b. Période 1994-2002: post-doctorat néerlandais et secteur privé**

Cette 2<sup>nd</sup>e phase dans ma carrière correspond à mon long séjour post-doctoral à l'Université de Leiden, Pays-Bas, et aux 2 années passées à IsoTis, compagnie néerlandaise spécialisée dans la mise au point d'implants osseux, cartilagineux et de peau. Si cette phase a donné lieu à un nombre plus faible d'articles publiés que la période précédente, elle se caractérise par quelques publications-clés, parues dans des revues à très fort facteur d'impact.

### **Post-doctorat, période 1994-2000**

Une question essentielle ayant trait aux biominéralisations chez les métazoaires concerne leur origine à la base du Cambrien, il y a environ 540 millions d'années. Comment sont-elles apparues ? Ont-elles été héritées ? Sont-elles apparues « *ex nihilo* » ? Ces questions sont un des aspects majeurs de l'événement Cambrien. Au cours de mon post-doctorat, j'ai mis en place un scénario qui pourrait expliquer la transition d'un système non calcifiant ancestral (protérozoïque) à un système calcifiant ; c'est le scénario de « l'anti-calcification ».

Ce scénario a été testé en comparant par immunologie et par des tests biochimiques *in vitro* deux types de matrices extracellulaires, le mucus et la matrice calcifiante, chez deux bivalves et un hexacoralliaire. J'ai mis en évidence des similitudes immunologiques entre ces deux produits de sécrétion, qui possèdent en outre la capacité d'inhiber la précipitation de CaCO<sub>3</sub> en solution. D'où l'idée qu'un mucus anti-calcifiant aurait protégé les téguments des métazoaires Néoprotérozoïques dans des océans sursaturés vis à vis du CaCO<sub>3</sub>, puis aurait été exapté à une nouvelle fonction, le contrôle de la minéralisation, à la transition Cambrienne. Cette hypothèse parcimonieuse a été publiée dans les PNAS. Elle a ensuite été testée de manière plus fine par des techniques de biologie moléculaire : après construction de banques d'ADN complémentaires, j'ai identifié, fin 1996, un transcrite codant une nouvelle protéine de nacre chez les bivalves. J'ai nommé cette protéine mucoperline, qui a fait l'objet d'un article dans JBC, et de nombreuses communications (orales, posters) entre 1997 et 2000. Nous avons complété notre hypothèse quant à l'origine précambrienne des constituants des matrices calcifiantes, en intégrant les données de nos collègues du MNHN (groupe Lopez, Milet) sur les propriétés ostéogéniques de la nacre, à notre scénario d'exaptation. Ce scénario a été publié dans Nature. Mes travaux ont été récompensés par le prix Vening-Meinesz (prix de 25000 Florins).

En résumé, ma formation post-doctorale a permis :

- D'apprendre de nombreuses techniques de biologie moléculaire.
- De mettre en place une thématique de recherche originale, sur le long terme.
- D'amplifier la portée de ma recherche et de confronter cette recherche aux meilleurs spécialistes mondiaux du domaine des biominéralisations (cf. congrès et conférences invitées entre 1994 et 2002).

### **Secteur privé, période 2001-2002**

Les 2 ans passés dans le privé (compagnie IsoTis) m'ont permis de poursuivre mes recherches sur la matrice calcifiante des prismes calcitiques de la coquille de *Pinna nobilis*, grand bivalve Méditerranéen. Une partie des expériences réalisées a été utilisée pour une publication majeure dans JBC parue en 2005.

De plus, j'ai mis au point 2 techniques : la première concerne la purification à grande échelle de protéines constitutives des matrices calcifiantes. Cette méthodologie, qui combine un fractionnement par électrophorèse préparative à une détection par dot-blot, m'a permis de caractériser 2 nouvelles protéines, la caspartine et la calprismine. Elle a fait l'objet de 2 publications. La 2<sup>nd</sup>e technique, que j'ai entièrement mise au point à IsoTis, puis perfectionnée à Dijon concerne la localisation directe sur biominéraux carbonatés ou phosphatés (coquille de mollusques, implant revêtu d'un 'coating' en Ca-P) de protéines d'intérêt, par immunogold, suivi d'une observation MEB en électrons rétro-diffusés. Elle a fait l'objet de plusieurs publications postérieures à 2002.

Mes recherches à IsoTis m'ont également permis de m'initier aux techniques histologiques sur tissu osseux, aux expérimentations animales, et aux tests sur cellules. Hormis l'aspect « recherche », mon activité au sein de la compagnie s'est diversifiée : formation de stagiaires, implémentation de techniques biochimiques classiques (SDS-PAGE, Western-blot, ELISA), management du 'PhD pool', conception de projets de recherche, prise de contact avec des partenaires (industriels, brevets, etc...).

### **c. Période 2003-2009 : CRI CNRS, Université de Bourgogne**

Le bilan provisoire est le suivant :

- Mise en place d'un laboratoire dédié à l'analyse des matrices calcifiantes. Ce laboratoire, pleinement opérationnel depuis Février 2004, comprend 3 membres permanents, un post-doc et trois thésards. Il permet d'exploiter les techniques biochimiques d'analyse des matrices calcifiantes, ainsi que les techniques de biologie moléculaire. En outre, les techniques d'immunogold et de purification préparative, mises au point pendant la 2<sup>nd</sup>e phase, sont utilisées en routine. Depuis 2007, grâce à une ANR (ACCRO-Earth), nous mettons en place une approche « protéomique de la calcification ».

- Pérennisation de l'axe de recherche « origine des biominéralisations carbonatées chez les métazoaires ». Cette question scientifique, qui reste plus que jamais d'actualité, constitue le point central de notre recherche. Avec les très nombreuses séquences de protéines publiées ces dernières années, nous pouvons affiner les scénarios quant à l'origine de ces protéines. Nous pensons en particulier que la fonction « anhydrase carbonique », qui fait l'objet de la thèse de N. Le Roy, joue un rôle clé dans la compréhension de l'origine des systèmes calcifiants. Depuis 2007, nous mettons l'accent sur cet aspect.

- Etude de plusieurs modèles biologiques, autorisant une approche comparative inter-phylum. Modèles mollusques : *Pinna nobilis*, *Unio pictorum*, *Haliotis*, *Nautilus*. Modèle arthropodes. Modèle brachiopodes.

- Mise en place de nombreuses collaborations : internes à l'UMR, locales (ENESAD, groupe Alcaraz ; U498 INSERM), nationales (Univ. Caen ; MNHN Paris ; Univ. Paris-Sud Orsay ; GDR perles « ADEQUA », IUEM, ICBP, Lyon), internationales (Technion Haifa, Israël ; Univ. Santiago, Chili ; Center for Marine Research Rovinj, Croatie (PAI Cogito + EcoNet) ; Projet Européen BioMintec).



### d. Collaborations actuelles et financements

Trois grands axes de recherche structurent mon activité depuis 2003. Il s'agit de :

- L'origine et l'évolution de la biominéralisation carbonatée des métazoaires.
- Le contrôle de la minéralisation par la matrice calcifiante.
- La diagenèse des matrices calcifiantes des minéraux carbonatés.

Ces trois axes sont découpés en un certain nombre de chantiers (j'en ai défini 9), pour lesquels j'indique les collaborations ainsi que les sources de financement (Table 1).

N° CHANTIERS		LES GRANDS AXES DE RECHERCHE			FINANCEMENTS	COLLABORATIONS
		Origine et évolution des biominéralisations des métazoaires	Contrôle de la minéralisation par la matrice calcifiante	Diagenèse des matrices des minéraux carbonatés		
1	Les protéines acides dans la minéralisation	2003 à ... <i>Pérenne</i>	2003 à ... <i>Pérenne</i>	2005-2006 <i>Ponctuel</i>	Récurrent ACI ANR	Technion
2	Origine et évolution de la nacre des mollusques	2004 à ... <i>Pérenne</i>	2004 à ... <i>Pérenne</i>		Récurrent ACI ANR	MNHN ICBP
3	Rôle de la fraction saccharidique dans la biominéralisation		2005 à ... <i>Ponctuel</i>		ACI BQR Buffon	ENESAD
4	Activité anhydrase carbonique des matrices calcifiantes	2007 à ... <i>Pérenne</i>	2007 à ... <i>Pérenne</i>		ANR ECOS-SUD	CIMAT (Chili)
5	Réparation coquillière chez les bivalves		2005 à 2007 (Caen) 2008 à ... (IUEM)		Récurrent	Univ. Caen IUEM Brest
6	Développement larvaire de la coquille chez les bivalves	2005 à ... <i>De proche en proche</i>	2005 à ... <i>Idem</i>		PAI ECO-NET ANR	Center Rovinj Croatie)
7	Matrice coquillière chez les brachiopodes	2005 à ... <i>De proche en proche</i>	2005 à ... <i>De proche en proche</i>		ACI ANR	D. Gaspard (Univ.P. XI)
8	Structure de stockage calcique chez les crustacés	2003 à ... <i>Pérenne</i>	2003 à ... <i>Pérenne</i>		ANR ECOS-SUD BQR Luquet	CIMAT (Chili)
9	Diagenèse des matrices calcifiantes			2005 à 2007 <i>Ponctuel</i>	ACI Récurrent	

 Axe couvert par le chantier

Table 1. Les grands axes de la recherche réalisée à Dijon depuis 2003.

Dans la table ci-après (Table 2), j'indique toutes les sources de financement qui ont couvert la période 2003-2009. Les financements majeurs sont ou ont été l'ACI Jeune Chercheur (2004-2006) et le contrat ANR (2007-2010). Des financements ponctuels, sous la forme de 3 projets régionaux, dont un projet « accueil jeunes chercheurs » (T. Rigaud, porteur du projet) ont permis de monter *ex nihilo* le laboratoire de biominéralisation.

Actuellement, le laboratoire fonctionne sur les crédits ANR, sur le programme Européen BioMintec, et sur le GDR ADEQUA.

	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
<b>E Q U I P E M E N T</b>		Accueil jeunes chercheurs T. Rigaud									
			ACI JC 3049 F. Marin								
			Projet Région 1 (Marin/Faivre)								
			Projet Région 2 (Marin)								
							ANR ACCRO-Earth				
<b>F O N C T I O N N E M E N T</b>				Crédits récurrents							
				ACI JC 3049 F. Marin					Projet Européen BioMintec		
			BQR G. Luquet								
			BQR G. Luquet							GDR ADEQUA	
				BQR G. Luquet							
							BQR "Buffon"				
			Prise de fonctions Janv. 2003					ANR ACCRO-Earth			
				PAI Cogito (F. Marin)							
								ECO-Net (F. Marin)			
								ECOS-SUD (G. Luquet)			

Table 2. Financement du laboratoire de biominéralisation sur la période 2003-2009.

## **I.4. RESPONSABILITES**

### **a. Responsabilités au sein de l'UMR**

Au niveau de l'UMR, j'anime l'équipe « Biominéralisations » : je gère en particulier tout le budget qui nous est alloué : crédits récurrents, ACI (2003-2006), ANR (2007-2010), BQR, GDR, BioMintec. Ces activités impliquent l'achat d'équipement, de consommables et de réactifs chimiques et biologiques, ainsi que la gestion des analyses externes : analyse d'acides aminés, production d'anticorps polyclonaux. Un aspect important concerne aussi la recherche de financements, la rédaction de projets de recherche, ainsi que la rédaction de rapports d'activité.

Jusqu'à Janvier 2007, j'étais également responsable du service analytique de l'UMR : gestion du budget, prise en compte des besoins analytiques des collègues géochimistes, gestion de l'emploi du temps de Nathalie Guichard, technicienne CNRS. Avec l'intégration des collègues de « Géosol » lors du nouveau contrat quadriennal, cette responsabilité s'est quelque peu diluée.

Je suis également membre du Conseil d'UMR qui se réunit une fois par trimestre.

### **b. Organisation du symposium « Vie Primitive, Radiations Anciennes »**

A l'instar de certains de mes collègues de l'UMR, j'ai été très impliqué dans l'organisation de la 21<sup>ème</sup> RST, qui s'est tenue au Palais des Congrès de Dijon, du 4 au 8 Décembre 2006. Cette manifestation d'importance, organisée par l'UMR CNRS 5561 et présidée par B. David et F. Andreux, a réuni plus de 800 chercheurs. Mon rôle a consisté à organiser, avec mon collègue Bertrand Lefebvre, l'un des deux symposiums internationaux de la RST : le symposium « Primitive Life, Ancient Radiations ».

L'organisation de ce symposium a consisté en :

- invitation de 4 chercheurs d'envergure internationale : Pr. Andrew Knoll, (Harvard), Pr. Stefan Bengtson (Stockholm), Pr. Werner Müller (Mainz), Pr. Jean Yves Sire (Paris).

- l'élaboration d'une « mailing liste » de plus de 1000 noms de chercheurs du monde entier, dans les domaines concernés : géologues, paléontologistes, géochimistes du Précambrien, du Cambrien, de l'Ordovicien, mais aussi biologistes du développement, microbiologistes et chimistes « prébiotiques ».

- la diffusion de plusieurs circulaires.

- l'élaboration et la diffusion d'une plaquette spéciale pour le symposium, comportant les noms des 4 conférenciers invités.

- la collecte des résumés, et leur correction.

- l'envoi de lettres d'invitation pour les chercheurs chinois et russes.

- l'organisation du déroulement des deux jours.

- la gestion des déplacements et hébergement des conférenciers invités.

- la gestion de l'hébergement de certains inscrits au symposium (collègues russes et chinois notamment).

- l'animation du symposium sur les 2 jours (chairman).

Le symposium, qui s'est déroulé les 7 et 8 Décembre 2006, a réuni plus de 100 participants, d'une dizaine de pays différents. En tout, 37 résumés ont été communiqués : Hormis les 4 conférenciers invités, il y a eu 22 communications orales et 10 posters.

A la suite de ce symposium, un volume spécial « Primitive Life, Ancient Radiations », dont je suis le co-éditeur scientifique avec Bertrand Lefebvre, a été édité par la revue Biogeosciences :

Cf. [http://www.biogeosciences-discuss.net/special\\_issue23.html](http://www.biogeosciences-discuss.net/special_issue23.html).

## **I.5. EXPERTISES DIVERSES**

### **a. Expertise d'articles**

Sur la période 2000-2008, j'ai expertisé de nombreux articles ayant trait au domaine de la biominéralisation, pour les revues suivantes : *Journal of Biological Chemistry*, *FEBS Journal*, *Comparative Biochemistry and Physiology*, *Biogeosciences*, *Journal of Experimental Zoology*, *European Journal of Biochemistry*, *Comptes Rendus Palévol.*, *ChemBiochem.*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, *FEBS Letters*, *Journal of Palaeontology*, *Journal of Structural Biology*, *Science*.

Ces 2 dernières années, j'ai été très souvent sollicité pour évaluer des articles (en moyenne 1 fois par mois), mais je n'ai pas toujours donné suite à ces sollicitations par manque de temps.

### **b. Jury de thèse**

Depuis mon installation à Dijon, j'ai été membre du jury de 6 thèses :

- Arnaud Hecker (Univ. de Bourgogne, Dijon, 13 Décembre 2002) : « *Production, fonction et localisation d'Orchestine : calciprotéine spécifique de la matrice organique des structures minéralisées élaborées par le crustacé terrestre *Orchestia cavimana** » (examineur).
- Marthe Rousseau (MNHN, Paris, 31 Mars 2004) : « *Structure, croissance et biologie de la nacre* » (examineur).
- Olivier Braissant (Univ. Neuchâtel, 02 Novembre 2005) : « *Carbonatogenèse bactérienne liée au cycle biogéochimique oxalate-carbonate* » (rapporteur).
- Jean-Philippe Gourdine (Univ. Des Antilles et de la Guyane, Pointe-à-Pitre, Novembre 2006) : « *étude d'une nouvelle lectine marine de la palourde blanche *Codakia orbicularis* : la codakine* » (examineur).
- Christophe Fleury (Univ. Caen Basse -Normandie, 20 Décembre 2006) : « *étude des collagènes (types I et IV) chez le mollusque gastéropode *Haliotis tuberculata* et analyse de leur expression lors du processus de réparation de la coquille. Activité biologique in vitro d'une protéine collagénique recombinante (fibroblastes humains)* » (membre invité).
- Benjamin Marie (Univ. Bourgogne, 14 Mai 2008) : « *les protéines des matrices calcifiantes chez le nautilus *Nautilus macromphalus* et la moule d'eau douce *Unio pictorum*, mollusques à microstructures coquillières nacro-prismatiques : identification, caractérisation et comparaisons inter-classes* » (examineur).

Je suis membre du comité de thèse de Nolwenn Trinkler (IUEM). A ce titre, je participerai probablement à son jury de thèse fin 2009 ou début 2010.

### c. Expertise de projets scientifiques

J'ai également été amené à évaluer ponctuellement des projets scientifiques nationaux et internationaux :

- Un projet de recherche de la NERC (UK) sur l'ostéocalcine (1994).
- Des projets de recherche nationaux dans le cadre du programme ECLIPSE II (2004).
- Un projet ACI (2004).
- Un projet de recherche du FNS (Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique).
- Un projet "jeune équipe, Univ. Paris VI" (2004).
- 7 projets de la DFG (Deutsche Forschungs Gemeinschaft), dans le cadre du programme prioritaire allemand "Prinzipien der Biomineralisation, SPP1118". L'analyse des dossiers a été menée à Dijon, et la restitution, à Bonn (Allemagne), sur 3 jours (Févr. 2005), au sein d'un comité international d'experts en biominéralisation.
- Un programme de Recherche Avancée (PRA), avec la Chine.
- Un PPF (Programme pluri-formations) de l'Univ. Paris VI, sur la biominéralisation.

Depuis Janvier 2008, je suis rapporteur auprès du Comité Consultatif Régional pour la Recherche et le Développement Technologique (CCRRDT) de la région Bourgogne, au sein de la commission 2. Pour chaque projet qui m'est attribué courant Janvier, ma mission consiste à diffuser les dossiers auprès de deux experts nationaux non rattachés à la région Bourgogne, puis à collecter leur rapport d'expertise, à en faire une synthèse, exposée lors de la réunion de restitution en Mars. Les projets concernent principalement des subventions pour l'organisation de colloques, conférences ou workshops, ou bien des demandes de bourses post-doctorales.

## **I.6. MISSIONS DE TERRAIN ET DE LABORATOIRE, STAGES DE FORMATION**

1989. Stage de 3 jours chez Pharmacia, St-Quentin en Y. : techniques d'analyses des acides aminés.

1990. Stage de 3 jours à l'USTL, Montpellier : apprentissage des techniques électrophorétiques.

1991. 3 stages doctoraux à l'Université de Leiden, pour une durée totale de 4 mois : apprentissage des techniques immunologiques et électrophorétiques.

1993. Stage de 3 jours chez Dionex : technique d'analyse des monosaccharides par chromatographie HPAE-PAD.

1993. Stage de 3 jours au Laboratoire de Biologie Marine de Concarneau : extraction de mucus.

1994. Stage de 2 semaines au Laboratoire de Biologie Marine de Concarneau : apprentissage des techniques de biologie moléculaire, construction d'une banque d'ADNc de la moule *Mytilus edulis* (Drs. D. Sellos et A. van Vormhout).

1997. Stage de 3 jours, Université de Leiden : biologie moléculaire et informatique.

1999. 1 journée, laboratoire Clusius, Leiden : immunogold.

1999. Mission de 4 mois au MNHN, Paris, Laboratoire de Physiologie Générale et Comparée : analyse de protéines de coquille de mollusque par SDS-PAGE et immunotransfert, développement d'anticorps, construction d'une banque d'ADNc de tissus calcifiants de mollusques.

2000. Mission de 5 semaines en Polynésie Française, Atoll de Manihi, chez un perliculteur (Thierry Janoyer) : expériences de pose de greffes sur des huîtres perlières *Pinctada margaritifera*. Cette mission a donné lieu à un rapport non publié.

2005 et 2006. Missions au Center for Marine Research de Rovinj, Croatie dans le cadre d'un PAI (Programme d'Action Intégré) avec le Dr. Medakovic.

2008. Dans le cadre d'un programme ECO-NET, mission de 3 semaines au Center for Marine Research de Rovinj, Croatie, chez le Dr. Medakovic, et d'une semaine au Zemalski Museum de Sarajevo (Bosnie-Herzégovine).

## II. ENCADREMENT DE RECHERCHES ET MISSION D'ENSEIGNEMENT

### II.1. Encadrement de recherches

- a. Encadrement pendant le post-doctorat néerlandais
  - a.1. Contexte
  - a.2. Biominéralisation et caractérisation sérologique
  - a.3. Evolution de l'équipement calcifiant : rôle des processus de détoxification
  - a.4. Matrice coquillière de l'huître perlière, collaboration avec le MNHN
- b. Encadrement dans le secteur privé : compagnie IsoTis, NV.
  - b.1. Introduction
  - b.2. Encadrement de techniciens et étudiants en thèse
  - b.3. Encadrement de stagiaires
  - b.4. Management du groupe des thésards (« PhD Pool »)
- c. Encadrement à l'Université de Bourgogne
  - c.1. Encadrement de stagiaires de Master 1<sup>ère</sup> et 2<sup>nde</sup> année
  - c.2. Co-encadrement de la thèse de Benjamin Marie
  - c.3. Co-encadrement de la thèse de Nathalie Le Roy
  - c.4. Co-encadrement des thèses européennes du projet BioMintec
  - c.5. Autres encadrements
  - c.6. Reconversion de Nathalie Guichard, technicienne CNRS
- d. Références bibliographiques

### II.2. Mission d'enseignement

- a. Enseignement réalisé à l'Université d'Orsay.
- b. Enseignement effectué pendant mon post-doctorat
- c. Enseignement depuis mon recrutement au CNRS

## **II.1. Encadrement de recherches**

*Depuis une douzaine d'années, mes travaux de recherche en biominéralisation m'ont donné l'opportunité d'encadrer de nombreux stagiaires, doctorants et techniciens de laboratoire. A travers ces quelques pages, je vais m'employer à décrire de manière exhaustive cette activité, et à la remettre, à chaque fois, dans son contexte scientifique.*

*A cette fin, je distinguerai trois périodes successives:*

- *Mon long post-doctorat à l'Université de Leiden, Pays-Bas.*
- *Mon expérience de deux ans en tant que « research scientist » dans le secteur privé.*
- *Mon activité de chercheur CNRS à l'Université de Bourgogne.*

### **a. Encadrement pendant le post-doctorat, Université de Leiden, Pays-Bas**

#### **a.1. Contexte**

Sur le plan personnel, la période 1995-1999 a été marquée par l'apprentissage et l'utilisation des techniques de biologie moléculaire (cf. chapitre précédent, § « parcours scientifique »). Il s'agissait alors d'identifier des gènes codant des protéines coquillères. Ce travail de longue haleine a trouvé sa conclusion par la publication de mon article sur la caractérisation de la mucoperline, en 2000.

En parallèle aux travaux de biologie moléculaire, j'ai mené de multiples comparaisons sérologiques à l'aide de nombreux anticorps polyclonaux. Dans ce contexte, j'ai eu la chance d'encadrer le travail d'une étudiante Erasmus, Maggaly Gillibert, pendant près de sept mois, de Janvier à Juillet 1996. J'ai également encadré le travail bibliographique d'un étudiant de Master 1<sup>ère</sup> année, Wilhelm Bakker, sur la période Juillet-Octobre 1999.

Mon long post-doctorat à l'Université de Leiden a vu la mise en place d'une collaboration bilatérale avec le laboratoire d'Evelyne Lopez et de Christian Milet (« Régulation des Sécrétions Endocriniennes »), du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris. Dans le cadre, j'ai activement suivi et participé aux travaux de recherche d'une thésarde, Lucilia Pereira, sur la période 1999-2000.

#### **a.2. Biominéralisation et caractérisation sérologique**

**Contexte :** La seconde partie de ma thèse avait eu pour trait la caractérisation de matrices coquillères de *Pinna nobilis* et *Pinctada margaritifera*, à l'aide d'anticorps polyclonaux, que j'avais préparés à Hôpital de Leiden. Ce travail novateur à l'époque avait donné lieu à une courte publication dans les Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences (Marin *et al.*, 1994). J'avais alors réalisé tout l'intérêt d'une comparaison sérologique quantitative, pouvant s'appliquer à un grand nombre d'échantillons en même temps, chose tout à fait impossible avec une approche chromatographique par exemple. Néanmoins, la fin de ma thèse et mon premier post-doctorat à Orsay m'avaient laissé une frustration grandissante : il me semblait en effet que l'approche sérologique n'avait pas été exploitée dans sa pleine mesure, et qu'elle devait être poursuivie et approfondie.

**Objectifs :** Ainsi, lors de mon retour à Leiden pour mon second post-doctorat, parallèlement à la mise en place des techniques de biologie moléculaire, je poursuivais l'approche sérologique. Je disposais alors, en plus des anticorps utilisés lors de ma thèse, d'autres anticorps, préparés par les Dr. Muyzer et Collins. Pour me seconder,



j'employais alors M<sup>elle</sup> Maggaly Gillibert, étudiante Erasmus, de Janvier à Juillet 1996. Son travail avait pour objectif principal de mesurer les réactivités croisées d'anticorps polyclonaux anti-matrices coquillères de quelques bivalves (genres *Pinna*, *Pinctada*, *Mercenaria*, *Bathymodiolus*) contre des extraits coquilliers solubles à l'EDTA d'un grand nombre de bivalves représentant la plupart des familles existantes, les extra-groupes étant constitués de brachiopodes et de coraux scléactiniaires. Les tests utilisés étaient de type ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay), réalisés sur une, deux ou trois microplaques à la fois. Par ces tests, nous avons cherché à savoir si les signaux immunologiques obtenus correspondaient à un signal phylogénétique, ou bien alors, à un signal microstructural.

De plus, nous souhaitions mesurer l'activité bactéricide de quelques extraits acido-solubles de coquille de moule comestible *Mytilus edulis*. Cette idée reposait sur un constat simple : la surface interne des coquilles, bien que séjournant dans des milieux favorables à des contaminations par des micro-organismes, est peu sujette au développement de biofilms bactériens ou à la croissance de micro-organismes perforants ou encroûtants. Les mucus sécrétés constamment par les tissus épithéliaux ont un rôle majeur dans l'auto-nettoyage de cette surface interne et dans l'élimination des particules et micro-organismes. Nous avons émis l'hypothèse, que parallèlement à ce mécanisme physique actif, existe un mécanisme préventif, la présence de bactéricides au sein de la matrice calcifiante coquillière. Dans le cadre du travail de Maggaly Gillibert, nous avons cherché à tester la présence de bactéricides dans les matrices coquillères. A cette fin, nous avons employé deux méthodes, d'une part, un test spectrophotométrique au rouge de phénol, le « metabolism inhibition assay », d'autre part, la méthode classique sur boîte de Pétri avec disque en papier buvard imprégné d'extrait de coquille. Les souches bactériennes employées étaient *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus sp.*

**Résultats:** les résultats obtenus sont, à bien des égards, surprenants :

- A une exception près, les signaux immunologiques obtenus ne sont pas de nature phylogénétique, en ce sens qu'ils ne traduisent pas une proximité phylétique par rapport au taxon ayant servi à la production d'anticorps polyclonaux. De manière similaire, nous n'avons pas non plus obtenu de corrélation simple entre les signaux immunologiques et les microstructures coquillères étudiées (prismes, nacre, calcite foliée, microstructure lamellaire croisée, granulaire ou homogène). L'exception est représentée par un seul anticorps testé (anticorps anti-matrice soluble de nacre de *Pinna nobilis*), qui distingue clairement les bivalves ptériomorphes des bivalves hétérodontes. Dans ce cas seulement, le patron immunologique obtenu s'accorde de manière remarquable avec la représentation dichotomique de la phylogénie des bivalves, proposée par Uozumi et Suzuki (1981). Pour les autres anticorps, le regroupement des genres en fonction de leur réactivité immunologique croisée avec tel ou tel anticorps conduit à une phylogénie absurde, des genres phylogénétiquement très proches *dans la réalité* pouvant réagir de manière très différente à un anticorps donné, tandis que des genres phylogénétiquement éloignés pouvant être artificiellement rapprochés. En surimposant les réactivités immunologiques obtenues à une phylogénie « classique » des bivalves, on obtient ainsi un « arbre à trous ». Tout se passe comme si des déterminants antigéniques étaient perdus ou modifiés au cours de l'Evolution, au niveau de taxons de rang intermédiaire – familles, superfamilles, voire ordre. L'idée d'une « dégénérescence disjointe » des déterminants antigéniques émergeait.

- Nous n'avons pas mis en évidence une activité bactéricide marquée. Tout au plus, sur les tests d'inhibition du métabolisme au rouge de phénol, un ralentissement de croissance bactérienne a été enregistré. Cependant, pour des raisons techniques et par manque de temps (dialyse), nous avons testé des fractions protéiques de masse

moléculaire supérieure à 10 kDa, les petits peptides de la matrice coquillière n'ayant pas été retenus. Or, il est connu que de nombreux bactéricides sont de petits peptides (1 à 2 kDa) riches en lysine. Il serait donc judicieux de refaire ce type de test sur des fractions de faible masse moléculaire, particulièrement fastidieuses à obtenir, car issues d'une double ultrafiltration sur membrane 10 et 1 kDa. Cette approche serait pleinement justifiée par la récente découverte de transcrits codant de putatives protéines coquillières très basiques : les KRMPs et les shematrins (Yano et al., 2006 ; Zhang et al., 2006). Il est tentant d'imaginer que ces protéines, dont le rôle premier serait l'ancrage des protéines acides à la matrice insoluble, par le jeu d'interactions électrostatiques, pourraient se dégrader *in vivo* dans la coquille et génèreraient ainsi des peptides basiques, aux propriétés antibactériennes.

Le travail de Maggaly Gillibert a fait l'objet d'un rapport de fin de stage, soutenu en Juillet 96. Son travail sur les comparaisons sérologiques a été intégré à une publication (cf. liste des travaux, publication 37).

\* Gillibert, M., 1996. *Molluscan shell matrices : immunological and bactéricidal properties, rapport de maîtrise ERASMUS, Université de Leiden.*

\* Marin, F., Gillibert, M., Wesbroek, P., Muyzer, G. & Dauphin, Y., 1999. *Evolution: disjunct degeneration of immunological determinants. Geol. Mijnbouw., 78 (2): 135-139.*

### **a.3. Evolution de l'équipement calcifiant : rôle des processus de détoxification**

**Contexte :** Parmi les nombreuses hypothèses sur l'origine Cambrienne des systèmes calcifiants chez les métazoaires (brièvement mentionnées dans Marin *et al.*, 1996), figure en bonne place celle de la détoxification. Cette hypothèse a été formulée pour la première fois par K. Simkiss, l'un des grands promoteurs de la biominéralisation en tant que discipline, et co-auteur, avec K. Wilbur, d'un ouvrage-clé sur le domaine (Simkiss and Wilbur, 1989). Sur la base d'arguments physiologiques et cellulaires, Simkiss a imaginé que la biominéralisation calcaire aurait pu être le résultat direct d'un processus de détoxification, à savoir, l'expulsion massive hors de la cellule, d'un excès de calcium (Simkiss, 1977). Rappelons que l'ion calcium a un rôle particulier dans la signalisation intracellulaire : c'est un messenger secondaire, dont la concentration intracellulaire moyenne est de l'ordre de  $10^{-7}$  M. Dans le milieu marin, sa concentration moyenne, beaucoup plus élevée (env.  $10^{-3}$  M), est toxique pour la cellule. La cellule, qui doit sans cesse lutter contre un gradient de calcium défavorable, a mis au point des stratégies de réduction et d'élimination du calcium excédentaire : pompes à calcium, concentration du calcium dans des compartiments appropriés, stockage de calcium sous forme de granules de carbonate de calcium amorphe, protéines pouvant fixer le calcium en grande quantité (low affinity high capacity calcium-binding proteins), etc...

Afin de faire le point sur le corpus bibliographique concernant ces aspects de physiologie cellulaire, j'ai encadré les recherches bibliographiques d'un étudiant néerlandais, Wilhelm Bakker, durant trois mois (Juil-Oct 1999). Ses recherches portaient sur les aspects suivants : le métabolisme du calcium intracellulaire, la détoxification intracellulaire *per se*, la formation de granules carbonate de calcium amorphe chez les mollusques, les adaptations extracellulaires. Elles ont donné lieu à un mémoire de fin de stage.

\* Bakker, W. J., 1999. *A cellular view on the evolution of the metazoan calcifying apparatus, rapport de fin d'étude, Université de Leiden.*

#### a.4. Matrice coquillière de l'huître perlière, collaboration avec le MNHN

**Contexte :** Durant l'année 1997, une collaboration informelle s'est établie entre l'Unité de Géobiochimie de Leiden et le groupe d'Evelyne Lopez et de Christian Milet, au MNHN. Rappelons que ce groupe peut s'enorgueillir d'avoir le premier utilisé la poudre de nacre des huîtres perlières *Pinctada margaritifera/maxima* à des fins de chirurgie osseuse réparatrice (Silve *et al.*, 1992 ; Atlan *et al.*, 1997). La poudre de nacre possède non seulement des propriétés ostéoinductives, mais également des propriétés ostéogéniques. Ces propriétés ne sont explicables que par la présence, parmi les constituants macromoléculaires de la matrice de nacre, de facteurs ostéogéniques. Ces facteurs, jusqu'à aujourd'hui encore inconnus, pourraient être apparentés aux BMPs (Bone Morphogenetic Proteins). L'équipe de Muséum cherchait alors à identifier les constituants de la matrice de nacre, et parmi ces derniers, ceux responsables des propriétés régénératrices de la nacre.

Dans ce contexte, notre collaboration a pris une tournure plus concrète, en 1999 (Mai-Août), avec un séjour de 3 mois et demi que j'ai effectué au Muséum de Paris. J'ai donc été amené à travailler de concert avec Lucilia Pereira, étudiante de thèse au laboratoire du MNHN. J'ai notamment appris à Lucilia à construire une banque d'ADN complémentaire à partir de tissus de manteau de l'huître *Pinctada margaritifera*, en utilisant un kit de construction et d'emballage (Stratagene). Ma contribution a également consisté à introduire au laboratoire du MNHN l'utilisation des mini-gels Bio-Rad, ainsi que les Western blots correspondants, plus performants que les gels de grande taille, pour ce type de matrices. Nous avons également fait synthétiser un anticorps polyclonal, dirigé contre une fraction soluble à l'eau de la matrice de nacre (fraction F4). Ensemble, sur des extraits solubles à l'eau, nous avons mis en évidence sur gel et sur western blot la présence de nombreuses bandes répétées (en jargon électrophorétique, on appelle cela un « banding pattern »). Ce patron électrophorétique s'expliquerait par la présence d'une protéine ayant une structure modulaire, à laquelle est ajouté un module selon un pas constant. Le pas a été estimé autour de 3 kDa.

Par la suite, Lucilia a effectué un stage de quelques semaines à Leiden (Janv-Févr. 2000), durant lequel elle a poursuivi ses caractérisations de matrice de nacre sur gel d'électrophorèse. Par ailleurs, elle a purifié une protéine de nacre de 20 kDa, appelée provisoirement P20. Pour ce, elle a utilisé une technique que j'avais développée lorsque je purifiais la mucoperline recombinante, courant 1998 : il s'agissait d'une purification par électrophorèse préparative suivie d'une détection de la protéine éluée par dot-blot.

Notre collaboration a donné lieu à deux articles :

\* Pereira-Mouries, L., Almeida, M. J., Marin, F., Gay, M., Milet, C., and Lopez, E, 2003. Soluble proteins of the nacre from the giant oyster *Pinctada maxima*, with highly hydrophobic amino acids. In "Biomaterialization : Formation, Diversity, Evolution and Application". Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Symposium on Biomaterialization (Kobayashi I. and Ozawa H. eds.), Tokai University Press, Kanagawa: 145-148.

\* Marin, F., Pereira, L., and Westbroek, P., 2001. Large scale purification of molluscan shell proteins. *Prot. Express. Purif.*, 23: 175-179.

## **b. Encadrement dans le secteur privé : compagnie IsoTis**

### **b. 1. Introduction**

Mon expérience de deux ans dans une compagnie de biotechnologie IsoTis, bv. (Bilthoven, Pays-Bas) m'a permis de poursuivre mes recherches sur la caractérisation des protéines de coquille de mollusques. En parallèle, mon grade de « research scientist » m'a amené à introduire un certain nombre de techniques biochimiques et immunologiques au sein de la compagnie, dont la compétence dans le domaine des biomatériaux était reconnue, mais qui souffrait d'un manque de savoir-faire dans le domaine biochimique. A ce double titre, j'ai encadré les travaux de stagiaires et d'employés d'IsoTis. J'ai également coordonné l'activité du « PhD pool » d'IsoTis.

### **b. 2. Encadrement de techniciens et étudiants en thèse**

L'encadrement a consisté à transmettre mes connaissances pratiques et théoriques des techniques électrophorétiques (mini-SDS-PAGE) et immunologiques (Western blot, dot-blot, ELISA). C'est également à cette période que j'ai développé la technique de localisation d'antigènes sur surfaces minérales, qu'il s'agisse de fragments de coquilles, ou bien d'implants revêtus de phosphate de calcium dopés à une ou plusieurs protéines. Martin Stigter (technicien), Chantal De Valk (technicienne), Pamela Habibovic (PhD), Tahir Mahmoud (PhD), Chang Du (PhD), Yelian Liu (PhD), Jérôme Sohier (PhD) ont bénéficié de ces techniques.

Le travail immunohistologique (revêtement en phosphate de calcium incorporant une protéine) réalisé avec Chang Du a été intégré à son mémoire de thèse.

\* Du, C., Tichelaar, F. D., Marin, F., Hofland, I., Cui, F. Z., De Groot, K., and Layrolle, P., 2002. *Self-assembly apatite and composites : a model system relevant to biomineralization and biomimetic synthesis*. In « *Biomimetic composites for bone substitution* », C. Du PhD Thesis, Leiden University, Chapter 8 : 111-128.

J'ai également initié Martin Stigter au test d'inhibition *in vitro* de la précipitation de carbonate de calcium. Ensemble, nous avons effectué ce type de test sur la matrice des prismes de *Pinna nobilis* ainsi que sur la caspartine. Sa contribution a été intégrée à l'une de mes publications sortie en 2005.

\* Marin, F., Amons, R., Guichard, N., Stigter, M., Hecker, A., Luquet, G., Layrolle, P., Alcaraz, G., Riondet, C. and Westbroek, P., 2005. *Caspartin and calprismismin, two proteins of the shell calcitic prisms of the Mediterranean fan mussel Pinna nobilis*. *J. Biol. Chem.*, 280 (40): 33895-33908.

### **b.3. Encadrement de stagiaires**

IsoTis recevait chaque année des stagiaires, niveau 2<sup>ème</sup> année de BTS/Licence, amenés dans leur cursus à réaliser une formation en entreprise de 6 mois. Ces stages leur permettaient ainsi de s'initier au fonctionnement général d'une entreprise privée de biotechnologie, d'acquérir quelques unes des techniques de laboratoire mentionnées ci-dessus, et enfin, de suivre ce qu'est une recherche fondamentale. Dans chacun des cas, les activités des stagiaires étaient sanctionnées par un rapport final d'activité. Les trois rapports sont consultables dans mon bureau.

*Stage d'Anne-Marie De Kok* (Hogeschool Rotterdam, Sept 2001-Janvier 2002).

Ce stage avait pour but de purifier des protéines de matrices coquillières par électrophorèse préparative, selon le protocole que j'avais mis au point à Leiden (cf. Marin et al., 2001. Prot. Expr. Purif., 23 : 175-179). Des matrices coquillières de diverses provenance (*Mercenaria mercenaria*, *Pinna nobilis*, *Pinctada margaritifera*, *Pinctada maxima*, *Haliotis sp.*) ont ainsi été extraites, purifiées et testées sur gels. Certains extraits purifiés ont été séquencés (extrémité N-terminale). Par ailleurs, nous avons testé la plupart de ces extraits sur Western blot en utilisant un anticorps polyclonal dirigé contre une BMP recombinante.

\* *De Kok, A. M., 2002. Teaching practice at IsoTis Bioceramics Department.*

*Stage d'Herma Roestenburg* (Hogeschool Rotterdam, Janv-Mai 2002).

Le but de ce stage était également de purifier des protéines extraites de coquilles, de les analyser en Western blot et en test d'interférence de précipitation de CaCO<sub>3</sub>. Certains extraits ont été préparés en quantité importante, pour des expériences d'implantation chez le rat, réalisées à partir de Juillet 2002. H. Roestenburg a également été impliquée dans la mise au point de la technique d'immunogold sur coquille.

\* *Roestenburg, H., 2002. Learning period at IsoTis.*

*Stage d'Inge Hofland* (Hogeschool Utrecht, Févr-Juil 2002).

Nous avons testé ensemble les propriétés ostéogéniques d'extraits coquilliers de mollusques, sur des lignées cellulaires HOS (Human Osteo Sarcoma) et sur des cellules de moelle osseuse humaine (HBMC, Human Bone Marrow Cells). Les tests utilisés étaient les classiques mesures des rapports ALP/ADN (où ALP est la mesure de l'activité phosphatase alcaline, rapportée à la quantité de cellules). Les contrôles positifs étaient réalisés à l'aide d'une BMP-2 recombinante humaine. Les tests étaient réalisés en présence ou absence de dexaméthasone.

Nous avons détecté des activités ALP supérieures pour les échantillons traités aux extraits coquilliers. Cependant, nous avons observé des écarts-types importants, et une certaine variabilité des réponses cellulaires, notamment dans le cas où nous avons utilisé les cellules de moelle osseuse

Outre le mémoire de stage, le travail de Inge Hofland a été intégré à un court article paru dans le volume 2002 de l'ESB meeting (European Society for Biomaterials).

\* *Hofland, I., 2002. The influence of bone morphogenetic proteins on human osteogenic cells.*

\* *Marin, F., van de Valk, C., Hofland, I., Koerts, J., Layrolle, P., and de Groot, K., 2002. Molluscan shell matrices, a potential source of bioactive factors for bone reconstruction. Proceedings of the 17<sup>th</sup> European Conference in Biomaterials, Barcelona, Spain : p212.*

#### **b.4. Management du «groupe des thésards (« PhD pool »)**

A la suite d'une restructuration de la compagnie IsoTis courant 2002, les activités de recherche ont été découplées des activités de développement, cette opération

permettant de sécuriser et pérenniser la recherche réalisée, en grande partie par les doctorants de la compagnie. A partir de Mai 2002, un « PhD pool », regroupant tous les thésards d'IsoTis, soit une quinzaine de personnes, a été formé. Mon collègue Jan de Boer et moi-même supervisons les activités de ce regroupement, avec Clemens van Blitterswijk, CEO d'IsoTis. Le management du PhD pool consistait en plusieurs activités :

- La résolution de questions purement techniques que nous soumettaient les thésards, en particulier les questions ayant trait aux caractérisations biochimiques et immunologiques d'extraits cellulaires.
- L'organisation de séminaires internes.
- L'évaluation de candidats postulant sur des thèses. Après une pré-sélection sur dossier, il s'agissait de faire passer des entretiens hebdomadaires (1 à 2 heures par candidat). Cette tâche a été menée un jour par semaine, de Juin à Octobre 2002.

### **c. Encadrement à l'Université de Bourgogne**

#### **c.1. Encadrement de stagiaires Master 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> année**

Depuis 2005, j'ai encadré les travaux de recherche de trois étudiants de Master, Virginie Morin (stage Master 1), Fred Knap (stages Master 1 et Master 2) et Céline Pavat (stage Master 1 et Master 2), soit 5 stages.

##### *Stage de Virginie Morin*

A l'aide de l'anticorps polyclonal développé contre la caspartine, protéine des prismes calcitiques du bivalve *Pinna nobilis* (Marin *et al.*, 2005), V. Morin a cherché à détecter la présence de cette protéine dans des extraits coquilliers de nombreux mollusques - majoritairement des bivalves - en effectuant des extractions rapides à l'EDTA, puis en testant les extraits par la méthode ELISA. Dans les cas où un signal fort était enregistré, elle procédait alors à une extraction classique. L'extrait était alors testé par SDS-PAGE et Western blot.

##### *Stages de Fred Knap*

Le premier stage (Master 1) consistait à mesurer la stabilité thermique de la caspartine. Il s'agissait d'estimer si la caspartine possède intrinsèquement une bonne potentialité de préservation à la diagenèse. A cette fin, nous avons mimé une diagenèse en chauffant des prismes calcitiques à des températures constantes variant de 100 à 200°C, sur des durées comprises entre quelques heures et 11 jours. Dans chaque cas, la matrice des prismes a ensuite été extraite, analysée sur gel et par Western blot, à l'aide de l'anticorps polyclonal anti-caspartine. A la suite de ce premier stage, Fred Knap a réalisé son second stage (Master 2) en testant notamment des matrices fossiles, dont celles d'inocérames, grand bivalves mésozoïques à couche externe prismatique calcitique.

##### *Stage de Céline Pavat*

Lors de son stage de Master 1, C. Pavat a étudié l'activité anhydrase carbonique de matrices calcifiantes extraites de mollusques. Elle a mis au point des tests de détection de cette enzyme sur des sections de structures minéralisées. Lors de son 2<sup>nd</sup> stage (Master 2), elle s'est livrée à une caractérisation biochimique très complète de la matrice coquillière de l'escargot comestible *Helix aspersa maxima* (« gros-gris »). Son travail fait l'objet d'une publication en cours de rédaction.

\* Morin, V., 2005. *Présence de caspartine – ou protéines apparentées – dans les tissus calcifiés de mollusques.*

\* Knap, F., 2005. *Diagenèse organo-minérale des matrices calcifiantes associées aux carbonates biogéniques : l'exemple d'une protéine de coquille de bivalve (Pinna nobilis).*

\* Knap, F., 2006. *Diagenèse organo-minérale : les matrices organiques des carbonates biogéniques - exemples de protéines de coquille de bivalve - application à des spécimens méso et cénozoïques.*

\* Pavat, C., 2007. *Caractérisation d'activité anhydrase carbonique dans des biominéralisations carbonatées.*

\* Pavat, C., 2008. *La matrice coquillière du gastéropode terrestre Helix aspersa maxima.*

Les travaux de Master 1 de V. Morin et F. Knap ont été intégrés à un article.

\* Marin, F., Morin, V., Knap, F., Guichard, N., Marie, B., Luquet, L., Westbroek, P., and Medakovic, D., 2007. *Caspartin: Thermal Stability and Occurrence in Mollusk Calcified Tissues. In: Biomineralization, from Paleontology to Materials Science, (Arias J.L., Fernandez M.S., eds), Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Symposium on Biomineralization, Editorial Universitaria, Santiago de Chile: 281-288.*

## **c.2. Co-encadrement de la thèse de Benjamin Marie**

J'ai co-encadré la thèse de Benjamin Marie, commencée en Novembre 2004 et soutenue le 14 Mai 2008. B. Marie a obtenu les félicitations du jury pour son travail.

A la suite de l'acceptation de mon projet ACI en 2003, j'avais fait une demande pour obtenir une bourse de thèse MRT. Cette bourse avait été obtenue en 2004. Gilles Luquet et moi-même avons alors procédé à un recrutement par le site de l'ABG (Association Bernard Grégory : <http://www.abg.asso.fr/>). Nous avons recruté Benjamin Marie, biologiste marin de Paris VI, parmi une vingtaine de candidats français et étrangers.

Sa thèse a pour titre : « Les protéines des matrices calcifiantes chez le nautilus *Nautilus macromphalus* et la moule d'eau douce *Unio pictorum*, mollusques à microstructures coquillières nacro-prismatiques: identification, caractérisation et comparaisons inter-classes ».

B. Marie a étudié ces deux modèles mollusques à coquille nacrée, qui ont constitué le cœur de son activité sur trois ans. De plus, B. Marie a également été impliqué dans les recherches conduites sur les brachiopodes, et sur l'ormeau *Haliotis tuberculata*. En dernier lieu, ce chercheur a effectué des analyses biochimiques sur des moules d'eau douce fossiles.

B. Marie a puissamment contribué à développer et faire vivre la thématique. Il s'est très bien intégré à l'équipe, et a montré une activité scientifique intense. Durant son contrat, il a principalement utilisé les techniques biochimiques pour caractériser les matrices calcifiantes de ses modèles d'étude. Courant 2006, il a également construit une banque d'expression d'ADN complémentaire, qui n'a, pour le moment, pas été exploitée, faute de temps.

B. Marie est le premier auteur de 4 publications (3 publiées, une acceptée). Une autre publication dont il est l'auteur principal a été soumise. Un autre papier, sur la protéomique appliquée à la matrice coquillière d'*Unio pictorum*, est en cours de rédaction. Benjamin est co-auteur de six autres publications.

Actuellement, Benjamin Marie effectue un post-doctorat dans le cadre du GDR ADEQUA (amélioration de la qualité des perles), financé par la Polynésie Française. Rattaché administrativement à l'Université du Pacifique, il effectue l'essentiel de son travail dans notre laboratoire dijonnais.

### **c.3. Co-encadrement de la thèse de Nathalie Le Roy**

Cette thèse, qui a débuté en Octobre 2007, a pour titre : « activité anhydrase carbonique – caractérisation, évolution moléculaire et fonction dans la biominéralisation carbonatée ». Elle est encadrée par Gilles Luquet et moi-même. Nathalie réalise des caractérisations biochimiques de matrices extraites de gastrolithes, qui sont, chez les écrevisses, les minéralisations permettant de stocker temporairement de grandes quantités de calcium, en prévision de la minéralisation de leur nouvelle cuticule après la mue. Nathalie utilise également les techniques de biologie moléculaire, à l'aide de sondes oligonucléotidiques.

### **c.4. Co-encadrement des thèses européennes du projet BioMintec**

En Octobre 2008 a démarré le projet européen BioMintec (ITN Marie Curie), piloté par l'Université Gutenberg de Mayence (Pr. H. C. Schröder). Ce projet comprend 9 partenaires, dont deux partenaires industriels. Il implique le recrutement de doctorants, lesquels passent 18 mois dans un premier laboratoire d'un des partenaires du réseau, et 18 dans un second laboratoire. A l'issue des 36 mois, ils doivent soutenir leur thèse. J'ai recruté 2 étudiants, Paula Silva et Prabakaran Narayanappa. La première établit une base de données moléculaires de toutes les protéines associées aux biominéralisations en carbonate de calcium chez les métazoaires ; le second caractérise plus complètement les protéines associées aux prismes calcitiques chez *Pinna nobilis*, en particulier, la caspartine et la calprismine.

### **c.5. Autres encadrements**

En Février 2008, j'ai été contacté par Christine Paillard, chercheuse CNRS à l'IUEM de Brest-Plouzané. C. Paillard est connue pour avoir décrit et caractérisé la maladie de l'anneau brun (Brown Ring Disease, ou BRD) chez la palourde *Ruditapes philippinarum* (Allam *et al.*, 2000). Cette maladie, causée par une bactérie *Vibrio tapetis*, se manifeste par le dépôt d'une couche organique brune dans la partie interne de la coquille en contact avec le manteau. Il s'ensuit de fortes mortalités. Les palourdes résistantes à la maladie ont une capacité de reminéraliser leur coquille par-dessus l'anneau brun. C'est cet aspect de « réparation coquillière » qu'une des thésardes de C. Paillard, Nolwenn Trinkler, étudie. Dans ce contexte, je suis fortement impliqué dans le suivi de son travail. Cette jeune chercheuse a effectué plusieurs stages chez nous : Mars 2008 (9 jours complets), Juin 2008 (1 semaine), Août 2008 (2 semaines), Janvier 2009 (3 semaines). Notre travail consiste à comparer par la biochimie et l'immunologie les matrices calcifiantes des zones réparées et celles des zones dites « normales ». Une première publication a été récemment soumise, une seconde est en préparation.

Notre laboratoire de biominéralisation est, depuis 2008, partenaire d'un GDR, nommé ADEQUA, piloté par l'IFREMER et le Service de la perliculture de Polynésie Française. Dans ce cadre, 2 chercheuses statutaires sont venues effectuer un stage dans notre laboratoire : Nelly Schmidt étudie les propriétés biochimiques des nucléus greffés dans les gonades des huîtres perlières, qui servent de support à la sécrétion de nacre, aboutissant à la perle. Ces nucléus sont eux même des biominéraux provenant de



coquilles de moules du Mississippi, ou bien alors d'huître perlière. Au cours d'un stage d'une semaine (Avril 2008), nous avons ensemble montré que les matrices extraites de ces deux nucleus sont assez différentes, et réagissent très différemment avec des anticorps appropriés. Nos résultats, publiables, pourraient expliquer les plus forts rejets obtenus avec des nucleus provenant de moules du Mississippi.

La 2<sup>nde</sup> stagiaire, Caroline Montagnani (Ifremer) a identifié les ARN messagers codant 2 protéines impliquées dans la synthèse de la nacre, la perline et la calcine. Elle a sur-exprimé une perline recombinante, à partir de laquelle elle a élaboré un anticorps spécifique. Lors d'un stage d'une semaine à Dijon (Juin 2008), elle a testé la spécificité de cet anticorps par Western blot, et réalisé une immuno-localisation de la perline par immunogold sur des sections de nacre, selon la technique que nous avons développée. Ces résultats appellent d'autres développements dans le cadre du GDR.

## **c.6. Reconversion de Nathalie Guichard, technicienne CNRS**

Avec la mise en place du laboratoire de biominéralisation courant 2004, l'activité de Nathalie Guichard a considérablement évolué. Cette technicienne CNRS de l'UMR Biogéosciences, recrutée en 1999, était initialement formée aux techniques d'analyse géochimiques (spectrophotométrie d'absorption atomique). Depuis le départ de Laurent Emmanuel, j'ai encadré sa reconversion vers les techniques d'analyse biochimiques, incluant l'électrophorèse mono-dimensionnelle, l'électrophorèse préparative, le Western blot, les tests ELISA, les dosages protéiques. Elle s'est également formée aux techniques de biologie moléculaire, notamment par un stage d'une semaine dans un laboratoire de la région parisienne. Depuis 2004, Nathalie est parfaitement autonome et très efficace. C'est un membre à part entière de notre équipe « biominéralisation ».

## **d. Références bibliographiques**

- Allam, B., Paillard, C., Howard, A. and Le Penneç, M., 2000. Isolation of the pathogen *Vibrio tapetis* and defense parameters in brown ring diseased Manila clams *Ruditapes philippinarum* cultivated in England. *Dis. Aquat. Organ.* **41**, 105-113.
- Atlan, G., Balmain, N., Berland, S., Vidal, B. and Lopez, E., 1997. Reconstruction of human maxillary defects with nacre powder: histological evidence for bone regeneration. *C. R. Acad. Sci. Paris III.* **320**, 253-258.
- Marin, F., Muyzer, G. & Dauphin, Y., 1994. Caractérisation électrophorétique et immunologique des matrices organiques solubles de deux Bivalves Ptériomorphes actuels, *Pinna nobilis* L. et *Pinctada margaritifera* (L.). *C. R. Acad. Sci. Paris II* **318**, 1653-1659.
- Marin, F., Smith, M., Isa, Y., Muyzer, G. & Westbroek, P., 1996. Skeletal matrices, mucins and the origin of Invertebrate calcification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 1554-1559.
- Silve C, Lopez E, Vidal B, Smith DC, Camprasse S, Camprasse G, Couly G., 1992. Nacre initiates biomineralization by human osteoblasts maintained in vitro. *Calcif Tissue Int.* **51**, 363-369.
- Simkiss K., 1977. Biomineralization and detoxification. *Calcif Tissue Res.* **24**, 199-200.
- Simkiss, K., and Wilbur, K., 1989. Biomineralization. Cell Biology and Mineral Deposition. Academic Press, New York.
- Uozumi et Suzuki, 1981. The evolution of the shell structures in the Bivalvia. In "Study of Molluscan Paleobiology, Prof. M. Omori Memorial Volume", pp 63-77.
- Yano M, Nagai K, Morimoto K, Miyamoto H., 2006. Shematin: a family of glycine-rich structural proteins in the shell of the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Comp. Biochem. Physiol. B* **144**, 254-262.
- Zhang C, Xie L, Huang J, Liu X, Zhang R., 2006. A novel matrix protein family participating in the prismatic layer framework formation of pearl oyster, *Pinctada fucata*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **344**, 735-740.

## **II.2. Mission d'enseignement**

### **a. Enseignement réalisé à l'Université d'Orsay**

Durant ma thèse de 3<sup>ème</sup> cycle, j'ai dispensé un enseignement au Département des Sciences de la Terre de l'Université d'Orsay, dans le cadre du monitorat d'enseignement, pendant 2 ans, puis dans le cadre d'un poste d'Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche, pendant 13 mois.

#### **a.1. Enseignement dans le cadre du monitorat d'enseignement**

Cet enseignement a été réalisé au cours des années universitaires 1989-1990 et 1990-1991. Il a consisté en 4 activités : stages de terrain, exploitation en salle du matériel géologique, Travaux Pratiques en paléontologie, cours hebdomadaires intégrés.

- Stages de terrain (Sept. 1989, Sept. 1990, durée 9 jours). Ces stages (Roscoff et région de Caen) s'adressaient aux étudiants du module semestriel M2 G (1<sup>er</sup> cycle, 2<sup>ème</sup> année, option géologie). Ont été abordées les thèmes suivants : recensement des faunes et flore du littoral breton ; caractérisation de biotopes ; dissections en laboratoire ; aspects systématiques ; modèles sédimentaires littoraux ; biotopes anciens ; caractérisation de paléo-environnements ; tectonique et orogénèse.

- Exploitation en salle du matériel géologique (3 séances en 1989, idem en 1990) : à la suite des stages, plusieurs séances de travaux pratiques du matériel collecté ont été organisées à l'Université d'Orsay: tri de sédiments, observation et reconnaissance de microfossiles ou de restes d'organismes macroscopiques sous loupe binoculaire.

- Travaux Pratiques en paléontologie : séances hebdomadaires dispensées aux étudiants de Licence de Géologie (LST), durant l'année 1989-1990. Séances consacrées aux grands groupes zoologiques : foraminifères, spongiaires, cnidaires, brachiopodes, mollusques, arthropodes, échinodermes. L'accent a été mis sur les caractères morphologiques de reconnaissance des taxons, leur répartition stratigraphique, leur mode et milieu de vie.

- Cours intégrés : ces cours hebdomadaires, d'une durée de 3 heures, ont été dispensés aux étudiants du module de pré-orientation M0 (1<sup>ère</sup> année de 1<sup>er</sup> cycle, 1<sup>er</sup> trimestre). Il s'agissait de cours théoriques simplifiés d'introduction aux géosciences, accompagnés d'exercices pratiques : observation d'échantillons, travaux sur cartes géologiques. Les thèmes suivants ont été abordés : « roches et matériaux », « séismes et volcans », « le temps en géologie », etc. Une évaluation finale a été réalisée par le biais d'un exercice de synthèse d'un article, ainsi que par un QCM.

#### **a.2. Enseignement dans le cadre du contrat ATER**

A la suite du service militaire, j'ai démarré un contrat ATER (6 mois : Févr-Août 1993), à l'Université de Paris-Sud Orsay. Ce contrat a été prolongé de 7 mois (Sept-Mars 1994). Mon activité a consisté en travaux pratiques en paléontologie, et en stages de terrain.

- Travaux Pratiques en paléontologie : ont été dispensés aux étudiants en Licence de Sciences de la Terre (LST). Il s'agissait de 2 séances hebdomadaires de 3 heures chacune, de Février à Mai 1993, puis d'Octobre à mars 1994, organisées en un cours (1 heure) suivi d'observations (2 heures). Le contenu pédagogique comprenait : la présentation des principaux groupes d'organismes minéralisants, leur répartition stratigraphique, leur milieu de vie. L'accent a été mis sur le cadre chronologique et

évolutif. Des séances spécifiques, telles que « l'évolution des communautés récifales au cours des temps géologiques », ont été organisées.

- Stages de terrain : s'adressaient aux étudiants de LST. Un stage de tectonique et sédimentation de la région de Veynes (durée : 1 semaine), au cours duquel des cartes géologiques et structurales ont été relevées, ainsi que des coupes stratigraphiques. Les calages chronologiques ont été effectués grâce aux riches faunes d'ammonites. Un second stage de terrain, d'une journée, a été effectué dans la vallée de l'Yonne, afin de découvrir les récifs oxfordiens, leur contenu faunistique, leur extension dans l'espace (variations latérales de faciès, reconstitutions paléogéographiques).

### **b. Enseignement effectué pendant mon post-doctorat**

Mon activité d'enseignement de 1994 à 2002, correspondant à ma période néerlandaise, a été nettement réduite par rapport à la période précédente.

En Septembre 1995, à la suite d'un stage de terrain dans les Ardennes belges (3 jours), organisé par l'Université de Leiden, j'ai préparé et organisé sur une journée complète un TP en immunologie pour les participants au stage (« serological and immunological methods in biogeochemistry »).

Dans le cadre du DEA du Muséum National d'Histoire Naturelle "activités biologiques des substances naturelles, reconnaissance moléculaire et communications cellulaires", j'ai donné un cours annuel de 2 heures, entre 1999 et 2002 sur le thème de la biominéralisation : « Biominéralisations chez les métazoaires: aspects évolutifs et appliqués ».

Par ailleurs, j'ai donné un certain nombre de séminaires invités entre 1995 et 2002 (cf. chapitre précédent).

### **c. Enseignement depuis mon recrutement au CNRS**

Depuis mon recrutement en 2003, j'assure quelques heures d'enseignement annuel (2 à 4 heures), généralement en Novembre. Cet enseignement théorique concerne les Master II Sciences Terre. Il s'agit d'une introduction générale au domaine des biominéralisations. J'aborde également les aspects évolutifs, en particulier l'origine de la biominéralisation carbonatée, ainsi que quelques aspects techniques concernant les méthodes d'analyse des biominéralisations carbonatées.

Chaque année, je donne également des séminaires dans le domaine de la biominéralisation. Ces séminaires ou conférences invitées sont listés dans le premier chapitre de mon mémoire. Entre 2003 et 2008, j'ai ainsi donné 16 séminaires, en France et à l'étranger.

Récemment (Oct. 2008), j'ai été invité par le MNHN (UMR CNRS 5178 Biologie des Organismes Marins et Ecosystèmes », groupe Christian Milet) à venir passer une semaine pour enseigner la technique de test d'interférence de précipitation de carbonate de calcium par des extraits protéiques. Ce test est utilisé en routine au laboratoire.

Enfin, dans le cadre de l'UE « Biominéralisation » organisé par le MNHN et l'Université Paris VI, j'interviens lors d'un cours de 2 heures sur l'origine et l'évolution des biominéralisations (Mars 2009).



# III. UNE TRES BREVE HISTOIRE DE LA BIOMINERALISATION A TRAVERS QUELQUES CONCEPTS-CLES

III.1. La biominéralisation, trois concepts

III.2. Genèse d'une terminologie

III.3. Evolution des idées

- a. Flash-back sur les temps anciens : les toutes premières données microscopiques
- b. La nature organo-minérale des biominéralisations
- c. La matrice organique et l'essor de la biominéralisation
- d. La nature hiérarchique des biominéraux
- e. Minéralisation biologiquement induite ou contrôlée
- f. La biominéralisation depuis les quinze dernières années
- g. Où en est la biominéralisation aujourd'hui ?
- h. Références bibliographiques

### **III.1. LA BIOMINÉRALISATION, 3 CONCEPTS**

En langage courant, il est usuel d'accoler le préfixe 'bio' à tout nom ou adjectif donné, pour peu que le concept associé à ce mot implique, d'une manière plus ou moins indirecte d'ailleurs, de la matière vivante. Ainsi en est-il de la biominéralisation, terme à la fois précis et vague car porteur d'une redoutable ambiguïté. En effet, la biominéralisation désigne au moins trois concepts très différents. C'est tout d'abord *un objet, un produit fini*, c'est-à-dire une *structure minéralisée synthétisée par un organisme vivant*. C'est ensuite *un processus dynamique*. Sous cette seconde acception, le terme désigne alors l'ensemble des *phénomènes physico-chimiques, cellulaires et moléculaires par lesquels des organismes vivants élaborent des structures minéralisées*. Enfin, en dernier lieu, la biominéralisation désigne tout simplement *une discipline scientifique à part entière, c'est-à-dire l'étude des structures minéralisées*. Cette discipline, qui emploie de nombreux outils analytiques, se situe au carrefour entre la minéralogie, la sédimentologie, la géochimie, la paléontologie, la physiologie, la biochimie, la génétique moléculaire, les sciences des matériaux l'ostéologie, l'odontologie. C'est l'aspect « discipline » que nous allons évoquer ici.

### **III.2. GENESE D'UNE TERMINOLOGIE**

La biominéralisation, en tant que discipline, peut apparaître aux yeux du profane comme un domaine de recherche extrêmement récent et restreint: le mot « biominéralisation » ne figure même pas dans Le Petit Robert, édition 2008, ni dans le Larousse de la même année; Il fait partie de la vaste cohorte de ces mots en transit, de ceux qui attendent dans l'antichambre, avant d'être « dictionnarisés » et de passer dans le vocabulaire courant. Preuve supplémentaire de son statut incertain, les correcteurs d'orthographe des traitements de texte l'ignorent à en juger par leur nette propension à le souligner en rouge.

Quand la terminologie 'biominéralisation' est-elle apparue pour la première fois ? Comme souvent, l'émergence d'un concept scientifique associé à un mot est difficile à dater de manière précise. A l'instar de Monsieur Jourdain et de sa prose, de nombreux chercheurs de la première moitié du vingtième siècle 'faisaient de la biominéralisation' sans le savoir. Jusqu'aux années soixante, on parlait alors beaucoup de calcification biologique, et les ouvrages publiés traduisent cet état (cf. « Calcification in biological systems », 1960, R. F. Sognaes ed.) qui excluait évidemment les minéralisations siliceuses des diatomées, ferriques des tapis bactériens et, de manière générale, toute forme de minéralisation n'impliquant pas le calcium.

Un examen rapide de plusieurs bases de données bibliographiques accorde à Veres et collaborateurs la primeur de l'utilisation du terme « biomineralization » dans le titre d'un article, paru dans Mikroskopie en 1973 (Veres *et al.*, Mikroskopie, 29 : 151-156, 1973, « New aspects in the investigation of some processes of biomineralization »). Il est cependant quasi certain que le mot a été utilisé dans le texte plusieurs années auparavant.

C'est en effet au cours des années soixante que la discipline a pris un réel essor. Ce dynamisme nouveau, qui reposait certes sur une communauté scientifique extrêmement restreinte mais motivée, s'est notamment traduit par la parution de nombreux articles dans le domaine naissant, et surtout, par l'édition d'une revue à la périodicité très incertaine, les *Biomineralization Research Reports*, émanation de la défunte Commission de Recherche sur les Biocristallites, dont le premier numéro est daté de 1970. Cette revue, publiée jusqu'en 1979 (numéro 10), comportait de remarquables études micro et ultrastructurales, notamment sur des coquilles de mollusques, ainsi que les toutes premières études biochimiques modernes

sur la matrice minéralisante associée. Autre curiosité à signaler, les promoteurs originels de la biominéralisation comme discipline (Hare, Degens, Erben) appartenait au domaine des sciences de la Terre ! Ce n'est que plus tard, au cours des années 80, que les biologistes ont investi le domaine.

De manière concomitante à la parution de cette revue, et témoignant de l'essor de la discipline, les Symposiums Internationaux sur la Biominéralisation ont été mis en place: la première édition, organisée par le Professeur Erben, se déroula à l'Université de Mayence, du 30 Juin au 7 Juillet 1970, et rassembla 55 scientifiques, tant cristallographes que paléontologistes ou zoologistes. Ce fut en quelque sorte l'acte officiel de la création de la discipline. Le succès de ce premier symposium eut pour conséquence l'organisation de congrès successifs (à un rythme très approximatif d'un tous les 3 ans) jusqu'à aujourd'hui, avec, à chaque fois, la publication d'un volume présentant l'ensemble des communications (Table 3). En 2008, la dixième édition des Symposiums Internationaux s'est déroulée à Lianyungang, en Chine.

L'adoubement irréversible du mot « biominéralisation » s'opéra dans les années 80, avec notamment la parution d'ouvrages entièrement dédiés à ce sujet, tels que « *On Biomineralization* », de H. Lowenstam et S. Weiner (1989), « *Biomineralization* », de K. Simkiss et K. M. Wilbur (1989), ou encore l'ouvrage collectif « *Biomineralization, Chemical and Biochemical Perspectives* », édité par S. Mann, J. Webb et R. J. P. Williams (1989), pour ne citer que trois ouvrages particulièrement marquants.

Pour résumer, on peut donc logiquement faire remonter la date de la première utilisation du mot biominéralisation à 1970. C'est en effet à cette date qu'est apparue la nécessité de réunifier toutes les structures minéralisées produites par des organismes vivants sous un vocable unique. Il est cependant possible que, en dépit d'un examen scrupuleux de notre part, des auteurs aient déjà utilisé, dans le texte, cette terminologie dès le milieu des années soixante, ou plus tôt encore...

Il est difficile de brosser un panorama complet d'une discipline telle que la biominéralisation, tant son évolution récente est buissonnante. Dans le bref descriptif qui suit, et dont l'ambition n'est pas de couvrir tous les aspects historiques, j'envisage l'émergence de la biominéralisation en tant que discipline à travers quelques étapes importantes, le but avoué étant de restituer précisément l'apparition et la propagation de concepts-clés. Ces étapes sont les suivantes : les toutes premières données microscopiques, la nature organo-minérale des minéralisations biogéniques, le concept de matrice organique, la nature hiérarchique des biominéraux, et enfin, l'identification de deux grands groupes de biominéralisations, celles qui sont contrôlées et celles qui sont induites. Je terminerai par un rapide tour d'horizon sur la discipline depuis ces quinze dernières années, et sur la situation actuelle.

### III.3. EVOLUTION DES IDEES

#### a. Flash-back sur les temps anciens : les toutes premières données microscopiques

Mais revenons de nombreuses années en arrière, voire quelques siècles. A la suite de l'invention du microscope, attribuée à Anton Van Leeuwenhoek (1632-1723), de nombreux savants cherchèrent à observer des biominéralisations sous leur forme microscopique. Le plus célèbre d'entre eux et sans doute le premier fut Robert Hooke (1635-1703), qui, dans son célèbre ouvrage *Micrographia* (1665), décrit, entre autres choses, des cristaux urinaires (observation XII, « of gravels in urine »), ainsi que les dents de la radula d'un escargot (observation XL, « of the teeth of a snail »), et dont les planches sont reproduites ci-après.

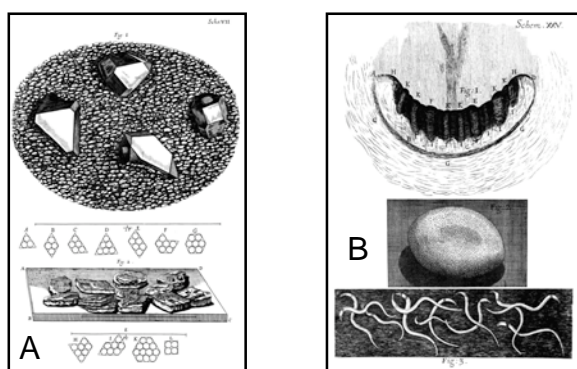


Fig. 2 Extraits de *Micrographia* de Robert Hooke (1665). A. Cristaux observés dans l'urine. B. Dents de la radula d'un escargot commun.

Par la suite, au cours des 17, 18 et 19<sup>èmes</sup> siècles, les observations macro- et microscopiques se multiplièrent, tant sur des os que sur des coquilles de mollusques ou sur des tests de foraminifères. Ainsi, l'encyclopédie Diderot et d'Allembert présente de très nombreux schémas de biominéralisations, sous la forme de coquilles et de test divers. Pour l'os, citons le travail fondateur de Clopton Havers (1657-1702), physiologiste anglais et le premier à décrire précisément la microstructure de l'os : on lui doit la découverte, dans l'os compact, des canaux qui portent son nom (Havers, 1691).

#### b. La nature organo-minérale des biominéralisations

**Une des particularités des biominéralisations concerne leur nature composite : elles sont généralement constituées d'une fraction minérale et d'une fraction organique.** Dans la majeure partie des cas, le minéral constitue la fraction majeure de la biominéralisation, tandis que la phase organique est minoritaire, voire ultra-minoritaire. Il existe cependant quelques exceptions notables à cette règle : minéralisations pathologiques, les cristaux d'urée, mentionnés plus haut, sont entièrement organiques. L'os est un type de biominéralisation dont la fraction organique est relativement importante, environ 30%, correspondant principalement au collagène (comptant pour plus de 95% de la fraction organique, le restant étant constitué d'un cortège très complexe de protéines non-collagéniques). Le squelette interne de la seiche, le fameux « os de seiche » ou bien la cuticule de crabe sont également des biominéralisations très fortement enrichies en chitine.

La nature organo-minérale des biominéralisations a été très tôt mise en évidence, de manière empirique, dans un cas précis, celui des os. Citons par exemple les expériences de



calcination d'os menées par De Lasone (1751). Plus loin encore, mentionnons les procédés d'extraction de dérivés de collagène osseux (collagène = qui génère de la colle). On sait en effet que la macération prolongée d'os broyé dans de l'eau bouillante génère une substance vitreuse, liquide lorsque chaude, et qui se solidifie lentement en refroidissant, la gélatine. La gélatine a des propriétés adhésives intéressantes. C'est aussi un liant remarquable pour les préparations culinaires. La première production industrielle de gélatine semble avoir été vers 1685 en Hollande, avant que le procédé ne soit exporté en Angleterre. On sait cependant avec certitude que la gélatine extraite d'os a été utilisée au Moyen-Age en Occident, et plus loin encore, dès l'Antiquité, par les Egyptiens. La plus ancienne utilisation de gélatine remonte à environ 8200 ans (BP) (gisement de Nahal Hemar, Mer Morte, Israël).

On attribue cependant à Frémy, un Français, la paternité de la première vraie étude de la fraction organique de l'os et autres biominéraux. Dans un volumineux article d'une soixantaine de pages paru dans les Annales de Chimie et de Physique, publié en 1855 et intitulé « recherches chimiques sur les os », il réalisa une analyse extrêmement détaillée de caractérisation de la composition chimique d'os de diverses natures, tant actuels que fossiles. De plus, il compara les compositions obtenues à celle des dents, du tégument des crustacés, des coquilles de mollusques, enfin, à celle des axes calcifiés de gorgones. Ainsi, sur l'os, il caractérisa ainsi une substance organique peu soluble, mais transformable en gélatine par traitement à l'acide à chaud, qu'il appelle « osséine », et qui correspond à peu près au collagène. La terminologie « osséine », bien que tombée en désuétude - elle figure cependant toujours dans le dictionnaire - a été couramment employée, au moins jusque dans les années 70. Frémy note par ailleurs *que l'osséine n'est pas le seul corps organique contenu dans la substance osseuse, puisqu'il identifie également une matière organique qui ne se transforme pas en gélatine.*

A partir de cuticule calcifiée de crustacé, Frémy obtint la composition chimique élémentaire de la chitine. Il constata sa forte insolubilité et sa ressemblance avec la cellulose. Il faut cependant préciser que la chitine, un des polymères les plus utilisés dans le règne du vivant après la cellulose, fut découverte plusieurs dizaines d'années avant les travaux de Frémy, plus exactement en 1811, par le Prof. Henri Braconnot, qui nomma cette substance fongine (il l'avait extraite de champignons), avant qu'elle ne soit rebaptisée chitine par Odier, en 1823, à la suite de ses travaux sur la cuticule des insectes. Frémy trouva également de la chitine dans l'os de seiche et dans la plume de calmar. Il observa *qu'il est curieux de retrouver la même substance non azotée chez les crustacés, les insectes, les mollusques et les zoophytes (= pennatules) ; la chitine ne se trouve jamais dans les os des vertébrés.*

Analysant chimiquement les axes calcaires des pennatules, Frémy obtint un résidu organique composé pour partie d'une *matière insoluble dans les acides*, et d'une fraction *présentant une certaine analogie avec la substance osseuse*, c'est à dire l'osséine, définie auparavant dans la monographie. A ce propos, il est intéressant de noter que la présence effective de collagène chez les gorgones a été démontrée plus d'un siècle après Frémy (Tidball, 1982 ; Kingsley *et al.*, 1990).

Enfin, à partir de coquille de mollusques, Frémy mit en évidence, après traitement à l'acide chlorhydrique, *« un résidu d'une matière organique fort remarquable, d'un aspect brillant et feutré, insoluble dans l'eau, l'alcool et l'éther, et qui résiste à l'action des acides étendus »*. Cette substance *« ne produit pas de gélatine par l'action de l'eau bouillante ; les acides et les alcalis concentrés ne la dissolvent que très lentement »*. Elle présente une grande analogie avec *« la matière organique qui constitue l'axe corné des gorgones »*. Cette substance, il la baptisa *« conchioline »*. Cette terminologie connut un certain succès, puisque, aujourd'hui encore, elle figure dans la plupart des dictionnaires usuels, alors même que le mot biominéralisation n'en fait pas encore partie.

La publication de Frémy marque le début clairement daté de l'étude des matrices minéralisantes. Cependant, ni Frémy ni ses proches continuateurs du dix-neuvième siècle n'associent une quelconque fonction aux composés organiques associés aux biominéralisations étudiées. La question ne sera soulevée que plusieurs dizaines d'années plus tard, durant les premières décennies du vingtième siècle, avec des travaux plus élaborés sur la composition chimique de coquilles (travaux listés dans Grégoire, 1972).

### **c. La matrice organique et l'essor de la biominéralisation**

Après la 2<sup>nd</sup>e guerre mondiale, la situation évolue rapidement, la parution de nouvelles données s'accélère. Les progrès enregistrés dans la connaissance des biominéralisations sont essentiellement dus aux avancées technologiques. De nouveaux outils analytiques permettent de comprendre la structure des tissus minéralisés, d'en caractériser leur composition chimique, enfin, de comprendre la structure tridimensionnelle des macromolécules constitutives des biominéraux. Pour le premier aspect, le microscope électronique (à balayage ou à transmission) est l'outil idéal pour visualiser la microstructure, voire l'ultrastructure des matériaux minéralisés. Quant à la détermination de la composition chimique, elle s'appuie entièrement sur les développements spectaculaires de la biochimie, durant les années cinquante et soixante. La « biominéralisation » en tant que discipline sur le point de naître bénéficie ainsi des progrès importants faits dans les techniques de séparation des protéines – chromatographies et électrophorèses - mais aussi dans la détermination des constituants élémentaires des protéines, les acides aminés, technique dont Stein et Moore (1948) furent les initiateurs. En dernier lieu, les techniques de diffraction des rayons X, appliquées aux biomolécules traitées alors comme des cristaux, permettent d'en obtenir la structure 3D. C'est notamment le cas de la molécule de collagène, dont la structure en triple hélice alpha fut déterminée par Ramachandran et Kartha (1954), puis par Rich et Crick (1955).

A partir des années cinquante, de nombreuses études biochimiques sont publiées sur la composition en acides aminés des matrices organiques de diverses origines. Citons les travaux précurseurs de Piez (1953) pour les dents, d'Eastoe (1955) pour les os, ou encore de Grégoire et al. (1955) pour les coquilles de mollusques. Il est fascinant de penser que tout juste un siècle sépare les toutes premières analyses de Frémy de celles de ses plus illustres continuateurs.

A cette époque, il est devenu évident depuis longtemps que les composés organiques associés aux biominéralisations et sécrétés au moment de la mise en place des structures minéralisées ont une fonction liée au processus de minéralisation. Ces constituants sont de plusieurs natures : protéiques, polysaccharidiques et lipidiques. Ce mélange complexe de macromolécules organiques forme une architecture supramoléculaire cohérente et fonctionnelle. Il est alors qualifié de matrice, terme qui, à ma connaissance, a été introduit et popularisé par Melvin Glimcher, l'un des « papes » de l'étude de l'os (Glimcher, 1960). Le concept de matrice est une étape fondamentale dans l'histoire de la biominéralisation. Une matrice ne représente pas simplement un mélange de protéines, voire la simple juxtaposition de plusieurs fonctions. C'est un tout cohérent, où chaque constituant participe à l'élaboration de la structure finale, dont les propriétés sont très différentes de celles de ses éléments pris un à un. On pressent donc que le concept de matrice minéralisante renvoie directement au concept d'émergence.

Hormis le collagène des os, parmi les constituants des matrices qui ont fait l'objet d'un grand nombre d'étude, on trouve les substances polyanioniques, protéines ou polysaccharides. Ces macromolécules jouent un rôle-clé dans la plupart des systèmes minéralisants impliquant

le calcium, sous forme de carbonate, de phosphate ou d'oxalates. Ce sont notamment elles qui sont impliquées dans les phénomènes d'attraction électrostatiques des ions calcium, dans les processus de nucléation cristalline, dans les phénomènes de modification des formes cristallines, et en dernier lieu, dans les mécanismes d'inhibition cristalline (Marin et Luquet, 2007). Dans le chapitre V qui leur est dédié, j'aurai l'occasion de reparler plus longuement de ces protéines.

Pour conclure sur ce paragraphe, la terminologie de « matrice », de par sa vertu unificatrice, a connu un vif succès qui ne se dément pas, dans la mesure où elle est toujours usitée près de cinquante ans plus tard. La matrice organique associée aux biominéralisations est impliquée dans plusieurs fonctions : elle a en premier lieu un rôle structurel. Elle forme un édifice tridimensionnel qui « reçoit » la phase minérale. C'est elle qui assure la solidité de la structure minéralisée, en empêchant en particulier, la propagation de fractures mécaniques. Mais elle a aussi un rôle actif dans la précipitation de la phase minérale, cristalline ou amorphe, et dans l'architecture – on parle aussi de microstructure - de la biominéralisation. Enfin, la matrice organique a un rôle dans la signalisation cellulaire, cette dimension n'étant pleinement prise en compte que depuis deux décennies pour l'os, et moins encore pour les autres systèmes minéralisants.

#### **d. La nature hiérarchique des biominéraux**

Parallèlement au développement de l'analyse de la fraction organique des biominéralisations, la microscopie électronique permet d'en visualiser la microstructure, voire l'ultrastructure. Cette technique révèle ainsi une propriété fondamentale de la plupart des biominéralisations, leur structure anisotrope et leur organisation « hiérarchique » : hiérarchie de la matrice organique minéralisante, hiérarchie de la phase minérale.

Pour la matrice organique minéralisante, l'exemple le plus connu est celui du collagène osseux. Le collagène est une longue chaîne polypeptidique alpha d'acides aminés dont l'essentiel de la séquence est formé d'un triplet Gly-X-Y (où X et Y sont très souvent des résidus proline et hydroxyproline). Lors de la synthèse, cette chaîne s'associe avec 2 autres chaînes pour former une triple hélice, dont les extrémités N et C-terminales sont clivées pour former la molécule de tropocollagène, de masse moléculaire avoisinant les 300 kDa, pour une longueur de 300 nm et un diamètre de 1,4 nm (Eyre, 1980). Le tropocollagène s'auto-assemble en microfibrilles, caractérisées par un décalage longitudinal de 67 nm de chaque molécule par rapport à sa plus proche voisine, ce qui confère à l'ensemble un aspect strié en microscopie électronique à transmission. Le trou formé par ce décalage est le lieu où les nanocristaux d'hydroxylapatite sont précipités. Les microfibrilles s'associent en faisceaux pour donner des fibrilles, de longueur en moyenne égale à 2 µm. A leur tour, les fibrilles s'organisent en fibres et faisceaux. Cette organisation hiérarchique de la matrice collagénique confère à l'os des propriétés de résistance exceptionnelles.

L'aspect hiérarchique de la phase minérale est remarquablement illustré par la nacre des mollusques. La nacre forme la couche interne de la coquille de nombreux bivalves ptériomorphes de certains gastéropodes et d'un céphalopode, le nautilus. Elle est constituée d'un assemblage de cristaux d'aragonite très plats, les tablettes de nacre, de 500 nm d'épaisseur pour une longueur de plusieurs microns. Ces cristaux constituent les briques d'un mur dont le ciment est une matrice organique « péri-tablettaire ». Les tablettes de nacre ont longtemps été considérées comme l'unité minérale de base de la nacre, car d'apparence monocristalline. On sait maintenant qu'il n'en est rien et que ces tablettes sont elles-mêmes laminées, et qu'elles sont constituées de nano-blocs minéraux, ou nano-tablettes, de 30 à 180 nm de long pour une épaisseur de quelques dizaines de nm (Oaki and Imai, 2005 ; Rousseau

*et al.*, 2005). Hormis la nacre, d'autres microstructures coquillères présentent aussi une hiérarchie de la phase minérale, jusqu'aux nano-cristaux. C'est notamment le cas des prismes calcitiques, dont je reparlerai ultérieurement.

### **e. Minéralisation biologiquement induite ou contrôlée**

L'unification de toutes les biominéralisations sous une même terminologie a amené Stephen Mann (1983) à distinguer deux grandes catégories de processus de formation des structures minéralisées: les minéralisations biologiquement induites ; les minéralisations biologiquement contrôlées. Cette dichotomie s'est substituée à celle opposant les biominéralisations « squelettiques » (« skeletal biomineralizations ») regroupant toutes les structures minéralisées de soutien (coquilles, tests, cuticules, frustules, etc...), à celles qui ne le sont pas (« non-skeletal biomineralizations »). Ce second groupe représente un vaste ensemble disparate comprenant pêle-mêle les statolithes, les otolithes, les structures de stockage calcique, les oogones de charophytes, les coquilles d'œuf, bref, un inventaire à la Prévert ! La division dichotomique introduite par Mann traduit une réalité physiologique, biochimique et évolutive, moins perceptible de prime abord, mais beaucoup plus fondamentale. Elle envisage la biominéralisation d'un point de vue du processus moléculaire. Elle ambitionne d'englober toutes les minéralisations, quelles qu'elles soient. Il existe cependant quelques cas-limites pour lesquels il reste difficile de savoir si l'organisme producteur contrôle sa minéralisation ou pas : c'est l'exemple de certaines algues calcaires marines, dasycladales ou *Halimeda*. C'est aussi l'exemple de certaines sclérosponges, dont la mise en place du squelette calcaire non spiculaire semble moins contrôlée que celle des spicules siliceux. Dans l'enregistrement fossile, c'est enfin l'exemple des stromatopores.

Parmi les minéralisations biologiquement induites, on trouve la plupart des productions minérales d'origine bactérienne, telles que celles résultant de l'oxydation du fer ou manganèse, ou les minéralisations calcaires de type stromatolithique ou mud-mounts. A la surface du globe ces minéralisations représentent des volumes énormes. Lorsque je dis *la plupart des minéralisations bactériennes*, un exemple dans le monde bactérien échappe à cette définition : celui des bactéries magnétotactiques, qui contrôlent parfaitement la production de magnétites dans une structure appelée magnétosome (Jogler and Schüler, 2007). Les minéralisations pathologiques font aussi partie des minéralisations biologiquement induites. En effet, elles sont produites de manière accidentelle, non contrôlées par l'organisme.

Quant aux minéralisations biologiquement contrôlées, elles rassemblent la plupart des minéralisations non pathologiques produites par les métazoaires. Elles comprennent également de nombreuses et importantes (quantitativement) minéralisations produites par des protistes : tests calcaires des foraminifères, coccosphères des coccolithophores, tests siliceux des radiolaires, des diatomées ou des silicoflagellés.

Bien évidemment, notre intérêt porte tout particulièrement sur les minéralisations biologiquement contrôlées. 5 critères permettent de les différencier de celles qui sont induites. Examinons ces critères :

- *les minéralisations biologiquement contrôlées requièrent une machinerie cellulaire spécialisée, dédiée à la production de minéraux. Cela signifie que ces minéraux ne sont pas simplement des « avatars » de l'activité métabolique mais sont intégrés dans une chaîne complexe de réactions métaboliques impliquant de nombreuses régulations et boucles de rétro-contrôle.*

- La synthèse des biominéraux est un processus actif, ce qui signifie que les minéraux produits sont rarement en équilibre avec le milieu environnant. On peut citer quelques exemples remarquables : les structures de stockage calciques chez les crustacés en carbonate de calcium amorphe (Raz et al., 2002). Le carbonate de calcium amorphe est hautement instable et tend spontanément à recristalliser en une forme plus stable, aragonite ou calcite. Chez les crustacés, la recristallisation ne se produit pas et ces organismes parviennent à stabiliser la forme amorphe. Autre exemple parlant, celui des acanthaires, protozoaires marins proches des radiolaires, qui élaborent un test minéralisé en célestite (sulfate de strontium,  $\text{SrSO}_4$ ). Or, les océans sont très largement sous-saturés vis à vis de ce minéral (Odum, 1951). Dans des conditions naturelles, ce minéral se dissout rapidement. Les acanthaires sont capables de concentrer les ions constitutifs de la célestite pour sa synthèse, en allouant une part importante de leur budget énergétique à cette fonction. Dans une moindre mesure, un cas similaire est représenté par les diatomées, dont le test siliceux n'est pas en équilibre avec le milieu marin, sous-saturé vis à vis de ce minéral.

- Les minéraux formés de manière contrôlée ont un habitus différent de ceux précipités chimiquement. Le cas des mollusques est évocateur, puisqu'ils sont capables de moduler très subtilement les formes des cristaux de carbonate de calcium de leur coquille, et de les assembler en un nombre important de microstructures de morphologies variées : couches prismatiques, nacrées, foliées, granulaires, homogènes, composites prismatiques, lamellaires croisées (Carter, 1990). J'aurai plus loin l'occasion d'évoquer cet aspect.

- Les minéraux formés de manière contrôlée ne sont jamais synthétisés au contact direct de l'environnement. L'organisme producteur élabore une stratégie pour délimiter l'espace dans lequel le minéral est produit ; c'est le « space delineation », de Lowenstam et Weiner (1989). Cet espace peut revêtir plusieurs morphologies : c'est par exemple une vésicule cytoplasmique, dans laquelle se forme un coccolithe, lequel est sécrété par exocytose. C'est une vésicule extracellulaire, dans le cas de la minéralisation du cartilage. C'est un syncytium, dans le cas des échinodermes (Simkiss and Wilbur, 1989). C'est un espace clos coïncé entre un épithélium minéralisant et une membrane organique ; les mollusques ont adopté cette stratégie.

- Le processus de biominéralisation est contrôlé par une matrice organique, sécrétée au moment de la mise en place de la structure minéralisée. Cette matrice est incorporée dans la biominéralisation. Au niveau moléculaire et supra-moléculaire, cette matrice joue un rôle actif dans la minéralisation. On lui attribue de très nombreuses fonctions : organisation spatiale du micro-environnement dans lequel s'effectue la minéralisation, nucléation cristalline, croissance des cristaux selon des axes cristallographiques privilégiés, arrêt de la croissance cristalline. On lui attribue également un rôle dans la signalisation cellulaire. Enfin, pour les minéralisations non cristallines, c'est à dire amorphes, cette matrice joue un rôle dans sa stabilisation. Au niveau macroscopique, l'incorporation de la matrice dans la structure minéralisée en modifie considérablement ses propriétés mécaniques, la rendant beaucoup plus solide. Dans le chapitre suivant, nous aurons bien entendu l'occasion de développer et décrire les multiples rôles de la matrice minéralisante.

En plus de ces cinq critères d'identification des minéralisations biologiquement contrôlées, il existe une différence fondamentale entre minéralisations biologiquement induites et minéralisations biologiquement contrôlées, celle de leur apparition à la surface du globe. En effet, les minéralisations biologiquement induites sont apparues très tôt, à l'Archéen inférieur, autour de 3,5 milliards d'années. Il s'agissait alors de stromatolites, autrement dit, de structures organo-sédimentaires résultant de l'activité photosynthétique de cyanobactéries. En revanche, les minéralisations biologiquement contrôlées sont nettement plus tardives, puisqu'elles apparaissent à peu près à la limite Protérozoïque/Cambrien. Elles représentent même un des aspects les plus spectaculaires de la fameuse « explosion Cambrienne », en tout cas, un des aspects les plus visibles de cet événement.

Pour conclure sur ce paragraphe, on peut dire que le grand mérite de la classification introduite par Mann, et reprise par Lowenstam et Weiner (1989) est d'avoir amené la communauté scientifique à s'interroger sur la biominéralisation en tant que processus, et non pas seulement en tant que produit fini. En quelque sorte, cette étape marque le passage de la discipline biominéralisation de l'enfance à l'adolescence.

### **f. La biominéralisation depuis les quinze dernières années**

Depuis les années 90, le domaine des biominéralisations connaît un développement buissonnant remarquable, qu'il est difficile de synthétiser en quelques lignes. Ce développement se fait néanmoins de manière dichotomique: d'un côté, la communauté « vertébriste » travaillant sur les os et les dents, de l'autre, l'émiettement de communautés travaillant sur tous les autres systèmes minéralisants.

Dans le premier cas, la compréhension du fonctionnement des tissus osseux ou dentaires a fait des progrès gigantesques, en adéquation avec la taille de la communauté scientifique qui travaille sur ces modèles. Avec la publication des génomes de la plupart des modèles vertébrés, les constituants matriciels constitutifs des os et dents sont presque tous connus. De même, les voies de synthèse de ces constituants, en particulier en ce qui concerne les nombreuses modifications post-traductionnelles (clivage des pro-collagènes, hydroxylation des résidus Lys et Pro, etc...) ont été précisément identifiées. Pour des raisons biomédicales faciles à comprendre – entre autres choses, la lutte contre l'ostéoporose, les ostéosarcomes, les collagénopathies, ou de manière générale, les malformations osseuses ou dentaires d'origine génétique - les domaines qui focalisent l'attention depuis une quinzaine d'années sont les voies de signalisation cellulaire, la régulation du couple ostéoblaste/ostéoclaste (la triade OPG/RANK/RANKL), et les phénomènes de différenciation cellulaire vers des lignées ostéoblastiques ou odontoblastiques. De nombreuses lignées cellulaires minéralisantes sont disponibles commercialement, autorisant le suivi du comportement cellulaire, notamment par PCR en temps réel, ou, depuis ces dix dernières années, par biopuces à ADN, en attendant les biopuces à protéines.

Dans les systèmes minéralisants « non-vertébrés », les situations sont très variables d'un modèle à l'autre. Un examen détaillé de la banque de données Gold (<http://www.genomesonline.org/>) indique quels sont les groupes zoologiques qui ont les faveurs de grands projets de séquençage génomique. C'est le cas des échinodermes, des bactéries magnétotactiques, des algues coccolithophores ou des diatomées. Pour les premiers, les génomes complets des oursins *Strongylocentrotus purpuratus*, *S. franciscanus*, *Lytechinus variegatus* et *Alloccentrotus fragilis* sont disponibles. Une bonne partie des protéines de la matrice minéralisante a été identifiée chez *S. purpuratus*. Le génome des bactéries magnétotactiques *Magnetospirillum gryphiswaldense* et *M. magneticum* a été déterminé, et la

plupart des protéines associées au fonctionnement du magnétosome, cet organite cellulaire constitué de membranes à l'intérieur duquel sont assemblés les cristaux de magnétite, ont été à peu près identifiées. Chez les diatomées (bacillariophytes), le génome de l'espèce *Thalassiosira pseudonana* est connu et là encore, une partie des enzymes et protéines associées au métabolisme de la silice a été identifiée. Chez les coccolithophores (algues haptophytes), le génome ainsi que plusieurs banques d'EST sont disponibles pour l'espèce *Emiliana huxleyi*, qui reste LE grand modèle de biominéralisation carbonatée chez les protistes. Remarquons cependant que la connaissance du génome ne donne pas la clé du fonctionnement du système minéralisant, et qu'un effort important reste à faire pour annoter tous les gènes impliqués à des degrés divers dans la minéralisation, comprendre leur expression dans le temps et dans l'espace, et représenter leurs interactions multiples sous forme de réseaux, préalable à la compréhension approfondie du métabolisme de la minéralisation.

Les mollusques, qui ont joué le « rôle de locomotive » dans les avancées conceptuelles du domaine de la biominéralisation, sont paradoxalement dans une situation nettement moins avancée (Simison and Boore, 2008). Pour quelques mollusques d'intérêt économiques, tels que l'huître perlière *Pinctada* sp., l'huître creuse *Crassostrea gigas*, on dispose de banques d'EST. La moule américaine *Mytilus californianus* ou encore la patelle géante *Lottia gigantea* ont vu leur génome séquencé. Cependant, considérant l'étendue et la complexité du phylum, on peut se demander si cette information pourra facilement être transposable à d'autres formes taxonomiquement éloignées, et dont le génome n'a pas encore été séquencé.

D'autres groupes zoologiques sont dans une situation relativement similaire à celle des mollusques: les cnidaires ou les spongiaires. Chez les cnidaires, quelques hexacoralliaires et octocoralliaires sont bien étudiés du point de vue de la biominéralisation (physiologie, matrice calcifiante), et pour des formes telles que *Acropora* et *Porites*, on dispose respectivement du génome et de banques d'EST. Chez les spongiaires, seule la démosponge *Suberites domuncula*, forme aux spicules siliceux, fait l'objet de recherches très complètes sur son « équipement moléculaire » silicifiant.

Enfin, parents pauvres de la biominéralisation, quelques groupes zoologiques traînent en queue de peloton, se caractérisant par des connaissances extrêmement lacunaires du point de vue de la biominéralisation: ce sont les brachiopodes, les bryozoaires, les annélides calcifiants, les tuniciers (urochordés) ou encore, les foraminifères. Pour ces groupes, très peu de connaissances ont été accumulées sur les constituants organiques des matrices, et pour l'instant, ils ne font pas l'objet de séquençage.

Un autre aspect qui marque le domaine de la biominéralisation de ces dernières années concerne le retour en force des méthodes physiques d'investigation des biominéraux. A partir des années 80 et ce, pendant deux décennies, les méthodes physiques avaient paru céder le pas devant les approches biochimiques ou de biologie moléculaire des matrices minéralisantes. D'une certaine manière, ces méthodes ont apporté – et apportent toujours – profusion d'informations, malgré le fait qu'elles soient destructives – dans le cas de la biochimie - ou bien qu'elles ne renseignent que très indirectement sur la structure finale – dans le cas d'une approche par la biologie moléculaire (à l'exception d'une approche par « gene knock-down » ou par ARN interférent). Les nouvelles techniques d'investigation, telles que la spectrométrie Raman, le Nano-Sims, la microtomographie, les micro-sondes EDS et WDS offrent de nouvelles perspectives d'analyse des biominéralisations tout à fait intéressantes, puisqu'elles permettent d'observer la structure organo-minérale en place, *in situ*. Nul doute que ces techniques sont amenées à jouer un rôle important au cours de la prochaine décennie.

### **g. Où en est la biominéralisation aujourd'hui ?**

La biominéralisation est un domaine de recherche actif, nourri par de nombreuses manifestations scientifiques internationales et par un rythme croissant de publications. Outre les symposiums internationaux sur la biominéralisations, évoqués plus haut et mentionnés dans la Table 3, qui connaissent un succès qui ne se dément pas, d'autres manifestations scientifiques d'envergure ont trait à ce domaine : en premier lieu, les Gordon Conferences on Biomineralization, organisées toutes les années paires depuis 1992, au mois d'Août, à New London dans le New Hampshire. Cette conférence de renom réunit pendant une semaine environ 150 spécialistes du domaine à l'échelle mondiale. Notons également les ICCBMT (International Conference on the Chemistry and Biology of Mineralized Tissues), conférences organisées tous les 2-3 ans, assez voisines des GRC, mais plus axées sur les tissus osseux ou dentaires. Les Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés (JFBTM), organisées annuellement, sont un peu leur équivalent français.

Symposium Internationaux sur la biominéralisation	Année	Lieu	Volume publié	Année de publication
10th Int. Symp. Biomin.	2008	Lianyungang, China	Non encore disponible	
9th Int. Symp. Biomin.	2005	Pucon, Chile	Biomineralization, from Paleontology to Materials	2007
8th Int. Symp. Biomin.	2001	Niigata, Japan	Biomineralization. Formation, diversity, Evolution & Application	2004
7th Int. Symp. Biomin.	1993	Monaco-Ville, Monaco	Biomineralization 93 (5 volumes)	1994 à 1996
6th Int. Symp. Biomin.	1990	Odawara, Japan	Mechanisms and Phylogeny of Mineralization in Biological Systems	1991
5th Int. Symp. Biomin.	1986	Arlington, Texas, USA	Origin, Evolution, & Modern Aspects of Biomineralization in Plants & Animals	1989
4th Int. Symp. Biomin.	1982	Renesse, The Netherlands	Biomineralization & Biological Metal Accumulation	1983
3rd Int. Symp. Biomin.	1977	Kashikojima, Japan	The Mechanisms of Biomineralization in Animals & Plants	1980
2 <sup>nd</sup> Int. Symp. Biomin.	1974	Georgetown, USA	The Mechanisms of Mineralization in the Invertebrates & Plants	1976
1st Int. Symp. Biomin.	1970	Mainz, Germany	Biomineralization Research Report, volume 6	1972

Table 3. Succession des symposiums internationaux sur la biominéralisation.

Des domaines très voisins de la biominéralisation, organisent régulièrement des conférences internationales qui comportent un volet « biominéralisations ». C'est le cas notamment des congrès centrés sur les biomatériaux (ESB Meetings, WBC Congress, MRS Spring Meeting), pour lesquels la communauté scientifique mondiale est beaucoup plus importante que celle des biominéralisations *sensu stricto*.

Certains symposiums internationaux transversaux, dont les thématiques ont trait au domaine marin par exemple, organisent des sessions spéciales dédiées aux biominéralisations : c'est notamment le cas des IMBC (International Marine Biotechnology Conferences).

Enfin, à l'échelle nationale ou internationale, de nombreux ateliers (« workshops » dans le jargon français), séminaires ou conférences plus restreints sont, de manière sporadique, organisés sur la thématique des biominéralisations. Cela a été le cas du séminaire organisé par le Collège de France en Mai 2003, ayant pour titre « Biominéralisation : diversité et unité », ou encore d'un séminaire organisé à l'Université de Bremen, intitulé « Molecular Biology and Protein Chemistry in Biomineralization Research », réunissant une quarantaine de personnes en Novembre 2003.



Le nombre d'articles publiés est aussi un indice de la vitalité de la discipline. Ce nombre croît de manière quasi-exponentielle. Pratiquement, chaque semaine, sur PubMed paraît un ou plusieurs articles ayant trait au domaine. Sur la base de données PubMed, une recherche bibliographique à partir de la terminologie « biomineral\* » (avec une troncature) révèle une liste de 64 pages comprenant environ 1300 articles. Sur la période 1970-1979, 8 articles comportant le terme biomineral\* ont été publiés ; la décennie suivante, ce nombre s'élève à 63, 212 pour la période 1990-1999, et finalement plus de 1000 pour la période 2000-2009. Ce chiffre, déjà respectable en soi, est bien au-dessous du nombre réel d'articles traitant de la biominéralisation, puisque PubMed ne recense pas les articles publiés en dehors du domaine biomédical, en particulier, les articles issus des sciences de la Terre. De plus, si l'on effectue une recherche dans la base de données PubMed avec le terme « calcification », le nombre d'articles trouvés avoisine les 30000 !

Enfin, dernier marqueur de la vitalité de la discipline, le nombre d'ouvrages publiés collectifs ou individuels, dont la parution s'est accélérée au cours de la dernière décennie. Citons pêle-mêle le « Biomineralization, Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry », de Stephen Mann (2001), le « Biomineralization », de P. M. Dove, J. J. De Yoreo et S. Weiner (2003), les 5 volumes de la série Biomineralization, édités par E. Baeuerlein chez Wiley-VCH entre 2000 et 2008, les 2 volumes Biomineralization édités par K. Naka (2007), « Biomineralization, from Nature to Application », édité par les Sigel (2008). Et la liste est loin d'être close.

## **h. Références bibliographiques**

- Baeuerlein, E. (Ed.), 2000. Biomineralization. Wiley-VCH, Weinheim.
- Baeuerlein, E. (Ed.), 2004. Biomineralization. Wiley-VCH, Weinheim (2<sup>nd</sup> completely revised and extended edition).
- Baeuerlein, E. (Ed.), 2007. Handbook of Biomineralization. Wiley-VCH, Weinheim. 3 volumes.
- Carter, J. G., 1990 (Ed.). Skeletal Biomineralization: Patterns, Processes, and Evolutionary Trends, Van Nostrand Reinhold, New York, 2 volumes.
- De Lasone, 1751. Premier mémoire sur l'organisation des os. *Mémoire de l'Académie Royale des Sciences* 145-177.
- Dove, P. M., De Yoreo, J. J., and Weiner, S. (Eds.), 2003. Biomineralization. Reviews in Mineralogy and Geochemistry, 54. Mineralogical Society of America.
- Eastoe, J. E., 1955. The amino acid composition of mammalian collagen and gelatin. *Biochem. J.* **61**, 589-600.
- Eyre, D. R., 1980. Collagen : molecular diversity in body's protein scaffold. *Science* **207**, 1315-1322.
- Frémy, M. E., 1855. Recherches chimiques sur les os. *Annales Chim. Phys.*, 3<sup>ème</sup> sér. **43**, 47-107.
- Glimcher, M. J., 1960. Specificity of the molecular structure of organic matrices in mineralization. In "Calcification in Biological Systems" (R. F. Sognaes Ed.) pp. 421-487. Publ. 64 of the American Association for the Advancement of Science, Washington, D. C.
- Grégoire, C., 1972. Structure of the molluscan shell. In "Chemical Zoology, VII Mollusca" (M. Florkin and B. T. Scheer Eds.) pp. 45-102. Academic Press, New York.
- Grégoire, C., Duchâteau, G., and Florkin, M., 1955. La trame protidique des nacrés et des perles. *Ann. Inst. Océanogr. Monaco* **31**, 1-36.
- Havers, C., 1691. *Osteologia nova, or some new observations of the bones, and the parts belonging to them, with the manner of their accretion and nutrition.* London.
- Hooke, R., 1665. Micrographia, or some Physiological Descriptions of Minute Bodies Made by Magnifying Glasses with Observations and Inquiries Thereupon. Royal Soc Ed., London.
- Jogler, C., and Schüler, D., 2007. Genetic and biochemical analysis of magnetosome formation in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. In "Handbook of Biomineralization" (E. Baeuerlein Ed.) pp. 145-161. Wiley VCH, Weinheim.
- Kingsley, R. J., Watabe, N., 1982. Ultrastructural investigation of spicule formation in the gorgonian *Leptogorgia virgulata* (Lamarck) (Coelenterata: Gorgonacea). *Cell Tissue Res.* **223**, 325-334.
- Logan, M. A., 1935. Composition of cartilage, bone, dentin and enamel. *Biol. Chem.* **110**, 375.

- Lowenstam, H. A., and Weiner, S., 1989. *On Biomineralization*. Oxford University Press, New York.
- Mann, S., 1983. Mineralization in biological systems. *Struct. Bond.* **54**, 125-174.
- Mann, S., 2001. *Biomineralization. Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry*. Oxford University Press, Oxford.
- Mann, S., Webb, J. and R. J. P. Williams, 1989. *Biomineralization. Chemical and Biochemical Perspectives*. VCH, London.
- Naka, K. (Ed.), 2007. *Biomineralization I. Topics in Current Chemistry*, 270. Springer, Berlin.
- Naka, K. (Ed.), 2007. *Biomineralization II. Topics in Current Chemistry*, 271. Springer, Berlin.
- Oaki, Y., and Imai, H., 2005. The hierarchical architecture of nacre and its mimetic materials. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **44**, 6571-6575.
- Odum, H. T., 1951. Note on the strontium content of sea water, celestite radiolarian, and strontianite snail shells. *Science* **114**, 211-213.
- Piez, K.A., 1953. The amino acid content of dentin protein. *J. Dental Res.* **32**, 706.
- Ramachandran, G. N., and Kartha, G., 1954. Structure of collagen. *Nature* **174**, 269-270.
- Raz, S., Testenière, O., Hecker, A., Weiner, S., Luquet, G., 2002. Stable amorphous calcium carbonate is the main component of the calcium storage structures of the crustacean *Orchestia cavimana*. *Biol. Bull.* **203**, 269-274.
- Rich, A., and Crick, F. H. C., 1955. The structure of collagen. *Nature* **176**, 915.
- Rousseau, M., Lopez, E., Stempfélé, P., Brendlé, M., Franke, L., Guette, A., Naslain, R., and Bourrat, X., 2005. Multiscale structure of sheet nacre. *Biomater.* **26**, 6254-6262.
- Sigel, A., Sigel, H., and Sigel, R. K. O. 2008. *Biomineralization. From Nature to Application. Metal Ions in Life Sci.* **4**, Wiley, Chichester.
- Simison, W. B., and Boore, J. L., 2008. Molluscan evolutionary genomics. *In Phylogeny and Evolution of the Mollusca* (W. F. Ponder and D. R. Lindberg eds.) pp. 447-461. University of California Press, Berkeley.
- Stein, W. H., Moore, S., 1948. Chromatography of Amino Acids on Starch Columns. Separation of Phenylalanine, Leucine, Isoleucine, Methionine, Tyrosine, and Valine. *J. Biol. Chem.* **176**, 337-365.
- Simkiss, K. and Wilbur, K. M., 1989. *Biomineralization. Cell Biology and Mineral Deposition*. Academic Press, New York.
- Tidball, J. G., 1982. An ultrastructural and cytochemical analysis of the cellular basis for tyrosine-derived collagen crosslinks in *Leptogorgia virgulata* (Cnidaria: Gorgonacea). *Cell Tissue Res.* **222**, 635-645.
- Veres, I, Lenart, G., Szép, I., Bidlo, G., Pinter, J., Ocsényi, A., 1973. New aspects in the investigation of some processes of biomineralization. *Mikroskopie* **29**, 151-156.

# IV. BIOMINERALISATION DE LA COQUILLE DES MOLLUSQUES

## IV. 1. Introduction

## IV.2. Phylogénie des mollusques

- a. Généralités
- b. Problèmes phylogénétiques au sein du phylum

## IV.3. Origine des mollusques

- a. Individualisation du phylum : quand ?
- b. Les premières coquilles

## IV.4. La coquille des mollusques : développement et physiologie

- a. Généralités
- b. La coquille embryonnaire
- c. La coquille juvénile à adulte : considérations physiologiques
- d. Critique du modèle physiologique

## IV.5. Les protéines des coquilles de mollusque

- a. Caractérisation des protéines coquillières
- b. Les protéines coquillières : diversité
- c. Quelques remarques sur les protéines de coquille
- d. Mécanismes moléculaires d'évolution des matrices coquillières
- e. Quelles origines pour les protéines coquillières ?
  - e.1. Le scénario de l'héritage Protérozoïque
  - e.2. Le scénario des inventions indépendantes et/ou d'évolution rapide
- f. Références bibliographiques

## IV.1. INTRODUCTION

Dans l'histoire de la discipline biominéralisation, les mollusques occupent une place à part, une place privilégiée. Par bien des aspects, ils ont constitué, et constituent encore le groupe moteur du développement de la discipline, à partir duquel de nombreux concepts-clés ont été forgés (cf. chapitre précédent). Ces concepts ont ensuite été adaptés et généralisés à d'autres types de biominéralisations. A ce propos, il est intéressant de constater que le transfert des connaissances s'est fait depuis le modèle « coquille de mollusque » vers les modèles « os » ou « dent », alors que l'on aurait pu attendre le contraire, simplement du fait que la communauté scientifique travaillant sur l'os ou la dent est autrement plus importante que celle qui étudie les coquilles de mollusque.

Avant de parler des processus de minéralisation de la coquille chez les mollusques, il est utile de replacer le groupe dans son cadre phylogénétique.

## IV.2. PHYLOGENIE DES MOLLUSQUES

### a. Généralités

Les mollusques sont des métazoaires triploblastiques bilatériens. Ils appartiennent à la division des protostomiens (le blastopore donne la bouche du futur adulte) schizocoelomates (la cavité coelomique est produite par schizocoelie, autrement dit par creusement de la masse mésodermique, lors de la gastrulation). Au sein des protostomiens, les mollusques sont regroupés au sein du super-phylum des lophotrochozoaires (Halanych *et al.*, 1995 ; Aguinaldo *et al.*, 1998), qui comprend les brachiopodes les bryozoaires, les annélides, les plathyhelminthes, les acanthocéphales, les siponcles, les phoronidiens. La caractéristique de cet ensemble monophylétique est de rassembler tous les protostomiens à larves trochophores et/ou porteurs de lophophores (couronne de tentacules ciliés autour de la bouche). Les mollusques sont des eutrochophores, groupe rassemblant les formes à forme larvaire ciliée nageuse, la larve trochophore. Les mollusques sont souvent classés à proximité des annélides, au vu de la similitude des premiers stades de développement embryonnaire (Nielsen, 2004). Notons cependant que plusieurs cladogrammes, récemment proposés, remettent en cause cette proximité (Haszprunar *et al.*, 2008 ; Paps *et al.*, 2009).

Le phylum des mollusques est généralement considéré comme un groupe monophylétique. Néanmoins, cette position a été récemment contestée (Bourlat *et al.*, 2008), à partir de reconstructions d'arbres prenant en compte un ensemble de gènes nucléaires, ribosomiaux et mitochondriaux. Les mollusques représentent, après les arthropodes, le second phylum par la taille. On estime actuellement que plus de 120 000 espèces vivantes de mollusques peuplent la surface du globe (Lecointre et Le Guyader, 2001), mais cette estimation nécessite sans doute une réévaluation à la hausse : Haszprunar *et al.* (2008) parlent de 130000 espèces vivantes, 70000 espèces fossiles, et tablent sur une diversité d'environ 200000 espèces vivantes.

Depuis la dernière décennie, la phylogénie des mollusques a subi bien plus qu'un « relifiting ». Les anciennes terminologies d'amphineures, d'aplacophores n'existent plus. Le phylum est maintenant partagé en huit classes d'importance inégale comprenant des formes vivantes. D'autres classes regroupent des formes éteintes.

- *Les solénogastres* : représentent des mollusques vermiformes, dont les tissus épithéliaux élaborent des spicules calcaires. Cette classe est représentée par 350 espèces vivantes.

- *Les caudofovéates* : mollusques vermiformes dont les téguments sécrètent des plaques calcaires. Environ cent espèces ont été décrites.
- *Les polyplacophores* : encore appelés chitons, ces formes se caractérisent par un manteau dont la partie dorsale sécrète huit plaques calcaires articulées entre elles. Environ 900 espèces ont été recensées.
- *Les monoplacophores* : forment une classe de taille réduite ne comprenant que 15 espèces actuelles, possédant une fine coquille calcaire univalve, et une organisation sériée de leur anatomie. Ils sont souvent considérés comme les plus primitifs des conchifères.
- *Les bivalves* : figurent parmi les mollusques les plus connus. Ils ont une symétrie bilatérale. Leur coquille est constituée de deux valves comprimées latéralement, réunie par une charnière et un ligament organique. Cette classe comprend plus de 12000 espèces.
- *Les scaphopodes* : comprennent des mollusques dont la masse viscérale est contenue dans une coquille univalve conique ouverte aux deux extrémités. Environ 500 espèces ont été dénombrées.
- *Les gastéropodes* : c'est la classe de mollusques la plus diversifiée, comprenant plus de 100000 espèces vivantes. Caractérisés par une torsion de la masse viscérale à 180° lors de leur développement, la plupart des formes possèdent une coquille univalve spiralée ; Les formes les plus dérivées (limaces) ont perdu leur coquille.
- *Les céphalopodes* : cette classe est caractérisée par des formes possédant des tentacules préhensiles, une coquille externe (nautilé) ou interne (seiche, calmar), voire pas de coquille du tout (pieuvre). 730 espèces sont actuellement recensées.

### **b. Problèmes phylogénétiques au sein du phylum**

Si les relations phylogénétiques des mollusques par rapport aux autres lophotrochozoaires sont loin d'être éclaircies, les liens de parenté des différentes classes de mollusques ne le sont guère plus. Dans les phylogénies les plus consensuelles, les solénogastres et les caudofovéates occupent une position basale (Haas, 1981 ; Salvini-Plawen and Steiner, 1996), par rapport aux 6 autres classes qui forment alors les eumollusques (Fig. 3). Les 5 dernières classes sont dites conchifères, c'est à dire, porteuses de coquilles. Dans le point de vue adopté par Runnegar (1996) et par Salvini-Plawen et Steiner (1996), et relayé par Lecointre et Le Guyader (2001), les 4 dernières classes constituent les ganglioneures. Bivalves et scaphopodes sont rassemblés au sein des diasomes, sur la base de caractères anatomiques : disparition de la tête, système nerveux secondairement décentralisé, manteau entourant la totalité de l'animal, pied généralement spatulé, coquille de la larve véligère passant par un stade bivalve. Gastéropodes et céphalopodes sont rassemblés au sein des viscéroconques, ou cyrtosomes, caractérisés par une tête distincte bien développée, un système nerveux centralisé par fusion de ganglions nerveux, un manteau qui n'entoure que la partie viscérale du corps, un tube digestif en forme de U.

D'autres phylogénies, résumées dans Haszprunar *et al.* (2008) proposent des cladogrammes radicalement différents : une position basale des conchifères par rapport aux solénogastres et caudofovéates, considérés alors comme mollusques extrêmement dérivés (Scheltema and Schander, 2006) ; au sein des conchifères, Waller (1998) et Steiner et Dreyer (2003) identifient les scaphopodes et les céphalopodes comme deux groupes-frères, l'ensemble constituant le groupe-frère des gastéropodes, et le clade scaphopodes-céphalopodes-gastéropodes, lui-même groupe-frère des bivalves. La phylogénie des mollusques proposée par Passamanek *et al.* (2004) adopte également ce point de vue.

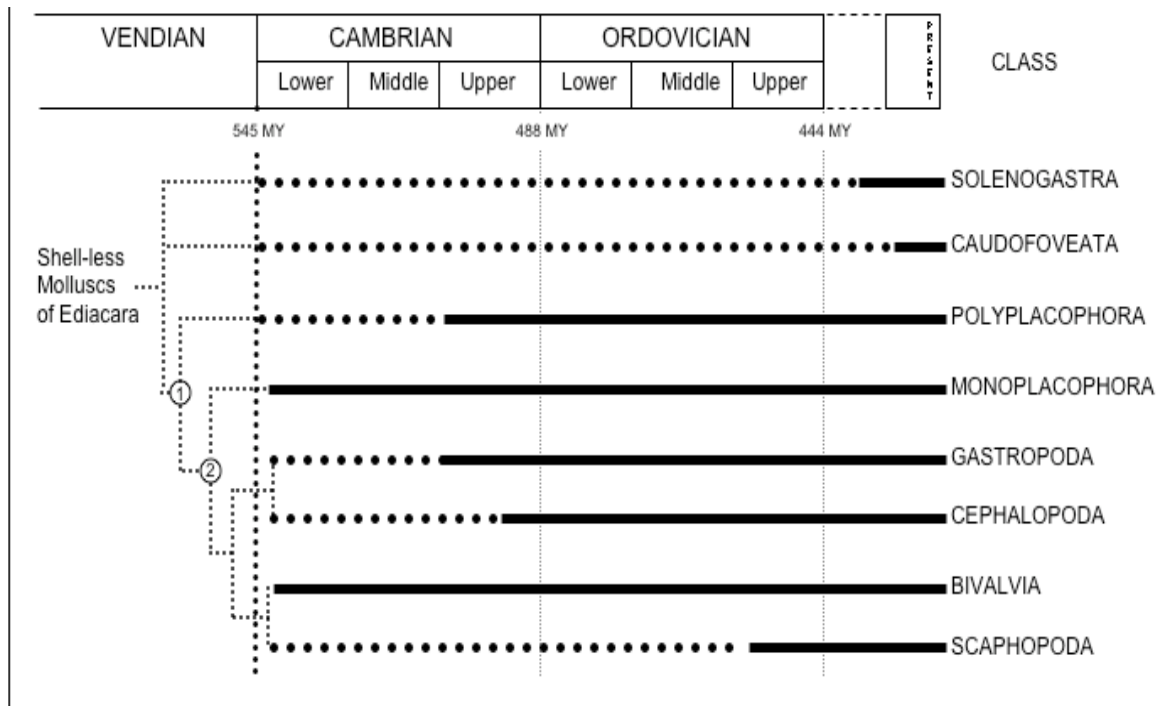


Fig. 3. Phylogénie du phylum Mollusca. Ce cladogramme, publié dans Marin *et al.* (2008) adopte le point de vue exposé par Lecoindre et Le Guyader (2001). Le nœud 1 correspond au sous-phylum Eumollusca, et le nœud 2, à la super-classe Conchifera. Chez les conchifères, les scaphopodes font une apparition tardive, fini-ordovicienne, et peut-être plus tardive encore (Carbonifère, d'après Reynolds and Steiner, 2008).

### IV.3. ORIGINE DES MOLLUSQUES

#### a. Individualisation du phylum : quand ?

A l'instar de la plupart des embranchements actuels de métazoaires, les mollusques apparaissent de manière certaine au Cambrien basal. Ils sont d'ailleurs, parallèlement aux brachiopodes, un des acteurs majeurs de « l'explosion Cambrienne », et par là même, de l'apparition de la minéralisation. Retracer leur origine s'inscrit dans le débat plus général de l'origine des phylums de métazoaires, débat loin d'être clos. Les controverses portent à la fois sur le patron évolutif des métazoaires, c'est à dire, la structure de l'arbre phylogénétique, ainsi que sur les différentes dates de divergence des phylums de métazoaires. Ce débat est alimenté par les données paléontologiques d'une part, et par les données de biologie moléculaire d'autre part.

L'individualisation du phylum des mollusques s'enracine quelque part dans le Protérozoïque. Il y a une douzaine d'années, les reconstitutions de Wray *et al.* (1996) basées sur des taux de mutation de différents gènes, indiquaient, pour la séparation entre mollusques et chordés, des dates de divergences très précoces, variant de 1,3 milliards d'années à près de 800 millions d'années. Cette publication avait cependant donné lieu à une très vive polémique, à peine éteinte. De manière plus réaliste, Ayala *et al.* (1998) avaient obtenu une séparation entre deutérostomes et protostomes datant de 670 millions d'années. Plus récemment, Douzery *et al.* (2004 ; 2006) ont calculé une date de divergence de ces deux clades comprise entre 642 et 761 millions d'années. Quant à Peterson *et al.* (2004), ils

rajeunissent encore cette divergence, puisqu'ils estiment qu'elle se serait produite autour de 570 millions d'années, soit à peine trente millions d'années avant la limite P/C. Une nouvelle reconstitution phylogénétique entreprise récemment par ces auteurs (Peterson *et al.*, 2008) semble confirmer cette date.

Y-a-t-il des mollusques avérés dans la faune à corps mou d'Ediacara ? Rien n'est moins sûr. Actuellement, le candidat le plus sérieux à l'appellation de mollusque est *Kimberella quadratus* (Fig.4). Originellement décrite par Glaessner et Daily (1959) et longtemps assimilée à une méduse, cette forme énigmatique à symétrie bilatérale a été interprétée depuis comme un vrai mollusque par Fedonkin et Waggoner (1997). De taille comprise entre 3 et 105 mm, son empreinte ovale suggère en effet la présence d'un pied, d'un manteau et d'une coquille dorsale non minéralisée. La découverte récente de traces de reptation associées à *Kimberella* semblerait confirmer l'appartenance aux mollusques. Les datations donnent pour *Kimberella* un âge d'environ 555 millions d'années, soit 13 millions d'années avant la limite Protérozoïque/Cambrien. S'il s'avère que *Kimberella* est bien un mollusque, alors on tient la preuve qu'au moins un phylum de métazoaires connu actuellement était bel et bien individualisé avant la limite P/C. Cela suggère également une filiation entre les faunes édiacariennes et celles du Cambrien.



Fig. 4. *Kimberella quadratus* (Fedonkin et Waggoner, 1997) et sa reconstitution (à droite). Pour la reconstitution, cf. le site : [www-geology.ucdavis.edu/.../Kimberallie2.gif](http://www-geology.ucdavis.edu/.../Kimberallie2.gif)

### **b. Les premières coquilles**

Avec la faune des Small Shelly Fossils (SSF) du Cambrien Inférieur (Nemakit-Daldynien/Tommotien, c'est à dire d'âge compris entre 542 et 519 millions d'années), faune qui marque stratigraphiquement le début discret de l'explosion Cambrienne, on tient les premiers mollusques indiscutables, même si leur affinité avec des classes actuelles reste, pour un certain nombre d'entre eux, problématique. En effet, pour de nombreuses formes, notamment chez les bivalves, il existe un hiatus stratigraphique entre les spécimens du Cambrien Inférieur et Moyen et ceux apparus à l'Ordovicien (Parkhaev, 2008). De petite taille (quelques mm), la plupart des formes du Cambrien Inférieur sont univalves, de forme trochoïde ou conique. Finement préservées dans des dépôts phosphatés, elles ont même conservé leurs microstructures coquillières (Kouchinsky, 2000 ; Feng and Sun, 2003), révélant la présence de « nacre », « prismes », microstructure « lamellaire croisée », et autres. A ce jour, une estimation indique que 600 espèces de mollusques ont été nommées dans le Cambrien Inférieur et Moyen (Parkhaev, 2008), mais il se pourrait que ce nombre soit surévalué (une seule espèce sous plusieurs noms différents). Les faunes les plus diversifiées se situent en Chine (250 espèces) et Sibérie (env. 150 espèces). Les faunes Australiennes et

Mongoles comprennent environ 50 espèces, le reste étant distribué entre le Maroc, l'Europe, l'Amérique du Nord, le Khazakstan et l'Iran (Parkhaev, 2008).

Quelles sont les classes actuelles de mollusques représentées dans les faunes Cambriennes ? Des mollusques vermiformes (solénogastres et caudofovéates), on ne possède aucune trace. Les Scaphopodes apparaissent beaucoup plus tardivement, au minimum à l'Ordovicien (mais cette position est contestée), et plus probablement au Carbonifère (360 millions d'années ; Reynolds and Steiner, 2008). Les polyplacophores sont représentés dans le Cambrien Terminal, avec notamment les genres *Matthevia* et *Hemithecellia* et *Elongata* (Runnegar *et al.*, 1979 ; Stinchcomb and Darrough, 1995). Des sclérites calcifiés ont été attribués aux polyplacophores, dans le Cambrien basal, mais leur affinité reste très incertaine (Parkhaev, 2008). Les bivalves sont représentés dès le Cambrien Inférieur avec les genres *Fordilla*, *Bulluniella* et *Pojetaia* (Pojeta *et al.*, 1973 ; Jell, 1980), ce dernier étant considéré comme une forme primitive des nuculidés, bivalves paléotaxodontes. L'appartenance des formes univalves coniques du Cambrien Inférieur donne lieu à des controverses. Ces formes se répartissent en une dizaine de familles dont 3 d'entre elles (Helcionellidés, Pelagiellidés, Aldanellidés) sont rattachées tantôt aux gastéropodes, tantôt aux monoplacophores, tantôt à d'autres classes de mollusques n'ayant pas laissé de descendance (Parkhaev, 2008). Quant aux céphalopodes, ils apparaissent à la fin du Cambrien Moyen, avec le genre *Plectronoceras* de Chine (Nishiguchi and Mapes, 2008).

Parallèlement aux classes actuelles, de nombreuses formes de mollusques apparues au Cambrien ont été attribuées à des classes qui ne sont plus représentées actuellement, illustrant une fois de plus que le Cambrien a été une période d'exploration morphologique, marquée par une forte disparité et une diversité « intra-taxon » moyenne, voire faible (ce qui est souvent le cas de phases de radiations). Les formes les plus connues sont sans doute les rostroconches, à l'origine rattachées aux bivalves, mais incluses dans une classe à part par Pojeta *et al.* (1972). Les rostroconches (*Rostroconchia*) sont des formes univalves non enroulées (on dit aussi pseudobivalves), dont les deux lobes latéraux symétriques par rapport à un plan sont connectés dorsalement au niveau d'un sillon médian qui n'est pas sans rappeler la charnière des bivalves. Les rostroconches, représentés par une quarantaine de genres, ont subsisté jusqu'au Permien. D'autres formes, tels les sténothécoïdes, ont été rassemblées dans de nouvelles classes de mollusques par Yochelson (1969). Les données paléontologiques récentes les réintègrent au sein des gastéropodes (Parkhaev, 2008). Pour les helcionelloïdes, formes à coquilles comprimées et spiralées, Peel (1991) a également créé une nouvelle classe. Enfin, les hyolithidés représentent un groupe énigmatique très homogène, souvent considérés comme une classe de mollusques (Marek and Yochelson, 1964), ou bien comme un phylum à part (Runnegar, 2007). L'analyse des microstructures (Feng *et al.*, 2001) ne permet pas de trancher pas quant à l'appartenance des hyolithes aux mollusques.

Pour résumer, à l'exception des scaphopodes, toutes les classes actuelles de mollusques conchifères sont présentes au moins dès la fin du Cambrien moyen, les bivalves, les monoplacophores, et sans doute les gastéropodes étant présents dès le Cambrien Inférieur. Ce sont donc des modèles-clés pour essayer de comprendre l'origine de la minéralisation à la base du Cambrien.



## IV.4. LA COQUILLE DES MOLLUSQUES : DEVELOPPEMENT ET PHYSIOLOGIE

### a. Généralités

Depuis leur apparition Cambrienne, les mollusques ont colonisé à peu près tous les milieux, à l'exception du milieu aérien. Ils sont présents dans tous les environnements dits « extrêmes », domaine abyssal, milieux sub-désertiques chauds, environnements de type tundra, domaines de haute altitude, ce qui en dit long sur leur grande adaptabilité. Un élément essentiel du succès évolutif des mollusques repose sur la sécrétion d'une coquille externe, qui sert à la fois d'organe supportant les tissus mous et d'organe de protection contre la prédation, la dessiccation, ou les agressions chimiques.

La coquille des mollusques représente l'archétype d'une biominéralisation carbonatée produite à l'extérieur de tissus vivants. Contrairement à l'os, c'est un tissu « mort » non cellulaire. Cependant, sa capacité de remodelage est réelle, ainsi qu'en attestent les multiples expériences de réparation coquillière opérées sur des bivalves ou des gastéropodes (pour une revue récente, voir Fleury *et al.*, 2008), ou encore les cassures accidentelles, les perforations par des clones, ou les infestations par des bactéries qui colonisent la surface interne (Trinkler *et al.*, 2009). Un autre aspect du remodelage est illustré par la capacité des mollusques (en particulier les bivalves) à re-dissoudre très légèrement la dernière couche minérale déposée, et de réabsorber le calcium libéré. Ce mécanisme inverse de la calcification se produit lors des phases anaérobies (valves fermées), en période d'émersion par exemple.

### b. La coquille embryonnaire

La mise en place de la coquille intervient très tôt au cours du développement embryonnaire chez les mollusques. La coquille est d'origine ectodermique. Le développement embryonnaire des mollusques a été remarquablement synthétisé par Nielsen (2004), en ce qui concerne les premières étapes. Rappelons simplement que l'œuf fécondé des mollusques subit un clivage spirale (à l'exception des céphalopodes). Après la seconde division cellulaire, la cellule D produit, par division inégale, le micromère 2d, lequel donnera, après de multiples divisions, les cellules de la glande coquillière qui produiront la coquille embryonnaire. Ce schéma général connaît quelques exceptions, par exemple, la patelle pour laquelle la glande coquillière se développe à partir des micromères 2a et 2c (Dictus and Damen, 1997).

Chez les mollusques, le développement post-embryonnaire connaît deux modes possibles : un développement indirect : il représente la majeure partie des cas ; un développement direct, observable chez les céphalopodes. Le premier cas se caractérise par la formation d'une larve trochophore ciliée, nageuse ou pas, qui se transforme en larve véligère, qui possède un vélum. Cette larve se fixe, opère sa métamorphose (perte du vélum, développement du pied, organisation de la glande digestive et des organes reproducteurs) pour donner un individu juvénile ressemblant à un adulte (Bonar, 1976). Le stade véligère est typique des mollusques. Chez les gastéropodes, c'est durant cette étape qu'a lieu la torsion de 180° de la larve. Le second mode de développement est direct, sans aucun stade larvaire, ce qui implique que les formes juvéniles ressemblent à peu près à des adultes en réduction. La description suivante du développement de la coquille larvaire s'applique aux formes à développement indirect.

De manière simplifiée, les premières étapes de la formation de la coquille interviennent durant le stade trochophore. La coquille est produite par un groupe de cellules localisée du côté postérieur de la larve. Ces cellules définissent le champ coquillier (« shell field »,

Kniprath, 1981). Ces cellules s'invaginent selon différents modes, l'invagination produisant alors une glande coquillière transitoire la glande pré-conchilienne. Selon Kniprath, l'invagination a pour fonction de placer en contact les cellules à la périphérie de la glande, cellules qui n'ont pas été internalisées. Ces cellules vont produire la toute première membrane organique, support de la minéralisation. Ce sera le futur périostracum. A l'étape suivante, la glande coquillière s'aplatit graduellement par division mitotique ou a tendance à s'évagner, en même temps que le périostracum grandit. Entre le périostracum et les cellules coquillières, une première minéralisation se produit. C'est la prodissoconque I, chez les bivalves (Fig. 5), encore appelée protoconque I chez les gastéropodes. Pendant la transition trochophore/véligère, le régime sécrétoire change et la prodissoconque II (protoconque II) est produite. Le changement est marqué par l'apparition de lignes de croissance sur les valves. Suivant la métamorphose de la larve véligère, la dissoconque (téloconque chez les gastéropodes) est sécrétée. Jusqu'à la mort de l'animal, le régime sécrétoire ne change plus, et la coquille grandit par incréments.

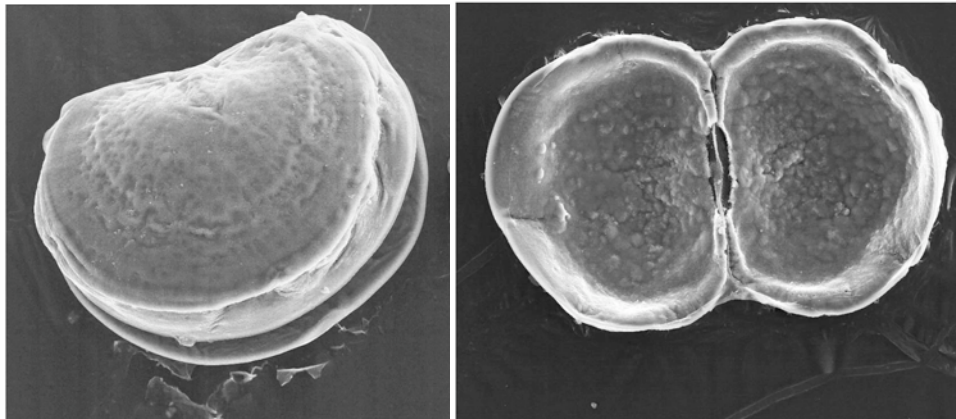


Fig. 5. Photos MEB de la larve véligère de *Mytilus galloprovincialis* (photos F. Marin, D. Medakovic). A gauche, larve en stade D avancé, dimension de la coquille environ 90  $\mu\text{m}$ . A droite, prodissoconque I en vue interne. La charnière est encore simple et peu développée.

Contrairement à d'autres modèles, tels que les échinodermes, le lien entre la physiologie du développement chez les mollusques et la machinerie génétique mise en place pour contrôler ce développement reste encore assez mal connu. On peut citer en particulier les papiers de Wray *et al.* (1995), Moshel *et al.* (1998), de Jacobs *et al.* (2000), de Wanninger et Haszprunar (2001), de Klerkx *et al.* (2001), de Nederbragt *et al.* (2002), de Hinman *et al.* (2003), et plus récemment, de Jackson *et al.* (2006) et de Wanninger *et al.* (2008). Certains de ces papiers soulignent le rôle-clé du gène *Engrailed* (*En*) dans le développement de la coquille chez les mollusques. Ce gène code un facteur de transcription (c'est à dire une protéine comportant un domaine qui se lie à l'ADN nucléaire, permettant d'activer la transcription en ARN). Chez les métazoaires, le gène *Engrailed* est impliqué notamment dans la neurogénèse, dans la segmentation du corps chez les annélides et les arthropodes (compartimentation), et dans d'autres fonctions dérivées (Hidalgo, 1996). Chez les larves de mollusques, *En* est fortement exprimé dans la glande coquillière du gastéropode *Ilyanassa* (Moshel *et al.*, 1998), dans les cellules qui bordent la protoconque chez le dentale *Antalis* (Wanninger and Haszprunar, 2001) ou encore dans une zone qui délimite les plaques calcifiées chez le chiton (Jacobs *et al.*, 2000). Le rôle de *En* reste mal compris : est-ce lui qui va définir et activer les cellules impliquées dans la squelettogénèse ? Ou bien, est-il seulement

impliqué dans la délimitation du compartiment calcifiant séparant les cellules de la glande coquillière et les autres cellules ectodermiques voisines ? La question n'est pour le moment pas tranchée. Selon Jacobs et al. (2000), *En* serait directement impliqué dans la squelettogenèse, non seulement chez les mollusques, mais également chez d'autres métazoaires. Ces auteurs y voient là un argument fort pour dire que l'acquisition d'un squelette chez les métazoaires, à la base du Cambrien, pourrait avoir été un évènement unique, expliquant en partie l'émergence de la minéralisation. Ce point de vue a été fortement contesté par Nederbragt et al. (2002), qui n'attribuent à *En* qu'un rôle périphérique – aux deux sens du terme - dans la minéralisation : *En* serait impliqué uniquement dans la délimitation du compartiment calcifiant.

D'autres gènes codant des protéines à homéodomaines sont également activés, lors du développement de la coquille larvaire (Wanninger *et al.*, 2008). Chez l'orveau, ce sont en particulier les gènes *Hox1* et *Hox4* (Hinman *et al.*, 2003). Ces 2 gènes sont exprimés à des moments différents, *Hox1*, étant exprimé durant le stade trochophore au niveau d'une zone annulaire délimitant la glande coquillière, tandis que *Hox4* est exprimé à un stade plus tardif, dans le manteau. *Hox4* semble avoir acquis une nouvelle fonction liée au développement de la coquille chez l'orveau. Par contre, il n'aurait plus aucun rôle dans la genèse du système nerveux, ce qui constituait sa fonction initiale chez les bilatériens. Chez la larve de patelle, une corrélation négative a été observée entre l'expression de *E32*, un gène codant pour une protéine se liant à l'ARN et sa localisation dans la larve, puisque ce gène est exprimé partout sauf dans la glande coquillière (Klerkx *et al.*, 2001).

Un autre aspect important de la formation de la coquille embryonnaire concerne l'activité enzymatique élevée, observée chez les larves trochophores et véligères, mais là encore, les données, parcellaires, n'ont été acquises que chez quelques modèles. Bien que déjà ancienne, l'étude sans doute la plus complète réalisée à ce jour est celle de Timmermans (1969) portant sur la limnée *Lymnea stagnalis*. Cet auteur a ainsi constaté que l'activité phosphatase alcaline (ALP) est la plus importante pendant l'évagination de la glande coquillière ; les expressions de la tyrosinase et de la peroxydase sont maximales sur le pourtour de la glande coquillière après évagination, dans la zone où est sécrétée la lame organique qui donnera le futur périostracum. Chez la moule commune *Mytilus*, l'activité anhydrase carbonique a été enregistrée durant tout le processus développemental (Medakovic, 2000). Rappelons que l'anhydrase carbonique est une enzyme-clé dans la minéralisation, car c'est elle qui catalyse l'hydratation du CO<sub>2</sub> en ion bicarbonate, précurseur de la calcification. Au stade gastrula, alors que l'embryon n'a pas encore commencé à minéraliser, une activité anhydrase carbonique importante a été observée, précédant la formation du domaine coquillier (shell field). De même, cette activité anhydrase carbonique précède la formation de la glande coquillière et du futur périostracum durant le stade trochophore, et la calcification de la prodissoconque I et II. Chez l'escargot d'eau douce *Biomphalaria glabrata*, une activité ALP a été observée au stade trochophore dans la glande coquillière, avant même toute minéralisation, tandis qu'une activité peroxydase a été enregistrée au niveau des cellules qui sécrètent le périostracum (Marxen *et al.*, 2003). Pour finir, un papier plus récent de Weiss *et al.* (2006) montre le rôle important de la chitine synthase lors du développement embryonnaire de la moule *Mytilus galloprovincialis*. Comme son nom l'indique, cette enzyme est impliquée dans la synthèse de chitine. C'est une glycosyltransférase transmembranaire. Par hybridation *in situ*, ces auteurs ont observé la localisation du transcrite codant la chitine synthase, durant tout le stade véligère, dans les cellules en contact avec la coquille larvaire.

### c. La coquille juvénile à adulte : considérations physiologiques

Bien que la calcification de la coquille soit très localisée au niveau de la bordure du manteau (Fig. 6), la minéralisation proprement dite se prépare bien en amont. Elle fait intervenir un métabolisme relativement complexe, dont les grandes lignes ont été ébauchées d'après des travaux déjà anciens, mais qui, dans le détail, demeure mal compris.

Dans le cas de mollusques marins ou d'eau douce, les ions précurseurs, calcium et bicarbonate, sont puisés dans le milieu aqueux et dans l'alimentation. Dans le cas de mollusques terrestres, seule l'alimentation contribue à fournir les ions calcium nécessaires à l'élaboration de la coquille. Dans le premier cas, ces ions sont absorbés au niveau de l'épithélium interne, des branchies ou du système digestif. Ils transitent dans les tissus connectifs du manteau par l'hémolymphe, le fluide interstitiel qui baigne les organes, et sont dirigés vers l'épithélium externe calcifiant (Istin, 1970).

Une particularité des mollusques concerne la possibilité qu'ils ont de stocker du calcium sous forme de granules amorphes, au niveau des tissus conjonctifs (Istin, 1970 ; Roinel *et al.*, 1973). Ces granules ont été décrits chez les formes terrestres comme *Helix* (Simkiss, 1980), ou marines, comme l'ormeau *Haliotis* (Fleury *et al.*, 2008). Ils sont visibles sur coupe histologique, après coloration au Von Kossa (Gabe, 1968). Ils peuvent être intracellulaires (Fournié et Chétail, 1982), ou extracellulaires, c'est à dire interstitiels (Istin et Girard, 1970 ; Istin et Masoni, 1973). Les granules amorphes offrent plusieurs avantages : ils constituent sous un volume compact une source de calcium importante, rapidement mobilisable, du fait de leur grande solubilité (Simkiss, 1993). Les granules sont notamment bien visibles lors de phénomènes de réparation coquillière (Fleury *et al.*, 2008), qui nécessitent des flux importants de calcium. Les granules jouent également un rôle dans les processus de détoxification cellulaire, en piégeant les métaux toxiques pour les cellules (Simkiss, 1977). La translocation du calcium sous forme de granules vers le site de minéralisation peut s'effectuer selon divers modes, encore mal décrits. Pour des granules intracellulaires, une redissolution suivie d'une extrusion massive vers le milieu extrapalléal par des pompes à calcium, ou bien un relargage direct par exocytose dans le fluide extrapalléal. Pour les granules interstitiels, deux mécanismes peuvent être invoqués, une redissolution, ou bien, une migration à travers des canaux trans-épithéliaux (Sud *et al.*, 2002).

La figure 6 décrit une coupe simplifiée d'un épithélium calcifiant d'un bivalve adulte en train de calcifier. L'ensemble peut être résumé par une succession de compartiments au travers desquels transitent les précurseurs minéraux ou organiques de la structure minéralisée. Ces compartiments sont respectivement le manteau et son épithélium calcifiant, le compartiment extrapalléal, et enfin la coquille. La notion de compartiment est sans doute réductrice, mais pratique.

Le manteau est un tissu polarisé comprenant un épithélium interne non calcifiant, mais producteur en abondance de mucus, une zone centrale constituée de tissus conjonctifs, de muscles palléaux, de fibres nerveuses, et enfin, un épithélium calcifiant externe, tourné vers la coquille en formation. En coupe, l'épithélium est constitué d'un alignement monocouche de cellules épithéliales à microvillosités typiques (Petit *et al.*, 1978), dans lequel s'intercalent sporadiquement des cellules productrices de mucus, les mucocytes ('globet cells'). L'extrémité du manteau est marquée par une succession de replis – trois chez les bivalves, seulement deux chez les gastéropodes – dont le plus externe individualise le sillon périostracal. Le sillon périostracal est tapissé, dans sa partie la plus interne, de cellules qui produisent le périostracum (Saleuddin and Petit, 1983). Des travaux relativement récents (Checa, 2000) montrent que, chez les bivalves unionidés, le périostracum peut être stratifié en 2 couches, la couche externe étant synthétisée dans le sillon périostracal, tandis que la couche interne est

sécrétée par l'épithélium du repli externe du manteau. Comme nous l'avons indiqué précédemment, le rôle premier du périostracum est de supporter la toute première minéralisation de la coquille, chez la larve trochophore. Son deuxième rôle consiste à isoler du milieu ambiant la zone dans laquelle a lieu la minéralisation de la coquille. C'est cette stratégie que les mollusques ont utilisé pour délimiter l'espace (cf. introduction) et individualiser le domaine extrapalléal. Son troisième rôle consiste à protéger la coquille de redissolutions, lorsque le milieu s'acidifie (Isaji, 1995). Finalement, le périostracum constitue une barrière efficace contre la colonisation de la coquille par des micro-organismes : des données récentes montrent en effet que le périostracum possède des propriétés anti-salissures ('anti-fouling' ; Bers *et al.*, 2006).

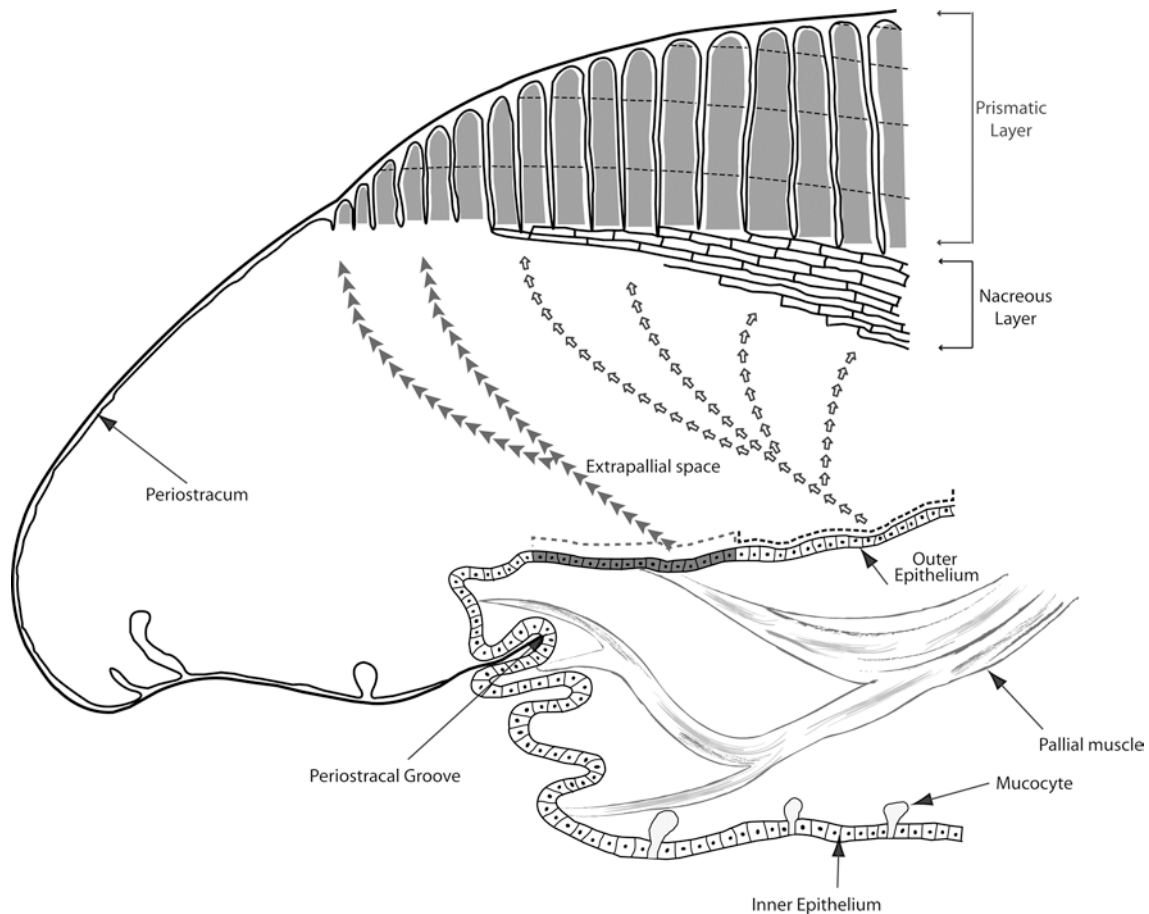


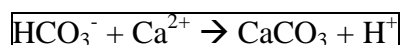
Fig. 6. Physiologie de la calcification chez un bivalve macro-prismatique (Marin *et al.*, 2008, adapté de Saleuddin and Petit, 1983). Un aspect important du modèle est la zonation des cellules épithéliales du manteau : certaines sont impliquées dans l'élaboration de la couche interne nacré, tandis que d'autres, plus périphériques (distales par rapport au crochet) synthétisent la matrice de la couche externe prismatique. Dans ce modèle, la minéralisation se produit dans l'espace extrapalléal. Cette vision est cependant controversée, car il est possible que les cellules épithéliales soient directement en contact avec la minéralisation en croissance.

Le périostracum forme une couche organique insoluble externe. Il persiste durant toute la vie de l'animal, chez la moule commune, ou bien peut être rapidement abrasé, chez la praire. Lors de sa production, il est sécrété sous forme d'un film liquide précurseur, qui se sclérotise très rapidement par un processus de tannage quinonique. (Saleuddin and Petit,

1983 ; Waite, 1983). Les précurseurs du périostracum ne sont pas connus, à l'exception d'une petite protéine soluble, et très instable, la périostracine dont les propriétés chimiques ont été décrites par Waite, *et al.* (1979). Cette protéine de masse moléculaire 20 kDa est fortement enrichie en résidus tyrosine et en DOPA (dihydroxy-L-phenylalanine). La DOPA est un acide aminé particulier, issu d'une modification post-traductionnelle de résidus tyrosine par ajout d'un groupement hydroxyl, sous l'action d'une enzyme, la tyrosine hydroxylase. Lors de la sécrétion, les résidus DOPA sont oxydés en quinone par une enzyme, la tyrosinase (encore appelée catéchol oxydase, ou encore phénoloxydase). Il s'ensuit une polymérisation par la formation de multiples liaisons covalentes intermoléculaires, aboutissant à une insolubilisation totale du précurseur (Waite, 1995), d'où cet aspect de « vieux cuir ».

Une autre caractéristique de l'épithélium calcifiant externe est qu'il présente une zonation depuis la bordure de la coquille vers le crochet (Fig. 6). Cette zonation semble corrélée à la microstructure de la coquille. Dans le cas présent, il s'agit d'un bivalve nacropismatique, comportant une couche prismatique externe, qui peut être soit calcitique chez les bivalves ptériomorphes, soit aragonitique, chez les bivalves paléohétérodontes. Cette couche repose sur le périostracum. La seconde couche, aragonitique nacrée, est en position interne. La zonation de l'épithélium, non détectable par simple coupe histologique, a été observée, à l'aide de marqueurs moléculaires, au niveau transcriptionnel, et au niveau protéique. Sudo *et al.* (1997) ont mis en évidence par HIS (hybridation *in situ*) que le transcrite codant une protéine coquillière, la MSI31, était exprimée dans la partie distale (par rapport au crochet), tandis qu'un autre transcrite codant la MSI60 était localisé plutôt en position proximale. Il semble donc qu'il existe des cellules distales chargées de synthétiser la matrice organique qui sera intégrée dans la couche prismatique externe, et des cellules proximales, chargées de synthétiser la matrice organique de couche nacrée. Cette observation a depuis été confirmée indépendamment, d'une part, par Milet *et al.* (2004) et Jolly *et al.* (2004) et d'autre part, par Takeuchi et Endo (2005). Dans ce dernier cas, ces auteurs ont utilisé plusieurs marqueurs transcriptionnels et montrent que certains d'entre eux sont spécifiques pour la couche prismatique, d'autres, pour la couche nacrée, tandis qu'une troisième catégorie code pour des protéines présentes dans les deux couches. Cette dernière observation de Takeuchi et Endo confirme aussi que les matrices associées aux prismes et à la nacre ne sont pas radicalement différentes, mais qu'elles ont en commun un certain nombre de macromolécules. De ce fait, elle confirme aussi une conclusion à laquelle étaient parvenus Weiner (1983) ou Marin *et al.* (1994), respectivement par chromatographie HPLC et par comparaison sérologique.

Dans la vision classique de la minéralisation de la coquille, l'épithélium calcifiant extrude les ions calcium, sous l'action de pompes à calcium membranaires, les Ca-ATPases. En parallèle sont sécrétés les ions bicarbonate par l'intermédiaire de bicarbonate-ATPases hypothétiques. Le même épithélium sécrète les constituants organiques qui seront ensuite intégrés dans la coquille. Ces constituants représentent la matrice organique coquillière. Ions précurseurs minéraux et constituants macromoléculaires organiques s'accumulent dans le second compartiment, l'espace extrapalléal. Dans cet espace se produit la cristallisation, selon l'équation suivante :



Comme on peut le constater, la réaction produit des protons  $\text{H}^+$ , qui acidifient le milieu. Afin que la réaction soit favorisée dans le sens 1, les protons doivent être soustraits au milieu. Des pompes à protons (H-ATPases) membranaires de l'épithélium ont pour rôle la réabsorption des protons produits. Chez les mollusques, ces pompes sont très peu documentées (Coimbra *et al.*, 1988). Il est possible également que ces pompes à protons

fonctionnent en sens inverse, induisant une acidose du milieu extrapalléal, donc une légère redissolution de la coquille (Moura *et al.*, 2003).

Le second compartiment décrit est l'espace extrapalléal. A bien des égards, cet espace reste une abstraction, une boîte noire. C'est le lieu où s'accomplit la transition d'une phase liquide, ou colloïdale vers une phase solide, et la chimie qui intervient lors de cette transition reste pour le moment mystérieuse. Dans une perspective « classique », cette transition est gouvernée par le fluide extrapalléal, censé remplir l'espace du même nom. Ce fluide a donné lieu à un nombre extrêmement réduit de caractérisations moléculaires. Une des raisons pratiques est sans doute à trouver dans les techniques de prélèvement. Pour avoir moi-même prélevé du fluide extrapalléal d'huîtres perlières, je trouve qu'il est difficile de s'abstraire des contaminants –tissus mous, bactéries et autres – qui peuvent polluer l'échantillonnage. Des compositions de fluides extrapalléaux ont néanmoins été publiées çà et là (Misogianes and Chasteen, 1979 ; Moura *et al.*, 2000). Ces compositions montrent que ce fluide est sursaturé vis-à-vis du carbonate de calcium, donc qu'il tend à précipiter spontanément du carbonate de calcium. Cela ne se produit manifestement pas, car, en fait, ce fluide contient également des inhibiteurs organiques et minéraux très efficaces (Wilbur and Bernhardt, 1984). Parmi les constituants organiques, on observe des acides aminés libres, des protéines, des glycosaminoglycanes, des hexosamines (Kobayashi, 1964 ; Pietrzak *et al.*, 1973 ; Misogianes and Chasteen, 1979 ; Moura *et al.*, 2000 ; Lopes-Lima *et al.*, 2005). Parmi les protéines, une seule a été identifiée de manière très précise, chez la moule comestible *Mytilus edulis*. Il s'agit de la protéine EP, caractérisée à la fois au niveau protéique (Hattan *et al.*, 2001) et transcriptionnel (Yin *et al.*, 2005). Cette petite protéine (masse 14 kDa), comprenant 213 acides aminés et un site de N-glycosylation, fixe le calcium. Elle est acide (8,5 et 12% d'acide aspartique et glutamique respectivement), mais surtout très enrichie en résidus histidine (plus de 14% de la séquence). Sa fonction n'est pas encore élucidée. Il semblerait toutefois qu'elle transporte le calcium, et qu'elle puisse se lier à des métaux lourds, servant ainsi à la détoxification cellulaire.

L'interface entre le domaine extrapalléal et la coquille est le lieu où la minéralisation s'auto-organise. On parle couramment de processus d'auto-assemblage (self-assembling process). C'est le lieu où les constituants matriciels organiques se structurent en une architecture tridimensionnelle supramoléculaire bien contrôlée, dans laquelle des agrégats nanoscopiques amorphes de carbonate de calcium s'associent, se réorganisent pour donner de véritables cristaux, lesquels croissent dans des directions privilégiées. La structure est ensuite scellée lorsque les minéraux arrivent à confluence. Les constituants organiques matriciels se retrouvent donc « piégés » dans le troisième compartiment du modèle de la Fig. 6, la coquille elle-même. Comme indiqué précédemment, la coquille est un tissu mort, qui est susceptible d'un léger remaniement durant les phases de métabolisme anaérobie, ou de réparation coquillière. La coquille constitue donc un matériau multicouche solide, composé principalement de carbonate de calcium, sous l'un et/ou l'autre de ses deux polymorphes les plus communs, la calcite ou l'aragonite. Ce matériau incorpore aussi des éléments mineurs (Mn, Sr, Fe, etc..) en proportions variables. La matrice organique ne représente qu'une faible fraction de la coquille, de 0,1 à 4-5% maximum. Ces quelques pourcents sont constitués de protéines, de glycoprotéines, de chitine, de polysaccharides acides, et peut-être d'un peu de lipides. L'adjonction d'une phase organique dans le carbonate de calcium modifie de manière drastique les propriétés mécaniques du carbonate. On cite souvent l'exemple de la nacre, dont la résistance à la fracture est mille à trois mille fois supérieure à celle d'une aragonite purement sédimentaire (Currey, 1980 ; Jackson *et al.*, 1988 ; Currey, 1999).

#### **d. Critique du modèle physiologique**

Le modèle classique, tel que présenté ici, offre un cadre général satisfaisant dans ses grandes lignes. A y regarder de près, il est éminemment critiquable, car il laisse d'importantes zones d'ombres à plusieurs niveaux.

- Le transfert du calcium à travers l'organisme: les études des flux de calcium, depuis son assimilation par les tissus jusqu'à son intégration dans la coquille, sont anciennes et reposent essentiellement sur des observations histologiques, par définition, non quantifiées. Un traçage précis des flux de calcium serait nécessaire. Par ailleurs, bien que souligné par plusieurs études, le rôle important des granules amorphes du tissu conjonctif dans le stockage transitoire du calcium est sans doute sous-estimé.

- La translocation des ions précurseurs de la minéralisation ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ) des cellules épithéliales vers l'espace extrapalléal reste mal comprise. En particulier, la machinerie membranaire nécessaire à l'extrusion des ions calcium (Ca-ATPases), des ions bicarbonate (bicarbonate-ATPases), puis à la réabsorption des protons (proton-ATPases) est plus pré-supposée que véritablement connue. Avec les quelques génomes de mollusques connus, il faudrait identifier les gènes correspondants et étudier la localisation et la répartition des protéines codées par ces gènes, au niveau des membranes des cellules épithéliales.

- Le modèle attribue un rôle clé à l'espace extrapalléal. Dans la vision proposée par la Fig.6, cela signifie qu'il y a un contrôle « à distance » de l'épithélium sur la minéralisation. Ce point de vue a été récemment critiqué par Addadi *et al.* (2006), pour lesquels il est envisageable que l'épithélium soit en contact étroit avec le front de minéralisation. Une telle disposition assurerait un guidage sûr des macromolécules responsables de la biominéralisation vers le site minéralisant, ainsi qu'un feed-back des biominéralisations néo-formées vers l'épithélium producteur.

- Le fluide extrapalléal pose également un certain nombre de questionnements, bien que, pour beaucoup, sa réalité ne fasse aucun doute. Par exemple, la protéine EP est une protéine majoritaire du fluide extrapalléal de la moule (56% de toutes les protéines de ce fluide). Elle a une composition remarquable où dominent les résidus histidine (Yin *et al.*, 2005). Or, cet acide aminé ne ressort jamais dans les analyses d'acides aminés effectuées sur la matrice coquillière (c'est un acide aminé très minoritaire). De plus, EP n'a, à ce jour, jamais été détectée directement dans la coquille de *Mytilus*. La signification de ceci est énigmatique. Est-il possible que, tout en contribuant à la minéralisation de la coquille, EP ne soit pas intégrée à celle-ci ? Si oui, cela tendrait à montrer que la construction de la coquille est en partie contrôlée par des protéines « silencieuses », « transitoires », qu'il est vain de chercher dans la coquille. Le travail récent de transcriptomique réalisé par Jackson *et al.* (2006) à partir d'EST (Expressed Sequence Tag) obtenus sur du manteau d'ormeau (*Haliotis asinina*) va dans ce sens. Ce travail montre en effet que beaucoup de nouvelles protéines, jamais identifiées jusqu'à présent, sont sécrétées par le manteau calcifiant. La plupart d'entre elles ne correspondent pas à la dizaine de protéines connues de coquille d'ormeau, telles qu'elles ont été répertoriées par Marin *et al.* (2008).

- Le modèle présenté ici considère comme acquis que la coquille chez les mollusques est l'archétype d'une biominéralisation contrôlée par un épithélium (Simkiss and Wilbur, 1989). De ce fait, il n'attribue aucun rôle aux hémocytes. Rappelons que les hémocytes sont des cellules qui circulent librement dans l'hémolymphe. Elles sont impliquées entre autres choses



dans les mécanismes de défense immunitaires (Glinski and Jarosz, 1997). Elles peuvent induire des réparations tissulaires, car elles possèdent la capacité de sécréter certains constituants des matrices extracellulaires : collagène, protéoglycanes, fibronectines, et facteurs de croissance de type IGF (Serpentini *et al.*, 2000). Leur rôle dans la minéralisation est documenté, en particulier lors de phases de réparations coquillières (Bubel *et al.*, 1977 ; Watabe, 1983). Dans un article provocant, Mount *et al.* (2004) ont suggéré que les hémocytes sont impliqués, non pas marginalement mais de manière massive, dans les phénomènes normaux de minéralisation de la coquille. Se basant sur des expériences de régénération coquillière chez l'huître *Crassostrea virginica*, ils ont observé notamment que des hémocytes de la classe des granulocytes contiennent des cristaux de calcite typiques, qu'ils sont capables de transporter sur le site de minéralisation. Là, les cristaux subissent un remodelage avant d'être intégrés au biominéral. Ces travaux très controversés ont le mérite de pointer le doigt sur le rôle des hémocytes, et sur le fait, qu'après tout, la coquille n'est peut-être pas uniquement une minéralisation contrôlée par un épithélium.

- Le modèle présenté Fig. 6 comporte des transitions discrètes : manteau/espace extrapalléal/coquille, correspondant à des états physiques très distincts : milieu cellulaire/liquide/solide. La réalité pourrait être tout autre, et l'on pourrait envisager une sorte de continuum depuis la barrière épithéliale jusque vers la coquille, surtout si la chimie mise en place n'est pas une chimie en solution aqueuse, mais une chimie réalisée dans un gel (j'aurai plus loin l'occasion de revenir sur ce point précis). De plus, dans le modèle, l'interface entre le domaine extrapalléal et la coquille n'est pas considérée. Or, c'est le lieu où l'auto-assemblage se produit. C'est le lieu où la minéralisation se réarrange, passant d'une phase amorphe à une phase cristalline aragonitique ou calcitique.

## **IV.5. LES PROTEINES DES COQUILLES DE MOLLUSQUE**

### **a. Caractérisation des protéines coquillères**

C'est au cours des années soixante et soixante-dix que la notion de matrice minéralisante (cf. chapitre III) a été forgée et que le concept de contrôle de la minéralisation par cette matrice est apparu. Durant les quatre dernières décennies, des efforts considérables ont donc été entrepris pour identifier et caractériser biochimiquement les différents constituants macromoléculaires des matrices coquillères, afin de comprendre leurs fonctions dans la minéralisation.

Dans la totalité des cas, la matrice a été analysée après extraction, par dissolution de la phase minérale. De ce fait, ce type d'approche détruit irrémédiablement toute information sur la structure supramoléculaire de la matrice, c'est à dire l'agencement des macromolécules entre elles. Jusqu'à aujourd'hui, les solvants les plus utilisés sont l'acide éthylène diamine tétracétique (EDTA), un chélateur de l'ion calcium, des acides faibles, tels que l'acide acétique ou l'acide formique, ou, plus rarement, un acide fort. Chaque solvant a ses avantages et inconvénients : l'EDTA est utilisé à pH neutre, donc ne dégrade pas les macromolécules. En revanche, il forme des complexes avec les macromolécules matricielles, et, par conséquent, est difficile à éliminer, même après des dialyses prolongées. De ce fait, il ne peut être employé lorsque les macromolécules extraites sont testées *in vitro* pour leur capacité à interagir avec le carbonate de calcium, car il interagit lui-même avec le carbonate de calcium. Les acides peuvent dégrader les macromolécules, si le pH est trop acide. En revanche, ils s'éliminent bien par dialyse, et donc, sont adaptés lorsque, en aval, la caractérisation des macromolécules extraites implique des tests d'interférence. Notre préférence se porte sur l'acide acétique dilué (5% vol./vol.), à froid (4°C), ajouté goutte à goutte par une burette électronique, sur une suspension de poudre à décarbonater. Par ce système, l'acide ajouté de manière très progressive est tamponné par la poudre de carbonate. Le pH ne descend jamais au dessous de 4. La décalcification s'effectue durant la nuit, le pH final est autour de 4,2, ce qui est bien moins acide que du jus de citron. Nous pensons que ce protocole longuement testé et éprouvé ne dégrade pas les constituants matriciels.

D'autres procédés d'extraction ont été utilisés, en particulier ceux qui utilisent des résines échangeuses d'ions (Albeck et al., 1996). Cependant, ces déminéralisations, très douces, sont excessivement longues, de l'ordre de la semaine. Quant aux extractions à l'eau (Pereira-Mouriès *et al.*, 2002), elles n'extraient que les fractions organiques les moins liées à la phase minérale, puisqu'elles ne s'accompagnent pas d'une déminéralisation de la poudre de carbonate. Ainsi, elles ne sont pas adaptées pour l'extraction des protéines très acides.

La décalcification individualise deux séries de composés organiques : ceux qui sont solubles en solution, et ceux qui ne le sont pas. Ces composés sont séparables par centrifugation. Dans la coquille, le ratio entre ces constituants peut varier de manière importante : ainsi, si 90% de la matrice organique de nacre de nautilus est insoluble, presque toute la matrice de la praire est soluble. Les composés insolubles font l'objet de caractérisations limitées, comme par exemple, une analyse de leur composition en acides aminés, après hydrolyse totale dans un acide fort. Les composés insolubles peuvent aussi être partiellement solubilisés par des solvants chaotropiques tels que l'urée, le tampon de Laemmli, voire le thiocyanate de guanidinium. L'extrait soluble, qui contient les sels issus de la décalcification, peut être concentré, puis longuement dialysé avant analyse. La fraction soluble peut ensuite être fractionnée selon des techniques chromatographiques classiques :

perméation sur gel, échange d'ion, interactions hydrophobes, HPLC sur gradient de sel ou en phase organique, etc... Cependant, ces techniques classiques en biochimie, qui fonctionnent pour la plupart des protéines, s'avèrent bien souvent assez inopérantes pour les matrices coquillières. En effet, ces matrices sont constituées de protéines non globulaires, polydisperses, ayant de nombreuses charges anioniques. Ces protéines sont en outre glycosylées ou phosphorylées. Ces difficultés techniques, inhérentes au matériel analysé, ont été le cauchemar des biochimistes des matrices, pendant plus de deux décennies. Ceci explique notamment pourquoi les toutes premières données de séquences partielles de protéines de coquille n'ont été publiées qu'en 1991 (Rusenko *et al.*, 1991), et qu'il aura fallu attendre 1996 pour voir publiée la première séquence complète d'une protéine de nacre, la nacréine (Miyamoto *et al.*, 1996).

En l'absence de fractionnement chromatographique performant, la technique de séparation qui convient le mieux pour ce type de matériel est l'électrophorèse sur gel d'acrylamide, en conditions dénaturantes, en présence de SDS et  $\beta$ -mercaptoéthanol. C'est par cette technique que les résultats les plus probants sont obtenus et que l'on peut visualiser sur gel le contenu de la matrice acido-soluble ou Laemmli-soluble. Cependant, la technique électrophorétique connaît elle-même un certain nombre de limitations, que nous avons décrites dans un article de revue (Marin et Luquet, 2007) : beaucoup de protéines coquillières ne colorent pas au Bleu de Coomassie du fait qu'elles contiennent très peu - voire pas du tout - d'acides aminés aromatiques ou basiques; d'autres donnent des colorations négatives au nitrate d'argent ; enfin, la plupart ont une migration anormale, due aux charges négatives et aux modifications post-traductionnelles. Les données de masse moléculaire apparente peuvent s'écarter de la valeur de masse réelle.

L'analyse des protéines de matrice coquillière a bénéficié de deux apports majeurs : d'une part, les techniques de micro-séquençage, et d'autre part, l'intrusion massive des techniques de biologie moléculaire. Concernant le micro-séquençage, la technique s'est améliorée au cours des années 90. A partir de faibles quantités de protéines transférées sur membranes (jusqu'à la picomole), ou éluées de gels d'acrylamide, le micro-séquençage a permis l'acquisition de séquences N-terminales, C-terminales ou internes, permettant le développement de sondes oligonucléotidiques pour identifier le transcrite codant la protéine d'intérêt. Concernant les techniques de biologie moléculaire, elles ont fait progresser le domaine de la biominéralisation de manière significative. Sur la cinquantaine de séquences de protéines de coquilles obtenues à ce jour, 90% le sont par biologie moléculaire, par R-PCR, ou par immuno-criblage ou criblage oligonucléotidique. Seules, quelques séquences ont été obtenues par séquençage direct de la protéine. Avec les approches de type « EST » et les approches génomiques, le nombre de protéines obtenues devrait croître de manière exponentielle au cours des prochaines années.

### **b. Les protéines coquillières : diversité**

A l'heure actuelle, les protéines de coquille de mollusques connues par leur séquence forment un ensemble assez hétérogène, qu'il est difficile de subdiviser simplement en sous-groupe. Certaines protéines forment une véritable « famille » : tel est le cas des shematrines, KRMP, Asprich, N14/N16/pearline, mais beaucoup d'entre elles sont uniques : MSI60, mucoperline, perlwapine, perlucine, lustrine A, prismaline 14, etc...

J'ai pris le parti de représenter ces protéines sur un graphe  $pI/MW$ , où  $MW$  représente la masse moléculaire calculée de chaque protéine, et  $pI$ , son point isoélectrique théorique,

c'est à dire la valeur de pH pour laquelle la charge globale est électriquement neutre. Ces deux paramètres ont été calculés d'après les séquences sur le site Expasy ([http://www.expasy.ch/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html)). Ce sont des valeurs théoriques. Au préalable, nous avons pris soin d'ôter les peptides-sigaux (<http://www.cbs.dtu.dk/service/SignalP/>) utilisés pour l'exportation des protéines en domaine extracellulaire (en général, de 15 à 25 acides aminés en extrémité N-terminale). Cette représentation est tout à fait arbitraire. Elle ne tient pas compte des modifications post-traductionnelles (glycosylations, phosphorylations, qui peuvent modifier de manière drastique les propriétés de charge de ces protéines. Elle a cependant le mérite de représenter la position de chaque protéine sur un « gel bidimensionnel théorique ».

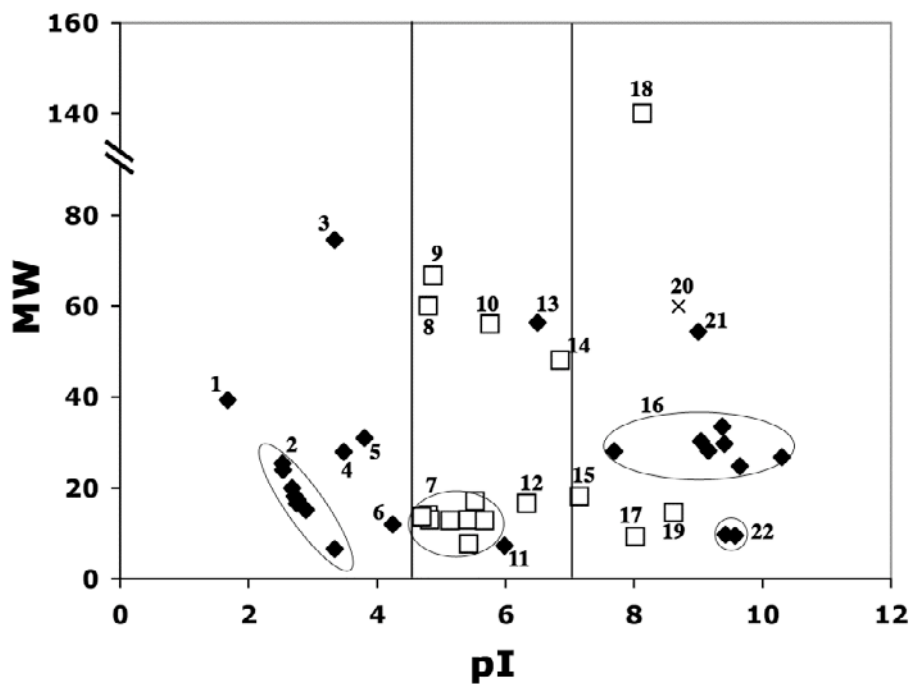


Fig. 7. Répartition des protéines coquillières en fonction de leur masse moléculaire calculée et de leur point isoélectrique théorique (Marin *et al.*, 2008). Losanges noirs : protéines associées à la calcite. Carrés blancs : protéines associées à l'aragonite. 1 : aspéine ; 2 : famille Asprich ; 3 : MSP-1 ; 4 : MSP-2 (ou SP-S) ; 5 : MSI31 ; 6 : prismaticine-14 ; 7 : N14/N16/pearline/perline, masquant AP7 et AP24 ; 8 : MSI60 ; 9 : mucoperline ; 10 : nacréine de *P. fucata* ; 11 : MSI7 ; 12 : dermatopontine ; 13 : Tyrosinase-like1 ; 14 : nacréine de *T. marmoratus* ; 15 : perlucine ; 16 : famille des shematrines ; 17 : perlustrine ; 18 : lustrine A ; 19 : perlwapine ; 20 : N66 ; 21 : Tyrosine-like2 ; 22 : famille des KRMP.

Dans la représentation de la Fig.7, les protéines sont largement dispersées dans le plan : selon l'axe x, elles sont comprises entre 1,7 (aspéine) et plus de 10 (shematrine 7). Selon l'axe y, elles sont comprises entre 6,6 (Asprich1) et 140 kDa (lustrine A). On peut néanmoins tenter de les grouper en sous-ensembles, selon l'un ou l'autre des paramètres considérés : ainsi, en fonction des masses moléculaires, la distribution des protéines est bimodale, avec un premier paquet de protéines de masse inférieure à 30-35 kDa, et un second paquet, de masse supérieure à 50 kDa, avec, entre les deux, un trou. Si l'on groupe ces protéines selon leur point isoélectrique, on peut établir 3 sous-ensembles : les protéines, très acides, dont le pI théorique est inférieur à 4,5 ; les protéines faiblement acides à neutre, dont le pI est compris entre 4,5 et 7 ; et finalement, les protéines basiques, à pI supérieur à 7.

En assignant à chaque protéine la microstructure et la minéralogie de la couche minéralisée dont elle est extraite ou à laquelle elle est supposée appartenir, une observation remarquable saute aux yeux : les protéines associées à la calcite se divisent en deux paquets distincts : elles sont soit très acides ( $pI < 4,5$ ), soit très basiques ( $pI > 9$ , sauf la shematrine 5). En revanche, les protéines associées à la nacre aragonitique sont faiblement acides à faiblement basiques, et occupent par conséquent une position centrale dans le graphe. La raison de cette partition est inconnue. Curieusement, elle rappelle une l'observation de Hare (1963) sur la plus grande acidité des matrices associées aux prismes. Dans mon travail de thèse, j'avais fait une remarque analogue, en analysant séparément les couches prismatiques et nacrées des bivalves périomorphes *Pinna nobilis* et *Pinctada margaritifera* (Marin, 1992, p 89-93). J'avais d'ailleurs corrélié cette propriété à la capacité supérieure des matrices solubles extraites de prismes d'inhiber la précipitation de carbonate de calcium *in vitro*, par rapport aux matrices extraites de nacre.

Les protéines qui ont été assez bien caractérisées au niveau de leur structure primaire sont regroupées dans les trois tableaux qui suivent (Table 4-6). Les protéines très acides forment un groupe assez homogène, comprenant les dix membres d'une famille, Asprich, ainsi que quelques protéines éparses, telles que MSP-1, MSP-2 (encore appelée SP-S), MSI31, et enfin, l'aspéine et la prismaline 14. Ces protéines se singularisent par des teneurs élevées en acide aspartique, et, dans une moindre mesure, en sérine. Les protéines modérément acides sont également représentées par une famille homogène de protéines de faible masse moléculaire, N14/N16/pearline/perline, et un groupe hétérogène de protéines dissemblables, telles que la dermatopontine, la mucoperline, MSI7, AP7, AP24, une tyrosinase, MSI60, et la nacréine, la première protéine identifiée à ce jour. Dans le chapitre suivant, je parlerai plus spécifiquement de la mucoperline. Finalement, le troisième groupe comprend des protéines basiques. Ce groupe a constitué la surprise de ces dernières années, puisque le modèle classique de biominéralisation de la coquille ne les avait absolument pas prises en compte. Ce groupe comprend la populaire lustrine A, la N66, une tyrosinase, la perlucine, la perlustrine, la perlinhibine, la perlwapine, et deux groupes de protéines très basiques, les KRMP (K-rich matrix proteins) et les shematrines.

A la suite des trois tableaux montrant les protéines à structure primaire connue, la table 7 liste certaines des protéines coquillières partiellement caractérisées. Dans le chapitre V suivant, je présenterai deux d'entre elles, la caspartine et la calprismine, toutes deux extraites et purifiées des prismes calcitiques de *Pinna nobilis*. Certaines des protéines partiellement caractérisées ont été bien identifiées par diverses techniques biochimiques, d'autres ne sont connues que par des fragments de séquences, d'autres encore, purifiées à partir de coquilles, n'ont pas été séquencées. Enfin, des homologues de protéines de coquilles connues (par exemple, la dermatopontine) ont été identifiés par des techniques de biologie moléculaire et des séquences partielles sont disponibles. Rien cependant n'indique que ces protéines sont exprimées dans la coquille ou simplement dans le manteau. Quant aux protéines épithéliales, qui pourraient éventuellement être des composants de la matrice coquillière, je les ai volontairement exclues de cette liste : elles font aussi l'objet de la revue publiée l'année dernière (Marin *et al.*, 2008).

	Protein Name	Species	Microstructure (polymorph)	MW (kDa)	pI (% Asp + Glu)	Swiss-Prot/TrEMBL Accession Number	Reference
	Aspein	<i>Pinctada maxima</i>	Prisms (calcite)	39.3/41.2	1.67 (61.9)	Q76K52	Tsunamoto <i>et al.</i> , 2004
	MSI31	"	Prisms (calcite)	32.85/31	3.8 (14)	O02401	Sudo <i>et al.</i> , 1997
	Prismalin-14	<i>Pinctada fucata</i>	Prisms (calcite)	11.9/13.5	4.24 (10.5)	Q6F4C6	Suzuki <i>et al.</i> , 2004
B	MSP-1	<i>Patinopecten yessoensis</i>	Foliated (calcite)	74.6/76.4	3.34 (22.8)	Q95YF6	Sarashina and Endo, 1998, 2001
I	MSP-2/SP-S	"	Foliated (calcite)	27.9/29.8	3.48 (22.3)	Q6BC34	Hasegawa and Uchiyama, 2005
V	Asprich protein 1	<i>Atrina rigida</i>	Prisms (calcite)	6.6/8.5	3.34 (50.8)	Q5Y821	Gotliv <i>et al.</i> , 2005
A	Asprich protein 2	"	"	15/17	2.89 (52.8)	Q5Y822	"
L	Asprich protein 3	"	"	16.5/18.4	2.75 (60)	Q5Y823	"
V	Asprich protein 4	"	"	18/19.9	2.73 (56.2)	Q5Y824	"
I	Asprich protein 5	"	"	17.4/19.3	2.76 (57.5)	Q5Y825	"
A	Asprich protein 6	"	"	18.2/20	2.72 (59.2)	Q5Y826	"
	Asprich protein 7	"	"	25.8/23.9	2.54 (66.2)	Q5Y827	"
	Asprich protein 8	"	"	25.3/27.2	2.53 (65.1)	Q5Y828	"
	Asprich protein 9	"	"	18.2/20	2.72 (59.2)	Q5Y829	"
	Asprich protein 10	"	"	20/21.8	2.68 (60)	Q5Y830	"

Table 4. Protéines très acides des coquilles de mollusques (Marin *et al.*, 2008).

Protein Name	Species	Microstructure (polymorph)	MW (kDa)	pI (% Asp + Glu)	Swiss-Prot/TrEMBL Accession Number	Reference
<b>B</b> NI4	<i>Pinctada maxima</i>	Nacre (aragonite)	13.7/16.4	4.8 (15.8)	Q9NL39	Kono <i>et al.</i> , 2000
<b>I</b> Nacrein	<i>Pinctada fucata</i>	Nacre (aragonite)	48.2/50.1	6.85	Q27908	Miyamoto <i>et al.</i> , 1996
<b>V</b> NI16/Pearlin	"	Nacre (aragonite)	12.8/15.4	5.14 (16.9)	O97048	Samata <i>et al.</i> , 1999; Miyashita <i>et al.</i> , 2000
<b>V</b> MSI60	"	Nacre (aragonite)	61.7/60	4.8 (5.9)	O02402	Sudo <i>et al.</i> , 1997
<b>A</b> MSI7	"	Prisms (calcite)	7.3/9.3	5.98 (2.6)	Q7YWA5	Zhang <i>et al.</i> , 2003
<b>L</b> Tyrosinase-like prot. 1	"	"	56.3/58.3	6.5 (9.3)	A11HF0	Nagai <i>et al.</i> , 2007
<b>V</b> Perlone	<i>Pinctada margaritifera</i>	Nacre (aragonite)	13.6/16.2	4.7 (15.8)	Q14WA6	Montagnani, 2006 (submission author)
<b>V</b> Mucoperlin	<i>Pinna nobilis</i>	Nacre (aragonite)	65.4/66.7	4.87 (9.5)	Q9BKM3	Marin <i>et al.</i> , 2000
<b>G</b> AP7	<i>Haliotis rufescens</i>	Nacre (aragonite)	7.6/9.9	5.43 (12.1)	Q9BP37	Michenfelder <i>et al.</i> , 2003
<b>A</b> AP24	"	Nacre (aragonite)	17/19.6	5.53 (13.6)	Q9BP38	"
<b>S</b> Nacrein	<i>Turbo marmoratus</i>	Nacre (aragonite)	56/57.6	5.76 (10.7)	Q8NOR6	Miyamoto <i>et al.</i> , 2003
<b>T</b> Dermatopontin	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Crossed-lamellar (aragonite)	16.6 (no s.p.)	6.33 (10.8)	P83553	Marxen <i>et al.</i> , 2003

Table 5. Protéines modérément acides des coquilles de mollusques (Marin *et al.*, 2008).

Protein Name	Species	Microstructure (polymorph)	MW (kDa)	pI	Swiss-Prot/TREMBL Accession Number	Reference
NG6	<i>Pinctada maxima</i>	Nacre (aragonite) + Prisms (calcite)	59.8/62.4	8.66	JC7210	Kono <i>et al.</i> , 2000
	<i>Pinctada fucata</i>	Prisms (calcite)	30.3/31.9	9.04	Q1MW96	Yano <i>et al.</i> , 2006
B	"	"	33.4/35.3	9.37	Q1MW95	"
I	"	"	29.7/31.4	9.41	Q1MW94	"
V	"	"	28.2/30.2	9.16	Q1MW93	"
A	"	"	28.0/30.2	7.69	Q1MW92	"
L	"	"	24.8/26.5	9.65	Q1MW91	"
V	"	"	26.8/28.4	10.3	Q1MW90	"
I	"	"	9.5/11.5	9.6	Q1AGW0	Zhang <i>et al.</i> , 2006
A	"	"	9.8/11.8	9.4	Q1AGV9	"
	"	"	9.8/11.8	9.4	Q1AGV8	"
	"	"	54.4/56.5	9.	A1IHF1	Nagai <i>et al.</i> , 2007
G	<i>Haliois rufescens</i>	Nacre (aragonite)	140/142.2	8.13	O44341	Shen <i>et al.</i> , 1997
A	<i>Haliois laevigata</i>	Nacre (aragonite)	9.3 (no s. p.)	8.02	P82595	Weiss <i>et al.</i> , 2001
S	"	"	18.2 (no s. p.)	7.15	P82596	Mann <i>et al.</i> , 2000
T	<i>Periwain</i>	"	14.5 (no s. p.)	8.62	P84811	Treccani <i>et al.</i> , 2006

Table 6. Protéines basiques des coquilles de mollusques (Marin *et al.*, 2008).



A- Partial sequence(s)	Protein Name	Species	Microstructure	Features	Swiss-Prot Acc. Number	Reference
	Nacrein-like protein	<i>Pinctada fucata</i>	Nacre (aragonite)	415 aa	A0ZSF2	Norizuki, M. (submission author)
	W/SM peptides	<i>Pinctada margaritifera</i>	Nacre (aragonite)	repeats of Q/KGGG/L or Q/KGAG/L		Bédouet <i>et al.</i> , 2006
	p20	<i>Pinctada maxima</i>	Nacre (aragonite)	21 (N-ter sequence)		Bédouet <i>et al.</i> , 2001
<b>B</b>	Nacrein-like protein P1	"	"	421 aa	A0ZSF3	"
<b>I</b>	Nacrein-like protein P2	<i>Patinopecten yessoensis</i>	"	331 aa	A0ZSF4	"
<b>V</b>	Nacrein-like protein C1	"	"	430 aa	A0ZSF5	"
	Nacrein-like protein C2	<i>Crassostrea nippona</i>	"	340 aa	A0ZSF6	"
<b>A</b>	RP-1 fraction	"	"	415 aa	A0ZSF7	"
<b>L</b>	RP-1 fraction	<i>Crassostrea virginica</i>	Foliated (calcite)	59 aa (6 internal fragments)		Rusenko <i>et al.</i> , 1991; Donachy <i>et al.</i> , 1992
<b>V</b>	Caspartin	<i>Adamussium colbecki</i>	Foliated (calcite)	34 aa (6 internal fragments)		Halloran and Donachy, 1995
<b>I</b>	Calprismin	<i>Pinna nobilis</i>	Prisms (calcite)	62 aa; 17 kDa (SP); putative polyD-domain		Marin <i>et al.</i> , 2005
<b>A</b>	P12, P16	"	Prisms (calcite)	61 aa; 38 kDa (SP)	P83631	Weiner, 1983
	45-, 21 & 5-kDa proteins	<i>Mytilus californianus</i>	Prisms (calcite)	D-P-T-D repeats in the 2 proteins		Keith <i>et al.</i> , 93
	55-, 20 & 15-kDa proteins	<i>Mytilus edulis</i>	Prisms (calcite) + nacre (aragonite)	N-ter seq.: 13 aa (45 kDa); 14 aa (5 kDa)		"
<b>C</b>	60-, 32 & 12-kDa proteins	<i>Atrina vexillum</i>	Nacre (aragonite)	N-ter seq.: 30 aa (21 kDa)	Q9TWS3	Zhao <i>et al.</i> , 2003
<b>E</b>		<i>Nautilus pompilius</i>	Nacre (aragonite)	15 aa (20 kDa); 6 aa (15 kDa)		Zhao <i>et al.</i> , 2003
<b>G</b>	Dermatopontin2	<i>Satsuma japonica</i>	Crossed-lamellar (aragonite)	51 aa *	Q50K83	Sarashina <i>et al.</i> , 2006
<b>A</b>	Dermatopontin1	"	"	98 aa *	Q50K84	"
<b>S</b>	Dermatopontin2	<i>Mandarina aureola</i>	"	64 aa *	Q50K85	"
<b>T</b>	Dermatopontin1	"	"	64 aa *	Q50K86	"
<b>R</b>	Dermatopontin2	<i>Euhadra peliomphala</i>	"	64 aa *	Q50K87	"
<b>O</b>	Dermatopontin1	<i>Euhadra amatiae</i>	"	51 aa *	Q50K88	"
<b>P</b>	Dermatopontin2	<i>Euhadra herklotsi</i>	"	98 aa *	Q50K89	"
<b>D</b>	Dermatopontin1	"	"	64 aa *	Q50K90	"
<b>A</b>	Dermatopontin2	<i>Euhadra brandtii</i>	"	56 aa *	Q50K91	"
	Dermatopontin1	"	"	51 aa *	Q50K92	"
	Dermatopontin2	<i>Biomphalaria glabrata</i>	"	118 aa *	Q50K93	"
	Dermatopontin3	"	"	129 aa *	Q50K94	"
	Dermatopontin2	<i>Lymnea stagnalis</i>	"	129 aa *	Q50K95	"
	Dermatopontin1	"	"	109 aa *	Q50K96	"
<b>B- No sequence</b>	ACL S40	<i>Strombus decorus persicus</i>	Crossed-lamellar + prisms (aragonite)	40 kDa (SP); 25 aa (2 internal fragments)		Pokroy <i>et al.</i> , 2006
<b>I</b>	P10	<i>Atrina rigida</i>	Nacre (aragonite)	aragonite-nucleating protein		Gotliv <i>et al.</i> , 2003
<b>V</b>	Periostracin	<i>Pinctada fucata</i>	Nacre (aragonite)	10 kDa (SP)		Zhang <i>et al.</i> , 2006
<b>G</b>	AP8	<i>Mytilus edulis</i>	Periostracum	20 kDa (SP); 55% Gly		Waite <i>et al.</i> , 1979
<b>A</b>	61 kDa protein	<i>Haliois rufescens</i>	Nacre (aragonite)	AP8- $\alpha$ (8.7 kDa; SP); AP8- $\beta$ (7.8 kDa; SP)		Fu <i>et al.</i> , 2005
		<i>Biomphalaria glabrata</i>	Crossed-lamellar (aragonite)	61.2 kDa (SP); 11 aa		Marxen and Becker, 1997

Table 7. Protéines de coquilles de mollusques partiellement caractérisées (Marin *et al.*, 2008).

### c. Quelques remarques sur les protéines de coquille

En quelques années (depuis 1996), le nombre de protéines associées aux coquilles de mollusques a crû de manière exponentielle, et il y a peu de raison de penser que cette tendance fléchisse, surtout avec l'utilisation de techniques combinées de protéomique et de transcriptomique. Malgré cela, notre connaissance reste extrêmement parcellaire, dans la mesure où la plupart des protéines ont été identifiées à partir de quelques modèles biologiques : l'huître perlière chez les bivalves, l'ormeau, chez les gastéropodes, ces deux genres concentrant 90% des données moléculaires. Pis encore, beaucoup de ces protéines n'ont été identifiées qu'au niveau transcriptionnel et la démonstration de leur présence effective dans la coquille reste à faire. Parmi les protéines identifiées à la fois dans la coquille et au niveau transcriptionnel, citons la nacréine, N14-N16, la prismaline 14, la dermatopontine, la mucoperline, et finalement AP7 et AP24, et c'est tout. Notons cependant que les récents travaux de Benjamin Marie en protéomique ont permis d'annoter comme protéines coquillières huit EST, qui avaient été identifiés précédemment dans le manteau de l'ormeau *Haliotis asinina* (cf. chapitre VI). Une approche combinant la protéomique et la transcriptomique permettra rapidement d'identifier des protéines de coquille avérées.

Les fonctions des protéines coquillières restent mal cernées, dans la mesure où des recherches d'homologie avec des protéines aux fonctions connues ne donnent rien. En effet, à l'exception de la protéine coquillière de *Biomphalaria glabrata* dont la totalité de la séquence s'aligne avec des dermatopontines, les autres protéines coquillières ne s'alignent que très partiellement, ce qui est une indication de leur architecture modulaire. Cette propriété est souvent observée chez les protéines de la matrice extracellulaire (Patthy, 1999). En général, il y a coïncidence entre un module et une fonction donnée. Certains modules sont clairement identifiés : les 2 domaines de type anhydrase carbonique qui flanquent le domaine riche en glycine de la nacréine, le domaine « lectine de type C » de la perlucine, le domaine de type IGF-BP de la perlustrine. La conséquence de cette architecture modulaire est que la plupart des protéines coquillières listées sont probablement multifonctionnelles.

Les protéines coquillières dont les masses moléculaires sont les plus élevées présentent des séquences répétées. C'est notamment le cas de la mucoperline dont le domaine central « mucin-like » est constitué d'une succession de 13 unités répétées de 31 acides aminés chacune. C'est aussi le cas de MSI31, qui comprend 6 motifs XSEEDX mis bout à bout. D'autres protéines montrent une alternance répétée de domaines. C'est le cas de la lustrine pour laquelle deux domaines successifs, l'un riche en proline, l'autre, riche en cystéine, sont répétés 8 fois.

Une autre caractéristique remarquable des protéines de coquille est leur composition en acides aminés, largement dominée par un, deux ou quelques résidus. La conséquence est que la composition de ces protéines dévie largement de la composition « moyenne », calculée par McCaldon and Argos (1988). Sont particulièrement représentés la glycine, l'acide aspartique, la sérine, et dans une moindre mesure l'asparagine, la tyrosine, l'alanine, la proline, la cystéine, et la leucine. En revanche, sont sous-représentés l'histidine, le tryptophane, la phénylalanine, la méthionine, la glutamine. Les résidus correspondant à des acides aminés dominants ne sont pas dispersés le long de la séquence, mais sont concentrés dans certains domaines, qualifiés alors de domaines de faible complexité. Ces acides aminés constituent alors de courts motifs répétés : GGYGXX (shematrines-4 et 5), GGGGVI (shematrine-3), GS (MSP-1), GN (nacréine). De manière fréquente, un seul type d'acide aminé peut former un « bloc » : motifs poly-acide aspartique de la MSP-1, motifs poly-alanine de la MSI60. De tels domaines de faible complexité sont le cauchemar du bioinformaticien, car, en pratique, ils sont peu exploitables pour des alignements de séquences : le fait que 2

séquences de faible complexité s'alignent ne traduit en aucun cas une quelconque proximité phylétique.

Dans la vision standard des protéines coquillères, vision héritée des analyses d'acides aminés des années 60 à 80, les protéines insolubles sont hydrophobes, tandis que les protéines solubles sont hydrophiles. Les unes contiennent en abondance des acides aminés à radicaux aliphatiques (alanine), tandis que les autres sont enrichies en acides aminés à radicaux acides (acide aspartique). Un examen des séquences de la MSI31, supposée être une protéine insoluble, montre que cette dichotomie est sans doute à revoir, car cette protéine présente un domaine hydrophobe, riche en glycine, dans sa partie N-terminale, et un domaine acide, beaucoup plus hydrophile, dans sa partie C-terminale. Nous verrons également dans le chapitre VI consacré à la nacre que des protéines de la matrice insoluble ont des fragments tryptiques identiques à ceux de protéines de matrice soluble. Cela montre une fois de plus qu'il n'y a pas une limite tranchée entre matrice soluble et matrice insoluble.

#### **d. Mécanismes moléculaires d'évolution des matrices coquillères**

L'organisation en modules des protéines des matrices calcifiantes coquillères évoque irrésistiblement une construction en « Meccano », c'est à dire le raboutage de domaines qui n'ont *à priori* rien à voir entre eux, mais dont l'association permet l'émergence d'une nouvelle fonction inédite. On n'est pas loin du bricolage génétique (« genetic tinkering ») cher à François Jacob. L'architecture modulaire des protéines coquillères suggère fortement qu'elles ont été construites par recombinaison d'exons (« exon shuffling »). C'est un mécanisme moléculaire qui a été mis en évidence pour de nombreuses protéines de matrices extracellulaires (Eickbush, 1999; Patthy, 1996; 1999; 2003; Kolkman and Stemmer, 2001). Ce mécanisme implique une duplication de gènes et le réarrangement des exons du (des) gène(s) dupliqués, créant ainsi de nouvelles fonctions à partir de fonctions pré-existantes. Pour le moment, rien n'indique que ce mécanisme ait prévalu et cette hypothèse reste à tester. On estime que la probabilité de recombinaison d'exon est forte lorsqu'il y a concordance entre les limites d'un exon et celles d'un domaine protéique fonctionnel.

Un cas intéressant, presque un cas d'école, est fourni avec la shematrine 2 et la MSI31, deux protéines qui ont été déduites du séquençage de leurs transcrits respectifs. Dans leur partie N-terminale, ces deux protéines sont homologues à 98%. Cependant, leurs extrémités C-terminales sont complètement différentes : celle de la shematrine 2 est très basique, tandis que celle de la MSI31 est extrêmement acide. Dans le premier cas, un domaine basique peut servir d'ancrage aux protéines acides. Dans le second cas, un domaine acide est plutôt impliqué dans la nucléation cristalline. S'il s'avère que ces différences ne sont pas dûes à une erreur de séquençage (une base « oubliée », impliquant un décalage du cadre de lecture), alors on peut invoquer plusieurs « scénarios » pour passer de l'une à l'autre protéine. La première explication est la recombinaison d'exons, expliquée plus haut. La seconde explication est, suivant la duplication du gène, l'insertion, dans un des gènes issus de cette duplication, d'une ou de quelques bases introduisant un décalage de lecture. On pourrait aussi invoquer un épissage alternatif, conduisant tantôt à la MSI31, tantôt à la shematrine 2. Clairement, ces hypothèses devront être testées.

## **e. Quelles origines pour les protéines coquillières ?**

Cette question est au cœur de notre recherche depuis une décennie. Clairement, elle nous renvoie à « l'événement Cambrien », encore qualifié d'« explosion Cambrienne ». L'apparition de la biominéralisation chez les métazoaires reste l'un des aspects les plus marquants de cet événement, en tout cas l'un des plus visibles...

Dans le paragraphe IV.3 (« origine des mollusques »), nous avons vu que le phylum est représenté à la base du Cambrien Inférieur, et sans doute plus tôt, si l'on admet *Kimberella* comme un mollusque, et si l'on donne crédit aux reconstructions moléculaires des phases de radiation (Douzery, *et al.*, 2004 ; Peterson *et al.*, 2004). Le fait que l'embranchement commence à minéraliser au Cambrien Inférieur implique que l'événement minéralisant a été postérieur à la phase de différenciation du phylum.

Pour expliquer comment la calcification de la coquille des mollusques – et plus généralement la minéralisation – est apparue, deux scénarios extrêmes peuvent être invoqués. D'un côté, la minéralisation a été héritée de fonctions ancestrales, qui n'avaient initialement rien à voir avec la minéralisation (Marin *et al.*, 2003). On parlera alors d'exaptation, pour reprendre la terminologie inventée par Gould et Vrba (1982). Dans ce cas, la minéralisation n'est rien moins que le recrutement et l'orchestration de fonctions pré-existantes. Ce scénario est celui de la parcimonie. De l'autre côté, on peut aussi imaginer que la minéralisation est apparue de manière indépendante dans chacun des phylums, et pourquoi pas, dans chaque classe d'un même phylum. Dans ce cas, des homologies au niveau moléculaire traduiraient non pas une origine commune, mais des convergences adaptatives. Après tout, les contraintes physiques liées à la minéralisation (nucléation, inhibition de croissance) sont les mêmes quels que soient les organismes calcifiants. Examinons les arguments en faveur de chacun des scénarios.

### **e.1. Le scénario de l'héritage Protérozoïque**

Divers arguments plaident en faveur d'un scénario de ce type.

- La calcification chez les métazoaires a été précédée par une phase durant laquelle les outils de régulation du calcium intracellulaire ont été mis en place (Lowenstam and Margulis, 1980). Rappelons que l'ion calcium occupe une position-clé dans la cellule. C'est un messenger secondaire, impliqué dans de nombreux processus physiologiques, tels que la contraction musculaire, la sécrétion, ou l'adhésion cellulaire. Ces processus sont tellement fondamentaux et universels qu'ils n'ont pu être mis en place que très tôt au cours de l'évolution biologique. Cela qui signifie que la machinerie intracellulaire « manipulant » le calcium était déjà là, bien avant la minéralisation. On peut donc imaginer qu'une partie de cette machinerie a été détournée, ou cooptée pour la production de minéraux à l'extérieur de la cellule. En particulier, les protéines intracellulaires liant le calcium en grande quantité mais avec une faible affinité (type calséquestrine) ont pu être « externalisées » pour devenir des constituants de matrice coquillière. Il en est sans doute de même pour les protéines à fonction anhydrase carbonique. Dans le chapitre V (§V.5), nous verrons que l'idée « d'externalisation d'une fonction ancestrale » est assez consistante.
- Lors de comparaisons sérologiques réalisées à partir d'anticorps élaborés contre des matrices calcifiantes, de nombreuses réactivités croisées inter-phylum ont été observées : vertébré à échinodermes (Veis *et al.*, 1986), échinodermes à prochordés (Lambert and Lambert, 1996), mollusques à brachiopodes (Marin, données non publiées). Bien que ces réactivités croisées puissent être fortuites et ne correspondre à aucune homologie véritable, elles pourraient aussi être la traduction de la conservation d'épitopes ayant une origine unique.

- En 94-95, j'avais fait des comparaisons immunologiques et biochimiques entre mucus et matrices calcifiantes chez deux bivalves (*Mercenaria mercenaria*, *Mytilus edulis*) et un scléactiniaire (*Galaxea fascicularis*). Mes résultats montraient de nombreuses similitudes entre ces deux produits de sécrétion (Marin *et al.*, 1996). Nous avons alors imaginé le scénario de l'anti-calcification. Dans un contexte de sursaturation des océans Néo-Protérozoïques (Knoll *et al.*, 1993), des substances de type mucus auraient servi de sécrétions protectrices contre le risque d'encroûtement des tissus épithéliaux. Ils auraient ainsi été utilisés comme inhibiteurs. A la transition Protérozoïque/Cambrien, ces mêmes inhibiteurs auraient été recrutés pour une autre fonction, la « domestication » de la minéralisation. Ils auraient ainsi été utilisés comme constituants de la matrice calcifiante.
- La bioactivité de la nacre de mollusque dans les processus de réparation osseuse est aussi un argument fort montrant que les deux systèmes, vertébrés et mollusques, utilisent les mêmes molécules signalisatrices pour la minéralisation (Westbroek and Marin, 1998). Il existe un corpus bibliographique d'importance obtenu à la fois *in vivo* et sur des lignées cellulaires (Lopez *et al.*, 1992 ; Atlan *et al.*, 1997 ; Liao *et al.*, 1997 ; Liao *et al.*, 2000 ; Liao *et al.*, 2002). La matrice de nacre contient un facteur bioactif (Almeida *et al.*, 2001), capable d'induire la différenciation de lignées préostéoblastiques (Rousseau *et al.*, 2003). Ce facteur, toujours non identifié à ce jour, pourrait être de type BMP (Bone Morphogenetic Protein). Le mécanisme invoqué est la transduction de signal : libéré dans le milieu, le facteur bioactif peut se fixer sur des récepteurs membranaires de cellules ostéoblastiques ou pré-ostéoblastiques, et activer la cascade de réactions intracellulaires conduisant à la synthèse de la matrice extracellulaire constitutive des os, incluant le collagène et les « NCP » (non collagenous proteins). Ces expériences montrent sans ambiguïté que le système de signalisation cellulaire pour la calcification est sans doute antérieur à la séparation protostomes/deutérostomes.
- Finalement, l'analyse des séquences connues de protéines coquillières (Tables 4 à 6) plaide pour l'ancienneté de certains domaines. C'est notamment le cas des domaines anhydrase carbonique, trouvés chez la nacréine et la N66. La nacréine en particulier se comporte comme une enzyme, même si son activité est moindre que celles de vraies anhydrases carboniques. Cela prouve que s'il y a eu cooptation d'une fonction, celle-ci a été conservée. La forte homologie des deux domaines anhydrase carbonique de la nacréine avec une vraie anhydrase carbonique humaine (CA II) est fascinante, car elle suggère, une fois de plus, que ces domaines ont été hérités du stock commun précédant la séparation protostome/deutérostome. Au vu de l'importance de la fonction anhydrase carbonique pour le fonctionnement cellulaire, en particulier pour le maintien de l'équilibre acide-base, il paraît fort peu probable que les domaines anhydrase carbonique de la nacréine et ceux de vertébrés aient été inventés indépendamment.

## **e.2. Le scénario des inventions indépendantes et/ou d'évolution rapide**

Des arguments forts plaident pour une grande plasticité des systèmes calcifiants, ce qui peut signifier, soit une dérive génétique importante qui ne permet pas de retracer le signal de départ, soit des apparitions indépendantes des « outils calcifiants » dans chacun des phylums.

- En particulier, l'analyse du génome de l'oursin *Strongylocentrotus purpuratus* a permis d'identifier les gènes codant les protéines de la matrice calcifiante (Wilt *et al.*, 2003 ; Livingston *et al.*, 2006). Ces gènes, au nombre de 16, sont organisés en « clusters » dans le génome. Ils n'ont pas leur homologue chez les vertébrés, ni chez d'autres deutérostomes. De manière symétrique, les gènes codant les protéines des os et dents chez les vertébrés n'ont

pas leur équivalent chez *S. purpuratus*. Ceci tend à prouver que ces deux phylums, pourtant phylogénétiquement proches, ont inventé indépendamment leurs outils minéralisants.

- Chez les mollusques, l'approche transcriptomique réalisée par Jackson *et al.* (2006 ; 2007) sur l'ormeau *Haliotis asinina* va également dans le sens d'une évolution rapide des outils minéralisants. Ces auteurs ont identifié des EST (Expressed Sequence Tag) codant des protéines sécrétées par le manteau. En comparant ces transcrits avec ceux connus chez la patelle *Lottia scutum*, ils ont constaté avec surprise que la plupart des transcrits ne sont pas homologues. 19% seulement des protéines sécrétées de l'ormeau se retrouvent chez la patelle, ce qui suggère fortement que les protéines matricielles de coquilles sont beaucoup plus variables (et moins contraintes évolutivement parlant) que ce que l'on pouvait attendre.
- Sarashina *et al.* (2006) ont étudié la distribution de la dermatopontine, une protéine coquillière identifiée chez un gastéropode d'eau douce, *Biomphalaria glabrata* (Marxen *et al.*, 2003) chez plusieurs espèces de gastéropodes terrestres et d'eau douce. Leur reconstitution phylogénétique indique que le recrutement de la dermatopontine comme protéine de matrice coquillière s'est sans doute produit deux fois, dans deux lignées différentes, et ceci, de manière totalement indépendante.
- Enfin, les travaux réalisés par Kawasaki *et al.* (2004) et par Kawasaki et Weiss (2006) sur la famille des SCPP (Secretory Calcium-binding PhosphoProteins) indiquent que tous les membres de cette famille, incluant trois protéines de l'émail dentaire, cinq protéines de dentines, la caséine du lait, et des protéines salivaires, dérivent d'un même gène ancestral par duplication, mais que ces protéines ont dérivé, en particulier la caséine du lait, dont la fonction n'a plus rien à voir avec la calcification. Ces auteurs montrent une situation *a priori* paradoxale : la grande pérennité (stabilité évolutive) des systèmes minéralisants étudiés (dents) alors même que la machinerie génétique qui contrôle ces structures minéralisées a extrêmement dérivé. Nous verrons, dans le chapitre VI qu'il pourrait en être de même pour la nacre chez les mollusques.

A la lueur de ce qui a été exposé ci-dessus, ma position sur le sujet est nuancée : d'un côté, il me semble que pour un certain nombre de fonctions, le scénario de l'héritage Protérozoïque tient la route, notamment en ce qui concerne des fonctions essentielles telles que la fonction anhydrase carbonique. D'un autre côté, on ne peut exclure que certains outils ou certaines fonctions ont été mis en place « *de novo* » et de manière indépendante, dans chaque phylum minéralisant, et que, à l'intérieur de chaque phylum, ces fonctions ou outils moléculaires ont pu être recrutés ou perdus plusieurs fois.

## **f. Références bibliographiques**

- Addadi, L., Joester, D., Nudelman, F., and Weiner, S. (2006). Mollusk shell formation: a source of new concepts for understanding biomineralization processes. *Chem. Eur. J.* **12**, 980-987.
- Aguinaldo, A. M. A., Turbeville, J. M., Linford, L. S., Rivera, M. C., Garey, J. R., Raff, R. A., and Lake, J. A. (1998). Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature* **387**, 489-493.
- Albeck, S., Weiner, S., and Addadi, L. (1996). Polysaccharides of intracrystalline glycoproteins modulate calcite crystal growth *in vitro*. *Chem. Eur. J.* **2**, 278-284.
- Almeida, M. J., Pereira, L., Milet, C., Haigle, J., Barbosa, M., and Lopez, E. (2001). Comparative effect of nacre water-soluble matrix and dexamethasone on the alkaline phosphatase activity of MRC-5 fibroblasts. *J. Biomed. Mater. Res.* **57**, 306-312.
- Atlan, G., Balmain, N., Berland, S., Vidal, B., and Lopez, E. (1997). Reconstruction of human maxillary defects with nacre powder: histological evidence for bone regeneration. *C. R. Acad. Sci. Paris* **320**, 253-258.

- Ayala, F. J., Rzhetsky, A., and Ayala, F. J. (1998). Origin of the metazoan phyla: molecular clocks confirm paleontological estimates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 606-611.
- Bédouet, L., Schuller, M. J., Marin, F., Milet, C., Lopez, E., and Giraud, M. (2001). Soluble proteins of the nacre of the giant oyster *Pinctada maxima* and of the abalone *Haliotis tuberculata*: extraction and partial analysis of nacre proteins. *Comp. Biochem. Physiol. B* **128**, 389-400.
- Bédouet, L., Rusconi, F., Rousseau, M., Duplas, D., Marie, A., Dubost, L., Le Ny, K., Berland, S., Péduzzi, J., and Lopez, E. (2006). Identification of low molecular weight molecules as new components of the nacre organic matrix. *Comp. Biochem. Physiol. B* **144**, 532-543.
- Bers, A. V., D'Souza, F., Klijnsma, J. W., Willemsen, P. R., and Wahl, M. (2006). Chemical defence in mussels: antifouling effect of crude extracts of the periostracum of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Biofouling* **22**, 251-259.
- Bonar, D. B. (1976). Molluscan metamorphosis: a study in tissue transformation. *Amer. Zool.* **16**, 573-591.
- Bourlat, S. J., Nielsen, C., Economou, A. D., and Telford, M. J. (2008). Testing the new animal phylogeny: a phylum level molecular analysis of the animal kingdom. *Mol. Phylogenet. Evol.* **49**, 23-31.
- Bubel, A., Moore, M. N., and Lowe, D. (1977). Cellular responses to the shell damage in *Mytilus edulis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **30**, 1-27.
- Checa, A. (2000). A new model for periostracum and shell formation in Unionidae (Bivalvia, Mollusca). *Tissue Cell* **32**, 405-416.
- Coimbra, J., Machado, J., Fernandes, P. L., Ferreira, H. G., and Ferreira, K. G. (1988). Electrophysiology of the mantle of *Anodonta cygnea*. *J. Exp. Biol.* **140**, 65-88.
- Currey, J. D. (1980). Mechanical properties of mollusc shell. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **34**, 75-97.
- Currey, J. D. (1999). The design of mineralised hard tissues for their mechanical functions. *J. Exp. Biol.* **202**, 3285-3294.
- Dictus, W. J. A. G., and Damen, P. (1997). Cell-lineage and clonal-contribution map of the trochophore larva of *Patella vulgata*. *Mech. Dev.* **62**, 213-226.
- Donachy, J. E., Drake, B., and Sikes, C. S. (1992). Sequence and atomic-force microscopy analysis of a matrix protein from the shell of the oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol.* **114**, 423-428.
- Douzery, E. J. P., Snell, E. A., Baptiste, E., Delsuc, F., and Philippe, H. (2004). The timing of eukaryotic evolution: does a relaxed molecular clock reconcile proteins and fossils? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 15386-15391.
- Douzery, E. J. P., Delsuc, F., and Philippe, H. (2006). Les datations moléculaires à l'heure de la génomique. *Med. Sci. (Paris)* **22**, 374-380.
- Eickbush, T. (1999). Exon shuffling in retrospect. *Science* **283**, 1465-1467.
- Fedonkin, M. A., and Waggoner, B. M. (1997). The Late Precambrian fossil *Kimberella* is a mollusc-like bilaterian organism. *Nature* **388**, 868-871.
- Feng, W., Mu, X. N. and Kouchinsky, A. V. (2001). Hyolith-type microstructure in a mollusc-like fossil from the Early Cambrian of Yunnan, China. *Lethaia* **34**, 305-309.
- Feng, W., and Sun, W. (2003). Phosphate replicated and replaced microstructure of molluscan shells from the earliest Cambrian of China. *Acta Palaeontol. Pol.* **48**, 21-30.
- Fleury, C., Marin, F., Marie, B., Luquet, G., Thomas, J., Josse, C., Serpentine, A., and Lebel, J. M. (2008). Shell repair process in the green ormer *Haliotis tuberculata* : a histological and microstructural study. *Tissue Cell* **40**, 207-218.
- Fournié, J., and Chétail, M. (1982). Accumulation calcique au niveau cellulaire chez les mollusques. *Malacologia* **22**, 265-284.
- Fu, G., Valiyaveetil, S., Wopenka, B., and Morse, D. E. (2005). CaCO<sub>3</sub> biomineralization: an acidic 8-kDa proteins isolated from aragonitic abalone shell nacre can specifically modify calcite crystal morphology. *Biomacromolecules* **6**, 1289-1298.
- Gabe, M. (1968). Techniques histologiques. Editions Masson & C<sup>ie</sup>. Paris.
- Glaessner, M. F., and Daily, B. (1959). The geology and Late Precambrian fauna from the Ediacara fossil reserve. *Record of the South Australian Museum* **13**, 369-401.
- Glinski, Z., and Jarosz, J. (1997). Molluscan immune defenses. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **45**, 149-55.
- Gotliv, B.-A., Kessler, N., Sumerel, J. L., Morse, D. E., Tuross, N., Addadi, L., and Weiner, S. (2005). Asprich: a novel aspartic acid-rich protein family from the prismatic shell matrix of the bivalve *Atrina rigida*. *ChemBiochem.* **6**, 304-314.
- Gould, S. J., and Vrba, E. S. (1982). Exaptation - a missing term in the science of form. *Paleobiology* **8**, 4-15.
- Haas, W. (1981). Evolution of calcareous hardparts in primitive molluscs. *Malacologia* **21**, 403-418.
- Halanych, K. M., Bacheller, J. D., Aguinaldo, A. M., Liva, S. M., Hillis, D. M., and Lake, J. A. (1995). Evidence from 18S ribosomal DNA that the lophophorates are protostome animals. *Science* **266**, 1641-1643.
- Halloran, B. A., and Donachy, J. E. (1995). Characterization of organic matrix macromolecules from the shell of the Antarctic scallop, *Adamussium colbecki*. *Comp. Biochem. Physiol. B* **111**, 221-231.

- Hare, P. E. (1963). Amino acids in the proteins from aragonite and calcite in the shells of *Mytilus californianus*. *Science* **139**, 216-217.
- Hasegawa, Y., and Uchiyama, K. (2005). cDNA cloning of shell matrix proteins from scallop shell. *Fish. Sci.* **71**, 1174-1178.
- Haszprunar, G., Schander, C., and Halanych, K. M. (2008). Relationships of higher molluscan taxa. In "Phylogeny and Evolution of the Mollusca" (W. F. Ponder and D. R. Lindberg, Eds.), pp 19-32. University of California Press, Berkeley.
- Hattan, S. J., Laue, T. M., and Chasteen, N. D. (2001). Purification and characterization of a novel calcium-binding protein from the extrapallial fluid of the mollusc, *Mytilus edulis*. *J. Biol. Chem.* **276**, 4461-4468.
- Hidalgo, A. (1996). The roles of engrailed. *Trends Genet.* **12**, 1-4.
- Hinman, V. F., O'Brien, E. K., Richards, G. S., and Degnan, B. M. (2003). Expression of anterior Hox genes during larval development of the gastropod *Haliotis asinina*. *Evol. Dev.* **5**, 508-521.
- Isaji, S. (1995). Defensive strategies against shell dissolution in bivalves inhabiting acidic environments: the case of *Geloina* (Corbiculidae) in mangrove swamps. *The Veliger* **38**, 235-246.
- Istin, M. (1970). Rôle du manteau dans le métabolisme du calcium chez les lamellibranches. *Bull. Inform. Sci. Tech. CEA* **144**, 53-80.
- Istin, M., and Girard, J. P. (1970). Carbonic anhydrase and mobilisation of calcium reserves in the mantle of lamellibranches. *Calcif. Tissue. Res.* **5**, 247-260.
- Istin, M. and Masoni, A. (1973). Absorption et redistribution du calcium dans le manteau des lamellibranches en relation avec la structure. *Calcif. Tiss. Res.* **11**, 151-162.
- Jackson, A. P., Vincent, J. F. V. and Turner, R. M. (1988). The mechanical design of nacre. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **234**, 415-440.
- Jackson, D. J., McDougall, C., Green, K., Simpson, F., Wörheide, G., and Degnan, B. M. (2006). A rapidly evolving secretome builds and patterns a sea shell. *BMC Biology* **4**, 40-49.
- Jackson, D. J., Wörheide, G., and Degnan, B. M. (2007). Dynamic expression of ancient and novel molluscan shell genes during ecological transitions. *BMC Evol. Biol.* **7**, 160-177.
- Jacobs, D. K., Wray, C. G., Wedeen, C. J., Kostriken, R., DeSalle, R., Staton, J. L., Gates, R. D., and Lindberg, D. R. (2000). Molluscan *engrailed* expression, serial organization, and shell evolution. *Evol. Dev.* **2**, 340-347.
- Jell, P. A. (1980). Earliest known pelecypod on Earth – a new Early Cambrian genus from South Australia. *Alcheringa* **4**, 233-239.
- Jolly, C., Berland, S., Milet, C., Borzeix, S., Lopez, E., and Doumenc, D. (2004). Zonal localization of shell matrix proteins in mantle of *Haliotis tuberculata* (Mollusca, Gastropoda). *Mar. Biotechnol.* **6**, 541-551.
- Kawasaki, K., and Weiss, K. M. (2006). Evolutionary genetics of vertebrate tissue mineralization: the origin and evolution of the secretory calcium-binding phosphoprotein family. *J. Exp. Zool.* **306B**, 295-316.
- Kawasaki, K., Suzuki, T., and Weiss, K. M. (2004). Genetic basis for the evolution of vertebrate mineralized tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 11356-11361.
- Keith, J., Stockwell, S., Ball, D., Remillard, K., Kaplan, D., Thannhauser T., and Sherwood, R. (1993). Comparative analysis of macromolecules in mollusc shells. *Comp. Biochem. Physiol. B* **105**, 487-496.
- Klerkx, A. H. E., de Boer, E., and van Loon, A. E. (2001). Spatio-temporal expression of a gene encoding a putative RNA-binding protein during the early development of the mollusc *Patella vulgate*. *Dev. Genes Evol.* **211**, 423-427.
- Kniprath, E. (1981). Ontogeny of the molluscan shell field. *Zoologica Scripta* **10**, 61-79.
- Knoll, A. H., Fairchild, I. J., Swett, K. (1993). Calcified microbes in Neoproterozoic carbonates: implications for our understanding of the Proterozoic/Cambrian transition. *Palaios* **8**, 512-525.
- Kobayashi, I. (1964). Introduction to the shell structure of bivalved molluscs. *Earth Sci.* **73**, 1-12.
- Kolkman, J. A., and Stemmer, W. P. (2001). Directed evolution of proteins by exon shuffling *Nat. Biotechnol.*, **19**, 423-428.
- Kono, M., Hayashi, N., and Samata, T. (2000). Molecular mechanism of the nacreous layer formation in *Pinctada maxima*. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **269**, 213-218.
- Kouchinsky, A. (2000). Shell microstructures in early Cambrian molluscs. *Acta Palaeontol. Pol.* **45**, 119-150.
- Lambert, G., and Lambert, C. C. (1996). Antibodies to echinoid larval spicule proteins cross react with the spicular complex in the ascidian *Herdmania momus*. *Bull. Inst. Océanogr. Monaco* **14** (4), 253-261.
- Lecointre, G., and Le Guyader, H. (2001). Classification Phylogénétique du Vivant. 2<sup>ème</sup> édition, Belin, Paris.
- Liao, H., Brandsten, C., Lundmark, C., Wurtz, T., and Li, J. (1997). Response of bone to titania-hydroxyapatite composite and nacreous implants: a preliminary comparison by *in situ* hybridization. *J. Mater. Sci.-Mater. M.* **8**, 823-827.
- Liao, H., Mutvei, H., Sjöström, M., Hammarström, L., and Li, J. (2000). Tissue response to natural aragonite (*Margaritifera* shell) implants *in vivo*. *Biomater.* **21**, 457-468.



- Liao, H., Mutvei, H., Hammarström, L., Wurtz, T., and Li, J. (2003). Tissue response to nacreous implants in rat femur: an *in situ* hybridization and histochemical study. *Biomater.* **23**, 2693-2701.
- Livingston, B. T., Killian, C. E., Wilt, F., Cameron, A., Landrum, M. J., Ermolaeva, O., Sapojnikov, V., Maglott, D. R., Buchanan, A. M., and Etensohn, C. A. (2006). A genome-wide analysis of biomineralization-related proteins in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev Biol.* **300**, 335-48.
- Lopes-Lima, M., Ribeiro, I., Pinto, R. A., and Machado, J. (2005). Isolation, purification and characterization of glycosaminoglycans in the fluids of the mollusc *Anodonta cygnea*. *Comp. Biochem. Physiol. A* **141**, 319-326.
- Lopez, E., Vidal, B., Berland, S., Camprasse, S., Camprasse, G., and Silve, C. (1992). Demonstration of the capacity of nacre to induce bone formation by human osteoblasts maintained *in vitro*. *Tissue Cell* **24**, 667-679.
- Lowenstam, H. A., and Margulis, L. (1980). Evolutionary prerequisites for early Phanerozoic calcareous skeletons. *Biosystems* **12**, 27-41.
- Mann, K., Weiss, I. M., André, S., Gabius, H. J., and Fritz, M. (2000). The amino acid sequence of the abalone (*Haliotis laevigata*) nacre protein perlucin. *Eur. J. Biochem.* **267**, 5257-5264.
- Marek, L., and Yochelson, E. L. (1964). Paleozoic mollusk: Hyolithes. *Science* **146**, 1674-1675.
- Marin, F. (1992). Essai de caractérisation chromatographique et immunologique des constituants organiques associés aux biocristaux carbonates des squelettes de mollusques, cnidaires et spongiaires. Thèse de 3ème cycle, Université de Paris-Sud-Orsay, 16 Mars 1992.
- Marin, F., and Luquet, G. (2007). Unusually acidic proteins. In "Handbook of Biomineralization", Vol. 1, (E. Bäuerlein, Ed.), pp. 273-290. Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- Marin, F., Muyzer, G. & Dauphin, Y. (1994). Caractérisation électrophorétique et immunologique des matrices organiques solubles de deux Bivalves Ptériomorphes actuels, *Pinna nobilis* L. et *Pinctada margaritifera* (L.). *C. R. Acad. Sci. Paris II* **318**, 1653-1659.
- Marin, F., Smith, M., Isa, Y., Muyzer, G., and Westbroek, P. (1996). Skeletal matrices, mucin, and the origin of invertebrate calcification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 1554-1559.
- Marin, F., Corstjens, P., De Gaulejac, B., De Vrind-De Jong, E., and Westbroek, P. (2000). Mucins and molluscan calcification: molecular characterization of mucoperlin, a novel mucin-like protein from the nacreous shell layer of the fan mussel *Pinna nobilis* (Bivalvia, Pteriomorpha). *J. Biol. Chem.* **275**, 20667-20675.
- Marin, F., layrolle, P., De Groot, K., and Westbroek, P. (2003). The Origin of metazoan skeleton. In "Biomineralization: Formation, Diversity, Evolution and Application" (I. Kobayashi, and H. Osawa, Eds.), pp. 50-53. Tokai University Press, Kanagawa.
- Marin, F., Amons, R., Guichard, N., Stigter, M., Hecker, A., Luquet, G., Layrolle, P., Alcaraz, G., Riondet, C., and Westbroek, P. (2005). Caspartin and calprism, two proteins of the shell calcitic prisms of the Mediterranean fan mussel *Pinna nobilis*. *J. Biol. Chem.* **280**, 33895-33908.
- Marin, F., Pokroy, B., Luquet, G., Layrolle, P., and De Groot, K. (2007). Protein mapping of calcium carbonate biominerals by immunogold. *Biomaterials* **28**, 2368-2377.
- Marin, F., Luquet, G., Marie, B., and Medakovic, D. (2008). Molluscan shell proteins : primary structure, origin, and evolution. *Curr. Top. Dev. Biol.*, **80**, 209-276.
- Marxen, J. C., and Becker, W. (1997). The organic shell matrix of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. *Comp. Biochem. Physiol. B* **118**, 23-33.
- Marxen, J. C., Becker, W., Finke, D., Hasse, B., and Epple, M. (2003). Early mineralization in *Biomphalaria glabrata*: microscopic and structural results. *J. Moll. Stud.* **69**, 113-121.
- Marxen, J. C., Nimtz, M., Becker, W., and Mann, K. (2003). The major soluble 19.6 kDa protein of the organic shell matrix of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* is an N-glycosylated dermatopontin. *Biochim. Biophys. Acta* **1650**, 92-98.
- McCaldon, P., and Argos, P. (1988). Oligopeptide biases in protein sequences and their use in predicting protein coding regions in nucleotide sequences. *Proteins* **4**, 99-122.
- Medakovic, D. (2000). Carbonic anhydrase activity and biomineralization process in embryos, larvae and adult blue mussels *Mytilus edulis* L. *Helgol. Mar. Res.* **54**, 1-6.
- Michenfelder, M., Fu, G., Lawrence, C., Weaver, J. C., Wustman, B. A., Taranto, L., Evans, J. S., and Morse, D. E. (2003). Characterization of two molluscan crystal-modulating biomineralization proteins and identification of putative mineral binding domains. *Biopolymers* **70**, 522-533. Erratum in *Biopolymers* (2004) **73**, 291.
- Milet, C., Berland, S., Lamghari, M., Mouries, L., Jolly, C., Borzeix, S., Doumenc, D., and Lopez, E. (2004). Conservation of signal molecules involved in biomineralization control in calcifying matrices of bones and shell. *C. R. Palevol.* **3**, 493-501.
- Misogianes, M. J., and Chasteen, N. D. (1979). A chemical and spectral characterization of the extrapallial fluid of *Mytilus edulis*. *Anal. Biochem.* **100**, 324-334.

- Miyamoto, H., Miyashita, T., Okushima, M., Nakano, S., Morita, T., and Matsushiro, A. (1996). A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9657-9660.
- Miyamoto, H., Yano, M., and Miyashita, T. (2003). Similarities in the structure of nacrein, the shell-matrix protein, in a bivalve and a gastropod. *J. Mollusc. Stud.* **69**, 87-89.
- Miyashita, T., Takagi, R., Okushima, M., Nakano, S., Miyamoto, H., Nishikawa, E., and Matsushiro, A. (2000). Complementary DNA cloning and characterization of pearlins, a new class of matrix protein in the nacreous layer of oyster pearls. *Mar. Biotechnol.* **2**, 409-418.
- Moshel, S. M., Levine, M., and Collier, J. R. (1998). Shell differentiation and *engrailed* expression in the *Ilyanassa* embryo. *Dev. Genes Evol.* **208**, 135-141.
- Mount, A. M., Wheeler, A. P., Paradkar, R. P., and Snider, D. (2004). Hemocyte-mediated mineralization in the eastern oyster. *Science*, **304**, 297-300.
- Moura, G., Vilarinho, L., Carvalho Santos, A., Machado, J. (2000). Organic compounds in the extrapallial fluid and haemolymph of *Anodonta cygnea* (L.) with emphasis on the seasonal biomineralization process. *Comp. Biochem. Physiol. B* **125**, 293-306.
- Moura, G., Machado, J., and Coimbra, J. (2003). Insights on nacre formation in the freshwater clam *Anodonta cygnea* (L.): an overview. In "Biomineralization: Formation, Diversity, Evolution and Application" (I. Kobayashi, and H. Osawa, Eds.), pp. 129-132. Tokai University Press, Kanagawa.
- Nagai, K., Yano, M., Morimoto, K., and Miyamoto, H. (2007). Tyrosinase localization in mollusc shells. *Comp. Biochem. Physiol.* **146**, 207-214.
- Nederbragt, A. J., van Loon, A. E., and Dictus, W. J. A. G. (2002). Expression of *Patella vulgata* orthologs of *engrailed* and *dpp-BMP2/4* in adjacent domains during molluscan shell development suggests a conserved compartment boundary mechanism. *Dev. Biol.* **246**, 341-355.
- Nielsen, C. (2004). Trochophora larvae: cell-lineages, ciliary bands and body regions. 1 Annelida and Mollusca. *J. Exp. Biol.* **302**, 35-68.
- Nishiguchi, M., and Mapes, R. H. (2008). Cephalopoda. In "Phylogeny and Evolution of the Mollusca" (W. F. Ponder and D. R. Lindberg, Eds.), pp 163-199. University of California Press, Berkeley.
- Paps, J., Baguna, J. And Riutort, M. (2009). Lophotrochozoan internal phylogeny: new insights from an up-to-date analysis of nuclear ribosomal genes. *Proc Biol Sci.* **276**, 1245-1254.
- Parkhaev, P. Y. (2008). The early Cambrian radiation of Mollusca. In "Phylogeny and Evolution of the Mollusca" (W. F. Ponder and D. R. Lindberg, Eds.), pp 33-69. University of California Press, Berkeley.
- Passamanek, Y. J., Schander, C., and Halanych, K. M. (2004). Investigation of molluscan phylogeny using large-subunit and small-subunit nuclear rRNA sequences. *Mol Phylogenet Evol.* **32**, 25-38.
- Patthy, L. (1996). Exon shuffling and other ways of module exchange. *Matrix Biol.* **15**, 301-310.
- Patthy, L. (1999). Genome evolution and the evolution of exon-shuffling - a review. *Gene*, **238**, 103-114.
- Patthy, L. (2003). Modular assembly of genes and the evolution of new functions. *Genetica*, **118**, 217-231.
- Peel, J. S. (1991). Functional morphology of the Class Helcionelloida nov., and the early evolution of the Mollusca. In "The Early Evolution of Metazoa and the Significance of Problematic Taxa" (A. M. Simonetta & S. Conway Morris, Eds.) pp.157-177. Cambridge Univ. Press.
- Pereira-Mouriès, L., Almeida, M. J., Ribeiro, C., Peduzzi, J., Barthélemy, M., Milet, C., and Lopez, E. (2002). Soluble silk-like organic matrix in the nacreous layer of the bivalve *Pinctada maxima*. *Eur. J. Biochem.* **269**, 4994-5003.
- Peterson, K. J., Lyons, J. B., Nowak, K. S., Takacs, C. M., Wargo, M. J., and McPeck, M. A. (2004). Estimating metazoan divergence times with a molecular clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 6536-6541.
- Peterson, K. J., Cotton, J. A., Gehling, J. G., and Pisani, D. (2008). The Ediacaran emergence of bilaterians: congruence between the genetic and the geological records. *Phil. Trans. R. Soc. B* **363**, 1435-1443.
- Petit, H., Davis, W. L., and Jones, R. G. (1978). Morphological studies on the mantle of the fresh-water mussel *Amblema* (Unionidae): scanning electron microscopy. *Tissue Cell* **10**, 619-627.
- Pietrzak, J. E., Bates, J. M., and Scott, R. M. (1973). Constituents of unionid extrapallial fluid. I. Electrophoretic and immunological studies of protein components. *Biol. Bull.* **144**, 391-399.
- Pojeta, J., Runnegar, B., Morris, N. J., and Newell, N. D. (1972). Rostroconchia: a new class of bivalved molluscs. *Science* **177**, 264-267.
- Pojeta, J., Runnegar, B., and Kriz, J. (1973). *Fordilla troyensis* Barrande: the oldest known pelecypod. *Science* **180**, 866-868.
- Pokroy, B., Zolotoyabko, E., and Adir, N. (2006). Purification and functional analysis of a 40-kDa protein extracted from the *Strombus decorus persicus* mollusc shell. *Biomacromolecules* **7**, 550-556.
- Reynolds, P. D., and Steiner, G. (2008). Scaphopoda. In "Phylogeny and Evolution of the Mollusca" (W. F. Ponder and D. R. Lindberg, Eds.), pp 143-161. University of California Press, Berkeley.
- Roinel, M., Morel, F., and Istin, M. (1973). Etude des granules calcifiés du manteau des lamellibranches à l'aide de la microsonde électronique. *Calc. Tiss. Res.* **11**, 163-170.

- Rousseau, M., Pereira-Mouriès, L., Almeida, M. J., Milet, C., Lopez, E. (2003). The water-soluble matrix fraction from the nacre of *Pinctada maxima* produces earlier mineralization of MC3T3-E1 mouse pre-osteoblasts. *Comp. Biochem. Physiol.B* **135**, 1-7.
- Runnegar, B. (1996). Early evolution of the Mollusca: the fossil record. In "Origin and Evolutionary Radiation of the Mollusca" (J. Taylor, Ed.), pp. 77-87. Oxford University Press, Oxford.
- Runnegar, B. (2007). Hyolitha: status of the phylum. *Lethaia* **13**, 21-25.
- Runnegar, B., Pojeta, J. Jr., Taylor, M. E., and Collins, D. (1979). New species of the Cambrian and Ordovician chitons *Matthevia* and *Chelodes* from Wisconsin and Queensland: evidence for the early history of polyplacophoran mollusks. *J. Paleont.* **53**, 1374-1394.
- Rusenko, K. W., Donachy, J. E., and Wheeler, A. P. (1991). Purification and characterization of a shell matrix phosphoprotein from the American oyster. In "Surface Reactive Peptides and Polymers, Discovery and Commercialization" (C. S. Sikes, and A. P. Wheeler, Eds.), pp. 107-124. ACS Symposium Series 444, Washington, DC.
- Saleuddin, A. S. M., and Petit, H. P. (1983). The mode of formation and the structure of the periostracum. In "The Mollusca, Vol. 4: Physiology" (A. S. M. Saleuddin, and K. M. Wilbur, Eds.), pp 199-233. Academic Press, New York.
- Salvini-Plawen, L.v., and Steiner, G. (1996). Synapomorphies and plesiomorphies in higher classification of Mollusca. In "Origin and Evolutionary Radiation of the Mollusca" (J. D. Taylor, ed.), pp 29-51. Oxford University Press, Oxford.
- Samata, T., Hayashi, N., Kono, M., Hasegawa, K., Horita, C., and Akera, S. (1999) A new matrix protein family related to the nacreous layer formation of *Pinctada fucata*. *FEBS Lett.* **462**, 225-229.
- Sarashina, I., and Endo, K. (1998). Primary structure of a soluble matrix protein of scallop shell: implications for calcium carbonate biomineralization. *Amer. Mineral.* **83**, 1510-1515.
- Sarashina, I., and Endo, K. (2001). The complete primary structure of Molluscan Shell Protein 1 (MSP-1), an acidic glycoprotein in the shell matrix of the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Mar. Biotechnol.* **3**, 362-369.
- Sarashina, I., Yamaguchi, H., Haga, T., Iijima, M., Chiba, S., and Endo, K. (2006). Molecular evolution and functionally important structures of molluscan dermatopontin: implications for the origins of molluscan shell matrix proteins. *J. Mol. Evol.* **62**, 307-318.
- Schelterma, A. H., and Schander, C. (2006). Exoskeletons: tracing molluscan evolution. *Venus* **65**, 19-26.
- Serpentini, A., Ghayir, C., Poncet, J.-M., Hebert, V., Galéra, P., Pujol, J.-P., Boucaud-Camou, E., and Lebel, J.-M. (2000). Collagen study and regulation of the de novo synthesis by IGF-1 in hemocytes from the gastropod mollusc, *Haliotis tuberculata*. *J. Exp. Zool.* **287**, 275-284.
- Shen, X., Belcher, A. M., Hansma, P. K., Stucky, G. D., and Morse, D. E. (1997). Molecular cloning and characterization of lustrin A, a matrix protein from shell and pearl nacre of *Haliotis rufescens*. *J. Biol. Chem.* **272**, 32472-32481.
- Simkiss, K. (1977). Biomineralization and detoxification. *Calcif. Tiss. Res.* **24**, 199-200.
- Simkiss, K. (1980). Detoxification, calcification and the intercellular storage of ions. In "The Mechanisms of Biomineralization in Animals and Plants" (M. Omori and N. Watabe, Eds.) pp 13-18. Tokai University Press, Tokyo.
- Simkiss, K. (1993). Amorphous minerals in biology. *Bull. Inst. Oceanogr. Monaco, n° special* **14**, 49-54.
- Simkiss, K., and Wilbur, K. M. (1989). Biomineralization, Cell biology and Mineral Deposition. Academic Press, Inc., New York.
- Steiner, G., and Dreyer, H. (2003). Molecular phylogeny of Scaphopoda (Mollusca) inferred from 18S rDNA sequences: support for a Scaphopoda-Cephalopoda clade. *Zoologica Scripta* **32**, 343-356.
- Stinchcomb, B. L., and Darrough, G. (1995). Some molluscan problematica from the upper Cambrian-Lower Ordovician of the Ozark uplift. *J. Paleont.* **69**, 52-65.
- Sud, D., Poncet, J. M., Saihi, A., Lebel, J. M., Doumenc, D., and Boucaud-Camou, E. (2002). A cytological study of the mantle edge of *Haliotis tuberculata* L. (Mollusca, Gastropoda) in relation to shell structure. *J. Shellfish Res.* **21**, 201-210.
- Sudo, S., Fujikawa, T., Nagakura, T., Ohkubo, T., Sakagushi, K., Tanaka, M., and Nakashima, K. (1997). Structures of mollusc shell framework proteins. *Nature* **387**, 563-564.
- Suzuki, M., Murayama, E., Inoue, H., Ozaki, N., Tohse, H., Kogure, T., and Nagasawa, H. (2004). Characterization of Prismalin-14, a novel matrix protein from the prismatic layer of the Japanese pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Biochem. J.* **382**, 205-213.
- Takeuchi, T., and Endo, K. (2005). Biphasic and dually coordinated expression of the genes encoding major shell matrix proteins in the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Mar. Biotech.* **8**, 52-61.
- Timmermans, L. P. M. (1969). Studies on shell formation in molluscs. *Netherl. J. Zool.* **19**, 417-523.
- Treccani, L., Mann, K., Heinemann, F., and Fritz, M. (2006). Perlwapin, an abalone nacre protein with three four-disulfide core (whey acidic protein) domains, inhibits the growth of calcium carbonate crystals. *Biophys. J.* **91**, 2601-2608.

- Trinkler, N., Labonne, M., Bardeau, J. F., Marin, F., Jolivet, A., Poulain, C. and Paillard, C. *Ruditapes philippinarum* shell repair face front to the Brown Ring Disease: a follow-up of the organic matrix using Raman spectrometry and WDS microprobe. Soumis à *Anal. Bioanal. Chem.*
- Tsukamoto, D., Sarashina, I., and Endo, K. (2004). Structure and expression of an unusually acidic matrix protein of pearl oyster shells. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **320**, 1175-1180.
- Veis, D. J., Albinger, T. M., Clohisy, J., Rahima, M., Sabsay, B., and Veis, A. (1986). Matrix proteins of the teeth of the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *J. Exp. Zool.* **240**, 35-46.
- Waite, H. (1983). Quinone-tanned scleroproteins. In "The Mollusca, vol. 4: Physiology" (A. S. M. Saleuddin, and K. M. Wilbur, Eds.), pp. 467-504. Academic Press, New York.
- Waite, J. H. (1995). Precursors of quinone-tanning: DOPA-containing proteins. *Meth. Enzymol.* **258**, 1-20.
- Waite, J. H., Saleuddin, A. S. M., and Andersen, S. O. (1979). Periostracin - A soluble precursor of sclerotized periostracum in *Mytilus edulis* L. *J. Comp. Physiol.* **130**, 301-307.
- Waller, T. R. (1998). Origin of the molluscan class Bivalvia and a phylogeny of major groups. In "Bivalves: an Eon of Evolution" (P. A. Johnston, and J. W. Haggard Eds.), pp. 1-45. University of Calgary Press, Calgary.
- Wanninger, A., and Haszprunar, G. (2001). The expression of an engrailed protein during embryonic shell formation of the tusk-shell, *Antalis entalis* (Mollusca, Scaphopoda). *Evol. Dev.* **3**, 312-321.
- Wanninger, A., Koop, D., Moshel-Lynch, S., and Degnan, B. M. (2008). Molluscan evolutionary development. In "Phylogeny and Evolution of the Mollusca" (W. F. Ponder and D. R. Lindberg, Eds.), pp 427-445. University of California Press, Berkeley.
- Watabe, N. (1983). Shell repair. In "The Mollusca, Vol. 4: Physiology" (A. S. M. Saleuddin, and K. M. Wilbur, Eds.), pp 289-316. Academic Press, New York.
- Weiner, S. (1983). Mollusk shell formation: isolation of two organic matrix proteins associated with calcite deposition in the bivalve *Mytilus californianus*. *Biochemistry* **22**, 4139-4145.
- Weiss, I. M., Kaufmann, S., Mann, K., and Fritz, M. (2000). Purification and characterization of perlucin and perlustrin, two new proteins from the shell of the mollusc *Haliotis laevigata*. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **267**, 17-21.
- Weiss, I. M., Göhring, W., Fritz, M., and Mann, K. (2001). Perlustrin, a *Haliotis laevigata* (abalone) nacre protein, is homologous to the insulin-like growth factor binding protein N-terminal module of vertebrates. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **285**, 244-249.
- Weiss, I. M., Schnönitzer, V., Eichner, N., and Sumper, M. (2006). The chitin synthase involved in marine bivalve mollusk shell formation contains a myosin domain. *FEBS Lett.* **580**, 1846-1852.
- Westbroek, P., and Marin, F. (1998). A marriage of bone and nacre. *Nature* **392**, 861-862.
- Wilbur, K. M., and Bernhardt, A. M. (1984). Effect of amino acids, magnesium, and molluscan extrapallial fluid on crystallization of calcium carbonate: *in vitro* experiments. *Biol. Bull.* **166**, 251-259.
- Wilt, F. H., Killian, C. E., and Livingston, B. T. (2003). Development of calcareous skeletal elements in invertebrates. *Differentiation* **71**, 237-250.
- Wray, C. G., Jacobs, D. K., Kostriken, R., Vogler, A. P., Baker, R., and DeSalle, R. (1995) Homologues of the engrailed gene from five molluscan classes. *FEBS Lett.* **365**, 71-74.
- Wray, G. A., Levinton, J. S., and Shapiro, L. H. (1996). Molecular evidence for deep Precambrian divergences among metazoan phyla. *Nature* **274**, 568-573.
- Yano, M., Nagai, K., Morimoto, K., and Miyamoto, H. (2006). Shematin: a family of glycin-rich structural proteins in the shell of the pearl oyster. *Comp. Biochem. Physiol.* **144**, 254-262.
- Yin, Y., Huang, J., Paine, M. L., Reinhold, V. N., and Chasteen, D. (2005). Structural characterization of the major extrapallial fluid protein of the mollusc *Mytilus edulis*: implication for function. *Biochemistry* **44**, 10720- 10731.
- Yochelson, E. L. (1969). Stenothecoida, a proposed new class of Cambrian Mollusca. *Lethaia* **2**, 49-62.
- Zhang, C., Xie, L., Meng, Q., Jiang, T., Pu, R., Chen, L., and Zhang, R. (2003). A novel matrix protein participating in the nacre framework formation of pearl oyster, *Pinctada fucata*. *Comp. Biochem. Physiol.* **133**, 565-573.
- Zhang, C., Xie, L., Huang, J., Liu, X., and Zhang, R. (2006a). A novel matrix protein family participating in the prismatic layer formation of pearl oyster, *Pinctada fucata*. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **344**, 735-740.
- Zhang, C., Xie, L., Huang, J., Chen, L., and Zhang, R. (2006b). A novel putative tyrosinase involved in periostracum formation from the pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Biochem. Biophys. Res. Co.* **342**, 632-639.
- Zhang, C., Li, S., Huang, J., Ma, Z., and Zhang, R. (2006c). A novel matrix protein p10 from the nacre of pearl oyster (*Pinctada fucata*) and its effect on both CaCO<sub>3</sub> crystal formation and mineralogenic cells. *Mar. Biotechnol.* **8**, 624-633.
- Zhao, H., Samata, T., Takakura, D., Hashimoto, R., Miyazaki, Y., Nozawa, T., and Hikita, Y. (2003). Organic matrix proteins preserved in fossil molluscan shells. In "Biomineralization: Formation, Diversity, Evolution and Application" (I. Kobayashi, and H. Osawa, Eds.), pp. 108-111. Tokai University Press, Kanagawa.

# V. LES PROTEINES ACIDES DES COQUILLES DE MOLLUSQUES : EXEMPLE DE PINNA NOBILIS

V.1. Introduction

V.2. Quelques caractéristiques générales

V.3. Autres propriétés remarquables

V.4. Protéines coquillières acides chez *P. nobilis*

a. Présentation de l'espèce

b. Structure de la coquille de *P. nobilis*

c. Les protéines coquillières acides

c.1. Travaux publiés

c.2. Matrice coquillière : article 2

c.3. La mucoperline : articles 4 et 6

c.4. Protéines très acides des prismes : articles 10 et 14

V.5. Origine et évolution des protéines acides dans la minéralisation

a. Hypothèses

b. Perspectives : phage display

c. Références bibliographiques

V.6. Illustration de la recherche par quelques articles

a. Article Marin *et al.*, CRAS 1994

b. Article Marin *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2000

c. Article Marin *et al.*, *Prot. Expr. Purif.*, 2003

d. Article Marin *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2005

e. Article Marin *et al.*, *Biomater.*, 2007

## V.1. INTRODUCTION

Les protéines acides jouent un rôle de premier plan dans la biominéralisation carbonatée en général, et dans la biominéralisation de la coquille des mollusques en particulier. On pourrait presque dire qu'elles en constituent le dogme central, tant elles dominent les débats sur les mécanismes moléculaires de contrôle de la cristallisation de carbonate de calcium par des protéines, depuis les années soixante-dix. Les protéines acides constituent en quelque sorte une « petite histoire » dans l'histoire de la biominéralisation. J'en retrace ici quelques étapes.

Si la découverte de la conchioline est vieille de plus de 150 ans (cf. chapitre III, § III.3), celle des protéines acides est beaucoup plus récente. Il est cependant difficile d'attribuer à un chercheur en particulier la paternité de l'idée que les protéines acides interagissent avec les ions calcium et permettent de nucléer des nanocristaux, pour contrôler la minéralisation. L'idée était dans l'air, à l'orée des années soixante.

A ma connaissance, un des premiers à avoir donné une formulation claire du processus fut encore une fois Melvin Glimcher (1960) : « *the hypothesis of the physical-chemical mechanism initiating mineralization (nucleation) is based on the stereochemistry of the major organic components. The hypothesis proposes that the precise juxtaposition of certain reactive groups in the organic matrix creates highly specific regions which act as sites for the heterogeneous nucleation of the appropriate crystals from metastable (or unstable) solutions of the body fluids* ». Glimcher parlait avant tout de la calcification de l'os.

Pour la coquille des mollusques, les contributions successives de Hare (1963), Simkiss (1965) ou Degens *et al.* (1967) s'avèrent décisives, d'un point de vue conceptuel. Hare, en particulier, fut d'une clairvoyance remarquable lorsqu'il écrivit, dans un court article consacré à la matrice coquillière de la moule californienne : « *the role of the organic matrix in mineralization is to provide a set of highly specific templates which act as the sites for the nucleation of the mineral phase... Aspartic and glutamic acid side chains could provide negatively charged sites, which would attract calcium ions* » (Dans cette seconde phrase, notons l'emploi du conditionnel). Hare fut relayé quelques années plus tard par Degens *et al.* (1967) : « *the most essential factor in nucleating a mineral phase appears to be the availability of free carboxyl groups provided by certain acidic amino acids* ». Quoiqu'il en soit, à cette époque, les protéines acides demeurent une Arlésienne, un serpent de mer, car personne n'en a encore identifié une seule, notamment pour des raisons techniques.

Un pas important fut franchi presque simultanément par Meenakshi *et al.* (1971) et Crenshaw (1972) par la découverte des matrices coquillières solubles à l'EDTA. Durant toute la décennie précédant ces deux travaux, seules les matrices insolubles avaient été prises en compte, et personne n'avait songé à regarder le contenu du surnageant issu de la décalcification ! Ainsi, les nombreuses analyses d'acides aminés publiées au cours des années soixante avaient surtout mis en évidence le caractère fortement hydrophobe des matrices de type « conchioline », avec une abondance de glycine et d'alanine (Grégoire, 1972), ce qui avait amené à la plupart des auteurs à assimiler ces protéines hydrophobes à la fibroïne de la soie (« silk-fibroin-like ») et à envisager pour elles un rôle structural de support et de « moule » aux cristaux. Les deux papiers pré-cités montrèrent que les matrices EDTA-solubles sont fortement enrichies en résidus aspartate, par comparaison avec la matrice insoluble. Crenshaw observa en plus que la matrice soluble n'est pas détruite par une série de traitements de poudre coquillière à l'eau de javel. Il mit donc en évidence une propriété tout à fait originale des matrices solubles, leur localisation « à l'intérieur des cristaux » (« intracristalline »). Cette propriété les distingue fondamentalement des matrices insolubles

hydrophobes qui sont plutôt localisées autour des cristaux, et servent d'armature à la minéralisation.

Néanmoins, l'intronisation des matrices acides solubles comme constituants majeurs et essentiels des coquilles de mollusques fut réalisée par l'article fondateur de Weiner et Hood (1975), qui proposa pour la première fois une série d'hypothèses quant à la structure et à la fonction de ces matrices :

- les matrices acido-solubles sont riches en acide aspartique (et non pas en asparagine). Dans des conditions de pH physiologique, elles sont polyanioniques.
- Elles servent de support à la nucléation des cristaux (« template »).
- Les résidus acide aspartique sont le ligand des ions calcium : la fixation du calcium est opérée par la chaîne latérale de l'acide aspartique chargée négativement dans des conditions de pH physiologique. Pour fixer cet ion divalent, il faut deux radicaux proches. Weiner et Hood proposent donc une séquence hypothétique où un acide aminé sur deux est un résidu acide aspartique.

L'article de Weiner et Hood (cité 177 fois uniquement dans les revues impactées) eut un rôle fondateur. Il mit les matrices solubles acides sur le devant de la scène. Il apporta un premier élément pour expliquer comment la matrice pouvait contrôler la minéralisation de la coquille. Sur cette lancée, Weiner et ses collaborateurs produisirent une série de papiers d'importance qui affinèrent le modèle. Ils proposèrent que la matrice soluble se fixe sur la matrice insoluble hydrophobe, en adoptant une conformation de feuillet- $\beta$ . Cette matrice polyanionique coopère aussi avec des polysaccharides sulfatés (chargés négativement), qui attirent les ions calcium (sous forme de « clusters ») à proximité du feuillet, où la nucléation se produit (Weiner and Traub, 1984 ; Addadi and Weiner, 1985 ; Addadi *et al.*, 1987). Le mécanisme de nucléation semblait donc élucidé dans ses grandes lignes...

Une seconde pièce manquante du puzzle fut apportée quelques années plus tard par Wheeler et ses collaborateurs (1981). A travers un court article (cité 150 fois), ils mirent en évidence une autre propriété remarquable des matrices acides solubles, leur capacité à inhiber *in vitro* la précipitation de calcite dans des solutions sursaturées dans lesquelles la calcite précipiterait spontanément. Cette propriété est générale ; elle est dose-dépendante. Elle est testable très facilement avec une mini-électrode de pH, selon un protocole à la simplicité confondante!

Avec la nucléation de Weiner et Hood et l'inhibition de Wheeler *et al.*, les deux mécanismes antagonistes de la minéralisation furent révélés, constituant le moteur central du contrôle de la minéralisation de la coquille. Ainsi, Wheeler *et al.* (1988), quelques années plus tard, proposèrent un modèle très simple dans lequel la matrice acide soluble est déposée sur un substrat insoluble ; cette matrice catalyse la nucléation cristalline ; lors de l'étape suivante de croissance cristalline, elle contrôle la morphologie des cristaux par adsorption à leur surface ; puis elle bloque la croissance cristalline par inhibition ; le tout est scellé par une nouvelle semelle insoluble qui se dépose par dessus, et le cycle recommence... Dans ce modèle, le rôle antagoniste de la matrice acide dépend de son état physique: en solution, cette matrice agit comme un inhibiteur, capable de s'adsorber, de manière sélective, à la surface des cristaux, bloquant ainsi leur croissance ; fixée sur son support hydrophobe insoluble par des liaisons non covalentes, cette même matrice agit alors comme un nucléateur.

Cette vision du contrôle de la minéralisation, gouvernée seulement par les deux mécanismes antagonistes que sont la nucléation et l'inhibition, a nourri le domaine de la biominéralisation durant près de trois décennies, en le structurant fortement. Quiconque ayant tant soit peu étudié la biominéralisation carbonatée a forcément « rencontré » à un moment donné ces matrices solubles acides, et constaté leurs propriétés biochimiques hors-normes. Avec le recul de trente ans, cette vision peut sembler aujourd'hui très réductrice. Elle n'explique pas comment les mollusques sont capables de synthétiser des microstructures très

différentes ni comment ils sont capables de sélectionner très précisément la minéralogie calcitique ou aragonitique de leurs couches coquillières. Plus grave encore, l'ensemble de la construction théorique était basé sur l'existence de protéines acides, riches en acide aspartique, dont les séquences fragmentaires avaient été déduites de manière très indirecte, par hydrolyse ménagée à l'acide acétique (Weiner, 1979).

Chez les mollusques, il faudra attendre 1998 pour que soit publiée la toute première séquence (partielle, puis complétée en 2001) d'une protéine réellement acide, qui confirme peu ou prou la prédiction de Weiner (Sarashina and Endo, 1998 ; 2001). Cette protéine, nommée MSP-1, est effectivement très enrichie en acide aspartique et sérine. Elle présente deux domaines constitués de motifs DGS ou DS, ainsi que de nombreux motifs DD. Depuis, d'autres candidats aux caractéristiques biochimiques qui entrent peu ou prou dans le cadre du modèle de Weiner ont été identifiés : SP-S, prismaticline 14, aspéine, et la famille des Asprich (cf. Marin *et al.*, 2008 pour une revue). Notons à titre de curiosité que l'aspéine, avec plus de 60% d'acide aspartique, a un point isoélectrique théorique de 1,67, ce qui en fait la protéine la plus acide trouvée à ce jour, tous organismes confondus!!

En parallèle, d'autres protéines acides ont été identifiées par séquençage direct ou par séquençage des ARN messagers correspondants. Ces protéines ne sont pas riches en acide aspartique, mais leur point isoélectrique théorique est inférieur à 6, voire 5 pour certaines d'entre elles. Ce sont par exemple la famille N14/N16/pearline, la MSI60, la MSI7, la mucoperline, AP7 et AP24, la nacréine... Ces protéines illustrent le fait que la minéralisation de la coquille chez les mollusques n'est pas uniquement contrôlée par le couple nucléation/inhibition, mais que de nombreuses autres fonctions entrent en ligne de compte.

Avant de présenter l'un de nos modèles d'étude, je liste ci-dessous quelques caractéristiques et propriétés remarquables des protéines acides de coquille de mollusque.

## **V.2. QUELQUES CARACTERISTIQUES GENERALES**

\* Les protéines acides sont fortement liées à la phase minérale : on ne les récupère qu'après une dissolution de celle-ci. De nature hydrophile à très hydrophiles, ces protéines sont facilement solubilisées dans le tampon aqueux de décalcification, qu'il s'agisse d'un agent chélateur du calcium comme l'EDTA, ou d'un acide organique dilué. Les protéines acides sont obtenues après concentration et dialyse.

\* On les analyse sur gel d'acrylamide, plutôt que par chromatographie. Elles ne colorent pas ou peu au Bleu de Coomassie. Il est souvent préférable d'utiliser le nitrate d'argent plus sensible, mais qui, quelquefois, donne une coloration négative, preuve supplémentaire d'un caractère polyanionique marqué. Certains auteurs ont observé que ces protéines diffusent rapidement en dehors du gel d'électrophorèse. Ces mêmes auteurs préconisent une double fixation du gel après électrophorèse, ainsi qu'une modification de la procédure de coloration à l'argent, permettant de visualiser toutes les protéines acides (Gotliv *et al.*, 2003). Pour avoir essayé cette procédure, nous n'avons pas constaté d'amélioration sensible. D'autres colorations, comme celle au bleu Alcian, peuvent être utilisées pour révéler le caractère polyanionique de ces protéines.

\* De manière schématique, les protéines acides de coquille de mollusque se divisent en deux groupes, celles qui sont enrichies en acides aminés acides, et celles qui ne le sont pas. Les premières sont acides « intrinsèquement » du fait d'un taux élevé d'acide aspartique et/ou d'un rapport acides aminés acides/acides aminés basiques très élevé. Les secondes sont rendues acides par leurs modifications post-traductionnelles, parmi lesquelles figurent en bonne place la glycosylation et la phosphorylation.



\* Concernant la première catégorie de protéines, il est intéressant de constater que l'acidité de ces protéines repose sur l'acide aspartique et non sur l'acide glutamique, comme si la sélection de l'un s'était opérée au détriment de l'autre. Les deux acides aminés ont pourtant des propriétés chimiques très voisines : le radical de l'acide aspartique (pKa : 4) est un groupement éthanoate ( $\text{CH}_2\text{CO}_2^-$ ) ; celui de l'acide glutamique (pKa : 4,1) est légèrement plus long, puisqu'il s'agit d'un groupement propanoate ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{CO}_2^-$ ). L'un et l'autre sont déterminés par deux codons (GAC, GAU pour Asp ; GAG, GAA pour Glu). Peut-être faut-il voir dans ce choix des raisons d'encombrement stérique ? Ce choix déborde largement du cadre de la biominéralisation de la coquille des mollusques, puisque, à de rares exceptions près (certaines protéines de cuticules de crustacés enrichies en acide glutamique, cf. Endo *et al.*, 2004), la plupart des biominéralisations carbonatées ont plutôt « choisi » l'acide aspartique comme ligand potentiel des ions calcium.

\* La seconde catégorie concerne des protéines coquillères rendues acides par leurs modifications post-traductionnelles, parmi lesquelles, la glycosylation et la phosphorylation. La glycosylation est le greffage covalent de saccharides (mono, oligo ou polysaccharides) à l'axe protéique. Elle s'effectue par l'asparagine (on parle alors de N-glycosylation) ou par la sérine ou la thréonine (on parle alors de O-glycosylation). Certaines glycosylations ont pour conséquence d'augmenter la charge négative globale de la protéine : c'est le cas notamment de greffage d'acide sialique, de greffage de saccharides comportant des hexoses acides (acide glucuronique, galacturonique, mannuronique, iduronique), ou du greffage des sucres comportant un groupement sulfate terminal. Ces types de glycosylations sont plus que suspectés pour un certain nombre de protéines de coquille. Dans le cas précis de la matrice acido-soluble de la moule d'eau douce *Unio pictorum*, nous avons montré que la déglycosylation de la matrice modifie le patron électrophorétique bidimensionnel des extraits, en déplaçant certains spots protéiques vers les pH basiques (Marie *et al.*, 2007). De plus, nous avons montré qu'une des protéines glycosylée, la P95, contient un ou plusieurs sucres sulfatés (Marie *et al.*, 2008), impliqués dans la fixation des ions calcium. La déglycosylation de la P95 se traduit par une perte totale de fixation de calcium.

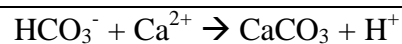
\* La deuxième modification post-traductionnelle d'importance est la phosphorylation, c'est à dire, l'addition d'un groupement phosphate aux résidus sérine (cas le plus fréquent), thréonine, ou plus rarement tyrosine. La phosphorylation augmente la charge négative d'une protéine. La phosphorylation a pour effet de fixer les ions calcium. Cela a été clairement montré dans le cas de l'orchestine, protéine de matrice calcifiante du crustacé *Orchestia cavimana* (Hecker *et al.*, 2003), mais, en revanche, chez les mollusques, cette propriété n'a jamais été réellement testée. La phosphorylation augmente aussi le pouvoir inhibiteur de la protéine étudiée. Le cas de RP-1, une protéine de coquille d'huître partiellement caractérisée, est intéressant : RP-1 est un puissant inhibiteur de précipitation de carbonate de calcium. Néanmoins, après déphosphorylation, RP-1 perd complètement cette capacité (Borbas *et al.*, 1991 ; Halloran and Donachy, 1995).

\* Une troisième modification post-traductionnelle qui rend une protéine plus acide est la sulfation des résidus tyrosine, c'est à dire le greffage covalent d'un groupement sulfate. Cette modification est bien connue pour de nombreuses protéines de matrices extracellulaires, mais elle n'a jamais été testée sur des protéines de coquille de mollusques. Cependant, au vu de l'analyse informatique de certaines séquences (résidus tyrosine en contexte acide), elle est assez probable.

\* Les protéines acides de coquille de mollusques interagissent avec l'ion calcium. Cette propriété a été montrée dans un certain nombre de cas (Marxen and Becker, 2000 ; Marin *et al.*, 2005). Elle est logique car, qu'il s'agisse de protéines riches en acide aspartique, ou de protéines rendues acides par des modifications post-traductionnelles, elle implique l'interaction électrostatique entre le cation calcium et un groupement anionique. Un des

moyens conventionnels de tester cette propriété consiste à transférer un extrait de coquille sur membrane de nitrocellulose après électrophorèse (Western-blotting) puis à incuber la membrane avec du calcium radioactif. Les protéines fixant le calcium sont révélées sur film photographique. Cette technique dite « test de Maruyama » (Maruyama *et al.*, 1984) ne révèle cependant pas toutes les protéines fixant potentiellement le calcium. En effet, elle avait été mise au point initialement pour une classe particulière de protéines, qui séquestrent le calcium avec une forte affinité, mais qui ne comportent que quelques sites de fixation par molécule : ce sont les protéines dites « high affinity-low capacity » (Kretzinger, 1976). Ces protéines, telles que la troponine C, la calmoduline, la calcineurine, sont caractérisées par un motif typique (« EF-hand) constitué de 2 hélices alpha plus ou moins perpendiculaires l'une à l'autre, rattachées par une boucle de 12 acides aminés. L'ion calcium est fixé au niveau de la boucle, par les résidus 1, 3, 5, 7, 9, 12 (Ikura, 1996). Or, les protéines de coquille de mollusque n'appartiennent pas à cette catégorie, puisque, à ce jour, aucune d'entre elles ne présente de motif EF-hand. Elles appartiennent plutôt à une seconde classe de protéines : celles qui fixent le calcium en grande quantité, mais avec une faible affinité (Maurer *et al.*, 1996). Ce sont des protéines « high capacity-low affinity ». Pour ces protéines, la fixation du calcium est beaucoup plus labile ; dans le test de Maruyama, il est nécessaire de limiter les rinçages de la membrane pour éviter l'élimination complète du calcium. Une fixation labile s'accorde bien à l'idée que ces protéines, qui peuvent transporter de nombreux ions calcium par molécule, doivent les restituer lorsque la nucléation cristalline entre en jeu (Mann, 1988).

\* En solution, les protéines acides de coquille présentent deux autres propriétés remarquables : leur capacité à inhiber la précipitation de carbonate de calcium, ainsi que leur capacité à interférer avec la croissance de cristaux de carbonate de calcium. Ces deux propriétés, bien que différentes, sont liées. A ma connaissance, il n'existe pas de protéine inhibitrice qui n'interfère pas avec la formation de cristaux et vice-versa. Point important, ces deux propriétés sont observables pour de faibles, voire de très faibles, quantités de protéines acides. Dans le premier cas (Wheeler *et al.*, 1981), il s'agit de mesurer le pH d'une solution de bicarbonate de sodium (30 mM, pH 8,65) à laquelle on ajoute rapidement du chlorure de calcium (30 mM). Après une phase d'équilibrage, le pH décroît graduellement jusqu'à 7, sa décroissance s'accompagnant d'une précipitation de calcite selon l'équation :



Dans ce système très simple (Fig. 8), l'addition d'une protéine acide en très faible quantité (quelques microgrammes) bloque la réaction ; le pH ne décroît plus, c'est l'effet inhibiteur. L'effet est dose-dépendant : il peut être très transitoire (une dizaine de secondes par exemple) à complet (toute la durée du test, soit 15 minutes). Une variante de ce test, appelée pH-stat, consiste à mesurer non pas le pH de la solution, mais le volume de soude ajoutée à la solution pour maintenir le pH constant. Une autre variante semi-quantitative consiste à mesurer dans une boîte de Pétri la zone d'inhibition provoquée par des protéines acides dans un hydrogel d'agarose contenant du calcium, incubé dans une solution de bicarbonate de sodium (Boggavarapu *et al.*, 2000).

Le second test utilisé classiquement avec les protéines acides de coquille est le test d'interférence *in vitro* de précipitation de carbonate de calcium (Albeck *et al.*, 1993). Il consiste à faire cristalliser du carbonate de calcium à partir d'une solution de chlorure de calcium (7,5 à 10 mM), placée au contact de vapeurs de bicarbonate d'ammonium (diffusion lente). Dans le test à blanc, des rhomboèdres de calcite sont produits. Lorsqu'on place un peu d'une protéine acide (quelques microgrammes), divers effets peuvent être enregistrés (Marin *et al.*, 2005) : modification du nombre de cristaux par unité de surface, formation d'aggrégats polycristallins, formation de cristaux de plus grande taille, formation de cristaux présentant un

feuilletage, réduction de la taille des cristaux produits. Pour des concentrations élevées en protéines, on observe la disparition complète de cristaux, car il y a inhibition de la précipitation.

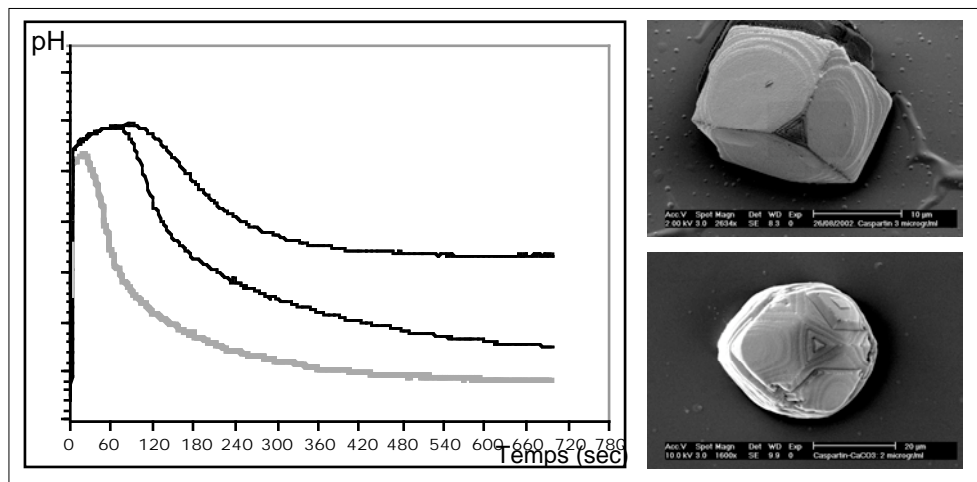


Fig. 8. A gauche, test pH-métrique d'inhibition de la précipitation de carbonate de calcium *in vitro*. La courbe grisée correspond au test à blanc, les courbes noires au test avec une protéine coquillière, à deux concentrations différentes. A droite, test d'interférence de cristallisation de calcite, en présence d'une protéine coquillière. Les 2 figures sont tirées de Marin *et al.*, 2005.

### V.3. AUTRES PROPRIETES REMARQUABLES

Précédemment, je mentionnais les travaux de Crenshaw (1972) qui faisaient état du caractère intracristallin des protéines acides solubles de la matrice coquillière. Cette propriété peut sembler paradoxale, car on voit mal *a priori* comment une protéine pourrait s'insérer dans un minéral qui apparaît souvent comme monocristallin. Le paradoxe est levé lorsque l'on considère les biominéraux non pas comme des monocristaux, mais comme des assemblages complexes de nanocristaux dont l'orientation cristallographique individuelle est organisée par une trame diffuse qui les entoure. La notion de mésocristaux, telle qu'elle a été brillamment exposée par Cölfen (2007) me semble particulièrement judicieuse. Elle montre qu'un grand nombre de minéralisations biologiquement contrôlées sont en fait des « cristallisations non classiques ».

De ce fait, la notion de mésocristaux tord le cou à des idées couramment véhiculées par quelques minéralogistes ou cristallographes « purs et durs », réfractaires au domaine de la biominéralisation, et qui considèrent que les minéralisations biogéniques ne sont que des minéraux classiques avec un peu d'organique autour. Dans cette perspective quelque peu réductionniste, ne sont alors pris en compte que les principes thermodynamiques classiques et les lois qui en découlent, telle la loi d'Ostwald / Gay-Lussac, régissant la succession de minéraux produits au cours d'une cristallisation, et la règle de Wulff, qui détermine les morphologies cristallines finales. Les récentes données ultrastructurales sur les minéralisations coquillières de type nacre montrent à l'évidence que les biominéralisations ne suivent pas les lois classiques de la cristallographie.

Récemment, nos collègues de l'Université Technion de Haïfa (Israël, Dr. B. Pokroy, Pr. E. Zolotoyabko) avec qui nous collaborons, ont enfoncé un peu plus le clou, en montrant que les protéines acides interagissent au niveau de la maille de la calcite.

Dans une première série d'expériences, ils ont très précisément mesuré, par diffraction sur poudre (ESRF, Grenoble) les paramètres de maille de cinq minéralisations biogéniques de couches calcitiques de mollusques (*Pinna nobilis*, *Atrina rigida*, *Ostrea edulis*, *Crassostrea gigas*, *Haliotis rufescens*). En appliquant les corrections nécessaires dues à l'incorporation de magnésium ou de soufre dans le réseau cristallin, ils en ont déduit les paramètres *a*, *b* et *c* théoriques. Ces paramètres, sans exception, montrent des valeurs supérieures à celles de calcite chimique (*a*= 4,9896 Å, *c*= 17,061 Å). Cela signifie que le réseau cristallin est légèrement distordu, la distorsion maximale étant obtenue selon l'axe *c* (de l'ordre de  $2.10^{-3}$ , soit 0,2%).

Dans une seconde série d'expériences, ils ont chauffé ces minéraux, afin de détruire la matrice organique intracrystalline. Ils ont ainsi pu observer une relaxation du réseau cristallin, se traduisant par une diminution des paramètres de maille *a* et *c*. Cette expérience montre, de manière indirecte, que les protéines intracrystallines sont sans doute à l'origine de la distorsion du réseau.

Pour prouver sans ambiguïté que les protéines intracrystallines sont la cause de la distorsion, ils ont cristallisé de la calcite en présence de caspartine - l'une des protéines que j'ai isolée et identifiée et que je décris ci-après - selon le protocole indiqué précédemment (diffusion de bicarbonate d'ammonium dans une solution de chlorure de calcium). Là encore, des mesures de diffractions X précises montrent que la calcite cristallisée en présence de caspartine a des paramètres de maille légèrement supérieurs à celle de calcite précipitée sans caspartine.

L'ensemble de ces résultats a fait l'objet d'une publication en 2006 : Pokroy, B., Fitch, A. N., Marin, F., Kapon, M., Adir, N. and Zolotoyabko, E., 2006. Anisotropic lattice distortions in biogenic calcite induced by intra-crystalline organic molecules. *J. Struct. Biol.*, 155: 96-103.

Le Dr. B. Pokroy a poursuivi sa caractérisation des interactions, à l'échelle de la maille cristalline, entre une protéine acide et la calcite, en se focalisant sur le phénomène de macle. Ce phénomène est bien connu des cristallographes. Une macle est une association orientée de deux ou plusieurs cristaux de même nature chimique, reliés entre eux par une opération de symétrie, réalisée selon un plan (plan de macle, macle par réflexion), selon un axe (axe de macle, macle par rotation), ou encore selon un centre (centre de macle, macle par inversion). En plus de 150 années de recherches, les macles de la calcite semblaient bien connues et répertoriées : réalisées par réflexion, elles sont au nombre de 4, correspondant aux plans de macle suivants : (001), (012), (104), et (018).

En cristallisant de la calcite en présence de caspartine (par diffusion de bicarbonate d'ammonium), B. Pokroy a effectué des mesures de diffraction X sur les cristaux produits. Il a ainsi mis en évidence un 5<sup>ème</sup> plan de macle, le plan (108), qui n'avait jamais été décelé auparavant. Ces travaux très novateurs ont fait l'objet d'un second article paru dans les PNAS : Pokroy, B., Kapon, M., Marin, F., Adir, N., and Zolotoyabko, E., 2007. Protein-induced, previously unidentified twin form of calcite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104 (18): 7337-7341. Pour le moment, cette découverte fondamentale est passée largement inaperçue.

Pour conclure ce paragraphe sur les propriétés remarquables des protéines acides dans la minéralisation de la coquille de mollusques, il est fort probable que nous ne sommes qu'au début d'une série de découvertes majeures, et que d'autres effets de ces protéines à l'échelle de la maille cristalline restent à identifier. En tout cas, la position consistant à n'envisager les biominéralisations que comme des cristallisations « standard » semble de moins en moins tenable, au vu de ce qui a été décrit ci-dessus.

Pour illustrer le chapitre consacré aux protéines acides, nous allons prendre l'exemple de *Pinna nobilis*, grand bivalve à microstructure nacro-prismatique, qui constitue l'un de mes

modèles d'étude en biominéralisation. Je présenterai d'abord le modèle, puis ses microstructures coquillières, avant de décrire succinctement quelques résultats obtenus sur une protéine modérément acide de la couche nacrée de cette espèce, et sur deux protéines très acides de sa couche prismatique.

## V.4. PROTEINES COQUILLIERE ACIDES CHEZ *P. NOBILIS*

### a. Présentation de l'espèce

Encore appelée jambon de mer, ou, chez les anglo-saxons, pen mussel ou razor fish, *Pinna nobilis* est un grand bivalve marin, trouvé sur le pourtour méditerranéen. Cette espèce est localisée sur la côte d'Azur, la côte espagnole, autour des Baléares, les rivages tunisiens et algériens, et sur les côtes italiennes et croates de l'Adriatique. C'est une espèce endémique, vivant entre 0,5 et 50 mètres de profondeur (domaine infralittoral), inféodée aux herbiers de posidonies, vivant parfois dans les pelouses de cymodocées. *Pinna nobilis* vit enfoncée dans les sédiments meubles sur le tiers de sa longueur. Elle synthétise un bissus, autrefois utilisé par les Romains pour la confection de vêtements.

*Pinna nobilis* est l'un des plus grands bivalves du monde avec le bénitier *Tridacna*. C'est une espèce protégée par une interdiction de pêche, selon l'arrêté du 26 Novembre 1992; elle figure également sur la liste des espèces en danger du bulletin officiel de l'Union Européenne (annexe IV de la directive habitat 92/43/CEE concernant la conservation des habitats naturels, de la flore et de la faune sauvage). Pour nos prélèvements (coquilles, tissus mous, période 1996-2002), nous avons bénéficié de l'aide du laboratoire du Professeur Nardo Vicente (CERAM, Faculté des Sciences et Techniques de Saint-Jérôme, Marseille et Institut Océanographique Paul Ricard, Ile des Embiez), un des rares laboratoires travaillant sur ce modèle. Pour nos prélèvements récents, nous avons obtenu une autorisation, renouvelable annuellement, de la Direction Régionale des Affaires Maritimes de la région PACA. Ajoutons que *Pinna nobilis* est un bivalve très peu étudié. Il a cependant fait l'objet d'un mini-séminaire international, le premier de ce genre, en Octobre 2002, sur l'Ile des Embiez.

La reproduction de *Pinna nobilis* est caractérisée par un hermaphrodisme successif à maturation asynchrone (Vicente, 2003). Au cours d'une année, l'évolution sexuelle se fait en plusieurs phases, marquées par une phase de repos, d'Octobre à Mars, et une phase d'activité sexuelle, le reste du temps. La maturation asynchrone des gamètes empêche l'autofécondation. La fécondation croisée n'est possible que lorsque des individus de sexe différents sont présents en même temps. Les ovocytes sont fécondés en pleine eau. A l'instar de la plupart des bivalves, l'œuf donne une larve trochophore, qui évolue en larve véligère. En se fixant, la larve véligère opère sa métamorphose pour donner un individu juvénile. La longévité de *Pinna nobilis* peut atteindre une trentaine d'années.

Pour la systématique, nous suivons la classification la plus récente à ce jour, celle proposée par Giribet (2008), basée à la fois sur des caractères morphologiques et des données moléculaires. Elle admet les bivalves ptériomorphes comme le groupe-frère des bivalves hétéroconches, eux-mêmes constitués des paléohétérodontes et des hétérodontes. Giribet ne précise pas cependant si le terme ptériomorphe correspond à une infra-classe, à un super-ordre ou à un ordre. La classification proposée ici est sensiblement différente de celle présentée par Poppe and Goto (2000), qui reprend la systématique traditionnelle de Newell (1969) (in Moore, « Treatise of Invertebrate Paleontology ») où *Pinna nobilis* est placée au sein de l'ordre des Mytiloida et de la superfamille des Pinnacea.

Classe : BIVALVIA
Sous-classe : AUTOLAMELLIBRANCHIATA
Super-ordre : PTERIOMORPHIA
Ordre : PTERIOIDA
Superfamille : PINNOIDEA
Famille : PINNIDAE
Genre : <i>Pinna</i>
Espèce : <i>nobilis</i> Linnaeus 1758

Table 8. Position systématique de *P. nobilis*.

### **b. Structure de la coquille de *P. nobilis***

A l'instar de tous les bivalves ptériomorphes mytiloïdes ou ptérioïdes, *Pinna nobilis* possède une coquille constituée de deux couches minéralisée. La couche nacrée interne est constituée de tablettes d'aragonite. La couche externe est faite de grands prismes calcitiques, développés perpendiculairement à la surface externe de la coquille. Les modèles macro-prismatiques sont fascinants à plus d'un titre : ils montrent à quel degré de contrôle de la minéralisation de la coquille les mollusques sont parvenus.

La couche nacrée chez *Pinna nobilis* ne couvre qu'un tiers de la surface interne de la coquille. Elle est en général très fine et presque transparente chez les individus juvéniles de 2-3 ans. Chez des formes adultes (20 ou 30 ans), elle s'opacifie en s'épaississant, formant une couche compacte, très solide, de près d'un centimètre d'épaisseur, dans la zone du crochet. La couche nacrée a été décrite de manière détaillée par Schmidt (1924). Curieusement, la plupart des monographies récentes ou articles traitant de la microstructure coquillière de *Pinna nobilis* se focalisent sur la couche prismatique, mais ne décrivent pas ou peu la couche nacrée. Les cristaux de nacre se présentent sous la forme de fines tablettes flexueuses, qui ont un aspect pseudo-columnnaire (cf. Fig. 9 et Fig. 10). En ce sens, la nacre de *Pinna nobilis* n'est pas une nacre classique en « mur de brique », telle qu'on peut la trouver chez les bivalves ptériomorphes, tels que *Pinctada margaritifera* ou paléohétérodontes tels que *Unio pictorum*, ces deux espèces étant également étudiées dans notre laboratoire. La transition nacre /prismes est abrupte, avec l'apparition d'une couche intermédiaire organique brune de quelques dizaines de microns d'épaisseur, sans structure apparente. Quelquefois, cette couche manque.

La couche prismatique chez *Pinna nobilis* est l'archétype de prismes dits « simples », selon la terminologie employée par Boggild (1930) et reprise par Taylor *et al.* (1969). Ces prismes ont leur axe c, parallèles à leur axe d'allongement. Ils ont une taille particulièrement importante, puisqu'ils peuvent mesurer plusieurs millimètres de longueur, pour environ une centaine de microns de diamètre. Leur section est polygonale (en général, penta- à heptagonale). Ces prismes sont entourés d'une gaine organique, qui peut être détruite après un traitement prolongé dans de l'eau de javel diluée. Les prismes sont alors collectés, propres, et débarrassés de tout contaminant exogène. C'est de cette façon que nous les traitons pour des analyses biochimiques ultérieures.

Les prismes calcitiques de *Pinna nobilis* apparaissent comme des objets, dont le caractère paradoxal a été mis en évidence par Cuif *et al.* (1983 ; 1991). En lame mince, ils se comportent comme des monocristaux, d'où leur appellation de prismes simples : en LPA (lumière polarisée analysée), ils montrent une extinction unique typique de monocristaux. Cependant, la pyrolyse de prismes isolés montre que chaque prisme est constitué d'un empilement de cristaux élémentaires. Ces cristaux élémentaires sont également visibles par traitement enzymatique de sections transversales polies. Le traitement dégage alors les limites inférieure et supérieure de chaque cristal élémentaire de la pile (Cuif *et al.*, 1991). Cela signifie que les cristaux élémentaires d'un même prisme, lors de sa croissance, s'orientent

tous de la même façon pour former un pseudo-monocristal. Le mécanisme invoqué peut s'apparenter à de l'épitaixie. Il pourrait être guidé par la matrice intracristalline des prismes.

Le schéma de la Figure 6 (chapitre IV) montre que les prismes croissent logiquement depuis la couche périostracale vers l'intérieur de la coquille. Cependant, le mécanisme de croissance des prismes est un sujet de controverse, donnant lieu à plusieurs interprétations. Des simulations par ordinateur indiquent que des cristaux prismatiques peuvent résulter d'un banal phénomène de compétition entre cristaux (Ubukata, 1994, 1997). Le point de départ est la formation de sphérulithes, nucléés, de manière aléatoire, sur la surface interne non plane du périostracum. Lorsque ces sphérulithes accroissent leur diamètre, ils arrivent en contact les uns avec les autres, et ne peuvent croître que dans une direction, plus ou moins perpendiculaire à la surface périostracale. Il en résulte la formation de prismes. Dans ce schéma, les cristaux qui croissent moins rapidement sont éliminés et absorbés en quelque sorte par les prismes voisins qui deviennent coalescents. Cette vision dynamique d'une croissance par compétition peut être remise en question : les sphérulithes qui caractérisent l'initiation de la minéralisation des prismes ont bel et bien été observés. Cependant, a également été observée la formation des gaines péripriprismatiques mises en place à peu près en même temps que les sphérulithes (Cuif *et al.*, 1983). Cela suggère que les sphérulithes, puis les prismes, croissent dans une gaine, et donc, n'entrent pas en compétition les uns avec les autres. Un troisième mécanisme très élégant, imaginé par Checa *et al.* (2005), propose que les gaines péripriprismatiques polygonales témoignent de l'existence, au moment de la minéralisation d'une émulsion liquide-liquide, caractérisée par la formation de bulles, un peu comme dans la mousse d'un bain. Des phénomènes de tension superficielle stabiliseraient très transitoirement ces bulles, à partir desquelles émergeraient les gaines péripriprismatiques polygonales, par polymérisation d'une phase organique hydrophobe.

En résumé, les prismes de *Pinna nobilis* constituent un modèle idéal pour étudier à la fois le processus de contrôle de la minéralisation, sur plusieurs échelles, du nanomètre au millimètre. Ce sont des objets « universels » dans le monde des biominéralisations. En effet, la formation de prismes ou de cristaux palissadiques à croissance orthogonale au plan de nucléation de la microstructure est une stratégie relativement commune pour minéraliser rapidement un espace : on rencontre cette stratégie chez les mollusques, les brachiopodes, les vertébrés (coquilles d'œuf). Les relations évolutives entre prismes et nacre sont également fascinantes, la nacre pouvant quelquefois être considérée comme issue d'un partitionnement horizontal de prismes (Taylor, 1973 ; Carter and Clark, 1985), ou bien alors, les prismes, comme la fusion de tablettes de nacre colonnaire.

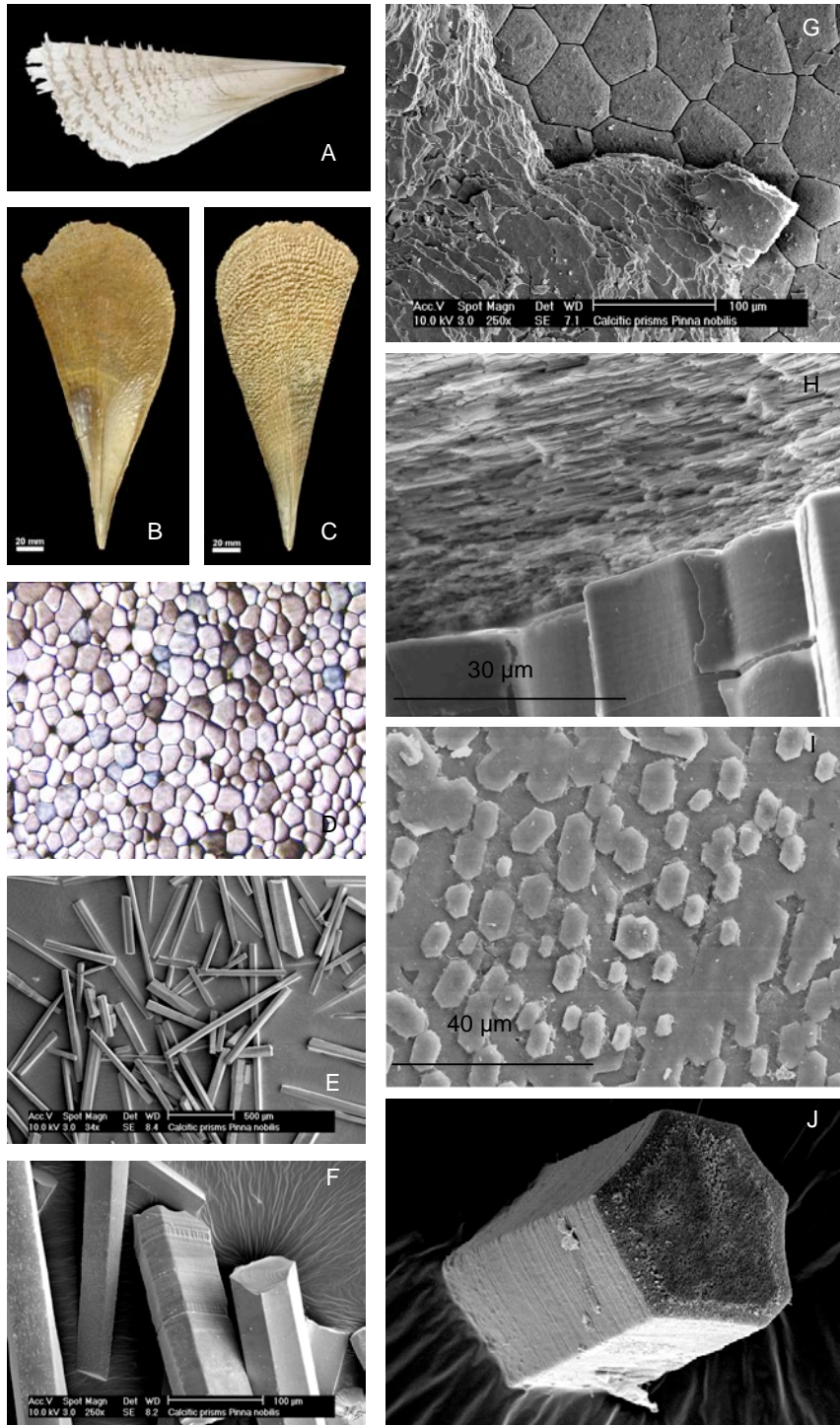


Fig. 9. La coquille de *Pinna nobilis*. A : spécimen juvénile (6 mois estimés). B : spécimen juvénile (2 ans), vue interne de la coquille. C : spécimen juvénile (2 ans) vue externe de la coquille. D : couche prismatique, section vue en lumière polarisée analysée. E : prismes isolés par hypochorite de sodium. F : détail de prismes isolés. G : interface couche prismatique, couche nacrée, vue en plan. H : interface couche prismatique (bas)-couche nacrée (haut) en section. I : nacre, vue en plan. J : prisme isolé.



## c. Les protéines coquillères acides

### c.1. Travaux publiés

Depuis une quinzaine d'années, j'ai été auteur principal ou co-auteur de 14 articles ayant trait aux matrices coquillères du modèle *Pinna nobilis*. Ces articles sont les suivants :

1. Cuif, J. P., *et al.*, 1991. In "Mechanisms & Phylogeny of Mineralization in Biological Systems" (S. Suga & H. Nakahara eds.), Springer Verlag, Tokyo: 391-395.
2. Marin, F. *et al.*, 1994. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 318, Sér. II: 1653-1659.
3. Marin, F. *et al.*, 1999. *Geol. Mijnbouw*, 78 (2): 135-139.
4. Marin, F. *et al.*, 2000. *J. Biol. Chem.*, 275 (27): 20667-20675.
5. Marin, F. *et al.*, 2001. *Prot. Expres. Purif.*, 23: 175-179.
6. Marin, F. *et al.*, 2003. *Prot. Expres. Purif.*, 30 (2): 246-252.
7. Marin, F., 2003. *The Scientific World J.*, 3: 342-347.
8. Marin, F. *et al.*, 2003. *Mémoires de l'Institut Océanographique Paul Ricard*: 77- 90.
9. Marin, F. and Luquet, G., 2005. *Mater. Sci. Engineer. C*, 25: 105-111.
10. Marin, F., *et al.*, 2005. *J. Biol. Chem.*, 280 (40): 33895-33908.
11. Pokroy, B., *et al.*, 2006. *J. Struct. Biol.*, 155: 96-103.
12. Pokroy, B., *et al.*, 2007. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104 (18): 7337-7341.
13. Marin, F., *et al.*, 2007. In *Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Symposium on Biomineralization, Editorial Universitaria, Santiago de Chile*: 281-288.
14. Marin, F., *et al.*, 2007. *Biomater.*, 28: 2368-2377.

Dans ce paragraphe, j'expose de manière succincte les données acquises dans cinq des papiers, les articles 2, 4, 6, 10 et 14. Ces articles décrivent en premier lieu certaines propriétés biochimiques des matrices associées à la nacre et aux prismes (article 2, 4, 10), puis caractérisent une protéine moyennement acide de la couche nacrée, la mucoperline (articles 4 et 6), et deux protéines très acides de la couche prismatique, la caspartine et la calprismine (articles 10 et 14).

### c.2. Matrices coquillères: article 2

Résultant de mon travail de thèse, cet article décrit pour la première fois les caractéristiques électrophorétiques (au Bleu de Coomassie, au nitrate d'argent, au Bleu Alcian) des matrices coquillères acido-solubles extraites de la couche prismatique et de la couche nacrée de *Pinna nobilis* et *Pinctada margaritifera*. De plus, l'article présente des données de comparaisons sérologiques, établies à partir d'anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre les matrices acido-solubles de prismes et de nacre chez ces deux espèces, et testés de manière croisée par ELISA. Les conclusions de l'article sont :

\* *Présence de constituants discrets (de 10 à plus de 50 kDa) et polydisperses dans les matrices. Les matrices de prismes montrent plus de macromolécules discrètes.*

\* *Les matrices de prismes et de nacre ont des patrons électrophorétiques différents : celles associées aux prismes sont plus acides (coloration Bleu Alcian).*

\* *Les 2 types de matrices possèdent des déterminants antigéniques (épitopes) communs : par comparaison sérologique, on retrouve un résultat que Weiner (1983) avait obtenu par chromatographie.*

Cet article préliminaire avait défriché le terrain, en quelque sorte. Il restait à analyser de manière plus détaillée les constituants macromoléculaires des matrices de *Pinna nobilis*. Rappelons qu'au moment de la parution de cet article (1994), seuls quelques fragments de

séquences de protéines de coquille étaient connus, à travers les articles de Donachy *et al.* (1992) sur *Crassostrea virginica* et de Keith *et al.* (1993) sur *Mytilus edulis*.

### **c.3. La mucoperline : articles 4 et 6**

Le travail sur la mucoperline, protéine de la nacre de *Pinna nobilis*, avait été l'occasion d'appliquer un grand nombre de techniques de biologie moléculaire : construction de banque, criblages, clonage et sous-clonage, analyse de restriction, sur-expression et purification de la protéine recombinante.

Dans un premier temps, j'ai construit plusieurs banques (*Mytilus edulis*, *Macoma balthica*) avant de construire une banque d'ADN complémentaire d'expression de manteau calcifiant de *Pinna nobilis* à l'aide d'un kit Stratagene. Une fois la banque amplifiée et testée, j'ai effectué son criblage, à l'aide des anticorps produits durant ma thèse (anti-matrice prismes de *Pinna* ; anti-matrice nacre de *Pinna*). Cette opération m'a permis d'isoler une douzaine de clones positifs, qui ont ensuite été recriblés (criblage secondaire et tertiaire). Trois d'entre eux, correspondant à des inserts de 2,2 kb, ont été analysés par restriction et séquencés. Du fait de la taille de l'insert et de la présence d'unités répétées interdisant un séquençage par « primer walking », j'ai été amené à digérer ces inserts pour obtenir des fragments de taille différente (kit Erase-A-Base), qui ont été sous-clonés et re-séquencés. Une fois la séquence obtenue, la protéine correspondante a été sur-exprimée dans un vecteur bactérien. Cette protéine a ensuite subi une double purification (sur colonne Ni-NTA, Qiagen, et par électrophorèse préparative Bio-Rad). La protéine recombinante a été utilisée dans des tests *in vitro* et a servi à la production d'anticorps polyclonaux chez un lapin. Ces anticorps ont été utilisés pour quantifier la protéine dans les extraits de matrice coquillière, par dot-blot et ELISA, pour vérifier sa présence sur Western-blot, et pour localiser la protéine directement dans la coquille. Ce travail de longue haleine (3 ans et demi), qui équivaldrait presque à refaire une nouvelle thèse, a été récompensé par la publication de ce qui reste à ce jour un de mes meilleurs papiers, le JBC de 2000. Les conclusions de cet article (et de l'article qui l'accompagne, publié trois ans après) sont :

*\* L'identification d'une protéine entièrement nouvelle. Cette protéine de 67 kDa et 636 résidus se compose de trois domaines : un court domaine N-terminal (probablement incomplet), un domaine central constitué de 13 unités en tandem de 31 résidus chacune, un domaine C-terminal modérément acide. Le domaine central est enrichi en proline et sérine et possède de nombreux sites de glycosylations possibles. Elle est acide (pI théorique 4,9). Bien que cette protéine ne présente que des homologues très limités, la présence d'unités en tandem, riches en proline et sérine, ainsi que la glycosylation démontrée de cette protéine, la range dans la vaste famille des mucines, protéines constitutives des mucus. J'ai par conséquent décidé de nommer cette protéine mucoperline.*

*\* Cinq techniques différentes (ELISA, dot-blot, Western-blot, immuno-histologie sur coquille, et criblage tertiaire d'un mélange de clones codant la mucoperline et de clones négatifs) indiquent que cette protéine est spécifique de la couche nacrée chez *Pinna nobilis* et qu'elle est totalement absente de la couche prismatique. C'est l'une des rares fois où la présence d'une protéine est montrée directement dans la coquille. C'est aussi un des rares exemples où il a été montré qu'une protéine est spécifique d'une microstructure coquillière chez une espèce donnée.*

\* Les tests ELISA utilisant l'anticorps montrent que cette protéine est plutôt intracristalline, car non dégradée par un traitement à l'hypochlorite de sodium. Les colorations immunohistologiques sur coquilles suivies d'observations en microscopie optique montrent qu'elle est localisée sur le côté des tablettes de nacre (localisation inter-tablettaire ou péri-tablettaire) et non pas entre les lamelles superposées (localisation inter-lamellaire). Depuis, cette localisation a été confirmée par immunogold suivie d'une observation en MEB en mode d'électrons rétro-diffusés, ainsi que la figure 10 le montre.

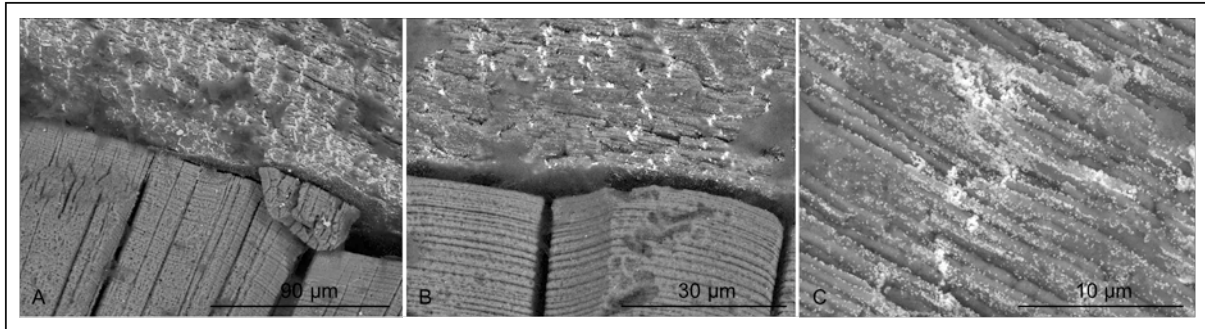


Fig. 10. Immunolocalisation de la mucoperline sur section de coquille de *Pinna nobilis*. La mucoperline est localisée par des points blancs en microscopie à balayage en mode d'électrons rétro-diffusés (cf. Marin *et al.*, 2007). A : transition prismes (en bas) / nacre (en haut). La mucoperline est localisée uniquement dans la couche nacré. B : même chose, plus fort grossissement. C : A fort grossissement, la mucoperline a une localisation « péri-tablettaires », plutôt qu'inter-lamellaire. (Marin, données non publiées).

Ce travail a mis en évidence le rôle d'une mucine dans la minéralisation de la coquille de mollusque, ce qui constitue une première. Chez les métazoaires, les mucines sont impliquées dans de nombreuses fonctions, telles que la lubrification, la protection de tissus épithéliaux contre des agressions chimiques (mucines gastriques) ou contre des pathogènes (mucines pulmonaires). Elles ont aussi un rôle dans la signalisation cellulaire, et notamment dans les processus de cancérisation (Bafna *et al.*, 2008). Elles peuvent être sécrétées ou fixées aux membranes cellulaires. Les mucines sont caractérisées par leur structure primaire dont la partie centrale est constituée d'unités en tandem très glycosylées riches en sérine (ou thréonine) et proline, et dont les extrémités N-et C-terminales comportent des résidus cystéine permettant la polymérisation en un gel (Fig. 11).

Chez les vertébrés, et en particulier chez l'homme, un lien direct peut être établi entre les mucines et les processus de calcification, dans au moins trois organes remarquables par leurs propriétés minéralisantes ou inhibitrices de minéralisation : la cavité buccale, la vésicule biliaire, la vessie. La cavité buccale est un lieu où l'on trouve à la fois une minéralisation très contrôlée, celle des dents, et un fluide très inhibiteur de minéralisation, la salive. La salive est un fluide très sursaturé vis à vis de l'ion calcium et, en l'absence d'inhibiteurs, ce fluide devrait normalement induire des précipitations spontanées. Ces précipitations spontanées ne se produisent heureusement pas car la salive contient de nombreux inhibiteurs organiques macromoléculaires. Des mucines salivaires (libres en solution) font partie de ces inhibiteurs. De plus, ces mêmes mucines se fixent à l'hydroxylapatite des dents (Tabak *et al.*, 1985 ; Nieuw-Amerongen *et al.*, 1989 ; Tabak, 1995) avec une assez forte affinité. Elles empêchent ainsi leur déminéralisation (Meyer-Lueckel *et al.*, 2006). La vésicule biliaire est un lieu où des sels biliaires et sels minéraux ont des concentrations élevées. En situation normale, des inhibiteurs macromoléculaires empêchent toute minéralisation (Afdhal *et al.*, 1995). En situation pathologique (lithiase biliaire), les mucines, en association avec des protéines liant le

calcium, sont impliquées dans la formation de concrétions minéralisées (Lechene de la Porte *et al.*, 1996). Enfin, dans la vessie, l'urine est un fluide très sursaturé vis à vis de l'ion calcium. L'urine comprend un cortège de plusieurs protéines, parmi lesquelles les mucines urinaires (telles que la mucoprotéine de Tamm-Horsfall), qui jouent un rôle prépondérant dans l'inhibition de la précipitation d'oxalate de calcium (Grases and Llobera, 1998). Que l'expression des mucines urinaires soit dérégulée a pour conséquence la formation de calculs urinaires.

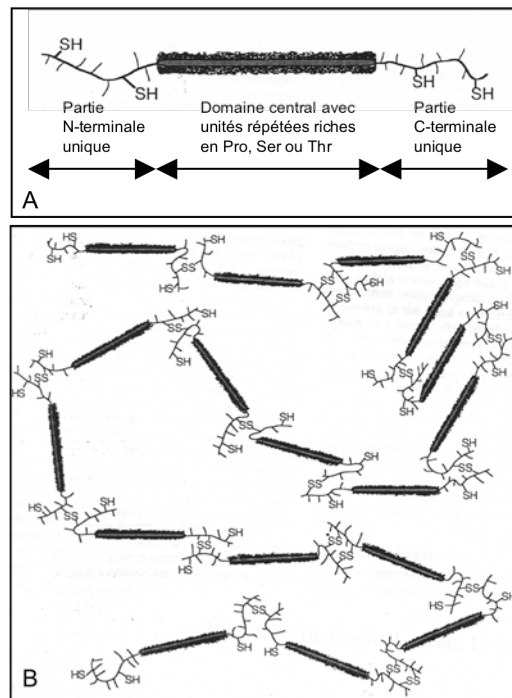


Fig. 11. Mucine sécrétée. A. Structure du monomère. B. Polymérisation du monomère en un gel, par l'intermédiaire de ponts disulfures présents en extrémités N- et C-terminales (Adapté de Gum, 1992).

Chez les métazoaires protostomiens, ou encore chez les vertébrés dits « inférieurs », les mucines ont été peu ou pas caractérisées du point de vue moléculaire (structure primaire). On parle alors de mucus au sens large. Les liens entre mucus et calcification ont été établis dans un certain nombre de cas : chez les coraux scléractiniaires, Goreau (1956) mit en évidence le lien entre matrice calcifiante et mucopolysaccharides. Les mollusques ont fait l'objet d'un certain nombre de travaux associant la production de mucus et la calcification (Hillman, 1968 ; Prezant, 1990 ; Davies and Hutchinson, 1995 ; Taylor *et al.*, 1999 ; Braithwaite *et al.*, 2000). Chez les annélides, Thorp *et al.* (1991) établirent une corrélation négative entre la production de mucus et la calcification. Enfin, Humbert *et al.* (1986, 1989) mirent en évidence le rôle direct du mucus intestinal de l'anguille *Anguilla anguilla* dans la précipitation de rhomboèdres de calcite. Clairement, les mucines jouent des rôles importants – quoique largement sous-estimés – dans les biominéralisations carbonatées, et il semble bien qu'elles possèdent cette dualité de fonction, inhibition ou nucléation, en rapport avec leur état physique (soluble/insoluble), c'est à dire, leur degré de polymérisation.

#### c.4. Protéines très acides des prismes: articles 10 et 14

Des travaux précédents, il ressort que la mucoperline est une protéine modérément acide de la nacre de *Pinna nobilis*. Il n'en est pas de même pour les protéines intracristallines des prismes calcitiques. Ces prismes se singularisent en effet par un cortège particulier de protéines extrêmement acides.

J'ai analysé la matrice des prismes de *Pinna nobilis* en appliquant une autre stratégie que celle développée pour la caractérisation de la mucoperline. Cette fois, il s'agissait de caractériser biochimiquement la matrice acido-soluble de prismes, par son extraction et son analyse sur gel d'électrophorèse.

J'ai mis au point une technique de purification des protéines majeures de la matrice acido-soluble, sur la base d'une série d'observations faites au cours de ma longue pratique des protéines associées aux tissus minéralisés. Des analyses spectrales UV sur des extraits de coquilles montrent que les protéines associées absorbent peu à 280 nm, longueur d'onde habituellement utilisée dans les détecteurs UV en chromatographie. Des analyses d'acides aminés montrent en effet que ces protéines sont appauvries en tyrosine, tryptophane, et dans une moindre mesure, en phénylalanine, les 3 acides aminés qui absorbent à cette longueur d'onde. Sur gel d'électrophorèse, après coloration à l'argent, ces protéines ne se distinguent pas toujours très bien du fond polydispersé. Par contre, ces protéines sont très immunogènes. Tous nos anticorps polyclonaux obtenus à partir d'extraits coquilliers injectés à des lapins ont toujours eu des titres élevés (en général supérieur à 1/1000<sup>ème</sup>). De plus, sur Western blot, une partie importante du signal produit par les anticorps est localisée sur les macromolécules discrètes de la matrice, et non sur les constituants polydispersés. Par conséquent, un Western blot donne souvent une image plus contrastée (et un rapport signal/bruit de fond amélioré) qu'une simple coloration à l'argent ou au CBB. J'ai donc utilisé l'ensemble de ces propriétés pour purifier les protéines de matrice calcifiante de la manière suivante:

- une électrophorèse préparative à la suite de laquelle des fractions sont récupérées « en aveugle » sur collecteur de fraction.
- une détection par dot-blot de chaque fraction, en utilisant un anticorps polyclonal dirigé contre la matrice totale. Cette technique permet de visualiser les tubes dans lesquels la protéine d'intérêt est éluée.
- La concentration par ultrafiltration des volumes des fractions d'intérêt réunies, leur dialyse, puis leur lyophilisation. Les fractions séparées peuvent ensuite être caractérisées biochimiquement, et, lorsqu'elles sont en quantité suffisante, peuvent servir à la production d'anticorps polyclonaux chez le lapin ou le cochon d'Inde.

La technique a été décrite par le biais de deux articles techniques : Marin *et al.*, 2001. Prot. Expres. Purif., 23 : 175-179, et Marin, F., 2003. The Scientific World Journal, 3: 342-347. Cette technique m'a permis de caractériser deux nouvelles protéines, la caspartine et la calprismine, dont les caractéristiques biochimiques ont été décrites dans Marin *et al.*, 2005. J. Biol. Chem., 280 (40): 33895-33908. La purification par électrophorèse préparative m'a permis en outre d'obtenir un anticorps polyclonal contre la caspartine, et, tout récemment, contre la calprismine.

\* *La caspartine et la calprismine sont deux protéines solubles intracristallines acides de masses moléculaires apparentes respectives 17 et 38 kDa.*

\* *La caspartine est extrêmement enrichie en résidus acides (68% Asx), tandis que la calprismine est constituée majoritairement des résidus Ala, Asx, Thr et Pro, ces 4 résidus constituant 55% de la séquence.*

\* *Toutes deux fixent le calcium, faiblement, et de manière très labile.*

- \* La calprismine est glycosylée, la caspartine ne l'est pas.
- \* La partie N-terminale séquencée de la calprismine (20% de la séquence) est acide et révèle un motif à 4 résidus cystéine.
- \* La caspartine est un puissant inhibiteur de précipitation de carbonate de calcium *in vitro*.
- \* La caspartine interagit avec la formation de calcite *in vitro*. En particulier, la protéine a un effet sur la cristallisation, visible à une concentration de l'ordre de 0,25 µg/ml. Pour des concentrations comprises entre 1 et 3 µg/ml, la caspartine provoque la formation de gros monocristaux feuilletés, et d'aggrégats polycristallins. Au delà de cette concentration, elle inhibe la cristallisation.
- \* La caspartine est concentrée dans les prismes, mais est également présente dans la nacre de *Pinna nobilis*, mais en quantité beaucoup plus faibles (7 à 8 fois moins).
- \* En conditions non dénaturantes (absence de SDS et de β-mercapto-éthanol), la caspartine polymérise (s'auto-aggrège).
- \* La caspartine est localisée à la fois sur le pourtour des prismes et à l'intérieur de ceux-ci. Sur le pourtour, elle forme un film, à l'interface entre la phase minérale calcitique et la gaine péripriamique hydrophobe insoluble. A l'intérieur des prismes, la caspartine est uniformément répartie et ne semble pas suivre de structure particulière.

Une illustration de l'acidité de la matrice acido-soluble de prismes de *Pinna nobilis* est fournie par les électrophorèses bidimensionnelles (Fig. 12).

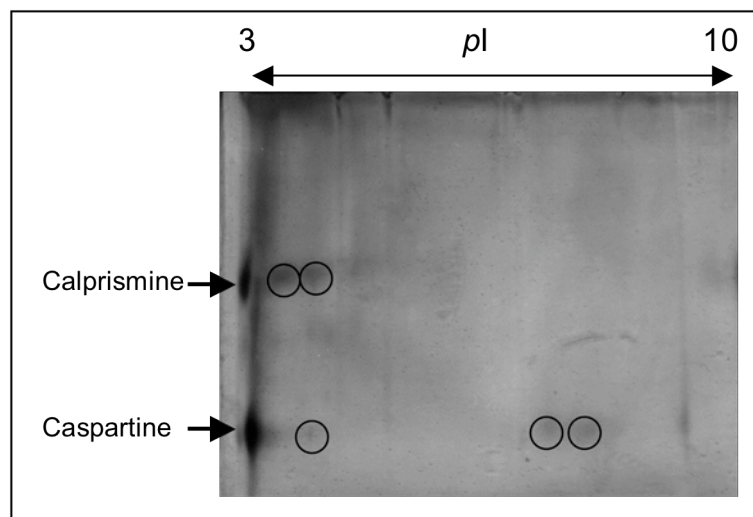


Fig. 12. Gel 2D de la matrice acido-soluble de prismes de *Pinna nobilis* (donnée non publiée). Gel coloré au nitrate d'argent. Bien que la caspartine et la calprismine représentent les deux protéines majoritaires de la matrice, d'autres protéines (ou isoformes de ces deux protéines ?) sont également présentes en très faible quantité (spots entourés). La caspartine et la calprismine migrent sur la bordure du gel, ce qui montre, une fois de plus, leur très forte acidité.

Nos résultats publiés en 2005 ont été complétés par un article publié un an et demi après, dans lequel j'explique de manière détaillée la technique d'immunogold appliquée à des biominéralisations carbonatées. Cet article (Marin, F., *et al.*, 2007. *Biomaterials*, 28: 2368-2377) présente également des données de séquences partielles de la caspartine, obtenus par nos collègues israéliens du Technion (Haïfa). En dernier lieu, je propose un modèle très schématique des fonctions possibles de la caspartine dans la minéralisation des prismes calcitiques chez *Pinna nobilis*. La caspartine intracristalline agirait comme un nucléateur de

nanograins, qui s'aggloméreraient à la surface du prisme en croissance. La caspartine péri-prismatique guiderait les prismes dans leur croissance selon l'axe *c*, et servirait de piège polyanionique à cations. On peut aussi imaginer que la construction de prismes soit régie par les tensions superficielles dans une émulsion liquide-liquide précédant la formation des prismes, hypothèse formulée par Checa *et al.* (2005). Si tel est le cas, la caspartine pourrait stabiliser l'émulsion, à l'interface entre la phase hydrophobe et la phase hydrophile. Clairement, la caractérisation de la caspartine, de la calprismine, et, de manière générale, de toutes les protéines mêmes minoritaires de la matrice de prismes calcitiques, doit être poursuivie pour mieux comprendre leurs rôles sans doute multiples dans la minéralisation.

C'est ce à quoi nous nous employons par le biais du contrat Européen BioMintec. Notre objectif est, à plus long terme, de comprendre pourquoi les matrices coquillières associées à la calcite sont plus acides que celles associées à l'aragonite. Une approche protéomique, combinée à une approche de biologie moléculaire (banque d'ADN complémentaire), devrait permettre d'identifier la majeure partie des protéines – même les protéines mineures -associées aux microstructures prismatiques chez *Pinna nobilis*.

## V.5. ORIGINE ET EVOLUTION DES PROTEINES ACIDES DANS LA MINERALISATION

### a. Hypothèses

Les exemples illustrés par la mucoperline, d'une part, et par la caspartine et calprismine d'autre part, montrent que le groupe des protéines acides est beaucoup moins monolithique que ne le laisse envisager les modèles cités dans le chapitre précédent. Les protéines acides continuent d'occuper un rôle central dans la minéralisation carbonatée. Ce sont elles qui font « le lien entre le monde inorganique carbonaté et le monde organique ». Ces protéines ne forment pas un groupe homogène, et il semble exclu qu'elles dérivent d'une protéine ancestrale unique. Comme indiqué au début de ce chapitre, elles peuvent être provisoirement sub-divisées en 2 «paquets», l'un comprenant les protéines très acides ( $pI < 4,5$ ) et l'autre, celles qui le sont modérément ( $4,5 < pI < 7$ ).

Les protéines modérément acides forment elles-même un groupe hétérogène (Marin *et al.*, 2008), dans lequel la plupart des membres sont multi-domaines, ce qui suggère des provenances différentes et une construction de ces protéines par recombinaison d'exon (exon shuffling). A ce jour, les domaines ou protéines que l'on peut rattacher avec certitude à des familles connues sont les suivants : les deux sous-domaines de la nacréine flanquant le domaine riche en glycine appartiennent aux anhydrases carboniques. Les domaines hydrophobes de la MSI60 sont apparentés à la fibroïne de la soie. La totalité de la séquence de la protéine détectée dans la coquille de la planorbe *Biomphalaria glabrata* est sans conteste une dermatopontine (encore appelée TRAMP, Tyrosine-Rich Acidic Matrix Protein), une protéine de matrice extracellulaire se liant aux décorines. La totalité de la protéine codée par le gène Pfty1 chez l'huître perlière est une tyrosinase. Enfin, bien sûr, le domaine central de la mucoperline est affilié aux mucines. Quant aux autres protéines modérément acides, telles que la famille N14/N16/pearline, AP7 ou AP24, leurs affinités avec d'autres protéines connues restent incertaines.

Les protéines très acides, celles qui sont enrichies en acide aspartique, sont presque toujours associées à la calcite plutôt qu'à l'aragonite. Cette propriété apparente remarquable reste pour le moment inexpiquée. Nos études réalisées sur la caspartine montrent cependant que la réalité pourrait être plus nuancée : certaines protéines modérément acides de la nacre peuvent être rendues beaucoup plus acides par leurs modifications post-traductionnelles ; une protéine très acide telle que la caspartine est également associée à l'aragonite, mais dans des proportions beaucoup plus faibles que dans la couche calcitique. On peut donc se poser la question si le polymorphe cristallin (calcite/aragonite) n'est pas contrôlé par des concentrations plus ou moins élevées en protéines très acides ?

Une des difficultés concernant les protéines très acides des coquilles est qu'elles contiennent des modules de faible complexité, notamment des modules poly-Asp, ou des motifs répétés Asp-Ser. De ce fait, leur alignement avec des protéines acides connues est problématique : il introduit un biais en rapprochant faussement des protéines qui n'ont aucune filiation. Cependant, leur richesse en acide aspartique, le fait qu'elles possèdent beaucoup de sites potentiels de fixation du calcium avec une affinité modérée, sont autant d'éléments qui rapprochent ces protéines coquillières de certaines protéines riches en acide aspartique du réticulum endoplasmique, en particulier, les calséquestrines ou encore les calréticulines. Les premières sont particulièrement enrichies dans les cellules musculaires. Elles fixent le calcium en grande quantité et permettent de réguler les échanges d'ions calcium avec le cytosol. Les secondes, fixant également une grande quantité d'ions calcium dans leur domaine C-terminal, sont des protéines multifonctions : elles ont un rôle de chaperones en permettant le repliement



correct des protéines du réticulum ; elles se lient aux fractions saccharidiques des glycoprotéines grâce à leur domaine lectine ; dans le noyau, elles ont aussi un rôle dans la régulation de la transcription. Dans un article de congrès (écrit en 2001 et publié en 2003), j'avais émis l'hypothèse que les protéines très acides des matrices coquillères pouvaient provenir de protéines intracellulaires de type calséquestrines (Marin *et al.*, 2003). Je reliais cette possibilité au fait que la régulation du calcium intracellulaire par des protéines de type calséquestrine devait avoir précédé la régulation de la minéralisation par une matrice acide, selon le schéma évolutif très général esquissé par Lowenstam et Margulis à l'orée des années 80 (Lowenstam and Margulis, 1980). En 2005, Gotliv *et al.*, dans leur article présentant la famille «Asprich», montraient que le domaine acide 1 de ces protéines avait 44% d'identité avec une calséquestrine, ce qui renforçait la possibilité d'une filiation entre ces deux groupes de protéines. Publié dans le même volume que mon papier, un article de Simkiss (2003) faisait état de la similitude entre la voie de sécrétion des protéines en général et la voie de synthèse des coccolithes. Cet article pointait du doigt entre autres choses le rôle de chaperone des calréticulines. Il est intéressant de constater qu'en 2003, est sorti un papier de Somogyi *et al.*, qui met en évidence pour la première fois, une calréticuline de la matrice extracellulaire de pré-dentine d'incisive de rat. Ce papier a donné une consistance certaine à l'hypothèse d'une « externalisation » (passage du domaine intra- au domaine extracellulaire) de protéines de type calséquestrine ou calréticulines, qui seraient devenues alors constituants des matrices calcifiantes. Bien que, à ma connaissance, nos hypothèses soient restées à l'état de limbes, elles mériteraient qu'on s'y arrête de nouveau.

Les protéines très acides sont-elles contraintes évolutivement ? Encore une fois, nous ne pouvons donner que des réponses très nuancées. Du fait de leur rôle central dans la minéralisation, on serait intuitivement amené à penser que ces protéines sont très conservées. Cependant, nos données obtenues à partir de l'anticorps anti-caspartine testé sur de nombreuses matrices d'une part (Marin *et al.*, 2007), et les quelques données de séquences de la caspartine d'autre part (Marin *et al.*, 2007), tendraient à montrer que de courts motifs protéiques de quelques acides aminés sont utilisés dans plusieurs protéines matricielles. Il est donc possible que les contraintes évolutives s'exercent sur de courts segments (de quelques acides aminés) de ces protéines et que d'autres domaines sont beaucoup moins contraints, donc plus sensibles à des mutations rapides, qui n'affectent pas la fonction de ces protéines. Les domaines protéiques contraints pourraient, par exemple, être les domaines impliqués dans la reconnaissance d'une surface minérale carbonatée, calcite ou aragonite, les domaines moins contraints ayant le rôle de « spacers ».

### **b. Perspectives : phage display**

On peut aussi envisager les contraintes évolutives exercées sur les protéines très acides d'un point de vue radicalement différent. En effet, la reconnaissance entre une surface minérale carbonatée et une protéine n'a pas le même degré de spécificité que la reconnaissance entre une enzyme et son substrat, ou un anticorps et son antigène. Ceci peut être démontré expérimentalement par la technique combinatoire appelée « phage display » ou « peptide display ». Cette technique, utilisée dans le domaine des semi-conducteurs et des matériaux composites organo-minéraux, permet de sélectionner des peptides en fonction de leur plus ou moins grande affinité pour une surface minérale. La technique (disponible dans le commerce) utilise une banque de bactériophages modifiés génétiquement, comportant une boucle peptidique externe, codée par l'ADN phagique. C'est cette boucle qui peut s'amarrer à une surface minérale. Pour une boucle peptidique de 7 résidus, la banque comprend toutes les combinaisons possibles, soit  $20^7$  combinaisons en prenant les 20 acides aminés standard. Par

des cycles successifs d'éluion/amplification (par infection d'une souche bactérienne), on peut ainsi arriver à sélectionner les peptides qui ont la plus forte affinité pour la phase minérale testée. Des essais de ce type ont été réalisés sur du carbonate de calcium (Belcher and Gooch, 2000). Les résultats montrent que de nombreux peptides dont les séquences sont très différentes peuvent s'adsorber sur une surface minérale carbonatée avec de fortes affinités, voisines les unes des autres. Ces expériences, qui à ma connaissance n'ont pas été reproduites sur des surfaces en carbonate de calcium, suggèrent que les domaines protéiques se liant à la surface minérale ne sont peut-être pas très contraints évolutivement et que l'interaction minéral/peptide autorise de nombreuses possibilités « interchangeables », contrairement à une reconnaissance anticorps-antigène, ou enzyme-substrat. Bien entendu, cela reste à montrer expérimentalement, en reproduisant les expériences de Belcher et Gooch d'une part, et en identifiant et comparant des séquences de protéines acides ayant des fonctions similaires, d'autre part. De faibles homologies de séquences suggéreraient de faibles contraintes évolutives. C'est ce à quoi nous nous emploierons au cours des prochaines années.

### **c. Références bibliographiques**

- Addadi, L., and Weiner, S. (1985). Interactions between acidic proteins and crystals: stereochemical requirements in biomineralization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4110-4114.
- Addadi, L., Moradian, J., Shay, E., Maroudas, N. G., and Weiner, S. (1987). A chemical model for the cooperation of sulfates and carboxylates in calcite crystal nucleation: relevance to biomineralization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 2732-2736.
- Afdhal, N. H., Ostrow, J. D., Koehler, R., Niu, N., Groen, A. K., Veis, A., Nunes, D. P., and Offner, G. D. (1995). Interaction of bovine gallbladder mucin and calcium-binding protein: Effect on calcium phosphate precipitation. *Gastroenterology* **109**, 1661-1672.
- Albeck, S., Aizenberg, J., Addadi, L., and Weiner, S. (1993). Interactions of various skeletal intracrystalline components with calcite crystals. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 11691-11697.
- Bafna, S., Singh, A. P., Moniaux, N., Eudy, J. D., Meza, J. L. and Batra, S. K. (2008). MUC4, a multifunctional transmembrane glycoprotein, induces oncogenic transformation of NIH3T3 mouse fibroblast cells. *Cancer Res.* **68**, 9231-9238.
- Belcher, A. M., and Gooch, E. E. (2000). Protein components and inorganic structure in shell nacre. In "Biomineralization - From Biology to Biotechnology and Medical Application" (E. Bäuerlein, Ed.), pp. 221-249. Wiley-VCH, New-York.
- Boggavarapu, S., Chang, J., and Calvert, P. (2000). A test for mineralization inhibition for calcium salts using agarose hydrogels. *Mater. Sci. Eng. C* **11**, 47-49.
- Boggild, O. (1930). The Shell Structure of the Mollusks. *D. Kgl. Danske Videnskab. Selsk. Skrifter, Naturvidensk. Og Mathem. Afdel.* **9**, 231-326.
- Borbas, J. E., Wheeler, A. P., and Sikes, C. S. (1991). Molluscan shell matrix phosphoproteins: correlation of degree of phosphorylation to shell mineral microstructure and to *in vitro* regulation of mineralization. *J. Exp. Zool.* **258**, 1-13.
- Braithwaite, C. J. R., Taylor, J. D., and Glover, E. A. (2000). Marine carbonate cements, biofilms, biomineralization, and skeletogenesis: Some bivalves do it all. *J. Sedim. Res.* **70**, 1129-1138.
- Carter, J. G., and Clark, G. R. II (1985). Classification and phylogenetic significance of mollusk shell microstructures. In "Mollusk, Note for a Short Course" (T. W. Broadhead, Ed.), pp. 50-71. Studies in Geology 13, Dpt. of Geological Sciences, University of Tennessee Press, Tennessee.
- Checa, A. G., Rodriguez-Navarro, A. B., and Esteban-Delgado, F. J. (2005). The nature and formation of calcitic columnar prismatic shell layers in pteriomorphian bivalves. *Biomaterials* **26**, 6404-6414.
- Cölfen, H. (2007). Bio-inspired mineralization using hydrophilic polymers. *Top. Curr. Chem.* **271**, 1-77.
- Cuif, J.-P., Dauphin, Y., Denis, A., Gaspard, D., and Keller, J. P. (1983). Etude des caractéristiques de la phase minérale dans les structures prismatiques du test de quelques mollusques. *Bull. Mus. Natn. Hist. Nat. Paris* 4e sér. **5**, 679-717.
- Cuif, J.-P., Gautret, P., and Marin, F. (1991). Correlation between the size of crystals and the molecular weight of organic fractions in the soluble matrices of mollusc, coral and sponge carbonate skeletons. In "Mechanisms and Phylogeny of Mineralization in Biological Systems" (S. Suga, and H. Nakahara, Eds.) pp. 391-395. Springer-Verlag, Tokyo.

- Crenshaw, M. A. (1972). The soluble matrix from *Mercenaria mercenaria* shell, *Biom mineralization* **6** (1972) 6-11.
- Davies, M. S. and Hutchinson, S. J. (1995). Crystalline calcium in littorinid mucus trail. *Hydrobiologia* **309**, 117-121.
- Degens, E. T., Spencer, D. W. and Parker, R. H. (1967). *Comp. Biochem. Physiol.* **20**, 553-579.
- Donachy, J. E., Drake, B., and Sikes, C. S. (1992). Sequence and atomic force microscopy analysis of a matrix protein from the shell of the oyster *Crassostrea virginica*, *Mar. Biol.* **114**, 423-428.
- Endo, H., Takagi, Y., Ozaki, N., Kogure, T., and Watanabe, T. (2004). A crustacean Ca<sup>2+</sup>-binding protein with a glutamate-rich sequence promotes CaCO<sub>3</sub> crystallization. *Biochem. J.* **384**, 159-167.
- Giribet, G. (2008). Bivalvia. In « Phylogeny and Evolution of the Mollusca » (W. F. Ponder and D. R. Lindberg, Eds.) pp 105-141. University of California Press, Berkeley.
- Glimcher, M. J. (1960). Specificity of the molecular structure of organic matrices in mineralization. In « Calcification in Biological Systems » (R. F. Sognaes, Ed.) pp 421-487. Publication n° 64 of the American Association for the Advancement of Science, Washington, DC.
- Goreau, T. (1956). Histochemistry of mucopolysaccharide-like substances and alkaline phosphatase in Madreporaria. *Nature* **177**, 1029-1030.
- Gotliv, B.-A., Addadi, L., and Weiner, S. (2003). Mollusk shell acidic proteins: in search for individual functions. *ChemBiochem.* **4**, 522-529.
- Gotliv, B.-A., Kessler, N., Sumerel, J. L., Morse, D. E., Tuross, N., Addadi, L., and Weiner, S. (2005). Asprich: a novel aspartic acid-rich protein family from the prismatic shell matrix of the bivalve *Atrina rigida*. *ChemBioChem* **6**, 304-314.
- Grases, F. and Llobera, A. (1998). Experimental model to study sedimentary kidney stones. *Micron* **29**, 105-111.
- Grégoire, C. (1972). Structure of the molluscan shell. In "Chemical Zoology, Vol. VII: Mollusca" (M. Florkin, and B. T. Scheer, Eds.), pp. 45-102. Academic Press, New York.
- Gum, J. R. Jr. (1992). Mucin genes and the proteins they encode: structure, diversity, and regulation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **7**, 557-564.
- Halloran, B. A., and Donachy, J. E. (1995). Characterization of organic matrix macromolecules from the shell of the Antarctic scallop, *Adamussium colbecki*. *Comp. Biochem. Physiol. B* **111**, 221-231.
- Hare, P. E. (1963). Amino acids in the proteins from aragonite and calcite in the shells of *Mytilus californianus*. *Science* **139**, 216-217.
- Hecker, A., Testenièrè, O., Marin, F., and Luquet, G. (2003). Phosphorylation of serine residues is fundamental for the calcium-binding ability of Orchestin, a soluble matrix protein from crustacean calcium storage structures. *FEBS Lett.* **535**, 49-54.
- Hillman, R. E. (1968). Histochemistry of mucosubstances in mantle of clam *Mercenaria mercenaria*. I. A glycosaminoglycan in first marginal fold. *Trans. Am. Microsc. Soc.* **87**, 361-367.
- Humbert, W., Kirsch, R. and Simonneaux, V. (1986). Is mucus involved in biocrystallization? Study of the intestinal mucus of the sea-water eel *Anguilla anguilla* L. *Cell. Tiss. Res.* **245**, 599-604.
- Humbert, W., Voegel, J. C., Kirsch, R., and Simonneaux, V. (1989). Role of intestinal mucus in crystal biogenesis: an electron-microscopical, diffraction and X-ray microanalytical study. *Cell Tiss. Res.* **255**, 575-583.
- Ikura, M. (1996). Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 14-17.
- Keith, J., Stockwell, S., Ball, D., Remillard, K., Kaplan, D., Thannhauser T., and Sherwood, R. (1993). Comparative analysis of macromolecules in mollusc shells. *Comp. Biochem. Physiol. B* **105**, 487-496.
- Kretsinger, R. H. (1976). Calcium-binding proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **45**, 239-266.
- Lechene de la Porte, P., Domingo, N., van Wijland, M., Groen, A. K., Ostrow, J. D., and Lafont, H. (1996). Distinct immuno-localization of mucin and other biliary proteins in human cholesterol gallstones. *J. Hepatol.* **25**, 339-348.
- Lowenstam, H. A., and Margulis, L. (1980). Evolutionary prerequisites for early Phanerozoic calcareous skeletons. *Biosystems* **12**, 27-41.
- Mann, S. (1988). Molecular recognition in biomineralization. *Nature* **332**, 119-124.
- Marie, B., Luquet, G., Pais De Barros, J. P., Guichard, N., Morel, S., Alcaraz, G., Bollache, L. and Marin, F. (2007). The shell matrix of the freshwater mussel *Unio pictorum* (Paleoheterodonta, Unionoida). Involvement of acidic polysaccharides from glycoproteins in nacre mineralization. *FEBS J.* **274**, 2933-2945.
- Marie, B., Luquet G., Bédouet, L., Milet C., Guichard, N., Medakovic, D., and Marin, F. (2008). Nacre calcification in the freshwater mussel *Unio pictorum*: carbonic anhydrase activity and purification of a 95-kDa calcium-binding glycoprotein. *ChemBiochem* **9**, 2515-2523.
- Marin, F. (2003). Molluscan shell matrix characterization by preparative SDS-PAGE. *The Scientific World J.* **3**, 342-347.

- Marin, F., Muyzer, G. and Dauphin, Y. (1994). Caractérisation électrophorétique et immunologique des matrices organiques solubles de deux Bivalves Ptériomorphes actuels, *Pinna nobilis* L. et *Pinctada margaritifera* (L.). *C. R. Acad. Sci. Paris II* **318**, 1653-1659.
- Marin, F., Gillibert, M., Westbroek, P., Muyzer, G. and Dauphin, Y. (1999). Evolution: disjunct degeneration of immunological determinants. *Geol. Mijnbouw* **78**, 135-139.
- Marin, F., Corstjens, P., De Gaulejac, B., De Vrind-De Jong, E. and Westbroek, P. (2000). Mucins and molluscan calcification : molecular characterization of mucoperlin, a novel acidic mucin-like protein of the nacreous shell-layer of the fan mussel *Pinna nobilis* (Bivalvia, Pteriomorpha). *J. Biol. Chem.* **275**, 20667-20675.
- Marin, F., Pereira, L., and Westbroek, P. (2001). Large-scale purification of molluscan shell matrix. *Prot. Express. Purif.* **23**, 175-179.
- Marin, F., Westbroek, P., and De Groot, K. (2003). Screening molluscan cDNA expression libraries with anti-shell matrix antibodies. *Prot. Express. Purif.* **30**, 246-252.
- Marin, F., Westbroek, P., and de Groot, K. (2003). The proteinaceous constituents of the shell of *Pinna nobilis* L. In « First International Meeting on the Mediterranean Fan-Shell *Pinna nobilis* » Mémoires de l'Institut Océanographique Paul Ricard, pp 77- 90. Paul Ricard Editions, Marseille.
- Marin, F., Luquet, G. (2005). Molluscan biomineralization: the proteinaceous shell constituents of *Pinna nobilis*. *Mater. Sci. Engineer. C* **25**, 105-111.
- Marin, F., Amons, R., Guichard, N., Stigter, M., Hecker, A., Luquet, G., Layrolle, P., Alcaraz, G., Riondet, C. and Westbroek, P. (2005). Caspartin and calprismin, two proteins of the shell calcitic prisms of the Mediterranean fan mussel *Pinna nobilis*. *J. Biol. Chem.* **280**, 33895-33908.
- Marin, F., Morin, V., Knap, F., Guichard, N., Marie, B., Luquet, L., Westbroek, P., and Medakovic, D. (2007). Caspartin: Thermal Stability and Occurrence in Mollusk Calcified Tissues. In "Biomineralization, from Paleontology to Materials Science", (J.L. Arias and M.S. Fernandez Eds.) pp 281-288. Editorial Universitaria, Santiago de Chile.
- Marin, F., Pokroy, B., Luquet, G., Layrolle, P., De Groot, K. (2007). Protein mapping of calcium carbonate biominerals by immunogold. *Biomater.* **28**, 2368-2377.
- Marin, F., Luquet, G., Marie, B. and Medakovic, D. (2008). Molluscan shell proteins : primary structure, origin and evolution. *Curr. Top. Dev. Biol.* **80**, 209-276.
- Maruyama, K., Mikawa, T., and Ebashi, S. (1984). Detection of calcium-binding proteins by <sup>45</sup>Ca autoradiography on nitrocellulose membrane after sodium dodecyl-sulfate gel-electrophoresis. *J. Biochem.* **95**, 511-519.
- Marxen, J.C. and Becker, W. (2000). Calcium binding constituents of the organic shell matrix from the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*, *Comp. Biochem. Physiol. B* **127**, 235-242.
- Maurer, P., Hohenester, E., and Engel, J. (1996). Extracellular calcium-binding proteins. *Curr. Opinion Cell Biol.* **8**, 609-617.
- Meenakshi, V. R., Hare, P. E., and Wilbur, K. M. (1971). Amino acids of the organic matrix of neogastropod shells. *Comp. Biochem. Physiol. B* **40**, 1037-1043.
- Meyer-Lueckel, H., Tschoppe, P., Hopfenmuller, W., Stenzel, W. R. and Kielbassa, A. M. (2006). Effect of polymers used in saliva substitutes on demineralized bovine enamel and dentin. *Am. J. Dentistry* **19**, 308-312.
- Newell, N. D. (1969). Classification of Bivalvia. In « Treatise on Invertebrate Paleontology ». Part N, *Mollusca* 6 vol.1 *Bivalvia* (R. C. Moore Ed.) pp N205-N244. Geological Society of America and University of Kansas, Boulder, CO, and Lawrence, KS.
- Nieuw-Amerongen, A. V., Oderkerk, C. H., and Veerman, E. C. I. (1989). Interaction of human salivary mucins with hydroxyapatite. *J. Biol. Buccale* **17**, 85-92.
- Pokroy, B., Fitch, A. N., Marin, F., Kapon, M., Adir, N. and Zolotoyabko, E. (2006). Anisotropic lattice distortions in biogenic calcite induced by intra-crystalline organic molecules. *J. Struct. Biol.* **155**, 96-103.
- Pokroy, B., Kapon, M., Marin, F., Adir, N., and Zolotoyabko, E. (2007). Protein-induced, previously unidentified twin form of calcite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 7337-7341.
- Prezant, R. S. (1990). Form, function and phylogeny of bivalve mucins. In « The Bivalvia – Proceedings of a Memorial Symposium in Honour of Sir Charles Maurice Yonge » (B. Morton, Ed.) pp 83-95. Hong Kong University Press, Hong Kong.
- Poppe, G. T. and Goto, Y. (2000). European Seashells, Vol. II. Conchbooks, Hackenheim.
- Sarashina, I., and Endo, K. (1998). Primary structure of a soluble matrix protein of scallop shell: implications for calcium carbonate biomineralization. *Amer. Mineral.* **83**, 1510-1515.
- Sarashina, I., and Endo, K. (2001). The complete primary structure of Molluscan Shell Protein 1 (MSP-1), an acidic glycoprotein in the shell matrix of the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Mar. Biotechnol.* **3**, 362-369.
- Schmidt, W. J. (1924). Bau und Bildung der Perlmuttermasse. *Zool. Jahrb. Abt. Anat. Ontog. Tiere* **45**, 1-148

- Simkiss, K. (1965). Organic matrix of oyster shell. *Comp. Biochem. Physiol.* **16**, 427-435.
- Simkiss, K. (2003). Genomes, stem cells and their environment. In « Biom mineralization : Formation, Diversity, Evolution and Application » (I. Kobayashi and H. Osawa, Eds.) pp 38-42 (Tokai University Press, Kanagawa).
- Somogyi, E., Petersson, U., Hultenby, K., and Wendel, M. (2003). Calreticulin – an endoplasmic reticulum protein with calcium-binding activity is also found in the extracellular matrix. *Matrix Biol.* **22**, 179-191.
- Tabak, L. A. (1995). In defense of the oral cavity : structure, biosynthesis and function of salivary mucins. *Ann. Rev. Physiol.* **57**, 547-564.
- Tabak, L. A., Levine, M. J., Jain, N. K., Bryan, A. R., Cohen, R. E., Monte, L. D., Zawacki, S., nancollas, G. H., Slomiany, A., and Slomiany, B. L. (1985). Adsorption of human salivary mucins to hydroxyapatite. *Arch. Oral Biol.* **30**, 423-427.
- Taylor, J. D. (1973). The structural evolution of the bivalve shell. *Palaeontology* **16**, 519-534.
- Taylor, J. D., Kennedy, W. J., and Hall, A. (1969). The shell structure and mineralogy of the bivalvia. Introduction. Nuculacea-Trigonacea. *Bull. Brit. Mus. (Nat. Hist.) Zool. Lond.* suppl. 3, 1-125.
- Taylor, J. D., Glover, E. A., and Braithwaite, C. J. R. (1999). Bivalves with 'concrete overcoats' : *Granicorium* and *Samanrangia*. *Acta Zoologica* **80**, 285-300.
- Thorp, C. H., Sewell, F. M., and Peter, R. Bond (1991). A self-cleaning mechanism in the operculum of *Serpula vermicularis* L. (Polychaeta : Serpulidae). *Bull. Mar. Sci.* **48**, 412-419.
- Ubukata, T. (1994). Architectural constraint on the morphogenesis of prismatic structure in Bivalvia. *Palaeontology* **37**, 241-261.
- Ubukata, T. (1997). Microscopic growth of bivalve shells and its computer simulation. *The Veliger* **40**, 165-177.
- Vicente, N. (2003). La grande nacre de Méditerranée *Pinna nobilis*. Présentation générale. In « First International Meeting on the Mediterranean Fan-Shell *Pinna nobilis* » Mémoires de l'Institut Océanographique Paul Ricard, pp 7-16. Paul Ricard Editions, Marseille.
- Weiner, S. (1979). Aspartic acid-rich proteins: major components of the soluble organic matrix of mollusk shells. *Calcif. Tissue Int.* **29**, 163-167.
- Weiner, S. (1983). Mollusk shell formation – Isolation of two organic matrix proteins associated with calcite deposition in the bivalve *Mytilus californianus*. *Biochemistry* **22**, 4139-4145.
- Weiner, S., and Hood, L. (1975). Soluble proteins of the organic matrix of mollusc shells: a potential template for shell formation. *Science* **190**, 987-989.
- Weiner, S., and Traub, W. (1984). Macromolecules in mollusc shells and their functions in biomineralization. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **B304**, 425-434.
- Wheeler, A. P., George, J. W., and Evans, C. A. (1981). Control of calcium carbonate nucleation and crystal growth by soluble matrix of oyster shell. *Science* **212**, 1397-1398.
- Wheeler, A. P., Rusenko, K. W., and Sikes, C. S. (1988). Organic matrix from carbonate biomineral as a regulator of mineralization. In « Chemical Aspects of Regulation of Mineralization » (C. S. Sikes and A. P. Wheeler, Eds.) pp 9-13. University of South Alabama Publication Service, Mobile, Alabama.

|

|

## V.6. ILLUSTRATION DE LA RECHERCHE SUR LES PROTEINES ACIDES PAR QUELQUES ARTICLES

### a. Article Marin et al., CRAS, 1994

# Caractérisations électrophorétique et immunologique des matrices organiques solubles des tests de deux Bivalves Pteriomorphes actuels, *Pinna nobilis* L. et *Pinctada margaritifera* (L.)

Frédéric Marin, Gérard Muyzer et Yannicke Dauphin

C.R. Acad. Sci. Paris,  
t. 318, série II,  
p. 1653 à 1659,  
1994

**Résumé** Chez les Bivalves, la minéralisation des tests s'effectue par l'intermédiaire d'une trame organique soluble associée à la phase cristalline. Les tests de *Pinna nobilis* et *Pinctada margaritifera* comportent une couche prismatique calcitique externe et une couche nacrée aragonitique interne. Les matrices solubles de prismes, riches en polysaccharides acides, présentent une bande majeure à 17 kDa, tandis que les trames des couches nacrées apparaissent surtout composées de constituants de masse moléculaire non discrète. Ces dissimilitudes sont atténuées par les tests immunologiques (ELISA), qui montrent qu'une part importante des déterminants antigéniques est commune aux deux microstructures.

**Mots-clés** : Bivalves, microstructures, matrice soluble, SDS-PAGE, ELISA.

F. M. et Y. D. : Laboratoire de Paléontologie, URA 723 du CNRS, Bât. n° 504, Université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex, France;

G. M. : Geobiochemistry Unit, Dept. of Biochemistry, Leiden University, Wassenaarseweg 64, 2333 AL Leiden, The Netherlands.

**Abstract** **Electrophoretic and immunological characterization of shell soluble matrices from two living Pteriomorphid Bivalves, *Pinna nobilis* L. and *Pinctada margaritifera* (L.)**

In the Bivalves, shell formation is influenced by a soluble organic matrix, closely linked to the mineral phase. *Pinna nobilis* and *Pinctada margaritifera* have a bi-layered shell, characterized by an outer prismatic calcitic microstructure and an inner nacreous aragonitic one. A comparison of electrophoretic and immunological properties of the soluble matrices extracted from these layers is performed. Electrophoresis data suggest that great differences exist: the matrices of prisms are rich in acidic polysaccharides and contain discrete proteinaceous compounds, especially a major one of 17 kDa, whereas the nacreous material predominantly consists of polydisperse macromolecules. However, the dissimilarities are attenuated by immunological tests (ELISA), indicating that an important part of antigenic determinants is common to the two microstructures.

**Keywords** : Bivalves, microstructures, soluble matrix, SDS-PAGE, ELISA.

#### **Abridged English Version**

**I**N the Pteriomorphid bivalves, the two common CaCO<sub>3</sub> polymorphs, calcite and aragonite, are often associated in a single shell, and correspond to well-defined microstructural types (Taylor *et al.*, 1969); the inner layer ("mother-of-pearl") is aragonitic whereas calcite constitutes a prismatic external layer. *Pinna nobilis* and *Pinctada margaritifera* present such a microstructural arrangement.

In the bivalves, a readily soluble crystal-

linked organic matrix plays a distinct role in calcification. It is believed to bind calcium ions (Weiner and Hood, 1975) and to orient the crystals (Wheeler *et al.*, 1981). Hare (1963) noticed that in *Mytilus californianus* the ratio of acidic and basic amino acids was higher in the matrix of the calcitic prisms than in nacreous aragonitic layer. A combination of ion-exchange and HPLC chromatography of the two matrices extracted from the same species per-

#### **Note**

présentée par  
Yves Coppens.

remise le 12 septembre 1993,  
acceptée après révision  
le 16 mars 1994.

mitted the separation of around forty fractions (Weiner, 1983); two Ca-binding proteins appeared to be specific of the prisms.

With a micro- and ultrastructural study and gel-filtration analyses of the soluble matrices, Cuif *et al.* (1991) found a correlation between the distribution of apparent molecular weights and the crystallinity of prisms and nacles of *Pinna nobilis* and *Pinctada margaritifera*. Prisms having a greater crystallographic continuity would need soluble compounds of "heavier" molecular weights (> 100 kDa) than those of mother-of-pearl (< 60 kDa).

The present work aims at a further characterization of organic matrices linked to different microstructures and mineralogies. It is based on two complementary approaches, never used together with such material: electrophoresis, for a determination of the chemical nature and molecular weight distribution of the matrice compounds, and immunology, which is based on the high specificity of antibody-antigen recognition. The immunological approach has already been performed successfully on molluscan shell matrices (Westbroek *et al.*, 1979; Muyzer *et al.*, 1984), and constitutes a very sensitive way to estimate the degree of homology of these materials.

## MATERIALS AND METHODS

*Pinctada margaritifera* shells were collected in French Polynesia, whereas *Pinna nobilis* samples came from the Mediterranean Sea. After cleaning (dilute sodium hypochlorite), prismatic and nacreous layers were separated.

### Extraction

This was performed according to a previously described procedure (Cuif *et al.*, 1991). Acetic acid was used for decalcification. Solubilized matrices were desalted by gel-filtration (Sephadex G-25, Pharmacia), then submitted to ultrafiltration (Amicon filters 5 kDa) and lyophilized.

### Electrophoresis

SDS-PAGE was used (Laemmli, 1970). Samples were denatured previously with SDS-mercaptoethanol. Gels were stained with CBB (Coomassie Brilliant Blue) and silver (Morrissey, 1981). Alcyan Blue was also used

for characterization of acidic polysaccharides (Scott *et al.*, 1964).

### Immunological tests

These were based on the ability of antibodies to "recognize" the antigenic determinants (small macromolecular domains) on the matrix materials against which they were elicited (Westbroek *et al.*, 1979; Muyzer *et al.*, 1984).

Four rabbit antisera were produced against each one of the two matrices isolated from the two species. After the immunological titer had been determined, cross-reactivity tests were performed on denatured and non-denatured antigens with ELISA (Clark and Adams, 1977) using microplates. The results were read with a Titertek Multiskan, at 405 nm, whereby the absorbances were proportional to the degree of antigen-antibody binding. A specimen of *Pteria* (inner aragonitic nacreous layer and outer prismatic calcitic layer) was added as a control.

## RESULTS

### Biochemical nature and molecular weights (figure 1)

Several bands are detected, especially in the matrix of the prismatic layer of *Pinctada*, in which 9 discrete subunits (53 to 10 kDa) are counted (figure 1 D).

A major band (17 kDa) is found common to the prismatic layers of both species.

On the other hand, the matrices of the nacreous layer appear to consist of mainly non-discrete compounds, forming a dense background in the area of low molecular weights. A diffuse subunit (13 kDa) is nevertheless detected. Difficulties in staining these matrices would indicate high levels of glycosylation (Wheeler *et al.*, 1981). Alcyan Blue staining (figure 1 C) reveals that acidic polysaccharides constitute the stained background of the prismatic layer matrices and are also located on some proteinaceous bands (17 and 38 kDa for *Pinctada*, 68 kDa for *Pinna*). No staining is found of the matrices extracted from nacreous layers.

### Degree of homology (figure 2)

Invariably the strongest reactions are recorded between the antisera and the antigens against which they are directed. In addition,



reactivities of lesser intensity are detected between antigens extracted from one layer and the antiserum raised against "the other layer" of the same species, and also between the antisera and the antigens of the same microstructural origin but from different species. The antiserum against the nacreous layer of *Pinctada* constitutes an exception since it does not recognize the antigens extracted from the prisms of this sample.

Reactivities of the four antisera against pooled *Pteria* sp. antigens are analogous to those recorded with the separate matrices of *Pinctada* and *Pinna*. Denaturation of the samples prior to ELISA leads to reactivities that are less intense than those recorded on the native antigens, suggesting that no "cryptic" determinants are exposed by the denaturing process.

## DISCUSSION

The data obtained with electrophoresis confirm the heterogeneity in the soluble matrices of bivalves (Weiner *et al.*, 1977; Weiner, 1983; Cuif *et al.*, 1991). Significant differences are detected between matrices from the two microstructures. Particularly characteristic are the presence of discrete molecular weight compounds and the abundance of acidic polysaccharides of the prisms. These materials are probably correlated with high amounts of S (Cuif *et al.*, 1986).

## INTRODUCTION

La plupart des squelettes calcaires secrétés par les organismes invertébrés sont élaborés à partir des deux polymorphes: calcite et aragonite. Chez les Bivalves Ptériomorphes, ces minéraux sont souvent observés au sein d'une même coquille. Chacune correspond à un type microstructural dont les caractéristiques topographiques ont été définies (Taylor *et al.*, 1969). A une couche interne constituée de tablettes de nacre aragonitique, se superpose une couche externe de prismes calcitiques. *Pinna nobilis* et *Pinctada margaritifera* présentent une telle disposition.

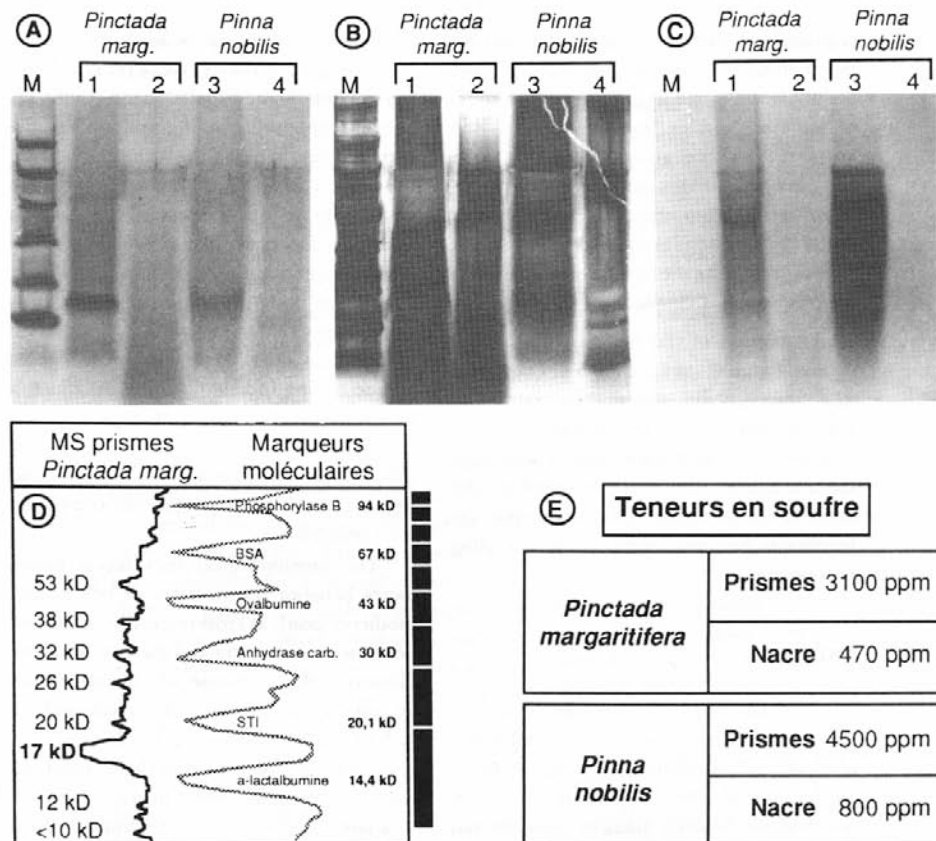
A direct comparison between the molecular weight values determined by electrophoresis and by gel-filtration (Cuif *et al.*, 1991) is impossible as the samples are denatured when applying the former technique. However, a comparison with electrophoresis data (Weiner *et al.*, 1977; Samata, 1991) reveals some divergences which may be related to differences in extraction procedures. The 17 kDa subunit of both prismatic microstructures could correspond to the sulfated aspartic-rich glycoprotein (15 kDa) isolated from *Mytilus* calcitic prisms (Addadi *et al.*, 1987). Such a band might be characteristic of this microstructure. Further characterization of this fraction with monoclonal antibodies and sequencing of the proteinaceous compound are envisaged.

The immunological tests reveal homologies between the matrices of prisms and mother-of-pearl, as cross-reactivities are found between three antisera and the four antigens. However, the response of the antiserum against the nacreous layer of *Pinctada* and the lack of reactivity between anti-prisms antisera and nacreous layers antigens clearly point out that some antigenic determinants are specific of a layer. Beside antigenic determinants that are characteristic of particular taxa, there appear to be others that are specific for particular microstructures. It is possible that the latter determinants are responsible for the differentiation between the prismatic and nacreous microstructures.

La mise en place de ces couches est réalisée par l'intermédiaire d'une trame organique intracristalline soluble dont le rôle est d'assurer la fixation de  $\text{CaCO}_3$  (Weiner et Hood, 1975) et d'orienter la croissance cristalline (Wheeler *et al.*, 1981). Par contre, les données biochimiques n'ont, jusqu'à présent, pas permis d'établir quels sont les facteurs qui déterminent le « choix » de la minéralogie et de la microstructure par l'organisme. Chez *Mytilus californianus*, autre Ptériomorphe, Hare (1963) a montré que les prismes calcitiques comportaient un taux d'acides aminés acides/basiques plus élevé que celui de la nacre. Sur cette espèce, Wei-

**Figure 1** Electrophorèse des matrices solubles des couches prismatiques (1, 3) et nacrées (2, 4) de *Pinctada margaritifera* et *Pinna nobilis*. M : marqueurs moléculaires. Coloration au Bleu de Coomassie (A), à l'argent (B), au Bleu Alcyan (C). D : profil densitométrique de la matrice de prismes de *P. margaritifera* : 9 sous-unités protéiques ont été décelées. E : les concentrations importantes de S (d'après Cuif et al., 1986) dans les prismes seraient à corréler à leur teneur élevée en polysaccharides acides.

Electrophoresis of soluble matrices of *P. margaritifera* and *P. nobilis* prismatic (1, 3) and nacreous (2, 4) layers. M: molecular markers. Coomassie Brilliant Blue (A), silver (B) and Alcyan Blue (C) stainings. Densitometric profile (D) of the matrix of the prismatic layer of *P. margaritifera*: 9 proteinaceous sub-units were detected. E: high S amounts within prisms (from Cuif et al., 1986) could be related to the presence of acidic polysaccharides.



ner (1983), en combinant l'échange d'ions et la chromatographie HPLC, a dénombré une quarantaine de fractions. Deux protéines n'auraient été détectées que dans les prismes.

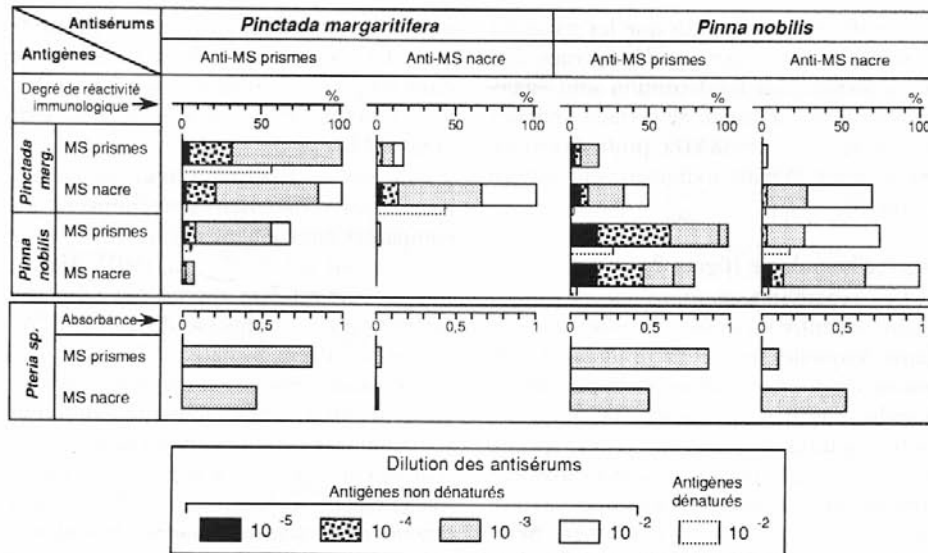
En associant une étude micro et ultra-structurale à une analyse par filtration sur gel, Cuif et al. (1991) ont émis l'hypothèse d'une corrélation entre les masses moléculaires apparentes et le degré de cristallinité des couches: les prismes, dont la cohérence cristallographique est assurée à travers de nombreux cycles de minéralisation, possèdent des constituants organiques, de masses plus élevées (> 100 kDa) que ceux de la nacre (< 60 kDa).

La mise en évidence des spécificités des trames organiques peut reposer sur deux méthodes analytiques complémentaires, utilisées conjointement pour la première fois pour une comparaison des différentes couches d'un même échantillon. L'électrophorèse,

caractérisation « dissociante », vise à établir la nature et les masses moléculaires des sous-unités des matrices, alors que l'immunologie est plus globale. Celle-ci, basée sur la spécificité de la reconnaissance immunitaire (entre un anticorps et son site de fixation, le déterminant antigénique), constitue un moyen indirect très sensible d'apprécier le degré d'homologie des matrices. Elle a été pratiquée sur les matrices solubles de nombreux Mollusques (Westbroek et al., 1979; Muyzer et al., 1984).

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les spécimens de *Pinctada margaritifera* proviennent de Polynésie française. Ceux de *Pinna nobilis* ont été collectés en Méditerranée. Après lavage à l'hypochlorite de sodium dilué, les couches prismatiques calcitiques et nacrées aragonitiques ont été séparées.



**Figure 2** Tests ELISA : réactivités immunologiques croisées sur antigènes non dénaturés (histogrammes, traits pleins) et dénaturés (tiretés). Pour les tests avec *Pteria*, dilutions = titres, soit 500 (antisérums de nacre) et 1000 (antisérums de prismes). MS : matrice soluble.

ELISA tests: immunological cross-reactivities on non-denatured (histograms, full lines) and denatured (dotted lines) antigens. For the tests with *Pteria*, antisera dilutions = titres: 500 (anti-nacreous layer antisera) and 1000 (anti-prisms antisera). MS: soluble matrix.

### Extraction des matrices

L'acide acétique (pH 4) est utilisé comme décalcifiant. Les matrices organiques solubilisées ont été chromatographiées sur gel Sephadex G-25, ultrafiltrées (membrane Amicon 5 kDa), puis lyophilisées (Cuif *et al.*, 1991).

### Electrophorèse

Elle est pratiquée sur mini-gels de SDS-Polyacrylamide (10% d'acrylamide) (Laemmli, 1970), les échantillons étant dénaturés (SDS-mercaptoéthanol). Les gels ont été colorés au Bleu de Coomassie, à l'argent (Morrissey, 1981) et au Bleu Alcyan, ce dernier révélant les polysaccharides acides (Scott *et al.*, 1964).

### Tests immunologiques

Ils sont basés sur la capacité d'anticorps produits contre une matrice donnée à « reconnaître » ou non les déterminants antigéniques (de courtes portions de molécules) d'une autre matrice (Westbroek *et al.*, 1979; Muyzer *et al.*, 1984). 4 antisérums de lapins ont été obtenus contre les matrices des prismes et nacres, après 3 injections à intervalle de 5 semaines. Les titres de chaque antisérum ayant été déterminés par des tests spectrophotométriques ELISA (Clark et Adams, 1977), des expérimentations croisées sur anti-

gènes non-dénaturés et dénaturés (SDS-mercaptoéthanol) ont été réalisées. Un autre Ptériomorphe (*Pteria*) de même microstructure a été ajouté à titre de contrôle.

## RÉSULTATS

### Nature chimique et masses moléculaires (figure 1)

De nombreuses bandes sont visibles, particulièrement dans les prismes de *Pinctada*, où 9 sous-unités protéiques (de 53 à 10 kDa de masse moléculaire apparente) ont été individualisées (figure 1D); une bande majeure (17 kDa) est commune aux deux matrices de prismes. Cette bande, absente des nacres, pourrait être caractéristique de cette microstructure.

A l'inverse, les nacres se caractérisent par une abondance de composés non-discrets, formant un fond continu vers de plus faibles masses; une bande très diffuse est néanmoins visible vers 13 kDa. De plus, elles sont moins colorées par le Bleu de Coomassie, ce qui serait l'indice d'une forte glycosylation (Wheeler *et al.*, 1981).

Après coloration au Bleu Alcyan (figure 1C), les différences entre matrices de prismes et de nacre apparaissent nettement: les premières, intensément colorées, comprennent une importante fraction poly-

saccharidique acide, tandis que les secondes en semblent pratiquement dépourvues. Les sucres formant un fond continu sont également localisés au niveau de certaines bandes protéiques (17 et 38 kDa pour *Pinctada*, 68 kDa pour *Pinna*), indiquant leur nature glycosylée.

#### Degré d'homologie (figure 2)

Les réactivités immunologiques étant maximales entre les antisérums et les matrices contre lesquelles ils ont été produits, 3 antisérums sur 4 « reconnaissent », à des degrés moindres, les matrices associées aux mêmes microstructures, sur les deux autres espèces. Ces mêmes antisérums réagissent, de manière atténuée, avec les matrices issues de « l'autre couche », chez une espèce donnée. Seul, l'antisérum « anti-nacre de *Pinctada* » ne reconnaît pratiquement que la matrice de cette couche chez ce spécimen. Par ailleurs, les tests sur antigènes dénaturés n'ont apparemment pas démasqué de déterminants antigéniques « cryptiques », puisque, dans tous les cas, la réponse immunitaire est plus faible après dénaturation.

#### DISCUSSION

Les résultats d'électrophorèse sont une confirmation du caractère hétérogène des matrices des Bivalves (Weiner *et al.*, 1977; Weiner, 1983; Cuif *et al.*, 1991). Des différences importantes ont été constatées: celles des prismes, riches en polysaccharides acides non-discrets, comportent des constituants (glyco)protéiques discrets, tandis que les constituants des couches nacrées sont majoritairement non discrets. Les colorations mettent en évidence l'importance des fractions

sucres libres ou liées aux constituants protéiques. La présence de polysaccharides acides dans les prismes est sans doute à corrélérer à leurs teneurs élevées en S (Cuif *et al.*, 1986) (figure 1 E).

Du fait de la dénaturation, les données de masses moléculaires ne peuvent être comparées directement à celles obtenues par filtration sur gel (Cuif *et al.*, 1991). Mais ces valeurs peuvent être rapprochées des rares données d'électrophorèse disponibles (Weiner *et al.*, 1977; Samata, 1991): les divergences pourraient être imputables à des procédés d'extraction/solubilisation différents. La bande à 17 kDa des matrices de prismes semble correspondre à la glycoprotéine sulfatée riche en acide aspartique, de 15 kDa des prismes de *Mytilus californianus* (Addadi *et al.*, 1987). Cette sous-unité protéique peut constituer un « candidat sérieux » spécifique de cette microstructure.

Les tests immunologiques croisés montrent qu'une partie importante des déterminants antigéniques est commune aux deux microstructures d'une même espèce, résultat à rapprocher de ceux de Weiner (1983). Les réactivités enregistrées avec *Pteria* sont analogues à celles observées sur *Pinna* et *Pinctada*. Cependant, l'antisérum anti-nacre de *Pinctada* rappelle qu'il existe également des déterminants antigéniques propres aux deux microstructures. Il existe probablement, outre des composés à valeur « taxonomique », des composés à valeur « microstructurale ». Par ailleurs, il est possible que les différences entre matrices de prismes et de nacre ne portent que sur un nombre extrêmement réduit de constituants organiques. Reste également à préciser le rôle des matrices insolubles présentes dans ces couches.

**Remerciements** : Les auteurs remercient le Professeur P. Westbroek, Department of Biochemistry, Leiden University, Membre de l'Académie des Sciences des Pays-Bas, pour la lecture critique du manuscrit. Ce travail a été financé par la Richard Lounsbery Foundation (G. Muyzer).

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADDADI, L., MORADIAN, J., SHAY, E., MAROUDAS, N. G. et WEINER, S., 1987. A chemical model for the cooperation of sulfates and carboxylates in calcite crystal nucleation: relevance to biomineralization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, p. 2732-2736.
- CLARK, N. F. et ADAMS, A. N., 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses, *J. Gen. Virol.*, 34, p. 475-483.
- CUIF, J. P., FLAMAND, D., FREROTTE, B., CHABIN, A. et RAGUIDEAU, A., 1986. La mesure localisée du taux de soufre comme indicateur de

- l'origine et de l'état diagénétique des biocristaux carbonatés, *C.R. Acad. Sci. Paris*, 303, série II, p. 251-256.
- CUIF, J. P., GAUTRET, P. et MARIN, F., 1991. Correlation between the size of crystals and the molecular weight of organic fractions in the soluble matrices of Mollusc, Coral and Sponge carbonate skeletons, in *Mechanisms and Phylogeny of Mineralization in Biological Systems*, SUGA, S. et NAKAHARA, H., éd., Springer-Verlag, Tokyo, p. 391-395.
- HARE, P. E., 1963. Amino acids in the proteins from aragonite and calcite in the shells of *Mytilus californianus*, *Science*, 139, p. 216-217.
- LAEMMLI, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, p. 680-685.
- MORRISSEY, J. H., 1981. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced sensitivity, *Anal. Biochem.*, 117, p. 307-310.
- MUYZER, G., WESTBROEK, P., DE VRIND, J. P. M., TANKE, J., VRIJHEID, T., DE JONG, E. W., BRUNNING, J. W. et WEHMILLER, J. F., 1984. Immunology and organic geochemistry, *Org. Geochem.*, 6, p. 847-855.
- SAMATA, T., 1991. Structure and function of the organic matrix in the nacreous layer of *Pinctada fucata*, In *Mechanisms and Phylogeny of Mineralization in Biological Systems*, SUGA, S. et NAKAHARA, H., éd., Springer-Verlag, Tokyo, p. 23-27.
- SCOTT, J. E., QUINTARELLI, G. et DELLOVO, M. C., 1964. The chemical and histochemical properties of alcian blue. I. The mechanism of alcian blue staining, *Histochemie*, 4, p. 73-85.
- TAYLOR, J. D., KENNEDY, W. J. et HALL, A., 1969. The shell structure and mineralogy of the Bivalvia I: Introduction: Nuculacea-Trigonacea, *Bull. Br. Mus. (Nat. Hist.), Zool. Suppl.*, 3, p. 1-125.
- WEINER, S., 1983. Mollusk shell formation: isolation of two organic matrix proteins associated with calcite deposition in the Bivalve *Mytilus californianus*, *Biochemistry*, 22, p. 4139-4145.
- WEINER, S. et HOOD, L., 1975. Soluble protein of the organic matrix of mollusk shells: a potential template for shell formation, *Science*, 190, p. 987-988.
- WEINER, S., LOWENSTAM, H. A. et HOOD, L., 1977. Discrete molecular weight components of the organic matrices of mollusk shells, *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, 30, p. 45-51.
- WESTBROEK, P., VAN DER MEIDE, P. H., VAN DER WEY-KLOPPERS, J. S., VAN DER SLUIS, R. J., DE LEEUW, J. W. et DE JONG, E. W., 1979. Fossil macromolecules from cephalopod shells: characterization, immunological response and diagenesis, *Paleobiology*, 5 (2), p. 151-167.
- WHEELER, A. P., GEORGE, J. W. et EVANS, C. A., 1981. Control of calcium carbonate nucleation and crystal growth by soluble matrix of oyster shell, *Science*, 212, p. 1397-1398.
-



## Mucins and Molluscan Calcification

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF MUCOPERLIN, A NOVEL MUCIN-LIKE PROTEIN FROM THE NACREOUS SHELL LAYER OF THE FAN MUSSEL *PINNA NOBILIS* (BIVALVIA, PTERIOMORPHIA)\*

Received for publication, April 10, 2000  
Published, JBC Papers in Press, April 17, 2000, DOI 10.1074/jbc.M003006200

Frédéric Marin<sup>§</sup>, Paul Corstjens<sup>‡</sup>, Béatrice de Gaulejac<sup>¶</sup>, Elizabeth de Vrind-De Jong<sup>‡</sup>,  
and Peter Westbroek<sup>‡</sup>

From the <sup>‡</sup>Leiden Institute of Chemistry, Gorlaeus Laboratories, Leiden University, P.O. Box 9502, 2300 RA Leiden, The Netherlands and <sup>¶</sup>Centre d'Etude des Ressources Animales Marines, Faculté des Sciences et Techniques de St Jérôme, C341, F-13397 Marseille cedex 20, France

A cDNA expression library constructed from mantle tissue mRNA of the Mediterranean fan mussel *Pinna nobilis* was screened with antibodies raised against the acetic acid-soluble shell matrix of the same species. This resulted in the isolation of a 2138-base pair cDNA, containing 13 tandem repeats of 93 base pairs. The deduced protein has a molecular mass of 66.7 kDa and a isoelectric point of 4.8. This protein, which is enriched in serine and proline residues, was overexpressed, purified, and used for producing polyclonal antibodies. Immunological *in situ* and *in vitro* tests showed that the protein is localized in the nacreous aragonitic layer of *P. nobilis*, but not in the calcitic prisms. Because this protein of the nacre of *P. nobilis* exhibits some mucin-like characteristics, we propose the name mucoperlin. This is the first paper reporting the cloning of a molluscan mucin and the first molecular evidence for the involvement of a mucin in molluscan calcification. This finding corroborates our previous hypothesis that some of the proteinaceous constituents of the molluscan shell matrix would derive from mucins, common to many metazoan lineages of the late Precambrian (Marin, F., Smith, M., Isa, Y., Muyzer, G. and Westbroek, P. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 1554–1559). The adaptation of an ancestral mucin to a new function, the regulation of the mineralization process, may be one of the molecular events, among others, that would explain the simultaneous emergence of organized calcification in many metazoan lineages during the Cambrian explosion.

The skeletons produced by molluscs to protect and support their soft bodies are organo-mineral amalgamates (1, 2) exhibiting a high degree of order at the nanoscale (3). As a rule, the mineralized structure has mechanical properties far superior to each of its constituent components. A well known example is mother-of-pearl or nacre. Its micron-sized compact brick wall

texture is more than 1000 times tougher than the chemically precipitated counterpart, aragonite (4).

A complex biochemical machinery is required for the production of these highly ordered biominerals. Specialized microenvironments must be created to accommodate the growing minerals (1, 5). The constituent ions as well as macromolecules capable of directing and fine-tuning the crystallization must be supplied, while waste products of crystallization have to be removed and deleterious precipitations avoided. The actual biomineralization process follows as a remarkable case of self-organization, with the densely packed organic-inorganic composite emerging as the final product. Furthermore, the organisms must deploy upstream the calcification, signal transmitters (6, 7), and transcription factors (8, 9) able to switch their biomineralizing machineries on and off.

Despite its complexity, it would appear as though the skeleton-forming machinery evolved with remarkable facility. The skeletons of many animal phyla were installed in less than 30 million years, since the beginning of the Cambrian, 544 million years ago (10, 11). Phylogenetic evidence derived from fossils and morphology and DNA-sequencing of extant animals indicate that major steps in animal diversification had already been made prior to the "Cambrian explosion" (12–16). To explain how a function as complex as skeleton formation could emerge in many independent stocks almost simultaneously, we suggested that components of the mineralizing machinery were already available in the soft bodied ancestors but that they served other functions than calcification. Subsequently, during the Cambrian explosion, they only had to be co-opted for organized biomineralization (17, 18). One indication supporting this "preadaptation" hypothesis came from the observations by Lopez and collaborators that molluscan nacre can induce bone production in human osteoblasts (18–20). These experiments suggest a common Precambrian ancestry for the responsible signaling system in both taxa.

Another point to mention was our finding that secreted muci and soluble shell matrix strongly cross-reacted with antisera against these two antigens in various molluscs as well as in the coral *Galaxea fascicularis* (17). Both the freshly extracted muci, which were secreted by noncalcifying epithelia into the ambient seawater, and the matrix fractions were shown to inhibit the *in vitro* crystallization of calcium carbonate. We explained these observations by assuming that the "anticalcifying" mucous secretions protected the soft bodied ancestors from spontaneous incrustations in the highly supersaturated Precambrian ocean waters (17). At the onset of calcification, the same inhibitory molecules could then be incorporated into the calcifying machinery to fine-tune the crystallization process. Clearly, this "anticalcification hypothesis" calls for a more

\* This work was supported in part by the Nederlandse Organisatie voor Wetenschappelijk Onderzoek (NWO, Den Haag). This work was also supported by the "Fondation des Treilles" (Paris), the "Société de Secours des Amis des Sciences" (Paris), the "Fondation Singer-Polignac" (Paris) during the period 1996–1999, and the Fondation Simone et Cino Del Duca (Paris) for the year 2000. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

The nucleotide sequence(s) reported in this paper has been submitted to the GenBank™/EBI Data Bank with accession number(s) AF145215.

§ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 31 71 527 47 57; Fax: 31 71 527 45 37; E-mail: f.marin@chem.leidenuniv.nl.

detailed study of the macromolecular fractions in the mucous secretions and the mineralized matrix.

In this paper, we report the isolation of a new gene encoding a water-soluble protein of the nauprismatic shell of the protected mollusc *Pinna nobilis*, the largest bivalve in the Mediterranean. The protein that we identified is acidic and enriched in serine and proline residues. It is further characterized by the presence of 13 tandem repeats with 31 amino acid residues and a C terminus containing three unique cysteine residues. The presence of tandem repeats, the enrichment in serine residues, and its consequent potential of high glycosylation strongly suggest that this protein is a mucin. The protein is localized in the naure but not in the prisms of *P. nobilis*. We chose to name it mucoperlin, and we believe that its skeletal association is important evidence in support of our anticalcification hypothesis.

#### MATERIALS AND METHODS

**Tissue and Shell Collection.**—Mantle tissue fragments from actively calcifying, juvenile *P. nobilis*, grown in aquaria, were obtained. Tissue collection was performed according to the European directive 92-43-CEE concerning protected species (91). This operation did not affect the viability and filtration capacity of the animal. The isolated tissue (about 0.5 g) was immediately frozen in liquid nitrogen.

Shell material was collected from two different batches of juvenile specimens at CERAM (Centres d'Etudes des Ressources Animales Marines). The two layers of the shells (*i.e.* outer prismatic calcitic layer and inner aragonitic mother-of-pearl) were separated by abrasion and by dissociation of the calcitic prisms in dilute sodium hypochlorite.

**Construction of the cDNA Expression Library.**—Total RNA was extracted from 0.5 g of mantle tissue using the RNeasy<sup>®</sup> Total RNA Isolation System (Promega). The extraction yielded about 70 µg of RNA. Poly(A)-mRNA was subsequently isolated with Oligotex<sup>®</sup> Resin (Qiagen). Approximately 1.5 µg mRNA was obtained and immediately processed using the ZAP<sup>®</sup> Express cDNA synthesis kit (Stratagene), eventually yielding double-stranded *Xho*I-*Eco*RI cDNA fragments. Approximately 70 ng of cDNA was ligated to 1 µg of *Xho*I/*Eco*RI-predigested dephosphorylated ZAP Express vector. Subsequent packaging of recombinant phages was performed with Gigapack<sup>®</sup> II Gold Packaging Extract (Stratagene). The resulting phage library consisted of 350,000 clones, of which at least 95% were found to be recombinant. Prior to the antibody screening, the library was amplified.

**Antibody Screening of the cDNA Expression Library.**—The amplified library was screened with antibodies raised against acetic acid-soluble extracts of the naureous layer of *P. nobilis* (21). About 500,000 phages were used in the initial screening. After infection of *Escherichia coli* XL1-Blue MRF<sup>+</sup> cells were plated and grown for 4 h at 42 °C. The plates were covered with isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside-saturated nitrocellulose membranes (BA85; Schleicher & Schuell) and incubated at 37 °C for an additional 5 h. Membranes were first blocked in 1% gelatin/Tris-buffered saline/Tween solution and then incubated in blocking solution containing the antiserum (diluted 1:3000), NaN<sub>3</sub> (500 µg/ml), and phenylmethylsulfonyl fluoride (100 µg/ml). An *E. coli* extract (1 mg/ml) was added to decrease background staining. The membranes were then incubated with the conjugated antibody GAR/AP (Sigma) and subsequently with the chemoluminescent substrate CSPD<sup>®</sup> (Roche Molecular Biochemicals) before being exposed to X-Omat films (Eastman Kodak Co.). Eleven positive clones were identified, and three of them were rescreened to purity. In a two-step *in vivo* excision, the pBK-CMV phagemids (Stratagene) with their cDNA inserts were excised from the purified ZAP Express phage clones and converted into the plasmids pPNC1-pPNC3.

**Nucleotide Sequence Analysis.**—Enzyme restriction analysis of plasmids pPNC1-3 showed similar *Pst*I and *Xho*I restriction patterns consisting of a 2100-base pair (bp)<sup>1</sup> *Pst*I and a <100-bp *Pst*I-*Xho*I fragment. Partial nucleotide sequences determined from the 5'- and 3'-termini further confirmed that the three clones contained identical inserts. The sequence of the cDNA insert of pPNC1 was determined using 5'-deletions made with the Erase-a-Base<sup>®</sup> System (Promega). Sequences were compiled and analyzed with the Wisconsin Package (version 9.0) of the Genetics Computer Group. The GenBank<sup>®</sup> acces-

sion number for the sequence of the cDNA insert of pPNC1 is AF145215.

**Polyclonal Antibodies against the Recombinant Mucoperlin.**—The cDNA insert of pPNC1 was cloned as a *Bam*HI-*Kpn*I fragment in vector pQE-32 (QIAexpress<sup>®</sup> Expression System; Qiagen). In the resulting construct, pPNC4, the putative start codon on the cDNA insert is cloned in frame with the start codon of the T5 promoter transcription-translation system of pQE-32. Cloning in ZAP Express (pBK-CMV) and the above described subcloning in pQE-32 resulted in the addition of an extra fragment of 33 bp to the 5'-end of the original cDNA. This fragment encoded a 11-amino acid peptide (MRGSHHHHHHHG) with a molecular mass of 1.5 kDa. The His-tagged recombinant protein was expressed from pPNC4 in *E. coli* M15 and purified using Ni<sup>2+</sup>-nitrilotriacetic acid chromatography (Qiagen). A complete purification of the recombinant protein was achieved by using a preparative electrophoresis (Bio-Rad; 491 Prep Cell, 7% acrylamide). On denaturing gels (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis), the fusion protein migrated as an 80-kDa band, in good agreement with the molecular weight as deduced from the sequence (Fig. 1). Recombinant mucoperlin was desalted by ultrafiltration (Amicon, YM10 membrane), lyophilized, and used to generate polyclonal antibodies in a rabbit.

**Mucoperlin in Extracts of Naure and Prisms.**—To investigate whether native mucoperlin is present in either the naureous or in the prismatic layer of *P. nobilis* shell or in both, ~100-mg portions of both cleaned shell materials (batch 1) were powdered and dissolved overnight in 6 ml of 20% (w/v) EDTA, pH 8.0. Insoluble material was removed by centrifugation (5 min, 13,000 rpm). Demineralization with EDTA instead of acetic acid permitted direct analysis of the supernatant by ELISA and dot-blot (22), using anti-mucoperlin.

To study the intimacy of association between the native mucoperlin and the mineral phase (23) and possible contamination of shell matrix by soft tissues (24), naure powder was submitted to a pretreatment with sodium hypochlorite (2 g of active chlorine/liter) for 70 h, washed with water, dried, and dissolved in EDTA. The resulting extract was compared with EDTA-extracts of nonpretreated material in ELISA assays.

For electrophoretic analysis, 3 g of hypochlorite-treated powders from juvenile naure and prisms was decalcified overnight at 4 °C with 5% (v/v) acetic acid, pH 4. Acid decalcification precluded the formation of aggregates during the subsequent purification steps, a phenomenon often observed when EDTA is used (25). The solutions were centrifuged, and the supernatants were desalted by ultrafiltration (Amicon, YM10) and lyophilized. The pellets were thoroughly rinsed with water and lyophilized. The lyophilized preparations were denatured in Laemmli sample buffer for 5 min at 100 °C (26). After a short centrifugation, the denatured samples were applied on 12% acrylamide gels. Gels were either stained with silver (27) or electroblotted on Immobilon<sup>™</sup>-P (Millipore Corp.) (28). Immunodetection of blotted proteins with anti-mucoperlin was performed using the chemoluminescent substrate Luminal (Sigma catalog no. A4685) (29).

**Assays of Naure Matrix Glycosylation.**—The second batch of shell material was used to determine the degree of glycosylation of naure matrix. Because the amount of this batch was limited, only a few assays could be performed. Part of the acetic acid-soluble extract of hypochlorite-treated naure was run on a 12% SDS-polyacrylamide gel and subsequently blotted as described above. The blot was stained with the Immun-Blot kit for glycoproteins (Bio-Rad catalog no. 170-6490). The procedure involves periodate oxidation, labeling with biotin, incubation with streptavidin-AP, and staining with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium. In one sample of naure matrix, the periodate oxidation was omitted to ascertain the specificity of the staining (negative control). Fetuin was used as a positive control.

The other part of the acid-soluble matrix was submitted to chemical deglycosylation with TFMS (Sigma catalog no. T 1394) for 5 h, as described by Edge *et al.* (30). To prevent peptide bond hydrolysis, all procedures were performed at 0 °C under N<sub>2</sub>. The deglycosylated matrix was desalted and concentrated by ultrafiltration and lyophilized. The matrix was then analyzed on Western blots with anti-mucoperlin as described above. Fetuin was deglycosylated by the same method to check the efficiency of the procedure.

**Interaction with Calcium and Inhibition of Calcium Carbonate Precipitation.**—Acetic acid-soluble naure matrix extracted from the second batch was also tested for <sup>45</sup>Ca binding capacity, according to a standard protocol (31). The assays were performed after dot-blotting the whole matrix on polyvinylidene difluoride membranes at various concentrations as indicated in the legend of Fig. 7. GPA, a calcium-binding protein from a unicellular calcifying alga (32), was used as a positive control. Furthermore, the capacity of the naure matrix to inhibit calcium carbonate precipitation *in vitro* was also tested (33).

<sup>1</sup> The abbreviations used are: bp, base pair(s); ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; MCP, mucoperlin; rec-MCP, recombinant mucoperlin; TFMS, trifluoromethanesulfonic acid.



10 30 50  
 agcgaatccaatcagtggtattagatcaagcagacaggaagctccagttcactagat  
 70 90 110  
 gaacatacaacggatgctgtaaaatcggacattogctacattgagtcacagagattta  
 130 150 170  
 gccgattctagtgtaaaagaccatctcaactcaatccgggtctgctcaactgac  
 190 210 230  
 acagaataaagactgacacagcactatgctgggtgagttgacgggtacgttagca  
 1 250 270 290  
 12 ttatctctggaatgctctgctcaaaacgaatgccagacagtcacgaattgctgaata  
L S S G M P L S K P M P D S T Q V V E I 31  
 310 330 350  
 32 cggattcagagtgctagcctcctcaacctaattatctctggaatgctctgctcaaa  
P I Q S A S L L Q P K L S S G M P L S K 51  
 370 390 410  
 52 ccaatgacagggcagtcagcaagttgtcgaaataccgattcagagtgctgctcctgcaa  
 P M T G S T Q V V E I P I Q S A G L L Q 71  
 430 450 470  
 72 cetaaattatctctggaatgctctgctcaaaacgaatgccagacagtcacgaattgctc  
 P K L S S G M P L S K P M P D S T Q V V 91  
 490 510 530  
 92 caaatgacagggcagtcagcaagttgtcgaaataccgattcagagtgctgctcctgcaa  
 Q I P I Q S A G I M Q P K L S S G M P L 111  
 550 570 590  
 112 tcgaaacaaatgccagatgctcagcaagttgtcgaaataccgattcagagtgctgcaagcctc  
 S K P M P D S Q Q V V E I P I Q S A G L 131  
 610 630 650  
 132 cgtgcaactatattctctggaatgctctgctcaaaacgaatgccagacagtcacgaaa  
 L S P L S S G M P L S K P M P D S T K 151  
 670 690 710  
 152 ttgtcgaaataccgattcagagtgctcagcaatgcaactcaaaatctctggaatg  
 F V E I P I Q S A G I M Q P K L S S G M 171  
 730 750 770  
 172 cctctgctcaaaacgaatgccagacagtcacgaatgcaaaacagcattcagagtgaa  
 P L S K P M P D S T Q V D E T P I Q S E 191  
 790 810 830  
 192 ggcacatgcaaacctcaatattctctggaatgctctgctcaaaacgaatgccagacagt  
 G I M Q P K L S S E M P L S K P M P D S 211  
 850 870 890  
 212 ccggaattgtgcaaaatccgattcagagtgctcagcagcctcctcaaacctataattctctc  
 P E V V K I P I Q S A G L L Q P L L S S 231  
 910 930 950  
 232 ggaatgctctgctcaaaacaaacagcagtcgcaagttgtcgaaacagcattcag  
 G M P L S K P I T D S P Q V V E T P I Q 251  
 970 990 1010  
 252 agtcagcagtcctcagcaactcaatgctctctggaatgctctgctcaaaacaaataca  
 S A G I L P P N L L S S E M P L S K P I T 271  
 1030 1050 1070  
 272 gacagtcgcaagttgtcgaaataccgattcagagtgcaagcctcctcaaacctaaattd  
 L S P Q V V E I P I Q S A G I L P P N L 291  
 1090 1110 1130  
 292 tctctggaatgctctgctcaaaacaaacagcagtcgcaagttgtcgaaacagc  
 S S E M P L S K P I T D S P Q V V E T P 311  
 1150 1170 1190  
 312 attcagagtcagcagcctcctcaaacctcaatgctctctggaatgctctgctcaaaacca  
 I Q S A G I L P P N L L S S E M P L S K P 331  
 1210 1230 1250  
 332 ataacagacatccgcaagttgtcgaaataccgattcagagtgcaagcctcctcaaacct  
 I T D S P Q V V E I P I Q S A G I L P P 351  
 1270 1290 1310  
 352 aatgctctctggaatgctctgctcaaaacaaacagcagtcgcaagttgtcgaa  
 N L L S S E M P L S K P I T D S P Q V V E 371  
 1330 1350 1370  
 372 ataccagtcagagtcgcaagcctcctcaaacctcaatgctctctggaatgctctgctc  
 I P I Q S A S I L Q P K L S S E M P L S 391  
 1390 1410 1430  
 392 aaacaaatgccagatgctcagcaagttgtcgaaacagcagtcgcaagttgtcgaaatg  
 K P M P D S Q Q V V G K H V Q S A G K M 411  
 1450 1470 1490  
 412 caatcgtgctttcaaacctcagtcgcaagcagtcgcaagttgtcgaaatgctctgctca  
 Q S S N L T T S G P A A V P V A A G S L 431  
 1530 1550 1570  
 432 tcatttccggcttaccctatattaggagaatctggcatgaagactgagcctgctcaatta  
 S F P G L P I L G E S G M K T E P G S L 451  
 1590 1610 1630  
 452 agtctgagtaagaggggttctctggaatgctctgctcaaacctcaaacctcaaacca  
 S L D E M R V S L D I P T G S M Y K P 471  
 1650 1670 1690  
 472 acagaataatgaaacacctgagatagatcaactaaagatattatgctcaaacctct  
 T E N M K Q P E I D Y L K D I I V Q P S 491  
 1710 1730 1750  
 492 gggatgaaatcaaacctcaacgttgggttggctcaaacagacatcgaagtcaaaaca  
 G M K S T S N V G G L L K T D I E V K T 511  
 1770 1790 1810  
 512 agtggatcagagattatataaatctctgagctgacggcctggcaaatcggcctc  
 S G Q E D Y I K S S D V T R P G N I G I 531  
 1830 1850 1870  
 532 atgagtagttaggtccctctatggtgctggaagcaggtatggttaactctctgagggga  
 M S M L G P S M V R E D G M V N L A E G 551  
 1890 1910 1930  
 552 gaactgctgctttgaaaaaaggattctcaaatggggaccgtctatcaaaccttagcc  
 E L S A L K K R D S T M G T V Y T T L A 571  
 1950 1970 1990  
 572 ggtgagctctctgagcggataaagacgctacttaccagttaccggaaacagtcagta  
 G D V S D R D K D A T Y P V T R N D A V 591  
 2010 2030 2050  
 592 ttcaaacggagtcattatggtctaggaccgcaatgaaatagctgctcagtcacgc  
 F K P E C I N G L G P P C K L A V T S R 611  
 2070 2090 2110  
 612 gatcgtcagtcgctgttcttgggtgtaagctcaccacaagacaccaaagtcctcctg  
 D A A V P V V S G V S L T N P T K V P C 631  
 2130 2150  
 632 gacaagtgaaatacagcagcagtcgtaaatgctcagc  
 D K W N N x 636

FIG. 1. Nucleotide sequence of *mcp*. The amino acid sequence of mucoperlin is shown under the nucleotide sequence in one-letter symbols. Mucoperlin contains 13 tandem repeats; the first repeat is boxed, and the last amino acid residue of each repeat is indicated and num-

*In Situ Immunohistological Localization of Native Mucoperlin*—Juvenile and adult *P. nobilis* cleaned shell fragments were polished with micropolish powder (0.05  $\mu$ m), thoroughly rinsed with water, and slightly etched with EDTA 1% (w/v) during 15 min, to expose antigenic determinants. The material was then immunostained as described previously (17, 34) and viewed by microscope under incident light.

## RESULTS

*Isolation and Characterization of mcp*—Clone PNC1 was isolated from a *P. nobilis* cDNA library using antibodies against the soluble matrix of *Pinna* naure. Analysis of its insert gave a nucleotide sequence of 2138 bp (Fig. 1). We assume the ATG at positions 208–210 to be the start codon of an open reading frame of 1908 bp, encoding a gene referred to as *mcp*. The cDNA contains a 5'-untranslated region of 208 bp and a truncated 3'-untranslated region of only 23 bp. A poly(A) tail is missing at the 3'-end. This is probably due to an internal *Xho*I restriction recognition site in the original mRNA.

*Characterization of the mcp-encoded Protein*—The *mcp*-encoded protein mucoperlin (Fig. 1) encompasses 636 amino acid residues and has a calculated molecular mass of 66.7 kDa and a pI of 4.8 (Table I). The two most abundant amino acids are proline and serine (Table I). Mucoperlin comprises three distinct regions (schematically presented in Fig. 2): a short N-terminal part (11 amino acids), a tandem repeat region (403 amino acids), and a C-terminal part (222 amino acids). The tandem-repeat region consists of 13 repeats (Fig. 2). They all contain 31 amino acids, 12 of which are invariant through the repeats. Only few substitutions occur, mostly in the second half of each repeat.

The primary structure of mucoperlin (Figs. 1 and 2) indicates that the natural molecule may be heavily glycosylated, particularly in the tandem repeat region. Four possible *N*-glycosylation sites, characterized by NX(S/T) (where *X* may be any amino acid except proline), occur in this region. The tandem repeat region also exhibits many potential *O*-glycosylation sites, as suggested by its high serine and threonine content. A search performed with the NetOGlyc 2.0 program (35) predicts that 27 serines are glycosylated in that region (*i.e.* one to three serines per repeat) (Figs. 1 and 2). Prosite analysis and a search made with NetPhos 2.0 (36) suggested that some of the serine and threonine residues may be phosphorylated, a feature commonly found with proteins associated with mineralized tissues (1). A high content of proline (17% of the residues) is another characteristic feature of the tandem repeat region, suggesting that this part of the molecule has a rigid, rodlike conformation (37, 38).

The C-terminal region of mucoperlin has different characteristics than the repeat region. Glycosylation appears to be less densely distributed (Fig. 1), potentially with only one *N*-glycosylation site at position 625 and three *O*-glycosylation sites through threonine residues at positions 418, 465, and 472. On the other hand, phosphorylation sites may be more densely distributed, according to both Prosite and NetPhos 2.0 analysis. Proline and serine are less common (8 and 10%, respectively, of the C-terminal amino acids), although their abundance is relatively high as compared with values of 5.1 and 6.9% for proteins in general (39). Furthermore, the only three cysteine residues in mucoperlin occur in the C-terminal region, at positions 596, 604, and 631, respectively. Finally, the C-

bered 1–13. The three cysteine residues in the C terminus are indicated in bold, and the two potentially sulfated tyrosine residues are underlined. The *Xho*I restriction site at the 3'-end is double underlined and indicated with x. Serine and threonine residues representing possible *O*-glycosylation sites (see Ref. 35) are indicated in boldface italic type. *N*-Glycosylation motifs are indicated by gray rectangles.

TABLE I  
Amino acid composition of *mcp*-deduced mucoperlin

*n*, number of residues. Data shown in parentheses represent the average occurrence of each amino acid, as determined for a large number of proteins (see Ref. 39) (636 total amino acid residues; pI = 4.87; theoretical mass = 66.7 kDa).

Amino acid	<i>n</i>	Mole	%	Amino acid	<i>n</i>	Mole	%
Ala	27	4.25	(8.3)	Met	36	5.66	(2.4)
Cys	3	0.47	(1.7)	Asn	13	2.04	(4.4)
Asp	30	4.72	(5.3)	Pro	84	13.21	(5.1)
Glu	29	4.56	(6.2)	Gln	38	5.98	(4.0)
Phe	3	0.47	(3.9)	Arg	8	1.26	(5.7)
Gly	42	6.60	(7.2)	Ser	93	14.62	(6.9)
His	1	0.16	(2.2)	Thr	34	5.36	(6.8)
Ile	46	7.23	(5.2)	Val	46	7.23	(6.6)
Lys	38	6.00	(5.7)	Trp	1	0.16	(1.3)
Leu	59	9.28	(9.0)	Tyr	5	0.79	(3.2)

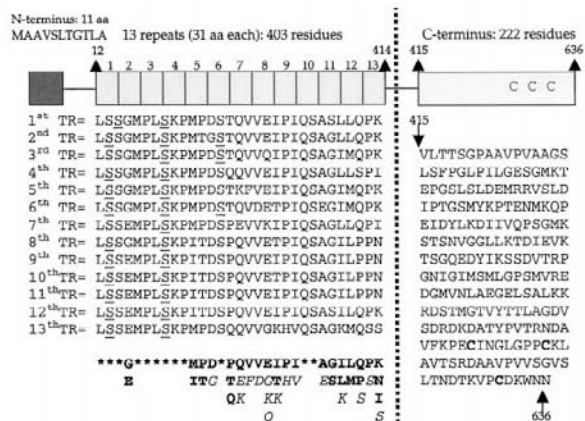


FIG. 2. Schematic representation of mucoperlin. The protein comprises a short 11-amino acid N terminus, a tandem repeat region (residues 12–414), and a C terminus (residues 415–636) containing 3 cysteine residues (in *boldface type*). The 13 tandem repeats (31 amino acids each) are aligned. *TR*, tandem repeat. \*, the 12 amino acid residues that are invariant throughout the repeats. Five of them are serine residues. The potential sites for *O*-glycosylation are *underlined*. In the second position, 10 serines out of 13 would be glycosylated and all of the serine residues in the eighth as well. *Boldface letters* indicate amino acids that occur at least twice in a given position, throughout the repeats. *Italics* represent amino acids that appear only once.

terminal region contains also the five tyrosine residues of the protein, two of them (at positions 482 and 517) showing all of the requirements for tyrosine sulfation (40).

BLAST searches (41) in protein and DNA-translated data bases showed limited homology of mucoperlin with any other known protein. The highest homology was found with PGM, an incompletely characterized pig gastric mucin (42) that exhibits serine-rich tandem repeats of 16 amino acid residues (Fig. 3A). The C terminus of mucoperlin did not exhibit any homology with a mucin. A striking homology was observed between a set of 24 residues (positions 425–448) and the N terminus of a chicken homeobox protein Hox-A9 (Ref. 43; Fig. 3B).

*Mucoperlin in Extracts of Nacre and Prisms of P. nobilis*—The results of immunodetection of mucoperlin in EDTA extracts of nacreous and prismatic shell material (batch 1) of *P. nobilis* are shown in Fig. 4, A and B. The reactions were performed using ELISA and dot-blotting with the antiserum directed against His-tagged recombinant mucoperlin. Mucoperlin was only detected in the nacre and not in the prisms. ELISA analysis on hypochlorite-treated nacre did not affect the reactivity of the antibody with the extract (Fig. 4C). We conclude that the immunological signals did not originate from soft tissue contamination. Furthermore, this result suggests that mucoperlin is either strongly adsorbed on the mineral surface or that it occupies an “intracrystalline” position (23).

The nacre specificity of anti-mucoperlin as determined with ELISA and dot-blot analysis was verified with SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting on acetic acid-soluble extracts from juvenile aragonitic nacre and calcitic prisms (Fig. 5). Laemmli-soluble extracts of the two acetic acid-insoluble fractions were also included in the analysis. Silver staining of the gels showed the presence of numerous discrete thin bands in a background smear (Fig. 5A). All extracts showed distinctively different patterns. Western blot analysis proved that mucoperlin was only present in the nacre matrices (Fig. 5B). Neither the acetic acid- nor the Laemmli-soluble fractions of the prisms showed any reaction with anti-mucoperlin.

In the acetic acid-soluble fraction of the nacre, a prominent anti-mucoperlin-positive band with an apparent molecular mass around 55 kDa was detected. We assumed this band to represent native mucoperlin. The diffuse smear below this band may indicate degradation or differences in glycosylation of the native protein. The 55-kDa protein is also visible as a major discrete band on silver-stained gels (Fig. 5A). In Laemmli extracts of the insoluble nacre matrix, two closely apposed anti-mucoperlin positive bands are visible with apparent molecular masses around 30 kDa. This indicates that mucoperlin-related proteins remain associated with the insoluble matrix after acid extraction of the nacre. These positive bands may represent breakdown products of mucoperlin, generated by the combined hypochlorite and Laemmli treatments, or different proteins closely resembling mucoperlin.

The apparent molecular mass of native mucoperlin (55 kDa, Fig. 5A) is smaller than of the *mcp* deduced protein (66.7 kDa). Heavily glycosylated proteins, like mucins, are known to behave anomalously upon electrophoresis (44); their mobility is influenced by their intrinsic negative charge but also by the fact that they bind very little SDS (45). It is also likely that mucoperlin undergoes specific cleavage when incorporated into the nacre or undergoes degradation due to aging of the nacre layer (see below).

*Deglycosylation Assays*—The amino acid sequence of mucoperlin suggests that the native molecule is heavily glycosylated. In general, molluscan shell matrices have been shown to contain an important sugar moiety (23, 46–48). This was confirmed by a specific glycoprotein staining of the *Pinna* nacre matrix. Strong staining was obtained with many components of the matrix, with the exception of low molecular weight fractions (<20 kDa), which stained negatively (Fig. 6A). We assume that at least part of nondegraded native mucoperlin is represented by the stained band migrating slightly faster than the 58.1-kDa marker (Fig. 6A, lanes 5 and 6). After deglycosylation, no stained bands were visible.

Staining with anti-mucoperlin did not reveal such a discrete anti-mucoperlin-positive band as obtained with the first batch of shell (Fig. 5). Instead, a positive smear from 55 to 30 kDa,

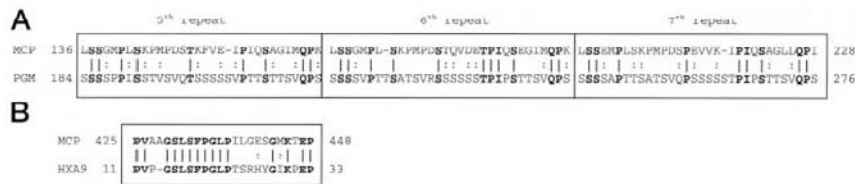


FIG. 3. A, alignment of repeats 5–7 of MCP with those of PGM (accession number trEMBL Q29071), a pig gastric mucin. A gap was introduced in each repeat of MCP to fit with the length of the doubled repeats of PGM. Identical (I) and similar (S) amino acid residues are indicated. B, a short portion of the C-terminus of MCP is aligned with the N terminus of chicken HoxA9 protein (accession number Swiss-Prot Q98924).

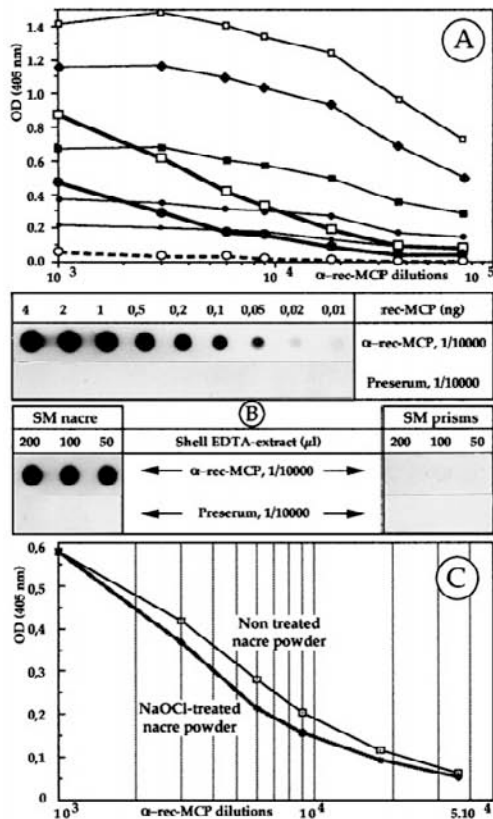


FIG. 4. Detection of native mucoperlin in different shell extracts. The anti-recombinant mucoperlin antibody was tested against EDTA-soluble shell matrices of calcitic prisms and aragonitic nacre of *P. nobilis*, via ELISA (A) and dot-blot (B). For more information, see "Materials and Methods." As a positive control, this antibody was also tested against its target antigen, the recombinant mucoperlin (rec-MCP). A, □, 1 ng of rec-MCP; ▲, 0.5 ng of rec-MCP; ■, 0.25 ng of rec-MCP; ●, 0.1 ng of rec-MCP; ◆, 0.05 ng of rec-MCP; □, SM nacre; ●, SM nacre, diluted 10 times; ○, SM prisms. C, the reactivity of the EDTA extract with the anti-rec-MCP antibody was tested before (black curve) and after (gray curve) a pretreatment of nacre powder with dilute sodium hypochlorite (2 g of active chlorine/liter for 70 h). This pretreatment did not significantly affect the immunological reactivity.

with a maximum between 40 and 30 kDa, was observed (Fig. 6B). Apparently, the mucoperlin in this shell batch had undergone more degradation than in the first batch. But clearly, the positive signal shifted to lower molecular weights after deglycosylation (Fig. 6B, lane 2), indicating removal of sugar residues.

**Calcium Binding Assay and Inhibition of CaCO<sub>3</sub> Precipitation**—The specific association of mucoperlin with the nacre layer suggests that the molecule is functional in the calcification process. This might imply that mucoperlin is able to interact with Ca<sup>2+</sup> and/or to interfere with CaCO<sub>3</sub> precipitation.

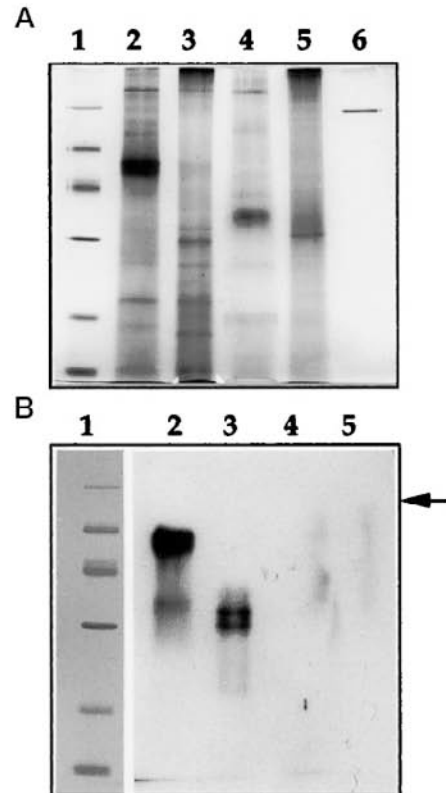


FIG. 5. Characterization of mucoperlin in CH<sub>3</sub>COOH extracts of *P. nobilis* shell on 12% SDS-polyacrylamide gels (A) and Western blots (B). The gel was stained with silver; the blot was revealed with the chemoluminescent substrate Luminol. In each lane, equivalent amounts of matrices were applied (about 10 μg). Lane 1, molecular mass standards (from top to bottom): 94, 67, 43, 30, 20.1, and 14.4 kDa; lane 2, CH<sub>3</sub>COOH-soluble matrix of the nacre; lane 3, Laemmli-soluble fraction of the CH<sub>3</sub>COOH-insoluble matrix of the nacre; lane 4, CH<sub>3</sub>COOH-soluble matrix of the calcitic prisms; lane 5, Laemmli-soluble fraction of the CH<sub>3</sub>COOH-insoluble matrix of the prisms; lane 6, recombinant mucoperlin. B, the arrow on the right side of the blot indicates the position of the recombinant mucoperlin. A, lane 4 exhibits a strong negative staining with silver. In CH<sub>3</sub>COOH-soluble extracts of the nacre, the mucoperlin migrates as a thick band with an apparent molecular mobility between that of bovine serum albumin (67 kDa) and of ovalbumin (43 kDa).

When tested in the CaCO<sub>3</sub> precipitation assay as described by Wheeler *et al.* (33), the recombinant mucoperlin did not delay the precipitation of CaCO<sub>3</sub>. It did not appear to bind Ca<sup>2+</sup> either when submitted to the Ca<sup>2+</sup> binding protocol on Western blot as described by Maruyama and co-workers (31). We assumed that potential interactions of the native mucoperlin with Ca<sup>2+</sup> would be conveyed by its sugar moieties, as is the case for many molluscan shell proteins (47, 48). The combined acetic acid-soluble nacre matrix was able to bind Ca<sup>2+</sup> when tested on dot-blot (Fig. 7A) and strongly inhibited CaCO<sub>3</sub>

crystallization (Fig. 7E). However, individual  $\text{Ca}^{2+}$  binding components could not be demonstrated on Western blots with the protocol of Maruyama *et al.* (not shown), probably as a result of the denaturing conditions during electrophoresis. This was confirmed by the inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  binding by SDS and  $\beta$ -mercaptoethanol in the dot-blot assay (Fig. 7A). Consequently, we could not determine from these experiments whether native mucoperlin is one of the nacre components that interact with  $\text{Ca}^{2+}$ .

*In Situ Localization of Mucoperlin*—The outer, prismatic layer of the *P. nobilis* shell is made of long, thin prisms of calcite with a length of 1–3 mm and a diameter between 50 and 100  $\mu\text{m}$ . Each prism is composed of a pile of thin crystallites, all with identical optical axes (49). The internal, nacreous layer

consists of flat aragonite tablets, approximately 0.5–1  $\mu\text{m}$  thick. The tablets are stacked in a characteristic mortar-and-brick structure (3, 50). The transition between the two layers is abrupt, with sometimes an organic sheet (50  $\mu\text{m}$  thickness) in between. The *in situ* experiments on thin transversal EDTA-etched adult shell sections (Fig. 8) confirm the nacre location of mucoperlin. The nacre layer is stained purple as a result of a positive reaction with anti-mucoperlin, whereas the prismatic layer does not stain at all (Fig. 8B). Mucoperlin might also be localized in the heavily pigmented organic layer between the two microstructures. However, none of our assays permitted us to visualize the presence of mucoperlin in that layer. The staining pattern of the nacre layer on transverse sections is not uniform. At low magnification, it reveals short diffuse purple lines more or less perpendicular to the growth plane (Fig. 8E). At higher magnification, the lower and upper surface of each nacre tablet are finely underlined by the staining, while predominant staining is observed on the short sides of each tablet (Fig. 8C). In any case, mucoperlin was seen to form a continuous sheet around each crystallite of the nacre. Furthermore, sections parallel to the growth plane of juvenile nacre show that mucoperlin is concentrated along the outlines of the tablet (Fig. 8, D and E).

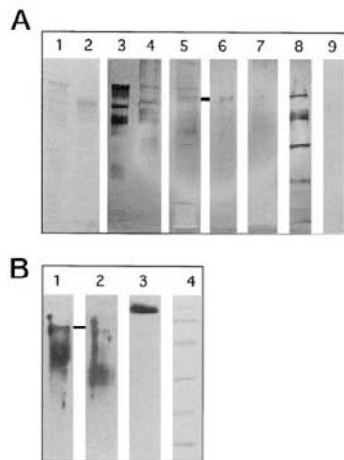


FIG. 6. Glycosylation study of mucoperlin on Western blots, using the glycoprotein detection kit from Bio-Rad (A, lanes 3–9) and the anti-recombinant mucoperlin on acetic acid-soluble nacre extracts (B, lanes 1–3), before and after chemical deglycosylation with TFMS. Gel A, lane 1, glycosylated fetuin, Coomassie Brilliant Blue-stained; lane 2, TFMS-deglycosylated fetuin, Coomassie Brilliant Blue-stained; lane 3, glycosylated fetuin; lane 4, TFMS-deglycosylated fetuin; lane 5, nonglycosylated acetic acid-soluble extract from nacre, batch 2; lane 6, nonglycosylated acetic acid-soluble extract from nacre, batch 1; lane 7, TFMS-deglycosylated acetic acid-soluble extract from nacre, batch 2; lane 8, biotinylated markers, respectively 58.1, 39.8, 29, 20.1, and 14.3 kDa; lane 9, same as lane 5, without treatment with periodate (negative control). The position of mucoperlin is indicated by a bar, between lanes 5 and 6. Gel B, lane 1, nonglycosylated acetic acid-soluble extract from nacre, batch 2; lane 2, TFMS-deglycosylated acetic acid-soluble extract from nacre, batch 2; lane 3, recombinant mucoperlin; lane 4, molecular mass markers, stained with Coomassie Brilliant Blue. The position of mucoperlin is indicated by a bar between lanes 1 and 2.

#### DISCUSSION

Calcified skeletons are formed by the intricate interplay between inorganic ions and a variety of organic macromolecules, collectively called the skeletal organic matrix (1, 2, 5). In a previous paper (17), we proposed that some components of the soluble skeletal matrix of corals and molluscs were recruited from mucous secretions of the Precambrian uncalcified ancestors. Originally, these materials would have been involved in the protection of soft tissues against mineral encrustment in the highly supersaturated oceans of the late Precambrian (51). This anticalcification hypothesis was based on immunological cross-reactivities between water-soluble skeletal matrices and mucous secretions as well as on the ability of both materials to inhibit calcium carbonate crystallization *in vitro*. A drawback of this earlier work was the lack of biochemical information on the secreted macromolecules. This paper supports our hypothesis by providing convincing structural evidence that at least some skeletal matrix components evolved from mucous secretions.

We isolated a novel gene (*mcp*) from an expression library of the bivalve *P. nobilis* with antibodies raised against the acetic acid soluble skeletal matrix from *Pinna* nacre. The encoded protein mucoperlin shows homology with mucins, a broad family of proteins (37, 38, 45) and important constituents of metazoan mucous secretions.

FIG. 7. Calcium binding (7A) and *in vitro* inhibition of calcium carbonate precipitation (7B) assays. A, the acetic acid-soluble matrix of nacre-bound calcium only in nondenaturing conditions. In presence of Laemmli sample buffer, this effect was drastically reduced. GPA and rabbit albumin are positive and negative controls, respectively. In B, the same matrix exhibited a strong inhibiting effect.

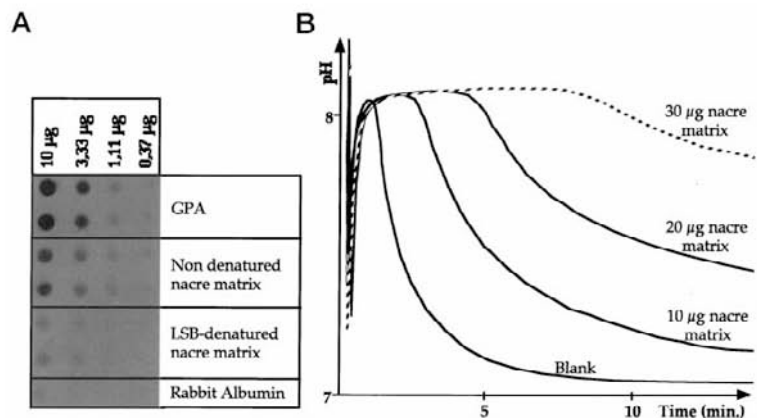
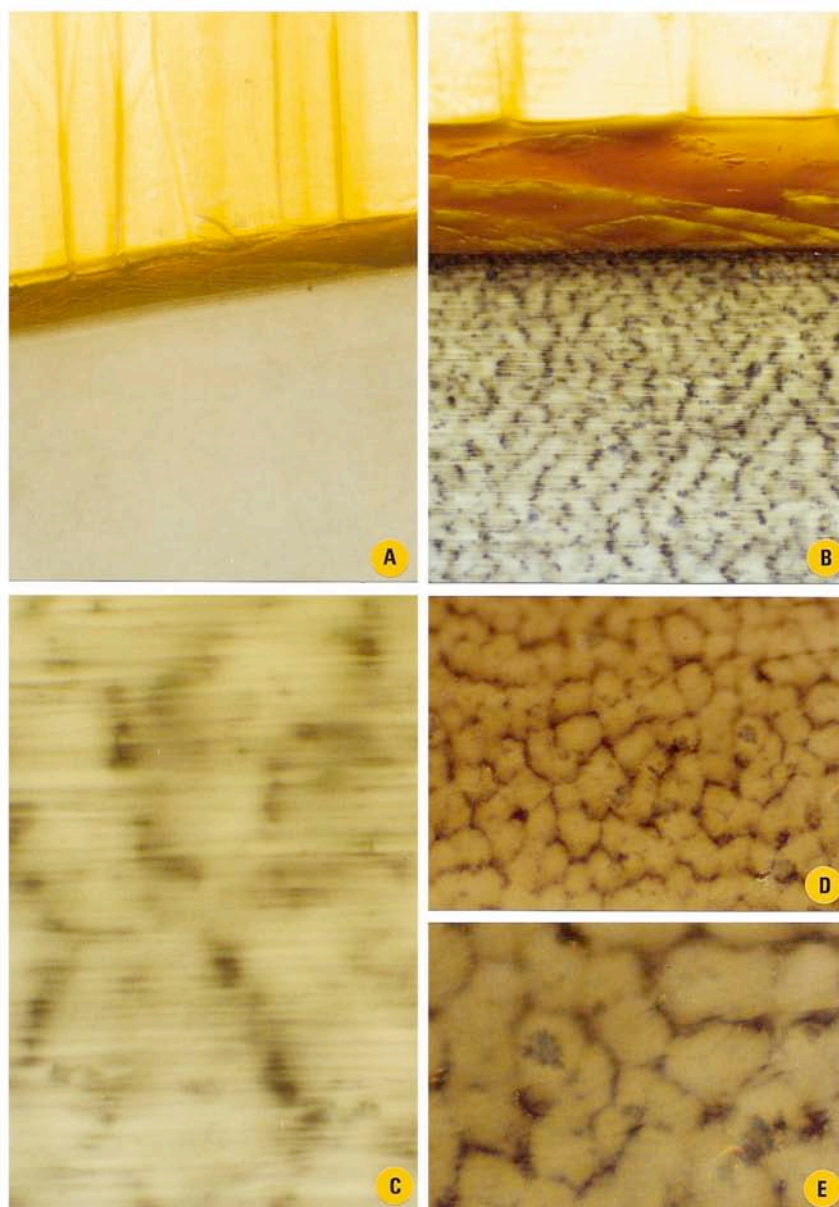


FIG. 8. *In situ* localization of mucoperlin in the shell of *P. nobilis*, with the antirecombinant MCP antibody. For technical details, see "Materials and Methods" and Refs. 17 and 34. In transversal section, the shell presents a macro-prismatic microstructure, with long calcitic prisms (Fig. 8, A and B, upper yellow compartment) and a nacreous layer (Fig. 8, A and B, lower compartment). The two calcified layers are generally separated by an organic layer, 50–60  $\mu\text{m}$  thick (brown line, Fig. 8, A and B). The nacreous layer is composed a succession of minute aragonitic tablets (approximately 1- $\mu\text{m}$  thick). A, negative control with preserum of anti-rec-MCP, diluted  $10^4$  times. B, staining with anti-rec-MCP, diluted  $10^4$  times. C, same section, high magnification. The staining reveals horizontal lines, which delineate the upper and lower surfaces of each tablet. The predominant staining occurs, however, on the short lateral sides of the tablets. D, longitudinal section (parallel to the growth plane of the nacre) in a juvenile *P. nobilis* shell. This preparation confirms that mucoperlin is localized around the polygonal elements (size about 15–20  $\mu\text{m}$ ) of the nacre. E, same preparation, high magnification.



Numerous mucin genes have been determined, from protozoans to vertebrates (52–57), but among the molluscs they have not yet been identified. So far, the single molluscan mucin proteins, which have been genetically characterized are few lectins of the land slug (58, 59). Mucins are heavily glycosylated and sometimes sulfated proteins of which the sugar moiety can amount to 85% of the total weight (38, 56). The protein cores (apomucins) are characterized by the presence of numerous tandem repeats in their central region. The repeats vary in size from 6 (60) up to 169 (61) amino acids. They all contain many serine and threonine residues, a large proportion of which constitute *O*-glycosylation sites. The protein cores of mucins are also rich in helix-breaking proline residues, accounting for the rigid rodlike structure of the proteins (37, 38). Mucins are able to form disulfide-dependent soluble dimers (56, 62) and multimeric insoluble gels through cross-linking of cysteine-enriched domains in the C- and N-terminal parts of the molecules (63, 64). They act as lubricants protecting the underlying

epithelial tissues against viruses, bacteria, and other harmful agents. Furthermore, they play a role in selective interactions with the environment and in cellular recognition processes (65). Our idea of an anticalcifying function is well in agreement with the multifunctional nature of mucous materials.

Mucoperlin has many of the structural features characteristic of mucins. The core region has 13 tandem repeats rich in serine, threonine, and proline. These residues, important determinants of glycosylation and protein conformation, all occur at conserved positions (see Fig. 2). Also indicative is the concentration of the 3 cysteine residues of mucoperlin in the C-terminal region. This suggests that mucoperlin may form tail-to-tail dimers.

We did not find N-terminal cysteines, although these occur in virtually all mucins studied. Note that MUC7 (66), a water-soluble mucin from human saliva, and RSM, a rat submandibular mucin (67), contain only two cysteine residues, both localized at the N terminus. Thus, as MUC7 and RSM, mucoperlin

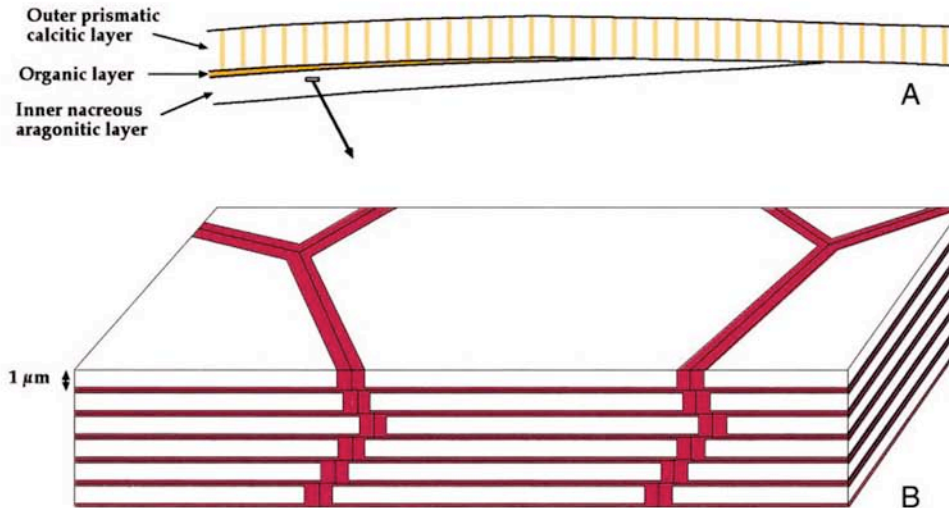


FIG. 9. Schematic drawing of the localization of mucoperlin in the shell of *P. nobilis*. A, nacropismatic microstructure of the shell. B, mucoperlin (dark red) is localized in the nacreous layer, around the tablets. Since nacre tablets grow from a center and extend laterally, mucoperlin may be involved in the lateral control of the growth.

appears to be anomalous in this respect. On the other hand, we cannot exclude the possibility that our isolate of *mcp* is incomplete at the 5'-end. Our identification of the start codon of *mcp* should be confirmed with Northern analysis, reverse transcriptase-polymerase chain reaction amplification of the mRNA 5' terminus, and genomic cloning. This work could not be carried out for this study because fresh tissue material of the protected species *P. nobilis* can only rarely be made available.

The specific association of mucoperlin with nacre tablets and not with the prisms indicates that the protein plays a functional role in the calcification process and is not a haphazard inclusion in the shell. This observation confirms our previous experiments (17), where we found a specific localization of mucous-homologous soluble matrix components in the shell of the bivalve mollusc *Mercenaria mercenaria*.

What could be the role of mucoperlin in the formation of nacre? Weiner and Traub (68) proposed a hypothetical model that would describe nacre formation (see also Refs. 1, 2, and 69). Insoluble matrix components would form a hydrophobic chamber-like framework to which soluble, acidic proteins rich in Asp/Glu-X or Asp/Glu-Ser-X motifs would be attached, adopting a  $\beta$ -sheet conformation. These repetitive acidic motifs would induce  $\text{CaCO}_3$  nucleation and promote epitaxial growth of the crystals or, in contrast, terminate crystal growth when covering growth surfaces (70). Structural information that became available on various molluscan shell proteins in recent years (71–76) indicates that the regulation of crystal growth may be more subtle and complex; proteins such as nacrein (71), MSI60 (72), lustrin A (73), N16 (75), N14, and N66 (76), all from molluscan nacre, are clearly multifunctional. For example, nacrein and MSI60 exhibit both calcium binding domains and in addition a carbonic anhydrase function (for the first one) and a set of hydrophobic motifs (for the second one). N16, a newly discovered protein comprising at least three isoforms, exhibits four short acidic regions and a heparin-binding-like domain. Lustrin A is characterized by an alternation of proline-rich and cysteine-rich modules and a long GS domain putatively forming a "glycine loop." The C terminus of lustrin A presents a short basic domain and a protease inhibitor-like domain. Although lustrin A is thought to be mainly responsible of the toughness of nacre (77), additional functions are predicted from its sequence. Lustrin A may be a member of a

protein family, since another protein related to lustrin A has been recently isolated (78). The cloning of mucoperlin, the first mucin-like protein to be localized in a molluscan nacre, extends one step more our view on molluscan calcification. Furthermore, it emphasizes the role of mucins in metazoan mineralization.

Mucins have indeed been shown to be associated with calcification in different mineralizing systems: the buccal cavity, where salivary mucins strongly bind to teeth hydroxyapatite (79, 80) and protect the teeth against demineralization (81); the gallbladder, where the mucin GBM promotes gallstone formation (82) but also delays the precipitation of calcium phosphate (83); and urine, where urinary mucins modulate the shape of calcium oxalates (84) and act as heterogeneous nucleants for calcium salts (85). In molluscs, mucins have been suspected of playing a role in calcification (86), but only little molecular evidence has been given (87).

In the absence of a more comprehensive theory on molluscan calcification than the proposed model, any suggestion for the role of mucoperlin must be tentative (Fig. 9). It has been previously suggested (88–90) that the nucleating macromolecules in nacre were located in the central part of the nacre polygons. Our observation that mucoperlin snugly surrounds the nacreous tablets (see Fig. 8) might indicate that its primary role would be to terminate crystal growth, in a way, similar to the mechanism described by Wheeler *et al.* (70). This hypothesis would be in agreement with the idea that the original function of mucoperlin in ancestral stocks would have been anticalcification, *i.e.* to inhibit spontaneous encrustation of soft tissues. We observed that acetic acid-soluble extracts of nacre of *P. nobilis* containing mucoperlin, could bind calcium, when non-denatured, and strongly inhibited the precipitation of calcium carbonate *in vitro*. It is not yet clear whether these roles are played solely by mucoperlin or are the result of the interaction between different components of the nacre matrix. Further studies are required to isolate large amounts of native mucoperlin from nacre extracts and to characterize this protein *in vitro*. In particular, attention has to be given to its glycosyl moieties. Recent works (47, 48) demonstrated the importance of protein-bound polysaccharides in the regulation of molluscan calcification process. This, in combination with the study of the temporospatial pattern of *mcp* gene expression by *in situ* hy-

bridization, will finally permit elucidation of the function of mucoperlin in molluscan calcification and identification of the cell types that contribute to mucoperlin deposition in naure tissues.

*Acknowledgments*—F. M. thanks Dr. D. Sellos and Dr. Van Vornhout (Laboratoire de Biologie Marine du Collège de France) for teaching him the basic techniques of molecular biology.

#### REFERENCES

1. Lowenstam, H. A., and Weiner, S. (1989) *On Biomineralization*, Oxford University Press, New York
2. Addadi, L., and Weiner, S. (1992) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **31**, 153–169
3. Carter, J. W. (ed) (1990) *Skeletal Biomineralization: Patterns, Processes, and Evolutionary Trends*, Van Nostrand Reinhold, New York
4. Jackson, A., Vincent, J., and Turner, R. (1988) *Proc. R. Soc. Lond. B* **234**, 415–425
5. Wilbur, K. M., and Saleuddin, A. S. M. (1983) *The Mollusca*, Vol. 4 (Saleuddin, A. S. M., and Wilbur, K. M., eds) pp. 235–287, Academic Press, Inc., New York
6. Rosen, V., and Thies, R. S. (1992) *Trends Genet.* **8**, 97–102
7. Reddi, A. H. (1997) *Cytokine Growth Factor Rev.* **8**, 11–20
8. Dickman, S. (1997) *Science* **276**, 1502
9. Rodan, G. A., and Harada, S. (1997) *Cell* **89**, 677–680
10. Lowenstam, H. A., and Margulies, L. (1980) *Biosystems* **12**, 27–41
11. Bengtson, S. (1992) *The Proterozoic Earth: A Multidisciplinary Study* (Schopf, J. W., and Klein, C., eds) pp. 397–411, Cambridge University Press, Cambridge, UK
12. Ayala, F. J., Rzhetsky, A., and Ayala, F. J. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 606–611
13. Bromham, L., Rambaut, A., Fortey, R., Cooper, A., and Penny, D. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 12386–12389
14. Adoutte, A., Balavoine, G., Lartillot, N., and de Rosa, R. (1999) *Trends Genet.* **15**, 104–108
15. Valentine, J. W., Jablonski, D., and Erwin, D. H. (1999) *Development* **126**, 851–859
16. Knoll, A. H., and Carroll, S. B. (1999) *Science* **284**, 2129–2137
17. Marin, F., Smith, M., Isa, Y., Muzzer, G., and Westbroek, P. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 1554–1559
18. Westbroek, P., and Marin, F. (1998) *Nature* **392**, 861–862
19. Lopez, E., Vidal, B., Berland, S., Camprasse, S., Camprasse, G., and Silve, C. (1992) *Tissue Cell* **24**, 667–679
20. Athan, G., Balmain, N., Berland, S., Vidal, B., and Lopez, E. (1997) *C. R. Acad. Sci. Paris Ser. III* **320**, 253–258
21. Marin, F., Muzzer, G., and Dauphin, Y. (1994) *C. R. Acad. Sci. Paris Ser. III* **318**, 1653–1659
22. Collins, M. J., Curry, G. B., Muzzer, G., Quinn, R., Zomerdijk, T., and Westbroek, P. (1988) *Hist. Biol. (Paris)* **1**, 207–224
23. Crenshaw, M. A. (1972) *Biomineralization* **6**, 6–11
24. Gaffey, S., and Bronniman, C. E. (1993) *J. Sediment. Petrol.* **63**, 752–754
25. Wheeler, A. P., Rusenko, K. W., George, J. W., and Sikes, C. S. (1987) *Comp. Biochem. Physiol. B Comp. Biochem.* **87**, 953–960
26. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680–685
27. Myers, J. M., Veis, A., Sabsay, B., and Wheeler, A. P. (1996) *Anal. Biochem.* **240**, 300–302
28. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 4350–4354
29. Leong, M. M. L., Milstein, C., and Pannell, R. (1986) *J. Histochem. Cytochem.* **34**, 1645–1650
30. Edge, A. S. B., Faltynek, C. R., Hof, L., Reichert, L. E., Jr., and Weber, P. (1981) *Anal. Biochem.* **118**, 131–137
31. Maruyama, K., Mikawa, T., and Ebashi, S. (1984) *J. Biochem. (Tokyo)* **95**, 511–519
32. Corstjens, P. L. A. M., van der Kooij, A., Linschooten, C., Brouwers, G. J., Westbroek, P., and de Vrind de Jong, E. (1998) *J. Phycol.* **34**, 622–630
33. Wheeler, A. P., George, J. W., and Evans, C. A. (1981) *Science* **212**, 1397–1398
34. Muzzer, G., and Westbroek, P. (1989) *Geochim. Cosmochim. Acta* **53**, 1699–1702
35. Hansen, J. E., Lund, O., Tolstrup, N., Gooley, A. A., Williams, K. L., and Brunak, S. (1998) *Glycoconj. J.* **15**, 115–130
36. Elom, N., Gammeltoft, S., and Brunak, S. (1999) *J. Mol. Biol.* **294**, 1351–1362
37. Jentoft, N. (1990) *Trends Biochem. Sci.* **15**, 291–294
38. Hilken, J., Ligtenberg, M. J. L., Vos, H. L., and Litinov, S. V. (1992) *Trends Biochem. Sci.* **17**, 359–363
39. McCaldon, P., and Argos, P. (1988) *Proteins* **4**, 99–122
40. Huttner, W. B. (1987) *Trends Biochem. Sci.* **12**, 361–363
41. Pearson, W., and Lipman, W. J. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 2444–2448
42. Turner, B. S., Bhaskar, K. R., Hadzopoulou-Cladaras, M., Speiran, R. D., and Lamont, J. T. (1995) *Biochem. J.* **308**, 89–96
43. Gaunt, S. J., and Strachan, L. (1996) *Dev. Dyn.* **207**, 270–280
44. Tytgat, K. M. A. J., Swallow, D. M., Van Klینken, B. J. W., Büller, H. A., Einerhand, A. W. C., and Dekker, J. (1995) *Biochem. J.* **310**, 1053–1054
45. Van Klینken, B. J. W., Einerhand, A. W., Büller, H. A., and Dekker, J. (1998) *Anal. Biochem.* **265**, 103–116
46. Dauphin, Y., and Marin, F. (1995) *Experientia* **51**, 278–283
47. Albeck, S., Weiner, S., and Addadi, L. (1996) *Chem. Eur. J.* **2**, 278–284
48. Marxen, J. C., Hammer, M., Gehrke, T., and Becker, W. (1998) *Biol. Bull.* **194**, 231–240
49. Culf, J. P., Denis, A., Flamand, D., and Frérotte, B. (1985) *Sci. Rep. Port-Cros Natl. Park Fr.* **11**, 95–107
50. Schmidt, W. J. (1924) *Zool. Jahrb. Abt. Anat. Ontog. Tiere* **45**, 1–148
51. Knoll, A. K., Fairchild, I. J., and Swett, K. (1993) *Falaises* **8**, 512–525
52. Di Noia, J. M., Sanchez, D. O., and Frasch, A. C. C. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 24146–24149
53. Wang, P., and Granados, R. R. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 16663–16669
54. Theopold, U., Samakovlis, C., Erdjument-Bromage, H., Dillon, N., Axelsson, E., Schmidt, O., Tempst, P., and Hultmark, D. (1997) *J. Biol. Chem.* **271**, 12708–12715
55. Gendler, S. J., and Spicer, A. P. (1995) *Annu. Rev. Physiol.* **57**, 607–634
56. Gum, J. R., Jr. (1996) *Biochem. Soc. Trans.* **23**, 795–799
57. Seregni, E., Botti, C., Massaron, S., Lombardo, C., Capobianco, A., Bogni, A., and Bombardieri, E. (1997) *Tumori* **83**, 625–632
58. Yusa, H. J., Furuta, E., Nakamura, A., and Takagi, T. (1998) *Comp. Biochem. Physiol. B Comp. Biochem.* **119**, 479–484
59. Kurachi, S., Song, Z. W., Takagaki, M., Yang, Q., Winter, H. C., Kurachi, K., and Goldstein, L. J. (1998) *Eur. J. Biochem.* **254**, 217–222
60. Gum, J. R., Jr., Hicks, J. W., Lagace, R. E., Byrd, J. C., Toribara, N. W., Siddiki, B., Fearney, F. J., Lamport, D. T., and Kim, Y. S. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 22733–22738
61. Toribara, N. W., Robertson, A. M., Ho, S. B., Kuo, W. L., Gum, E., Hicks, J. W., Gum, J. R., Jr., Byrd, J. C., Siddiki, B., and Kim, Y. S. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 5879–5885
62. Perez-Vilar, J., Eckhardt, A. E., and Hill, R. L. (1998) *J. Biol. Chem.* **271**, 9845–9850
63. Perez-Vilar, J., Eckhardt, A. E., DeLuca, A., and Hill, R. L. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 14442–14449
64. Axelsson, M. A. B., Asker, N., and Hansson, G. C. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 18864–18870
65. Amerongen, A. V. N., Bolscher, J. G. M., Bloemena, E., and Veerman, E. C. I. (1998) *Biol. Chem.* **379**, 1–18
66. Bobek, L. A., Tsai, H., Biesbrock, A. R., and Levine, M. J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 20563–20569
67. Albone, E. F., Hagen, F. K., VanWuyekhuysen, B. C., and Tabak, L. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 16845–16852
68. Weiner, S., and Traub, W. (1984) *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **304**, 425–434
69. Addadi, L., Moradian, J., Shay, E., Maroudas, N. G., and Weiner, S. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 2732–2736
70. Wheeler, A. P., Rusenko, K. W., and Sikes, C. S. (1988) *Chemical Aspects of Regulation of Mineralization* (Sikes, C. S., and Wheeler, A. P., eds) pp. 9–13, University of South Alabama Publication Services, Mobile, AL
71. Miyamoto, H., Miyashita, T., Okushima, M., Nakano, S., Morita, T., and Matsushiro, A. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 9657–9660
72. Sudo, S., Fujikawa, T., Nagakura, T., Ohkubo, T., Sakaguchi, K., Tanaka, M., Nakashima, K., and Takahashi, T. (1997) *Nature* **387**, 563–564
73. Shen, X., Belcher, A. M., Hansma, P. K., Stucky, G. D., and Morse, D. E. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 32472–32481
74. Sarashina, I., and Endo, K. (1998) *Am. Mineral.* **83**, 1510–1515
75. Samata, T., Hayashi, N., Kono, M., Hasegawa, K., Horita, C., and Akera, S. (1999) *FEBS Lett.* **462**, 225–229
76. Kono, M., Hayashi, N., and Samata, T. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **269**, 213–218
77. Smith, B. L., Schäffer, T. E., Viani, M., Thompson, J. B., Frederick, N. A., Kindt, J., Belcher, A., Stucky, G. D., Morse, D. E., and Hansma, P. K. (1999) *Nature* **399**, 761–763
78. Weiss, I. M., Kaufmann, S., Mann, K., and Fritz, M. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **267**, 17–21
79. Nieuw Amerongen, A. V., Oederkerk, C. H., and Veerman, E. C. I. (1989) *J. Biol. Buc.* **17**, 85–92
80. Tabak, L. A. (1995) *Annu. Rev. Physiol.* **57**, 547–564
81. Nieuw Amerongen, A. V., Oederkerk, C. H., Veerman, E. C. I., and de Groot, K. (1988) *Adv. Biomater.* **8**, 327–330
82. Lechene de la Porte, P., Domingo, N., van Wijland, M., Groen, A. K., Ostrow, J. D., and Lafont, H. (1996) *J. Hepatol.* **25**, 339–348
83. Afidhal, N. H., Ostrow, J. D., Koehler, R., Niu, N., Groen, A. K., Veis, A., Nunes, D. P., Offner, G. (1995) *Gastroenterology* **109**, 1661–1672
84. Akbarieh, M., and Tawashi, R. (1991) *Scanning Microsc.* **5**, 1019–1027
85. Grases, F., and Llobera, A. (1998) *Micron* **29**, 105–111
86. Prezant, R. S. (1990) *The Bivalvia: Proceedings of a Memorial Symposium in Honour of Sir Charles Maurice Yonge, Edinburgh 1986* (Morton, B., ed.) pp. 83–95, Hong Kong University Press, Hong Kong
87. Marxen, J. C., and Becker, W. (1997) *Comp. Biochem. Physiol. B Biol. Sci.* **118**, 23–33
88. Crenshaw, M. A., and Ristedt, H. (1976) *The Mechanisms of Mineralization in the Invertebrates and Plants* (Watabe, N., and Wilbur, K. M., eds) pp. 355–367, University of South Carolina Press, Columbia, SC
89. Mutvei, H. (1980) *The Mechanisms of Biomineralization in Animals and Plants* (Omori, M., and Watabe, N., eds) pp. 49–56, Tokai University Press, Tokyo
90. Nakahara, H. (1991) *Mechanisms and Phylogeny of Mineralization in Biological Systems* (Suga, S., and Nakahara, H., eds) pp. 343–350, Springer-Verlag, Tokyo
91. European Economic Community (1992) *Off. J. E. C. L206*, 22.7.1992







## Screening molluscan cDNA expression libraries with anti-shell matrix antibodies

Frédéric Marin,<sup>a,\*</sup> Klaas de Groot,<sup>a</sup> and Peter Westbroek<sup>b</sup>

<sup>a</sup> IsoTis NV, Prof. Bronkhorstlaan, 10, Gebouw D 3723 MB Bilthoven, The Netherlands

<sup>b</sup> LIC, Gorlaeus Laboratoria, Leiden University, Einsteinweg 55, P.O. Box 9502, 2300 RA Leiden, The Netherlands

Received 5 February 2003, and in revised form 17 March 2003

### Abstract

In a previous paper [Marin et al., *Protein Expr. Purif.* 23 (2001) 175], we showed that polyclonal antibodies raised against molluscan shell matrices could be useful tools for visualizing shell proteins after a preparative fractionation of the shell matrix. In this paper, we have used the same antibodies for screening a cDNA library constructed from mantle tissues of the nacro-prismatic bivalve *Pinna nobilis*. The immunoscreening led to the identification of a new protein, mucoperlin [Marin et al., *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 20667], which was subsequently overexpressed. A polyclonal antibody was obtained from the recombinant mucoperlin. In a control assay, we unambiguously demonstrated that this antibody and one of the sera used for the initial screening hybridize with the same clones. We assess that screening cDNA libraries with antibodies elicited against unfractionated calcifying matrices is a good alternative to oligonucleotide screening techniques, particularly in the field of molluscan biomineralization where only few gene sequences are known.

© 2003 Elsevier Science (USA). All rights reserved.

Screening expression cDNA libraries with antibody probes is a technique, which is commonly performed when oligonucleotide probes are not available [3–5]. For example, immunoscreening has been successfully used for identifying ferritins from a freshwater snail [6], cuticular proteins of the silkworm [7], allergens of diverse sources [8,9], or various tumor-associated proteins [10,11]. However, the success of the technique is strongly dependent on the specificity and on the titer of the antibody used. Ideally, an immuno-screening should be performed with a set of monoclonal or polyclonal high titer antibodies raised against different conformation-independent epitopes that are displayed on both native and denatured forms of the protein [12]. However, these conditions are rarely obtained. Instead, the antibodies used are often elicited against a crude mixture of proteins and, when obtained, these antibodies are usually

not purified from the serum of the immunized animal. Because the serum may contain several antibodies in addition to those elicited against the antigens of interest, there is a risk of fishing out positive clones which have nothing to do with the wanted genes. Furthermore, the signal/background ratio obtained during the screening is frequently low, a situation which may lead to the isolation of pseudo-positive clones, or to the non-identification of truly positive ones.

In a previous paper, we showed that sera raised against non-fractionated molluscan shell matrices of prisms and nacre, respectively, were useful tools for identifying proteins on dot-blot, after the fractionation of the matrix on a preparative electrophoresis [1]. In the present paper, we demonstrate that these antibodies can also be used for screening expression cDNA libraries constructed from molluscan calcifying tissues. In the case of the Mediterranean bivalve *Pinna nobilis*, this operation led to the identification of three clones, whose cDNA inserts encode an ORF of 2.14 kb, called mcp [2]. The corresponding protein, mucoperlin, was overexpressed and purified for generating highly specific polyclonal antibodies. In this paper, we clearly show

\* Corresponding author. Fax: +33-3-80-39-63-87.

E-mail address: [frederic.marin@u-bourgogne.fr](mailto:frederic.marin@u-bourgogne.fr) (F. Marin).

<sup>1</sup> Present address: UMR-CNRS 5561 "Biogéosciences", Université de Bourgogne, 21000 Dijon, France.

that anti-mucoperlin antibodies and one of the sera used for the initial screening hybridize with the same positive clones, in a tertiary screening performed on a phage population containing a mixture of positive and negative clones. We suggest that immunoscreening with anti-shell matrix antibodies is an appropriate technique in the field of molluscan biomineralization, where obtaining the N-terminal or internal protein sequences a prerequisite for developing oligonucleotide probes is often hampered by several technical obstacles.

## Materials and methods

### *Anti-shell matrix antibodies*

*Pinna nobilis*, the Mediterranean giant fan mussel, exhibits a bi-layered shell texture: an internal layer made of aragonitic nacreous tablets, an outer layer composed of long calcitic prisms [13]. These two layers were separated mechanically. The shell fragments were cleaned and crushed under liquid nitrogen. The corresponding shell matrices were extracted with 20% (v/v) acetic acid, as described in earlier studies [1,2]. For each texture, the extraction resulted in the isolation of acetic acid-soluble and acetic acid-insoluble matrices. Polyclonal antibodies were produced by immunizing separately two white rabbits with the acetic acid-soluble matrices of the prisms and of the nacre, respectively [14]. Note that the two antigen preparations were not deglycosylated. A standard immunization procedure was performed with injections at 0, 14, 28, and 56 days, and bleedings at 0 (pre-immune), 38, 66, and 80 days. The sera titers were determined by ELISA [14]. The second bleeding sera were used for further studies.

### *Western-blots on shell matrices of P. nobilis*

The two acetic acid-soluble matrices (from prisms and from nacre) were heat-denatured by Laemmli buffer [15]. Two additional fractions, referred to as Laemmli-soluble matrices, were obtained by resuspending in Laemmli buffer and heat-denaturing the acetic acid-insoluble matrices. The acetic acid- and Laemmli-soluble matrices were run on two 12% polyacrylamide mini-gels (Bio-Rad Protean II), in denaturing conditions [15]. The gels were subsequently blotted onto PVDF Immobilon-P membranes (Millipore), with the Bio-Rad Mini Trans-Blot module [16]. The membranes were blocked with gelatin (1% w/v) in Tris-buffered saline (TBS) and then incubated with the anti-prisms matrix or anti-nacre matrix serum, respectively, diluted 3000 times in a TBS solution containing gelatin (0.5% w/v) and Tween 20 (0.05% v/v). After three washing steps, the membranes were incubated with the secondary antibody (GAR/Peroxidase

conjugate, Sigma A6154), then washed again, and incubated with the chemoluminescent substrate luminol [17].

### *cDNA library construction*

N<sub>2</sub>-frozen pieces of calcifying mantle tissues, which were kindly provided by CERAM (Centre d'Etudes des Ressources Animales Marines, B. De Gaulejac), were used for constructing an expression cDNA library (Stratagene Catalog 200404) with the *EcoRI-XhoI* pre-digested Zap Express vector. The protocol was fully described elsewhere [2]. The primary library yielded 350,000 clones. The library was amplified once.

### *Immunoscreening of the cDNA library*

The library was screened with a mixture of the two polyclonal antibodies elicited against prisms and nacre matrices, respectively. Around 500,000 phages were used for infecting *Escherichia coli* XL1-Blue MRF'. Cells were plated on nine square petri dishes and grown for 4 h at 42 °C. The dishes were covered with IPTG-saturated nitrocellulose membranes (BA 85, Schleicher and Schuell) and left at 37 °C for an additional 5 h. The membranes were carefully removed and the plates were incubated overnight with a second set of IPTG-saturated membranes. All the membranes were subsequently blocked with a TBS solution containing 1% (w/v) gelatin and 0.05% (v/v) Tween 20. They were then incubated overnight in the same solution containing a mixture of the two sera (anti-prisms matrix, diluted 3000 times, anti-nacre matrix, same dilution), NaN<sub>3</sub> (500 µg/ml), and PMSF (100 µg/ml). To decrease background staining, *E. coli* extract (1 mg/ml) was admixed to the antibody solution. After three rinsing steps with TBS/Tween 20, the membranes were incubated for 90 min. with the conjugated antibody (GAR/AP conjugate, Sigma A3687) and then rinsed five times. They were revealed with the chemoluminescent substrate CSPD (Roche Molecular Biochemicals, Cat. No 1655884) and then exposed to X-Omat films (Eastman Kodak). This operation led to the isolation of eleven clones, three of them being strongly positive. These clones were picked up, suspended in SM buffer, titered, and rescreened to purity. They were subsequently converted to pBK-CMV phagemid vector, in a one-step excision procedure involving the ExAssist helper phage (Stratagene Catalog 211203). The phagemids were propagated into XL0LR strain. The three plasmids were digested with *PstI* and *XhoI* restriction enzymes and the fragments were subsequently analyzed on a 1% agarose gel. The complete insert was sequenced (GenBank Accession No. AF145215). The sequence obtained encodes a protein called mucoperlin, the characteristics of which were previously described [2].

### Overexpression and purification of recombinant mucoperlin

The cDNA insert encoding mucoperlin was subcloned as a *Bam*HI-*Kpn*I fragment in vectors pQE-30, -31, and -32 (QIAexpress Expression kit IV, Qiagen, Catalog No. 32149). The subcloning in vector pQE-32 resulted in the addition of an extra fragment of 33 bp to the 5'-end of the original cDNA. This fragment encoded an eleven amino acid peptide (MRGSHHHHHHG) with a molecular mass of 1.5kDa. The construct was transformed into competent *E. coli* M15[pREP4], which were subsequently plated on LB-agar containing kanamycin (25 µg/ml) and ampicillin (100 µg/ml). The overexpression of mucoperlin was performed as follows: a starter liquid culture, grown overnight in LB/Kn/Amp at 32°C, was used for inoculating a prewarmed LB/Kn/Amp medium. At OD 0.6, the overexpression was induced by adding to the medium IPTG to a final concentration of 1 mM. After 3 h of induction, the cells were harvested and centrifuged (5500 rpm, 15 min), and the supernatant was discarded. The recombinant protein was purified under denaturing conditions: the pellet was resuspended in phosphate buffer (lysis buffer B, see [18]) containing 8 M urea (pH 8) and the suspension was sonicated (15 min) and then centrifuged again. The supernatant was filtered (0.45 µm), while the pellet was disrupted further by sonication. The recombinant mucoperlin was purified by affinity on a Ni<sup>2+</sup>-nitrilotriacetic acid (NTA) agarose gel: the pooled *E. coli* supernatants were gently mixed with the Ni-NTA slurry for 1 h, in a 4/1 volume ratio (batch purification), and then the mixture was loaded onto a 5 ml disposable column. The chromatography was performed according to manufacturer's instructions [18] by lowering the pH successively to 6.3 (two washing steps, buffer C), 5.9 (first elution, buffer D), and 4.5 (second elution, buffer E). All these fractions were tested on a 7% polyacrylamide mini-gel and on Western-blots. In this latter case, we used anti-His tag antibody (Qiagen, Ref. 34610), for detecting the recombinant mucoperlin. We observed that the last elution, which contained most of the recombinant mucoperlin, exhibited additional bands. We subsequently performed a second purification step of the last eluate on a preparative electrophoresis (Bio Rad, model 491 Prep Cell, 7% polyacrylamide), in denaturing conditions. The gel was run at 250 V overnight. 80 fractions of 5 ml each were continuously collected at a flow rate of 0.5 ml/min. Aliquots (100 µl) of these fractions were dot-blotted (Bio-Rad Bio-Dot apparatus). The recombinant mucoperlin was detected with anti-His tag antibody. To check the purity of the fractions containing mucoperlin, aliquots (20 µl) were directly tested on a 7% polyacrylamide mini-gel, which was subsequently stained with silver. The fractions were pooled and the volume was reduced by ultrafiltration (Amicon

stirring cell). The solution was then extensively dialyzed and freeze-dried.

### Tertiary screening with polyclonal anti-mucoperlin antibodies

Polyclonal antibodies were obtained by immunizing a white rabbit with the purified recombinant mucoperlin. We used the same immunization schedule as the one described above. This resulted in the production of high titer sera (determined by ELISA). To check that the isolated clones were not haphazard positive signals, we performed a tertiary screening, where known amounts of admixed positive (around 50) and negative (around 1000) clones were allowed to infect *E. coli* XL1-Blue MRF<sup>r</sup>. Cells were plated on one petri dish and incubated at 42°C for 4 h. The petri dish was then covered 3 × 4 h with three successive IPTG-saturated membranes. The first membrane was incubated with anti-mucoperlin (second bleeding, 1/15,000), the second, with anti-prisms matrix (1/3000), and the third, with anti-nacre matrix (1/3000). The membranes were revealed as described above. The screening was repeated twice.

## Results

### Antibodies against prisms and nacre matrices

Fig. 1 shows the results of the Western-blots, after the incubation of acetic acid-soluble and Laemmli-soluble matrices of prisms and nacre with anti-prisms matrix (left) or with anti-nacre matrix serum (right). These

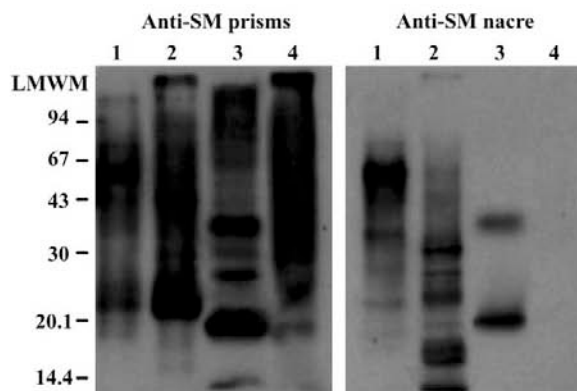


Fig. 1. Western-blots of the nacre (lanes 1 and 2) and of the prisms matrices (lanes 3 and 4) of *P. nobilis*. The acetic acid-soluble (lanes 1 and 3) and the acetic acid-insoluble/Laemmli-soluble matrices (lanes 2 and 4) were tested. The left membrane was incubated with anti-prisms matrix serum (diluted 3000 times), the right one, with the anti-nacre matrix serum (same dilution). Note that the anti-nacre matrix serum is more specific than the anti-prisms matrix serum. LMWM: low molecular weight markers.

antibodies revealed several protein bands, among which few were predominant. The two antibodies cross-reacted, but not similarly. While the anti-prisms matrix serum cross-reacted with all the matrices with similar intensities, the anti-nacre matrix serum gave a limited cross-reactivity with the acetic acid-soluble matrix of the prisms (only two stained bands, right, lane 3), and no cross-reactivity with the Laemmli-soluble matrix of the prisms (right, lane 4). This suggests that nacre and prisms matrices share several epitopes, but also possess layer-specific epitopes. Our data are coherent with earlier findings [14,19]. In addition, they confirm that, in some cases, Western-blot incubated with polyclonal anti-matrix antibodies give a sharper picture of the discrete components of the matrix than silver-stained gels [1].

#### Immunoscreening of the cDNA library

Around 500,000 clones were screened with a mixture of the two antibodies. Our screening yielded 11 clones, three of which gave the highest signal/background ratio. Fig. 2 shows one of the three clones (Fig. 2A) and the result after a second screening of this clone with the same mixture of antibodies (Fig. 2B). In spite of a high

background, the isolated clones were undoubtedly positive. The clone was excised and the resulting pBK-CMV plasmid containing the insert was digested with *Pst*I and *Xho*I restriction enzymes. As shown by Fig. 2C, we obtained a 2.1 kb *Pst*I fragment. The double digestion also yielded a short (< 0.1 kb) *Pst*I-*Xho*I fragment (not shown on the gel). The three clones showed exactly the same restriction pattern. Subsequent sequencing confirmed that the three inserts were identical and that a *Pst*I restriction site was present 79 bases upstream the *Xho*I site at the 3'-end. The insert encodes mucoperlin.

#### Overexpression of mucoperlin

The cDNA insert encoding mucoperlin was subcloned in vectors pQE-30, -31, and -32. The in-frame insertion of the mcp cDNA was obtained with vector pQE-32 (Fig. 3A, lane 4). The produced recombinant mucoperlin contained poly-His tag at its N-terminus. Because this protein was used for generating polyclonal antibodies and not for functional studies, we chose to purify it under denaturing conditions with 8M urea. This treatment precluded the purification problems of native proteins, in particular the formation of insoluble inclusion bodies, which often occurs when eukaryotic

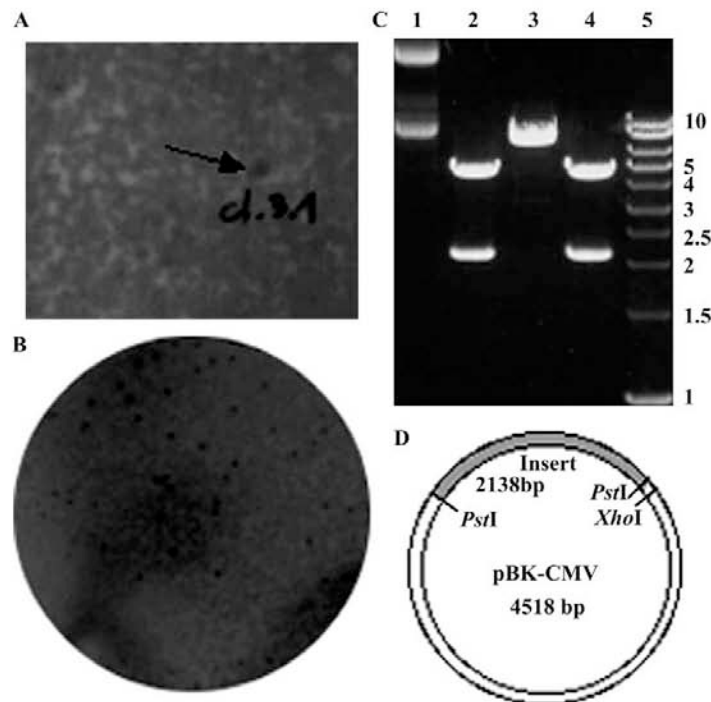


Fig. 2. Screening and insert analysis. (A) Primary immunoscreening of a cDNA library with a mixture of the two sera. A small area of a 110 × 110 mm plate is shown. The darker dot (see arrow) has been rescreened (B). After excision of the phage, the digestion of the plasmid pBK-CMV with *Xho*I/*Pst*I (C) yielded a 2.1 kb *Pst*I fragment and a short *Pst*I-*Xho*I fragment (not shown on the gel). Lane 1, undigested plasmid; lane 2, *Pst*I-digested plasmid; lane 3, *Xho*I-digested plasmid; lane 4, *Xho*I/*Pst*I-digested plasmid; and lane 5, DNA markers (kb). (D) Structure of the mcp cDNA insert.

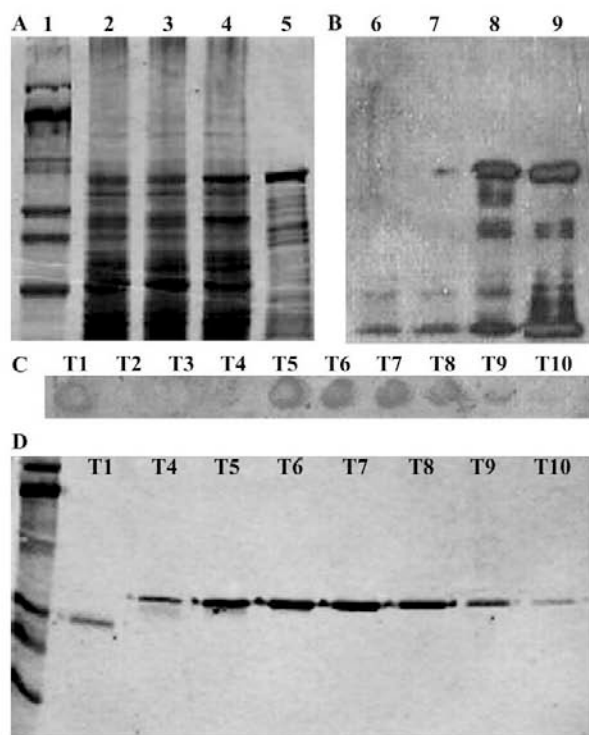


Fig. 3. Overexpression of recombinant mucoperlin in *E. coli* M15[pREP4]. (A) Silver-stained 7% polyacrylamide gel. (B) Western-blot after incubation with anti-His-tag antibody. The *mcp* cDNA insert was cloned in vector pQE30 (lanes 2 and 6), pQE31 (lanes 3 and 7), and in-frame in vector pQE32 (lanes 4 and 8). Lanes 5 and 9: recombinant mucoperlin, after a first purification step on Ni-NTA column (elution E, see Materials and methods). Some contaminants are still visible. Lane 1: high molecular weight markers: from top to bottom 205, 116, 97, 66, 45, and 31 kDa, respectively. (C) Dot-blot of recombinant mucoperlin, after a second purification step of the E eluate on preparative electrophoresis. The fractions were tested with anti-His-tag antibody. Mucoperlin was mainly eluted in fractions 5–10. (D) Silver-stained 7% polyacrylamide mini-gel of the fractions 1, 4–10 obtained after the preparative electrophoresis. Lane 1: high molecular weight markers, same as above. Tube 1 is either a contaminant or a degradation product of mucoperlin.

proteins are expressed in *E. coli* [18]. On a 7% polyacrylamide mini-gel (Fig. 3A) and on Western-blot (Fig. 3B), the recombinant mucoperlin migrated as a 80 kDa band, which was in agreement with the theoretical mass deduced from the insert sequence including the His-tag. After the first purification step on Ni-NTA column, some extra bands were visible both on the silver-stained gel (Fig. 3A, lane 5) and on the Western-blot (Fig. 3B, lane 9). These bands may correspond to mucoperlin degradation products or *E. coli* contaminants. A second step of purification on a preparative electrophoresis was, however, required, to obtain pure mucoperlin. On dot-blot, mucoperlin was eluted from tube 4 to tube 10 (Fig. 3C), a result which was confirmed on the silver-stained mini-gel (Fig. 3D). Tubes 5–10 were pooled. In total, around 1 mg of pure mucoperlin was produced from four batches of liquid cultures representing in total one liter. By assuming that there were no losses during the two consecutive purification steps, this represents a low expression level, around 0.8% according to the Qiagen instruction manual [18]. From 1 mg pure mucoperlin, 500  $\mu$ g was used for generating polyclonal antibodies. In our previous paper [2], we showed that this antibody preparation cross-reacted with a single band of the acetic acid-soluble nacre matrix but gave no cross-reactivity with the prisms matrices.

#### Tertiary immunoscreening

An unequivocal demonstration that the positive clones resulting from the primary screening were also positive with the polyclonal antibody raised against recombinant mucoperlin is given in Figs. 4(A–C). In this experiment, the same mixture of positive and negative clones was hybridized, respectively, with anti-mucoperlin, anti-prisms matrix, and anti-nacre matrix sera. The anti-nacre matrix and the anti-mucoperlin sera gave two completely superposable patterns. The single difference lay in the signal/background ratio, which was greatly

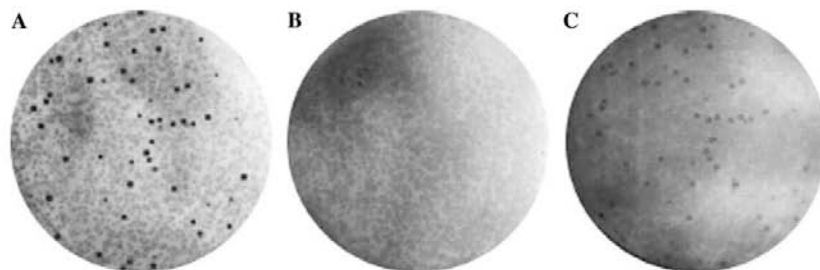


Fig. 4. Tertiary screening of a mixture of positive and negative clones, with anti-recombinant mucoperlin (A, dilution 1/15,000), anti-prisms matrix (B, dilution 1/3000), and anti-nacre matrix (C, dilution 1/3000) sera. Although (A) and (C) exhibit the same pattern, the signal/background ratio is improved when anti-recombinant mucoperlin serum is used.

improved when the more specific anti-mucoperlin was used. The anti-prisms matrix serum did not give any cross-reactivity at all with the mucoperlin-expressing clones.

## Discussion

In the present paper, we have used two cross-reacting antibodies for screening an expression cDNA library made from calcifying mantle tissues of the giant Mediterranean fan mussel *P. nobilis*. This operation resulted in the identification and the characterization of a protein, that we named mucoperlin, because of its similarities with mucins. In a previous paper [2], we demonstrated that mucoperlin is specific of the nacreous layer of *P. nobilis*, by using three different techniques, Western-blot, dot-blot, and immunohistology. We showed further that mucoperlin is one of the major discrete constituents of the acetic acid-soluble matrix of the nacre, which itself represents less than 0.02 % of the weight of the nacre dry powder (F.M., unpublished data). From our estimations, mucoperlin may indeed account for 2–10 µg per gram of nacre powder, the remaining part of the acetic acid-soluble matrix being constituted by polydisperse components. We presently show here that among the two antibodies used for screening our cDNA library, only the anti-nacre antibody cross-reacts with the mucoperlin-expressing clones. Thus, we give a fourth although indirect demonstration that mucoperlin is nacre-specific and totally absent from the prisms of *P. nobilis*.

On a total of  $5 \times 10^5$  screened clones, we detected only three strongly positive clones and eight additional, which were putatively positive. The number of detected positive clones is singularly low, if we consider the multiple potential antigenic determinants, present in the shell matrix of *P. nobilis*. This scarcity may be explained by four combined factors: first, a low level of the shell protein-encoding transcripts, when the mantle tissues were sampled for constructing the cDNA library. Second, a considerable number of conformation-dependent antibodies synthesized in the serum of the immunized rabbit. In a previous paper, we showed indeed that there was a substantial decrease of immunological reactivity when an antibody raised against a native matrix was tested against the same SDS-denatured matrix [20]. Third, a low immunogenicity of some protein epitopes of the matrix, by comparison to others, like those of mucoperlin. Lastly, a high level of polysaccharidic epitopes in the matrix. Shell matrices are indeed known to be heavily glycosylated [21,22]. It is thus very likely that many of the antibodies are elicited against the polysaccharide moiety of the shell matrix, as suggested by our previous studies [20].

In spite of these limitations, we believe that immunoscreening with anti-shell matrix sera is a reasonable alternative to screening techniques involving degenerate oligonucleotide probes, when gene sequences are rare or not yet available. This is particularly true in the invertebrate biomineralization field: when we refer to the molluscan mineralization, only eight shell-associated protein sequences have been published, among which two were determined by a direct sequencing, five, by PCR/screening with oligonucleotide probes, and one, by immunoscreening. We assess that immunoscreening is an easy way to rapidly obtain several clones encoding different shell proteins, in one screening experiment. However, to increase the chance of picking up different cDNAs, we strongly recommend the deglycosylation of the matrix and its chemical denaturation with SDS/β-mercaptoethanol before raising the antibodies used for screening.

## Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Fondation Simone et Cino Del Duca (Paris, France) for the year 2000 and by IsoTis NV (Bilthoven, The Netherlands) for the period 2001–2002.

## References

- [1] F. Marin, L. Pereira, P. Westbrook, Large-scale fractionation of molluscan shell matrix, *Protein Expr. Purif.* 23 (2001) 175–179, doi: 10.1006/prep.2001.1487.
- [2] F. Marin, P. Corstjens, B. De Gaulejac, E. De Vrind De Jong, P. Westbrook, Mucins and molluscan calcification: molecular characterization of mucoperlin, a novel mucin-like protein from the nacreous shell-layer of the fan mussel *Pinna nobilis* (Bivalvia, Pteriomorpha), *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 20667–20675, doi: 10.1074/jbc.M003006200.
- [3] S. Broome, W. Gilbert, Immunological screening method to detect specific translation products, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (6) (1978) 2746–2749.
- [4] D.J. Kemp, A.F. Cowman, Direct immunoassay for detecting *Escherichia coli* colonies that contain polypeptides encoded by cloned DNA segments, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (7) (1981) 4520–4524.
- [5] R.A. Young, R.W. Davis, Efficient isolation of genes by using antibody probes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 1194–1198.
- [6] M. von Darl, P.M. Harrison, W. Bottke, cDNA cloning and deduced amino acid sequence of two ferritins: soma ferritin and yolk ferritin, from the snail *Lymnaea stagnalis* L., *Eur. J. Biochem.* 222 (2) (1994) 353–366.
- [7] H. Nakato, M. Takekoshi, T. Togawa, S. Izumi, S. Tomino, Purification and cDNA cloning of evolutionally conserved larval cuticle proteins of the silkworm, *Bombyx mori*, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27 (8-9) (1997) 701–709.
- [8] A. Bufe, G. Schramm, M.B. Keown, M. Selaak, W.M. Becker, Major allergen Phl p Vb in timothy grass is a novel pollen RNase, *FEBS Lett.* 363 (1–2) (1995) 6–12.
- [9] A. Fujikawa, N. Ishimaru, A. Seto, H. Yamada, T. Aki, S. Shigeta, T. Wada, T. Jyo, Y. Murooka, S. Oka, K. Ono, Cloning

- and characterization of a new allergen, Mag 3, from the house dust mite, *Dermatophagoides farinae*: cross-reactivity with high-molecular-weight allergen, *Mol. Immunol.* 33 (3) (1996) 311-319.
- [10] J. Dakour, K. Jimbow, T. Vinayagamoorthy, D. Luo, H. Chen, Characterization of melanosome-associated proteins by establishment of monoclonal antibodies and immunoscreening of a melanoma cDNA library through an anti-melanosome antibody, *Melanoma Res.* 3 (5) (1993) 331-336.
- [11] A. Line, Z. Slucka, A. Stengrevics, K. Silina, G. Li, R.C. Rees, Characterization of tumor-associated antigens in colon cancer, *Cancer Immunol. Immunother.* 51 (10) (2002) 574-582, doi:10.1007/s00262-002-0322-2.
- [12] T. Maniatis, J. Sambrook, E.F. Fritsch, *Molecular cloning: a laboratory manual*, second ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- [13] J.W. Carter (Ed.), *Skeletal Biomineralization: Patterns, Processes and Evolutionary Trends*, Van Nostrand Reinhold, New York, 1990.
- [14] F. Marin, G. Muyzer, Y. Dauphin, Electrophoretic and immunological characterization of shell soluble matrices from two living pteriomorphid bivalves, *Pinna nobilis* L. and *Pinctada margaritifera* (L.), *C.R. Acad. Sci. Paris* 318 (ser. II) (1994) 1653-1659.
- [15] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680-685.
- [16] W.N. Burnette, 'Western-blotting': Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A, *Anal. Biochem.* 112 (1981) 195-203.
- [17] M.M.L. Leong, C. Milstein, R. Pannell, Luminescent detection method for immunodot, Western, and Southern blots, *J. Histochem. Cytochem.* 34 (1986) 1645-1650.
- [18] *The QIAexpressionist*, A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins, third ed., 1997, p. 94.
- [19] S. Weiner, Mollusk shell formation: isolation of two organic matrix proteins associated with calcite deposition in the bivalve *Mytilus californianus*, *Biochemistry* 22 (1983) 4139-4145.
- [20] F. Marin, M. Smith, Y. Isa, G. Muyzer, P. Westbrook, Skeletal matrices, muci, and the origin of invertebrate calcification, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (4) (1996) 1554-1559.
- [21] J.C. Marxen, M. Hammer, T. Gehrke, W. Becker, Carbohydrates of the organic shell matrix and the shell-forming tissue of the snail *Biomphalaria glabrata* (Say), *Biol. Bull.* 194 (1998) 231-240.
- [22] L. Pereira-Mouriès, M.J. Almeida, C. Ribeiro, J. Peduzzi, M. Barthélémy, C. Milet, E. Lopez, Soluble silk-like organic matrix in the nacreous layer of the bivalve *Pinctada maxima*. A new insight in the biomineralization field, *Eur. J. Biochem.* 269 (2002) 4994-5003, doi:10.1046/j.1432-1033.2002.03203.x.





## Caspartin and Calprismmin, Two Proteins of the Shell Calcitic Prisms of the Mediterranean Fan Mussel *Pinna nobilis*\*

Received for publication, June 15, 2005, and in revised form, June 30, 2005. Published, JBC Papers in Press, July 1, 2005, DOI 10.1074/jbc.M506526200

Frédéric Marin<sup>#51</sup>, Reinout Amons<sup>||</sup>, Nathalie Guichard<sup>‡</sup>, Martin Stigter<sup>§</sup>, Arnaud Hecker<sup>\*\*\*</sup>, Gilles Luquet<sup>‡</sup>, Pierre Layrolle<sup>§</sup>, Gérard Alcaraz<sup>++</sup>, Christophe Riondet<sup>++</sup>, and Peter Westbroek<sup>§§</sup>

From the <sup>#</sup>UMR CNRS 5561 "Biogéosciences," Université de Bourgogne, 6 Boulevard Gabriel, Dijon F-21000, France, <sup>§</sup>IsoTis, NV, 10 Prof. Bronkhorstlaan, Gebouw D., Bilthoven 3723 MB, The Netherlands, <sup>||</sup>Sylvius Laboratories, Leiden University, Leiden 2300 RA, The Netherlands, <sup>\*\*</sup>UMR CNRS/Université Paris-Sud 8621, Institut de Génétique Moléculaire, Equipe BMGE, Orsay Cedex F-91405, France, <sup>++</sup>UMR INRA 692 "Biochimie des Interactions Cellulaires," ENESAD, 26 Boulevard du Dr. Petitjean, F-21079 Dijon cedex, France, and <sup>§§</sup>Leiden Institute of Chemistry, Gorlaeus Laboratories, Leiden University, 55 Einsteinweg, P.O. Box 9502, Leiden 2300 RA, The Netherlands

We used the combination of preparative electrophoresis and immunological detection to isolate two new proteins from the shell calcitic prisms of *Pinna nobilis*, the Mediterranean fan mussel. The amino acid composition of these proteins was determined. Both proteins are soluble, intracrystalline, and acidic. The 38-kDa protein is glycosylated; the 17-kDa one is not. Ala, Asx, Thr, and Pro represent the dominant residues of the 38-kDa protein, named calprismmin. An N-terminal sequence was obtained from calprismmin. This sequence, which comprises a pattern of 4 cysteine residues, is not related to any known protein. The second protein, named caspartin, exhibits an unusual amino acid composition, since Asx constitutes by far the main amino acid residue. Preliminary sequencing surprisingly suggests that the first 75 N-terminal residues are all Asp. Caspartin self-aggregates spontaneously into multimers. *In vitro* tests show that it inhibits the precipitation of calcium carbonate. Furthermore, it strongly interferes with the growth of calcite crystals. A polyclonal antiserum raised against caspartin was used to localize this protein in the shell by immunogold. The immunolocalization demonstrates that caspartin is distributed within the prisms and makes a continuous film at the interface between the prisms and the surrounding insoluble sheets. Our finding emphasizes the prominent role of aspartic acid-rich proteins for the building of calcitic prisms among molluscs.

The secretion of a shell by molluscs is a striking example of a self-assembling process performed outside living tissues. When a mollusc builds its shell, the calcifying epithelium of its mantle extrudes mineral ions, mainly calcium and bicarbonate. In addition, it secretes an extracellular matrix composed of proteins, glycoproteins, proteoglycans, and polysaccharides (1). This mixture is released into the extrapallial space, a microvolume delimited by the epithelium, the growing shell, and the

leathery periostracum (2). In this supersaturated space, the released macromolecules interact with bicarbonate and calcium to form biocrystallites that self-aggregate in an orderly manner. The end product is a densely packed organomineral assembly, the shell, in which the mineral phase represents more than 95% by weight (3). As shell proteins exert a control on the biomineralization process, they can be used in the synthesis of biomimetic materials (4–6). However, the resolution of the primary structure of molluscan shell proteins has been seriously impaired for decades by their polydispersity, their polyanionic properties, and finally their post-translational modifications (3, 7).

Despite these obstacles, investigations on molluscan shell proteins have made significant advances in the last 6 years, with the characterization of 16 proteins and, for most of them, the identification of the corresponding transcript (8, 9). Among the different shell textures that molluscs use to produce their shell, mother-of-pearl has received the greatest deal of attention. Its intrinsic beauty, its incredible mechanical toughness (10), and its occurrence in the three major mollusc phyla (11) have indeed contributed to make it the unique model for molluscan mineralization (3, 12). The interest for studying nacre has also been driven by its economical importance in the pearl industry (13) and recently by its promising use for promoting bone repair (14, 15). As a consequence, most of the molecular information accumulated at present concerns nacre proteins.

In contrast, the prismatic texture, that always forms the outer calcified layer of nacreous molluscs, has been studied far less. To our knowledge, only four proteins, including MSI31 and the newly discovered prismalin, aspein, and asprich, have been genetically characterized (16–19). Of these proteins, only prismalin has been characterized both biochemically and at the transcriptional level, the three other protein sequences being simply deduced from their transcripts. Despite the paucity of molecular data, prismatic biominerals fully deserve attention, because they are widespread among molluscs and because prism-like biominerals are also found in other calcifying systems, such as the eggshell (20) and the secondary layer of brachiopods (21). Thus, prism-like biominerals are often considered to represent an efficient and simple strategy adopted by calcifying metazoans for rapid mineralization. Also, because this layer is believed to represent an archaic type of texture, analysis of the associated matrix components may shed light on the molecular mechanisms of early biomineralization (22, 23). Finally, because prisms are large crystals, they represent a good model for studying how molluscs are able to control their mineralization over nanometer to millimeter scales.

Like several Pteriomorphid bivalves, *Pinna nobilis*, the giant Mediterranean fan mussel, exhibits a macroprismatic organization of its shell.

\* This work was supported by the "Fondation Simone et Cino Del Duca" (Paris), for the period November 1999 to January 2001, and by the Dutch biotech Company IsoTis, for the period February 2001 to December 2002. This paper is a contribution to an "Aide Concertée Incitative Jeunes Chercheurs" (ACI JC 3049) awarded to F. Marin by the French "Ministère Délégué à la Recherche et aux Nouvelles Technologies." In 2004, the "Conseil Régional de Bourgogne" (Dijon, France) provided financial support for the installation of a biomineralization laboratory in Biogéosciences research unit. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

The N-terminal protein sequence of calprismmin reported in this paper has been registered in the Swiss-Prot and TrEMBL knowledgebase under the accession number P83631.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed: UMR CNRS 5561 "BIOGÉOSCIENCES," Université de Bourgogne, 6 Bd. Gabriel, 21000 DIJON, France. Tel.: 33-3-80-39-63-72; Fax: 33-3-80-39-63-87; E-mail: frederic.marin@u-bourgogne.fr.

## Characterization of Two Shell Proteins from Calcitic Prisms

Whereas the nacreous layer is restricted to the first half of the shell, the prismatic layer is fully developed and constitutes the predominant shell layer of this species. It is made of long needles of calcite with a polygonal cross-section. The prisms of *Pinna* represent the so-called "regular simple prism" type (11, 24, 25). Among adult specimens, these prisms can be several mm long with a diameter less than 100  $\mu\text{m}$ . Growing inward from the periostracum (2, 25), they are kept together by an interprismatic organic honeycomb-like framework, which can be destroyed by sodium hypochlorite (26). Optically, each isolated prism behaves as a monocrystal (27). However, despite this apparent simplicity, the calcitic prisms of *P. nobilis* are indeed composed of a stack of numerous crystallites, which have a single optical orientation maintained throughout the length of the prisms. When decalcified, the isolated prisms release a soluble acidic matrix. This matrix is thought to be responsible for the choice of the calcite polymorph and for the guidance and correct positioning of the single crystallites, so that the monocrystal-like units emerge (27). But this matrix has been poorly characterized (26, 28), and recent data acquired on the bulk matrix (29, 30) do not give any information on the molecular mechanisms by which prisms are built. The work described herein aims to elucidate the structure of this acidic macromolecular assemblage. The results of this study represent a biochemical characterization of two so-called "intracrystalline" proteins, which we have named caspartin and calprismmin. In addition, this report presents the localization of one of these proteins, caspartin, by combining immunogold labeling and scanning electron microscopy. Finally, this report describes the dramatic effect of this protein on the morphology of calcium carbonate crystals grown *in vitro*.

### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Shell Material**—The species used in this study is the protected Mediterranean fan mussel *P. nobilis* (31). Fragments of shells of juvenile and adult specimens were kindly provided by CERAM (Prof. Nardo Vicente) (Marseille, France). Detailed descriptions of the nacropismatic texture of the shell have been reported (11, 24–26). For direct microscopic observations, cleaned shell fragments or isolated prisms were gold-sputtered with a sputter coater (model 108 Auto; Cressington) and directly observed with a Philips XL30 ESEM-FEG scanning electron microscope (Fig. 1).

**Shell Preparation and Matrix Extraction**—The shell fragments were scrupulously brushed to remove epibionts, and the nacreous layer, when present, was removed by abrasion. Only the prismatic layer was used for subsequent analysis. Fragments of this layer were soaked in sodium hypochlorite solution (0.2 g of active chlorine/100 ml of water) for 12 h, rinsed with water, and dried.

Cleaned pieces were briefly crushed into minute fragments, which were subsequently treated with dilute sodium hypochlorite (0.2 g of active chlorine/100 ml of water) for 4 days with constant stirring. This treatment resulted in the complete dissociation of the fragments into prisms, which were collected on a membrane by filtering the suspension (Nalgene filtration assembly). The prisms were then extensively rinsed with Milli-Q water and dried before being crushed.

For extraction of the soluble matrix, different batches were used, comprising juvenile or adult specimens. Between 3 and 25 g of the prism powder were suspended in water, to which cold acetic acid (5%, v/v) was added until the pH was 4. Decalcification was performed overnight at 4 °C. The solution was centrifuged for 10 min at  $5000 \times g$ , and the residual insoluble organic matrix was discarded. The clear supernatant was filtered (0.45  $\mu\text{m}$ ), and the volume was reduced to approximately 5 ml by ultrafiltration on an Amicon membrane (YM10; cut-off of 10 kDa)

at 4 °C. Complete desalting of the solution was accomplished by dialysis against water at 4 °C for 5 days (Slide-A-Lyzer cassette; Pierce). For some of the batches, this solution was freeze-dried, and the resulting pellet was weighed.

**Soluble Matrix Analysis on SDS-PAGE and on Immunoblots**—For each batch, the solution containing the concentrated acetic acid-soluble matrix was diluted with an equal volume of  $2 \times$  Laemmli sample buffer containing  $\beta$ -mercaptoethanol. After heat denaturation (32), small aliquots were tested on 10, 12, or 15% discontinuous polyacrylamide SDS-polyacrylamide gels (Mini-Protean 3; Bio-Rad). Most of the gels were directly stained with silver nitrate (33). Other gels were blotted onto PVDF<sup>2</sup> Immobilon-P membrane (Millipore Corp.) with the Mini-Trans Blot module (Bio-Rad) for 90 min at 120 mA (34, 35). The blots were blocked with 1% gelatin in Tris-buffered saline (TBS) for 30 min and then incubated for 90 min with polyclonal antibodies raised against unfractionated acetic acid-soluble prism and nacre matrices of *P. nobilis* (28). After washing with TBS/Tween 20, the membranes were incubated with a goat anti-rabbit, peroxidase-conjugated antibody (A6154; Sigma) for 90 min. After extensive washing, the membranes were incubated with luminase buffer for 2 min (36) and then briefly exposed to X-Omat film (Eastman Kodak Co.).

**Large Scale Matrix Fractionation**—For each batch, large aliquots of the denatured matrix were fractionated on a preparative SDS-12% polyacrylamide gel (model 491 Prep Cell, 28-mm tube diameter; Bio-Rad) (37, 38). The gel was run at 250 V for 1 h and then at 300 V overnight in a buffer containing Tris (25 mM), glycine (192 mM), and SDS (0.1%), pH 8.3. The same buffer without SDS was used for eluting protein fractions from the gel. After the elution of the migration front, 80 fractions of 5 ml each were continuously collected overnight (Bio-Rad fraction collector 2110) at a flow rate of 0.5 ml/min.

Since none of the fractions absorbed UV at 280 nm, an immunological detection of the matrix fractions was performed with the anti-prism and nacre matrix antisera (28, 37). Aliquots (100  $\mu\text{l}$  each) of the 80 fractions were vacuum-blotted on a PVDF membrane with a dot blot apparatus (Bio-Rad Bio-Dot). The membrane was subsequently treated like a normal Western blot as described above. Following the result of the dot blot, the tubes containing two identified fractions were pooled and concentrated to 4–5 ml by ultrafiltration (Amicon ultrafiltration cell, cut-off of 10 kDa) before being dialyzed for 5 days against Milli-Q water at 4 °C to remove Tris and glycine. The fractions were freeze-dried. The purity of the two fractions was assessed on a mini-SDS-polyacrylamide gel, which was subsequently stained with silver. Two strong bands of 17 and 38 kDa were observed.

**Amino Acid Composition and N-terminal Sequencing**—The amino acid compositions of the two fractions were determined by Eurosequence bv, Groningen. Freeze-dried proteins were hydrolyzed with 5.7 N HCl in the gas phase for 1.5 h at 150 °C. The analysis of the hydrolysates was performed on an HP 1090 Aminoquant (39) by an automated two-step precolumn derivatization with *o*-phthalaldehyde for primary and FMOC (*N*-(9-fluorenyl)methoxycarbonyl) for secondary amino acids. Cysteine residues were quantified after pyridylethylation. Tryptophan was not determined. In order to ensure that the samples were not contaminated with free amino acids, in particular glycine, amino acid analyses were also performed without prior hydrolysis.

The N-terminal sequencing was performed with a Hewlett-Packard G1006A Protein Sequencer connected in line to a Hewlett-Packard model 1100 high pressure liquid chromatograph. Edman degradation

<sup>2</sup> The abbreviations used are: PVDF, polyvinylidene difluoride; TBS, Tris-buffered saline; PTH, phenylthiohydantoin; BSA, bovine serum albumin; TFM, trifluoromethanesulfonic.

used the Routine 3.1 program, and the sequencing cartridge and most chemicals were obtained from Hewlett-Packard. Ethyl acetate was analyzed by Baker Ultraresi, to which 2.5  $\mu\text{l}$  of tributylphosphine were added per 125 ml. The addition of tributylphosphine substantially improved the yield of the PTH-derivative, especially of lysine.<sup>3</sup> During sequencing of calprism, we observed the appearance of an abnormal PTH-derivative in cycles 12, 19, 33, and 40, between PTH-Gly and PTH-His. It is the position of the PTH-derivative of carboxamidoethylcysteine, which may have formed from acrylamide monomer and reduced cysteine during the preparative acrylamide electrophoresis step (see "Large Scale Matrix Fractionation").

**Calcium-binding Assay**—The calcium-binding capacity of the acetic acid-soluble matrix and of the two purified proteins was analyzed according to two methods: staining with carbocyanine "Stains-All" dye (40) and the overlay method with <sup>45</sup>Ca (41). In the first case, minigels were run, extensively washed with 25% isopropyl alcohol, and stained in the dark for 4 days with 0.0025% Stains-All, 25% isopropyl alcohol, 7.5% formamide, and 30 mM Tris base, pH 8.8. In the second case, denaturing gels were blotted onto PVDF membranes, which were subsequently soaked three times for 20 min each in an overlay buffer (10 mM imidazole-HCl, pH 6.8, 60 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) and then incubated in the same buffer containing <sup>45</sup>CaCl<sub>2</sub> (37 MBq/liter, 1.36  $\times 10^{-3}$  mM). After a brief washing (50% ethanol, twice for 2 min each), the membranes were dried at room temperature and exposed to an x-ray film for 1 week or more. Calmodulin, a calcium-binding protein (catalog number P2277; Sigma), was used as a positive control. To test the effect of Laemmli buffer on the calcium-binding ability of the samples, additional tests were performed. Similar amounts of Laemmli-denatured and nondenatured extracts of soluble matrix and of the 17- and 38-kDa proteins were dot-blotted on a PVDF membrane with a Bio-Dot module (Bio-Rad). The membrane was treated with <sup>45</sup>Ca as described above. The test was repeated several times.

**Glycosylation and Deglycosylation Studies**—The search for putative glycosylations of the acetic acid-soluble matrix and of the two isolated proteins was performed according to three different sets of techniques: (a) gel and blot staining, (b) deglycosylation studies, (c) monosaccharide analysis. The first set included staining of the gels with Alcian Blue 8 GX according to the protocol of Wall and Gyi (42) and staining of gels and of Western blots with PAS (43). Deglycosylation studies were performed according to two procedures: chemical deglycosylation with trimethanesulfonic (TFMS) acid/anisole (44) and enzymatic deglycosylation. In the first case, the removal of sugars was performed at 0 °C for 3 h, under N<sub>2</sub>, with constant stirring. After neutralization with pyridine, the aqueous phase was extracted three times with diethyl ether and then extensively dialyzed before being lyophilized. In the second case, samples were deglycosylated enzymatically at 37 °C for 3 h, with a mixture containing peptide:N-glycosidase F, O-glycosidase, sialidase,  $\beta$ -galactosidase, and glucosaminidase (CarboRelease Kit, catalog number KE-DG01; QA-Bio, San Mateo, CA). In both cases, fetuin was used as a positive control, and BSA was used as a negative control for the chemical deglycosylation. The TFMS acid-treated and enzyme-treated samples were tested on mini-SDS-PAGE (10, 12, or 15% acrylamide), which were subsequently stained with silver or blotted on PVDF membranes. The blots were then incubated with the anti-nacre matrix antibody (28). Furthermore, Alcian Blue staining was assayed on the 38-kDa protein, before and after enzymatic deglycosylation. At last, the soluble matrix and the two purified proteins were assayed for monosaccharides (45) before and after hydrolysis. Lyophilized samples (400–800  $\mu\text{g}$ ) were

dissolved in water at 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Aliquots of 100  $\mu\text{l}$  were hydrolyzed in 100  $\mu\text{l}$  of trifluoroacetic acid (4N) at 105 °C for 4 h. Samples were evaporated to dryness before being solubilized with 100  $\mu\text{l}$  of 20 mM NaOH. The neutral and amino sugar contents of the hydrolysates were determined by high performance anion exchange-pulsed amperometric detection (Dionex) (46) on a CarboPac PA100 column (Dionex P/N 043055). Data were collected and processed using Chromeleon software (version 6.40). Nonhydrolyzed samples were analyzed similarly, in order to detect free monosaccharides. Blank experiments were performed, where acetic acid solutions had gone through all of the steps of the extraction procedure, to assess possible sugar contamination via filtration and ultrafiltration membranes and dialysis tubing. Note that this technique does not allow the quantification of sialic acids, which are destroyed during hydrolysis with trifluoroacetic acid.

**In Vitro Inhibition Test with the 17-kDa Protein**—The 17-kDa protein was subsequently assayed for *in vitro* inhibition of calcium carbonate precipitation (47). Two ml of 20 mM CaCl<sub>2</sub> were rapidly added to 2 ml of 20 mM NaHCO<sub>3</sub> containing variable amounts of protein extract (1–10  $\mu\text{g}$ ). For each experiment, the pH was constantly recorded with a combined glass electrode (catalog number 6.0234.100; Metrohm) coupled with a Metrohm model 692 pH meter. Each concentration was tested in triplicate. Between each experiment, the electrode was refreshed with 0.5 M HCl. Blank tests were performed in the absence of protein. Positive controls were performed with poly-L-aspartic acid (P-6762; Sigma) and negative controls with BSA.

**Growth of Calcite Crystals in the Presence of the 17-kDa Protein**—The effect of the 17-kDa protein on the morphology of calcite crystals was tested *in vitro*. Calcite crystals were grown by slow diffusion of ammonium bicarbonate vapors into a CaCl<sub>2</sub> solution (48). Plastic tips were UV-glued on HCl-cleaned microscope glass coverslips (18  $\times$  18 mm) to allow easy handling with forceps. The coverslips were placed into the wells of a Sterilin 5  $\times$  5 square-well plate (catalog number 638161; Greiner), to which were added 4 ml of 10 mM calcium chloride containing increasing amounts of the shell protein (0.1–4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Negative controls were performed with similar amounts of bovine serum albumin. Blanks were performed without any protein. The plate was closed with a plastic cover, which had been pierced with 1-mm holes, and then incubated overnight at 4 °C in a closed dessicator containing crystals of ammonium bicarbonate. After incubation, the coverslips were gently dried by capillarity and then by incubation at 50 °C. They were subsequently gold-sputtered and observed with a Philips XL30 ESEM-FEG scanning electron microscope. This test was performed five times.

**Polyclonal Antibodies against the 17-kDa Protein**—An aliquot of the 17-kDa protein was used for the production of polyclonal antibodies in a rabbit (Eurogentec). A standard immunization procedure was performed with injections at 0, 14, 28, and 56 days and bleedings at 0 (preimmune), 38, 66, and 80 days. Sera (second and third bleeding) containing the polyclonal antibodies were used for subsequent experiments. Their respective titer was determined by standard enzyme-linked immunosorbent assay (49). The specificity of the antiserum for the low molecular weight protein was checked by Western blots on complete acetic acid-soluble prism matrix of *P. nobilis*. The antiserum was also tested on Western blots against the isolated protein, without or after reduction with  $\beta$ -mercaptoethanol. In addition, the antiserum was tested against poly-L-aspartic acid (P-6762; Sigma) and against the acetic acid-soluble matrix extracted from the nacreous shell layer of *P. nobilis*. In this latter case, the nacre matrix was extracted with cold dilute acetic acid, in the same way as the prism matrix.

The same antiserum was used for determining the concentration of the low molecular weight protein in EDTA extracts of the prisms and of

<sup>3</sup> R. Amons, unpublished results.

## Characterization of Two Shell Proteins from Calcitic Prisms

the nacre matrix of *P. nobilis*. Aliquots of 300 mg of cleaned prisms and of nacre powders were dissolved overnight in 10 ml of 20% (w/v) EDTA. The solutions were centrifuged and filtered, and the supernatants were

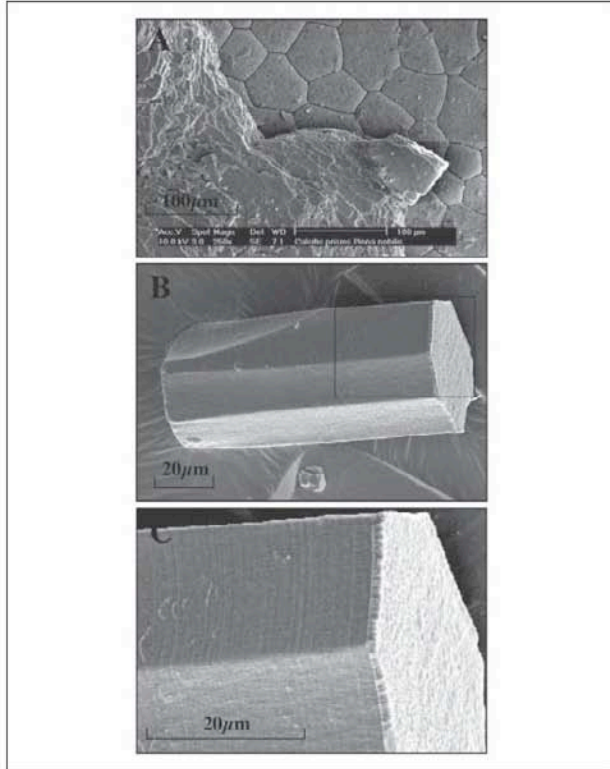


FIGURE 1. Prismatic texture of *P. nobilis* shell. A, internal view of the contact between the nacreous (left) and the prismatic (right) layers of the shell. The sample was cleaned with bleach. The prismatic layer is composed of packed polygonal crystallites, the prisms. B, bleach-isolated calcitic prism. C, enlarged view of B. Although the prisms look homogeneous, a thin layering perpendicular to the long axis of the prisms is visible (C). The acetic acid-soluble matrix was extracted from the isolated prisms.

serially diluted with EDTA and then vacuum-blotted onto a PVDF membrane. Known amounts (100 pg to 100 ng of the 17-kDa protein) were used as a standard. The membrane was incubated with the antiserum and then treated as a normal blot. The test was repeated four times in triplicate. To check the effect of sodium hypochlorite (used for isolating the prisms) on the degradation of the 17-kDa protein, a control experiment was performed where prism matrices were extracted from sodium bleach-isolated prisms and from untreated prismatic layer and then dot-blotted and treated with the antiserum.

**Immunolocalization of the 17-kDa Protein with Gold Particles**—The antiserum preparations were used for localizing the 17-kDa protein directly in the shell. Freshly broken pieces of cleaned prismatic layer or isolated prisms were slightly etched with EDTA (1%) for 2 min before being blocked with a 2% gelatin solution in TBS, pH 7.5. As an alternative, polished sections were bleached with sodium hypochlorite for a few minutes and then rinsed with water, etched with EDTA, and blocked with gelatin. The preparations were subsequently incubated for 2 h with the antiserum (second bleeding) diluted 1:3000 in a solution of 2% gelatin in TBS-Tween 20 (TBS-T). After extensive rinsing with TBS-T, the preparations were incubated for 2 h with a similar gelatin-TBS-T solution containing the diluted (1:400) goat anti-rabbit antibody coupled to 5-nm gold particles (catalogue number EM.GAR5; British Biocell International). After extensive rinsing with TBS-T, the preparations were gently dried by capillarity and silver-enhanced for 5–10 min (catalogue number SEKL15; British Biocell International). Blank experiments were performed similarly without the first antibody step or with preimmune serum. The samples were observed with a Philips XL30 ESEM-FEG scanning electron microscope (IsoTis; Bilthoven) in the back scattering electron mode. Additional observations were performed with a JEOL JSM 6400F scanning electron microscope (Laboratoire de Réactivité des Solides, Dijon, France).

## RESULTS

**Extraction of Matrix and Characterization on SDS-PAGE**—In the present study, we have extracted an acetic acid-soluble matrix from the calcitic prisms of the outer layer of *P. nobilis*. Because the single prisms are isolated with sodium hypochlorite (Fig. 1), this matrix should be

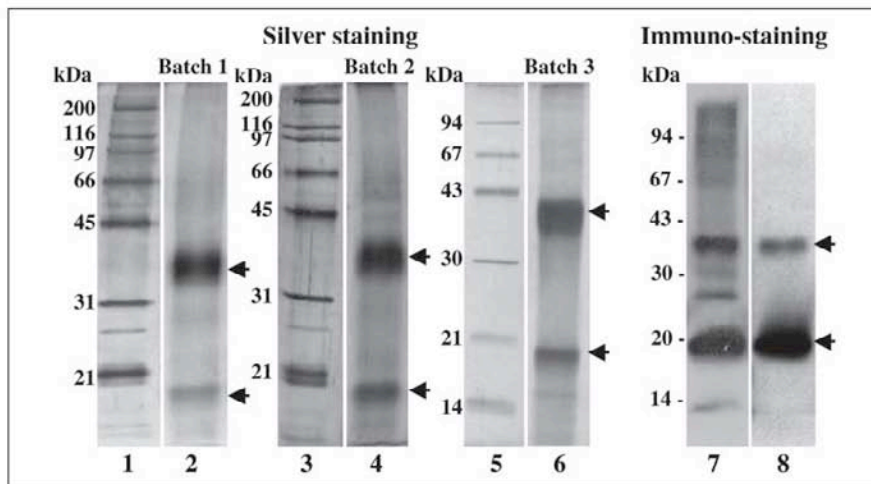


FIGURE 2. SDS-PAGE and Western blot of the acetic acid-soluble prism matrix of *P. nobilis*. The gels were stained with silver, and the blots were probed with polyclonal antibodies (see Ref. 28) raised against the whole acetic acid-soluble matrix extracted from prisms (lane 7) and from nacre (lane 8). The arrows indicate the position of the two major proteinaceous components of the matrix. Similar amounts of shell matrices were analyzed (20  $\mu$ g/lane). Batch 1 and 2 (lanes 2 and 4) were matrix from two specimens, aged 2 years. Batch 3 (lane 6 and Western blot) was matrix from 1 year-old specimen. The samples from batches 1 and 2 were run on 12% polyacrylamide gels, and the one from batch 3 was run on a 15% polyacrylamide gel. The two proteins fractionated from batch 3 were used for amino acid composition and for N-terminal sequencing (see Fig. 3). Lanes 1 and 3, broad range molecular weight standards. Lane 5, low molecular weight standards.

## Characterization of Two Shell Proteins from Calcitic Prisms

considered as intracrystalline. From the different batches used for this study, the acetic acid-soluble matrix represents 0.26–0.29% by weight of the dry isolated prisms. These values are consistent with previous findings (50, 51). By comparison, the acetic acid-soluble matrix extracted from the nacreous layer of *P. nobilis* represents only 0.02% of the dry nacre (52).

When run on mini-SDS-PAGE and stained with silver (Fig. 2), acetic acid-soluble matrices of the different batches give similar patterns, characterized by the presence of two prominent bands with apparent molecular masses of 17 and 38 kDa. In addition, minor bands are visible in the upper part of the gels and below the 17-kDa protein. The nondiscrete macromolecules, which migrate as a smear, represent a significant component of the matrix from less than 10 kDa to the top of the gel. In comparison with standard proteins, the prism matrix does not stain well with silver. In batch 2, we observe a negative staining in a zone between the two main bands (Fig. 2, lane 4). A negative staining has often been reported for extremely acidic proteins associated with biominerals (53). Coomassie Blue is ineffective to stain the matrix proteins; only the 17-kDa band gives a faint staining (not shown).

From batch to batch, we observe that the upper band has a tendency to broaden, which makes it more difficult to purify. The broadening occurs especially with batches of adult specimens. This suggests that this protein may degrade rapidly *in vitro* or that it cross-links with other components of the biomineral after synthesis. The most discrete band is observed with 3 g of prisms from a very young specimen (Fig. 2, batch 3, lane 6). This batch was used for the amino acid composition and for the N-terminal sequencing. From batch to batch, the low molecular weight protein appears to be stable. Thus, it has been extracted in larger amounts and further characterized.

On Western blots stained with antisera raised against unfractionated matrix (anti-prism and anti-nacre matrices, respectively), the pattern is clearer than the one obtained after silver staining (Fig. 2, lanes 7 and 8). Since the two main bands are very immunogenic, they give a strong signal. Two additional bands, which are not visible on silver-stained gels, can be detected between 17 and 38 kDa (lane 7). The Western blot pattern has allowed us to perform a large scale fractionation of the matrix by preparative electrophoresis and to purify the two main discrete polypeptides (37, 38). From batch 3, we have extracted less than 200 µg of the 38-kDa protein, whereas more than 8 mg of the 17-kDa protein have been obtained from the three batches. When tested again on a minigel in denaturing conditions, the two bands appear as single bands (Fig. 3).

**Amino Acid Composition and Sequence Analysis**—Fig. 3 indicates the amino acid composition of the unfractionated acetic acid-soluble matrix and of the two isolated proteinaceous bands. All three compositions are acidic. The composition of the soluble matrix is characterized by an extremely high amount of Asx, which represents almost two-thirds of the residues. This composition is very similar to that of the intraprismaic organic matrix of *Pinna carnea* determined by Nakahara *et al.* (54). The bulk composition also shows similarities to that of the soluble prism matrix of *Atrina rigida* (43, 55). The main difference is the level of Glx residues, which is much higher in the case of *Atrina*. The other amino acid residues that are quantitatively abundant in the bulk soluble matrix are Ala, Glx, and Gly. The composition of the 17-kDa band is similar to that of the whole soluble matrix, with a striking 68% Asx. This suggests that the nonanalyzed polydisperse components of the matrix are also extremely acidic or that the 17-kDa protein is predominant in the soluble matrix. At 8.3%, Glx is another abundant residue. Except Ala and Gly, which represent, respectively, 6 and 5%, all of the other residues are below 2%. Surprisingly, in the first 75 cycles of

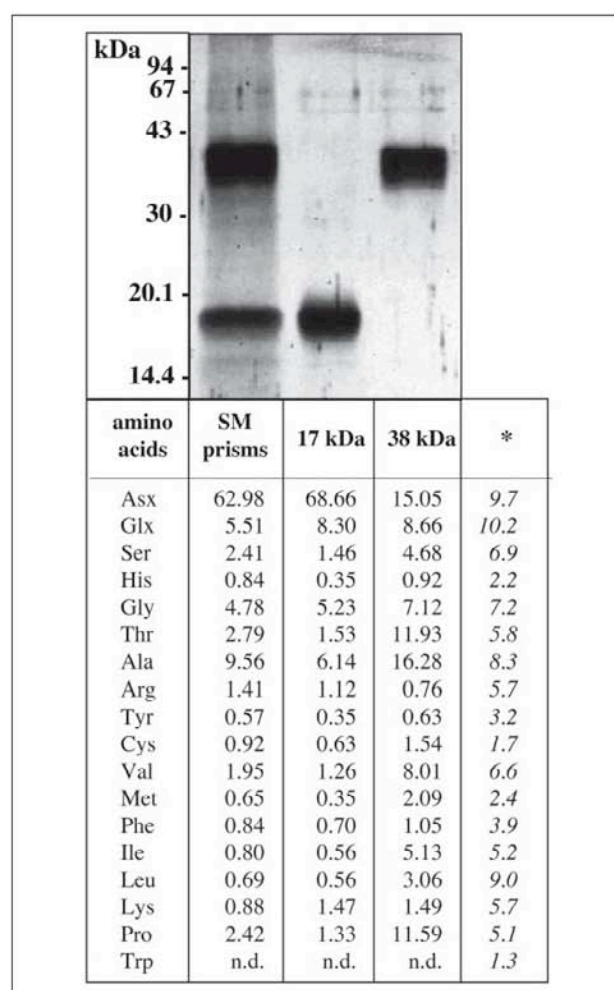


FIGURE 3. Purification and amino acid composition of the acetic acid-soluble prism matrix (SM prisms) and of the 17- and 38-kDa proteins. The two proteins were purified by preparative electrophoresis and analyzed again on mini-SDS-PAGE to assess their purity. The gel was stained with silver. The amino acid compositions of the two proteins were determined and compared with that of the soluble matrix prisms. The data are presented as percentage of total amino acid for each sample. Right column, average occurrence of amino acids determined for a large number of proteins (91).

N terminal sequence analysis of the 17 kDa protein, only aspartic acid residues are observed. As sequencing proceeded, an increasing part of the protein might have become out of phase. In the absence of the appearance of an amino acid other than Asp, further sequencing beyond cycle 75 was considered useless. Enzymatic cleavages did not allow the determination of internal sequences. Attempts to sequence this protein also revealed that the molecular weight determined by SDS-PAGE may be overestimated.<sup>4</sup> A crossed search made with AACompliment (56), combining similarities of amino acid compositions, acidic isoelectric point, and a 0–40-kDa molecular mass range, produced aspolin 2, an acidic fish muscle protein (57), which exhibits 66% Asp residues. On the other hand, a scan for a long polyaspartic acid pattern with ScanProsite (58) yielded chicken calsequestrin and its homolog, aspartactin, and diverse yeast proteins. Calsequestrin is a high capacity, low affinity calcium binding protein of the endoplasmic reticulum (59), whereas

<sup>4</sup>R. Amons, personal communication.

## Characterization of Two Shell Proteins from Calcitic Prisms

Calprismin	1	I T I E Q G E L V L N C I S D K M M C E F E A A A E M V V P S P C P S E Y D T C I L E T N I P P A N Q x P V h x i p x m h	61
Granulin	aa 105	C S A D G R S C F Q R S G N N S Y G A I Q C P D S Q F E C	aa 133
Calprismin	aa 12	C I S D K M M C E F E A A A E M V V P S P C P S E Y D T C	aa 40
Surface glycoprot.	aa 374	C V E L K E Q C E A L E A D A D W L R S P C E T L R T H C	aa 602

FIGURE 4. N-terminal sequence of calprismin, the 38-kDa protein of the acetic acid-soluble prism matrix. The cysteine pattern (shaded blocks) is aligned with that of vertebrate granulin (Swiss-Prot accession number P28799) and of the major surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii*, an ascomycete (Swiss-Prot accession number Q02744).

aspartactin is an extracellular matrix protein (60), which binds laminin. Both contain a long C-terminal poly-Asp domain. Curiously, our ScanProsite search produced neither aspein nor asprich, two newly found shell proteins (18, 19) that exhibit poly-Asp domains.

The overall amino acid composition of the 38-kDa protein is acidic, although less so than the 17-kDa protein and the matrix as a whole (Fig. 3). The 38-kDa protein is dominated by 4 amino acids, Ala, Asx, Thr, and Pro, all above 11% (Fig. 3). Gln, Val, and Gly represent the other abundant residues. The level of serine is low. The high percentage of proline and threonine might suggest that the 38-kDa protein is O-glycosylated (61). N-terminal sequencing yielded 61 residues (~18% of the sequence, accession number P83631), of which the first 45 residues are quite certain (Fig. 4). The sequenced portion contains 9 acidic residues, 7 of which are glutamic acid, and only one basic amino acid (Lys<sup>46</sup>). The N terminus does not reflect the overall composition of the protein. In particular, 4 cysteine residues are present, separated by 6, 13, and 6 residues, whereas this residue represents only 1.5% of the overall composition. It should be remembered, however, that part of the Cys has already been alkylated to S-carboxamidoethylcysteine during acrylamide electrophoresis. A BLAST search (62) does not reveal a clear homology with any protein occurring in the data bases. Some sequence similarities are found with a putative type III effector from *Pseudomonas* (SwissProt accession number Q7PC42). A ScanProsite search for a cysteine signature involving the pattern CX<sub>6</sub>CX<sub>13</sub>CX<sub>6</sub>C, with X being any amino acid except cysteine, produced more than 100 results, among which are agrins, granulins, and a wide variety of fungal surface glycoproteins. Note that the cysteine pattern of the 38-kDa protein differs from that of other extracellular matrix proteins: the 4-cysteine signature (CX<sub>2,3</sub>CXCX<sub>6,9</sub>C) found at the N terminus of small leucine-rich proteoglycans (63, 64) or the cysteine pattern of the cystine knot-containing hormones (65). This pattern is likewise not similar to the cysteine patterns found in other molluscan shell proteins: N16 (66), perlucin (67), and perlustrin (68). A search for post-translational modifications suggests putative phosphorylations of the two serine residues at positions 31 and 35 (69) or, alternatively, one O-glycosylation of serine 31 (70). On the other hand, a search made with ScanProsite indicates two putatively phosphorylated serines, at positions 14 and 35. The single Tyr of the sequence, at position 37, is surrounded by two acidic residues (Glu at position 36 and Asp at position 38), a context that favors sulfation (71). Tyrosine sulfation was however not observed by sequencing.<sup>4</sup>

These two proteins appear to be novel, and we have chosen to name the 17- and 38-kDa proteins caspartin and calprismin, respectively.

**Calcium-binding Assay**—The calcium-binding assays were performed in denaturing conditions on gels (Fig. 5A) and on Western blots (Fig. 5B). The unfractionated soluble matrix stains purple with carbocyanine dye (Fig. 5A, lane 1). Staining of the matrix produces a continuous smear from 10 to 70 kDa. Isolated caspartin and calprismin also stain purple (Fig. 5A, lanes 2 and 3). With the <sup>45</sup>Ca overlay test (Fig. 5B), the acetic acid-soluble extract of the prisms exhibits a weak calcium binding activity (lane 2), even at high concentration (30 μg/well). A

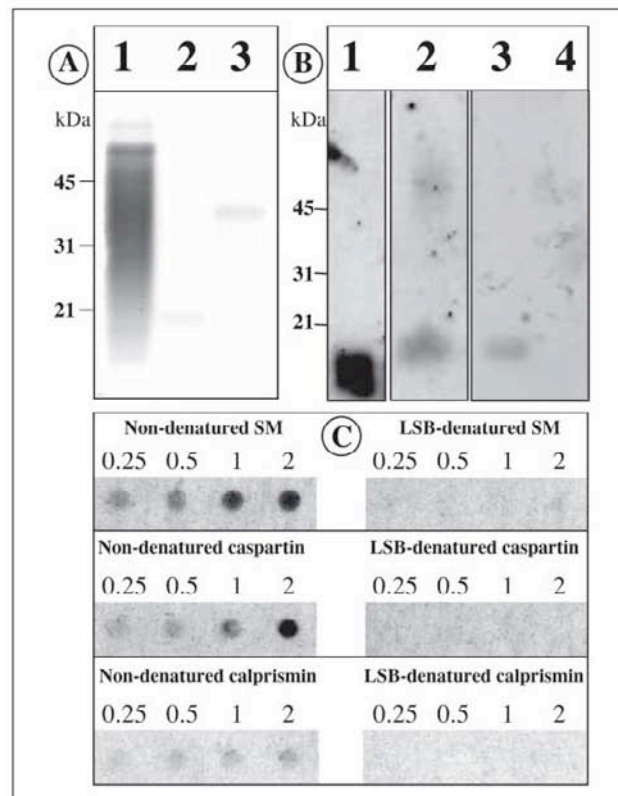


FIGURE 5. Calcium-binding properties of the acetic acid-soluble prism matrix (SM), of caspartin and of calprismin. A, staining with the carbocyanine dye Stains-All. Lane 1, soluble matrix (10 μg); lane 2, caspartin (~5 μg); lane 3, calprismin (~5 μg). B, <sup>45</sup>Ca-binding overlay test. Lane 1, calmodulin (2 μg); lane 2, soluble matrix (30 μg); lane 3, caspartin (20 μg); lane 4, calprismin (20 μg). C, <sup>45</sup>Ca binding overlay test on dot blots of the soluble matrix, of caspartin and of calprismin in denaturing (in the presence of Laemmli sample buffer (LSB)) and non-denaturing conditions. Different amounts were tested (0.25, 0.5, 1, and 2 μg). The soluble matrix exhibits the strongest calcium binding activity, and calprismin exhibits the lowest. Laemmli-treated samples have lost their ability to bind calcium.

diffuse signal is detected at molecular masses above 50 kDa and also where caspartin is located. Because the macromolecular components above 50 kDa are extremely minor components of the matrix, they may, however, represent a potent calcium binding activity. In our different attempts with purified caspartin and calprismin, we observe that caspartin weakly binds calcium but only when concentrated (Fig. 5B, lane 3, 20 μg/lane). This effect is lost when lower amounts of caspartin are used (data not shown). Calprismin does not bind calcium (Fig. 5B, lane 4). By comparison, calmodulin binds calcium, even at 2 μg/lane (Fig. 5B, lane 1).

The soluble matrix did not migrate properly in the gel under non-denaturing conditions. Consequently, the calcium binding activity of the

## Characterization of Two Shell Proteins from Calcitic Prisms

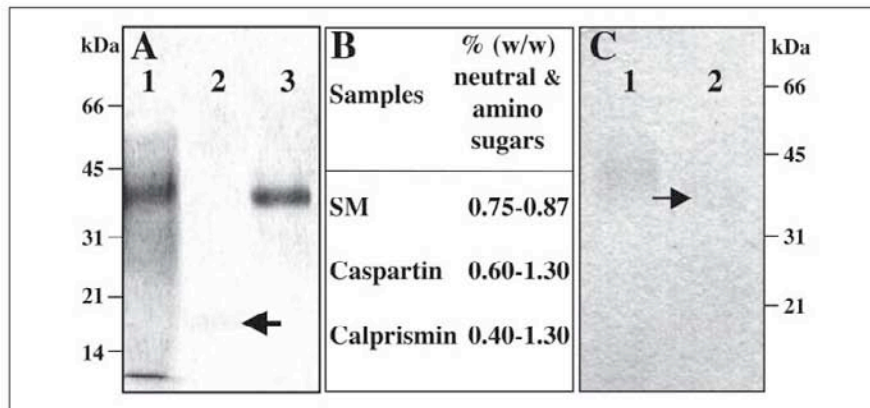


FIGURE 6. Glycosylation study of the acetic acid-soluble prism matrix (SM), of caspartin, and of calprisin. *A*, staining with Alcian blue. Lane 1, soluble matrix (20  $\mu$ g); lane 2, caspartin (10  $\mu$ g); lane 3, calprisin (10  $\mu$ g). The soluble matrix and calprisin stain well with Alcian blue, whereas caspartin, localized by the arrow, hardly stains. *B*, determination of the amount of neutral and amino sugars (in percentage of dry weight) after hydrolysis of the samples with trifluoroacetic acid and analysis by high performance anion exchange-pulsed amperometric detection. Batches 1 and 2 were used for the analysis. The three samples are characterized by low amounts of neutral and amino sugars. *C*, staining of calprisin with Alcian blue before (lane 1; 10  $\mu$ g) and after (lane 2; 10  $\mu$ g) an enzymatic deglycosylation. A decrease of the staining can be observed after the deglycosylation treatment. The arrow localizes the deglycosylated calprisin.

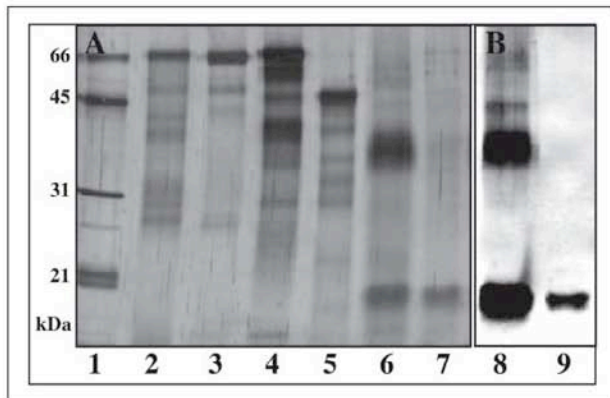


FIGURE 7. Chemical deglycosylation study with TFMS acid at 0°C. Analysis of the samples on silver-stained gel (12% acrylamide *A*) and on Western blot (12% acrylamide *B*). Lane 1, broad range molecular weight standards; lane 2, nontreated BSA; lane 3, TFMS acid-treated BSA, negative control; lane 4, untreated fetuin; lane 5, TFMS acid-treated fetuin, positive control; lanes 6 and 8, untreated prism soluble matrix (10  $\mu$ g); lanes 7 and 9, TFMS acid-treated prism soluble matrix (10  $\mu$ g). The Western blot was incubated with the anti-nacre matrix serum (23). Note that the TFMS acid treatment denatures caspartin epitopes and eliminates the immunological signal for calprisin. This suggests that the TFMS acid treatment degrades calprisin.

soluble matrix and of the two isolated proteins was tested on dot blots under nondenaturing and denaturing conditions. Fig. 5C (left column) shows that the three samples exhibit calcium binding activity when they are solubilized in Tris buffer. The intensities of the signals are, however, different. The soluble matrix exhibits the strongest calcium-binding capacity, which can still be clearly detected at 0.25  $\mu$ g. Isolated caspartin has a moderate calcium-binding capacity, which tends to drop below 1  $\mu$ g. Isolated calprisin exhibits a weak calcium binding activity, which slightly decreases from 2 to 0.25  $\mu$ g. Although the calcium-binding signal is low for calprisin, it is significantly higher than the background signal, obtained with the Laemmli-denatured samples. These results suggest that the calcium binding activity of the soluble matrix is not due entirely to caspartin and calprisin but that other components are involved in this property. This is in agreement with the data obtained with Western blot, which show that macromolecular components above 50 kDa participate in the calcium binding activity of the matrix. In denaturing conditions, the calcium-binding effect of the three prepara-

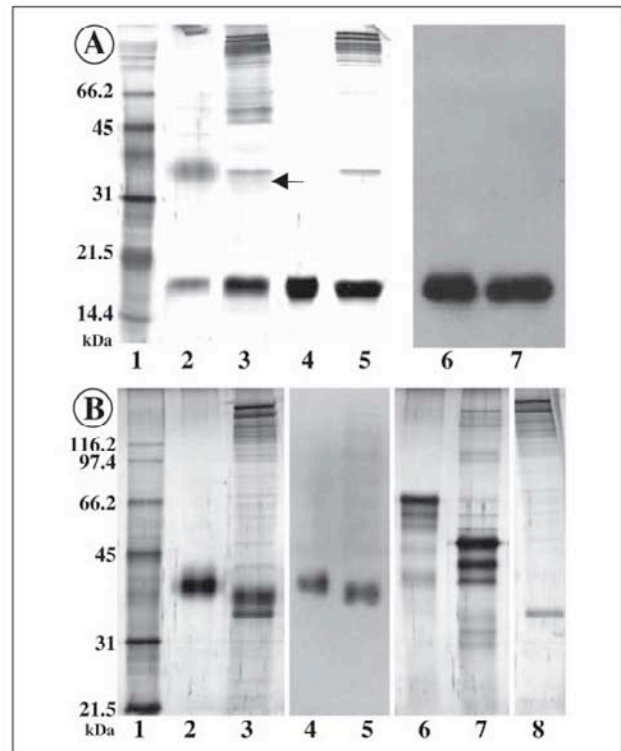
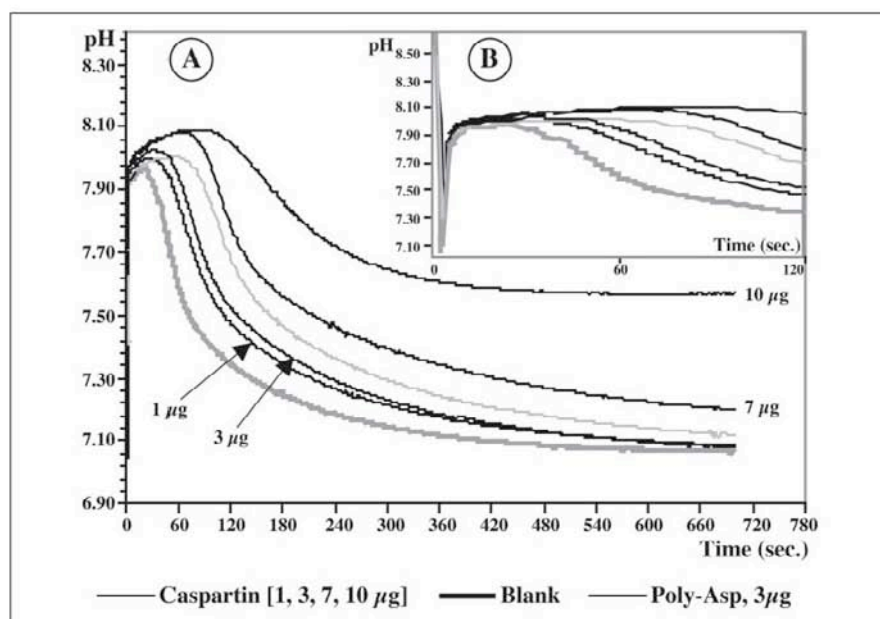


FIGURE 8. Enzymatic deglycosylation of the soluble matrix, of caspartin, and of calprisin. A mixture of five enzymes was used. *A*, 15% acrylamide gel stained with silver (lanes 1–5) and Western blot (lanes 6 and 7). Lane 1, broad range molecular weight standards; lane 2, untreated prism soluble matrix (10  $\mu$ g); lane 3, enzyme-treated prism soluble matrix (10  $\mu$ g); lanes 4 and 6, untreated caspartin (6  $\mu$ g); lanes 5 and 7, enzyme-treated caspartin (6  $\mu$ g). The Western blot was incubated with anti-nacre matrix serum (28). The arrow in lane 3 localizes the deglycosylated calprisin. *B*, 10% acrylamide gel stained with silver (lanes 1–3 and 6–8) and Western blot (lanes 4 and 5). Lane 1, broad range molecular weight standards; lanes 2 and 4, untreated calprisin (5  $\mu$ g); lanes 3 and 5, enzyme-treated calprisin (5  $\mu$ g); lane 6, untreated fetuin; lane 7, enzyme-treated fetuin, positive control; lane 8, negative control with the enzyme mixture alone.

tions disappears completely, when tested in the range 0.25–2  $\mu$ g (Fig. 5B, right column). Weak signals are recorded for higher concentrations (10–20  $\mu$ g, not shown). This suggests that the affinity of the three tested

## Characterization of Two Shell Proteins from Calcitic Prisms

FIGURE 9. A, *in vitro* inhibition of the precipitation of  $\text{CaCO}_3$  by caspartin, the 17-kDa protein. The graph shows that caspartin starts to be effective at 1  $\mu\text{g}$ . The delay is dose-dependent. B, same graph, expanded scale, representing the first 120 s.



samples (soluble matrix, caspartin, calprismin) for calcium is probably low and conformation-dependent.

**Glycosylation and Deglycosylation Studies**—Fig. 6A shows the results of Alcian blue staining, whereas Fig. 6B indicates the proportion of neutral and amino sugars found in two batches of acetic acid-soluble matrices, caspartin and calprismin. Alcian blue is a cationic dye, which stains mucopolysaccharides and glycosaminoglycans. It is thought to complex with anionic sites of polysaccharides. The acetic acid-soluble matrix appears heavily stained with this dye (Fig. 6A, lane 1). In particular, the most intense staining is observed around 38 kDa, where calprismin is located. A strong staining of isolated calprismin is confirmed in lane 3. On the other hand, caspartin is hardly stained with Alcian blue (lane 2). Different attempts to stain the matrix and the two isolated proteins with PAS (not shown) failed, both on gels and on blots. The absence of staining with PAS is consistent with the extremely low amounts of neutral and amino sugars, determined by high performance anion exchange-pulsed amperometric detection chromatography after acidic hydrolysis, which do not exceed 1.3% (w/w) for the two proteins and are even lower for the whole soluble matrix (Fig. 6B).

To preclude any ambiguities on putative glycosylation of the two proteins, chemical and enzymatic deglycosylations were performed and tested on SDS-PAGE and on Western blots. The results are shown in Fig. 7 for the chemical deglycosylation and in Figs. 8 and 6C for the enzymatic one. After a standard chemical deglycosylation performed at 0 °C, we do not detect any molecular weight shift for caspartin, both on a gel and by Western blot (Fig. 7, lanes 7 and 9), but there is a clear decrease of the immunological signal on the Western blot (lane 9). This indicates, first, that caspartin is apparently not glycosylated and, second, that the treatment with TFMS acid denatures conformation-dependent epitopes of caspartin. Furthermore, the calprismin band completely disappears, both on the silver-stained gel and on the Western blot. This suggests that calprismin may be extremely labile and cannot withstand the harsh treatment. The enzymatic deglycosylation (Fig. 8) confirms the absence of glycosylation of caspartin, since no increase of electrophoretic mobility is observed on a 15% acrylamide gel (Fig. 8A, lanes 5 and 7). Interestingly, on a 10% acrylamide gel, we observe a clear shift of

the calprismin band toward lower molecular weight after the enzymatic deglycosylation, both on the gel and on the blot (Fig. 8B, lanes 3 and 5). A precise calibration with the molecular weight markers indicates that calprismin decreases 2 kDa in apparent molecular mass. Furthermore, we observe a decrease (but not a complete loss) of the staining of calprismin with Alcian blue after the enzymatic deglycosylation (Fig. 6C, lanes 1 and 2). This suggests that the sugars bound to calprismin are negatively charged.

Taken together, our study on glycosyl moieties suggests that calprismin is a true glycoprotein, the saccharides of which are likely to be acidic rather than neutral or aminated. On the other hand, caspartin is not (or is very poorly) glycosylated.

**In Vitro Inhibition of Calcium Carbonate Precipitation**—Fig. 9 shows the results of the inhibition test. In the blank experiments (no added protein), the pH variations are characteristic. When  $\text{CaCl}_2$  is added to the  $\text{NaHCO}_3$  solution, the pH decreases instantaneously from 8.5/8.6 to 7.83 before rising again to 8 in ~30 s. Then the pH decreases rapidly to reach pH 7.1 in ~5 min. This pH decrease corresponds to the precipitation of calcium carbonate. The addition of caspartin to the system drastically changes the shape of the curve. One  $\mu\text{g}$  is sufficient to induce a delay in the crystallization of calcium carbonate. The delay increases in a dose-dependent manner when 3, 7, and 10  $\mu\text{g}$  are tested. At high amounts (>20  $\mu\text{g}$ ), a complete inhibition is recorded (data not shown). A similar effect is observed with poly-L-aspartic acid. By contrast, BSA has no effect on the delay, even at a high concentration (100  $\mu\text{g}$ ; not shown).

**Interaction of Caspartin with the Growth of Calcite**—Fig. 10 shows the effect of caspartin on the *in vitro* crystallization of calcium carbonate. In a blank experiment without any protein (Fig. 10, A and B), the crystals obtained are rhombohedral with an edge length of ~50  $\mu\text{m}$ . Their surface is smooth. The density of crystals per square millimeter was high, ~70–80. At low concentrations of caspartin (<0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), we do not observe any effect on the morphology of the crystals.

The effect of caspartin starts to be apparent at concentrations of 0.25–0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Fig. 10C), where a few crystals exhibit morphological changes. At 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  caspartin, the changes affect all of the crystals (Fig.



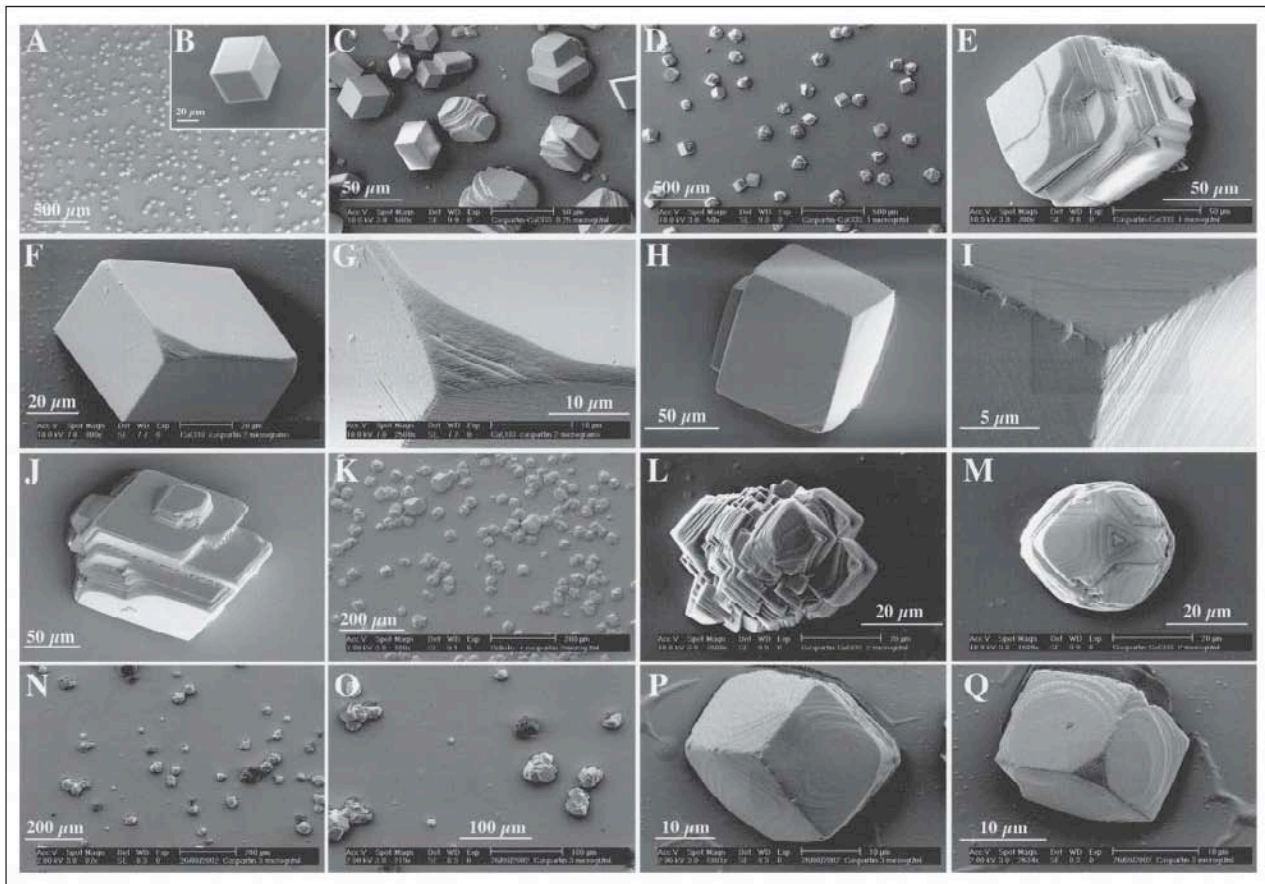


FIGURE 10. *In vitro* crystallization of calcite in the presence of caspartin. Caspartin was tested at concentrations ranging from 0.1 to 5  $\mu\text{g/ml}$  of  $\text{CaCl}_2$  solution. A and B, negative control without caspartin. C, caspartin at 0.25  $\mu\text{g/ml}$ . D–J, caspartin at 1  $\mu\text{g/ml}$ . K–M, caspartin at 2  $\mu\text{g/ml}$ . N–Q, caspartin at 3  $\mu\text{g/ml}$ . Above 3  $\mu\text{g/ml}$ , no crystals were formed.

10, D–J). At low magnification, we observe a drastic drop of the density of crystals per surface unit, between 5 and 10 crystals/ $\text{mm}^2$  (Fig. 10D). The crystals obtained are much bigger than those formed in the absence of caspartin, with dimensions of 70–100  $\mu\text{m}$ . Size distribution of the crystals is homogeneous. At higher magnification, the change in morphology is obvious, and two crystal morphologies are observed: polycrystalline aggregates (Fig. 10, E and J) and “monocrystals” (Fig. 10, F–J). The polycrystalline aggregates represent the majority of the crystals, and they exhibit complex morphologies. The “monocrystals” exhibit cubic or quadratic shapes characterized by rounded edges. Some of them exhibit surfaces that are not smooth but are characterized by the formation of terraces (Fig. 10H). At higher magnification (Fig. 10J), microsteps are visible, corresponding to the successive layers forming the sides. For this type of crystal, the effect of caspartin seems to be identical for all the sides of the crystals. The second type, present in low abundance, exhibits a layered structure in one dimension (Fig. 10, F and G).

At 2  $\mu\text{g/ml}$  caspartin, the size distribution of the crystals is heterogeneous. Whereas most of the crystals are smaller than the ones grown at 1  $\mu\text{g/ml}$  caspartin, few crystals exhibit similar dimensions (Fig. 10K). Most of the crystals are polycrystalline aggregates (Fig. 10, I and M). At 3  $\mu\text{g/ml}$ , the inhibiting effect of caspartin is readily apparent. The density of crystals per unit area is drastically decreased, as is the size of the crystals (Fig. 10, N and O). The bigger crystallites are all polycrystalline aggregates, whereas minute crystals (10–15  $\mu\text{m}$ ) are also present. These

minute crystals exhibit regular cubic shapes, the surfaces of which form regular terraces (Fig. 10, P and Q). At higher concentrations of caspartin, no crystals are observed. Controls performed with BSA do not show any of these effects.

To recapitulate, the concentration range in which the effect of caspartin is visible is narrow (0.5–3  $\mu\text{g/ml}$ ). Interestingly, a similar concentration range was previously found for an unfractionated shell extract (48).

**Polyclonal Antibodies Raised against Caspartin**—Extraction of caspartin from different batches yielded more than 8 mg of lyophilized caspartin, of which 1 mg was used to produce polyclonal antibodies in a rabbit. In ELISA, the working dilutions of the antisera obtained (first, second, and third bleedings) were 1:2000, 1:3000, and 1:10,000, respectively. When tested on a complete acetic acid-soluble extract of the prisms (Fig. 11A, lane 2), the antiserum (second bleeding) reacts against caspartin but does not cross-react with any other component of the prism matrix. The specificity of this antiserum allows us to use it for immunolocalizing caspartin within the shell.

We also observe that this antiserum does not cross-react with poly-L-aspartic acid (Fig. 11A, lane 5), although caspartin exhibits a putative poly-Asp domain. Two explanations can be put forward; such a domain is nonimmunogenic, or the caspartin-reactive antibodies are directed against the more hydrophobic part of the protein.

Interestingly, when lyophilized caspartin is dissolved in unheated or heated Laemmli buffer, which does not contain  $\beta$ -mercaptoethanol (Fig. 11, A (lane 4) and C), we observe a regular banding pattern, whereas the

## Characterization of Two Shell Proteins from Calcitic Prisms

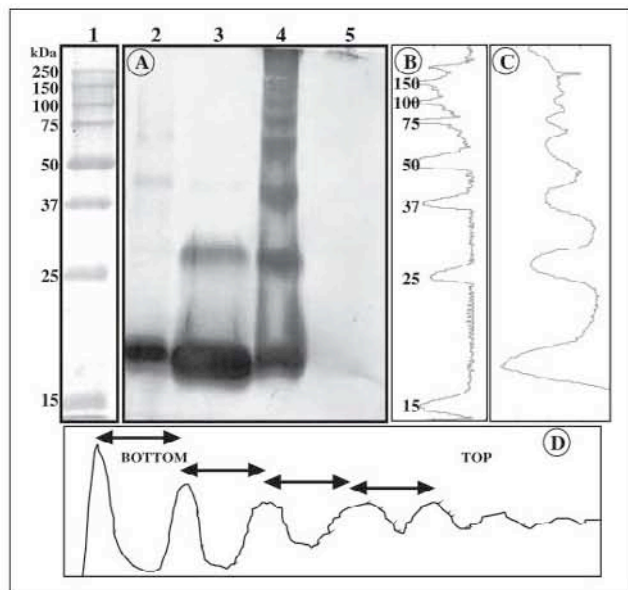


FIGURE 11. Western blot (A) of the prism matrix (lane 2) and of caspartin (lanes 3 and 4) after incubation with the anti-caspartin antibody. The samples were denatured in Laemmli buffer containing (lanes 2, 3, and 5) or not containing (lane 4)  $\beta$ -mercaptoethanol. Lane 1, molecular mass standards (kDa). Lane 5, polyaspartic acid. Densitometric profile of the standards (B) and of caspartin from lane 4 (C). D, densitometric profile of caspartin plotted on a semilog scale. The step (about 13/14 kDa) is conserved from peak to peak. This suggests that caspartin polymerizes in the absence of  $\beta$ -mercaptoethanol.

same preparation heated in a solution containing  $\beta$ -mercaptoethanol produces mainly one band. This suggests that caspartin has the ability to spontaneously self-aggregate into multimers. The densitometric profile, when plotted on a semilog scale (Fig. 11D), shows that the step between neighboring peaks is approximately constant and about 13/14 kDa. On the 12% polyacrylamide gel of Fig. 11, all the oligomers between the dimer and the heptamer can be distinguished. The step value, deduced from a precise calibration of the protein bands on a semilog graph (not shown), is lower than the apparent molecular weight of caspartin. This discrepancy may indicate that the molecular weight of caspartin, deduced from gel electrophoresis in the presence of SDS and  $\beta$ -mercaptoethanol, is overestimated, as previously suspected during our attempts to sequence caspartin. Similar differences in molecular weights have already been observed in many cases. In particular, E7, an acidic protein (pI 4.01), was found to migrate at 17 kDa in denaturing conditions, whereas its true molecular mass was only 11 kDa (72).

The fact that caspartin oligomerizes suggests that it may contain at least two cysteine residues per molecule. Our amino acid analysis (Fig. 3) shows that Cys represents less than 1%, which suggests only one cysteine residue per molecule. This discrepancy may be explained in two ways; the cysteine quantification after pyridylethylation underestimates the amount of this amino acid, or the oligomerization of caspartin may occur by a mechanism different from disulfide bond formation (electrostatic or hydrophobic interactions, van der Waals forces).

**Presence of Caspartin in Shell Extracts**—The polyclonal anti-caspartin antiserum was tested on dot blots of EDTA extracts of prism and nacre matrices (Fig. 12, A and B). In addition, this antibody was tested on Western blots of the two matrices (Fig. 12C). The results of the dot blots indicate that caspartin is mainly concentrated in the prismatic layer. Although our test is only semiquantitative, we estimate that caspartin represents between 2.4 and 5% of the acetic acid-soluble prism matrix (60–125  $\mu$ g of caspartin/g of bleach-treated prism powder). The inten-

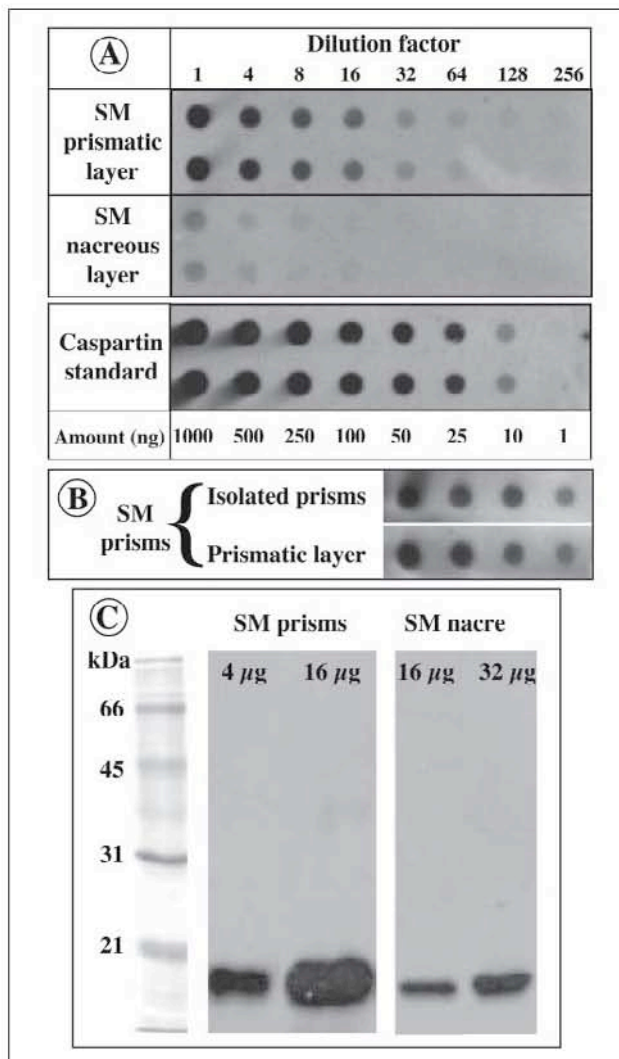


FIGURE 12. Presence of caspartin in prism and nacre EDTA extracts. A, dot blot semiquantification of caspartin in prism and nacre extracts. The extracts were compared with known amounts of caspartin, which were serially diluted in EDTA. The blot shows that a strong signal is detected in the prism extract and that a weak one is detected in the nacre matrix. B, comparison of the immunological reactivities of the EDTA-soluble matrices extracted from bleach-isolated prisms and from untreated prismatic layer. The reactivities are similar. SM, soluble matrix. C, Western blot of prism and nacre matrices (4, 16, and 32  $\mu$ g/lane). The blot was incubated with the anti-caspartin antiserum (dilution 1:5000). Caspartin is present in the soluble matrix of both layers, although in higher concentrations in the prism extract.

sities of the signals obtained from isolated bleach-treated prisms and from pieces of the prismatic layer are not significantly different (Fig. 12B). The slight variations might be due to the removal of insoluble organic periprismatic sheaths, which account for 5% of the weight of the powder. In comparison, the dot blot signal obtained with the nacre EDTA extract is low but significant. An approximate quantification of the amount of caspartin/g of dry powder indicates that caspartin or caspartin-related proteins would be 20–50 times less concentrated in the nacre than in the prisms. To test that the weak signal obtained on the nacre matrix is due to caspartin, or caspartin-related peptide, we also performed Western blots with increased amounts of prisms and nacre matrices. The results, shown in Fig. 12C, indicate that the nacre matrix contains an immunoreactive band, which is located at the same height on the gel as caspartin. However, this band is much less concentrated

## Characterization of Two Shell Proteins from Calcitic Prisms

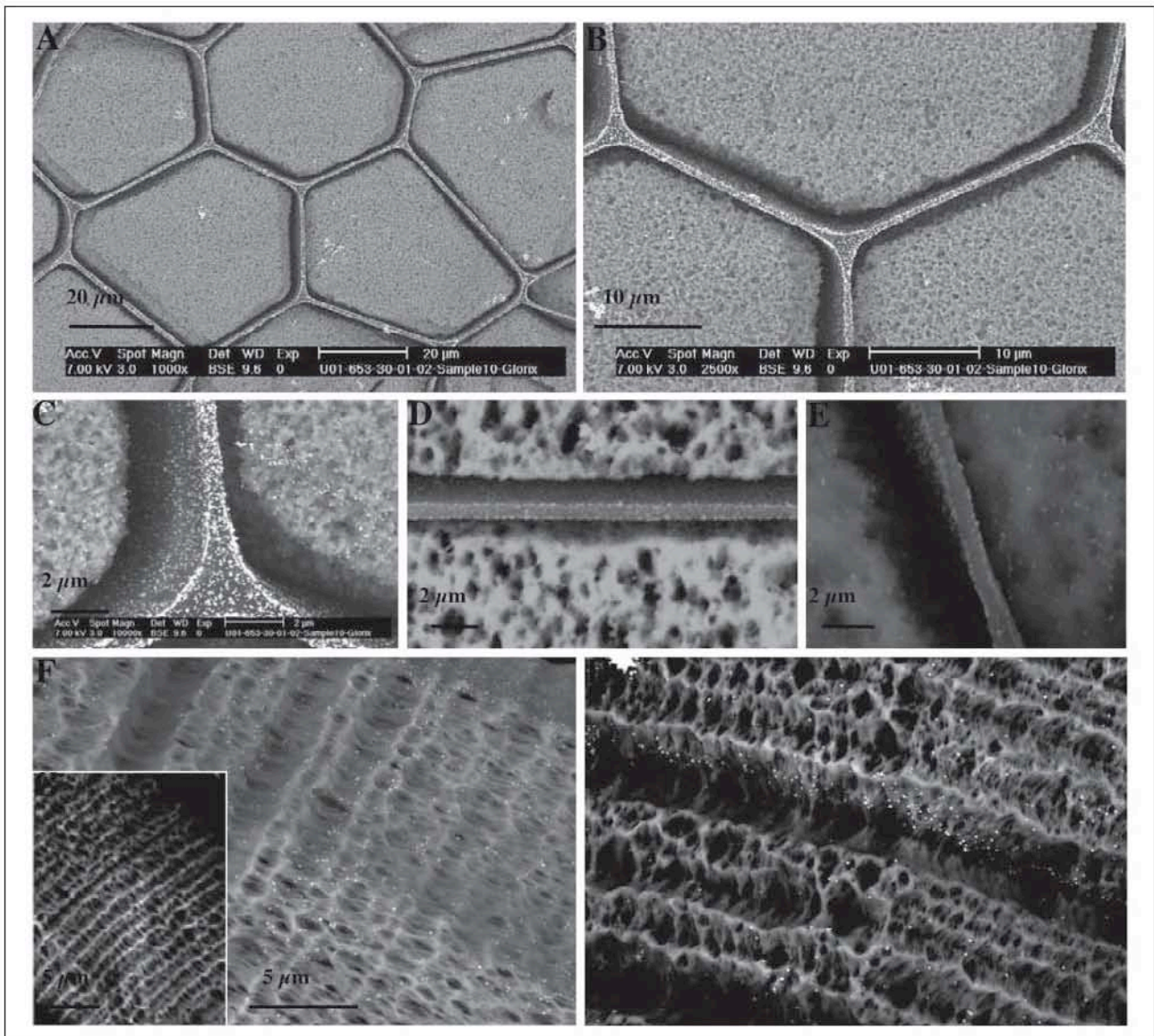


FIGURE 13. **Immunogold localization of caspartin in prisms.** Samples were observed in the back-scattered electron mode. *A–C*, transverse sections. *D* and *E*, longitudinal sections. *F–H*, surfaces of isolated prisms. *A–C* show that caspartin forms a continuous double layer at the interface between the periprismatic insoluble sheaths and the polygonal crystals. In addition, caspartin is dispersed within the crystals. *D* and *F*, a similar distribution of caspartin is observed in longitudinal sections. *F*, caspartin is homogeneously dispersed along the length of the prisms. *H*, in some areas, caspartin is preferentially concentrated in planes, which are perpendicular to the long axis of the prisms. Despite a layering of the prisms (see also Fig. 1), we do not observe any continuous layer of caspartin in that dimension. *G*, negative control with preimmune serum.

than caspartin in the prisms; 4  $\mu\text{g}$  of prism extract gives a signal that is higher than the one obtained with 32  $\mu\text{g}$  of nacre extract. These data suggest that caspartin, although enriched in the prism matrix, is not specific to that layer.

**Localization of Caspartin in Shell Preparation by Immunogold**—Results of the immunogold staining of caspartin in shell sections and in isolated prism preparations are shown in Fig. 13. In the back-scattered electron mode, the complexes formed by the antigen + first antibody + gold-labeled second antibody are localized as bright spots, the size of which is increased by silver enhancement (100 nm and more). In transverse sections, caspartin is seen as a continuous double layer coating the two sides of the insoluble organic sheaths

that surround the crystals (Fig. 13, *A–C*). At higher magnification, it can be seen that caspartin is also distributed inside the prisms (Fig. 13*C*). On longitudinal sections (Fig. 13, *D* and *E*), the double layer coating the insoluble sheath is also observed as well as scattered bright spots within the prisms (Fig. 13*E*). In the longitudinal view of isolated prism preparations, caspartin is localized on the surface of the prism sides (Fig. 13*F*). It is not clear whether the distribution of caspartin in that dimension is more or less uniform, as Fig. 13*F* suggests, or whether caspartin is preferentially concentrated in certain planes, perpendicular to the axis of the prisms, as shown in Fig. 13*H*. Although the layered structure of isolated prisms is evident, we do not observe continuous layers of caspartin, which would corre-

## Characterization of Two Shell Proteins from Calcitic Prisms

spond to these layers. The negative controls produce a low background (Fig. 13G).

### DISCUSSION

The new method that we used to isolate mollusc shell matrix proteins proceeds in two steps: fractionation of the shell matrix by preparative SDS-PAGE and assay of the isolated fractions on dot blots with an antibody elicited against the unfractionated matrix (37, 38). This allowed us to isolate two major proteins from the calcitic prismatic shell layer of the bivalve *P. nobilis*. We named these proteins caspartin and calprismismin, corresponding to the 17- and 38-kDa proteins, respectively.

Caspartin and calprismismin are two novel members of the small but rather disparate group of molluscan shell proteins that have been genetically or biochemically characterized (8, 9). This includes the twin proteins nacrein (73) and N66 (74), three framework proteins, MSI60, MSI31 (16), and MSI7 (75), the N14/N16/pearlin family (66, 74, 76), lustrin A (77), perlustrin (68, 78), mucoperlin (79), MSP-1 (80, 81), perlucin (67), a snail dermatopontin (82), AP7, and AP24 (83). This group also includes the recently found prismalin (17), aspein (18), asprich (19), and a histidine-rich protein of the extrapallial fluid (84). Furthermore, the shell protein group includes a few partly sequenced proteins (85–90).

Caspartin and calprismismin share many characteristics. They are soluble in acetic acid, and they are acidic due to their high Asx content. Their amino acid composition considerably deviates from the standard for proteins (91). Because these proteins are obtained after harsh treatment of the calcitic prisms with sodium hypochlorite, they are likely to be intimately associated with the mineral phase. Thus, in a first approximation, they could be described as *intracrystalline*. On a gel, they do not stain well and tend to migrate as diffuse bands. These two properties are usually found among proteins associated with calcified tissues (85, 86, 92). In denaturing conditions, neither caspartin nor calprismismin binds calcium. However, in the absence of Laemmli buffer, we demonstrated that caspartin, calprismismin, and the whole soluble matrix are able to bind calcium, although this effect is extremely reduced for calprismismin. A low affinity for calcium would be sufficient for temporarily sequestering calcium ions and releasing them when appropriate (93). Caspartin and calprismismin may act as crystal-binding rather than calcium-binding proteins (94). Our *in vitro* experiments suggest that at least caspartin strongly interacts with growing calcite crystals.

Despite a few similarities, caspartin and calprismismin are unlikely to belong to the same protein family. While caspartin seems to be a "true" aspartic acid-rich protein, calprismismin does not resemble any other calcifying protein. Contrary to caspartin, calprismismin is glycosylated. To date, only two shell proteins, the snail dermatopontin (82) and AP24 (83), have been shown to be glycosylated via asparagine. Because calprismismin stains well with Alcian blue but contains only low amounts of neutral and amino sugars, it is likely to carry acidic sugars, the chemical identity of which remains to be determined. Contrary to caspartin, calprismismin tends to smear when extracted from prisms of old specimens, and we suspect this protein to be rather labile. The fact that a small number of amino acids makes up the bulk of the molecule is characteristic of all proteins associated with biominerals (3, 95). On the other hand, the occurrence of proline and threonine is rather uncommon in this group. A potentially interesting feature comes from the cysteine pattern of calprismismin, which is similar to that found in granulins and in fungal surface glycoproteins. This may suggest that calprismismin might be involved in cell signaling or in matrix-cell interaction (14, 15, 96–98). However, because of its low level of homology and its incomplete characterization, the function of calprismismin is enigmatic.

In contrast to calprismismin, caspartin has more defined relation-

ships, since it may be included in the small group of aspartic acid-rich shell proteins. These soluble proteins, which were discovered by Weiner and co-workers (50, 95), are central to current hypotheses on molluscan mineralization, whereby they are thought to act as a template for nucleating calcium carbonate crystals (7, 12, 50). Initially, these proteins could not be easily isolated and characterized, so that their existence could only be inferred from amino acid composition and partial sequencing. The first members of this "family" to be described were three proteins extracted from the calcitic prismatic layer of the mussel *Mytilus californianus* (99, 100). RP-1 was another member from which short peptides were isolated and sequenced (85–87). More recently, the use of molecular biology techniques allowed the identification of transcripts, which encode putative Asp-rich proteins. The deduced protein sequences have been named MSP-1, aspein, and asprich. MSP-1 is an Asp-rich multidomain protein (80, 81) with a deduced molecular mass of 74.5 kDa. MSP-1 exhibits some similarities with phosphophoryns, a group of highly acidic proteins of the teeth (92, 101). The second fully sequenced transcript encodes aspein, the most acidic protein found to date (18). Aspein is a 39-kDa protein, which exhibits Asp<sub>n</sub> blocks punctuated with Ser-Gly dipeptides. Asp, Ser, and Gly represent 90% of the composition of aspein. Caspartin differs markedly from MSP-1 and aspein, because it contains very few serine and glycine residues but more glutamic acid. In that respect, caspartin might have more affiliation with the third protein family, the "asprich" proteins, recently identified from 10 transcripts of *Atrina rigida* (19). Interestingly, *Atrina rigida* is a nacropismatic bivalve, which is closely related to *P. nobilis*. The molecular weights of asprich-proteins vary between 8.5 and 27 kDa, and their Asp content varies between 32 and 50%. Compared with caspartin, asprich proteins are enriched in Glu (6.2–12.9%), Ala (10.3–16.7%), Val (3.5–8.8%), and Ser (4.9–9.8%). Asprich proteins have only been deduced from their transcripts and not by biochemical methods after an extraction/purification procedure. It is therefore premature to group caspartin and asprich proteins in the same subfamily.

How are the calcitic prisms of *P. nobilis* formed? The mechanism by which prisms grow is still unclear and controversial. Computer simulations show that prism-like textures may be easily produced by competition of spherulites (102, 103). When growing spherulites, which are regularly nucleated on a plane, come into contact, they grow only in one direction and form elongated crystals. Competition for space has been put forward to explain the formation of composite prisms of Unionid bivalves (104, 105). In *P. nobilis*, the early steps of prism formation are characterized by the presence of spherulites (25, 106) on the inner surface of the periostracal layer. However, histological observations clearly show that the interprismatic walls are produced before the mineral phase is deposited (25). In this case, crystal growth by competition is not required, since the prisms grow within a preformed mold. This does not mean that prisms grow "passively." Instead, prisms are likely to emerge from a complex interplay of electrostatic, stereochemical, and geometrical interactions (107).

Because caspartin is a major protein of the acetic acid-soluble matrix, it may play a central role in prism formation. We tentatively suggest the following functions. First, on growing prism surfaces, the intracrystalline caspartin would act as a local nucleator of CaCO<sub>3</sub> crystals. The nucleation surface of each prism would not be a continuous polyanionic film of caspartin but rather a surface punctuated by discrete caspartin spots, from which nanocrystals would grow and coalesce. Second, the caspartin film, which is anchored on the insoluble interprismatic walls, provides a strongly negatively charged environment. Thus, the honey-

## Characterization of Two Shell Proteins from Calcitic Prisms

comb-like framework, when coated with caspartin film, may be considered a polyanionic sink, which would help to attract and sequester calcium ions or to drive bicarbonate ions to the nucleating surface at the contact surface of the growing prisms and the supersaturated mother fluid. At the same time, the polyanionic envelope would act as an inhibitor constraining the outgrowth of the calcite crystals. Last, because caspartin polymerizes, the complex multimers formed may play a role in keeping a single crystallographic orientation of the prism nuclei, in such a way that each formed prism exhibits a single crystallographic orientation. Like other shell proteins, caspartin may be a multifunctional protein. More characterization (in particular sequence information and antisense RNA assays on larval fan mussels) is required before we can ascertain the function of caspartin in the formation of calcitic prisms.

*Acknowledgments*—Nicolas Navarro and Alain Godon (UMR 5561 "Biogéosciences") are acknowledged for help in designing Figs. 6, 8, and 9. F. Marin also thanks Claudie Josse (Laboratoire de Réactivité des Solides, Université de Bourgogne, Dijon, France) for help in handling the scanning electron microscope. F. Marin also thanks Prof. Nardo Vicente (CERAM, Marseille, France) for help in providing shell samples of *P. nobilis* and an anonymous reviewer for helpful corrections and suggestions.

### REFERENCES

1. Simkiss, K., and Wilbur, K. M. (1989) *Biom mineralization: Cell Biology and Mineral Deposition*, Academic Press, London
2. Saleuddin, A. S. M., and Petit, H. P. (1983) in *The Mollusca* (Saleuddin, A. S. M., and Wilbur, K. M., eds) Vol. 4, pp. 199–234, Academic Press, Inc., New York
3. Lowenstam, H. A., and Weiner, S. (1989) *On Biom mineralization*, Oxford University Press, New York
4. Mann, S. (2001) *Biom mineralization: Principles and Concepts in Bioinorganic Material Chemistry*, Oxford University Press, London
5. Kaplan, D. L. (1998) *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **3**, 232–236
6. Belcher, A. M., and Gooch, E. E. (2000) in *Biom mineralization: From Biology to Biotechnology and Medical Applications* (Bauerlein, E., ed) pp. 221–249, Wiley-VCH, Weinheim, Germany
7. Weiner, S., Traub, W., and Lowenstam, H. A. (1983) in *Biom mineralization and Biological Metal Accumulation, Biological and Geological Perspectives* (Westbroek, P., and de Jong, E. W., eds) pp. 205–224, D. Reidel Publishing Co., Dordrecht, The Netherlands
8. Wilt, F. H., Killian, C. E., and Livingston, B. T. (2003) *Differentiation* **71**, 237–250
9. Marin, F., and Luquet, G. (2004) *C. R. Palevol.* **3**, 469–492
10. Currey, J. D. (1999) *J. Exp. Biol.* **202**, 3285–3294
11. Carter, J. G. (ed) (1990) *Skeletal Biom mineralization: Patterns, Processes and Evolutionary Trends*, Van Nostrand Reinhold, New York
12. Weiner, S., and Traub, W. (1984) *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **304**, 425–434
13. Tisdell, C. A., and Poirine, B. (2000) *SPC Pearl Oyster Inform. Bull.* **14**, 21–31
14. Lopez, E., Berland, S., and Le Faou, A. (1995) *Bull. Inst. Océanogr. Monaco* **14**, 49–57
15. Westbroek, P., and Marin, F. (1998) *Nature* **392**, 861–862
16. Sudo, S., Fujikawa, T., Nagakura, T., Ohkubo, T., Sakaguchi, K., Tanaka, M., Nakashima, K., and Takahashi, T. (1997) *Nature* **387**, 563–564
17. Suzuki, M., Murayama, E., Inoue, H., Ozaki, N., Tohse, H., Kogure, T., and Nagasawa, H. (2004) *Biochem. J.* **382**, 205–213
18. Tsukamoto, D., Sarashina, I., and Endo, K. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**, 1175–1180
19. Gotliv, B. A., Kessler, N., Sumerel, J. L., Morse, D. E., Tuross, N., Addadi, L., and Weiner, S. (2005) *ChemBiochem* **6**, 304–314
20. Simkiss, K. (1968) in *Egg Quality: A Study of the Hen's Egg* (Carter, T. C., ed) pp. 3–25, Oliver & Boyd Ltd., Edinburgh
21. Gaspard, D. (1978) *Ann. Paléontol.* **64**, 1–25
22. Runnegar, B. (1985) *Alcheringa* **9**, 245–257
23. Kouchinsky, A. (2000) *Acta Palaeontol. Pol.* **45**, 119–150
24. Taylor, J. D., Kennedy, W. J., and Hall, A. (1969) *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. Zool. Suppl.* **3**, 1–125
25. Cuij, J. P., Denis, A., and Raguideau, A. (1983) *Halotit* **13**, 131–141
26. Cuij, J. P., Flamand, D., Frérotte, B., Chabin, A., and Raguideau, A. (1987) *C. R. Acad. Sci. (Paris) Sér. II* **304**, 475–478
27. Cuij, J. P., Gautret, P., and Marin, F. (1991) in *Mechanisms and Phylogeny of Mineralization in Biological Systems* (Suga, S., and Nakahara, H., eds) pp. 391–395, Springer-Verlag, Tokyo, Japan
28. Marin, F., Muzzer, G., and Dauphin, Y. (1994) *C. R. Acad. Sci. (Paris) Sér. II* **318**, 1653–1659
29. Dauphin, Y. (2002) *Comp. Biochem. Phys. B Biol. Sci.* **132**, 577–590
30. Dauphin, Y. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 15168–15177
31. European Economic Community (1992) *Official Journal of the EU* **L206**, 0007–0050
32. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680–685
33. Morrissey, J. H. (1981) *Anal. Biochem.* **117**, 307–310
34. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 4350–4354
35. Matsudaira, P. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 10035–10038
36. Leong, M. M. L., Milstein, C., and Pannell, R. (1986) *J. Histochem. Cytochem.* **34**, 1645–1650
37. Marin, F., Pereira, L., and Westbroek, P. (2001) *Protein Expression Purif.* **23**, 175–179
38. Marin, F. (2003) *Scientific World J.* **3**, 342–347
39. Schuster, R. (1988) *J. Chromatogr.* **431**, 271–284
40. Campbell, K. P., MacLennan, D. H., and Jorgensen, A. O. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 11267–11273
41. Maruyama, K., Mikawa, T., and Ebashi, S. (1984) *J. Biochem. (Tokyo)* **95**, 511–519
42. Wall, R. S., and Gyi, T. J. (1988) *Anal. Biochem.* **175**, 298–299
43. Devine, P. L., and Warren, J. A. (1990) *BioTechniques* **8**, 492
44. Edge, A. S. B., Faltynek, C. R., Hof, L., Reichert, L. E., and Weber, P. (1981) *Anal. Biochem.* **118**, 131–137
45. Hardy, M. R. (1989) *Methods Enzymol.* **179**, 76–82
46. Dionex Corp. (1998) *Technical Note* **40**, 1–6, Sunnyvale, CA
47. Wheeler, A. P., George, J. W., and Evans, C. A. (1981) *Science* **212**, 1397–1398
48. Albeck, S., Aizenberg, J., Addadi, L., and Weiner, S. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 11691–11697
49. Clark, M. F., and Adams, A. N. (1977) *J. Gen. Virol.* **34**, 475–483
50. Weiner, S., and Hood, L. (1975) *Science* **190**, 987–989
51. Krampitz, G., Drolshagen, H., Hausle, J., and Hof-Irmischer, J. (1983) in *Biom mineralization and Biological Metal Accumulation* (Westbroek, P., and De Jong, E. W., eds) pp. 231–247, D. Reidel Publishing Co., Dordrecht, The Netherlands
52. Marin, F., De Groot, K., and Westbroek, P. (2003) *Protein Expression Purif.* **30**, 246–252
53. Veis, A., Sabsay, B., and Wu, B. C. (1991) in *Surface Reactive Peptides and Polymers* (Sikes, C. S., and Wheeler, A. P., eds) pp. 1–12, American Chemical Society, Washington, D. C.
54. Nakahara, H., Kakei, M., and Bevelander, G. (1980) *Venus Jpn. J. Malacol.* **39**, 167–177
55. Albeck, S., Weiner, S., and Addadi, L. (1996) *Chem. Eur. J.* **2**, 278–284
56. Wilkins, M. R., Ou, K., Appel, R. D., Sanchez, J. C., Yan, J. X., Golaz, O., Farnsworth, V., Cartier, P., Hochstrasser, D. F., Williams, K. L., and Gooley, A. A. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **221**, 609–613
57. Takeuchi, K., Hatanaka, A., Kimura, M., Seki, N., Kimura, I., Yamada, S., and Yamashita, S. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 47416–47422
58. Gattiker, A., Gasteiger, E., and Bairoch, A. (2002) *Appl. Bioinformatics* **1**, 107–108
59. Yazaki, P. J., Salvatore, S., and Dahms, A. S. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **170**, 1089–1095
60. Clegg, D. O., Helder, J. C., Hann, B. C., Hall, D. E., and Reichardt, L. F. (1988) *J. Cell Biol.* **107**, 699–705
61. Thanka Christlet, T. H., and Veluraja, K. (2001) *Biophys. J.* **80**, 952–960
62. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997) *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402
63. Iozzo, R. V. (1997) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **32**, 141–174
64. Iozzo, R. V. (1998) *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 609–652
65. Vitt, U. A., Hsu, S. Y., and Hsueh, A. J. W. (2001) *Mol. Endocrinol.* **15**, 681–694
66. Samata, T., Hayashi, N., Kono, M., Hasegawa, K., Horita, C., and Akera, S. (1999) *FEBS Lett.* **462**, 225–229
67. Mann, K., Weiss, I. M., André, S., Gabius, H. J., and Fritz, M. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**, 5257–5264
68. Weiss, I. M., Göhring, W., Fritz, M., and Mann, K. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**, 244–249
69. Blom, N., Gammeltoft, S., and Brunak, S. (1999) *J. Mol. Biol.* **294**, 1351–1362
70. Hansen, J. E., Lund, O., Tolstrup, N., Gooley, A. A., Williams, K. L., and Brunak, S. (1998) *Glycoconj. J.* **15**, 115–130
71. Huttner, W. B. (1987) *Trends Biochem. Sci.* **12**, 361–363
72. Armstrong, D. J., and Roman, A. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **192**, 1380–1387
73. Miyamoto, H., Miyashita, T., Okushima, M., Nakano, S., Morita, T., and Matsushiro, A. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 9657–9660
74. Kono, M., Hayashi, N., and Samata, T. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **269**, 213–218
75. Zhang, Y., Xie, L., Meng, Q., Jiang, T., Fu, R., Chen, L., and Zhang, R. (2003) *Comp. Biochem. Phys. B Biol. Sci.* **135**, 565–573
76. Miyashita, T., Takagi, R., Okushima, M., Nakano, S., Miyamoto, H., Nishikawa, E.,

## Characterization of Two Shell Proteins from Calcitic Prisms

- and Matsushiro, A. (2000) *Mar. Biotechnol.* **2**, 409–418
77. Shen, X., Belcher, A. M., Hansma, P. K., Stucky, G. D., and Morse, D. E. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 32472–32481
78. Weiss, I. M., Kaufmann, S., Mann, K., and Fritz, M. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **267**, 17–21
79. Marin, F., Corstjens, P., De Gaulejac, B., De Vrind-De Jong, E., and Westbroek, P. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 20667–20675
80. Sarashina, I. and Endo, K. (1998) *Am. Mineral* **83**, 1510–1515
81. Sarashina, I. and Endo, K. (2001) *Mar. Biotechnol.* **3**, 362–369
82. Marxen, J. C., Nimtz, M., Becker, W., and Mann, K. (2003) *Biochim. Biophys. Acta* **1650**, 92–98
83. Michenfelder, M., Fu, G., Lawrence, C., Weaver, J. C., Wustman, B. A., Taranto, L., Evans, J. S., and Morse, D. E. (2003) *Biopolymers* **70**, 522–533
84. Hattan, S. J., Laue, T. M., and Chasteen, N. D. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 4461–4468
85. Rusenko, K. W., Donachy, J. E., and Wheeler, A. P. (1991) *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* **444**, 107–124
86. Donachy, J. E., Drake, B., and Sikes, C. S. (1992) *Mar. Biol.* **114**, 423–428
87. Halloran, B. A., and Donachy, J. E. (1995) *Comp. Biochem. Phys. B Biol. Sci.* **111**, 221–231
88. Bédouet, L., Schuller, M. J., Marin, F., Milet, C., Lopez, E., and Giraud, M. (2001) *Comp. Biochem. Phys. B Biol. Sci.* **128**, 389–400
89. Keith, J., Stockwell, S., Ball, D., Remillard, K., Kaplan, D., Thannhauser, T., and Sherwood, R. (1993) *Comp. Biochem. Phys. B Biol. Sci.* **105**, 487–496
90. Marxen, J. C., and Becker, W. (1997) *Comp. Biochem. Phys. B Biol. Sci.* **118**, 23–33
91. McCaldon, P., and Argos, P. (1988) *Proteins* **4**, 99–122
92. Stetler-Stevenson, W. G., and Veis, A. (1983) *Biochemistry* **22**, 4326–4335
93. Mann, S. (1988) *Nature* **332**, 119–124
94. Wheeler, A. P., Rusenko, K. W., George, J. W., and Sikes, C. S. (1987) *Comp. Biochem. Phys. B Biol. Sci.* **87**, 953–960
95. Weiner, S. (1979) *Calcif. Tissue Int.* **29**, 163–167
96. Reddi, A. H. (2000) *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 345–349
97. Almeida, M. J., Milet, C., Peduzzi, J., Pereira, L., Haigle, J., Barthelemy, M., and Lopez, E. (2000) *J. Exp. Zool.* **288**, 327–334
98. Bateman, A., and Benett, H. P. J. (1998) *J. Endocrinol.* **158**, 145–151
99. Weiner, S. (1983) *Biochemistry* **22**, 4139–4144
100. Addadi, L., Moradian, J., Shay, E., Maroudas, N. G., and Weiner, S. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 2732–2736
101. Ritchie, H. H., and Wang, L. H. H. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 21695–21698
102. Ubukata, T. (1994) *Palaeontology* **37**, 241–261
103. Ubukata, T. (1997) *Veliger* **40**, 165–177
104. Checa, A. (2000) *Tissue Cell* **32**, 405–416
105. Checa, A., and Rodriguez-Navarro, A. (2001) *Proc. R. Soc. Lond. B* **268**, 771–778
106. Dauphin, Y., Cuif, J. P., Doucet, J., Salomé, M., Susini, J., and Williams, C. T. (2003) *J. Struct. Biol.* **142**, 272–280
107. Heywood, B. R., and Mann, S. (1994) *Adv. Mater.* **6**, 9–20



ELSEVIER

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



Biomaterials 28 (2007) 2368–2377

**Biomaterials**

[www.elsevier.com/locate/biomaterials](http://www.elsevier.com/locate/biomaterials)

## Protein mapping of calcium carbonate biominerals by immunogold

Frédéric Marin<sup>a,\*</sup>, Boaz Pokroy<sup>b</sup>, Gilles Luquet<sup>a</sup>, Pierre Layrolle<sup>c</sup>, Klaas De Groot<sup>d</sup>

<sup>a</sup>UMR CNRS 5561 "Biogéosciences", Université de Bourgogne, 6 Boulevard Gabriel 21000 DIJON, France

<sup>b</sup>Department of Materials Engineering, Technion-Israel Institute of Technology, Haifa 32000, Israël

<sup>c</sup>INSERM U791, Osteoarticular and Dental Tissue Engineering, Faculty of Dental Surgery, Place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes, France

<sup>d</sup>University of Twente, Institute for Biomedical Technology, Professor Bronkhorstlaan 10D, 3723 MB Bilthoven, The Netherlands

Received 13 November 2006; accepted 23 January 2007

Available online 2 February 2007

### Abstract

The construction of metazoan calcium carbonate skeletons is finely regulated by a proteinaceous extracellular matrix, which remains embedded within the exoskeleton. In spite of numerous biochemical studies, the precise localization of skeletal proteins has remained for a long time as an elusive goal. In this paper, we describe a technique for visualizing shell matrix proteins on the surface of calcium carbonate crystals or within the biominerals. The technique is as follows: freshly broken pieces of biominerals or NaOCl then EDTA-etched polished surfaces are incubated with an antibody elicited against one matrix protein, then with a secondary gold-coupled antibody. After silver enhancement, the samples are subsequently observed with scanning electron microscopy by using back-scattered electron mode. In the present case, the technique is applied to a particular example, the calcitic prisms that compose the outer shell layer of the mediterranean fan mussel *Pinna nobilis*. One major soluble protein, caspartin, which was identified recently, was partly *de novo* sequenced after enzymatic digestions. A polyclonal antibody raised against caspartin was used for its localization within and on the prisms. The immunogold localization indicated that caspartin surrounds the calcitic prisms, but is also dispersed within the biominerals. This example illustrates the deep impact of the technique on the definition of intracrystalline versus intercrystalline matrix proteins. Furthermore, it is an important tool for assigning a putative function to a matrix protein of interest.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Calcium carbonate; Immunogold; SEM; Caspartin; Back-scattered electrons; Surface treatment

### 1. Introduction

In the metazoan world, calcium carbonate skeletons are the most commonly encountered biomineralizations, from the most "simple" diploblastic animals, sponges and corals, to deuterostomes, echinoderms and vertebrates. Their study offers promising perspectives in biotechnology: the synthesis at room temperature of materials that mimic the molluscan nacre, both in its structure and in its superior mechanical properties [1,2]; the use of bioactive coral or mollusk implants in bone substitution medicine [3,4].

All metazoan calcium carbonate biomineralizations share a remarkable property. They are organo-mineral assemblages, where the dominant mineral—calcite, aragonite, or less frequently, other polymorphs of CaCO<sub>3</sub>—is

closely associated with a minor organic matrix [5]. This latter (0.1–5 wt% of the skeleton) represents a mixture of proteins, glycoproteins and polysaccharides, which are secreted by the calcifying tissues during skeletogenesis, and sealed within the skeleton during its growth. The matrix displays essential functions in biomineralization: beside physico-chemical interactions, i.e., nucleation, polymorph selection, crystal growth and inhibition [6] the organic matrix is suspected to display enzymatic functions [7] and to be involved in cell signaling [8].

One fundamental aspect in biomineralization research is the comprehension of the topographic relations between the organic and the mineral phases [6]. Localizing the matrix components around and within biominerals helps to understand how they interact together, giving thus information on putative functions of matrix components during crystal synthesis. The precise localization of matrix components is critical, since it is usually the basis from

\*Corresponding author. Tel.: +33 3 80 39 63 72; fax: +33 3 80 39 63 87.  
E-mail address: [frederic.marin@u-bourgogne.fr](mailto:frederic.marin@u-bourgogne.fr) (F. Marin).

which new models of biomineralization are proposed. The best example is that of molluscan nacre, for which the “classical” model published in the early 1980s [9] evolved drastically until recently [10–13].

For localizing the organic matrix in calcium carbonate biominerals, several techniques are available from the most easy-to-handle to the most sophisticated ones: at low magnification, the distribution of organic matrix within biominerals can be visualized by coupling light microscopy with cathodoluminescence [14], with epifluorescence or by using different fluorochrome staining [15]. In the magnification range [1000–50,000], scanning electron microscopy (SEM) gives interesting results when samples surfaces are pre-treated for deciphering the fine topography of mineral-matrix assemblages [16]. At higher magnification, transmission electron microscopy (TEM) and cryo-TEM reveal nanostructural details [11,17], but their implementation requires a special expertise and skill. Finally, at the molecular scale, atomic force microscopy gives spectacular results, which however, may be difficult to interpret [18]. Other physical techniques, like high-resolution energy/wavelength dispersive X-ray analysis (EDX/WDX), Raman microspectroscopy, X-ray diffraction, X-ray absorption near edge structure spectroscopy (XANES), nanoscale secondary-ion mass spectrometry (NanoSIMS) may be useful. However, most of them do not localize a particular matrix component. At the best, XANES [19] and NanoSIMS [20] can only localize some chemical groups.

To localize a single component within a calcified skeleton, immunological techniques represent a valuable approach. The basic principle of these techniques is the use of antibody molecules, which specifically bind to their target antigens. The recognition domain of a given antibody is usually a short portion of the antigen, for polypeptides, 5–8 amino acids. The technique applied to skeletal matrices has not received a great deal of attention, in spite of having been successfully used with calcium carbonate biominerals: mollusc shells [21,22] and coral skeletons [23]. Two drawbacks of these earlier experiments were that, in two cases [21,23], the antibody preparations were made from crude mixtures of different matrix components and, if not, that these preparations were observed by optical microscopy, which implies a limited magnification [22].

In this paper, we describe an immunological staining, which overcomes these technical obstacles. The studied biominerals are the shell calcitic prisms of the pteriomorphid bivalve *Pinna nobilis*, from which caspartin, a shell soluble protein, was previously characterized [24]. In this paper, the characterization was pursued and caspartin was partly *de novo* sequenced after enzymatic digestions. Polyclonal antibodies were obtained against caspartin and used for immunogold localization with SEM, under back-scattered electron mode, after different surface treatments. We assess that this technique represents a substantial improvement for the localization of matrix components. Furthermore, it allows redefining the concepts of intracrystalline versus intercrystalline matrix.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

The shells of the bivalve *P. nobilis* were kindly provided by CERAM (Centre d'Etudes et de Recherches Animales Marines, Prof. Nardo Vicente). Like several Pteriomorphid bivalves, *P. nobilis* exhibits a macro-prismatic shell microstructure. The surface of the shells was carefully cleaned by abrasion with a dental drill, and the two shell layers were separated mechanically. In this study, only the outer prismatic calcitic layer was used for subsequent observations. On the one hand, small shell fragments were used for immunogold assay. On the other hand, several fragments of the prismatic layer were treated for protein purification. In this second case, they were soaked in dilute sodium hypochlorite (0.2 wt% active chlorine), for 4 days, under constant stirring. This operation resulted in the isolation of the calcitic prismatic biocrystals by degrading their periprismatic organic sheath [24]. Prisms were collected on a membrane, extensively rinsed with Milli-Q water, dried and crushed under liquid nitrogen. The soluble matrix (intra-prismatic) was extracted from this powder preparation.

### 2.2. Shell protein purification and polyclonal antibodies

The intra-prismatic matrix was obtained by overnight dissolution of the prism powder (20 g) with cold dilute acetic acid (5% v/v, 4 °C). The clear solution (about 1 l) was centrifuged (4500 rpm, 10 min), ultra-filtered (10 kDa cut-off) and extensively dialyzed [24]. Caspartin, a 17 kDa-protein and one of the two main soluble macromolecules of the prisms, was obtained by a blind fractionation of the matrix on preparative gel electrophoresis, followed by a dot-blot detection as previously described [24]. The quality of the preparation was checked on mini denaturing electrophoresis gels (Bio Rad Protean III), which were subsequently stained with silver [24].

Sera containing polyclonal antibodies raised against caspartin were obtained from the purified caspartin, in a white rabbit, according to a standard protocol (Eurogentec, Seraing, Belgium). The immunization procedure was performed with injections at 0, 14, 28 and 56 days, and bleedings at 0, 38, 66 and 80 days. The sera (1st, 2nd and 3rd bleeding) were tested on ELISA for the determination of their respective titer. The specificity of each serum for caspartin was subsequently checked by running the prism soluble matrix on mini-gel, and by transferring it on PVDF membrane. The membrane was then incubated with the anti-caspartin serum, extensively rinsed, incubated with the second antibody (peroxidase conjugate Goat Anti-Rabbit, Sigma A6154), rinsed and revealed by luminol chemoluminescent staining [24].

### 2.3. Protein sequencing

A caspartin extract was *de novo* sequenced [25] at the Biology Department of the Technion (Smoler Proteomics Center), Haifa, with an electrospray-quadrupole-TOF mass spectrometer (Q-TOF Ultima, Micromass, UK). To this end, the caspartin extract was digested either by trypsin, either by pepsin or by aspN. This yielded peptides of different lengths, the sequences of which were determined. Sequences were analyzed for homology search in SwissProt database. A complementary analysis was performed with SIM computer program (<http://www.expasy.ch/tools/sim-prot.html>), by aligning two per two each obtained sequence with each of the 43 known full-length shell proteins, characterized by their SwissProt accession number.

### 2.4. Immunogold localization of caspartin

Following titer determination, the 2nd antiserum preparation was used for localizing caspartin in the prismatic layer. All the incubation steps were performed in Falcon multiwell tissue culture flat bottom plates (12 or 24 wells). NaOCl-isolated prisms or shell fragments were used for the



experiments. For the shell fragments, different surface pre-treatments were applied: untreated freshly broken pieces of prismatic layer; EDTA-etched freshly broken pieces of prismatic layer; mirror-polished sections, which were subsequently cleaned with dilute sodium hypochlorite (0.2 wt% active chlorine, 10 min) for removing antigens spread on the surface, rinsed with water, then slightly etched with EDTA. Etching with EDTA 1% (w/v), pH 7.5, during 2–3 min, allows the exposure of epitopes, and their subsequent recognition by the antibodies. Contrarily to a soft tissue preparation, the mineral surface does not need to be fixed. All preparations were blocked at least 30 min with filtered gelatine (0.5–1% w/v) dissolved in Tris buffered saline (TBS), with a pH readjusted at 7.5 with dilute sodium hydroxide solution, to avoid further dissolution of the calcium carbonate. This operation precludes non-specific bindings of antibodies. The preparations were subsequently incubated for a few hours to overnight with the antiserum raised against caspartin, diluted 1:3000 in a solution of 1% gelatine dissolved in TBS, pH 7.5, containing Tween 20 (0.05% v/v). For overnight incubations,  $\text{NaN}_3$  (0.01% w/v), a bactericidal agent, was added to the solution. The preparations were extensively rinsed with TBS-Tween (4–6 times 10 min). They were subsequently incubated for 2–3 h in a small volume of the secondary antibody (Goat Anti-Rabbit coupled to 5-nm gold particles, British Biocell International, catalogue number EM.GAR5), diluted 400 times in 0.5% gelatin/TBS-Tween solution, pH 7.5. After extensive rinsing with TBS-Tween (4–6 times 10 min), the preparations were briefly rinsed with milli-Q water and dried before being silver enhanced at neutral pH [26] for 15–20 min with a silver enhancing kit (British Biocell International, catalogue number SEKL15). The staining was stopped, by rinsing the preparations with water. They were subsequently dried at 45 °C overnight and carbon sputtered (10 nm thick) for microscopic observations.

To check the specificity of the staining, blank experiments were performed similarly without the first antibody step or with pre-immune

serum, diluted 1:3000. Samples were observed with a JEOL JSM 6400F (Dijon). Observations were made in the back-scattering electron mode, with a 7.5–10 KeV beam. The immunogold experiments were performed several times.

### 3. Results

#### 3.1. The calcitic prisms of *P. nobilis*

As shown in Fig. 1, the prismatic outer layer of *P. nobilis* (Fig. 1A) is constructed from the dense packing of calcitic needles, which exhibit a polygonal section, the prisms (Fig. 1B). The prisms grow inwards from the periostracal layer, perpendicularly to the outer surface of the shell, and perpendicularly to nacre tablets (Fig. 1C). This direction corresponds to the crystallographic *c*-axis of the prisms. They are all maintained together by an organic framework, about 1  $\mu\text{m}$  thick. This honeycomb-like structure is composed of framework proteins, which can be entirely destroyed by sodium hypochlorite. This treatment dissociates the prismatic layer in single prisms units (Fig. 1D and E). The length of each prism varies between few tens of microns and more than 1 mm, for a diameter comprised between 30 and 100  $\mu\text{m}$ . They exhibit a layering perpendicular to their *c*-axis (Fig. 1E). The prisms of *P. nobilis* are defined as the “simple prisms” according to the terminology of Taylor et al. [27] and are known to behave

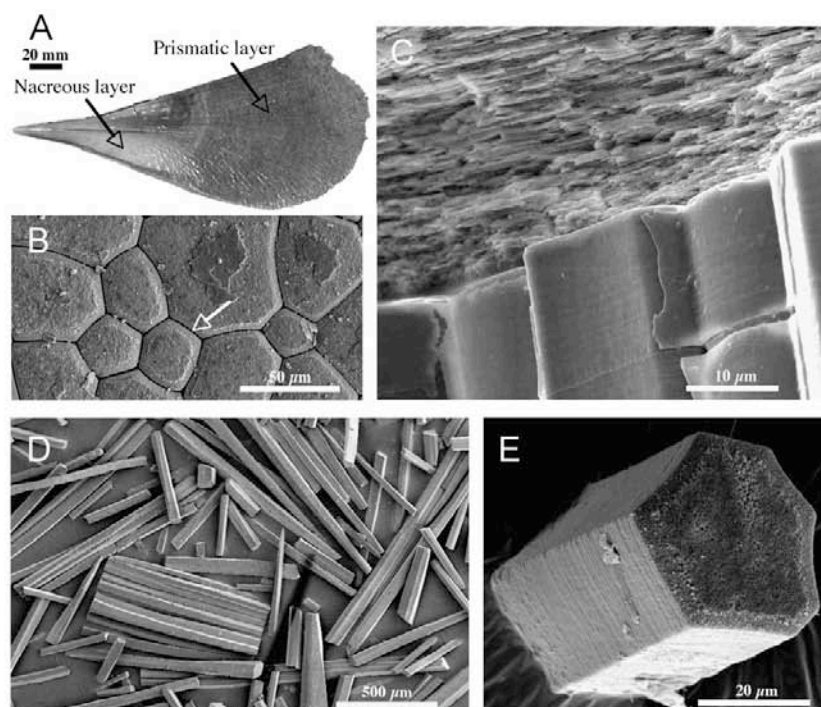


Fig. 1. Shell structure of *Pinna nobilis*: (A) macroscopic view of the internal surface of a right valve from a 2-year-old specimen, (B) non-cleaned surface of the prismatic layer, internal view. The densely packed prisms are maintained together by a thin interprismatic matrix (arrow), (C) transition zone between the prisms (down) and the nacre layer (top), transverse section, (D) isolated prisms from an adult specimen and (E) single prism, isolated with sodium hypochlorite. Note the thin layering perpendicular to the *c*-axis of the prism.

like monocrystals [27] although they exhibit several sub-structures [28]. For caspartin isolation and sequencing, antibody production, SDS-PAGE and Western blots, we used only the acetic acid-soluble matrix extracted from “within” the isolated prisms: this matrix should therefore be considered as *intracrystalline*.

### 3.2. Polyclonal antibodies against caspartin

On mini SDS-PAGE gel stained with silver nitrate, two prominent bands, localized by bold arrows, characterize the acetic acid-soluble matrix of the prisms of *P. nobilis* (Fig. 2, lane 2). In addition, several thin bands (small arrows) and a smear are also visible. The lower thick band, which migrates at 17 kDa of apparent molecular weight, corresponds to caspartin, an Asp-rich protein, the biochemical characteristics of which were described elsewhere [24]. Caspartin was purified from the crude soluble extract of NaOCl-isolated prisms, according to a previously published method [24]. It was tested for checking its purity on the same gel (Fig. 2, lane 3), and the purified extract was used for polyclonal antibody production. The anti-caspartin antibodies were tested by Western blot against the whole acetic acid-soluble prism matrix, at increasing matrix amounts. The results, shown in Fig. 2, lanes 4–6, indicate immuno-reactivity with a single band at 17 kDa, and no immunological cross-reactivity with the rest of the matrix. This strongly suggests that caspartin is the only matrix protein, recognized by the antibody preparation. The antibody preparation can thus be used for subsequent localization of caspartin directly in/on calcitic prisms.

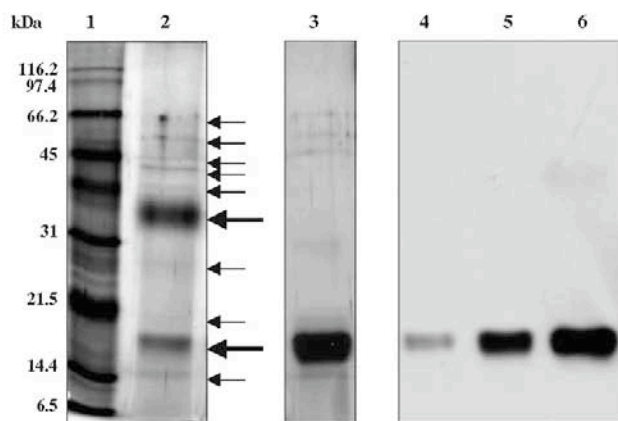


Fig. 2. SDS-PAGE (lanes 1–3) and Western blot (lanes 4–6) of the acetic acid-soluble matrix extracted from the prisms. Lane 1: broad range molecular weight standards. Lane 2: acetic acid-soluble matrix (SM) of the prisms of *Pinna nobilis*, 20 µg. Lane 3: purified caspartin, 10 µg. Lanes 1–3 were stained with silver nitrate. Lanes 4–6: SM of the prisms of *Pinna nobilis*, 5 µg (lane 4), 10 µg (lane 5), 20 µg (lane 6). The Western blots of lanes 4–6 were incubated with the anti-caspartin polyclonal antibody solution (dilution 1:3000). The signal obtained is very specific for caspartin.

### 3.3. Protein sequencing

The enzymatic digestions of caspartin generated peptides of different sizes (Fig. 3). A single acidic peptide was obtained after the trypsin digestion. This 17-residues peptide exhibits six aspartic acid residues (Fig. 3A). The pepsin digestion yielded five peptides (9–12 residues). Two of them differ only by one residue (M/F) in their C-terminus, and the three others, by three residues (Fig. 3B). Finally, the aspN digestion produced three additional almost identical peptides of 13 residues each, which differ by two residues in their N-terminus (Fig. 3C). These almost identical peptides produced by one enzymatic digestion may represent isoforms of a single domain or repeat units. A homology search performed with BLAST did not give significant results. However, the complementary SIM analysis, made by aligning two per two each obtained sequence with each of all the known full-length molluscan shell proteins (43 different accession numbers in SwissProt, including all the variants of Asp-rich and of shematrin families), produced interesting matching motifs. Among them, 17 have three consecutive amino acids, three have four amino acids (DAAD, SLSA, AVTA), and one, five residues (DAADV). The sequence of the acidic peptide obtained after the trypsin digestion exhibits some similarities with the sequences of the most acidic shell proteins, namely aspein, Asp-rich and MSP-1 (Fig. 3D). All three proteins are found in association with calcitic shell textures [29]. The peptide obtained from the pepsin digestion

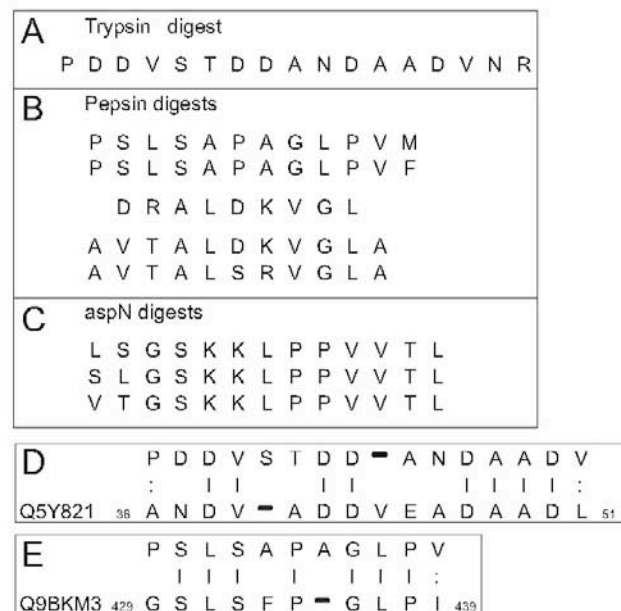


Fig. 3. Partial amino acid sequences obtained by *de novo* sequencing, after digestion: with trypsin (A), with pepsin (B), with aspN (C). (D) Sequence alignment of the trypsin digest with one of the members of the Asp-rich family (SwissProt accession number Q5Y821). (E) Sequence alignment of the pepsin digest with mucoperlin (SwissProt accession number Q9BKM3).

(PSLSAPAGLPV) exhibits some similarities with the C-terminus of mucoperlin (Fig. 3E), a mucin-like protein, which is specific of the nacreous layer of *P. nobilis* [22]. Taken together, our sequence data show that the primary structure of caspartin is constituted of domains, which markedly differ in their hydrophobicity/hydrophilicity. This suggests that these domains may display different functions in biomineralization.

### 3.4. Immunogold staining

The results of the immunogold staining are shown in Figs. 4 and 5. In the back-scattered electron mode, the gold particles, which are covalently bound to the secondary antibody (goat anti-rabbit), appear as tiny bright spots. The diameter of the spots depends on the duration of the silver enhancement. Typically, the spot size is comprised

between 50 and 100 nm after 20 min incubation in the silver enhancement solution.

In our hands, we found that the use of secondary antibodies coupled with small gold particles 5 or 1 nm diameter gave the best results. Attempts to use 30 nm gold particles were not successful, since very weak signals were obtained (not shown). This suggests that the size of the gold particles may induce steric or charge hindrance, as described by the manufacturer. Furthermore, we found that the best observations were performed at 7.5 or 10 KeV: attempts at 5 KeV gave low signal; at 15 KeV, thick samples had a tendency to charge.

Another parameter to check is the pH of the different gelatin solutions. In standard immunological tests (ELISA, Dot blot, Western blot), pH values of the gelatin solutions are usually not readjusted. A 1% gelatin solution significantly lowers the pH (below pH 6). Because we

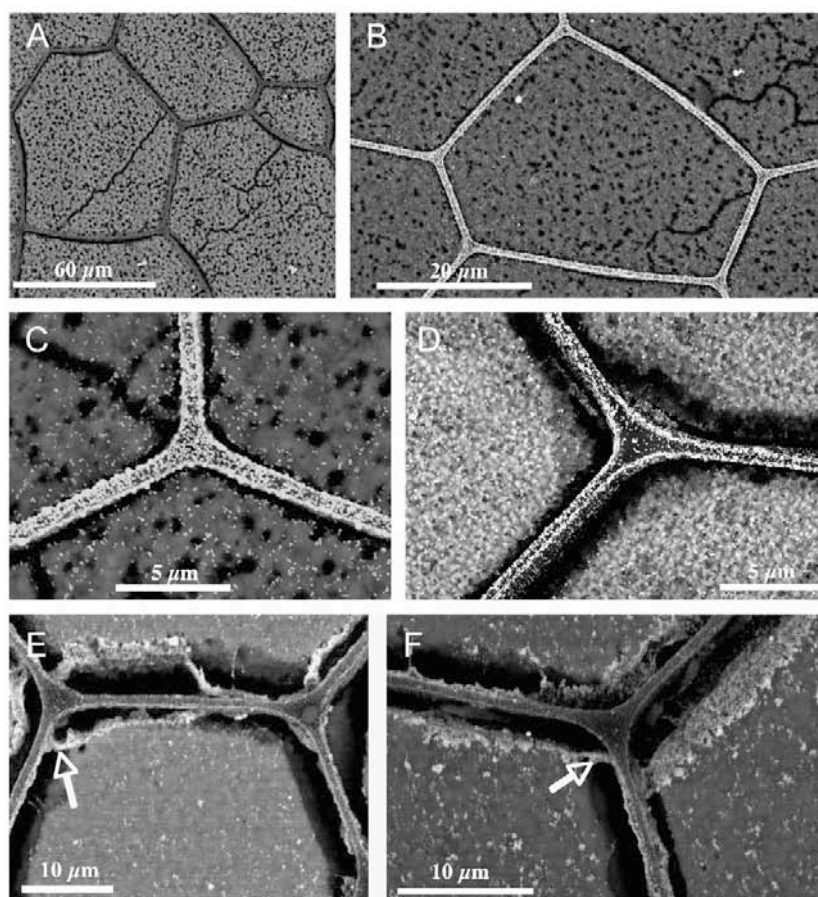


Fig. 4. Immunogold staining of transverse sections of prisms preparations, observed by scanning electron microscope, in back-scattered electron mode. Different preparations were tested: (A) negative control obtained on a fresh fracture, short etching (1 min) with EDTA, and incubation with pre-immune serum. (B) Similar preparation incubated with the anti-caspartin antiserum. Note the differences between A and B: in B, the surface of the prisms is stained, as well as a double layer, which surrounds each prism. (C) Triple junction between three prisms; same treatment as B. The double coating is evident, as well as a staining on the surfaces of the prisms. (D) Similar triple junction of a sample etched for 5 min. The dissolution takes place at the interface between the prisms and the insoluble sheaths. (E and F) Similar preparation, obtained after a long etching time (20 min). A densely stained membrane (arrow) is observed at the interface between the prisms and the organic periprismatic sheaths. In F, one of the densely stained lateral sides of a prism is clearly visible (arrow).

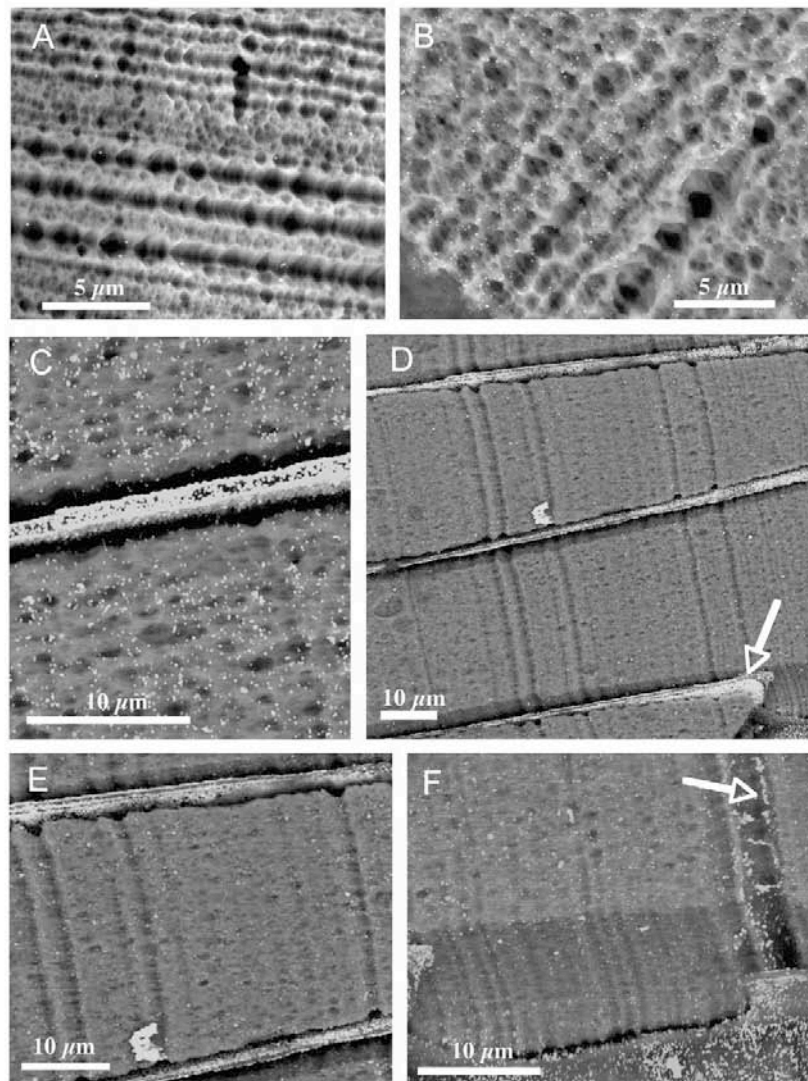


Fig. 5. Immunogold staining on isolated prisms (A and B) and on longitudinal section of prisms (C–F). (A) Negative control, single prism incubated with the pre-immune serum. Few background spots are visible. (B) Single prism preparation, obtained after extensive NaOCl treatment, then rinsed, briefly etched with EDTA and incubated with the anti-caspartin antiserum. The staining is less dense than in Fig. 5C, due to caspartin removal by NaOCl treatment. (C) Longitudinal section, EDTA-etching, 5 min. Caspartin makes a double layer around the prisms and is also densely spread on the surface. (D–F) Longitudinal section, EDTA-etching, 10 min: (D) the caspartin-rich layer around the prism can be clearly seen (arrow), (E) same as D, higher magnification and (F) although most of the immunogold signal is spread along the prism, a caspartin-rich discontinuous ‘layer’ is observed on the right side (arrow).

work with  $\text{CaCO}_3$  biominerals and gelatin is used in three incubation steps (for blocking and for the two antibody solutions), we advise to maintain pH at 7.5 with sodium hydroxide, for precluding the formation of dissolution patterns (particularly visible on single prism preparations, not shown), and a significant decrease of the immunological signal. In all our experiments, we buffered the gelatin solutions at pH 7.5.

We prepared different surface treatments to check whether the obtained images were not artifacts. For example, we observed that polishing the samples, rinsing

and etching with EDTA, blocking with gelatin and incubating with the first antibody solution induced artifacts, since the polishing provoked a spreading of the antigens on the surface of the polished surface. This can be solved by adding an extra-step of surface cleaning with dilute sodium hypochlorite (bleaching), after the polishing and before rinsing with water and etching with EDTA (Fig. 4D–F). We compared the results obtained with those obtained on freshly broken pieces, which were directly etched with EDTA, blocked with gelatin and treated with the first antibody solution (Fig. 4B and C). They were not

significantly different. Thus, we recommend working with freshly broken and EDTA-etched surfaces, this treatment minimizing the possibilities of artifacts.

Fig. 4 corresponds to transverse sections of prisms (plane perpendicular to the  $c$ -axis of the prisms). It shows that caspartin is distributed as a continuous double layer coating the two sides of the insoluble organic sheaths that surround the crystals (Fig. 4B-F). The different treatments applied to the shell surface do not fundamentally affect the distribution pattern of caspartin. Fig. 4B and C are produced on freshly broken pieces, with an extremely brief etching (1 min). Fig. 4D corresponds to another preparation, which was EDTA-etched for 5 min and Fig. 4E and F correspond to an EDTA-etching treatment of 20 min, which results in the formation of an empty space due to prism dissolution, between the prisms and the insoluble sheath. Interestingly, this last preparation clearly shows that caspartin makes a continuous film at the interface between the prisms and the sheaths (white arrows). It also shows that the film is maintained coherent in spite of being detached from its sheath template (Fig. 4F). This suggests that the caspartin, which constitutes the interfacial film, may be in an insoluble form, by polymerization or by strong interaction with other insoluble film components. In transverse sections, caspartin is also densely distributed on the top surface of the prisms (Fig. 4C, D and F). On this surface, the distribution of caspartin looks homogeneous, and this protein does not seem to be preferentially concentrated in specific zones. The different durations of the EDTA-etching do not affect the distribution of caspartin and the density of spots, on top of the prisms surface. The most likely explanation is that, because intracrystalline caspartin is more or less homogeneously distributed within the prisms, the EDTA etching treatment continuously un.masks 'new' embedded caspartin molecules during the slow dissolution of the prisms surface.

Fig. 5 shows the distribution on caspartin, either on the surface of isolated prisms (Fig. 5B) or on longitudinal polished sections (sections parallel to the  $c$ -axis of the prisms, Fig. 5C-F). Fig. 5C and E confirm the staining of a double layer coating the insoluble sheath, at the interface with the mineral phase. The caspartin film can be observed on the partly unmasked peri-prismatic sheath of Fig. 5D (bottom, white arrow). Numerous bright spots are also scattered within the prisms (Fig. 5B, C and F). On longitudinal view of isolated prism preparations (Fig. 5B), caspartin is slightly less densely distributed than in polished sections (Fig. 5C), which suggests that the NaOCl treatment used for isolating the prisms may partly degrade caspartin. The distribution of caspartin on polished sections is more or less uniform and does not follow the planes corresponding to the growth increments of the prisms. Only in few cases, caspartin is more concentrated in certain planes, perpendicular to the axis of the prisms (Fig. 5F, white arrow). However, the caspartin distribution along these planes is not continuous, which suggests that caspartin does not make a 'template'

film, as it is the case for the 'peri-prismatic' caspartin. In all our experiments, the negative controls always produce a low background (Fig. 4A and 5A).

#### 4. Discussion

The present paper describes partial sequences of caspartin and the localization of this protein on and within calcium carbonate biominerals by immunogold staining followed by observation with SEM. Our previous incomplete biochemical characterization suggested that caspartin is an aspartic acid-rich protein [24]. Our conclusions were based on the amino acid composition of caspartin, obtained after acid hydrolysis. In the absence of sequence data, we did not exclude the possibility that a part of the aspartic acid residues detected come from the conversion of asparagine residues during the hydrolysis, and that caspartin might be less acidic than initially suspected. In this paper, the partial sequence obtained after trypsin digestion reveals one Asp-rich domain, which shows similarities with one found in the Asp-rich family [29]. On the other hand, the other peptides (generated by aspN or pepsin digestions) are more hydrophobic: the aspN peptides exhibit two consecutive lysine residues and a short hydrophobic motif. This domain might be involved in the anchoring of caspartin to the framework insoluble sheath, as suggested for the basic C-terminal domain of lustrin A [30]. Furthermore, the presence of hydrophobic domains in an acidic protein, which inhibits the growth of calcium carbonate in solution, is known to enhance its inhibitory capacity [31]. Finally, two of the peptides produced by the pepsin digestion exhibit some similarities with mucoperlin [22], a protein specific of the nacre layer of *P. nobilis*. Although this similarity is not well understood at the functional level, it suggests that short protein domains can be re-used as 'building blocks' by different mineralizing proteins with different functions.

Caspartin was also localized by immunogold. The technique combines the specificity of the antigen antibody reaction to observation at high magnification. The immunogold SEM technique has been used for localizing specific antigens on cell membranes [32,33] or bioactive components on the surface of tailored materials [34,35]. However, the combination of immunogold labeling and SEM observation has been applied to CaCO<sub>3</sub> biominerals in rare cases: mollusk shell [24,36] and sea urchin spicules [37-39]. This technique brings invaluable information on the 3D relationships between matrix components and the mineral itself, at the 'mesoscale' [39]. It can be applied to all kinds of biominerals of prokaryotic or eucaryotic origin, fresh or fossil, provided that a specific antibody is available. Furthermore, by combining different antibodies raised against different matrix macromolecules, a biomineral protein mapping becomes technically feasible.

The localization of caspartin in the prisms by immunogold calls for further explanation. Since the pioneering work of Crenshaw [40], it is common knowledge to

distinguish shell proteins according to their solubility in the decalcifying solution. One distinguishes the ‘soluble’ proteins, which are hydrophilic and rich in aspartate residues, and the ‘insoluble’ proteins, which are hydrophobic, because of their high content in aliphatic amino acid. To this “technical” classification is superimposed another one introduced by Crenshaw: the *intercrystalline* versus *intracrystalline* fractions. The *intercrystalline* matrix corresponded to the EDTA-insoluble components localized around the calcium carbonate crystallites, and easily destroyed by a NaOCl treatment. The *intracrystalline* fraction corresponded to the EDTA-soluble proteins, protected from NaOCl because of their location within the biocrystals. According to this and to the protocol used for prisms isolation, caspartin is *intracrystalline*. However, the simple view that associates hydrophilicity to *intracrystallinity* and hydrophobicity to *intercrystallinity*

is inadequate. Our immunogold localization experiment shows that caspartin is both *intracrystalline* (dispersed within the crystals) and *intercrystalline* (forming a film at the periphery of the prisms). In a previous study on sea urchin, it was similarly shown that two soluble spicule proteins, SM50 and SM30, were both intracrystalline and located on the surface of the biocrystals [39]. Furthermore, our study demonstrates that the interprismatic framework is a three-layered structure, with the framework taken as sandwich between two caspartin-rich films. Such an organization had been described for nacre [17] but never for prisms. The single indication so far that the interprismatic framework may be heterogeneous comes from one recent paper [28], but the evidence presented is scanty and indirect. Our data unambiguously clarify this point.

We can try to relate the location of caspartin to its putative roles in the prisms biomineralization process.

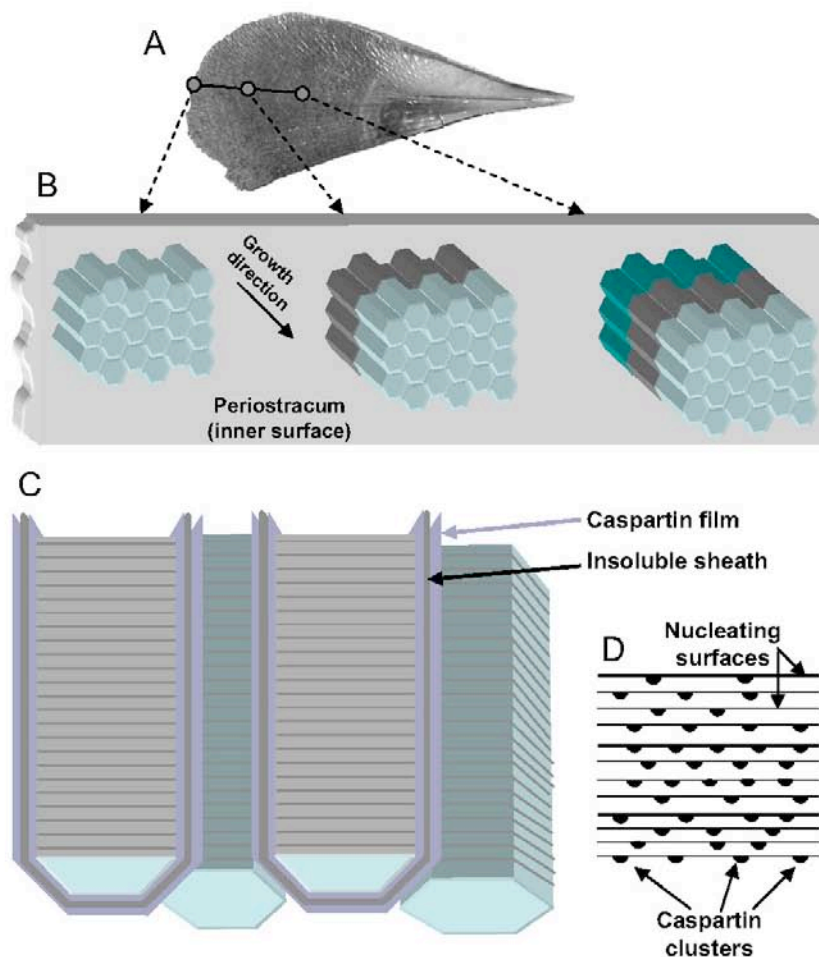


Fig. 6. A simplified model of the putative functions of caspartin, according to its location within and around the calcitic prisms of *Pinna nobilis*. (A) The inner surface of the shell is observed. (B) Schematic view of three groups of prisms, at different growth stages. The periostracum, secreted by the cells of the periostracal groove, is the organic membrane from which prisms grow. (C) Detailed scheme of five prisms. Each prism is initiated as a spherulite, which first grows centripetally (not represented). Caspartin makes a double coating film around each prism. (D) Detail of C. The “intracrystalline” caspartin may act as a nucleator of nanocrystals on the growing surface of each prism.

Because caspartin has basically two locations *around* and *within* calcitic prisms, different functions should be considered as shown by Fig. 6. At first, the *intracrystalline* caspartin may act as a nanocrystal nucleator, on the growing surfaces of each prism. If so, the nucleating surface would not be a continuous template of caspartin, but rather a mineral surface punctuated by caspartin clusters (Fig. 6D), from which nucleated nanocrystals would coalesce. As a consequence of its *intracrystalline* localization, caspartin is a crystal lattice modifier. We recently observed that caspartin, when incorporated to calcite grown *in vitro*, induces a slight lattice distortion, especially along the *c*-axis, when compared to non-biogenic calcite [41]. Secondly, the *intercrystalline* caspartin film may also display different functions. Firstly, it would act as an inhibiting surface, which may help to constrain the growth of the crystal in the *c*-axis direction (Fig. 6B and C). Secondly, caspartin may be involved in maintaining the crystallographic orientation of the whole prism. However, the mechanism by which this would be performed is unclear. Thirdly, the caspartin film coated on the interprismatic walls acts as a “polyanionic sink”, for sequestering calcium ions or for driving bicarbonate ions to the nucleating surface. A very elegant alternative hypothesis, published recently [42], proposes that the interprismatic hydrophobic walls are shaped by interfacial tension that occurs in a precursor liquid-liquid emulsion. If so, the hydrophilic caspartin may play an active role in this self-assembling process: being localized as a film at the surface of the liquid droplets of the extrapallial fluid, it may stabilize the emulsion, while the more viscous and hydrophobic organic phase polymerizes in a solid but flexible honeycomb-like structure.

## 5. Conclusion

Clearly, if obtaining the location of a protein in/on a biomineral is not *per se* a sufficient condition for understanding the biomineralization process, it constitutes an invaluable information for assessing putative functions of this protein.

## Acknowledgments

This work was initiated in the Dutch Biotech Company IsoTis (Bilthoven) and continued in Dijon. This paper is a contribution to an “Aide Concertée Incitative Jeunes Chercheurs” (ACI JC 3049) awarded to F. Marin by the French “Ministère Délégué à la Recherche et aux Nouvelles Technologies”. In 2004, the “Conseil Régional de Bourgogne” (Dijon, France) provided additional supports for the acquisition of new equipment in Biogéosciences research unit. F.M. thanks Claudie Josse (Laboratoire de Réactivité des Solides, UB, Dijon) for her help in handling SEM. F. Marin and B. Pokroy thank the Smoler Proteomics Center at the Department of Biology of Technion, Haifa, for their help in performing

the *de novo* sequencing, and Prof. Noam Adir (Chemistry, Technion) and Prof. Emil Zolotoyabko (Materials Engineering, Technion) for helpful discussions.

## References

- [1] Mann S. *Biomaterialization. Principles and concepts in bioinorganic materials chemistry*. Oxford: Oxford University Press; 2001.
- [2] Mayer G. Rigid biological systems as models for synthetic composites. *Science* 2005;310:1144–7.
- [3] Begley CT, Doherty MJ, Mollan RA, Wilson DJ. Comparative study of the osteoinductive properties of bioceramic, coral and processed bone graft substitutes. *Biomaterials* 1995;16:1181–5.
- [4] Atlan G, Balmain N, Berland S, Vidal B, Lopez E. Reconstruction of human maxillary defects with nacre powder: histological evidence for bone regeneration. *CR Acad Sci Paris* 1997;320:253–8.
- [5] Lowenstam IIA, Weiner S. *On biomineralization*. New York: Oxford University Press; 1989.
- [6] Weiner S, Addadi L. Design strategies in mineralized biological materials. *J Mater Chem* 1997;7:689–702.
- [7] Miyamoto H, Miyashita T, Okushima M, Nakano S, Morita T, Matsushiro A. A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9657–60.
- [8] Westbrook P, Marin F. A marriage of bone and nacre. *Nature* 1998; 392:861–2.
- [9] Weiner S, Traub W. Macromolecules in mollusk shells and their functions in biomineralization. *Philos Trans R Soc Lond B* 1984;304:424–5.
- [10] Schäffer TE, Ionescu-Zanetti C, Proksch R, Fritz M, Walters DA, Almqvist N, et al. Does abalone nacre form by heteroepitaxial nucleation or by growth through mineral bridges? *Chem Mater* 1997; 9:1731–40.
- [11] Levi-Kalisman Y, Falini G, Addadi L, Weiner S. Structure of the nacreous organic matrix of a bivalve mollusk shell examined in the hydrated state using cryo-TEM. *J Struct Biol* 2001;135:8–17.
- [12] Nassif N, Pinna N, Gehrke N, Antonietti M, Jäger C, Cölfen H. Amorphous layer around aragonite platelets in nacre. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:12653–5.
- [13] Addadi L, Joester D, Nudelman F, Weiner S. Mollusk shell formation: a source of new concepts for understanding biomineralization processes. *Chem Eur J* 2006;12:980–7.
- [14] Götz J. Potential of cathodoluminescence (CL) microscopy and spectroscopy for the analysis of minerals and materials. *Anal Bioanal Chem* 2002;374:703–8.
- [15] Gautret P, Reitner J, Marin F. Mineralization events during growth of the coralline sponges *Acanthochaetetes* and *Vaceletia*. *Bull Inst Oceanogr Monaco No special* 14 1996;4:325–34.
- [16] Mutvei H. The nacreous layer in molluscan shells. In: Omori M, Watabe N, editors. *The mechanisms of biomineralization in animals and plants*. Tokyo: Tokai University Press; 1980. p. 49–56.
- [17] Nakahara H. Nacre formation in bivalve and gastropod mollusks. In: Suga S, Nakahara H, editors. *Mechanisms and phylogeny of mineralization in biological systems*. Tokyo: Springer; 1991. p. 343–50.
- [18] Walters DA, Smith BL, Belcher AM, Palocz GT, Stucky GD, Morse DE, et al. Modification of calcite crystal growth by abalone shell proteins: an atomic force microscope study. *Biophys J* 1997;72: 1425–33.
- [19] Dauphin Y, Cuif JP, Doucet J, Salomé M, Susini J, Williams CT. In situ chemical speciation of sulfur in calcitic biominerals and the simple prism concept. *J Struct Biol* 2003;142:272–80.
- [20] Fayek M, Utsunomiya S, Piffner SM, White DC, Riciputi LR, Ewing RC, et al. The application of HRTEM and NanoSIMS to chemically and isotopically characterize *Geobacter sulfurreducens* surfaces. *Can Mineral* 2005;43:1631–41.
- [21] Muzer G, Westbrook P. An immunohistochemical technique for the localization of preserved biopolymeric remains in fossils. *Geochim Cosmochim Acta* 1989;53:1699–702.

- [22] Marin F, Corstjens P, De Gaulejac B, De Vrind-De Jong E, Westbroek P. Mucins and molluscan calcification: molecular characterization of mucoperlin, a novel acidic mucin-like protein of the nacreous shell-layer of the fan mussel *Pinna nobilis* (Bivalvia, Pteriomorpha). *J Biol Chem* 2000;275:20667–75.
- [23] Puverel S, Tambutté E, Zoccola D, Domart-Coulon I, Bouchot A, Lotto S, et al. Antibodies against the organic matrix in scleractinians: a new tool to study coral biomineralization. *Coral Reefs* 2005;24: 149–56.
- [24] Marin F, Amons R, Guichard N, Stigter M, Hecker A, Luquet G, et al. Caspartin and calprismin, two proteins of the shell calcitic prisms of the Mediterranean fan mussel *Pinna nobilis*. *J Biol Chem* 2005;280: 33895–908.
- [25] Standing KG. Peptide and protein *de novo* sequencing by mass spectrometry. *Curr Opin Struct Biol* 2003;13:595–601.
- [26] Robinson JM, Takizawa T, Vandrè DD, Burry RW. Ultrasmall immunogold particles: important probes for immunocytochemistry. *Microsc Res Tech* 1998;42:13–23.
- [27] Taylor JD, Kennedy WJ, Hall A. The shell structure and mineralogy of the Bivalvia. Introduction. *Nuculacea—Trigonacea*. *Bull Brit Mus (Nat Hist)* 1969; (Suppl. 3): 1–125.
- [28] Dauphin Y. Comparison of the soluble matrices of the calcitic prismatic layer of *Pinna nobilis* (Mollusca, Bivalvia, Pteriomorpha). *Comp Biochem Physiol* 2003;A132:577–90.
- [29] Gottliv BA, Kessler N, Sumerel JL, Morse DE, Tuross N, Addadi L, et al. Asp-rich: a novel aspartic acid-rich protein family from the prismatic shell matrix of the bivalve *Atrina rigida*. *ChemBioChem* 2005;6:304–14.
- [30] Shen X, Belcher AM, Hansma PK, Stucky GD, Morse DE. Molecular cloning and characterization of lustrin A, a matrix protein from the shell and pearl nacre of *Halotis rufescens*. *J Biol Chem* 1997;272:32472–81.
- [31] Sikes CS, Yeung ML, Wheeler AP. Inhibition of calcium carbonate and phosphate crystallization by peptides enriched in aspartic acid and phosphoserine. In: Sikes CS, Wheeler AP, editors. *Surface reactive peptides and polymers*. Washington: American Chemical Society; 1991. p. 50–71.
- [32] Hermann R, Walther P, Müller M. Immunogold labeling in scanning electron microscopy. *Histochem Cell Biol* 1996;106:31–9.
- [33] Odendal M, Brady K, McDonald F. The localization of estrogen receptors on human osteoblasts: a preliminary optical and electron microscopic technique. *Cell Biochem Biophys* 2004;40:237–48.
- [34] Park K, Simmons SR, Albrecht RM. Surface characterization of biomaterials by immunogold staining—quantitative analysis. *Scann Microsc* 1987;1:339–50.
- [35] Sammons R, Marquis P. Application of the low vacuum scanning electron microscope to the study of biomaterials and mammalian cells. *Biomaterials* 1997;18:81–6.
- [36] Nudelman F, Gottliv BA, Addadi L, Weiner S. Mollusk shell formation: mapping the distribution of organic matrix components underlying a single aragonitic tablet in nacre. *J Struct Biol* 2006;153: 176–87.
- [37] Cho JW, Partin JS, Lennarz WJ. A technique for detecting matrix proteins in the crystalline spicule of the sea urchin embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:1282–6.
- [38] Ameye L, De Becker G, Killian C, Wilt F, Kemps R, Kuypers S, et al. Proteins and saccharides of the sea urchin organic matrix of mineralization: characterization and localization in the spine skeleton. *J Struct Biol* 2001;134:56–66.
- [39] Seto J, Zhang Y, Hamilton P, Wilt F. The localization of occluded matrix proteins in calcareous spicules of sea urchin larvae. *J Struct Biol* 2004;148:123–30.
- [40] Crenshaw MA. The soluble matrix from *Mercenaria mercenaria* shell. *Biomineralization* 1972;6:6–11.
- [41] Pokroy B, Fitch AN, Marin F, Kapon M, Adir N, Zolotoyabko E. Anisotropic lattice distortions in biogenic calcite induced by intracrystalline organic molecules. *J Struct Biol* 2006;155:96–103.
- [42] Checa AG, Rodriguez-Navarro AB, Esteban-Delgado FJ. The nature and formation of calcitic columnar prismatic shell layers in pteriomorphian bivalves. *Biomaterials* 2005;26:6404–14.



## VI. DE LA NACRE : CONSIDERATIONS MACRO-EVOLUTIVES

### VI. 1. Introduction

- a. Une définition de la nacre
- b. Les données anciennes sur la nacre
- c. Les données récentes sur la nacre

### VI.2. Nacre chez les mollusques : origine, répartition et tendances évolutives

- a. Répartition de la nacre chez les mollusques conchifères
- b. Origine de la nacre et tendances évolutives
- c. La problématique de l'évolution de la nacre

### VI.3. Nos modèles d'étude –Résultats

- a. Modèle *Unio pictorum*
- b. Modèle *Nautilus macromphalus*
- c. Approche protéomique
- d. Matrice de nacre d'*Unio pictorum*
- e. Matrice de nacre de *Nautilus macromphalus*

### VI.4. Origine et évolution de la nacre : quelques remarques

- a. Sur la structure de la matrice de nacre
- b. Sur l'évolution de la matrice de nacre
- c. Références bibliographiques

### VI.5. Illustration de la recherche par quelques articles

- a. Article Marie *et al.*, *FEBS J.*, 2007
- b. Article Marie *et al.*, *ChemBioChem*, 2008
- c. Article Marie *et al.*, *ChemBioChem*, 2009 (version non corrigée)
- d. Article Marie *et al.*, *MRS Spring Meeting 2009*

## VI.1. INTRODUCTION

De nos jours, il est devenu trivial de considérer que les grandes innovations biologiques sont en permanence recyclées, autrement dit, que l'Évolution se fait selon le principe de parcimonie. Le monde vivant fourmille d'exemples qui suivent cet axiome de base. D'une certaine manière, la nacre pourrait constituer l'un de ces exemples.

Pour toutes sortes de raisons, exposées ci-après, la nacre des mollusques est un modèle particulièrement intéressant pour étudier l'origine des biominéralisations carbonatées. Apparue dès le Cambrien, c'est une microstructure pérenne, qui a subsisté jusqu'à aujourd'hui. C'est une texture coquillière extrêmement solide, dont l'apparition a dû créer un avantage évolutif indéniable aux mollusques, en termes de protection contre des chocs mécaniques ou contre la prédation. Nous plaçant dans une perspective macro-évolutive, nous avons initié une recherche sur la nacre dans le cadre de la thèse de Benjamin Marie.

### a. Une définition de la nacre

La nacre correspond à une microstructure très précisément décrite. On lui associe un certain nombre de critères d'identification:

- La nacre est une microstructure quasi-exclusive des mollusques, à l'inverse des structures prismatiques, largement répandues dans le monde de la biominéralisation (brachiopodes, mollusques, coquille d'œuf). Notons cependant qu'il existe des bryozoaires appartenant aux sous-ordres Tubuliporina et Articulata, qui possèdent un exosquelette calcitique dont la microstructure n'est pas sans rappeler celle de la nacre (Weedon & Taylor, 1995). De plus, certains brachiopodes craniiformes, tels *Novocrania*, possèdent une couche dite de « semi-nacre » (Checa *et al.*, 2009).
- La nacre est par définition une microstructure toujours aragonitique. L'aragonite étant le polymorphe métastable du carbonate de calcium, la nacre n'est elle-même pas très stable : sauf exception, elle s'altère rapidement.
- La couche nacrée correspond toujours à la couche coquillière la plus interne. Elle est d'ailleurs le plus souvent associée à une couche externe dite 'prismatique', *sensu lato*.
- L'unité microstructurale de base de la nacre est la tablette : c'est une structure cristalline, dont l'apparence est celle d'un monocristal (sans en être pour autant un, nous verrons plus loin pourquoi) très aplati, d'épaisseur voisine du demi-micron (+/- 150 nm) pour une longueur dépassant plusieurs micromètres (jusqu'à plus de 10 µm), selon les deux autres dimensions. Les tablettes peuvent être polygonales (le plus souvent hexagonales), rectangulaires ou arrondies. Chaque tablette est entourée d'une fine enveloppe organique, d'épaisseur environ 20 nm.
- Les tablettes sont déposées « à plat », c'est à dire à peu près parallèlement à l'épithélium producteur, quelle que soit la zone de la coquille concernée (crochet ou bordure palléale).
- Les tablettes sont agencées principalement selon deux modes, décrits dans la figure ci-dessous. Selon un premier mode, les tablettes superposées sont agencées en quinconce, en « mur de brique », les enveloppes organiques constituant le ciment de ce mur. Ce sont les fameuses « sheet nacre » des auteurs anglo-saxons (Erben, 1972 ; Nakahara, 1991). Sont construites sur ce mode la plupart des nacres de bivalves (*Pinna nobilis* excepté). Selon un second mode, les tablettes superposées sont alignées l'une par rapport à l'autre en colonnes. On parle alors de nacre colonnaire, ou de « columnar nacre ». Ce second type de nacre correspond à celle des gastéropodes, l'ormeau par exemple (Erben, 1972). On la rencontre aussi chez le nautilus.

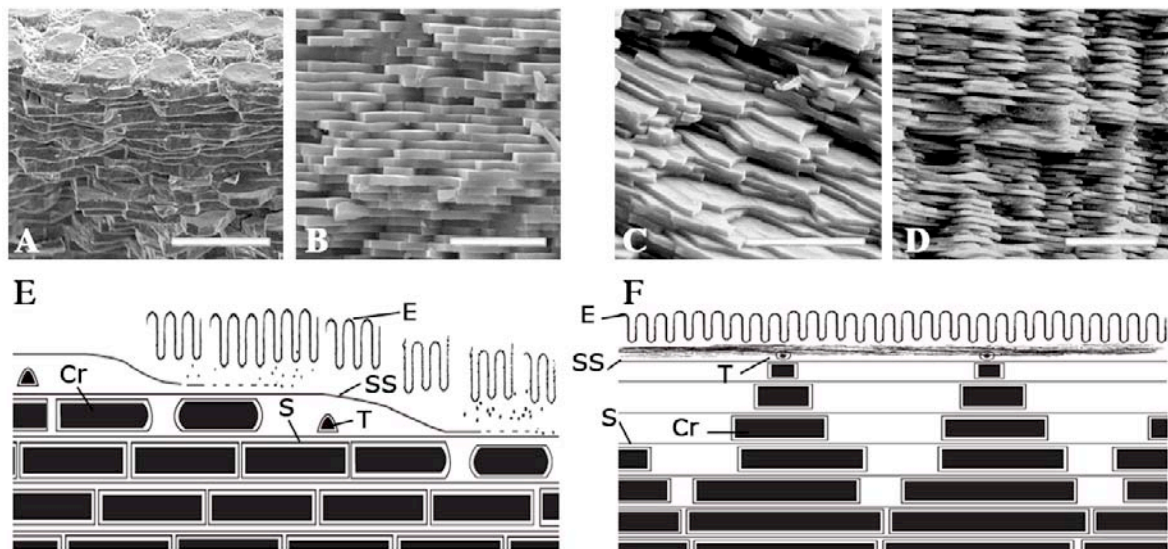


Fig. 13. Structure simplifiée des deux grands types de nacres trouvées chez les mollusques (Marin *et al.*, 2008). A gauche, nacre en mur de brique, typique de la plupart des bivalves. A, B : nacre de *Unio pictorum*. A droite nacre colonnaire des gastéropodes. C, D : nacre de *Haliotis tuberculata*. E et F ont été redessinés d'après Nakahara (1991). E : épithélium calcifiant. SS : nouveau film organique en formation. S : matrice interlamellaire. T : nouvelle tablette. Cr : « cristaux » en croissance.

### **b. Les données anciennes sur la nacre**

Je rappellerai simplement que la nacre a donné lieu à un nombre important d'études microstructurales et biochimiques, notamment dans les années 60, 70 et 80 (Grégoire, 1972 ; Lowenstam and Weiner, 1989). Je mentionne brièvement quelques observations générales d'importance.

La matrice insoluble de la nacre est composée de complexes chitino-protéiques très fortement insolubles. La fraction protéique insoluble est enrichie en glycine et alanine, caractère qui n'est pas sans rappeler la fibroïne de la soie des araignées (« silk-fibroin like proteins »). La matrice insoluble est supposée entourer les tablettes. Elle se compose d'une matrice inter-tablettaire, située sur le pourtour des tablettes, et d'une matrice inter-lamellaire, au dessous et au dessus de chaque tablette. Nakahara (1991), auteur d'une remarquable étude en microscopie électronique à transmission, a montré que ces deux matrices ne sont pas homogènes, mais que chacune d'elles est constituée d'au moins deux couches, plus ou moins denses aux électrons.

Il existe aussi une fraction organique soluble associée à la nacre, qui est enrichie en acide aspartique. Cette matrice « intracristalline » n'a cependant pas les propriétés d'extrême acidité que l'on retrouve dans les prismes calcitiques (Marin, 1992).

Les tablettes de nacre ne sont pas des cristaux homogènes : Crenshaw et Ristedt (1975), dans une étude ultrastructurale fascinante, observèrent la présence de composés organiques « intra-tabletaires ». Ils mirent en évidence une zonation des tablettes. La partie centrale est enrichie en polysaccharides sulfatés. Ces macromolécules sont censées agir comme nucléateurs de la croissance cristalline. Par ailleurs, Mutvei (1979) fit un constat analogue, puisqu'il observa la présence de sous-structures concentriques sur des tablettes préalablement découpées et fixées à un mélange glutaraldéhyde/acide acétique. Il mit également en évidence une sectorisation des tablettes, qui n'est pas sans rappeler un phénomène de maillage.

Dans le modèle de nacre proposé par Bevelander et Nakahara (1969), les protéines insolubles forment une armature en trois dimensions, dans laquelle les cristaux de nacre

croissent de manière passive. Avec l'apport de Weiner et Hood (1975), de Wheeler *et al.* (1981), et de Addadi *et al.* (1987), le modèle s'enrichit d'une matrice soluble acide nucléante riche en acide aspartique. Cette matrice repose sur la matrice hydrophobe insoluble. La matrice soluble acide peut être liée de manière covalente à des sucres sulfatés, dont le rôle serait de concentrer les ions calcium à proximité des points de nucléation. La matrice soluble joue aussi un rôle inhibiteur. Pour résumer, les cristaux de nacre poussent sur une semelle de protéines solubles acides, elle-même fixée sur une matrice insoluble hydrophobe, qui repose sur une armature en chitine. C'est un modèle en sandwich. Lorsque la tablette a fini de croître, elle est scellée par une nouvelle couche organique insoluble. Et le processus est répété un grand nombre de fois. Ainsi décrit, le processus de croissance cristalline s'apparente à de l'hétéro-épitaxie.

### **c. Les données récentes sur la nacre**

Avec l'emploi récent de techniques physiques d'analyse, telles que l'AFM ou le cryo-TEM, cette vision simple, pour ne pas dire simpliste, a été mise à mal.

Des observations de nacre colonnaire d'ormeau ont mis en évidence la présence de nano-pores, de diamètre compris entre 5 et 50 nm, au niveau de la matrice inter-lamellaire. Cette découverte d'importance suggère clairement qu'il existe une continuité minérale verticale entre tablettes d'une même colonne, d'où la question clairement posée par Schäffer *et al.* (1997) : la croissance des tablettes de nacre s'effectue-t-elle par hétéro-épitaxie ou par ponts minéraux ? Plus récemment, Song *et al.* (2003) ont estimé que l'interface entre tablettes superposées pouvait recéler entre 1400 et 1900 de ces ponts minéraux par tablette de nacre. Il est intéressant de constater que la découverte des ponts minéraux n'est pas tout à fait nouvelle : Mutvei (1969), puis Nakahara (1991) avaient déjà observé la présence de trous dans la matrice inter-lamellaire. A l'époque, ils en avaient déduit que ces trous facilitaient la diffusion des précurseurs minéraux pour le remplissage des compartiments. A ce jour, il est difficile de dire si la présence de pores dans la matrice inter-lamellaire représente un cas particulier, ou bien si elle ne correspond qu'aux nacres colonnaires, ou bien si elle peut être généralisée à toutes les nacres. De même, la fonction des pores n'est pas clarifiée : simples trous pour la diffusion des constituants minéraux et organiques ou réels ponts minéraux ?

Les observations de nacre du bivalve *Atrina* (un genre voisin de *Pinna*) par cryo-TEM, en mode hydraté, réalisées par Levi-Kalishman *et al.* (2001) ont amené à repenser complètement le modèle de minéralisation de la nacre. Dans ce modèle, les changements d'importance sont les suivants :

- La chitine, et la chitine seule, est le polymère qui donne l'armature solide et souple à la fois. C'est la chitine qui dicte l'orientation des cristaux.

- Les protéines hydrophobes insolubles sont sécrétées sous forme de gel désordonné, qui contient çà et là des « clusters » de protéines acides solubles.

- La phase minérale se structure dans ce gel hétérogène : il s'agit en premier lieu d'une phase amorphe très transitoire qui se réorganise en une phase cristalline.

Plus récemment, Nudelman *et al.* (2006) ont localisé des groupements réactifs à la surface de tablettes de nacre, chez le nautilus *Nautilus pompilius* et chez le bivalve *Atrina rigida*. Chez le nautilus, ils observent ainsi 4 zones concentriques : une zone centrale riche en groupement carboxylate (nucléation) ; juste sur le pourtour de cette zone, un fin anneau riche en groupements sulfates, une zone intermédiaire contenant des groupements carboxylate, puis, à la périphérie, la matrice inter-tabulaire riche en carboxylates et sulfates. Chez *Atrina*, la zonation de chaque tablette est beaucoup moins marquée : sont mises en évidence une zone

centrale de nucléation ainsi que la matrice inter-tablettaire périphérique. La zone centrale reste mal définie au niveau des groupements chimiques qui la constituent.

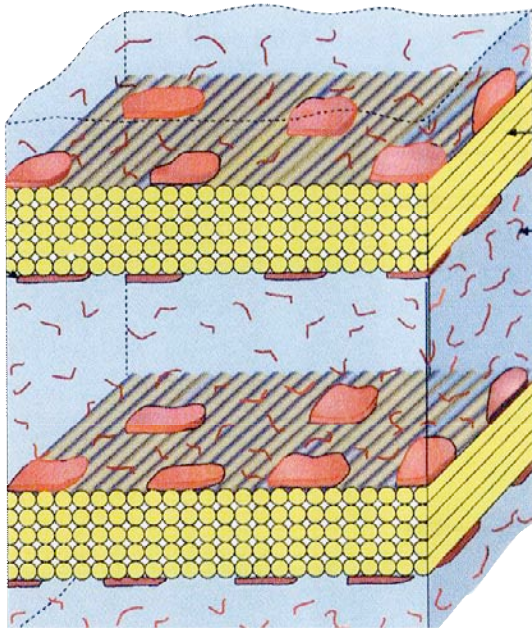


Fig. 14. Modèle topographique et structurel de la matrice de nacre (Levi-Kalisman *et al.*, 2001). Les baguettes jaunes symbolisent les fibres de  $\beta$ -chitine, les zones bleues, les protéines hydrophobes désordonnées formant un gel. En rouge sont figurées les protéines acides nucléantes, soit dispersées dans le gel (fins traits rouges), soit formant des « clusters » (surfaces rouges) à l'interface entre la chitine et le gel. Les tablettes de nacre seraient nucléées dans le gel.

C'est à peu près à la même période que, synthétisant les résultats acquis depuis le début des années 2000, Addadi *et al.* (2006) présentent la formation de la nacre selon 4 étapes temporelles hypothétiques:

- Assemblage de la matrice : la chitine, sécrétée dans l'espace extrapalléal, s'auto-organise en un réseau tridimensionnel, tandis que l'espace compris entre les feuillets de chitine se remplit d'un gel de protéines hydrophobes contenant aussi les agents nucléants, les protéines acides.
- La première phase minérale formée est amorphe. Les minéraux amorphes pourraient être amenés par des vésicules, dans un environnement hydrophobe (bicouche lipidique), qui stabiliserait très transitoirement la phase amorphe.
- Nucléation des tablettes d'aragonite. Les « clusters » de groupements acides constitueraient les points où la nucléation cristalline s'opère, à partir des nanominéraux amorphes.
- Croissance des tablettes : ces dernières croîtraient tout d'abord verticalement, jusqu'à atteindre la couche supérieure de chitine, puis latéralement. Pour chaque tablette, c'est une croissance centrifuge, depuis le centre de nucléation vers la périphérie. La croissance latérale s'accompagne de l'expulsion du gel hydrophobe « hors » du minéral. Lorsque les tablettes voisines entrent en confluence, ce gel polymérise pour donner la matrice fortement insoluble telle que l'on peut l'extraire sur des coquilles matures.

L'intérêt de ce modèle dynamique est qu'il offre un cadre dans lequel les différentes étapes de la formation des tablettes peuvent être testées, moyennant quelques efforts techniques.

D'autres données d'importance sont venues à la fois compléter ce modèle, mais aussi y ajouter de la complexité : Nassif *et al.* (2005) ont montré que chez l'ormeau, les tablettes de nacre sont entourées d'un fin liséré de carbonate de calcium amorphe, d'épaisseur d'environ 3 à 5 nm. Jusqu'à cette publication, nul n'avait vu cette couche. Elle pourrait témoigner de

l'existence de la phase transitoire amorphe précédant la cristallisation. La stabilisation de cette couche amorphe pourrait être envisagée de la façon suivante : lors de l'expansion latérale des tablettes de nacre, des « impuretés » ioniques et organiques migrent dans le front hydrophobe. Lorsque les tablettes entrent en confluence, les concentrations en « impuretés » sont suffisantes pour stabiliser la phase amorphe en inhibant la cristallisation de l'aragonite.

La nano-structure des tablettes a également été partiellement dévoilée : Comme il a été remarqué dans le paragraphe précédent, les tablettes ne sont pas des cristaux homogènes, en dépit de leur caractère monocristallin. Cölfen (2007) parle de mésocristaux pour désigner de tels objets, qui résultent de l'aggrégation orientée de nano-cristaux, qui, par « soudure » les uns avec les autres, ressemblent à des monocristaux. En observant de la nacre d'huître perlière par microscope électronique à balayage et/ou à transmission à émission de champ (respectivement FESEM et FETEM), Oaki et Imai (2005) mettent en évidence que chaque tablette est elle-même constituée de nano-tablettes ou nano-blocs de 30 à 180 nm de long, pour une épaisseur inférieure à 100 nm. La nano-structure laminée de chaque tablette de nacre a également été mise en évidence par Rousseau et al. (2005). Leur étude montre que les nano-grains constitutifs des tablettes sont entourés d'une matrice organique formant un réseau continu, dont l'aspect bulleux évoque une émulsion. Lorsque les nano-grains se soudent, cette matrice est piégée. C'est la fameuse matrice intracristalline décrite par Mutvei (1979). Très récemment, Rousseau *et al.* (2009) ont mis en évidence, par NanoSims, des structures annulaires organiques très temporaires autour des tablettes de nacre en formation et à l'interface entre ces tablettes et le manteau, ce dernier présentant lui-même des impressions annulaires. La signification de ces structures est encore énigmatique, mais elle suggère néanmoins qu'il y a un contact étroit entre l'épithélium producteur et les tablettes en croissance, ce qui montre indirectement que la notion d'espace extrapalléal serait sans aucun doute à revoir.

Pour conclure sur les aspects structuraux du modèle « nacre », nos connaissances ont considérablement progressé en une décennie, et ceci, grâce à la technologie plus qu'à de nouveaux concepts fondateurs. L'image dynamique qui émerge de ce qui est décrit ci-dessus est à la fois assez précise, mais en même temps quelque peu brouillée : selon le niveau d'analyse choisi, selon la technique utilisée, l'image semble à chaque fois différente, en particulier en ce qui concerne les aspects nano-structuraux de la nacre. A l'avenir, un des grands défis sera de comprendre, étape par étape, la succession des évènements sécrétoires, permettant de passer d'un liquide précurseur à une phase minérale solide structurée à plusieurs échelles d'observation.

## VI.2. NACRE CHEZ LES MOLLUSQUES : ORIGINE, REPARTITION, ET TENDANCES EVOLUTIVES

### a. Répartition de la nacre chez les mollusques conchifères

Un des aspects qui rend la nacre fascinante concerne sa répartition au sein du phylum Mollusca (Fig. 15).

La nacre est restreinte aux mollusques conchifères, où elle est présente dans 4 classes sur 5. Seuls, les scaphopodes ne présentent pas de couche nacrée. Leur coquille, constituée de deux ou trois couches présentent des combinaisons de microstructures prismatiques, lamellaires croisées, lamellaires croisées complexes ou homogènes (Carter and Hall, 1990 ; Reynolds and Okusu, 1999).

Chez les monoplacophores, du fait de la rareté des spécimens, la nacre a été étudiée dans un nombre limité de publications : Schmidt (1959), Erben *et al.* (1968), Meenakshi *et al.* (1970), et plus récemment, Cruz *et al.* (2003). Ces derniers auteurs parlent de « nacre en terrasse », tandis que Meenakshi *et al.* (1970) décrivent une « nacre en mur de brique ». Dans un article très récent, Checa *et al.* (2009) montrent que la plupart des microstructures identifiées comme de la nacre chez les monoplacophores vivants sont en fait de l'aragonite foliée, et que, malgré la ressemblance, le processus de formation est différent, ainsi que les caractéristiques cristallographiques. Seul, le genre *Veleropilina*, présente une vraie nacre. Selon ces auteurs, ce serait à ce jour la seule preuve de l'existence de nacre véritable chez des formes vivantes appartenant à la classe des monoplacophores.

Chez les bivalves, la nacre présente une répartition éclatée entre 4 sous-classes bien distinctes : les paléotaxodontes (nucules), habituellement considérés comme les plus primitifs des bivalves, le vaste ensemble des ptériomorphes, les paléohétérodontes, et finalement, les anomalodesmata (Taylor *et al.*, 1969 ; Taylor *et al.*, 1973). En revanche, la nacre est totalement absente de la coquille des hétérodontes, qui, actuellement, représente le groupe le plus diversifié par le nombre d'espèces. Il faut noter que chez les ptériomorphes, la nacre n'est présente que chez les formes dites nacro-prismatiques : elle est en effet absente chez les arcoïdes (*Arca*, *Barbatia*) qui présentent toujours une couche interne lamellaire-croisée complexe, ainsi que chez les ostréides (*Ostrea*, *Crassostrea*), dont la couche interne est en calcite foliée. Le cas des paléohétérodontes est intéressant, car tous les membres de cette petite sous-classe sont sans exception nacro-prismatiques, avec une couche externe aragonitique prismatique. Ainsi, les paléohétérodontes présentent à la fois des caractères ancestraux (présence de nacre) et dérivés (charnière), qui les placent à la jonction entre les deux grandes unités que sont les ptériomorphes d'une part, et les hétérodontes, d'autre part.

Chez les gastéropodes, la répartition de la nacre est beaucoup plus restreinte. Cependant, étant donné la complexité de la phylogénie des gastéropodes et ses changements récents (Aktipis *et al.*, 2008), il est difficile de dégager une vue d'ensemble claire. Aussi, je me baserai sur la phylogénie proposée par Ponder et Lindberg (1996), construite à partir d'une matrice de 95 caractères morphologiques, codés de 0 à 4. Dans cette phylogénie consensuelle, ces auteurs distinguent quatre super-ordres (ou sous-classes) : les patellogastéropodes (patelles), correspondant aux formes les plus primitives, les vétiogastéropodes, comprenant entre autres les fissurelles, les ormeaux et les troches, les caenogastéropodes, qui regroupent les cônes, les littorines, les cérithes et enfin, les hétérobranches, qui englobent en particulier toutes les formes pulmonées terrestres. Deux autres taxons mineurs, néritopsines et cocculinidés, complètent la phylogénie. Caenogastéropodes et hétérobranches forment deux groupes-frères, et l'ensemble, additionné

des néritopsines (ou néritinomorphes) et cocculinidés, constitue le groupe-frère des véligastéropodes. Les patellogastéropodes ont une position basale. Dans cette phylogénie, les gastéropodes nacrés appartiennent tous aux véligastéropodes et à eux seuls (Geiger *et al.*, 2008). Dans l'ancienne phylogénie de Thiele (1929-1931), les gastéropodes nacrés étaient rassemblés au sein du taxon paraphylétique des archéogastéropodes.

Enfin, chez les céphalopodes actuels, la nacre est restreinte à l'ordre des nautilidés, représentée par le nautilite. Les coléoides, qui représentent le second ordre de céphalopodes ayant des représentants vivants, ne forment pas de nacre. En particulier, les formes à coquille minéralisée externe (femelles argonautes) ou interne (seiche, spirule) sécrètent des microstructures très différentes, calcitique prismatique et sphérulithique pour les unes, prismatiques et lamello-fibrillaire pour les autres (Bandel, 1990). Il faut noter cependant que les céphalopodes actuels forment une classe beaucoup moins diversifiée que par le passé, au niveau ordinal (Nishiguchi and Mapes, 2008). De très nombreuses formes éteintes, dont la plupart des ammonoides, sécrétaient une couche coquillière interne faite de vraie nacre (Bandel, 1990), certaines formes bien connues des collectionneurs, telle *Baculites* du Crétacé Supérieur, ayant conservé une couche nacrée irisée.

### **b. Origine de la nacre et tendances évolutives majeures**

Comme je le soulignais dans l'introduction de ce chapitre, la nacre figure parmi les microstructures coquillières les plus anciennes puisqu'elle – ou quelque chose de ressemblant – est présente dès le début de la minéralisation. Des genres comme *Pojetaia runnegari*, *Mellopegma georginensis* ou *Fordilla troyensis*, tous du Cambrien Inférieur, semblent avoir possédé une couche interne nacrée (Feng and Sun, 2003). Les microstructures des mollusques Cambriens ont été étudiées par Runnegar (1983, 1985), Runnegar and Pojeta (1992), Bengtson *et al.* (1990), et, plus récemment, par Kouchinsky (2000) et par Feng et Sun (2003). Kouchinsky (2000) évoque l'hypothèse que la nacre aurait pu évoluer à partir de structures lamellaires aragonitiques. Feng et Sun (2003) dressent un tableau très complet de toutes les microstructures coquillières de mollusques avérés, observées dans le Cambrien Inférieur. Analysant les microstructures très bien préservées des dépôts phosphatés chinois, ces auteurs montrent que les microstructures de type lamello-fibrillaire précèdent dans le temps (de quelques millions d'années) les microstructures nacrées ou foliées. On peut logiquement penser que la microstructure « nacre » a été une innovation d'importance, notamment sur le plan mécanique, et qu'elle a conféré un avantage évolutif indéniable, surtout dans le contexte de prédation active qui marque « l'explosion Cambrienne ».

La présence de nacre au sein des coquilles est souvent considérée comme un caractère plésiomorphe (Taylor, 1973 ; Haas, 1981 ; Carter and Clark 1985 ; Geiger *et al.*, 2008 ; Checa, 2009), au même titre que les microstructures prismatiques simples qui leur sont souvent associées, chez les bivalves ptériomorphes et paléohétérodontes, les gastéropodes haliotidés, ou les céphalopodes nautilidés. L'idée que la nacre représente une microstructure ancestrale s'accorde avec le fait que, dans les trois plus importantes classes de mollusques nacrés, ce sont toujours les formes considérées comme les plus primitives qui possèdent une couche nacrée : les nucules chez les bivalves, les ormeaux chez les gastéropodes, les nautilites chez les céphalopodes.

Depuis l'Ordovicien, la nacre a un enregistrement fossile à peu près continu (Taylor *et al.*, 1973). Cependant, sur tout le Phanérozoïque, la tendance évolutive majeure a été vers la diminution de la proportion de mollusques nacrés, toutes classes confondues. C'est vrai pour les bivalves, qui ont connu une radiation Mésozoïque des ptériomorphes à microstructure en calcite foliée (huîtres), suivie d'une radiation Cénozoïque des hétérodontes, à microstructure



lamellaire croisée, à tel point que ces dernières forment le groupe dominant actuel (Taylor *et al.*, 1973). C'est encore vrai pour les gastéropodes, qui ont connu plusieurs phases de radiations des caenogastéropodes et des hétérobranchés (cf. Ponder and Lindberg, Ed., « Phylogeny and Evolution of the Mollusca », 2008). C'est enfin vrai pour les céphalopodes, dont les formes nacrées ammonoïdes ont été décimées lors de la crise K/T, et qui en outre ont vu une internalisation de leur coquille, voire une disparition complète, chez les coléoides.

La diminution de la proportion de mollusques nacrés au cours du Phanérozoïque peut paraître curieuse dans la mesure où la nacre est de loin la microstructure la plus solide, donc, celle qui devrait normalement être favorisée, notamment chez les formes benthiques fixées sujettes à une prédation active. Cette tendance générale peut trouver une explication en terme de coût énergétique. Dans deux articles, passés largement inaperçus, Palmer (1983 ; 1992) a calculé le coût physiologique de la fabrication d'une coquille chez divers mollusques. Selon lui, le coût le plus important correspond à la synthèse de la matrice organique, et non pas, au dépôt de carbonate de calcium proprement dit. Une des conclusions de ses travaux est que les formes qui utilisent beaucoup de matrices organiques pour minéraliser leur coquille sont désavantagées. Or, il se trouve que la nacre est la microstructure qui consomme le plus de matrice organique : chez l'ormeau, cette matrice représente environ 4% du poids de la coquille ; la valeur est à peu près identique chez le nautilus. Ces matrices sont à 80-90% insolubles, c'est à dire qu'elles ont subi un tannage quinonique, ou bien une polymérisation, ou bien l'action de transglutaminases. A l'opposé, les microstructures lamellaires croisées, relativement solides mécaniquement du fait de l'entrecroisement de lamelles de 1<sup>er</sup>, 2<sup>nd</sup> et 3<sup>ème</sup> ordre (Shimamoto, 1986), se remarquent par de faibles teneurs en matrices organiques (0,1 à 0,5%) et cette matrice est surtout soluble, donc plus économique à produire, car elle ne nécessite pas les modifications moléculaires mentionnées ci-dessus. On peut donc envisager une grande différence de coût énergétique pour produire de la nacre d'une part, et une microstructure lamellaire croisée d'autre part. L'avantage mécanique conféré par la nacre pourrait ainsi avoir été largement contrebalancé par un inconvénient majeur, son coût énergétique élevé. Ainsi, des microstructures lamellaires croisées, bien que moins solides, mais beaucoup moins coûteuses, pourraient avoir été favorisées.

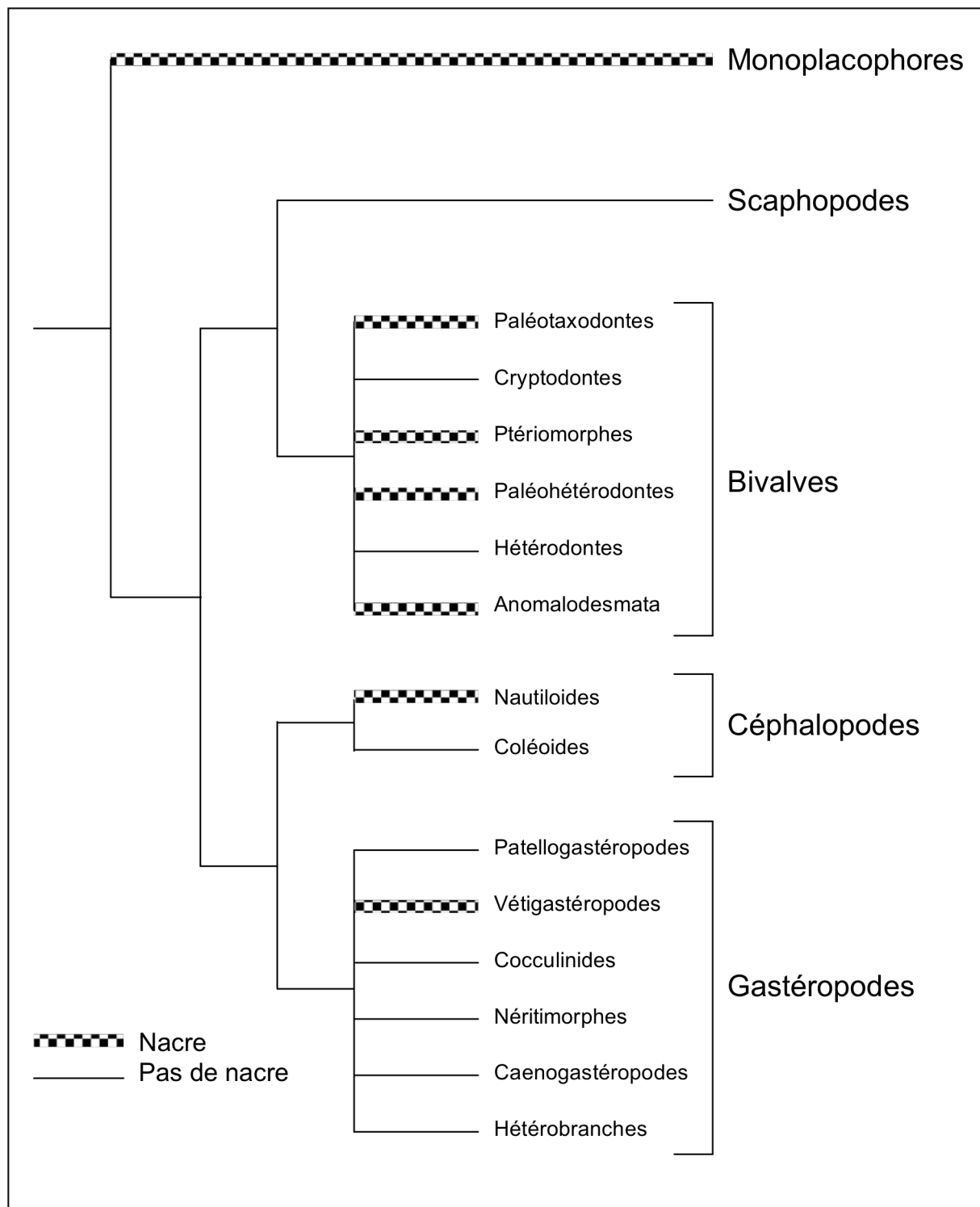


Fig. 15. Répartition de la microstructure nacré au sein des mollusques conchifères actuels. Pour les relations inter-classes, nous avons adopté le point de vue de Lecoindre et Le Guyader (2001). Pour des raisons de clarté, les formes éteintes nacrées ne sont pas figurées, notamment chez les céphalopodes (Ammonoïdes). Pour les bivalves, les céphalopodes et les gastéropodes, les sous-classes sont indiquées. Concernant les bivalves, les anciennes terminologies de Taylor *et al.*, toujours très usitées, (1969, 1973) ont été conservées. Pour les gastéropodes, nous avons suivi les dénominations de Aktipis *et al.* (2008).

### c. La problématique de l'évolution de la nacre

La nacre étant présente dans 4 classes de mollusques conchifères, on peut se demander si, d'un groupe à l'autre, elle a été inventée de manière indépendante, ou bien si elle dérive d'une nacre ancestrale commune, de type monoplacophore par exemple. L'étude cristallographique et cladistique réalisée par Chateigner *et al.* (2000) sur les coquilles de mollusques semble montrer que les nacres des céphalopodes et des gastéropodes sont deux acquisitions indépendantes. Ce point de vue est fortement contesté par Fryda *et al.* (2004 ; 2008) selon lesquels les nacres de céphalopodes et de gastéropodes sont homologues, et dérivent d'un ancêtre commun.

Les critères minéralogiques ou ultrastructuraux ne sont sans doute pas suffisants pour résoudre une telle question. Il faut se tourner vers d'autres marqueurs, en particulier les constituants macromoléculaires de la matrice de nacre. La question de l'origine et de l'évolution de la nacre peut donc être reformulée comme suit : les constituants macromoléculaires qui « fabriquent » la nacre sont-ils les mêmes d'un groupe à l'autre ? Les mollusques utilisent-ils tous la même boîte à outils moléculaires pour « synthétiser » la nacre ? Quelles sont les contraintes évolutives exercées sur les constituants macromoléculaires qui façonnent la nacre ?

A première vue, et de manière intuitive, il paraît hautement concevable que les protéines qui contrôlent la mise en place de la microstructure « nacre » soient très contraintes évolutivement, du fait de la pérennité de la microstructure à travers le Phanérozoïque. L'analogie avec les collagènes est tentante... et sans doute trop simplement directe. Les collagènes ont été « inventés » très tôt, quelque part dans le Protérozoïque (Exposito *et al.*, 2002). Il est généralement admis qu'ils marquent le monde des métazoaires, c'est à dire le passage à l'état pluricellulaire (Exposito *et al.*, 2002). C'est une superfamille de protéine, dont la structure en triple hélice de sa partie centrale découle directement de la structure primaire de chaque monomère, en particulier, de l'existence d'un motif typique, le triplet G-X-Y (ou X est très souvent un résidu proline), qui se répète un grand nombre de fois dans le domaine central. Bien que les collagènes aient largement divergé à partir d'un ancêtre commun, tous ont gardé cette signature particulière, que l'on peut considérer comme une véritable « contrainte évolutive ».

En ce qui concerne les protéines de nacre, la problématique est un peu plus complexe, puisque l'on adresse non pas à une famille de protéines, mais à plusieurs, aux contours encore très mal définis.

Un bref examen des séquences de protéines déjà connues identifiées dans les nacres d'ormeau (*Haliotis rufescens*, *H. laevigata*) et d'huître perlière (*Pinctada maxima*, *P. fucata*, *P. margaritifera*) donne déjà quelques indications qui vont à l'encontre de notre intuition de départ (Marin *et al.*, 2008). En effet, pour l'huître perlière, les protéines associées à la nacre sont le groupe des N14/N16/Perline, la MSI60, le groupe nacréine/N66, plus un certain nombre de protéines associées aux prismes calcitiques, mais dont l'absence dans la nacre n'a pas été certifiée. Pour l'ormeau, le cortège de protéines nacrères est représenté par la lustrine A, la perlustrine, la perluscine, la perwapine, la perlinhibine, la perlbikunine, AP7, AP24. Premier constat : ces protéines sont différentes entre ces deux espèces et rien dans leurs séquences respectives n'indique qu'elles puissent dériver d'un ancêtre commun. Pour le moment, le seul point commun que l'on peut trouver entre protéines nacrères de gastéropodes et de bivalves sont les nacréines, puisqu'une nacréine a été identifiée chez *Turbo marmoratus* (Miyamoto *et al.*, 2003).

Dans le contexte d'une connaissance très fragmentaire, nous avons voulu amener d'autres points de comparaison, en introduisant de nouveaux modèles d'étude, la moule d'eau douce *Unio pictorum*, et le nautilus, *Nautilus macromphalus*.

## VI.3. NOS MODELES D'ETUDE – RESULTATS

### a. Modèle *Unio pictorum*

*Unio pictorum* est un bivalve paléohétérodonte appartenant à l'ordre des unionidés. C'est un bivalve très commun des cours d'eau bourguignons, où il vit enfoui verticalement dans le sédiment. Sa coquille mesure 50 à 80 mm. Sa forme fuselée, son périostracum olivâtre vernissé permettent de le distinguer des espèces voisines que sont *Unio mancus*, *Unio crassus* ou *Unio tumidus*. A l'instar de tous les bivalves paléohétérodontes, *Unio pictorum* élabore une coquille à microstructure nacro-prismatique entièrement aragonitique, un critère qui différencie les bivalves paléohétérodontes des ptériomorphes à couche externe prismatique calcitique. La couche nacrée chez *Unio pictorum* est bien développée et épaisse (Fig. 16). Elle est de couleur blanche tirant sur un gris métallique. Le choix d'utiliser *Unio pictorum* répond à plusieurs critères d'intérêt :

- C'est une espèce facilement accessible, dont on peut prélever et congeler les tissus mous sur site. C'est ce que nous avons fait pour la construction d'une banque d'ADN complémentaire de manteau d'*Unio pictorum*.
- C'est une espèce robuste, pour laquelle on peut envisager des élevages sur plusieurs semaines, voire plusieurs mois.
- La matière première « nacre » est en abondance et peut être séparée de la couche prismatique sans trop d'effort, par polissage. *Unio* est plus facile à travailler que *Anodonta*, dont la coquille est plus grande, mais dont la couche nacrée est très fine.
- Il n'existe aucune donnée moléculaire sur la biominéralisation des bivalves paléohétérodontes.

Enfin, le choix d'utiliser un bivalve paléohétérodonte est dicté par des considérations phylogénétiques : cette petite sous-classe est souvent placée à la jonction entre les deux grands ensembles que sont les ptériomorphes et les hétérodontes, car ils ont des caractères mosaïques qui les rapprochent à la fois des uns (microstructure coquillière nacro-prismatique) et des autres (charnière). Il n'empêche que les paléohétérodontes sont assez éloignés phylogénétiquement des ptériomorphes (Ponder and Lindberg, 2008).

La microstructure de la couche nacrée d'*Unio pictorum* est une classique « nacre en mur de brique », avec des tablettes disposées en quinconce, et dont l'épaisseur est d'environ 0,5 microns. En cela, la microstructure nacrée ressemble beaucoup à celle observée chez *Pinctada* sp. Elle ne peut en être facilement distinguée, par une simple observation en microscopie électronique à balayage. Il est donc intéressant de voir si les deux nacres possèdent des protéines homologues.

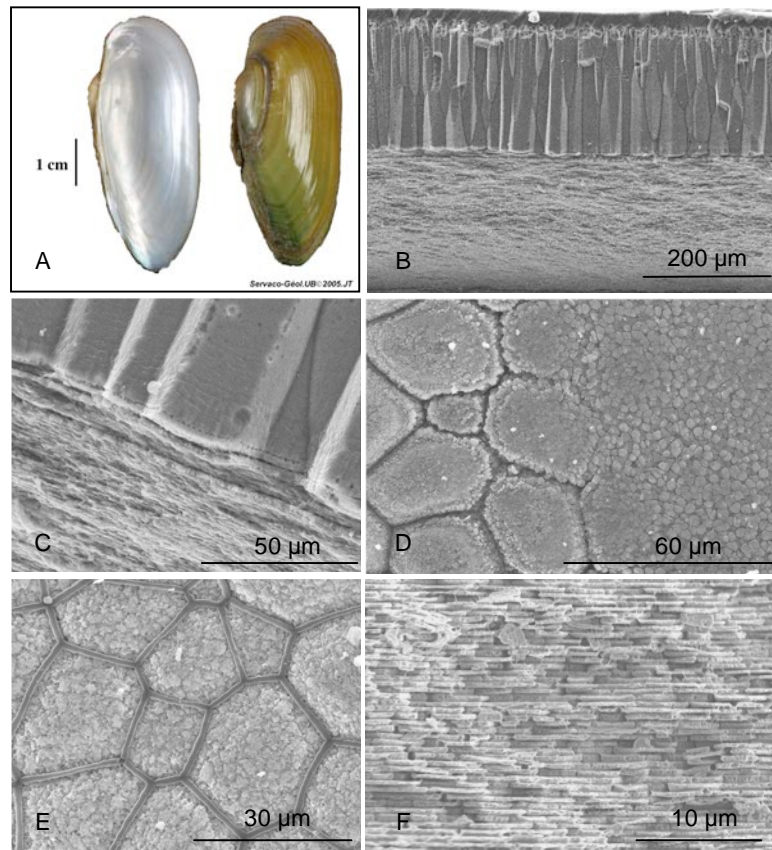


Fig. 16. Modèle *Unio pictorum*. A : vue interne et externe de la coquille. Remarquez le périostracum épais. B : section longitudinale de la coquille, montrant de haut en bas le périostracum, la couche prismatique aragonitique et la couche nacré, aragonitique également. C : détail de la transition prismes/nacre. D : transition prismes/nacre vue en plan. Les gros prismes (à gauche) sont recouverts par les tablettes de nacre (à droite). E : prismes, vus en section transversale. Les gaines périprismatiques sont bien visibles. F : tablettes de nacre.

### **b. Modèle *Nautilus macromphalus***

Le nautilus est un modèle classique en évolution, car considéré comme un « fossile vivant », une relique. Dans les cladogrammes reconstituant les liens de parenté des céphalopodes actuels, la sous-classe des Nautiloidea occupe toujours une position basale (Nishiguchi and Mapes, 2008). Au sein de ce taxon, deux genres vivants sont distingués *Nautilus* et *Allonautilus*. Au sein du genre *Nautilus*, six espèces actuelles ont été déterminées (*belauensis*, *macromphalus*, *pompilius*, *repertus*, *scrobiculatus*, *stenomphalus*). Notre choix s'est porté sur l'espèce *macromphalus*, endémique de la Nouvelle-Calédonie. Les spécimens étudiés proviennent de l'aquarium de Nouméa.

La coquille du nautilus est entièrement aragonitique. Hormis le périostracum, elle est constituée de deux couches minéralisées, l'une externe fine, prismatique, l'autre interne, nacré (Fig. 17). Au niveau des cloisons convexes, des dépôts caméraux sont également formés (Bandel, 1990). La couche de nacre est de type nacre colonnaire, et ressemble assez à celle trouvée chez l'ormeau. La nacre du nautilus a fait l'objet d'un certain nombre d'études

structurales, voire ultrastructurales (Crenshaw and Ristedt, 1975 ; Mutvei, 1980 ; Velazquez-Castillo *et al.*, 2006; Nudelman *et al.*, 2006). En revanche, la matrice coquillière associée a été curieusement peu étudiée, et la plupart des travaux sont déjà anciens : Grégoire (1972), Goffinet et Jeuniaux (1979), Weiner (1979), Lowenstam *et al.* (1984), Dauphin and Marin (1995) et Dauphin (2006). Ces travaux ont mis en évidence la présence de chitine, de protéines hydrophobes, de protéines solubles acides, et l'existence d'une fraction saccharidique non chitineuse. Plus récemment, trois courtes séquences N-terminales ont été identifiées (Zhao *et al.*, 2003). C'est à peu près tout ce que l'on connaît de la matrice nacrée chez le nautilus.

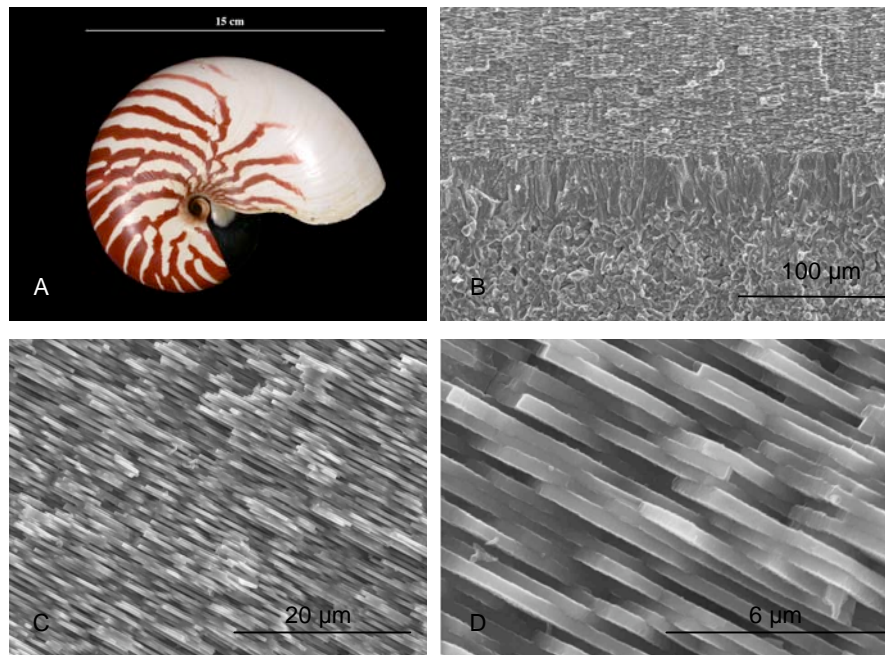


Fig. 17. Modèle *Nautilus macromphalus*. A : vue externe. B : section transversale de la coquille, montrant la microstructure prismatique (bas) et nacrée (haut). C : section transversale de la couche nacrée. D : même vue, à fort grossissement. L'aspect granuleux de la surface des tablettes est dû à la présence de constituants organiques.

### **c. Approche protéomique**

Afin de mieux cerner la variabilité des protéines associées à la nacre, nous avons entrepris dans le cadre de la thèse de Benjamin Marie une approche protéomique, en lien, d'une part, avec l'IBCP de Lyon (Institut de Biologie et Chimie des Protéines, M. Becchi et I. Zanella-Cléon), et d'autre part, avec la plate-forme de protéomique du MNHN de Paris (Dr. A. Marie).

L'approche protéomique consiste à extraire les constituants macromoléculaires de la matrice coquillière. Jusque-là, rien de bien nouveau. Ces constituants sont ensuite séparés sur gel d'électrophorèse, non pas monodimensionnel, mais selon deux dimensions : un premier fractionnement selon leur point iso-électrique, suivi d'un second fractionnement selon leur masse moléculaire, dans la dimension perpendiculaire. Les protéines sont ainsi localisées par des « taches » (des « spots ») sur le gel qu'il est possible de prélever avec une pointe stérile. Chaque protéine est ensuite digérée à la trypsine, une enzyme qui coupe les chaînes peptidiques au niveau des résidus arginine et lysine. Les peptides sont ensuite analysés en

spectrométrie de masse par MALDI-ToF/ToF. Les résultats sont ensuite analysés par le logiciel MASCOT ou par BLAST. Lorsque l'on travaille avec des protéines qui ont déjà été référencées en protéomique, la technique permet d'assigner un spot à une protéine connue. L'approche protéomique peut être également utilisée directement sur un mélange, sans passer par l'étape d'électrophorèse 2D. Cependant, dans ce cas, on perd de l'information, car il n'est plus possible d'associer des séquences peptidiques à une protéine donnée.

L'approche protéomique constitue, en quelque sorte, un échantillonnage de la composition en protéines du mélange analysé. Cette technique très puissante se substitue progressivement à une approche analytique qui explore en détail les propriétés de chaque protéine extraite séparément d'un mélange. Cependant, la technique peut se heurter à un certain nombre de difficultés :

- Nos modèles (*Pinna*, *Pinctada*, *Unio*, *Orchestia*, etc...) sont très peu étudiés. Ainsi, beaucoup de peptides identifiés ne sont pas encore répertoriés dans les bases peptidiques. Une identification « manuelle » et une validation des séquences doit suivre l'identification par le logiciel MASCOT, ce qui alourdit un peu le travail expérimental.
- Les protéines des systèmes calcifiants sont très souvent modulaires, c'est à dire qu'elles présentent une succession de domaines fonctionnels raboutés les uns aux autres, selon un principe de « bricolage évolutif ». La connaissance d'un ou deux peptides d'une protéine donnée ne permet donc pas forcément d'assigner ce ou ces peptides à une protéine connue.
- Toutes les protéines ne réagissent pas de façon identique à la digestion trypsique, qui clive les protéines au niveau des résidus basiques (Lys, Arg). Certaines protéines des matrices calcifiantes peuvent ne pas avoir, ou avoir en faibles proportions, ces résidus basiques, d'où absence de clivage, et impossibilité d'ioniser le peptide, qui ne sera par conséquent pas analysé. De plus, lorsque les résidus Lys et Arg sont présents, le site de clivage correspondant peut être masqué par des modifications post-traductionnelles voisines, telles que des glycosylations. De ce fait, la représentation que l'on obtient d'une composition peptidique d'un mélange peut être largement tronquée, certaines protéines (via leurs peptides) étant complètement sous-représentées.

En dépit de ces limitations techniques intrinsèques aux protéines étudiées, l'approche protéomique est remarquablement informative. Elle peut, de plus, être couplée à une approche classique de biologie moléculaire. En effet, les séquences obtenues par protéomique peuvent être utilisées pour le développement de sondes oligonucléotidiques multiples, lesquelles, par RT-PCR, permettent d'identifier plusieurs transcrits (ARN messagers) à la fois.

De plus, avec le séquençage partiel ou complet de génomes, l'approche protéomique permet aussi une annotation de gènes, ou de « contigs » d'une banque d'EST, lesquels, sans cette opération, continueraient de coder des protéines « inconnues ». L'approche protéomique est particulièrement adaptée dans le cas de *Pinctada margaritifera*, de *Crassostrea gigas*, de *Mytilus californianus*, de *Argopecten irradians*, de *Biomphalaria glabrata*, ou de *Spisula solidissima*, pour lesquelles le génome ou des EST sont connus.

#### **d. Matrice de nacre d'*Unio pictorum***

La matrice nacrée d'*Unio pictorum* a été analysée biochimiquement dans un premier temps, puis par protéomique. La caractérisation de cette matrice a donné lieu à 3 papiers publiés. Un autre est en préparation pour *Proteomics* :

1. Marie *et al.*, 2007. *FEBS Journal*, 274 : 2933-2945.

2. Marie *et al.*, 2007. In: *Biom mineralization, from Paleontology to Materials Science*, (Arias J.L., Fernandez M.S., eds), Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Symposium on Biom mineralization, Editorial Universitaria, Santiago de Chile: 273-280.
3. Marie *et al.*, 2008. *ChemBioChem*, 9: 2515-2523.

Les données acquises par différentes techniques biochimiques (papiers 1 et 2) indiquent que :

- *La matrice acido-soluble de nacre d'Unio pictorum a une signature en acides aminés typique d'une matrice calcifiante : trois acides aminés sont dominants : Gly (16,4%), Asx (12,5%) et Ala (11,1%). Elle semble donc plutôt acide et hydrophobe. La matrice acido-insoluble est très hydrophobe, avec Gly (24,3%) et Ala (24,7%) comme résidus dominants.*
- *Cette matrice est glycosylée. La fraction acido-soluble comporte à peu près tous les monosaccharides neutres standards, en proportions variables, ainsi que des sucres sulfatés. La fraction acido-insoluble est surtout représentée par le glucosamine, ce qui suggère la présence de chitine, polymère de N-acétyl-glucosamine (par hydrolyse acide, le N-acétyl-glucosamine est converti en glucosamine).*
- *La matrice acido-soluble inhibe la précipitation in vitro de carbonate de calcium. Notons cependant que c'est un inhibiteur modéré, si on compare son effet à celui produit par des matrices extraites de microstructures calcitiques, beaucoup plus inhibitrices.*
- *La matrice acido-soluble interfère avec la cristallisation de calcite in vitro. Cet effet est modifié lorsque l'on déglycosyle chimiquement cette matrice : on note alors la formation de « coins rentrants ». A notre connaissance, c'est la première fois que l'on peut visualiser directement l'effet de l'absence d'une fraction saccharidique sur la cristallisation de carbonate de calcium.*
- *La matrice acido-soluble est constituée de quelques fractions protéiques majoritaires, dont une fraction à 95 kDa (P95), une à 50 kDa (P50), une à 29 kDa (P29). Ces fractions, notamment la P50, présentent des isoformes sur gel 2D. Elles sont glycosylées et polyanioniques. Leur point isoélectrique apparent est acide, voire très acide pour la P95. Elles fixent en outre le calcium. Leur déglycosylation entraîne une diminution de leur masse moléculaire apparente, et une perte partielle (P50) ou totale (P95) de leur capacité à fixer le calcium. Sur gel 2D, elle se caractérise par un déplacement des protéines vers des points isoélectriques neutres, voire, faiblement basiques.*

Ce premier papier, et le second réalisé dans la foulée, avaient permis de caractériser finement, pour la première fois, la matrice acido-soluble associée à la nacre, sans pour autant obtenir de données de séquences. Dans le troisième papier, nous avons réalisé des tests d'activité anhydrase carbonique sur cette matrice. Nous avons en outre appliqué une approche protéomique, pour mieux caractériser les constituants majeurs de la matrice acido-soluble, en particulier, la P95, spécifique de la couche nacrée, car absente des prismes.

- *La matrice acido-soluble a une activité anhydrase carbonique. Cette activité, assez élevée (0,4 U/mg matrice) est dose-dépendante. Elle est inhibée par la chaleur et par un inhibiteur de l'anhydrase carbonique, l'acétazolamide. Il s'agit donc bien d'une vraie activité enzymatique. C'est une des rares fois où a été montrée une telle activité dans une matrice calcifiante.*
- *La P95 est enrichie en Gly (17,6%), Glx (13,5%) et Asx (10,5%). C'est une glycoprotéine fixatrice de calcium, qui perd cette capacité par déglycosylation. Seule, elle interagit avec la précipitation de carbonate de calcium in vitro. Cependant, son action est moindre que celle de la matrice soluble totale, d'où un possible effet cumulé des constituants testés ensemble, qui « travailleraient en synergie ».*



- De nombreux peptides ont été détectés par analyse MALDI-ToF/ToF, effectuée sur des spots prélevés sur gels 2D, et aussi à partir de fractions P95 purifiées sur gel préparatif selon la technique que j'ai développée (Marin et al., 2001). Curieusement, ces peptides se retrouvent d'un spot à un autre, ce qui suggère deux mécanismes : 1) les protéines constitutives de la matrice acido-soluble sont construites à partir des mêmes blocs fonctionnels. 2) Des clivages préférentiels des protéines de haut poids moléculaire en protéines plus petites de masse bien déterminée se produisent, à la manière du mécanisme de dégradation observé dans l'émail dentaire (Simmer and Hu, 2002).
- Les séquences partielles obtenues à partir des peptides ne permettent pas de rattacher les protéines correspondantes à des protéines connues.

Une analyse protéomique beaucoup plus complète a été réalisée avec l'IBCP de Lyon. Plus de 200 séquences ont été obtenues, de 6 à 20 résidus de long. La plupart d'entre elles, analysées par Benjamin Marie, ne correspondent pas à des protéines connues chez l'huître perlière *Pinctada* sp. ou bien chez l'ormeau *Haliotis* sp. Un article en préparation synthétisera l'ensemble des données.

### e. Matrice de nacre de *Nautilus macromphalus*

La matrice de nacre du nautilus a été analysée biochimiquement et par protéomique simultanément. Les données font l'objet d'un premier article. Un second article, récemment soumis, compile les données obtenues sur *Unio pictorum*, *Nautilus macromphalus* et *Haliotis asinina*. Enfin, une troisième publication est prévue, décrivant plus spécifiquement une protéine de la matrice acido-soluble, la nautiline63.

- Marie et al, *ChemBioChem*, 2009. sous-presse.
- Marie et al., *MRS Spring Meeting Volume*, soumis.

Nos données sur *Nautilus macromphalus* peuvent être résumées comme suit :

- La matrice acido-soluble de *Nautilus macromphalus* est fortement enrichie en résidus glycine et aspartate, respectivement 21,4% et 20,8%. La matrice acido-insoluble est enrichie en glycine (24%), en alanine (13,3%), et en glutamate (10,3%) et aspartate (9,5%). La matrice acido-soluble comporte de nombreux sucres neutres et sulfatés. La matrice acido-insoluble est surtout constituée de glucosamine, qui témoigne de la présence de chitine.
- La matrice acido-soluble interfère avec la précipitation de carbonate de calcium *in vitro*. Cet effet est similaire à celui obtenu avec la matrice de la moule d'eau douce *Unio pictorum*. La matrice acido-soluble est également un inhibiteur modéré de la précipitation de carbonate de calcium.
- Sur gel d'électrophorèse mono-dimensionnel, la matrice acido-soluble se caractérise par une profusion de constituants de masse moléculaire non discrète et quelques constituants discrets : une protéine à 63 kDa, appelée nautiline63, et des constituants de masses moléculaires inférieurs à 15-20 kDa. Cette matrice est polyanionique et fixe le calcium.
- Sur gel bidimensionnel, 6 spots protéiques sont caractérisés, notamment les spots N1, N2 et N5 très acides, N3 et N4 neutres à faiblement basiques, et N6 et N7, très basiques. Le patron en gel 2D obtenu est très différent de celui obtenu avec *Unio pictorum*.
- L'approche protéomique, effectuée sur la matrice acido-soluble et acido-insoluble, a permis d'obtenir un grand nombre de peptides. Beaucoup de peptides présents dans la matrice insoluble sont également présents dans la matrice soluble. De plus, d'un spot à

un autre, on retrouve certains peptides (dont les rapports masse/charge sont strictement identiques). Ce qui est vrai pour *Unio pictorum* l'est aussi pour *Nautilus macromphalus*. Ces peptides communs traduisent l'existence de blocs fonctionnels utilisés dans plusieurs protéines, ou bien, le clivage contrôlé d'une ou plusieurs protéines en protéines de masse plus faible.

- Environ 40 séquences ont été obtenues, soit à partir des spots protéiques, soit à partir de la matrice acido-soluble non fractionnée, ou de la matrice acido-insoluble. La plupart de ces séquences ne correspondent pas à des séquences connues chez l'huître perlière *Pinctada sp.* ou chez l'ormeau *Haliotis sp.* Seules, quelques séquences correspondent partiellement. Contre toute attente, ces séquences s'alignent sur la nacréine, la N14, la mucoperline, la Tyrosinase-like 1 et 2, ou encore, la MSI60 et MSI31. Toutes ces séquences sont des séquences de nacre de bivalve. Aucune homologie n'a été détectée avec les protéines de nacre d'ormeau. Pourtant, les nacres d'ormeau et de nautilus, de type colonnaire, se ressemblent beaucoup plus qu'elles ne ressemblent aux nacres de bivalves, en mur de brique. Il ne semble pas y avoir concordance entre des similitudes microstructurales et similitudes de séquences protéiques associées. En d'autres termes, des similitudes microstructurales ne se traduisent pas par des similitudes des constituants qui fabriquent ces microstructures.

Le petit papier soumis au MRS Spring Meeting (San Francisco, Avril 2009) reprend en partie ces données. Il intègre également les données acquises par Benjamin sur *Unio pictorum* et sur un troisième modèle, l'ormeau *Haliotis asinina*. Cette dernière espèce a fait l'objet de deux papiers d'importance de Jackson *et al.* (2006 ; 2007), basés sur une approche transcriptomique (EST). Cette approche avait permis de recenser des gènes exprimés par le manteau calcifiant, codant des protéines destinées à être exportées en domaine extracellulaire, car comportant un peptide-signal. Ces gènes étaient donc potentiellement impliqués dans la minéralisation de la coquille. Nos données ont montré sans équivoque que 8 EST (ML3A11, ML6A10, ML5A7, ML7A11, ML8B1, ML1E6, ML5H8, ML5B8) correspondent réellement à des protéines de coquille de l'ormeau *Haliotis asinina*. Ces protéines ne sont pas homologues de celles connues chez les ormeaux *Haliotis rufescens* et *Haliotis laevigata* et chez les bivalves nacrés *Pinctada sp.* et *Pinna nobilis*.

## VI.4. ORIGINE ET EVOLUTION DE LA NACRE : QUELQUES REMARQUES

Ces travaux en protéomique, réalisés par Benjamin Marie, appellent quelques remarques, à la fois sur la structure de la matrice coquillière et sur les mécanismes évolutifs qui se sont produits dans cette matrice.

### a. Sur la structure de la matrice de nacre

Depuis les années 60-70, il est classique de distinguer dans la matrice de nacre totale, une fraction soluble acide et une fraction insoluble hydrophobe. Outre les comportements différents de ces deux fractions en solution, cette dichotomie est fondée sur des analyses d'acides aminés réalisées sur chacune de ces fractions. Elle est largement gommée par notre approche protéomique, qui montre que de nombreux peptides sont communs aux deux fractions organiques. Des mécanismes moléculaires permettent d'expliquer ce fait : 1) La multimérisation d'une protéine soluble (monomère) aboutissant à la formation d'homopolymères insolubles. 2) La formation de liaisons covalentes intermoléculaires entre protéines différentes, sous l'action de transglutaminases, par exemple. 3) Le processus de tannage quinonique, sous l'action de tyrosinase. Chacune de ces possibilités mériterait d'être testée en laboratoire.

Les analyses protéomiques montrent aussi que des protéines différentes appartenant à une même fraction (la fraction soluble, par exemple) possèdent des peptides communs. Ce n'est pas un fait isolé, mais plutôt une constante, observée sur les différents modèles biologiques étudiés. A cela, deux explications sont possibles : 1) De courts domaines identiques sont utilisés pour « construire » plusieurs protéines différentes de la matrice. On aurait ici une sorte de jeu de Meccano, basé sur des motifs invariants d'une protéine à une autre. Cette vision s'accorde bien avec une architecture modulaire des protéines matricielles (Marin *et al.*, 2008). Elle n'est pas spécifique des protéines de nacre, puisqu'un mécanisme analogue a été évoqué pour la matrice de prismes de *Pinna nobilis* (Marin *et al.*, 2007). 2) Le clivage contrôlé d'une protéine de haut poids moléculaire en fragments plus petits, solubles. La fragmentation d'un précurseur de haut poids moléculaire en sous-unités de taille bien définie est connue pour les protéines de l'émail dentaire, amélogénines et MEPE (Bartlett and Simmer, 1999 ; Martin *et al.*, 2008). Ces deux hypothèses doivent être testées.

### b. Sur l'évolution de la matrice de nacre

Contre toute attente, l'approche protéomique sur la moule d'eau douce et sur le nautilus n'a pas permis de dégager de nombreuses homologies de séquences avec des protéines connues chez les modèles *Haliothis sp.* et *Pinctada sp.*, qui regroupent 90% des données moléculaires. Sur le modèle nautilus, les quelques homologies enregistrées le sont avec des protéines d'huître perlière, et non avec celles de l'ormeau, dont la microstructure nacrée est pourtant très semblable à celle de nautilus.

Les très faibles homologies enregistrées appellent plusieurs explications possibles :

- 1) Il y a eu une grande dérive génétique entre les différents modèles étudiés. Cette explication est la plus probable. Après tout, les différentes classes de mollusques conchifères ont divergé à peu près à la limite Protérozoïque/Cambrien, et plus de 500 millions d'années ont fait le travail. Si l'on part d'un stock commun ancestral, cette durée est largement suffisante pour brouiller le signal initial, aboutissant à

l'impossibilité d'aligner de manière simple des séquences. Le corollaire à cette explication est que les protéines de matrice de nacre sont évolutivement peu contraintes, ou en tout cas, beaucoup moins que ne le laisse présager la stabilité temporelle de la microstructure « nacre ». Un mécanisme de dérive est illustré par le cas des SCPP (Secretory Calcium-binding PhosphoProteins). Ces protéines forment une vraie famille, un vrai clade, qui inclut des protéines de l'émail dentaire, des protéines de la dentine et de l'os, la caséine du lait, et des protéines salivaires inhibitrices de minéralisation. Il a été montré que toutes ces protéines proviennent d'un gène ancestral, dupliqué un certain nombre de fois (Kawasaki and Weiss, 2003 ; Kawasaki *et al.*, 2004, 2006). Pourtant, au niveau de leur structure primaire, ces protéines se ressemblent peu.

- 2) Il y a quelques homologues de séquences, mais ces homologues portent sur des motifs très courts, longs de quelques acides aminés-clés. L'approche protéomique constituant un échantillonnage de la matrice, ces motifs ne sont pas toujours pris en compte par l'analyse pour les raisons indiquées précédemment. D'autre part, à ma connaissance, personne n'a essayé de scanner toutes les séquences de protéines coquillières avec de courts motifs « dégénérés », pour voir si ces motifs se retrouvent, de protéine à protéine. Un travail de bioinformatique reste à faire dans ce domaine.
- 3) Les matrices de nacre sont différentes, d'un modèle à un autre et elles ont été mises en place indépendamment les unes des autres. Cela signifie qu'il n'existe pas une seule manière de « fabriquer » de la nacre, mais bien différentes voies, qui aboutissent à des résultats très similaires. Cela tend également à montrer que la nacre est un « attracteur ». Pour visualiser de manière intuitive ce concept, on pourrait prendre l'image d'un entonnoir, et de billes différentes (symbolisant des matrices), disposées sur le pourtour de cet entonnoir. Quelle que soit leur position de départ, lorsque les billes sont lâchées, elles roulent irrémédiablement au fond de l'entonnoir, pour aboutir à une même position finale (la nacre). Bien que cette hypothèse soit moins probable que l'hypothèse 1, elle me semble particulièrement intéressante à tester. Elle revient cependant à généraliser le processus et à envisager toutes les microstructures coquillières, et pas simplement la nacre, comme autant d'attracteurs. Cette hypothèse est pour le moment difficile à démontrer. On peut cependant, dans un premier temps, envisager des approches statistiques plus simples et plus réalistes, consistant à effectuer des analyses multivariées (ACP, par exemple) : les données de biochimie (présence de chitine, activité anhydrase carbonique, etc...) et de protéomique (présence de tel ou tel peptide) collectées sur le plus grand nombre de matrices coquillières possibles associées à des microstructures différentes pourraient être codées dans une « matrice de caractères ». Chaque matrice coquillière pourrait ainsi être représentée par un point unique dans un espace à n dimensions. Il s'agirait ensuite de regrouper les points en fonction de leur appartenance à une microstructure donnée, afin de voir s'il existe des régions de l'espace (ramené à un plan ou à un espace à trois dimensions selon les axes principaux) qui concentrent plutôt tel ou tel type de microstructures. Cette analyse permettrait aussi de visualiser les proximités entre microstructures (nacre et prismes, nacre et lamellaire croisée, etc...).

En tout cas, quel que soit la « bonne explication », le fait que la nacre puisse être assemblée à partir d'outils moléculaires *a priori* différents offre d'intéressantes perspectives dans le domaine des matériaux biomimétiques.

D'un point de vue évolutif, nos travaux montrent que, s'il y a une contrainte évolutive sur la structure finale (la nacre), celle-ci doit s'exercer nécessairement « en amont » des matrices proprement dites. Il est clair qu'il nous faut nous orienter vers les concepts d'auto-assemblage et de propriétés émergentes, très porteurs, et qui ont encore de beaux jours devant eux.

### **c. Références bibliographiques**

- Addadi, L., Moradian, J., Shay, E., Maroudas, N. G., and Weiner, S. (1987). A chemical model for the cooperation of sulfates and carboxylates in calcite crystal nucleation: relevance to biomineralization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 2732-2736.
- Addadi, L., Joester, D., Nudelman, F., and Weiner, S. (2006). Mollusk shell formation: a source of new concepts for understanding biomineralization processes. *Chem. Eur. J.* **12**, 980-987.
- Aktipis, S. W., Giribet, G., Lindberg, D. R., and Ponder, W. F. (2008). Gastropoda : an overview and analysis. In « Phylogeny and Evolution of the Mollusca » (W. F. Ponder and D. R. Lindberg, Eds.) pp. 201-237. University of California Press, Berkeley.
- Bandel, K. (1990). Cephalopod shell structure and general mechanisms of shell formation. In « Skeletal Biomineralization : Patterns, Processes and Evolutionary Trends, Volume I » (J. G. Carter, Ed.) pp. 97-115. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Bartlett, J. D., and Simmer, J. P. (1999). Proteinases in developing dental enamel. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **10**, 425-441.
- Bengtson, S., Conway-Morris, S., Cooper, B. J., Jell, P. A., and Runnegar, B. N. (1990). Early Cambrian fossils from South Australia. *Memoir Assoc. Australasian Palaeontologists* **9**, 1-364.
- Bevelander, G., and Nakahara, H. (1969). An electron microscope study of the formation of the nacreous layer in the shell of certain bivalve molluscs. *Calcif. Tissue Res.* **3**, 84-92.
- Carter, J. G., and Clark II, G. R. (1985). Classification and phylogenetic significance of molluscan shell microstructure. In "Mollusks, Notes for a Short Course" (T. W. Broadhead, Ed.) pp. 50-71. University of Tennessee, Dpt. Of Geological Sciences, Studies in Geology 13.
- Carter, J. G., and Hall, R. M. (1990). Polyplacophora,, Scaphopoda, Archaeogastropoda, and Paragastropoda (Mollusca), Plates 122-134. In « Skeletal Biomineralization : Patterns, Processes and Evolutionary Trends, Volume II, Atlas and Index ». (J. G. Carter, Ed.) pp. 29-51. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Chateigner, D., Hedegaard, C., and Wenk, H. R. (2000). Mollusc shell microstructures and crystallographic textures. *J. Struct. Geol.* **22**, 1723-1735.
- Checa, A. G., Ramirez-Rico, J., Gonzales-Segura, A., and Sanchez-Navas, A. (2009). Nacre and false nacre (foliated aragonite) in extant monoplacophorans (=Tryblidiida : Mollusca). *Naturwissenschaften* **96**, 111-122.
- Checa, A. G., Gaspard, D., Gonzales-Segura, A., and Ramirez-Rico, J. (2009). Crystallography of the calcitic foliated-like and seminacre microstructures of the brachiopod *Novocrania*. *Crystal Growth Design* **9**, 2464-2469.
- Cölfen, H. (2007). Bio-inspired mineralization using hydrophilic polymers. *Top. Curr. Chem.* **271**, 1-77.
- Crenshaw, M. A., and Ridstedt, H. (1975). Histochemical and structural study of nautiloid septal nacre. *Biomineralization* **8**, 1-15.
- Cruz, R., Weismüller, G., and Farina, M. (2003). Microstructure of Monoplacophora (Mollusca) shell examined by low-voltage field emission scanning electron and atomic force microscopy. *Scanning* **25**, 12-18.
- Dauphin, Y. (2006). Structure and composition of the septal nacreous layer of *Nautilus macromphalus* L. (Mollusca, Cephalopoda). *Zoology* **109**, 85-95.
- Dauphin, Y., and Marin, F. (1995). The compositional analysis of recent cephalopod shell carbohydrates by Fourier transform infrared spectrometry and high performance anion exchange- pulsed amperometric detection. *Experientia* **51**, 278-283.
- Erben, H. K. (1972). Über die Bildung und das Wachstum von Perlmutter. *Biomineralization* **4**, 15-46.
- Erben, K., Flajs, G., and Siehl, A. (1968). Über die Schalenstruktur von Monoplacophoren. *Akad. Wiss. Lit., Abh. Math-Naturwiss.* K1 1968, 1-24.
- Exposito, J. Y., Cluzel, C., Garrone, R., and Lethias, C. (2002). Evolution of collagens. *The Anatom. Rec.* **268**, 302-316.
- Feng, W., and Sun, W. (2003). Phosphate replicated and replaced microstructure of molluscan shells from the earliest Cambrian of China. *Acta Palaeontol. Pol.* **48**, 21-30.
- Fryda, J., Rieder, M., Klementova, M., Weitschat, W., and Bandel, K. (2004). Discovery of a gastropod-type nacre in fossil cephalopod : a tale of two crystallographic textures. In « Abstract, World Congress of Malacology » (F. E. Wells, Ed.) p 43. Western Australian Museum, Perth.
- Fryda, J., Nützel, A., and Wagner, P. J. (2008). Paleozoic Gastropoda. In « Phylogeny and Evolution of the Mollusca » (W. F. Ponder and D. R. Lindberg, Eds.) pp. 239-270. University of California Press, Berkeley.

- Geiger, D. L., Nützel, A., and Sasaki, T. (2008). Vetigastropoda. In « Phylogeny and Evolution of the Mollusca » (W. F. Ponder and D. R. Lindberg, Eds.) pp. 297-330. University of California Press, Berkeley.
- Goffinet, G., and Jeuniaux, C. (1979). Distribution et importance quantitative de la chitine dans les coquilles de mollusques. *Cah. Biol. Mar.* **20**, 341-349.
- Grégoire, C. (1972). Structure of the molluscan shell. In "Chemical Zoology, Vol. VII: Mollusca" (M. Florin, and B. T. Scheer, Eds.), pp. 45-102. Academic Press, New York.
- Haas, W. (1981). Evolution of calcareous hardparts in primitive molluscs. *Malacologia* **21**, 403-418.
- Jackson, D. J., McDougall, C., Green, K., Simpson, F., Wörheide, G., and Degnan, B. M. (2006). A rapidly evolving secretome builds and patterns a sea shell. *BMC Biology* **4**, 40-49.
- Jackson, D. J., Wörheide, G., and Degnan, B. M. (2007). Dynamic expression of ancient and novel molluscan shell genes during ecological transitions. *BMC Evol. Biol.* **7**, 160-177.
- Kawasaki, K., and Weiss, K. M. (2003). Mineralized tissue and vertebrate evolution: the secretory calcium-binding phosphoprotein gene cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 4060-4065.
- Kawasaki, K., Suzuki, T., and Weiss, K. M. (2004). Genetic basis for the evolution of vertebrate mineralized tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 11356-11361.
- Kawasaki, K., and Weiss, K. M. (2006). Evolutionary genetics of vertebrate tissue mineralization: the origin and evolution of the secretory calcium-binding phosphoprotein family. *J. Exp. Zool.* **306B**, 295-316.
- Kouchinsky, A. (2000). Shell microstructures in early Cambrian molluscs. *Acta Palaeontol. Pol.* **45**, 119-150.
- Lecointre, G., et Le Guyader, H. (2001). Classification Phylogénétique du Vivant. 2<sup>ème</sup> Edition, Belin, Paris.
- Levi-Kalisman, Y., Falini, G., Addadi, L., and Weiner, S. (2001). Structure of the nacreous organic matrix of a bivalve mollusk shell examined in the hydrated state using cryo-TEM. *J. Struct. Biol.* **135**, 8-17.
- Lowenstam, H. A., Traub, W., and Weiner, S. (1984). *Nautilus* hard parts: a study of the mineral and organic constituents. *Paleobiology* **10**, 268-279.
- Lowenstam, H. A., and Weiner, S. (1989). On Biomineralization. Oxford University Press, New York.
- Marie, B., Luquet, G., Pais De Barros, J. P., Guichard, N., Morel, S., Alcaraz, G., Bollache, L. and Marin, F. (2007). The shell matrix of the freshwater mussel *Unio pictorum* (Paleoheterodonta, Unionoida). Involvement of acidic polysaccharides from glycoproteins in nacre mineralization. *FEBS Journal* **274**, 2933-2945.
- Marie, B., Guichard, N., Luquet, G., and Marin, F. (2007). Calcification in the shell of the freshwater bivalve *Unio pictorum*. In "Biomineralization, from Paleontology to Materials Science" (Arias J.L., Fernandez M.S., Eds.) pp. 273-280. Editorial Universitaria, Santiago de Chile.
- Marie, B., Luquet G., Bédouet, L., Milet C., Guichard, N., Medakovic, D., and Marin, F. (2008). Nacre calcification in the freshwater mussel *Unio pictorum*: carbonic anhydrase activity and purification of a 95-kDa calcium-binding glycoprotein. *ChemBiochem* **9**, 2515-2523.
- Marie, B., Marin, F., Marie, A., Bédouet, L., Dubost L., Alcaraz G., Milet C. and Luquet G. (2009). Evolution of nacre: biochemistry and proteomics of the shell organic matrix of the cephalopod *Nautilus macromphalus*. *ChemBiochem*, *accepté pour publication*.
- Marie, B., Le Roy, N., Marie, A., Dubost, L., Milet, C., Bédouet, L., Becchi, M., Zanella-Cléon, I., Jackson, D., Degnan, B., Luquet, G., and Marin, F. Nacre evolution: a proteomic approach. MRS Spring Meeting, San Francisco, *soumis*.
- Marin, F. (1992). Essai de caractérisation chromatographique et immunologique des constituants organiques associés aux biocristaux carbonates des squelettes de mollusques, cnidaires et spongiaires. Thèse de 3ème cycle, Université de Paris-Sud-Orsay, 16 Mars 1992.
- Marin, F., Pereira, L., and Westbroek, P. (2001). Large-scale purification of molluscan shell matrix. *Prot. Expres. Purif.* **23**, 175-179.
- Marin, F., Pokroy, B., Luquet, G., Layrolle, P., and De Groot, K. (2007). Protein mapping of calcium carbonate biominerals by immunogold. *Biomater.* **28**, 2368-2377.
- Marin, F., Luquet, G., Marie, B. and Medakovic, D. (2008). Molluscan shell proteins : primary structure, origin and evolution. *Curr. Top. Dev. Biol.* **80**, 209-276.
- Martin, A., David, V., Laurence, J. S., Schwarz, P. M., Lafer, E. M., Hedge, A. M., and Rowe, P. S. (2008). Degradation of MEPE, DMP1, and release of SIBLING ASARM-peptides (minhibins): ASARM-peptide(s) are directly responsible for defective mineralization in HYP. *Endocrinol.* **149**, 1757-1772.
- Meenakshi, V. R., Hare, P. E., Watabe, N., Wilbur, K. M., and Menzies, R. J. (1970). Ultrastructure, histochemistry, and amino acid composition of the shell of *Neopilina*. *Anton Bruun Rep.* **2**, 3-12.
- Miyamoto, H., Yano, M., and Miyashita, T. (2003). Similarities in the structure of nacrein, the shell-matrix protein, in a bivalve and a gastropod. *J. Mollusc. Stud.* **69**, 87-89.
- Mutvei, H. (1969). On the micro- and ultrastructure of the conchiolin in the nacreous layer of some recent and fossil molluscs. *Stockholm Contr. Geol.* **20**, 1-17.
- Mutvei, H. (1979). On the internal structures of the nacreous tablets in molluscan shells. *Scann. Electron. Microsc.* **11**, 457-462.

- Mutvei, H. (1980). The nacreous layer in molluscan shells. In "The mechanisms of Biomineralization in Animals and Plants" (M. Omori and N. Watabe, Eds.) pp. 49-56. Tokai University Press, Tokyo.
- Nakahara, H. (1991). Nacre formation in bivalve and gastropod mollusks. In "Mechanisms and phylogeny of Mineralization in Biological Systems" (S. Suga, and H. Nakahara, Eds.), pp. 343-350. Springer-Verlag, Tokyo.
- Nassif, N., Pinna, N., Gehrke, N., Antonietti, M., Jäger, C., and Cölfen, H. (2005). Amorphous layer around aragonite platelets in nacre. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 12653-12655.
- Nishiguchi, M. K., Mapes, R. H. (2008). Cephalopoda. In « Phylogeny and Evolution of the Mollusca » (W. F. Ponder and D. R. Lindberg, Eds.) pp. 163-199. University of California Press, Berkeley.
- Nudelman, F., Gotliv, B.-A., Addadi, L., and Weiner, S. (2006). Mollusk shell formation: mapping the distribution of organic matrix components underlying a single aragonitic tablet in nacre. *J. Struct. Biol.* **153**, 176-187.
- Oaki, Y., and Imai, H. (2005). The hierarchical architecture of nacre and its mimetic material. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **44**, 6571-6575.
- Palmer, A. R. (1983). Relative cost of producing skeletal organic matrix versus calcification: evidence from marine gastropods. *Mar. Biol.* **75**, 287-292.
- Palmer, A. R. (1992). Calcification in marine molluscs: how costly is it? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1379-1382.
- Ponder, W. F., and Lindberg, D. R. (1996). Gastropod phylogeny – Challenges for the 90s. In "Origin and Evolutionary Radiation of the Mollusca" (J. D. Taylor, Ed.), pp. 135-154. Oxford University Press, Oxford.
- Ponder, W. F., and Lindberg, D. R., Eds. (2008). Phylogeny and Evolution of the Mollusca. University of California Press, Berkeley.
- Reynolds, P. D., and Okusu, A. (1999). Phylogenetic relationships among families of the Scaphopoda (Mollusca). *Zool. J. Linnean Soc.* **126**, 131-154.
- Rousseau, M., Lopez, E., Stempfélé, P., Brendlé, M., Franke, L., Guette, A., Naslain, R., and Bourrat, X. (2005). Multiscale structure of sheet nacre. *Biomaterials* **26**, 6254-62.
- Rousseau, M., Meibom, A., Gèze, M., Bourrat, X., Angellier, M., and Lopez, E. (2009). Dynamics of sheet nacre formation in bivalves. *Biomaterials* **165**, 190-195.
- Runnegar, B. (1983). Molluscan phylogeny revisited. *Memoir of the Assoc. of Australasian Palaeontologists* **1**, 121-144.
- Runnegar, B. (1985). Shell microstructures of Cambrian mollusks replicated by phosphate. *Alcheringa* **9**, 245-257.
- Runnegar, B., and Pojeta, J. Jr. (1992). The earliest bivalves and their Ordovician descendants. *Am. Malacol. Bull.* **9**, 117-122.
- Schäffer, T. E., Ionescu-Zanetti, C., Proksch, R., Fritz, M., Walters, D. A., Almqvist, N., Zaremba, C. M., Belcher, A. M., Smith, B. L., Stucky, G. D., Morse, D. E., and Hansma, P. K. (1997). Does abalone nacre form by heteroepitaxial nucleation or by growth through mineral bridges? *Chem. Mater.* **9**, 1731-1740.
- Schmidt, W. J. (1959). Bemerkung zur Schalenstruktur von *Neopilina galathea*. In "Scientific Results of the Danish Deep-Sea Expedition Round the World 1950-1952, Galathea Report, Volume 3" (A. F. Bruun, S. Greve, R. Spärck, T. Wolff, Eds.) pp. 73-76 (Danish Science Press, Copenhagen).
- Shimamoto, M. (1986). Shell microstructure of the Veneridae (Bivalvia) and its phylogenetic implications. *Sci. Rep., 2<sup>nd</sup> ser., Tohoku Univ* **56**, 1-39.
- Simmer, J. P., and Hu, J. C. (2002). Expression, structure, and function of enamel proteinases. *Connect. Tissue Res.* **43**, 441-449.
- Song, F., Soh, A. K., and Bai, Y. L. (2003). Structural and mechanical properties of the organic matrix layers of nacre. *Biomaterials* **24**, 3623-3631.
- Taylor, J. D. (1973). The structural evolution of the bivalve shell. *Palaeontology* **16**, 519-534.
- Taylor, J. D., Kennedy, W. J., and Hall, A. (1969). The shell structure and mineralogy of the bivalvia. Introduction. Nuculacea-Trigonacea. *Bull. Brit. Mus. (Nat. Hist.) Zool. Lond.* suppl. 3, 1-125.
- Taylor, J. D., Kennedy, W. J., and Hall, A. (1973). The shell structure and mineralogy of the bivalvia. II. Lucinacea – Clavagellacea. Conclusions. *Bull. Brit. Mus. (Nat. Hist.) Zool. Lond* **22**, 255-294.
- Thiele, J. (1929-1931). Handbuch der Systematischen Weichtierkunde. Vol. 1. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Velazquez-Castillo, R. R., Reyes-Garcia, J., Garcia-Gutierrez, D. I., Jose-Yacamán, M. (2006). Crystal structure characterization of nautilus shell at different length scales. *Biomater.* **27**, 4508-4517.
- Weedon, M. J., and Taylor, P. D. (1995). Calcitic nacreous ultrastructures in bryozoans: implications for comparative biomineralization of lophophorates and molluscs. *Biol. Bull.* **188**, 281-292.
- Weiner, S. (1979). Aspartic acid-rich proteins: major components of the soluble organic matrix of mollusk shells. *Calcif. Tissue Int.* **29**, 163-167.
- Weiner, S., and Hood, L. (1975). Soluble proteins of the organic matrix of mollusc shells: a potential template for shell formation. *Science* **190**, 987-989.

- Wheeler, A. P., George, J. W., and Evans, C. A. (1981). Control of calcium carbonate nucleation and crystal growth by soluble matrix of oyster shell. *Science* **212**, 1397-1398.
- Zhao, H., Samata, T., Takakura, D., Hashimoto, R., Miyazaki, Y., Nozawa, T., and Hikita, Y. (2003). Organic matrix proteins preserved in fossil molluscan shells. *In* "Biomineralization: Formation, Diversity, Evolution and Application" (I. Kobayashi, and H. Osawa, Eds.) pp. 108-111. Tokai University Press, Kanagawa.



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

### Involvement of acidic polysaccharides from glycoproteins in nacre mineralization

Benjamin Marie<sup>1</sup>, Gilles Luquet<sup>1</sup>, Jean-Paul Pais De Barros<sup>2</sup>, Nathalie Guichard<sup>1</sup>, Sylvain Morel<sup>3</sup>, Gérard Alcaraz<sup>3</sup>, Loïc Bollache<sup>1</sup> and Frédéric Marin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> UMR CNRS 5561, Biogéosciences, Université de Bourgogne, Dijon, France

<sup>2</sup> U 498 INSERM, Métabolisme des lipoprotéines humaines et interactions vasculaires, Université de Bourgogne, Dijon, France

<sup>3</sup> UMR INRA 692, Biochimie des interactions cellulaires, ENESAD, Dijon, France

#### Keywords

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

#### Correspondence

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

Fax: +33 3 80 39 63 87

Tel: +33 3 80 39 63 72

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

gilles.luquet@u-bourgogne.fr,

frederic.marin@u-bourgogne.fr

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

doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05825.x

Among molluscs, the shell biomineralization process is controlled by a set of extracellular macromolecular components secreted by the calcifying mantle. In spite of several studies, these components are mainly known in bivalves from only few members of pteriomorph groups. In the present case, we investigated the biochemical properties of the aragonitic shell of the freshwater bivalve *Unio pictorum* (Paleoheterodonta, Unionoida). Analysis of the amino acid composition reveals a high amount of glycine, aspartate and alanine in the acid-soluble extract, whereas the acid-insoluble one is rich in alanine and glycine. Monosaccharidic analysis indicates that the insoluble matrix comprises a high amount of glucosamine. Furthermore, a high ratio of the carbohydrates of the soluble matrix is sulfated. Electrophoretic analysis of the acid-soluble matrix revealed discrete bands. Stains-All, Alcian Blue, periodic acid/Schiff and autoradiography with <sup>45</sup>Ca after electrophoretic separation revealed three major polyanionic calcium-binding glycoproteins, which exhibit an apparent molecular mass of 95, 50 and 29 kDa, respectively. Two-dimensional gel electrophoresis shows that these bands, provisionally named P95, P50 and P29, are composed of numerous isoforms, the majority of which have acidic isoelectric points. Chemical deglycosylation of the matrix with trifluoromethanesulfonic acid induces a drastic shift of both the apparent molecular mass and the isoelectric point of these matrix components. This treatment induces also a modification of the shape of CaCO<sub>3</sub> crystals grown *in vitro* and a loss of the calcium-binding ability of two of the main matrix proteins (P95 and P50). Our findings strongly suggest that post-translational modifications display important functions in mollusc shell calcification.

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

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

#### Abbreviations

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

the supersaturation threshold, catalyzes mineral precipitation, nucleates crystals, determines the polymorph at crystal lattice scale, controls the crystals shape by stereo-specific adsorptions and, finally, inhibits crystal growth [2]. In addition, the matrix is suspected to be involved in cell signalling with the calcifying epithelium [3].

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

For many reasons, paleoheterodont bivalves represent fascinating models. This small subclass, which comprises unionoida and trigonioida, is traditionally positioned between pteriomorphs and the 'modern' heterodont bivalves [7]. Most of them are freshwater species, which are observed worldwide. Until now, they have been often used in environmental pollution studies, notably as metal accumulation indicators [8,9]. If microscopic observations have been performed describing the structure of the shell of some unionoida bivalves [10,11], very little is known about the organic components of the shell, especially at the molecular level [8,12-14].

Like macro-prismatic pteriomorph bivalves (including Mytiloida and Pterioidea), paleoheterodont bivalves exhibit a rather 'primitive' shell texture, comprising an outer prismatic shell layer (not always present among some species) and an inner one made of the typical brick-wall nacre. Unlike most pteriomorphs (but like some gastropods and cephalopods), the prismatic shell layer of paleoheterodonts is entirely aragonitic [15]. Moreover, the shell hinge of paleoheterodonts is rather 'modern' and similar to that of heterodont bivalves. Thus, paleoheterodont bivalves represent a case of complex 'mosaic' evolution because they exhibit both primitive and derived characters [7].

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

saccharidic composition, and underline the importance of the role of glycosyl moiety in the nacre mineralization process.

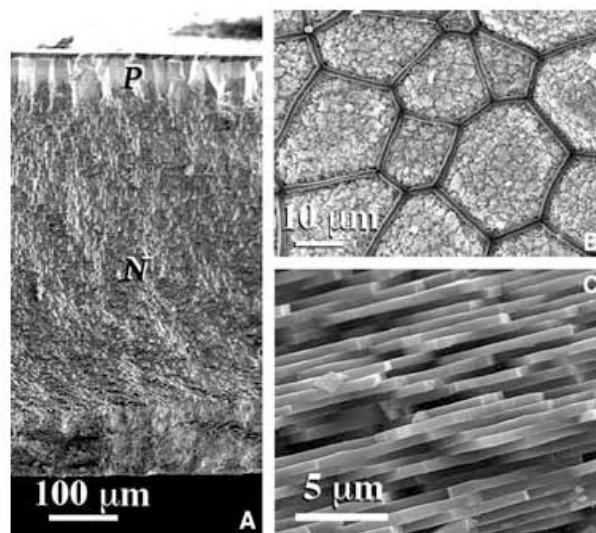
## Results

### Analysis of shell matrices on SDS/PAGE

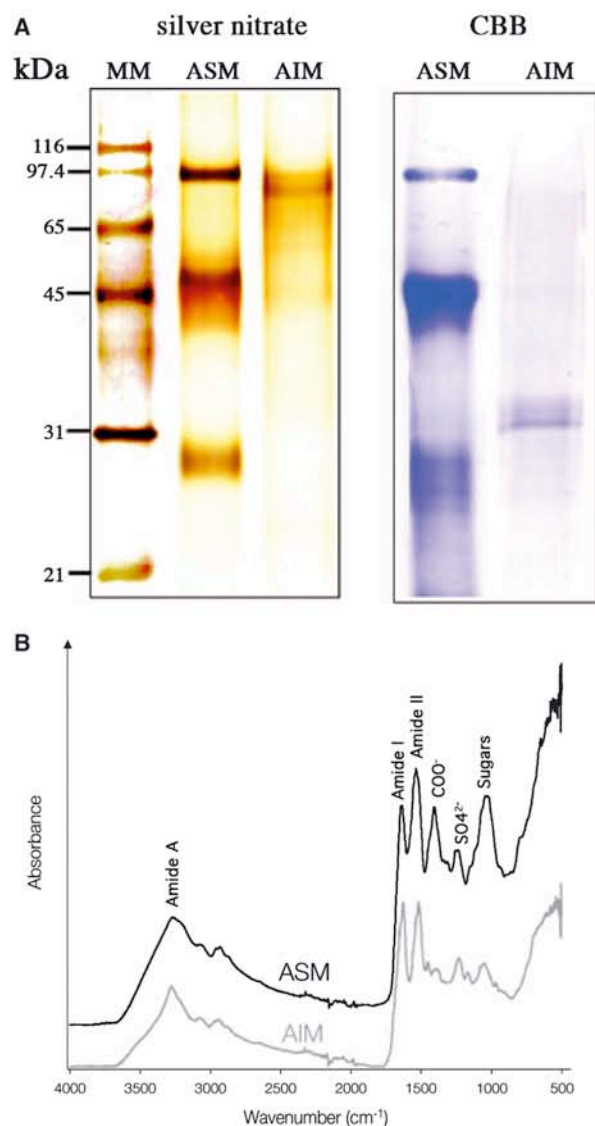
As shown in Fig. 1A-C, the shell of *U. pictorum* is composed of two mineralized layers: a thin external prismatic layer (Fig. 1B), representing less than 10% of the total shell thickness, and a thick internal nacreous layer made of flat tablets (Fig. 1C). The subsequent work was performed on the nacre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

After decalcification, the amounts of insoluble and soluble matrices were quantified: the acetic acid-soluble matrix (ASM) represents 0.04% w/w, and the acetic acid-insoluble matrix (AIM), 0.5% w/w of the shell powder. These results are consistent with previous findings on the nacreous layer of *Pinna nobilis* [16]. AIM is insoluble in most of the chaotropic agents. For subsequent electrophoretic analyses, we could only partly dissolve it in 8 M urea.

Mono-dimensional electrophoresis of the ASM and of the urea-soluble AIM shows few discrete prominent



**Fig. 1.** Scanning electron microscopy micrographs showing the microstructure of the shell of *U. pictorum*. (A) View of the complete shell broken in the transversal plane. P, prisms; N, nacre. (B) Superior view of the prismatic layer observed at the edge of the shell. The prismatic layer of *U. pictorum* is composed of packed polygonal crystallites of aragonite, the prisms, separated by an organic periprismatic sheath. (C) View of the fresh nacreous layer broken in the transversal plane. Nacre is made of superimposed aragonitic flat tablets of above 0.5 µm in thickness.



**Fig. 2.** Macromolecular and functional composition of the organic matrix of *U. pictorum*. (A) Electrophoretic analysis of organic fractions obtained by decalcification of *U. pictorum* nacreous layers with 5% acetic acid. 12% SDS/PAGE of the ASM and the AIM. The AIM was suspended in 8 M urea (60 °C, 2 h) before electrophoresis. MM, molecular mass markers. (B) Infrared spectra of the ASM and the AIM.

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

#### Fourier transform IR analysis of the ASM and AIM

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

#### Amino acid composition of the ASM and AIM

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

#### Monosaccharide composition of the ASM and AIM

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

**Table 1.** Elemental composition of the organic matrices of *U. pictorum*. (A) Amino acid composition of the ASM and of the AIM. Data are presented as molar percentage of total amino acid for each extracts. (B) Composition in neutral polysaccharides of the ASM and the AIM hydrolysed with 2 M trifluoroacetic acid at 110 °C (4 h). We observed that after hydrolysis of AIM, some unhydrolyzed compounds were still present at the bottom of the vessel. Composition in sialic acid was measured after a moderate hydrolysis with 0.016 M acetic acid at 80 °C (3 h). The quantity of sulfated sugars was determined spectrophotometrically with DMB. Data are presented in  $\text{ng}\cdot\mu\text{g}^{-1}$  of total matrix and in percentage of total identified carbohydrate compounds. ND, not detected. TR, trace.

<i>Unio pictorum</i>	ASM	AIM
(A) Amino acid composition (% of the total amino acid)		
Asx	12.5	8.3
Glx	9.6	4.3
Ser	7.9	10.1
His	1.5	ND
Gly	16.4	24.3
Thr	4.5	1.8
Ala	11.1	24.7
Arg	3.3	3.2
Tyr	2.3	1.8
Cys	2.5	1.1
Val	4.3	2.7
Met	1.3	0.8
Phe	3.0	3.8
Ile	2.6	1.9
Leu	4.6	6.3
Lys	5.7	3.1
Pro	7.0	1.8
Trp	ND	ND
(B) Composition in neutral polysaccharides [ $\text{ng}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ of matrix (% of the total)]		
Fucose	0.7 (2)	0.3 (1)
Rhamnose	ND	ND
Arabinose	ND	ND
Galactose	2.4 (6)	2.8 (10)
Glucose	9.3 (23)	5.2 (18)
Mannose	1.1 (3)	0.4 (1)
Xylose	0.3 (1)	0.1 (0.4)
Galactosamine	7.5 (17)	2.3 (8)
Glucosamine	9.3 (23)	16.6 (59)
Galacturonic acid	ND	ND
Glucuronic acid	ND	ND
Neu5Ac	TR	TR
Neu5Gc	ND	ND
Sulfated sugars	9.6 (24)	0.6 (2)
Total	40.2 (100)	28.3 (100)

were detected, but these could not be attributed to standard monosaccharides. For both extracts, four neutral monosaccharides constitute the main part of the sugar moieties: glucosamine and glucose, then galactosamine and galactose. The sum of these four sugars represents 93% and 97% of the total amount

of neutral and amino sugars investigated for ASM and AIM, respectively. AIM contains two-fold more glucosamine than ASM (60% and 30%, respectively). The two extracts contain only traces of fucose, mannose and xylose. Rhamnose, arabinose, galacturonic and glucuronic acids were not detected in both extracts. Sialic acids were observed to be present in very small amounts in ASM and AIM. Neu5Ac was detected as traces, whereas Neu5Gc was deficient in both matrices.

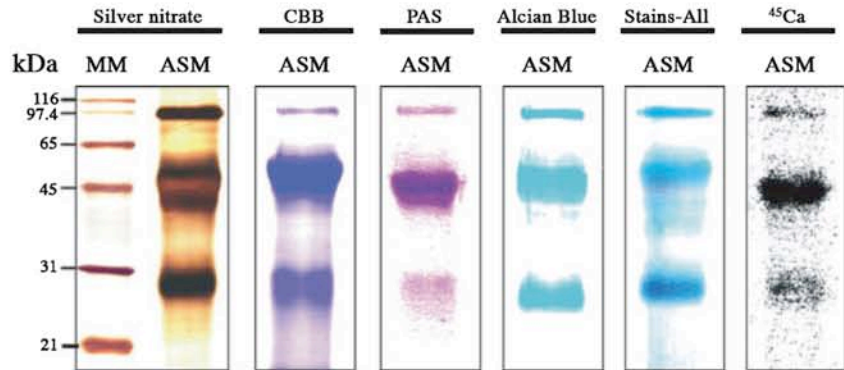
The sulfated sugar content of ASM and AIM was measured by spectrophotometry. High amounts of sulfated sugars were quantified in the ASM, representing 24% of the total sugar content. This corroborates previous findings on molluscan shell soluble matrices [5,18].

### ASM polysaccharide staining and ASM calcium-binding ability on gels

Figure 3 shows the different staining of the ASM on gel, in addition to the autoradiography after  $^{45}\text{Ca}$  incubation. The three major proteins, provisionally called P95, P50 and P29, stain with the nonspecific staining, silver nitrate and CBB. In addition, they stain with periodic acid/Schiff (PAS), Alcian Blue and Stains-All (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) dyes. The PAS reagent reveals vicinal diol groups on peripheral sugar and sialic acids with a specific red/purple colour. Furthermore, the Alcian Blue staining procedure, which was used in this study at pH 1, is characteristic of the very acidic sulfated sugars [19]. The results show that P95, P50 and P29 are glycosylated and that they bear sulfate groups (Fig. 3). The specific metachromatic blue colour observed for these three bands with the carbocyanine dye is characteristic of potential calcium-binding proteins [20]. The putative calcium-binding ability of the three main proteins was confirmed by the  $^{45}\text{Ca}$  overlay test. In comparison to the calcium-binding activity of the calmodulin (positive control, not shown), the signal obtained from the three glycoproteins is relatively weak under denaturing conditions, but consistently higher than the background signal.

### *In vitro* inhibition of calcium carbonate precipitation

Figure 4 shows the result of the inhibition test. In the very initial part of the reaction, when  $\text{CaCl}_2$  is added to the  $\text{NaHCO}_3$  solution, the pH decreases instantaneously from 8.4/8.5 to 7.7 before rising again to 7.9/8 in approximately 30 s. In the blank experiment (no

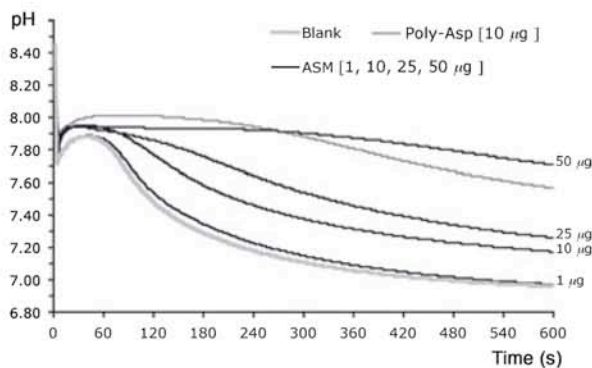


**Fig. 3.** Analysis of *U. pictorum* ASM by gel electrophoresis. (A) One-dimensional 12% polyacrylamide gel electrophoresis of ASM, under denaturing condition, after staining with silver nitrate, CBB, PAS, Alcian Blue, Stains-All and after autoradiography with <sup>45</sup>Ca. Similar amounts of shell matrix were analyzed (40 μg·lane<sup>-1</sup>). MM, molecular mass markers.

added matrix) the pH decreases without any time lag (approximately 60 s), corresponding to the rapid precipitation of calcium carbonate (Fig. 4). When ASM was present in the solution, we observed a delay of CaCO<sub>3</sub> precipitation. The effect of the matrix was efficient from 10 μg and the delay observed was dose-dependent when 25 or 50 μg of ASM were added. Above 50 μg, the inhibition was total. We used poly L-aspartic acid (10 μg) as a positive control of inhibition. The result obtained with the matrix of the *U. pictorum* shell is consistent with that obtained from bivalve nacre extracts [21].

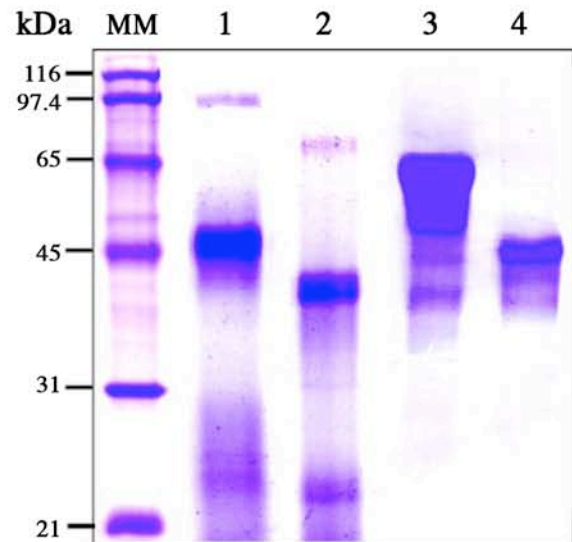
**ASM deglycosylation studies**

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



**Fig. 4.** *In vitro* inhibition of precipitation of CaCO<sub>3</sub> by ASM. The pH of the solution was recorded as a function of time. The graph shows that ASM starts to be effective at 10 μg. The delay observed is dose-dependent.

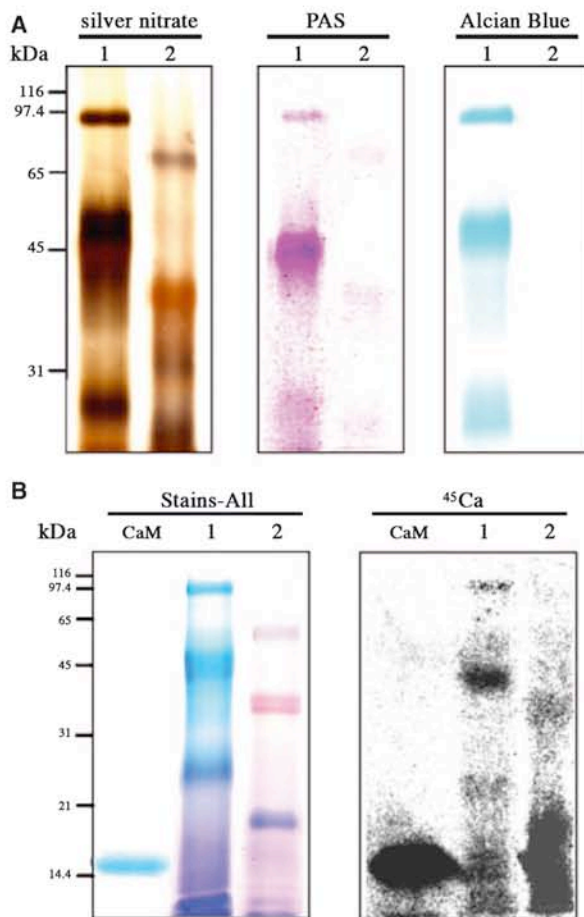
at 0 °C, under a nitrogen atmosphere, to preclude peptide bond hydrolysis but allow the removal of most of the sugars. The trifluoromethanesulfonic acid (TFMS) deglycosylation produced a drastic effect on the ASM (Fig. 5). This is particularly visible when the samples were tested on gel (lanes 2–3).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



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

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

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



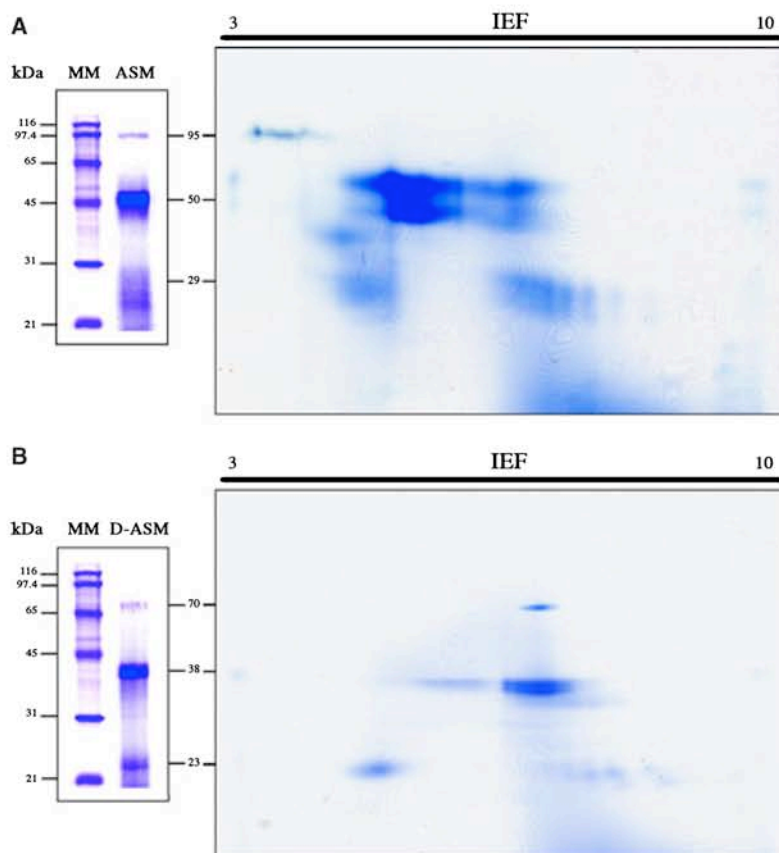
**Fig. 6.** Characterization of carbohydrate residues by chemical deglycosylation of *U. pictorum* ASM followed by staining with polyanionic dyes and calcium-binding test on SDS/PAGE. (A) 10% SDS/PAGE stained with silver nitrate, PAS and Alcian Blue. MM, molecular mass markers. Lane 1, ASM; lane 2, deg-ASM.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

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

#### ASM analysis on 2D gel electrophoresis

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

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



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

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

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

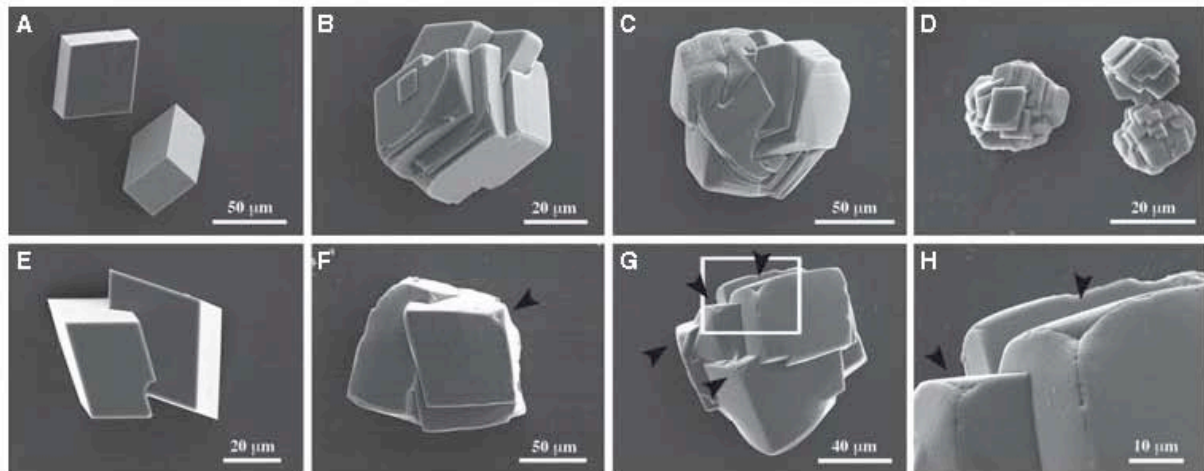
The results of the crystal growth experiment are shown in Fig. 8. When no matrix is added to the solution, calcium carbonate crystals, obtained *de novo* by the slow diffusion method, form rhombohedra, typical of calcite (Fig. 8A). The crystals present smooth surfaces and sharp edges. The length of their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

line aggregates decreases (around 20  $\mu\text{m}$ , Fig. 8D), which suggests that the ASM starts to inhibit crystal growth.

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

#### Discussion

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



**Fig. 8.** Scanning electron micrographs of synthetic calcite crystals grown *in vitro* with different concentrations of native ASM and deg-ASM. Effects of matrices were tested at concentrations in the range 0.1–20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$ . (A) Negative control without matrix. (B) ASM at 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . (C) ASM at 5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . (D) ASM at 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . (E) Deg-ASM at 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . (F) Deg-ASM at 5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . (G) Deg-ASM at 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . (H) Magnification of the square shown in (G). Black arrows indicate truncated corners.

used, the matrix comprises two fractions, one acetic acid-soluble and the other, acetic acid-insoluble. The amino acid compositions of both fractions are typical of soluble and insoluble nacre fractions, respectively. The ASM is fairly acidic. This finding corroborates previous data obtained from the ASM extracted from nacre [24]. The amounts of Asx and Glx residues are significantly lower than in calcitic microstructures [25,26]. The AIM exhibits the signature of hydrophobic proteins (enrichment in Gly and Ala), which belong to the 'silk fibroin-like' group [27,28]. Interestingly, the amino acid composition of the AIM of *U. pictorum* resembles that reported by Weiner *et al.* [29] on *Neotrigonia margaritacea*, another paleoheterodont bivalve. In particular, the same decreasing order of major amino acids is observed: Gly, Ala, Ser and Asx. Similar results were obtained with the insoluble nacreous matrices of the edible mussel, *Mytilus edulis*, of the cephalopod, *Nautilus pompilius* [30], and of the freshwater mussel, *Anodonta cygnea* [8], this latter being closely related to *U. pictorum*.

However, the distinction between a soluble and insoluble matrix is purely technical. Recent findings on nacre from pteriomorph bivalves have suggested that the so-called 'insoluble' matrix may be secreted as an aqueous gel [1], in which each aragonitic nacre tablet is crystallized from transient amorphous calcium carbonate [31], growing centrifugally from a nucleation centre, as previously suggested by Nakahara [32]. This gel also comprises acidic glycoproteins, which may surround the growing nacre tablets or be occluded within them [33]. The complex formed by the gel and the aci-

dic glycoproteins is itself embedded between chitin layers, which display a framework function [34]. We reasonably assume that this model can be extrapolated to paleoheterodont bivalves, such as *U. pictorum*. Indeed, pteriomorph and paleoheterodont nacles exhibit a similar 'brick wall' structure in cross-section [11,35]. Furthermore, they present similarities at the crystallographic level [36]. Finally, our biochemical data corroborate those obtained from pteriomorph matrices. First, even by considering that all Asx and Glx residues are in their acidic form, both nacre ASMs exhibit much lower acidic amino acid compositions (Asx + Glx < 22%) than calcite-associated matrices [8,25 27,29,37]. Second, both exhibit a lower capacity than calcite-associated matrices to inhibit calcium carbonate precipitation in the pH-metric and  $\text{CaCO}_3$  precipitation interference tests [26,38,39]. Third, as regards the saccharidic composition of the shell matrices of *U. pictorum*, high amounts of glucosamine are detected in both extracts. With our analytical technique involving trifluoroacetic acid hydrolysis, we cannot distinguish glucosamine from its *N*-acetylated form, which is the monomer of chitin. Chitin has been detected in the insoluble shell matrices of diverse groups of molluscs, such as pteriomorph bivalves [14,27,40,41], and is proposed to be involved in the 3D structuration of the matrix [34]. In our analyses, glucosamine is two-fold more concentrated in the AIM than in the ASM. This strongly suggests that a large amount of the detected glucosamine originates from the partial hydrolysis of chitin by trifluoroacetic acid.



In the present paper, we have unequivocally demonstrated that the major proteins of the ASM (P95, P50 and P29) are heavily glycosylated. The sugar moiety is partly composed of acidic sugars, in particular sulfated ones, which are responsible for the lowering of the pI of ASM components. Similarly, the nacre of the unionoida, *Lamellidans marginalis*, also exhibits a weakly acidic amino acid composition, a high amount of polysaccharide and the presence of sulfated groups [12]. Previous studies have reported the occurrence of sulfated sugars in the mollusc matrix [41,42]. More recently, Marxen and Becker [5] observed that sulfate groups are quantitatively important in the ASM, but depleted in the AIM of the shell of the freshwater gastropod, *Biomphalaria glabrata*. We also demonstrated that the polysaccharide moiety shows a calcium-binding activity, which is dramatically altered after deglycosylation. There is a striking example among vertebrates where the acidic saccharidic moiety of a calcified tissue-associated glycoprotein exhibits a calcium-binding capacity [43]. Calcium-binding activity due to saccharides is also known in the echinoderm skeletal matrix [44], and has been suspected among mollusc shell components [45]. Although we did not measure the affinity of the matrix for calcium, we suspect that it is low, a fact in agreement with the function of the matrix, which temporarily sequesters calcium ions and releases them where required [46]. Furthermore, we demonstrated that the saccharidic moiety of the shell glycoproteins modulates the shape of calcite crystals grown *in vitro*. In particular, the deglycosylation of the ASM leads to the formation of truncated corners without any microsteps. Interestingly, similar patterns were observed with an unglycosylated matrix extract of the pteriomorph mollusc, *Atrina rigida* [47], and similar microsteps patterns were observed with glycosylated proteins of different sources [48,49].

One central finding of our study is that the saccharidic moieties of the shell matrix play a key role, although this role is not yet understood. Most of the studies performed on molluscs to date have focused on the matrix proteinaceous components, and only a few reports deal with the characterization of carbohydrates, in particular studies by Simkiss [41], Crenshaw [18], Marxen & Becker [5] and Marxen *et al.* [50]. The first sequence of an oligosaccharide covalently N-linked to the dermatopontin of the snail *Biomphalaria glabrata* was obtained only recently [51]. Various functions have been proposed for ASM polysaccharides in CaCO<sub>3</sub> mineralization. Acidic sugars, especially sulfated ones, may concentrate calcium ions at the vicinity of the acidic proteins, inducing crystal nucleation

[52,53]. This was observed histochemically by Crenshaw and Ristedt [42], and confirmed recently by Nudelman *et al.* [33]. Polysaccharides may also play a role in mineral surface recognition [54] and in polymorph selection [55]. They also may be involved in water or ion entrapment within the hydrogel, and they may modify its viscosity at the nanoscale, as mucins and carrageenans can do [21,56]. Lastly, matrix polysaccharides may display an active role in mediating mantle cell-matrix interaction and cell signalling [57]. Further experiments, including primary structure determination and *in situ* localization, are essential for improving our understanding of the function of these matrix glycoproteins in biomineralization.

## Experimental procedures

### Shell material

Fresh shells, 10–16 mm in length, of the freshwater bivalve *U. pictorum* were collected in the canal of Burgundy (Dijon, France). Like most, if not all, unionoida bivalves, *U. pictorum* exhibits a bilayered shell, made of a thin prismatic outer and a thick nacreous layer. The whole shell is aragonitic. For direct microscopic observations, freshly fragmented cleaned shells were carbon-sputtered and directly observed in the secondary electron mode with a JEOL 6400 scanning electron microscope (JEOL Europe SAS, Croissy sur Seine, France) at the Laboratory of 'Réactivités des Solides', Dijon.

### Shell preparation and matrix extraction

The whole shells were immersed in 1% NaOCl for 24 h to remove the periostracum and superficial contaminants, followed by thorough rinsing with water. This treatment also disaggregates the outer thin prismatic layer. The shells were mechanically abraded until obtaining a pure nacre layer. They were then cleaned in water and crushed. The entire extraction procedure was performed at 4 °C in 5% acetic acid, as previously described [21,26], and we obtained an ASM and AIM. Both were freeze-dried and weighed.

### ASM and AIM analysis on mono-dimensional SDS/PAGE

The separation of matrix components, both from AIM and ASM, was performed under denaturing conditions by mono-dimensional SDS/PAGE in 12% polyacrylamide gels (Mini-Protean 3; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) according to Laemmli [58]. The protein concentration of the ASM was estimated with the bicinchoninic acid (BCA) assay (BCA-200 Protein Assay kit, Pierce, Rockford, IL, USA).

Fifty micrograms of ASM were loaded in each well. One mg of AIM was partly dissolved in 400  $\mu\text{L}$  of 8 M urea at 60 °C (2 h). Twenty  $\mu\text{L}$  of urea-soluble AIM were loaded on gel.

Proteins were visualized on gel after staining with silver nitrate [59] or with CBB R-250. To check the reproducibility of our extraction procedure, we performed several decalcifications from single shells, or from different pools of shells.

### Infrared analysis on ASM and AIM

IR spectra were recorded with dry lyophilized samples at a 2  $\text{cm}^{-1}$  resolution with ten scans, on a Fourier transform IR spectrometer Brücker Vector 22 (Kahlsrhur, Germany) equipped with a Specac Golden Gate™ ATR device (Specac Ltd., Orpington, UK) in the wave number range of 4000–500  $\text{cm}^{-1}$ .

### Amino acid composition of ASM and AIM

The amino acid compositions of the two fractions were determined by the Eurosequence Company (Groningen, the Netherlands). Freeze-dried samples were hydrolyzed with 5.7 M HCl in the gas phase for 1.5 h at 150 °C. The resulting hydrolysates were analyzed on an HP 1090 Aminoquant (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) by an automated two-step precolumn derivatization with *O*-phthalaldehyde for primary and *N*-(9-fluorenyl)methoxycarbonyl for secondary amino acids. Cysteine residues were quantified after oxidation. Tryptophan was not detected.

### Monosaccharide analysis of ASM and AIM

For quantification of neutral monosaccharide contents, lyophilized samples of ASM and AIM (100  $\mu\text{g}$ ) were hydrolyzed in 100  $\mu\text{L}$  2 M trifluoroacetic acid at 105 °C for 4 h. Samples were evaporated to dryness before being dissolved with 100  $\mu\text{L}$  20 mM NaOH. The neutral and amino sugar contents of the hydrolysates were determined by high performance anion exchange with pulsed amperometric detection (HPAE-PAD) on a CarboPac PA100 column (Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA). Carbohydrate standards (Sigma, St Louis, MO, USA) were injected at 16, 8 and 4 p.p.m. Nonhydrolyzed samples were analyzed similarly to detect free monosaccharides that could have contaminated the sample during dialysis. Note that this technique does not allow the quantification of sialic acids, which are destroyed during hydrolysis with trifluoroacetic acid.

Sialic acid determination was performed by HPAE-PAD after a moderate hydrolysis (0.016 M acetic acid, 3 h, 80 °C), as described by Rohrer [60]. The solution containing the released sialic acids was centrifuged and filtered (Centricon, 3 kDa cut-off; Millipore, Bedford, MA, USA), then dried under vacuum. Samples were re-dissolved in Milli-Q water (Millipore) for measurement.

### Spectrophotometric determination of sulfated carbohydrates

The direct 1,9-dimethylmethylene blue (DMB) method for quantifying sulfated polysaccharides [61] was adapted for microplate reading at 655 nm. Chondroitin 4-sulfate was used as standard for the quantification of ASM and AIM sulfated sugars.

### ASM polysaccharide staining and ASM calcium-binding ability on gels

Putative glycosylations of ASM macromolecules were studied qualitatively. In particular, saccharide moieties were investigated on denaturing mini-gels by using Alcian Blue 8GX [62], at pH 1 in order to stain specifically sulfated sugars [19], and PAS staining, specific of almost all carbohydrate residues [63]. The calcium-binding ability of ASM and deg-ASM was tested with two techniques: the cationic carbocyanine dye Stains-All staining [20] and the  $^{45}\text{Ca}$  overlay procedure [64].

### *In vitro* inhibition of calcium carbonate precipitation by the ASM

ASM were subsequently assayed for *in vitro* inhibition of calcium carbonate precipitation [38]. Three ml of 40 mM  $\text{CaCl}_2$  were rapidly added to 3 mL of 40 mM  $\text{NaHCO}_3$  containing variable amounts of protein extract (1–50  $\mu\text{g}$ ). For each experiment, the pH was constantly recorded with a combined glass electrode coupled with a pH-meter (model GLP21; Crison, Barcelona, Spain), connected to a computer. Each concentration was tested in triplicate. Blank tests were performed in absence of protein. Positive controls were performed with poly L-aspartic acid (Sigma).

### ASM deglycosylation studies

Chemical deglycosylation of 5 mg of ASM was performed with 1.5 mL of a mixture of TFMS/anisole (2 : 1, v/v) at 0 °C for 3 h, under  $\text{N}_2$  atmosphere, with constant stirring according to Edge *et al.* [22]. After neutralization with 2 mL of 50% cold pyridine, the aqueous phase was extracted twice with diethyl ether and then extensively dialyzed against water (5 days) before being lyophilized. Fetuin was treated similarly and used as a positive control of deglycosylation by TFMS. All the deglycosylated extracts were analyzed on mono-dimensional SDS/PAGE.

### ASM analysis on 2D gel electrophoresis

Following its quantification by micro-BCA assay, the ASM as well as the chemically deglycosylated ASM, were fractionated by 2D electrophoresis. Isoelectric focusing (IEF) was

carried out using a Protean IEF cell (Bio-Rad). Precast 7 cm linear pH 3–10 immobilized pH gradient (IPG) strips were re-hydrated overnight at 50 V (25 °C) with 150 µL buffer containing 80 µg ASM in 6 M urea, 2 M thiourea, 4% (w/v) Chaps, 20 mM dithiothreitol, 0.1% ampholytes and 0.001% bromophenol blue. Immediately afterwards, IEF was carried out at 250 V for 15 min, followed by 8000 V until 10000 Vh. The IPG strips were subsequently transferred 10 min into 2 mL equilibration buffer (6 M urea, 2% SDS, 375 mM Tris/HCl pH 8.8, 20% glycerol) containing 130 mM dithiothreitol and 10 min into the same buffer containing 135 mM iodoacetamide. Strips were rinsed in 25 mM Tris, 192 mM glycine and 0.1% SDS (TGS), positioned on top of precast 4–10% NuPAGE® BisTris Novex SDS-polyacrylamide gels (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and fixed in place with an overlay solution of 0.5% agarose/TGS (w/v). Electrophoresis was then performed at 200 V for 40 min.

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

CaCO<sub>3</sub> precipitation was performed *in vitro* by slow diffusion of ammonium carbonate vapour in a calcium chloride solution [65]. The test was adapted as follows: 500 µL of 7.5 mM CaCl<sub>2</sub>, containing different amounts of native or chemically deglycosylated ASM (0.1 µg·mL<sup>-1</sup> to 20 µg·mL<sup>-1</sup>) were introduced in eight-well culture slides (BD Falcon; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Blank controls were performed without any sample. They were incubated for 48 h at 4 °C in a closed dessicator containing crystals of ammonium bicarbonate. They were then dried, carbon-sputtered and observed at 15 keV by scanning electron microscopy (JEOL 6400).

### Acknowledgements

This work was supported by an Aide Concertée Incitative Jeunes Chercheurs (ACI JC3049) awarded to F. Marin by the French Ministère Délégué à la Recherche et aux Nouvelles Technologies. B. Marie is financed by a PhD Fellowship (No. 15351) from the Ministère Délégué à la Recherche et aux Nouvelles Technologies. The 'Conseil Régional de Bourgogne' (Dijon, France) provided additional supports for the acquisition of new equipment in the Biogeosciences research unit (UMR CNRS 5561). B. Marie and F. Marin thank Claudie Josse (Laboratoire de Réactivités des solides, University of Burgundy) for helping to handle the scanning electron microscopy and Danielle Bavillet-Tkatchenko (UMR 5188, LSEO, University of Burgundy) for the IR measurements.

### References

- Addadi L, Joester D, Nudelman F & Weiner S (2005) Mollusc shell formation: a source of new concepts for understanding biomineralization processes. *Chemistry* **12**, 980–987.
- Simkiss K & Wilbur KM (1989) *Biomineralization – Cell Biology and Mineral Deposition*. Academic Press, Inc., San Diego, CA.
- Sud D, Doumenc D, Lopez E & Milet C (2001) Role of water-soluble matrix fraction, extracted from the nacre of *Pinctada maxima*, in the regulation of cell activity in abalone mantle cell culture (*Haliotis tuberculata*). *Tissue Cell* **33**, 154–160.
- Marin F & Luquet G (2004) Molluscan shell proteins. *C R Palevol* **3**, 469–492.
- Marxen J & Becker W (1997) The organic shell matrix of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. *Comp Biochem Physiol B* **11**, 23–33.
- Rousseau M, Bédouet L, Lati E, Gasser P, Le Ny K & Lopez E (2006) Restoration of stratum corneum with nacre lipids. *Comp Biochem Physiol B* **145**, 1–9.
- Adamkewicz SL, Harasewych MG, Blake J, Saudek D & Bult CJ (1997) A molecular phylogeny of the bivalve molluscs. *Mol Biol Evol* **14**, 619–629.
- Moura G, Vilarinho L, Guedes R & Machado J (2000) The action of some heavy metals on the calcification process of *Anodonta cygnea* (Unionoida): nacre morphology and composition changes. *Haliotis* **29**, 43–53.
- Ravera O, Cenci R, Beone GM, Dants M & Lodigiani P (2003) Trace element concentrations in freshwater mussels and macrophytes as related to those in their environment. *J Limnol* **62**, 61–70.
- Towe K & Hamilton G (1968) Ultrastructure and inferred calcification of the mature and the developing nacre in bivalve molluscs. *Calc Tiss Res* **1**, 306–318.
- Checa A & Rodriguez-Navarro A (2001) Geometrical and crystallographic constraints determine the self-organization of the shell microstructures in Unionidae (Bivalvia: Mollusca). *Proc Biol Sci* **268**, 771–778.
- Ravindranath MH & Rajeswari Ravindranath RM (1974) The chemical nature of the shell of molluscs: 1. Prismatic and nacreous layers of a bivalve *Lamellidans marginalis* (Unionidae). *Acta Histochem* **48**, 26–41.
- Petit HP (1981) Survol de la minéralisation chez les unionidae. *Haliotis* **11**, 181–195.
- Machado J, Reis M, Coimbra R & Sa C (1991) Studies on chitin and calcification in the inner layers of the shell of *Anodonta cygnea*. *J Comp Physiol B* **161**, 413–418.
- Taylor JD, Kennedy WJ & Hall A (1969) The shell structure and mineralogy of the Bivalvia. Introduction, Nuculacea Trigonacea. *Bull Br Mus Nat Hist Zool* **3**, 1–125.

- 16 Marin F, De Groot K & Westbroek P (2003) Screening molluscan cDNA expression library with anti-shell matrix antibodies. *Prot Express Purif* **30**, 246–252.
- 17 Tao Y, Zhang L & Cheung P (2006) Physicochemical properties and antitumor activities of water-soluble native and sulfated hyperbranched mushroom polysaccharides. *Carbohydr Res* **341**, 2261–2269.
- 18 Crenshaw M (1972) The soluble matrix of *Mercenaria mercenaria* shell. *Biomaterial Res* **6**, 6–11.
- 19 Lev R & Spicer S (1964) Specific staining of sulfate groups with Alcian blue at low pH. *J Histochem Cytochem* **12**, 309.
- 20 Campbell KP, MacLennan DH & Jorgensen AO (1983) Staining of the Ca<sup>2+</sup>-binding proteins, calsequestrin, calmodulin, troponin C, and S-100, with the cationic carbocyanine dye 'Stains-All'. *J Biol Chem* **258**, 11267–11273.
- 21 Marin F, Corstjens B, Gaulejac E, De Vring-de Jong E & Westbroek P (2000) Mucins and molluscan calcification – molecular characterization of mucoperlin, a novel mucin-like protein from the nacreous shell layer of the fan mussel *Perna nobilis* (Bivalvia, Pteriomorpha). *J Biol Chem* **275**, 20667–20675.
- 22 Edge AS, Faltynek CR, Hof L, Reichert LE & Weber P (1981) Deglycosylation of glycoproteins by trifluoromethanesulfonic acid. *Anal Biochem* **118**, 131–137.
- 23 Edge AS (2003) Deglycosylation of glycoproteins with trifluoromethanesulfonic acid: elucidation of molecular structure and function. *Biochem J* **376**, 339–350.
- 24 Nakahara H, Bevelander G & Kakei M (1982) Electron microscopic and amino acid studies on the outer and inner shell layers of *Haliotis rufescens*. *Venus* **41**, 33–46.
- 25 Sarashina I & Endo K (1998) Primary structure of a soluble matrix protein of scallop shell: implications for calcium carbonate biomineralization. *Am Mineral* **83**, 1510–1515.
- 26 Marin F, Amons A, Guichard N, Stiger M, Hecker A, Luquet G, Layrolle P, Alcaraz G, Riondet C & Westbroek P (2005) Caspartin and calprismin, two proteins of the shell calcitic prisms of the mediterranean fan mussel *Perna nobilis*. *J Biol Chem* **280**, 33895–33908.
- 27 Grégoire C (1972) Structure of the molluscan shell. In: *Chemical Zoology*, Vol. II (Florkin M & Scheer BT, eds), pp. 45–102. Academic Press, New York, NY.
- 28 Sudo S, Fujikawa T, Nagakura T, Ohkubo T, Sakaguchi K, Tanaka M, Nakashima K & Takahashi T (1997) Structure of mollusc shell framework proteins. *Nature* **387**, 563–564.
- 29 Weiner S, Lowenstam HA & Hood L (1976) Characterization of 80-million-year-old mollusc shell proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **73**, 2541–2545.
- 30 Keith J, Stockwell S, Ball D, Remillard K, Kaplan D, Thannhauser T & Sherwood R (1993) Comparative analysis of macromolecules in mollusc shells. *Comp Biochem Physiol B* **105**, 487–496.
- 31 Weiss IM, Tuross N, Addadi L & Weiner S (2002) Mollusc larval shell formation: amorphous calcium carbonate is a precursor phase for aragonite. *J Exp Zool* **293**, 478–491.
- 32 Nakahara H (1991) Nacre formation in bivalve and gastropod molluscs. In: *Mechanisms and Phylogeny of Mineralization in Biological Systems* (Suga S & Nakahara H, eds), pp. 343–350. Springer-Verlag, New York, NY.
- 33 Nudelman F, Gotliv B, Addadi L & Weiner S (2006) Mollusc shell formation: mapping the distribution of organic matrix components underlying a single aragonitic tablet in nacre. *J Struct Biol* **153**, 176–187.
- 34 Levi-Kalisman Y, Falini G, Addadi L & Weiner S (2001) Structure of the nacreous organic matrix of a bivalve mollusc shell examined in the hydrated state using cryo-TEM. *J Struct Biol* **135**, 8–17.
- 35 Mutvei H (1980) The nacreous layer in molluscan shells. In: *The Mechanisms of Biomineralization in Animals and Plants. Proceedings of the Third International Biomineralization Symposium* (Omori M & Watabe N, eds), pp. 49–56. Tokai University Press, Tokyo.
- 36 Chateigner D, Hedegaard C & Wenk H (2000) Mollusc shell microstructures and crystallographic textures. *J Struct Geol* **22**, 1723–1735.
- 37 Bédouet L, Schuller MJ, Marin F, Milet C, Lopez E & Giraud M (2001) Soluble proteins of the nacre of the giant oyster *Pinctada maxima* and the abalone *Haliotis tuberculata*: extraction and partial analysis of nacre proteins. *Comp Biochem Physiol B* **128**, 389–400.
- 38 Wheeler AP, George JW & Evans CA (1981) Control of CaCO<sub>3</sub> nucleation and crystal growth by soluble matrix of oyster shell. *Science* **212**, 1397–1398.
- 39 Weiss IM, Kaufmann S, Mann K & Fritz M (2000) Purification and characterization of Perlucin and Perlustrin, two new proteins from the shell of the mollusc *Haliotis laevigata*. *Biochem Biophys Res Commun* **267**, 17–21.
- 40 Goffinet G & Jeuniaux C (1979) Distribution et importance quantitative de la chitine dans les coquilles de mollusques. *Cahiers Biologie March* **20**, 341–349.
- 41 Simkiss K (1965) The organic matrix of the oyster shell. *Comp Biochem Physiol* **16**, 427–435.
- 42 Crenshaw M & Ristedt H (1976) The histochemical localization of reactive groups in septal nacre from *Nautilus pompilius*. In: *The Mechanisms of Mineralization in the Invertebrates and Plants* (Watabe N & Wilbur KM, eds), pp. 355–367. University of South Carolina Press, Columbia, OH.
- 43 Gaus B & Hoffman W (1993) Calcium binding to sialic acids and its effect on the conformation of ependymins. *Eur J Biochem* **217**, 275–280.
- 44 Farach-Carson M, Carson D, Collier J, Lennarz W, Park H & Wright G (1989) A calcium-binding, asparagine-linked oligosaccharide is involved in skeleton

- formation in the sea urchin embryo. *J Cell Biol* **109**, 1289–1299.
- 45 Samata T (1990) Ca-binding glycoproteins in molluscan shells. with different types of ultrastructure. *Veliger* **33**, 190–201.
- 46 Mann S (1988) Molecular recognition in biomineralization. *Nature* **332**, 119–124.
- 47 Albeck S, Addadi L & Weiner S (1996) Regulation of calcite crystal morphology by intracrystalline acidic proteins and glycoproteins. *Connect Tissue Res* **35**, 365–370.
- 48 Albeck S, Aizenberg J, Addadi L & Weiner S (1993) Interactions of various skeletal intracrystalline components with calcite crystals. *J Am Chem Soc* **115**, 11691–11697.
- 49 Fu G, Qiu SR, Orme CA, Morse DE & De Yoreo JJ (2005) Acceleration of calcite kinetics by abalone nacre proteins. *Adv Mater* **17**, 2678–2683.
- 50 Marxen J, Hammer M, Gehrke T & Becker W (1998) Carbohydrates of the organic shell matrix and the shell-forming tissue of the snail *Biomphalaria glabrata* (Say). *Biol Bull* **194**, 231–240.
- 51 Marxen J, Nimtz M, Becker W & Mann K (2003) The major soluble 19.6 kDa protein of the organic shell matrix of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* is an N-glycosylated dermatopontin. *Biochim Biophys Acta* **1650**, 92–98.
- 52 Greenfield E, Wilson D & Crenshaw M (1984) Ionotropic nucleation of calcium carbonate by molluscan matrix. *Am Zool* **24**, 925–932.
- 53 Addadi L, Moradian J, Shay E, Maroudas N & Weiner S (1987) A chemical model for the cooperation of sulfates and carboxylates in calcite crystal nucleation: relevance to biomineralization. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 2732–2736.
- 54 Didymus J, Oliver P, Mann S, DeVries A, Hauschka P & Westbroek P (1993) Influence of low-molecular-weight and macromolecular organic additives on the morphology of calcium carbonate. *J Chem Soc Faraday Trans* **98**, 2891–2900.
- 55 Falini G, Albeck S, Weiner S & Addadi L (1996) Control of aragonite and calcite polymorphism by mollusc shell macromolecules. *Science* **271**, 67–69.
- 56 Deman J, Mareel M & Bruyneel E (1973) Effects of calcium and bound sialic acid on the viscosity of mucin. *Biochim Biophys Acta* **297**, 486–490.
- 57 Liu W, Chen L, Zhu J & Rodgers G (2006) The glycoprotein hGC-1 binds to cadherin and lectins. *Exp Cell Res* **312**, 1785–1797.
- 58 Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- 59 Morrissey JH (1981) Silver stains for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal Biochem* **117**, 307–310.
- 60 Rohrer J (2000) Analysing sialic acids using high-performance anion-exchange chromatography. *Anal Biochem* **283**, 3–9.
- 61 Barbosa I, Garcia S, Barbier-Chassefière V, Caruelle JP, Martelly I & Papy-Garcia D (2003) Improved and simple micro assay for sulfated glycoaminoglycans quantification in biological extracts and its use in skin and muscle tissue studies. *Glycobiology* **13**, 647–653.
- 62 Wall RS & Gyi TJ (1988) Alcian blue staining of proteoglycans in polyacrylamide gels using the 'critical electrolyte concentration' approach. *Anal Biochem* **175**, 298–299.
- 63 Zacharius RM, Zell TE, Morrison JH & Woodlock JJ (1969) Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Anal Biochem* **30**, 148–152.
- 64 Maruyama K, Mikawa T & Ebashi S (1984) Detection of the calcium-binding proteins by <sup>45</sup>Ca: autoradiography on nitrocellulose membrane after sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis. *J Biochem* **95**, 511–519.
- 65 Addadi L & Weiner S (1985) Interactions between acidic proteins and crystals: stereochemical requirements in biomineralization. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 4110–4114.



DOI: 10.1002/cbic.200800159

## Nacre Calcification in the Freshwater Mussel *Unio pictorum*: Carbonic Anhydrase Activity and Purification of a 95 kDa Calcium-Binding Glycoprotein

Benjamin Marie,<sup>\*,[a]</sup> Gilles Luquet,<sup>\*,[a]</sup> Laurent Bédouet,<sup>[b]</sup> Christian Millet,<sup>[b]</sup>  
Nathalie Guichard,<sup>[a]</sup> Davorin Medakovic,<sup>[c]</sup> and Frédéric Marin<sup>\*,[a]</sup>

*The formation of the molluscan shell is finely tuned by macromolecules of the shell organic matrix. Previous results have shown that the acid-soluble fraction of the nacre matrix of the freshwater paleoheterodont bivalve Unio pictorum shell displays a number of remarkable properties, such as calcium-binding activity, the presence of extensive glycosylations and the capacity to interfere at low concentration with in vitro calcium carbonate precipitation. Here we have found that the nacre-soluble matrix exhibits a carbonic anhydrase activity, an important function in calcification processes. This matrix is composed of three main proteinaceous discrete fractions. The one with the highest apparent molecular weight is a 95 kDa glycoprotein that is specific to*

*the nacreous layer. P95, as it is provisionally named, is enriched in Gly, Glx and Asx and exhibits an apparent pI value of ~4, or ~7 when chemically deglycosylated. Furthermore, its glycosyl moiety, consisting of sulfated polysaccharides, is involved in calcium binding. Purified fractions of the three main proteins were digested with trypsin, and the resulting peptides were analysed by mass spectrometry. Our results suggest that identical peptides are constitutive domains of the different proteins. Partial primary structures were obtained by de novo sequencing and compared with known sequences from other mollusc shell proteins. Our results are discussed from an evolutionary viewpoint.*

### Introduction

The molluscan shell is a classical biomineralisation product, composed of one or two polymorphs of calcium carbonate—calcite and aragonite—generally assembled in superimposed layers of different textures. One of them, the nacre or mother-of-pearl, is a fascinating example of a functional inorganic/organic composite, made of 95–99% aragonite and of 1–5% organic matrix.<sup>[1–2]</sup> Nacre can be described as the compact juxtaposition of 0.5 µm-thick mineral tablets, surrounded by a thin organic layer.<sup>[3]</sup> Although the organic matrix is quantitatively a minor component, it plays an important role for the elaboration of nacre.<sup>[4]</sup> This matrix, a complex amalgamate of proteins, glycoproteins, lipids and polysaccharides including chitin, is secreted by the calcifying epithelium of the mantle, as are the mineral precursor ions.<sup>[5]</sup> The matrix macromolecules are involved in critical functions such as the arrangement of a spatially ordered scaffold, the nucleation, the orientation and growth of calcium carbonate biominerals and the inhibition of their growth.<sup>[6]</sup> Furthermore, the nacre matrix controls the calcium carbonate polymorph<sup>[7]</sup> and exhibits cell-signalling properties.<sup>[8]</sup> Finally, in one case it has been reported that the matrix exhibits a carbonic anhydrase activity,<sup>[9]</sup> an important function for converting carbon dioxide into bicarbonate ions, one of the two reagents for the synthesis of calcium carbonate.

Numerous studies on mollusc shell have characterised the primary structures of proteins associated with nacre matrix (for recent reviews, see refs. [10], [11]). The nacre proteins often exhibit modular structures, composed of different functional domains.<sup>[9, 12–19]</sup> To date, about 15 complete sequences of effective

or putative proteins associated with nacre tissues have been described, but this number can be increased considerably if EST or proteomic approaches are used.<sup>[20–23]</sup> In spite of the increasing amount of molecular data, it remains difficult to sketch the outline of the different protein families and domains involved in nacre formation, for a simple reason: all the data have been obtained from only four mollusc genera. It is unlikely that this sampling gives an accurate picture of the whole diversity of proteins associated with nacre.

On consideration of the huge size of the phylum Mollusca, and in view of the diversity of shell textures,<sup>[24]</sup> one major question that arises involves the determination of the extent to which similar shell textures, present in different taxa, are produced by homologous sets of proteins. Bivalve nacre is particularly suitable for such an issue, because the nacreous texture is known in representatives belonging to four distinct subclasses: namely the Palaeotaxodonta, the Pteriomorpha, the

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

[b] Dr. L. Bédouet, Dr. C. Millet  
UMR CNRS 5178, Biologie des Organismes Marins et Écosystèmes  
MNHN, 75231 Paris (France)

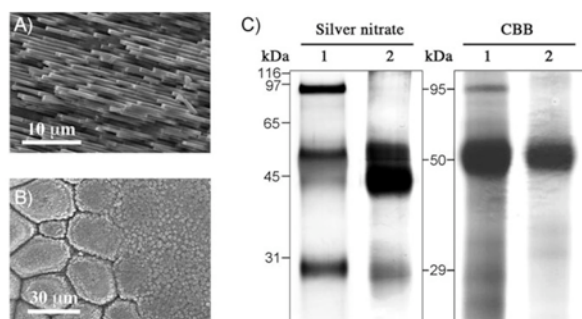
[c] Dr. D. Medakovic  
Center for Marine Research Rovinj  
52210 Rovinj (Croatia)

Palaeoheterodonta and the Anomalodesmata.<sup>[25–26]</sup> However, all the available molecular data have been retrieved only from the Pteriomorphia (*Pinctada* and *Pinna* genera), and no data for the three other subclasses have been published so far. This paper consequently represents a first step in characterizing the proteins associated with nacre in one Palaeoheterodont bivalve, in order to compare the nacre proteins of both groups. To this end we selected the freshwater unionoid bivalve *Unio pictorum*, which has an entirely aragonitic nacro-prismatic shell. In a recent paper we characterised the whole organic acid-soluble matrix (ASM) of the nacreous layer of *U. pictorum*.<sup>[27]</sup> In this paper we use the combination of biochemistry and proteomics for further characterisation of the shell matrix. In particular, we report the presence of a noteworthy carbonic anhydrase activity within the ASM matrix and we biochemically characterise P95, a nacre-specific glycoprotein capable of binding calcium ions. Finally, we have obtained a set of partial sequences of nacre mollusc shell proteins by mass spectrometry.

## Results

### Shell matrix characterisation on gels

Figures 1 A and B show the two microstructures that make up the shell layers of *U. pictorum*—the nacre (Figure 1 A) and the outer prisms (Figure 1 B), respectively—and from which their corresponding ASMs were extracted. Figure 1 C shows the electrophoretic patterns of the two ASMs, stained with Coomassie



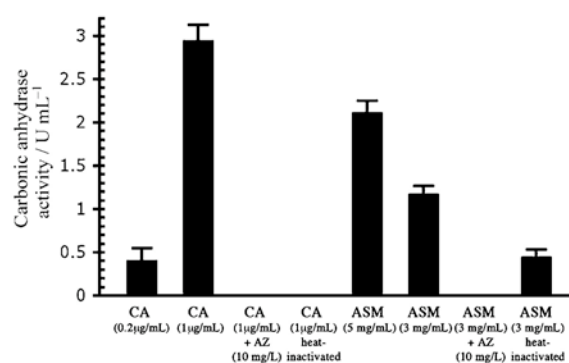
**Figure 1.** The shell of *U. pictorum* and associated skeletal matrices. A) SEM micrograph of a cross-section of the nacreous layer. B) SEM micrograph of the transition zone between the prisms (on the left, outer shell layer) and nacre tablets (on the right, internal shell layer), observed on the internal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

brilliant blue (CBB, right) and with silver nitrate (left). The two extracts are characterised by a few prominent discrete bands, in addition to a smear, particularly visible on CBB staining. Two bands, at about 50 and 29 kDa, are present in the two matrices. On the other hand, a protein migrating at 95 kDa, provisionally called P95, is observed exclusively in the nacreous layer, whatever the staining procedure used. We noticed that the electrophoretic pattern depends on the freshness of the

shells; the intensity of the P95 band tends to decrease, for example, in extracts from “old” shells (collected years after the death of the animal), which also have a different appearance (not shown).

### Carbonic anhydrase activity of the nacre ASM

Since a carbonic anhydrase (CA) activity had previously been detected in the nacre of one pteriomorphid bivalve (*Pinctada* sp.), we investigated the CA activity in the nacre ASM of *U. pictorum*, by using Maren’s phenol red colorimetric test.<sup>[28]</sup> The histogram in Figure 2 shows that the ASM extract exhibits



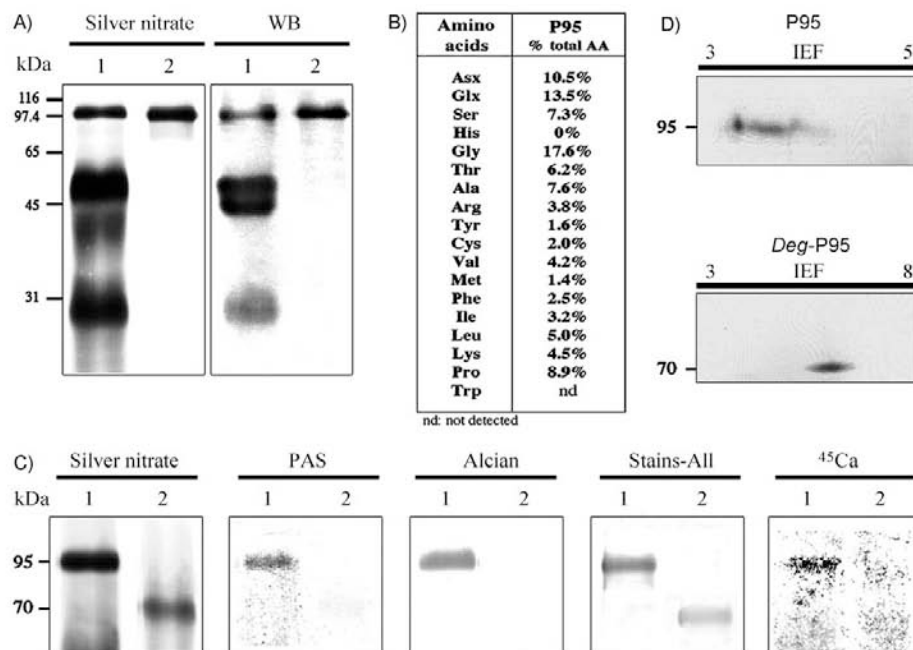
**Figure 2.** Carbonic anhydrase activity of the nacre ASM of *U. pictorum*. Commercial carbonic anhydrase (CA) from bovine erythrocytes was used as a positive control, and acetazolamide (AZ) was used as specific inhibitor of carbonic anhydrase activity. Each value is the average of three measurements.

a notable CA activity, as in the case of the bovine erythrocyte CA control. The ASM extract indeed exhibits an activity of 2.1 units mL<sup>-1</sup> of CA for a 5 mg mL<sup>-1</sup> concentration and of 1.2 units mL<sup>-1</sup> for a 3 mg mL<sup>-1</sup> concentration. This corresponds to a mean specific activity of 0.4 units per mg of matrix. The activities both of the control and of the ASM are dose-dependent. Furthermore, they are sensitive to acetazolamide inhibitor and to heat denaturation, which in the nacre of *U. pictorum* corresponds to true enzymatic activity. In the case of the heat denaturation of the ASM, however, we noticed that a residual activity, representing one third of the activity of the untreated extract at the same concentration, could still be seen after 10 min at 100 °C. One explanation might be that some enzymatic sites may remain sterically protected even after heat treatment.

### P95 characterisation

P95 was found to be specific to the nacreous layer. It was consequently investigated further. Fractionation of the nacre ASM by preparative electrophoresis resulted in the effective one-step purification of P95. The purity of the P95 extract was checked by 1D gel electrophoresis with silver nitrate staining (Figure 3 A, lane 2). A polyclonal antibody raised against puri-





**Figure 3.** Purification and characterisation of P95, a nacre-specific ASM protein. A) 12% SDS-PAGE of the nacre ASM (lane 1) and of the purified P95 (lane 2), stained with silver nitrate. The same extracts were tested on Western blot incubated with the anti-P95 polyclonal antibodies. Note that the antibodies cross-react with the other discrete components of the ASM. B) Amino acid composition of the purified P95. Asx=Asn + Asp; Glx=Gln + Glu; tryptophan residues are destroyed during the hydrolysis. C) Two-dimensional gels of purified P95 and TFMS-deglycosylated P95 (*deg*-P95), stained with CBB. D) 10% minigels of P95 (lane 1) and *deg*-P95 (lane 2), stained with silver nitrate, PAS, Alcian blue and Stains-All, and PVDF membrane revealed by autoradiography with <sup>45</sup>Ca.

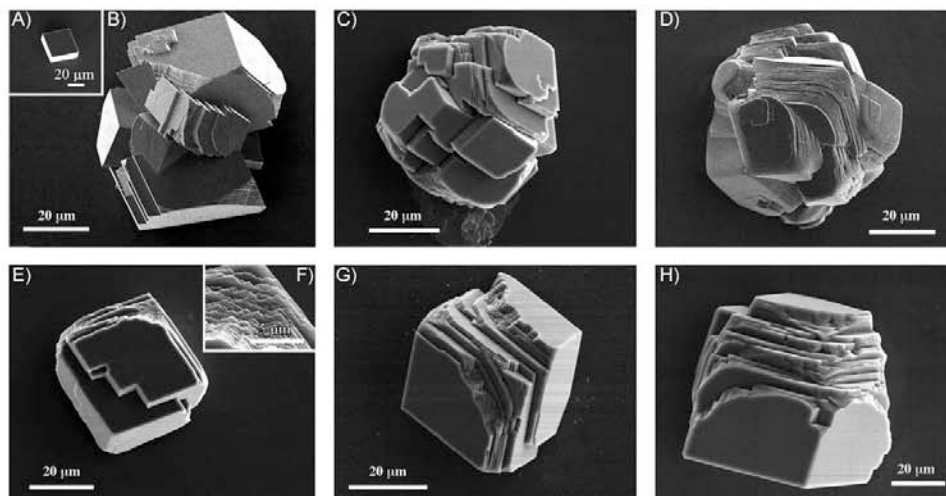
fied P95 was tested against P95 and against the ASM. The results, shown besides the silver nitrate staining (Figure 3A) indicate a strong cross-reactivity of the antibody preparation with all the discrete components of the ASM. The antibody staining is slightly more discriminatory than the silver nitrate: the thick band at 50 kDa is indeed not homogeneous, but dissociates into two bands of close apparent molecular weight. The cross-reactivity of the antibodies may be explained by P95 and the other discrete components having oligosaccharidic or protein epitopes in common.

The extract was analysed further for amino acid composition. Figure 3B shows that the four dominant amino acid residues are Gly (17.6%), Glx (13.5%), Asx (10.5%) and Pro (8.9%). In comparison with the amino acid composition of the bulk matrix,<sup>[27]</sup> P95 is enriched in Glx and Pro residues, but depleted in Ala and Asx residues. The sum of aliphatic residues is above 37%. The high level of aliphatic residues, on one hand, and of the sum of aspartate and glutamate residues, on the other, is the signature of several molluscan shell proteins. Interestingly, a search based on similarity of amino acid composition (AA-Complident, <http://expasy.org/tools/aacomp/>) identified several C-type lectins. From previous works, it is known that C-type lectins may be constituents of calcifying matrices.<sup>[13,14]</sup>

Periodic acid-Schiff (PAS) and Alcian blue staining on SDS-PAGE suggest that P95 is an acidic glycoprotein (Figure 3C). In addition, Stains-All staining of P95 in blue and <sup>45</sup>Ca overlay test both demonstrate that P95 binds calcium ions. To characterise its glycosyl moieties further, P95 was chemically deglycosylated

with trifluoromethanesulfonic acid (TFMS) at 0 °C, and the resulting extract was called *deg*-P95. When run on a gel, *deg*-P95 shows a significant shift of about 25 kDa (from 95 to 70 kDa of apparent molecular weight). This shift is primarily the result of the loss of covalently bound polysaccharides. It may also, secondarily, be the result of a difference in the amount of negative charges (due to SDS) surrounding the denatured P95 and *deg*-P95. The removal of linked polysaccharides is characterised by a drastic reduction in the PAS staining and by the complete disappearance of the Alcian blue staining. Because we had used Alcian blue under low pH conditions, this clearly suggests that the sugar moieties of P95 are sulfated. Furthermore, *deg*-P95 stains red with Stains-All and does not bind calcium ions in the <sup>45</sup>Ca overlay test. This clearly demonstrates that the calcium-binding ability of P95 is a property of its glycosyl moieties.

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



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

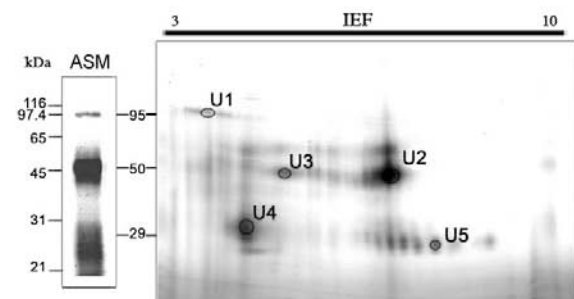
#### CaCO<sub>3</sub> precipitation interaction test

The CaCO<sub>3</sub> precipitation interaction test is commonly performed with macromolecules associated with calcitic or aragonitic structures to investigate their effect in calcium carbonate precipitation.<sup>[18,29–31]</sup> To estimate the effects of P95 on the morphology of calcium carbonate crystals, we examined crystals obtained in the presence of P95 by SEM and compared the results with those of a positive control experiment performed with the whole nacre ASM (Figure 4). Negative control experiments produced the typical calcite rhombohedrons (Figure 4A). In the presence of increasing amount of nacre ASM (0.5–10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; Figure 4B–D), the produced precipitates appear mostly as polycrystalline aggregates (60–80  $\mu\text{m}$  diameter). At 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ASM, crystals exhibit foliation with microsteps and rounded corners (Figure 4D). At the highest concentration (20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ASM), the precipitation of calcium carbonate starts to be inhibited, which results in the production of small-sized crystals (not shown). Similar effects were found with shell nacre matrices.<sup>[31]</sup>

In the presence of P95, we do not observe any polycrystalline aggregates. Furthermore, the overall morphology of monocrystals grown in the presence of P95 develops with numerous supernumerary faces organised in microsteps (Figure 4E–H). Even at the highest concentrations of P95 (up to 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), no inhibition of precipitation occurs. We note that the effect on crystal morphology is smaller with P95 alone than with the complete ASM; this suggests a synergistic effect of the different ASM components in interacting with the precipitation of carbonate crystal, as proposed by Matsuhiro et al.<sup>[32]</sup>

#### Proteomics analysis

In a first approach, we investigated the primary structure of *U. pictorum* shell proteins by N-terminal sequencing of purified proteins with preparative electrophoresis, but unfortunately no peptidic sequence was obtained, as the proteins appeared to be a mixture of isoforms of the same masses or were N-terminally blocked. Subsequently, we performed two-dimensional electrophoresis (2DE) separation followed by internal sequencing. Two-dimensional electrophoresis of nacre ASM gave satisfactory resolution for the separation of proteins,<sup>[27]</sup> and five main spots were unambiguously excised from the gel for de novo sequencing (Figure 5). All the protein spots digested with trypsin were firstly analysed by MALDI-TOF/TOF in MS and MS/MS modes. No hit was found by peptide mass fingerprint (PMF) search with the MASCOT tool of the ExPASy server, indicating that the obtained peptides do not correspond to already known sequences from the databases. Because of the



**Figure 5.** Proteomic analysis of *U. pictorum* nacre proteins. A) Separation of nacre ASM by 2D electrophoresis and coloration with CBB. Spots analysed by MS after trypsin digestion were named U1–U5.

absence of genomic data on freshwater mussels and in view of the diversity of the already sequenced mollusc shell proteins, it is not surprising that PMF searching cannot provide a reliable result for identifying proteins. On the other hand, the *m/z* values of these peptides indicate that the different spot proteins share numerous peptides of the same *m/z*, especially the spots U2 and U5 (Table 1), suggesting that different proteins of the nacre ASM may share similar peptide sequences. This was confirmed by analysis of the most abundant peptides in the MS/MS mode for de novo sequencing: peptides of the same *m/z*, such as 1313.7 from spots U2 and U5, share the same spectrum pattern. This indicates that some of the protein spots analysed on MS have amino acid sequences in common. It is important to note that, in spite of these similarities, the U2 and U5 digest patterns exhibit several non-common peptides (Table 1). This precludes the possibility of contamination between these two spots. We can also exclude the possibility that P95 and/or P50 are the results of polymerisation of P29 monomers, because they exhibit very different charges. However, this does not rule out the eventuality that the higher molecular weight proteins may be preferentially cleaved into smaller fragments: P29 (spot U5), for example, could be a cleavage product of P50 (spot U2).

As the digestion of the U1 spot (corresponding to P95) gave very few peptides, due to the insufficient amount of protein material present in a spot, purified P95 was also similarly analysed. We observed that the intensive digestion of P95 with trypsin yielded 28 to 33 peptides (Table 1), which is less than expected (about 70) from the size of deglycosylated P95 and its basic amino acid residue (Arg + Lys) composition. This suggests that some cleavage sites may be masked by the glycosyl moieties of P95.

## Sequence analysis and homology search

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

A homology search was performed with the WU-BLASTP program against the Swiss-Prot protein nonredundant database, but no relevant similarity was obtained. A complementary SIM analysis was performed with each obtained sequence aligned two-by-two with those of the known molluscan shell proteins.<sup>[11]</sup> We observed that the newly obtained sequences of *Unio* nacre ASM do not exhibit homology with other mollusc shell proteins, except for the Gly-repeat of the 1457.57 *m/z* peptide of the P95, which partly matches (five aa residues) with several short motifs of the acidic proteins: MSI31 [O02401], MSI60 [O02402] and MSI7 [Q/YWA5]. These similarities may be fortuitous, and may or may not have any phylogenetic implications.

## Discussion

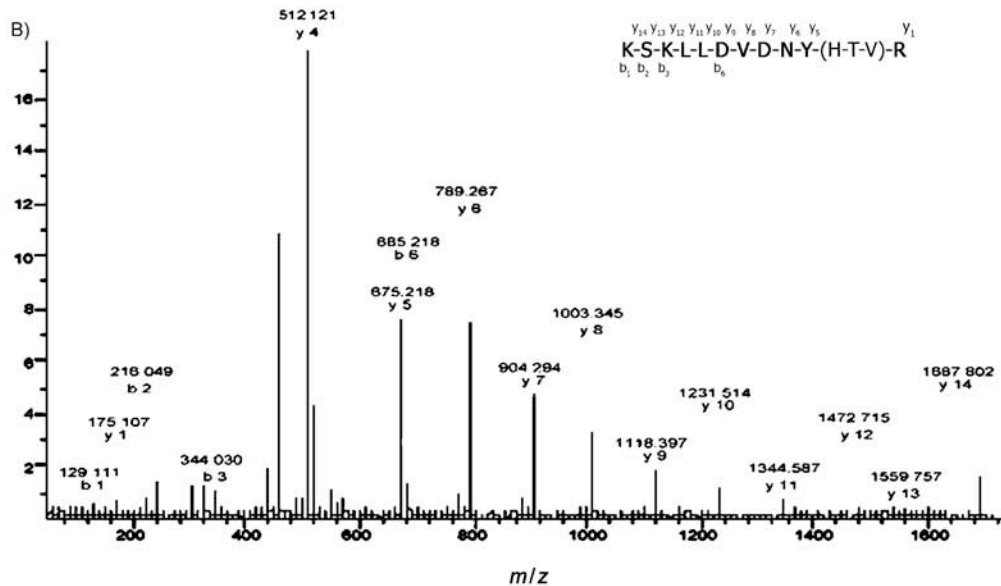
One of the challenges for understanding molluscan shell biomineralisation is the thorough biochemical and functional characterisation of the matrix macromolecules associated with

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

Protein name	<i>m/z</i> values (singly charged ions)
P95/spot U1	2029.98, 2057.00, 2069.99, 2084.04, 2812.02
P50/spot U2	1002.35, 1003.37, 1073.45, 1086.47, 1097.26, 1113.44, 1127.45, <u>1130.48*</u> , 1162.47, 1256.64, 1269.65, <u>1286.32</u> , <u>1313.68*</u> , 1329.66, 1335.64, 1345.67*, 1351.64*, 1363.69*, 1379.69*, 1408.91, 1531.56, 1550.65*, 1603.70, <u>1647.71*</u> , 1685.66, 1694.03, 1701.57, 1704.72*, 1718.75, 1724.57, 1748.81*, 1759.83, 1761.81*, 1787.79, 1804.84*, 1805.84*, 1842.92*, 1862.85*, 1881.73*, 1900.91, 1933.89, 1987.90, 2030.84*, 2079.90*, <u>2176.95*</u> , 2488.24*, 2536.23, 2637.11, 2664.32, 2809.18, 3137.45, 3162.28, 3209.44, 3271.40, 3289.37, 3339.44
P50/spot U3	<u>1130.47*</u> , 1144.50, 1196.05, <u>1313.67*</u> , <u>1326.04</u> , 1363.70*, 1379.70*, 1493.70*, 1742.05, 1765.74*, 1804.85*, <u>1805.82*</u> , 1843.92, 2810.17*
P29/spot U4	1130.48*, 1235.17, 1268.55, <u>1313.69*</u> , <u>1363.71*</u> , 1638.88*, <u>1647.73*</u> , 1804.87*, <u>1805.86*</u> , 1829.81, 1838.96, 1842.93*, 1862.87*, 2116.93, 2399.00, 2810.18*
P29/spot U5	1197.22, 1269.66, <u>1313.69*</u> , 1329.66, 1345.63*, 1351.61*, 1363.68*, 1375.57, 1379.68*, 1550.63*, 1638.84*, <u>1647.69*</u> , 1661.71, 1704.74*, 1708.80, 1748.75*, 1761.81*, 1765.73*, 1804.80*, <u>1805.83*</u> , 1819.84, <u>1842.91*</u> , 1862.83*, 1867.74, 1881.73*, 2079.85*, 2176.93*, 2383.95*, 2488.23*, 2501.21, 2504.23, 2705.13
P95	<u>1025.59</u> , 1100.57, 1114.57, 1179.61, <u>1242.66</u> , 1300.54, 1326.65, 1328.64, 1344.68, 1357.64, 1386.67, 1405.68, <u>1457.72</u> , 1475.77, 1493.72*, 1657.75, 1670.79, <u>1687.83</u> , 1709.79, 1732.77, 1765.71*, 2028.58, <u>2069.98</u> , 2085.99, 2192.14, 2271.13, 2293.09, 2309.06, 2383.92*, <u>2399.22</u> , <u>2421.17</u> , 2828.03, 3312.25

\*) Peptides of the same *m/z* common in different purified proteins. In bold: peptides that gave internal full or partial sequence by analysis of MS/MS spectra. Underlined: peptide analysed in MS/MS mode.

A)  
 Search Parameter: Charge=, MS Tol.:0.2 Da, MSMS Tol.:0.3 Da, RapiDeNovo  
 Tree hierarchy    Calc. MH+    Meas. Mr    Calc. Mr    Dev.(Da)    Score    Sequence  
 MSMS 1    1687.913    1686.812    1686.905    -0.093    2074    KSKLLDVDNY(HTV)R



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

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

Protein name (spot)	<i>m/z</i>	Charge	Mass [M+H] <sup>+</sup>	Partial or full sequence	Accession no.
P95	1457.7	1 <sup>+</sup>	1458.7	-TSHGGGKAG-	P85508
	1687.8	1 <sup>+</sup>	1688.8	KSKLLDVNY-	
P50 (U2)	1313.7	1 <sup>+</sup>	1314.7	KDALEHTGFAPK	P85509
	1647.7	1 <sup>+</sup>	1648.7	KDGEHVEWNYN-	
P29 (U5)	1313.7	1 <sup>+</sup>	1314.7	KDALEHTGFAPK	P85510

the biominerals. Nacre, widespread in shell-bearing molluscs, is one of the best studied shell structures. Furthermore, it is considered an ancestral shell texture,<sup>[33]</sup> constituting a fascinating model for understanding the long-term evolution of molluscan mineralised tissues. In this paper we have characterised the matrix extracted from the nacreous layer of the freshwater bivalve *U. pictorum*. We detected a carbonic anhydrase enzymatic activity of the ASM and have described a novel, nacreous layer-specific, acidic glycoprotein, P95. In addition, we have used a proteomic approach for obtaining partial sequences, in order to compare the nacre proteins of this paleoheterodont bivalve with those previously published from pteriomorpha.

Carbonic anhydrase (CA) is a ubiquitous metalloenzyme, observed in animals, plants and bacteria, that reversibly catalyses the hydration of carbon dioxide, according to the equation  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ . When intracellular or associated with the cytoplasm membranes, it displays an essential function for cytoplasmic acid/base balance and for transport mechanisms of  $\text{CO}_2$  and carbonate ions.<sup>[34]</sup> In addition, CA is essential in calcification processes,<sup>[35]</sup> since it has been identified in several calcifying epithelia.<sup>[36–38]</sup> One peculiarity of biomineralisation is the occurrence of CA activity in the extracellular skeletal matrix. This has been reported in only a few biological metazoan models: the cnidarian exoskeleton,<sup>[39–40]</sup> crustacean calcium storage concretions,<sup>[41]</sup> the fish otolith<sup>[42]</sup> and the molluscan shell.<sup>[9,42]</sup> The role of CA in an extracellular calcifying matrix is far from being elucidated. According to the mainstream hypothesis, CA catalyses the production of bicarbonate ions, which subsequently react with calcium to precipitate calcium carbonate. Alternately, it is also possible that in extracellular matrices, CA works in a different way, by catalysing the production of protons, which subsequently induce the dissolution of calcium carbonate.<sup>[43]</sup> It is also possible that the CA activity is integrated in a multi-domain protein, such as nacrein, a shell protein that exhibits both CA activity and structural function,<sup>[9]</sup> suggesting two successive spatio-temporal functions. Clearly, supplementary characterisations are needed before we can

draw conclusions on the significance of CA activity in the matrices associated to molluscan shells.

Among the proteins extracted from the shell of *U. pictorum*, P95 is a major component, specific to the nacre ASM. It is absent from the prismatic layer, unlike the other discrete components. This suggests that P95 might play an important function in controlling, inter alia, the building of nacre during shell formation. P95 is a glycoprotein, the acidity of which is entirely conveyed by its glycosyl moieties, consisting of acidic and sulfated polysaccharides. In its amino acid composition, P95 presents the "signature" of an acidic protein, because of its high Asx and Glx residue content.<sup>[44]</sup> However, its deglycosylated protein core exhibits an experimentally determined pI of about 6.5–7, which classifies it as, at most, a moderately acidic protein. Such a value may appear surprising but is consistent with the distribution of the theoretical pI values (deduced from primary structures) of most of the molluscan shell proteins associated with nacre, which as a general rule are far less acidic than those extracted from calcitic shell layers.<sup>[11]</sup> Another remarkable feature of P95 is its ability to bind calcium ions. Here again, this property is fully conveyed by the post-translational modifications of P95, in particular by the negatively charged sulfated sugars, and not by acidic amino acids. The presence of sulfated sugars in CaCO<sub>3</sub> biomineralisation products has been known for a long time,<sup>[45]</sup> but their role is still unclear. In mollusc nacre, two putative functions have been proposed for them: concentration of calcium ions in the vicinity of the nucleating site by an ionotropic effect<sup>[46–47]</sup> and mineral nucleation.<sup>[48]</sup> Recent in situ experiments directed towards localizing sulfate groups at the surfaces of nacre tablets<sup>[49]</sup> suggest that their function may be more diversified than expected, because they are not localised similarly in sheet (bivalvian) and columnar (cephalopod) nacles. Differential immunostaining of P95 and of deg-P95 directly on nacre, with more specific antibodies, may bring a more definitive answer.

In a given shell, what is the degree of similarity of the different proteins of the shell matrix? This question has only been touched upon, due to the fact that most of the published works characterise molluscan shell proteins individually. Recent studies have identified some "families", such as the nacrein, N14/16, asprich, shematin, or KRMP.<sup>[11]</sup> So far, most of these families have been retrieved at the transcriptional level, and it is not clear yet whether all the members of a family are present together, because they have not been identified directly in the shell matrix. Our proteomic analysis of trypsin-digested 2DE spots and purified P95 shows that several peptides share the same *m/z* value. The MS/MS analysis of several of these peptides unambiguously demonstrates that some of them are identical. In one case, the similarity of these peptides is fully confirmed by the interpretation of fragmentation spectra for de novo sequencing. Our data demonstrate that short protein motifs can be used as "functional blocks" by different shell matrix proteins of clearly identified molecular mass. In a previous paper,<sup>[50]</sup> we evoked this eventuality. These data tend to validate this hypothesis. Besides the possibility of cross-reactivity due to shared saccharidic epitopes, our proteomic data may also explain why strong cross-reactivity is recorded be-

tween an antibody raised against a single protein and other matrix components. These combined data have evolutionary implications and suggest that molluscan shell proteins were assembled, like "Meccano", by the tandem positioning of short functional modules, some of which are almost identical from one protein to another one. The genetic mechanism that underlies the process is unknown, but might be related to exon-shuffling.<sup>[51]</sup> As we have pointed out, the alternative hypothesis involves a preferential cleavage of matrix proteins of high molecular weight into smaller fragments of determined mass during shell maturation, in a manner similar to that observed for tooth matrix proteins.<sup>[52]</sup> Clearly, these two scenarios require further testing.

## Experimental Section

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

**One-dimensional SDS-PAGE:** The separation of matrix components was performed under denaturing conditions by 1D SDS-PAGE in polyacrylamide gels (MiniProtean 3, 12%, Bio-Rad) as described by Laemmli.<sup>[53]</sup> ASM (50 µg) was loaded into each well. Gels were stained with silver nitrate<sup>[54]</sup> or with Coomassie Blue (Bio-Safe Coomassie, Bio-Rad). A protocol developed for staining unusually acidic proteins<sup>[55]</sup> was also tested but produced blurred bands, and was not used further. To check the reproducibility of our extraction procedure, we performed several decalcifications from single shells, or from different batches of shells.

**Carbonic anhydrase activity:** The colorimetric method developed by Maren<sup>[28]</sup> was performed to measure the carbonic anhydrase (CA) activity of the nacre ASM. The experiment was carried out under a stabilised flow of CO<sub>2</sub> in an ice containing vessel. Phenol red (400 µL, 12.5 mg L<sup>-1</sup> in 2.6 mM NaHCO<sub>3</sub>) was mixed with water (200 µL) and sample (100 µL). The reaction was initiated by addition of freshly made carbonate buffer (0.6 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.412 M NaHCO<sub>3</sub>, 100 µL), and the time interval until the colour change from red to yellow was monitored. This colour change characterises the pH drop of the solution (from 8.2 to 7.3) resulting from the production of protons during the reaction catalysed by the CA (CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O → HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> + H<sup>+</sup>). The enzyme unit (EU) activity was calculated according to the following equation: activity units (EU) = (T<sub>0</sub> - T)/T, where T and T<sub>0</sub> are the reaction times required for the pH change with and without a catalyst, respectively. Acetazolamide was used as a specific inhibitor of the reaction. Heat inactivation of CA was performed by boiling the samples at 100 °C for 10 min.

**Purification of proteins by preparative SDS-PAGE:** The nacre ASM was fractionated on a preparative SDS polyacrylamide gel (8%) under denaturing conditions as described by Marin et al.<sup>[56]</sup> Eighty fractions (5 mL each) were eluted from the preparative gel. Aliquots (100 µL) of each of them were tested by the dot-blotting technique (Bio-Dot apparatus, Bio Rad) on PVDF membranes. The membranes were subsequently incubated with an antibody raised against the acid-soluble matrix of *Pinna nobilis* nacre. In previous experiments we had found that this polyclonal antibody cross-reacts with several molluscan matrices,<sup>[57]</sup> including paleohetero-

dont bivalves such as *Unio* and *Anodonta* sp. Fractions of the same proteins were pooled, thoroughly dialysed for several days against MilliQ water at 4 °C and freeze-dried. The purity of the fractions was assessed on a mini-SDS-PAGE stained with silver nitrate.

**Polyclonal antibodies against P95 and Western blot:** Polyclonal antibodies raised against P95 were obtained by subcutaneous immunisation (100 µg P95 per injection) of a female New Zealand white rabbit by a standard procedure (Covalab, Lyon, France), at days 1, 14 and 28. The blood was collected at days 1 (preserum, 4–5 mL), 39 (first bleeding, 12–15 mL) and 56 (final bleeding, 4–5 mL). The serum containing the antibodies was used for Western blots. Briefly, the ASM and the purified P95 were run on SDS-PAGE, then blotted (120 mA, 90 min, Mini Trans Blot module, Bio-Rad) on a PVDF membrane. The membrane was treated as previously described,<sup>[56]</sup> with a solution containing anti-P95 serum diluted 5000 times as the primary antibody.

For the animal experiments performed by the Covalab society, permission was obtained from the District Direction of the Veterinary Services (Burgundy, France; accreditation number A21231006).

**Amino acid composition of P95:** The amino acid composition of the purified fraction of P95 was determined by Eurosequence, Co. (Groningen, the Netherlands). After hydrolysis with HCl (5.7 N, 1.5 h at 150 °C), the resulting amino acids were analysed on an HP 1090 Aminoquant instrument by an automated two-step precolumn derivatisation with *o*-phthalaldehyde for primary and *N*-(9-fluorenyl)-methoxycarbonyl for secondary amino acids. Cysteine residues were quantified after oxidation.

**Deglycosylation of P95:** Chemical deglycosylation of P95 (1 mg) was performed in TFMS/anisole (2:1, v/v, 1.5 mL) at 0 °C for 3 h under N<sub>2</sub>, with constant stirring as described by Edge et al.<sup>[58]</sup> After neutralisation with cold pyridine (50%, 2 mL), the aqueous phase was extracted twice with diethyl ether and extensively dialysed against water (5 days) before being lyophilised. Fetuin was used as a positive control.

**Polysaccharide staining and calcium-binding ability on gels:** The glycosylation of P95 was studied qualitatively on denaturing minigels and on blots. In particular, saccharide moieties were investigated on minigels by use of Alcian Blue 8GX<sup>[59]</sup> at pH 1 in order specifically to stain sulfated sugars,<sup>[60]</sup> and by staining with PAS, which stains most carbohydrate residues.<sup>[61]</sup> The calcium-binding ability of P95 and deglycosylated-P95 (*deg*-P95) was tested by two procedures: "Stains All" staining on mini gels<sup>[62]</sup> and <sup>45</sup>Ca overlay test on blots.<sup>[63]</sup>

**Growth of calcite crystals in the presence of ASM and purified P95:** CaCO<sub>3</sub> precipitation was performed in vitro by slow diffusion of ammonium carbonate vapour in a calcium chloride solution.<sup>[64]</sup> The test was adapted as follows: CaCl<sub>2</sub> (7.5 mM, 500 µL) containing different amounts of nacre ASM or purified P95 (0.1 µg mL<sup>-1</sup> to 20 µg mL<sup>-1</sup>) was introduced onto eight-well culture slides (BD Falcon). Blank controls were performed without any sample. The culture slides were incubated 48 h at 4 °C in a closed desiccator containing crystals of ammonium bicarbonate. They were gently dried, carbon-sputtered and observed at 15 keV by scanning electron microscopy (JEOL 6400).

**Separation of ASM proteins by 2DE:** The nacre ASM was fractionated by 2DE. IEF was carried out with a Protean IEF cell (Bio-Rad). Precast 7 cm linear pH 3–10 immobilised pH gradient (IPG) strips were rehydrated, overnight, at 50 V (25 °C) with buffer (150 µL) containing ASM (80 µg) in urea (6 M), thiourea (2 M), 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS; 4%,

w/v), dithiothreitol (DTT; 20 mM), ampholytes (0.1%) and bromophenol blue (0.001%). Immediately afterwards, focalisation was performed at 250 V for 15 min. The voltage was then set at 8000 V until it reached 10000 Vh. The IPG strips were subsequently incubated for 10 min in 2 mL equilibration buffer (6 M urea, 2% SDS, 375 mM Tris/HCl pH 8.8, 20% glycerol, 2 mL) containing DTT (130 mM), and then incubated for a further 10 min in the same buffer containing iodoacetamide (135 mM). Strips were rinsed in TGS (25 mM Tris, 192 mM glycine and 0.1% SDS), placed on top of precast NuPAGE<sup>®</sup> BisTris Novex SDS-PAGE (4–10%) and fixed with an overlay layer of agarose/TGS (0.5%, w/v). Electrophoresis was performed at 200 V for 40 min.

**Protein digestion and MALDI-TOF/TOF analysis:** After electrophoresis, gels were stained with Coomassie Blue before spot excision. Excised spots were washed for 10 min in NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (100 mM), and the supernatant was discarded. After incubation in ACN (100%, 20 µL) for 10 min, with gentle stirring, the supernatant was discarded, and samples were subsequently reduced with DTT (20 mM, 30 min, 56 °C in 0.1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) and alkylated with iodoacetamide (0.1 M, 20 min, 25 °C in 0.1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>). Proteins were digested in gel with trypsin (10 µg mL<sup>-1</sup>, 20 µL, ROCHE, France) in TFA (0.01%, 30 min at 4 °C), after which supernatant (17 µL) was discarded and pieces of gels were covered with NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> solution (25 mM, 7 µL) for incubation (2 h, 37 °C). Peptide containing liquid fractions were extracted by addition of TFA (0.5%, 1 µL), and the supernatant (around 11 µL) was recovered. The gel spots were rinsed with ACN (8 µL), and the supernatants were pooled. Digests were analysed with the MS and the MS/MS mode on a MALDI-TOF/TOF Ultraflex II instrument (Bruker Daltonics) with an  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) matrix. Purified P95 protein was similarly analysed on MS and MS/MS after trypsin digestion.

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

## Acknowledgements

*This work is supported by an ANR project for the period 2007–2010 (ACCRO-Earth, ref. BLAN06-2\_159971, coordinator Gilles Ramstein, LSCE, Gif/Yvette). B.M. is financed by a PhD Fellowship (No. 15351), associated to an ACI from the Ministère Délégué à la Recherche et aux Nouvelles Technologies (JC3049, 2003–2006). The "Conseil Régional de Bourgogne" (Dijon, France) provided additional support for the acquisition of new equipment in the Bio-geosciences research unit (UMR CNRS 5561). B.M. and F.M. thank Claudie Josse (Laboratoire de Réactivités des solides, University of Burgundy) for helping to handle the SEM, and Patrick Ducoroy, Géraldine Lucchi and Jean-Pascal Gimeno (IFR 100, Faculté de Médecine, Dijon) for their contribution to the MS/MS analysis.*

**Keywords:** biomineralization · carbonic anhydrase · mollusc shell nacre · organic matrixes · two-dimensional electrophoresis

- [1] G. Goffinet, C. Jeuniaux, *Cah. Biol. Mar.* **1979**, *20*, 341–349.
- [2] S. Weiner, W. Traub, S. B. Parker, *Philos. Trans. R. Soc., B* **1984**, *304*, 425–434.
- [3] H. Nakahara in *Mechanisms and Phylogeny of Mineralization in Biological Systems* (Eds.: S. Suga, H. Nakahara), Springer, New York, **1991**, pp. 343–350.
- [4] K. Simkiss, K. M. Wilbur, *Biomineralization: Cell Biology and Mineral Deposition*, Academic Press, San Diego, **1989**, pp. 1–337.
- [5] L. Addadi, D. Joester, F. Nudelman, S. Weiner, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 980–987.
- [6] S. Mann, *Nature* **1988**, *332*, 119–124.
- [7] G. Falini, S. Albeck, S. Weiner, L. Addadi, *Science* **1996**, *271*, 67–69.
- [8] D. Sud, D. Doumenc, E. Lopez, C. Milet, *Tissue Cell* **2001**, *33*, 154–160.
- [9] H. Miyamoto, T. Miyashita, M. Okushima, S. Nakano, T. Morita, A. Matsushiro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 9657–9660.
- [10] C. Zhang, R. Zhang, *Mar. Biotechnol.* **2006**, *8*, 1–15.
- [11] F. Marin, G. Luquet, B. Marie, D. Medakovic, *Curr. Top. Dev. Biol.* **2007**, *80*, 209–276.
- [12] M. Kono, N. Hayashi, T. Samata, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *269*, 213–218.
- [13] K. Mann, I. Weiss, S. André, H. Gabius, M. Fritz, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5257–5264.
- [14] I. M. Weiss, S. Kaufmann, K. Mann, M. Fritz, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *267*, 17–21.
- [15] F. Marin, B. Corstjens, E. Gaulejac, E. De Vring de Jong, P. Westbroek, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 20667–20675.
- [16] S. Sudo, T. Fujikawa, T. Nagakura, T. Ohkubo, K. Sakaguchi, M. Tanaka, K. Nakashima, T. Takahashi, *Nature* **1997**, *387*, 563–564.
- [17] M. Michenfelder, G. Fu, C. Lawrence, J. Weaver, B. Wustman, L. Taranto, J. Evans, D. E. Morse, *Biopolymers* **2003**, *70*, 522–533; erratum in M. Michenfelder, G. Fu, C. Lawrence, J. Weaver, B. Wustman, L. Taranto, J. Evans, D. E. Morse, *Biopolymers* **2004**, *73*, 291.
- [18] L. Treccani, K. Mann, F. Heinemann, M. Fritz, *Biophys. J.* **2006**, *91*, 2601–2608.
- [19] X. Shen, A. Belcher, P. Hansma, G. Stucky, D. E. Morse, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 32472–32481.
- [20] D. Jackson, C. McDougall, K. Green, F. Simpson, G. Wörheide, B. Degnan, *BMC Biol.* **2006**, *4*, 40–49.
- [21] D. Jackson, G. Wörheide, B. M. Degnan, *BMC Evol. Biol.* **2007**, *7*, 160–177.
- [22] L. Bédouet, F. Rusconi, M. Rousseau, D. Duplat, A. Marie, L. Dubost, K. Le Ny, S. Berland, J. Péduzzi, E. Lopez, *Comp. Biochem. Physiol. Part B* **2006**, *144*, 532–543.
- [23] L. Bédouet, A. Marie, L. Dubost, J. Péduzzi, D. Duplat, S. Berland, M. Puisségur, H. Boulzaguet, M. Rousseau, C. Milet, E. Lopez, *Mar. Biotechnol.* **2007**, *9*, 638–649.
- [24] J. G. Carter, *Skeletal Biomineralization: Patterns, Processes, and Evolutionary Trends*, Van Nostrand Reinhold, New York, **1990**.
- [25] J. Taylor, W. Kennedy, A. Hall, *Bull. Br. Mus. (Nat. Hist.) Zool. Lond.* **1969**, *3*, 1–125.
- [26] J. Taylor, *Palaeontology* **1973**, *16*, 519–534.
- [27] B. Marie, G. Luquet, J. P. Pais de Barros, N. Guichard, S. Morel, G. Alcaraz, L. Bollache, F. Marin, *FEBS J.* **2007**, *274*, 2933–2945.
- [28] T. Maren, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1960**, *130*, 26–29.
- [29] S. Albeck, S. Weiner, L. Addadi, *Chem. Eur. J.* **1996**, *2*, 278–284.
- [30] Q. I. Feng, G. Pu, Y. Pei, F. Z. Cui, H. D. Li, T. N. Kim, *J. Cryst. Growth* **2000**, *216*, 459–465.
- [31] G. Fu, S. R. Qiu, C. A. Orme, D. E. Morse, J. J. De Yoreo, *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 2678–2683.
- [32] A. Matsushiro, T. Miyashita, H. Miyamoto, K. Morimoto, B. Tonomura, A. Tanaka, K. Sato, *Mar. Biotechnol.* **2003**, *5*, 37–44.
- [33] J. Carter, G. R. Clark II in *Mollusk, Notes for a Short Course, Studies in Geology 13* (Ed.: T. W. Broadhead), University of Tennessee Press, Knoxville, **1985**, pp. 50–71.
- [34] S. Lindskog, *Pharmacol. Ther.* **1997**, *74*, 1–20.
- [35] K. M. Wilbur, L. H. Jodrey, *Biol. Bull. (Woods Hole, MA, USA)* **1955**, *108*, 359–365.
- [36] K. Mitsunaga, K. Akasaka, H. Shimada, Y. Fujino, I. Yasumasu, H. Numano, *Cell Differ.* **1986**, *18*, 257–262.
- [37] J. M. Lucas, L. W. Knapp, *Mar. Biol.* **1996**, *126*, 471–477.
- [38] Z. Yu, L. Xie, S. Lee, R. Zhang, *Comp. Biochem. Physiol. Part B* **2006**, *143*, 190–194.
- [39] M. A. Rahman, Y. Isa, T. Uehara, *Proteomics* **2005**, *5*, 885–893.
- [40] S. Tambutté, E. Tambutté, D. Zoccola, N. Caminiti, S. Lotto, A. Moya, D. Allemand, J. Adkins, *Mar. Biol.* **2007**, *151*, 71–83.
- [41] J. C. Meyran, F. Graf, J. Fournié, *Histochemistry* **1987**, *87*, 419–429.
- [42] G. Borelli, N. Mayer-Gostan, P. L. Merle, H. De Pontual, G. Boeuf, D. Allemand, P. Payan, *Calcif. Tissue Int.* **2003**, *72*, 717–725.
- [43] M. Chétil, J. Fournier, *Am. Zool.* **1969**, *9*, 983–990.
- [44] S. Weiner, *Calcif. Tissue Int.* **1979**, *29*, 163–167.
- [45] S. D. Douglas, H. D. Isenberg, L. S. Lavine, S. S. Spicer, *J. Histochem. Cytochem.* **1967**, *15*, 285–291.
- [46] E. M. Greenfield, D. C. Wilson, M. A. Crenshaw, *Am. Zool.* **1984**, *24*, 925–932.
- [47] L. Addadi, J. Moradian, E. Shay, N. G. Maroudas, S. Weiner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 2732–2736.
- [48] M. Crenshaw, H. Ristedt in *The Mechanisms of Mineralization in the Invertebrates and Plants* (Eds.: N. Watabe, K. M. Wilbur), University of South Carolina Press, Columbia, **1976**, pp. 355–367.
- [49] F. Nudelman, B. Gotliv, L. Addadi, S. Weiner, *J. Struct. Biol.* **2006**, *153*, 176–187.
- [50] F. Marin, B. Pokroy, G. Luquet, P. Layrolle, K. De Groot, *Biomaterials* **2007**, *28*, 2368–2377.
- [51] L. Patthy, *Genetica* **2003**, *118*, 217–231.
- [52] J. P. Simmer, J. C. Hu, *Connect. Tissue Res.* **2002**, *43*, 441–449.
- [53] U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
- [54] J. H. Morrissey, *Anal. Biochem.* **1981**, *117*, 307–310.
- [55] B. A. Gotliv, L. Addadi, S. Weiner, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 522–529.
- [56] F. Marin, L. Peirera, P. Westbroek, *Protein Expression Purif.* **2001**, *23*, 175–179.
- [57] F. Marin, M. Gillibert, P. Westbroek, G. Muyzer, Y. Dauphin, *Geol. Mijnbouw* **1999**, *78*, 135–139.
- [58] A. S. Edge, C. R. Faltynek, L. Hof, L. E. Reichert, P. Weber, *Anal. Biochem.* **1981**, *118*, 131–137.
- [59] R. S. Wall, T. J. Gyí, *Anal. Biochem.* **1988**, *175*, 298–299.
- [60] R. Lev, S. Spicer, *J. Histochem. Cytochem.* **1964**, *12*, 309.
- [61] R. M. Zacharius, T. E. Zell, J. H. Morrison, J. J. Woodlock, *Anal. Biochem.* **1969**, *30*, 148–152.
- [62] K. P. Campbell, D. H. MacLennan, A. O. Jorgensen, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 11267–11273.
- [63] K. Maruyama, T. Mikawa, S. Ebashi, *J. Biochem.* **1984**, *95*, 511–519.
- [64] L. Addadi, S. Weiner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 4110–4114.

Received: March 12, 2008

Published online on September 22, 2008





DOI: 10.1002/cbic.200900009

## Evolution of Nacre: Biochemistry and Proteomics of the Shell Organic Matrix of the Cephalopod *Nautilus macromphalus*

Benjamin Marie,<sup>\*,[a]</sup> Frédéric Marin,<sup>\*,[a]</sup> Arul Marie,<sup>[b]</sup> Laurent Bédouet,<sup>[c]</sup> Lionel Dubost,<sup>[b]</sup> Gérard Alcaraz,<sup>[d]</sup> Christian Milet,<sup>[c]</sup> and Gilles Luquet<sup>\*,[a]</sup>

In mollusks, one of the most widely studied shell textures is nacre, the lustrous aragonitic layer that constitutes the internal components of the shells of several bivalves, a few gastropods, and one cephalopod: the nautilus. Nacre contains a minor organic fraction, which displays a wide range of functions in relation to the biomineralization process. Here, we have biochemically characterized the nacre matrix of the cephalopod *Nautilus macromphalus*. The acid-soluble matrix contains a mixture of polydisperse and discrete proteins and glycoproteins, which interact with the formation of calcite crystals. In addition, a few

bind calcium ions. Furthermore, we have used a proteomic approach, which was applied to the acetic acid-soluble and -insoluble shell matrixes, as well as to spots obtained after 2D gel electrophoresis. Our data demonstrate that the insoluble and soluble matrixes, although different in their bulk monosaccharide and amino acid compositions, contain numerous shared peptides. Strikingly, most of the obtained partial sequences are entirely new. A few only partly match with bivalvian nacre proteins. Our findings have implications for knowledge of the long-term evolution of molluskan nacre matrixes.

### Introduction

The calcification of the molluskan shell is a genetically controlled process based on subtle interactions between an extracellular matrix, which is synthesized by the epithelial cells of the calcifying mantle, and the mineral ion precursors of calcification: calcium, bicarbonate, and minor elements. The proteins, glycoproteins, and polysaccharides that are incorporated within the forming shell constitute the shell matrix. They are believed to have several key functions:<sup>[1]</sup> to provide an organic template for mineral growth, to create local physicochemical conditions for promoting nucleation, to determine the calcium carbonate polymorph (calcite vs. aragonite), to guide the mineral growth in privileged directions, to organize the crystal architecture in well-defined microstructures, and to inhibit the crystal growth when and where necessary.<sup>[2]</sup> The matrix is also ■■thought to play a role in signaling to ■■ the mantle epithelial cells.<sup>[3]</sup>

For several reasons related to its remarkable mechanical properties and to its high value in jewelry, nacre is by far the most widely studied molluskan shell microstructure. In addition, nacre is a biocompatible material, which may be used in bone surgery because of its osteoinductive and osteogenic properties.<sup>[4]</sup> From a structural viewpoint, it consists of a regular superimposition of polygonal flat aragonitic tablets of 0.5 μm in thickness, embedded in a peripheral thin organic matrix.<sup>[5,6]</sup> Recent ultrastructural advances have shown that each nacre tablet has a hierarchical organization<sup>[7]</sup> and is composed of nanodomains.<sup>[8]</sup> In parallel, biochemical characterizations have shown that the nacre matrix comprises a large set of macromolecular components, such as chitin,<sup>[9]</sup> hydrophobic "framework" proteins,<sup>[10]</sup> proteins with elastomeric properties,<sup>[11]</sup> and several soluble proteins and glycoproteins.<sup>[12,13]</sup> For

a few years, new dynamic models of nacre formation have been used in attempts to conciliate both biochemical and ultrastructural data.<sup>[1]</sup> Particular emphasis has been placed on the prominent role played by chitin in spatially structuring the organic framework,<sup>[1,14]</sup> the distribution of key biochemical functions at the surfaces of nacre tablets,<sup>[15]</sup> the existence of a transient precursor amorphous phase,<sup>[16]</sup> and the growth of nacre tablets in a hydrophobic gel, which hardens and becomes insoluble when nacre tablets coalesce.<sup>[17]</sup>

Nacre also constitutes a fascinating model of study from an evolutionary viewpoint. Firstly, nacre appears early in the fossil record,<sup>[18]</sup> somewhere in the Cambrian period, and since then has been remarkably stable throughout the Phanerozoic eon.

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

[b] A. Marie, L. Dubost  
Muséum National d'Histoire Naturelle  
Plateforme de Spectrométrie de Masse et de Protéomique  
Département Régulation Développement et Diversité Moléculaire  
FRE 3206 CNRS, Molécules de Communication  
et Adaptations des Micro Organismes  
75005 Paris (France)

[c] Dr. L. Bédouet, Dr. C. Milet  
UMR CNRS 5178, Biologie des Organismes Marins et Écosystèmes  
MNHN, 75231 Paris (France)

[d] Prof. G. Alcaraz  
UPSP PROXISS, Département Agronomie Environnement  
ENESAD, 21000 Dijon (France)

cause no aragonite band was observed.<sup>[24,35]</sup> Both AIM and ASM exhibit characteristic bands of proteinaceous and/or glycoproteinaceous components: the thick band around 3270 cm<sup>-1</sup> is attributable to the amide A group (N–H bonds), the two small bands at 2916 cm<sup>-1</sup> and 2850 cm<sup>-1</sup> were assigned to the C–H bonds, and the two noteworthy bands near 1640 cm<sup>-1</sup> and 1530 cm<sup>-1</sup> were ascribed to the amide I (C=O bond) and the amide II (C–N bond) groups, respectively, commonly associated with proteins. This is in agreement with previous works on organic compounds in other mollusk shells.<sup>[29,32,36–38]</sup> Carboxylate (COO<sup>-</sup>) and sulfate (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) absorption bands are also present in both extracts, at around 1420 cm<sup>-1</sup> and 1234 cm<sup>-1</sup>, respectively.<sup>[38]</sup> On the other hand, ASM exhibits a strong carbohydrate absorption band around 1060 cm<sup>-1</sup>, whereas for AIM this band is weaker. This suggests that ASM contains a more important ■■ saccharide fraction ■■.

### Amino acid compositions

The total amounts of amino acids, as determined from amino acid quantification, are 16 and 66 % w/w of the shell nacre AIM and ASM, respectively. We consider that the weak solubility of the AIM, even in HCl (5.7 N), produces a significant underestimation of its proteinaceous content. Table 1A indicates the amino acid compositions (in mol%) of the AIM and ASM. Because of deamidation of Asn and Gln during the acid hydroly-

sis, Asx and Glx residues represent Asn + Asp and Gln + Glu, respectively. In the AIM extract, Gly, Ala, and Glx are prominent amino acids, followed by Ser and Asx. The first three constitute almost half of the total amino acids. This result is consistent with those previously obtained with other *Nautilus* species,<sup>[31]</sup> because the AIM exhibits the signature of hydrophobic extracts, which characterizes the “silk fibroin-like” proteins<sup>[10,27]</sup> found in the nacre of various mollusks.<sup>[37,39,40]</sup> The composition of the ASM is characterized by large amounts of Gly and Asx, which represent more than two-fifths of the total amino acids. If most of the Asx residues are in their acidic form, as previously suggested,<sup>[28]</sup> this implies that the ASM of *Nautilus macromphalus* nacre is acidic, an assumption that is further confirmed on 2D gels.

### Monosaccharide composition

The total amounts of neutral, acidic, and amino sugars obtained after TFA (2 M) hydrolysis represent 6.1% and 5.2% of the AIM and the ASM, respectively (Table 1B). However, for the AIM, the standard hydrolysis for monosaccharide determination does not release the total sugar content, as can be seen in the presence of insoluble residues after hydrolysis. The AIM yields only six monosaccharide residues, out of which glucosamine represents 56%, galactose 16%, and glucose 15% of the composition. The technique used does not allow glucosamine to be distinguished from its N-acetylated form, which is the monomer of chitin. Chitin has been detected in the insoluble nacre matrix of several mollusks<sup>[41,42]</sup> including *Nautilus macromphalus*.<sup>[9,23]</sup> If it is assumed that a large fraction of the glucosamine residues originate from the hydrolysis of chitin, this macromolecular constituent could represent an important fraction of the AIM.

The ASM monosaccharide composition appears to be more diversified than that of the AIM, because it contains six of the seven standard neutral sugars (with the exception of xylose), the two amine sugars, and also noticeable amounts of glucuronic and galacturonic acids. As in the case of the AIM, in which glucosamine, glucose, galactose, and galactosamine represent 95% of the monosaccharide composition, these four residues are also dominant in the ASM, with 17, 17, 14, and 12%, respectively. Traces of sialic acids (Neu5Ac only) were detected in both matrices.

Because previous qualitative methods had determined the presence of acidic sulfated sugars in the nacre of *Nautilus* sp.,<sup>[15,24,32]</sup> an accurate quantification of these sugars in the AIM and in the ASM was performed by spectrophotometry (Table 1B). Significant amounts, representing 15% of the total sugar content, were quantified in the ASM. The AIM contains only traces of sulfated sugars.

### Characterization of matrixes by SDS-PAGE

The treatment of the AIM with urea dissolves the insoluble components only partly. The urea-treated fraction is called urea-soluble AIM. When resolved on mini-SDS-PAGE and stained with silver or Coomassie brilliant blue (CBB), the urea-

**Table 1.** Compositions of the AIM and ASM extracts of *Nautilus macromphalus* nacre.

Amino acids <sup>[a]</sup>	% of the total amino acids		Monosaccharides <sup>[b]</sup>	ng per µg of matrix (% of the total)	
	AIM	ASM		AIM	ASM
Asx	9.5	20.8	fucose	0.8 (1)	2.5 (4)
Glx	10.3	7.5	rhamnose	ND	2.5 (4)
Ser	9.6	6.8	arabinose	1.7 (3)	1.0 (2)
His	0	2.1	galactose	10 (16)	8.0 (14)
Gly	24.0	21.4	glucose	9.5 (15)	9.3 (17)
Thr	2.8	4.8	mannose	ND	1.3 (2)
Ala	13.3	7.3	xylose	ND	ND
Arg	5.6	3.1	galactosamine	4.6 (8)	6.5 (12)
Tyr	2.8	2.9	glucosamine	34.2 (56)	9.7 (17)
Cys	0	1.1	galacturonic acid	ND	3.0 (5)
Val	3.4	3.1	glucuronic acid	ND	3.8 (7)
Met	0.9	0.7	Neu5Ac	TR	TR
Phe	4.8	2.7	Neu5Gc	ND	ND
Ile	2.9	2.3	sulfated sugars	0.5 (1)	8.3 (15)
Leu	5.9	3.2	total	61.3 (100)	55.9 (100)
Lys	2.2	3.9			
Pro	2.0	6.4			
Trp	ND	ND			

[a] Amino acid composition: data are presented as molar percentage of total amino acids for each extract. Note that Asx = Asn + Asp and Glx = Gln + Glu. Cysteine residues were quantified after oxidation. Tryptophan residues were not detected due to the hydrolysis conditions. [b] Mono saccharide composition: the neutral sugar compositions were obtained by high performance anion exchange pulsed amperometric detection (HPAE PAD). Data are represented in ng per µg of the total matrix and as percentages of the total identified carbohydrate compounds; ND: not detected; TR: ■■ trace amounts ■■.

soluble AIM (US-AIM) and the ASM were found to be composed of various distinct macromolecular components (Figure 1B). The US-AIM shows two main bands migrating around 50 and 18 kDa. A few minor bands around 30 and 20 kDa are also visible, although only after silver staining. Silver and CBB stain the nacre ASM in different ways. The silver staining reveals high-molecular-weight components between 200 and 100 kDa, two thick bands around 63 and 52 kDa, and small discrete bands between 20 and 12 kDa. Although silver staining is much more sensitive than CBB, its reproducibility is poorer: the 100–200 kDa components sometimes appear negatively stained, and the other components exhibit variations in their staining intensities.

CBB does not reveal the high-molecular-weight components between 200 and 100 kDa, suggesting that these components are either heavily glycosylated or are strongly negatively charged. CBB does stain the two thick bands around 63 and 52 kDa and a few compounds between 40 and 22 kDa fairly strongly, and it heavily stains the small discrete bands between 20 and 12 kDa. Previous observations of CBB-stained electrophoretic profiles obtained from EDTA- or acetic acid-soluble matrixes of *Nautilus pompilius* shell<sup>[30,31]</sup> revealed thick bands above 45 kDa and a few discrete compounds between 20 and 10 kDa.

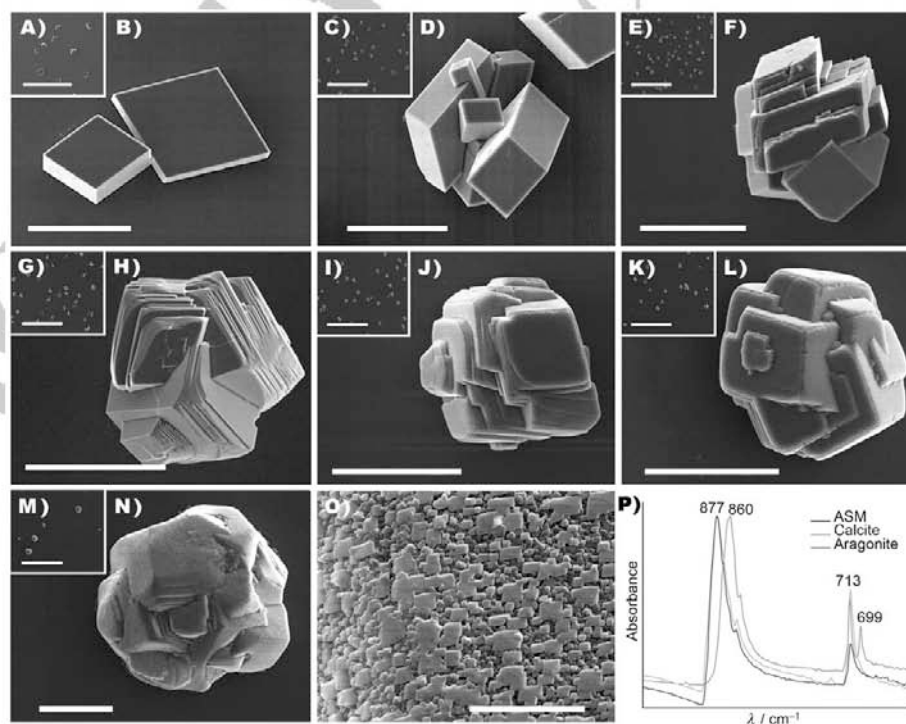
Because silver-nitrate-stained profiles of the ASM can show negative staining in the 100–200 kDa range (Figure 1C), we investigated the biochemical properties of this extract further by using different gel and blot staining techniques, as shown in Figure 1C. In particular, Alcian and periodic acid Schiff (PAS) procedures heavily stain the high-molecular-weight compounds, as well as the two discrete bands at 63 and 52 kDa. The Alcian blue staining method performed at pH 1 is specific for the very acidic sulfated sugars, while PAS reveals vicinal diol groups on peripheral sugars with a specific red/purple color. Taken together, these results suggest that the high-molecular-weight compounds, together with the 63 and 52 kDa bands, are acidic sulfated glycoproteins.

The carbocyanine dye stains the 37 kDa band in dark blue, whereas the proteins below 20 kDa exhibit a particular light blue color, different from the metachromatic blue characteristic of calcium-binding proteins. Nevertheless, the ability of the low-molecular-weight proteins

to bind calcium ions was unambiguously demonstrated by the <sup>45</sup>Ca overlay test under denaturing conditions.

#### Interaction of the ASM with in vitro calcite growth

The results of this test are shown in Figure 2. In the control blank experiment, the crystals exhibited the typical habitus of calcite (Figure 2A, B). The ASM was tested at concentrations varying from 0.1 to 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . In that range, we checked two parameters: the crystal size and shape, and the density of crystals per surface unit. Significant effects were observed above a threshold concentration of 0.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . At 0.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , most of the crystals were polycrystalline and exhibited smooth faces (Figure 2C, D). At 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , the number of crystals increased (Figure 2E) and all of them were polycrystalline, with rounded edges and microsteps (Figure 2F). At 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , the density of crystals decreased moderately (Figure 2G) and the polycrystalline aggregates exhibited foliated faces (Figure 2H). At 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , the number of crystals did not vary (Figure 2I), but the angles of crystals appeared more rounded, with slightly curved faces (Figure 2J). At 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , the density of crystals decreased (Figure 2K) and they exhibited rounded shapes (Figure 2L). At 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , the size distribution of the crystals was heterogeneous (Figure 2M), but the majority were smaller than those produced at lower ASM concentrations. This

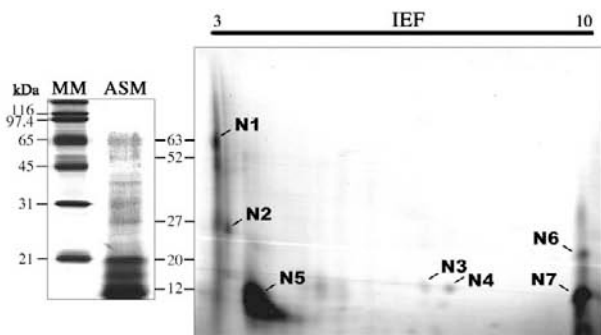


**Figure 2.** Effects of *Nautilus macromphalus* nacre ASM on  $\text{CaCO}_3$  crystal growth. SEM micrographs of calcite crystals grown in vitro, with different concentrations of ASM in the 0.1–20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  range. A, B) Negative control without matrix; C, D) 0.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ASM; E, F) 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ASM; G, H) 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ASM; I, J) 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ASM; K, L) 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ASM; M, N) 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ASM; O) detail of N). Scale bars: 600  $\mu\text{m}$  for A), C), E), G), I), K), and M); 30  $\mu\text{m}$  for B), D), F), H), J), L), and N); 2  $\mu\text{m}$  for O). P) FTIR profiles of the crystals obtained with nacre ASM, in comparison with those of aragonite and calcite standards. Under these conditions, we only observed the formation of calcite crystals.

decrease in size was probably due to the inhibiting effect of the ASM at high concentration. The formed polycrystalline aggregates had curved faces, edges, and corners (Figure 2N). At a higher magnification, the faces appeared to be formed by submicron crystallites of regular ■■quadratic■■ shape (Figure 2O). We checked the polymorph of the newly formed CaCO<sub>3</sub> crystals by FTIR and observed the presence of bands specific to calcite (877 and 713 cm<sup>-1</sup>) whether or not in the presence of nacre ASM (Figure 2P). No aragonite bands (860 and 699 cm<sup>-1</sup>) were detected.

### Separation of ASM proteins by 2D gel electrophoresis (2DE) and mass spectrometry analysis

The results of the two-dimensional gel analysis of nacre ASM are shown in Figure 3. The bands previously observed by 1D-electrophoresis can be retrieved. Most of the ASM components



**Figure 3.** 2D gel electrophoresis (2DE) analysis of *Nautilus macromphalus* nacre ASM. The monodimensional gel (left) with the ASM extract shows the correspondence between the protein bands and the spots observed on the 2DE (right) after CBB staining, by using a pH 3–10 immobilized pH gradient (IPG) strip in the first dimension; MM: molecular mass markers. The seven most intense spots (N1–N7) were excised from the gel and further analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry after reduction, alkylation, and digestion with trypsin.

are concentrated either at very acidic or very basic pI values. The two prominent 63 kDa (spot N1) and 52 kDa glycoproteins are clustered at pI 3; this suggests that these proteins each exhibit a pI of 3 or less. On the other hand, the set of low-molecular-weight proteins migrating between 20 and 12 kDa appears to be composed variously of very acidic (N5), neutral (N3 and N4), and very basic components (N6 and N7). Interestingly, the 12 kDa band is not homogenous and divides into two large spots around pI 3.5–4 and pI 9–10 (N5 and N7, respectively).

Seven spots were excised from the gel for protein characterization by MALDI-TOF/TOF with peptide mass fingerprinting (PMF) data search after digestion with trypsin (see one example with spot N1 in Figure 4A). For the main peptides, the MS/MS spectra were acquired for de novo sequencing and results were subjected to a BLAST data search. The peptides obtained after trypsin digestion from the 2DE spots were searched against the NCBI nonredundant database with use of MASCOT

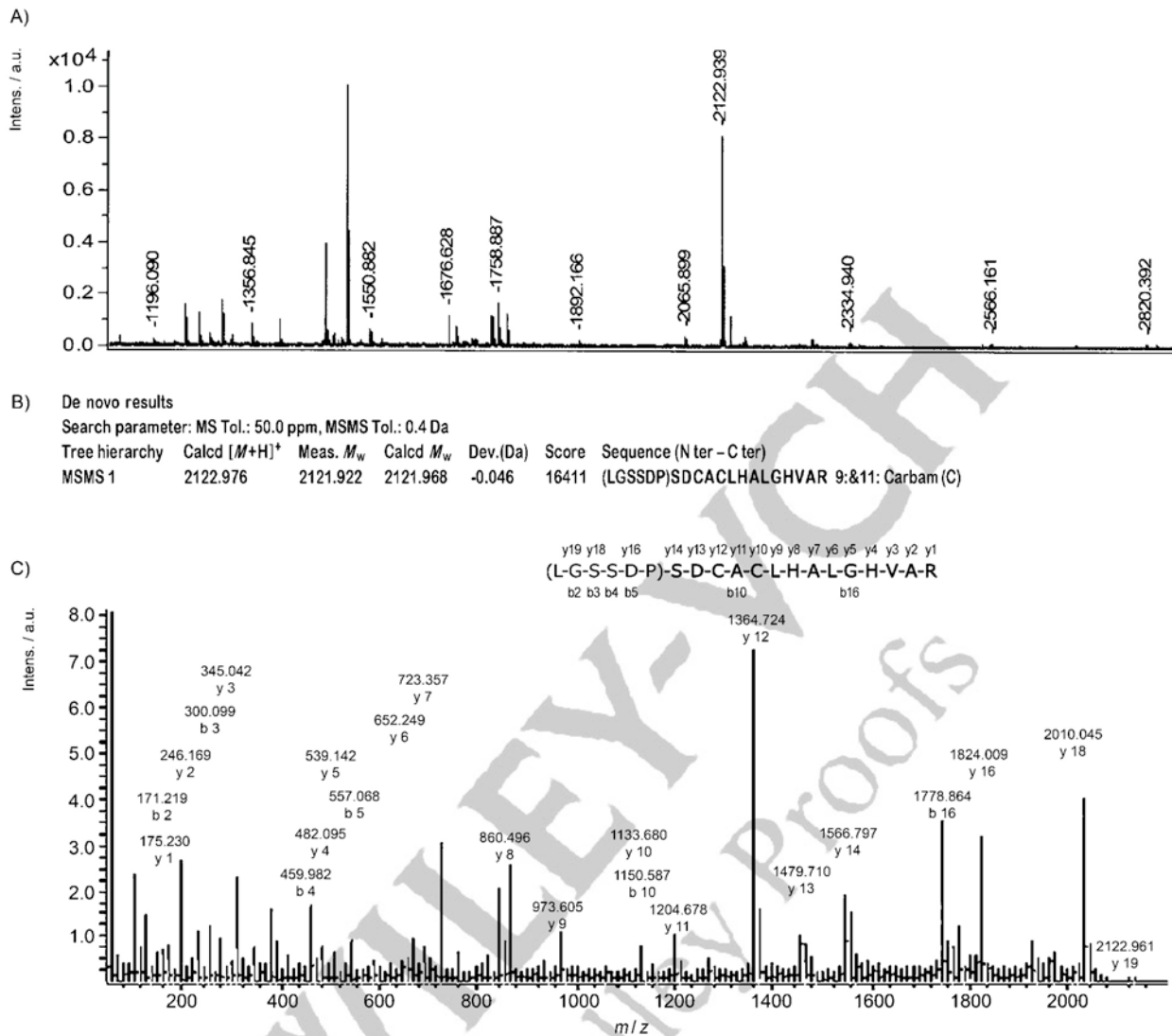
software and no significant result was found. Because of the absence of genomic/transcriptomic database on *Nautilus* sp., it is not surprising that this approach could not provide a reliable result for identifying proteins. Interestingly, we observed that many peptides were common to various spots (Table 2); this suggests that the different ASM proteins can share similar peptide domains. In spite of the possibility that peptides of different sequences could share the same *m/z* value, the numerous cases of similar *m/z* values shown in Table 2 indicate that the peptides are more likely truly identical.

We performed LC/MS-MS analysis both of the ASM and of the AIM after hydrolysis with trypsin. This approach provided an important set of MS and MS/MS data for both extracts. When searched against MASCOT, no protein was identified. Strikingly, the ASM and the AIM possess many peptides of the same *m/z* value. By comparing the ASM and AIM MS/MS spectra two by two, we determined that 33 different peptides of the two matrixes strictly share the same MS/MS-spectra patterns, as exemplified in Figure 5. Our results could have two implications: proteins of the AIM, on one hand, and the ASM, on the other, might be made up of similar peptide blocks, or alternatively, some proteins of the ASM might also be present in the AIM extract.

Partial and full internal sequences were obtained by interpretation of MS/MS spectra for de novo sequencing (see, for example, ■■Figure 4A and C■■). The interpretation of the mass differences between ions was assisted by use of PEAKS and Analyst QS1.1 software, and sequences were further confirmed manually. We only considered amino acid positions that were unambiguously determined with the  $\gamma$ -ion series and confirmed with the  $b$ -ion series. Only a few peptides analyzed in MS/MS mode could be fractionated or gave good MS/MS spectra for sequence interpretations. It is very likely that some of the peptides digested with trypsin bear glycosyl moieties (for example, for N1) or other post-translational modifications, which restrain the MS/MS fractionation. With the 2DE coupled with MALDI-TOF/TOF approach, we obtained four peptide sequences for the N1, N5, and N7 spots (Table 3). ■■From LC-MS-MS/MS analysis, we deduced 14 and 20 internal sequences for the ASM and AIM extracts, respectively. ok?■■ Two peptides of 675.35 and 675.85 *m/z* from the AIM, share the same amino acid sequence, and differ only in one residue—N or D—at the fifth position. This one-residue polymorphism could be explained by the presence of two isoforms of a particular domain in different matrix proteins or the occurrence of a repeat within the same protein as already observed for muco-perlin.<sup>[43]</sup> We also noticed that the 492.26 and 729.38 *m/z* peptides share identical internal sequences (DSSVLT).

### Sequence alignments

Only the sequences longer than seven amino acids were further considered for SIM alignment or BLAST. We performed an alignment two by two with all the 65 known molluskan shell proteins,<sup>[13]</sup> using the SIM tool from the ExPASy server (<http://www.expasy.org/tools/sim.html>). In no case did we obtain a perfect match. In some cases, however, some alignments



**Figure 4.** Proteomic approach performed on *Nautilus macromphalus* nacre ASM proteins after separation by 2DE. Example of the analysis performed on the Naut\_smp1 peptide ( $m/z$  2122.94, monocharged) from the N1 spot. A) Tryptic PMF of the N1 spot protein acquired in the linear mode by MALDI-TOF with HCCA matrix. The most intensive peaks were manually selected for MS/MS fractionation. The MASCOT search engine was used for protein identification by comparison of the mass spectra of the fragmented peptides. B) Result of the RapiDeNovo software interrogation for MS/MS spectra interpretation for the 2122.94  $m/z$  peptide fractionation. A high score indicates good correspondence between MS/MS spectra of a fractionated peptide and the sequence proposed by the software. The sequences were further validated by manual de novo sequencing. C) MS/MS spectrum of the 2122.94  $m/z$  peptide and manual interpretation of the spectrum for sequence identification. We only consider amino acid positions that were unambiguously determined. Uncertain amino acids are mentioned in brackets but not validated, and peptide sequences with uncertain amino acids in an internal position were not further considered. In this example, we validated the sequence SDCACLHALGHVAR for further BLAST, alignment with the SIM tool, and sequence registration on the Swiss-Prot database.

might be significant (Figure 6A–E). Three peptides match partially with nacrein and nacrein-like proteins (Figure 6A)—two nacre-associated proteins that are known to exhibit carbonic anhydrase (CA) activity. In spite of this sequence similarity, we did not detect any CA activity in the ASM extract of *N. macromphalus* (data not shown). Similarly, three other peptides match significantly with N14, N16, and pearlins (Figure 6B). Tyrosinase-like proteins 1 and 2 are also similar to two peptides from *N. macromphalus* shell proteins (Figure 6C). In mollusks,

tyrosinase-like proteins are suggested to play an essential role in quinone-tanning processes, by converting tyrosine residues into DOPA. In the shell, they may be directly involved in the phase transformation of a gel or of soluble proteins into insoluble “framework” proteins. Three peptides match with mucoperlin (Figure 6D), a mucin-like protein from *Pinna nobilis* nacre.<sup>[43]</sup> Furthermore, weak similarities are observed between two peptides of the AIM and low-complexity sequences from MS131 and MS160 (Figure 6E), but these similarities might be

**Table 2.** Tryptic PMF of the spot proteins from the *Nautilus macromphalus* shell nacre recorded by MALDI TOF.<sup>[a]</sup>

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

[a] Numerous spots ■■ were composed of ■■ many peptides with the same *m/z* values. For example, the spot protein N5 shares three peptide ions with N6 (*m/z* 1286.32, 1482.66, 1722.91) and five peptide ions with N7 (*m/z* 1003.37, 1286.32, 1482.66, 1531.52, 1758.87). This suggests that the N5 protein (pI ~3.5–4) and N6 or N7 proteins (pI 9–10) could exhibit similar domains. On the other hand, the N2 spot protein has five peptide ions in common with N1 (*m/z* 1512.92, 1723.41, 1774.87, 1892.15, 2122.9), three peptide ions in common with N5 (*m/z* 1722.93, 1791.74, 3312.31), and six peptide ions in common with N6 (*m/z* 1490.78, 1645.95, 1722.93, 1774.87, 1876.72, 3211.46). This suggests that N2 proteins share similar amino acid sequences with N1, N5, and N6. [b] Underlined values: peptides with the same *m/z* in different protein spots; bold values: peptides from which sequences were obtained by MS/MS analysis; \*: peptides analyzed in MS/MS mode.

fortuitous as a result of the bias due to the dominance of a single amino acid. Surprisingly, all of the few similarities detected are with shell proteins of bivalve, and not gastropod, origin. We did not find any homology with the few sequences published by Zhao and co-workers on *Nautilus pompilius*.<sup>[33]</sup>

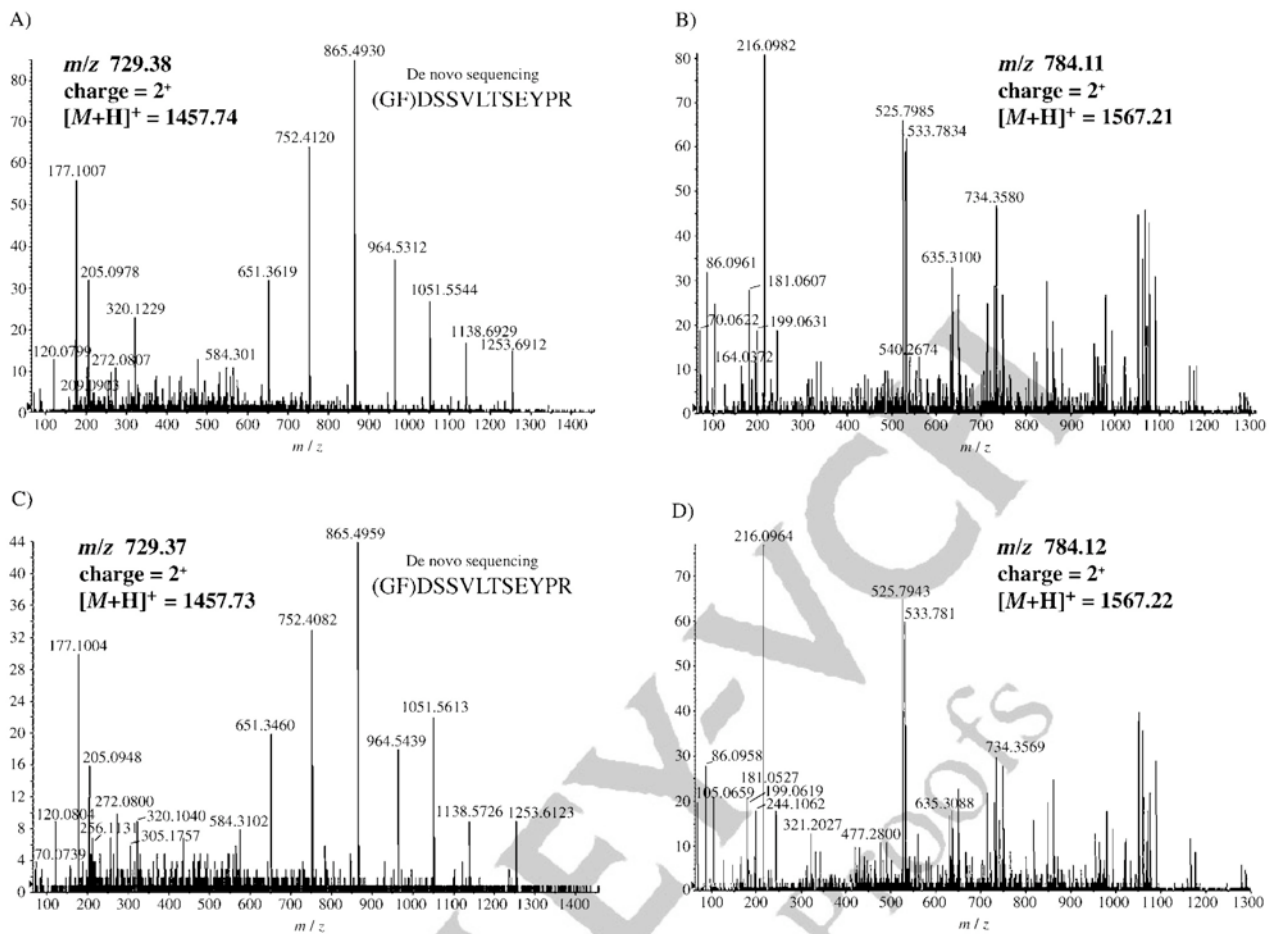
## Discussion

We have investigated the biochemical properties of the nacre-associated matrix extracted from the shell of the cephalopod *Nautilus macromphalus*. In classical views on molluscan shell biomineralization, the shell matrix can be divided into soluble and insoluble fractions: after mineral dissolution, the insoluble macromolecular complexes are recovered by simple centrifu-

gation, whereas the soluble components require additional concentration/dialysis/purification steps. The proportion of insoluble to soluble varies widely,<sup>[44]</sup> but nacre is always characterized by a high proportion of insoluble matrix,<sup>[45]</sup> whatever the extraction technique used. In the present case, with a matrix content above 4 wt%, the nacre of *Nautilus macromphalus* probably represents the molluscan shell microstructure with the highest organic content, and its AIM/ASM ratio is about 40. Our analyses performed on the bulk matrixes make a clear distinction between these two fractions. The urea soluble parts of the AIM and ASM exhibit different electrophoretic patterns. The AIM is enriched in aliphatic residues, mainly Gly and Ala, and in glucosamine. Gly and Ala are characteristic of “framework” proteins,<sup>[10]</sup> whereas large amounts of glucosamine indicate the likely presence of chitin.<sup>[29]</sup> The ASM is more hydrophilic, and enriched in Asx residues, whereas its sugar composition is shared out between different monosaccharide residues.

This clear dichotomy between the AIM and the ASM is largely attenuated by our MS and MS/MS data, which show that several tryptic peptides are present in both matrixes. Our finding is not an isolated case in calcium carbonate biomineralization: recently, Bédouet and co-workers<sup>[46]</sup> have noted that the insoluble and water-soluble matrixes of the pearl oyster *Pinctada margaritifera* ■■ contain identical MSI31 peptides ■■; Mann et al. have made a similar observation for the eggshell matrix of the hen *Gallus gallus*.<sup>[47]</sup> This fact may be explained in different manners. Firstly, soluble proteins of the shell matrix can become insoluble correlatively to their ability to form homopolymers of increasing size. Self-polymerization of a single shell protein has indeed been observed for P20<sup>[48]</sup> and for casparin.<sup>[49]</sup> Secondly, soluble proteins can be components of complex insoluble heteropolymers, which result from cross-linking between matrix macromolecules. Such a phenomenon, called quinone-tanning, has been observed during the formation of the periostracum.<sup>[50,51]</sup> It may occur as well in the formation of nacre tissues, in particular for hardening of the chitin-protein framework.<sup>[17]</sup> Thirdly, from recent reviews on shell proteins,<sup>[12,13]</sup> the primary structures of several shell matrix proteins exhibit organization in modules. Some of our recent data suggest that these modules may serve as “functional blocks” in different proteins, soluble or not.<sup>[52,53]</sup> Finally, we cannot exclude a mechanism opposite to polymerization: protein cleavage. Some proteins of the AIM may indeed mature and be cleaved into short peptides, which would be easily solubilized. The degradation of a long precursor into shorter peptides of well-defined size is largely documented for enamel proteins, in particular for amelogenin and MEPE.<sup>[54,55]</sup>

The proteomic approach that we used allowed 38 amino acid sequences, of six to 18 residues long, to be obtained. We are fully aware that this sequence pool represents only a small part of the whole sequences of the shell matrix proteins, thus giving a rather partial picture of the complete shell proteome of *Nautilus macromphalus*. Furthermore, the de novo sequencing by mass spectrometry presents some technical limitations: it does not work on proteins, which lack appropriate cleavage sites (arginine and lysine in the case of tryptic digestion) and



**Figure 5.** The *Nautilus macromphalus* nacre ASM and AIM share common proteins. Examples of MS/MS spectra of peptides that exhibit similar  $m/z$  values, acquired by ESI-QqTOF/TOF from trypsin digestion of: A), B) ASM, and C), D) AIM. The minimum ion intensity was set to ten counts. The ion-spray potential and the declustering potential were 5200 and 50 V, respectively. The collision energies for the gas-phase fragmentations of the precursor ions were determined automatically by IDA on the basis of their  $m/z$  values. A), C) MS/MS spectra of 729.4  $m/z$  peptides from ASM and AIM tryptic digests, respectively. For these two peptides, de novo sequencing gave the same sequence, (GF)DSSVLTSEYPR. B), D) MS/MS spectra of 784.1  $m/z$  peptides from ASM and AIM tryptic peptides, respectively. These two peptides share the same MS/MS profiles, but because of the complexity of the spectrum sequencing was not possible for this example. By using this comparative approach for peptides of similar  $m/z$  value from the two extracts, we were able to show that the ASM and AIM share at least 33 common peptides that exhibit the same MS/MS profiles and the same amino acid sequences.

A)	B)	C)	D)	E)
Nacrein <sup>[a]</sup>	N14 <sup>[b]</sup>	Tyrosinase-like1 & 2	Mucoperline	MSI60 & MSI31
smpp1 LHALGHV ::: : Q27908 LHALRNV	smpp15 LGICFASMP ::: : Q9NL39 LGICLSRP	smpp8 GPAAVVRLG ::: : A1IHF0 GPAAMTRAV ::: : A1IHF1 GPAAMASGG	smpp8 GPAAVVRLG ::: : Q9BKM3 GPAAVPVAA	impp14 AKAVAAEAASSA ::: : O02402 ASAVAAAAA
smpp3 EKGYNPYVR ::: : Q27908 EDGENLYVK	smpp8 AAVVRLG ::: : Q9NL39 AALVLLG	impp10 MNSLLQLGR ::: : A1IHF0 MNYLYSLER ::: : A1IHF1 MNYILSLER	smpp18 SSVLTSEYP ::: : Q9BKM3 SSVLTTS GP	impp4 TLSASAIASAR ::: : O02401 TLSALQIASGR ::: : O02402 KSSASASASAS
impp20 DMDDFGLGDFDD ::: : Q27908 EVGDDGFDEPD	impp17 YEEYVD ::: : Q9NL39 YWEEYID		impp5 SLDEYAR ::: : Q9BKM3 SLDEMRR	

**Figure 6.** Alignment of *Nautilus macromphalus* shell matrix sequences with previously characterized molluscan shell proteins. A) Multiple alignments with *P. fucata* nacrein (accession number Q27908). Note that similar alignments are observed with the six nacrein-like proteins (A0ZSF2, A0ZSF3, A0ZSF4, A0ZSF5, A0ZSF6, and A0ZSF7). B) Multiple alignments with N14 (Q9L39). Similar alignments are observed with N16 and perlin (O97048, Q14A6). C) Multiple alignments with tyrosinase-like proteins 1 and 2 (A1IHF0, A1IHF1). D) Multiple alignments with mucoperlin (Q9BKM3). E) Alignments with MSI60 (O02402) and MSI31 (O02401). Comparisons of sequences were performed two-by-two with the new sequence of *N. macromphalus* shell matrix and the 65 full or partial sequences of mollusk shell proteins (reviewed in ref. [18]), with the SIM tool from the ExPasy software (<http://www.expasy.org/tools/sim.html>). ■■ [a] Similar conserved domains exhibiting partial alignment with *N. macromphalus* shell proteins are also observed in nacrein-like proteins. [b] Similar conserved domains exhibiting partial alignment with *N. macromphalus* shell proteins are also observed in N16 and perline. ok? ■■

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

Peptide	m/z	Charge	[M+H] <sup>+</sup>	Partial (–) or full sequence	Accession No.
<b>MALDI TOF/TOF analysis</b>					
<b>Spot N1</b>					
SMPP1	2122.94	1 <sup>+</sup>	2123.95	–SDCACLHALGHVAR	P85390
<b>Spot N5</b>					
SMPP2	1874.76	1 <sup>+</sup>	1875.76	DGDDGDGD–	P85398
<b>Spot N7</b>					
SMPP3	1482.67	1 <sup>+</sup>	1483.68	EKGYNPYVR	P85388
SMPP4	1876.79	1 <sup>+</sup>	1877.79	DMYSDNLGLCDN–	P85391
<b>ESI QqTOF/TOF analysis</b>					
<b>ASM</b>					
SMPP5 <sup>[a]</sup>	360.19	2 <sup>+</sup>	719.37	FAPCPK	P85372
SMPP6	367.72	2 <sup>+</sup>	734.43	ADLFLR	P85373
SMPP7 <sup>[a]</sup>	483.78	2 <sup>+</sup>	966.56	LYSLTEK	P85374
SMPP8	484.31	2 <sup>+</sup>	967.62	GPAAVVRLLGK	P85375
SMPP9	492.26	2 <sup>+</sup>	983.51	SFDSSVLTK	P85376
SMPP10 <sup>[a]</sup>	516.79	2 <sup>+</sup>	1032.56	QLFQPPFR	P85364
SMPP11 <sup>[a]</sup>	517.78	2 <sup>+</sup>	1034.55	TSFTLYMR	P85392
SMPP12 <sup>[a]</sup>	528.32	2 <sup>+</sup>	1055.63	ALAQLLSLAR	P85377
SMPP13 <sup>[a]</sup>	549.28	2 <sup>+</sup>	1097.54	TSTVFSDDGQR	P85378
SMPP14	554.75	2 <sup>+</sup>	1108.49	DFFDFDPR	P85379
SMPP15 <sup>[a]</sup>	584.31	2 <sup>+</sup>	1167.61	LGICFASMPR	P85380
SMPP16	593.82	2 <sup>+</sup>	1186.64	–FIAGLNLGR	P85381
SMPP17	681.38	2 <sup>+</sup>	1361.76	LSLQEFGLWLR	P85382
SMPP18	729.38	2 <sup>+</sup>	1457.74	–DSSVLTSEYPR	P85383
<b>AIM</b>					
IMPP1	372.71	2 <sup>+</sup>	744.41	FVSTYK	P85389
IMPP2	465.78	2 <sup>+</sup>	930.55	VSVVGTVR	P85384
IMPP3	470.26	2 <sup>+</sup>	939.51	YLTCNLR	P85393
IMPP4	480.78	2 <sup>+</sup>	960.54	TLASAIASAR	P85385
IMPP5	512.26	2 <sup>+</sup>	1023.52	LGSLDEYAR	P85386
IMPP6	519.77	2 <sup>+</sup>	1038.54	SFSESLAAAR	P85387
IMPP7	582.81	2 <sup>+</sup>	1164.61	FTVSSQVSGPR	P85394
IMPP8	600.83	2 <sup>+</sup>	1200.65	AAALSQAADNLR	P85395
IMPP9	625.83	2 <sup>+</sup>	1250.66	FTAASQTLEAGR	P85396
IMPP10	675.35	2 <sup>+</sup>	1349.69	NSTMNSLLQLGR	P85397
IMPP11	675.85	2 <sup>+</sup>	1350.70	NSTMNSLLQLGR	P85370
IMPP12	682.85	2 <sup>+</sup>	1364.70	LSVNYQWLVR	P85399
IMPP13	697.82	2 <sup>+</sup>	1394.64	ALYSADGDSWFAR	P85368
IMPP14	737.39	2 <sup>+</sup>	1473.78	VTAKAVAAEAAASAR	P85371
IMPP15	762.88	2 <sup>+</sup>	1524.76	LGSPFGGFDLGSNR	P85369
IMPP16	842.46	2 <sup>+</sup>	1683.92	PGGGVSGALSLVQSLVR	P85365
IMPP17	862.4	2 <sup>+</sup>	1723.79	YYEYVDGQGMVVR	P85366
IMPP18	890.10	3 <sup>+</sup>	2669.29	–MFLGPGGAGGQAFDQAR	P85400
IMPP19	978.96	2 <sup>+</sup>	1956.91	–GGGSNFGQFAGGLDR	P85401
IMPP20	1057.4	2 <sup>+</sup>	2113.79	–DMDDFGLGDFDDGR	P85367

[a] Peptide also present in the AIM extract.

the resulting peptides, if not ionized, are not detectable. The technique might thus introduce a bias in the representativeness of the analyzed peptides. Finally, our approach focuses strictly on secreted proteins, which are incorporated in the shell. It does not take into consideration the “silent” secreted proteins, such as extrapallial fluid proteins, nor the proteins of the mantle epithelium, which may contribute to the shell elaboration without being constitutive of the shell matrix.<sup>[56]</sup> In

spite of these technical limitations, it is puzzling to observe that most of the peptide sequences that we obtained do not exhibit any similarity with known molluscan shell proteins. This obviously points to the fundamental question of the diversity of molluscan shell proteins. Since 1996, the number of fully sequenced proteins/genes has exponentially increased, forming a wide range of protein families.<sup>[12,13]</sup> However, these characterizations have been performed on a limited number of biological models, the two most studied being the pearl oyster *Pinctada* sp. and the abalone *Haliotis* sp. Through investigation of new biological models on one hand, and through the use of new approaches on the other, such as “mantle transcriptomics”<sup>[56,57]</sup> and “shell proteomics” as here, the information on molluscan shell proteins increases at different levels: protein families, domains, and functions. Ultimately, it should allow more accurate definition of the basic “protein equipment” required for making a shell.

Another remarkable finding of our proteomic approach on *Nautilus* is that the few peptides that exhibit sequence homology with known shell proteins match with those of bivalve origin. So far, we have not found any sequence homology with the nacre proteins characterized from the archeogastropod *Haliotis*, such as lustrin A, perlustrin, perlucin, perlwapin, perlinhibin, AP7, or AP24 (reviewed in ref. [13]) or the set of proteins determined by EST.<sup>[56]</sup> In the most consensual phylogenetic reconstructions of the phylum Mollusca, cephalopods and gastropods are grouped together in the Visceroconch (also called Cyrtosoma) clade,<sup>[58]</sup> which represents the sister group of diatoms (bivalves + scaphopods). The putative phylogenetic proximity of cephalopods and gastropods would be reflected in their respective nacre textures, which exhibit similarities, in contrast to bivalvian nacre.<sup>[59]</sup> The first are columnar, and constituted of superimposed tablets;<sup>[26]</sup> the second represent the “brickwall-type”, also called “sheet nacre”, and nacre tablets grow “in terraces”.<sup>[6]</sup> It is then surprising to observe that the morphological resemblance between nautilus and abalone nares is not translated in a “sampling” of their protein contents. This discrepancy is puzzling, in particular because nacre textures are usually considered to be plesiomorphic<sup>[19,60]</sup> and one should expect their constitutive proteins to be highly conserved during evolution. Our findings suggest, but do not demonstrate, that nacre proteins might be less evolutionarily constrained than expected, and/or that similar types of nacre might be constructed through different biochemical pathways, by use of different “macromolecular tools”.

## Experimental Section

**Shell material and matrix extraction:** Fresh shells of ■■■20–25 mm in diameter ■■■ from the cephalopod *Nautilus macromphalus* were collected on the coast of New Caledonia (Pacific). The external prismatic layers were removed by abrasion under cold water. Whole shells were mechanically crushed and fragments of the siphon were removed. The shell fragments were immersed in NaOCl (1%, v/v) for 24 h to remove superficial contaminants, and were then thoroughly rinsed with water. All the following extraction procedure was performed at 4°C. The shell powder (< 200 μm) was suspended in MilliQ water and decalcified, overnight,



quently reduced with DTT (20 mM, 30 min, 56 °C in 0.1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) and alkylated with iodoacetamide (0.1 M; 20 min, 25 °C in 0.1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>). Proteins were digested in gel with trypsin (10 µg mL<sup>-1</sup>, 20 µL; Roche, France) in TFA (0.01%, 30 min at 4 °C), supernatant (17 µL) was then discarded, and pieces of gels were covered with NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (25 mM, 7 µL) for incubation (2 h, 37 °C). Peptide-containing fractions were extracted by addition of TFA (0.5%, 1 µL) and the supernatant was then recovered. The gel was rinsed with ACN (8 µL) and the supernatants were pooled. Tryptic peptides were analyzed with the mass spectrometer (MS) and the MS/MS modes on a matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF/TOF) Ultraflex II (Bruker Daltonics) instrument with a HCCA matrix.

**LC ESI-QqTOF/TOF analysis of whole ASM and AIM:** ASM (1 mg) was dissolved in NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (100 mM, 20 µL) and proteins were reduced at 60 °C for 15 min with DTT (5 mM), followed by alkylation with iodoacetamide (20 mM), in the dark at room temperature for 25 min. Samples were diluted in NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> buffer (400 µL) with acetonitrile (20 µL) and incubated for 18 h at 37 °C with trypsin (10 µg, Proteomics grade, Sigma). After centrifugation, the supernatant was lyophilized and stored at -20 °C. AIM (100 mg) was suspended in NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (100 mM, 5 mL) and treated as described above for the ASM. Then the sample was lyophilized. The dry residue (1 mg) was dissolved in NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> buffer (100 µL) containing acetonitrile (5%) and incubated with trypsin (10 µg) for 18 h at 37 °C. After centrifugation, the supernatant was lyophilized and stored at -20 °C. The peptide digests were dissolved in MilliQ water (50 µL) and aliquots (5 µL) were used for proteomic analysis. High-performance liquid chromatography (HPLC) was performed on the tryptic peptides with a 0.32 mm diameter capillary C<sub>18</sub> column (Discovery® Bio wide pore 5 µm, Sigma) at a 50 µL min<sup>-1</sup> flow rate with a gradient of acetonitrile in 1% formic acid (5 to 80% in 60 min). The fractionated peptides were analyzed with an electrospray ionization hybrid quadrupole time-of-flight (ESI-QqTOF) hybrid mass spectrometer (pulsar I, Applied Biosystems) by information-dependent acquisition (IDA), which allows switching between MS and MS/MS experiments. The data were acquired and analyzed with the Analyst QS software (Version 1.1). After 1 s acquisition of the MS spectrum, the two most intense multiple charged precursor ions (+2 to +4) could be selected for 2 s-MS/MS spectral acquisitions. The mass-to-charge ratios of the selected precursor ions were excluded for 60 s to avoid re-analysis. The minimum threshold intensity of the ion was set to ten counts. The ion-spray potential and declustering potential were 5200 and 50 V, respectively. The collision energies for the gas-phase fragmentation of the precursor ions were determined automatically by the IDA on the basis of their mass-to-charge ratio (*m/z*) values.

**Mass spectrometry data and database searching:** The mass spectra data were searched against the NCBI nonredundant database (October 2007), with use of the MASCOT search engine (<http://www.matrixscience.com>). The mass tolerance was 50 ppm for MALDI-TOF MS or 0.5 Da for ESI-QqTOF MS and was 0.2 Da for both MS/MS experiments with one missed cleavage. Other search parameters were carbamidomethyl as fixed modification and oxidation of methionine as variable modification. Because no identification was achieved by MASCOT searching, MS/MS spectra were analyzed and interpreted de novo manually with the assistance of the Analyst QS1.1 software or the PEAKS software.<sup>[76]</sup> ■ ■ ■ indicates both Ile and Leu residues. ok? ■ ■ ■ All the candidate sequences were merged in a MS BLAST search and were compared and aligned two by two with the other sequences of mollusk shell pro-

teins, by use of the SIM tool from the ExPASy server (<http://www.expasy.ch/tools/sim.html>).

## Acknowledgements

This work is supported by an ANR project for the period 2007–2010 (ACCRO-Earth, ref. BLAN06–2\_159971, coordinator Gilles Ramstein, LSCE, Gif/Yvette). B.M. was financed by a PhD Fellowship from the Ministère Délégué à la Recherche et aux Nouvelles Technologies, (No. 15351) accompanying the ACI JC3049 (F.M.). The “Conseil Régional de Bourgogne” (Dijon, France) provided additional support for the acquisition of new equipment in the Biogéosciences research unit (UMR CNRS 5561). Jean-Paul Pais de Barros (U198, Métabolisme des Lipoprotéines Humaines et Interactions Vasculaires, Université de Bourgogne) is acknowledged for his help in performing the 2D gel electrophoresis. B.M. and F.M. thank Claudie Josse (Laboratoire de Réactivités des Solides, Université de Bourgogne) for helping with the SEM, and Danielle Ballivet-Tkatchenko and Laurent Plasseraud (UMR 5188, LSEO, Université de Bourgogne) for the infrared measurements. They also thank Olivier Mathieu and Jean Lévêque for elemental analysis (UMR 5561, Biogéosciences, Université de Bourgogne) and “l’aquarium des lagons” de Nouméa (Nouvelle-Calédonie) for providing fresh shells of *Nautilus macromphalus*. The protein sequence data appear in the UniProt knowledgebase under the accession numbers P85364–P85401.

**Keywords:** biomineralization · evolution · mollusk shell nacre · *Nautilus macromphalus* · proteomics

- [1] L. Addadi, D. Joester, F. Nudelman, S. Weiner, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 980–987.
- [2] S. Mann, *Nature* **1988**, *332*, 119–124.
- [3] D. Sud, D. Doumenc, E. Lopez, C. Millet, *Tissue Cell* **2001**, *33*, 154–160.
- [4] P. Westbroek, F. Marin, *Nature* **1998**, *392*, 861–862.
- [5] H. Mutvei, *The Mechanisms of Biomineralization in Animals and Plants*, Tokai University Press, Tokyo, **1990**.
- [6] H. Nakahara, *Mechanisms and Phylogeny of Mineralization in Biological Systems*, Springer, New York, **1991**.
- [7] Y. Oaki, H. Imai, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6571–6575.
- [8] M. Rousseau, E. Lopez, P. Stempflié, M. Brendlé, L. Franke, A. Guette, R. Naslain, X. Bourrat, *Biomaterials* **2005**, *26*, 6254–6262.
- [9] G. Goffinet, C. Jeuniaux, *Cahiers Biologie Mar.* **1979**, *20*, 341–349.
- [10] S. Sudo, T. Fujikawa, T. Nagakura, T. Ohkubo, K. Sakaguchi, M. Tanaka, K. Nakashima, T. Takahashi, *Nature* **1997**, *387*, 563–564.
- [11] X. Shen, A. Belcher, P. Hansma, G. Stucky, D. Morse, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 32472–32481.
- [12] C. Zhang, R. Zhang, *Mar. Biotechnol.* **2006**, *8*, 572–586.
- [13] F. Marin, G. Luquet, B. Marie, D. Medakovic, *Curr. Top. Dev. Biol.* **2007**, *80*, 209–276.
- [14] G. Falini, S. Weiner, L. Addadi, *Calcif. Tissue Int.* **2003**, *72*, 548–554.
- [15] F. Nudelman, B. Gotliv, L. Addadi, S. Weiner, *J. Struct. Biol.* **2006**, *153*, 176–187.
- [16] I. Weiss, N. Tuross, L. Addadi, S. Weiner, *J. Exp. Zool.* **2002**, *293*, 478–491.
- [17] Y. Levi Kalisman, G. Falini, L. Addadi, S. Weiner, *J. Struct. Biol.* **2001**, *135*, 8–17.
- [18] J. Cope, *Origin and Evolutionary Radiation of the Mollusca*, Oxford University Press, Oxford, **1996**.
- [19] J. Carter, G. Clark, *Mollusk, Note for a Short Course, Studies in Geology, University of Tennessee Press*, ■ ■ ■ ville plutôt qu’état, SVP ■ ■ ■ **1985**.
- [20] A. Palmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 1379–1382.
- [21] A. Lindgren, G. Giribet, M. Nishiguchi, *Cladistics* **2004**, *20*, 454–486.

- [22] L. Bonnaud, C. Ozouf Costaz, R. Boucher Rodoni, *C. R. Biol.* **2004**, *327*, 133–138.
- [23] G. Goffinet, *Comp. Biochem. Physiol.* **1969**, *29*, 835–839.
- [24] M. Crenshaw, H. Ristedt, *The Mechanisms of Mineralization in the Invertebrates and Plants*, University of South Carolina Press, Columbia, **1976**.
- [25] R. Velazquez Castillo, J. Reyes Gasga, D. Garcia Gutierrez, M. Jose Yacaman, *Biomaterials* **2006**, *27*, 4508–4517.
- [26] R. Velazquez Castillo, J. Reyes Gasga, D. Garcia Gutierrez, M. Jose Yacaman, *J. Mater. Res.* **2006**, *21*, 1484–1489.
- [27] C. Grégoire, *Chemical Zoology, Vol. 7*, Academic Press, New York, **1972**.
- [28] S. Weiner, *Calcif. Tissue Int.* **1979**, *29*, 163–167.
- [29] Y. Dauphin, F. Marin, *Experientia* **1995**, *51*, 278–283.
- [30] S. Weiner, H. Lowenstam, L. Hood, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **1977**, *30*, 45–51.
- [31] J. Keith, S. Stockwell, D. Ball, K. Remillard, D. Kaplan, T. Thannhauser, R. Sherwood, *Comp. Biochem. Physiol. Part B* **1993**, *105*, 487–496.
- [32] Y. Dauphin, *Zoology* **2006**, *109*, 85–95.
- [33] H. Zhao, T. Samata, D. Takakura, R. Hashimoto, Y. Miyazaki, T. Nozawa, Y. Hikita, *Biomaterialization (BIOM2001): Formation, Diversity, Evolution and Application*, Tokai University Press, Kanagawa, **2003**.
- [34] J. Balmain, B. Hannover, E. Lopez, *J. Biomed. Mater. Res.* **1999**, *48*, 749–754.
- [35] D. Worms, S. Weiner, *J. Exp. Zool.* **1986**, *237*, 11–20.
- [36] J. Marxen, W. Becker, *Comp. Biochem. Physiol. Part B* **1997**, *118*, 23–33.
- [37] B. Marie, G. Luquet, J. P. Pais de Barros, N. Guichard, S. Morel, G. Alcaraz, L. Bollache, F. Marin, *FEBS J.* **2007**, *274*, 2933–2945.
- [38] J. Marxen, M. Hammer, T. Gehrke, W. Becker, *Biol. Bull.* **1998**, *194*, 231–240.
- [39] H. Nakahara, G. Bevelander, M. Kakei, *Venus* **1982**, *41*, 33–46.
- [40] L. Pereira Mouriès, M. Almeida, C. Ribeiro, J. Peduzzi, M. Barthélemy, C. Milet, E. Lopez, *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 4994–5003.
- [41] S. Weiner, W. Traub, *FEBS Lett.* **1980**, *111*, 311–316.
- [42] F. Zentz, L. Bédouet, M. Schuller, C. Milet, E. Lopez, M. Giraud, *Mar. Bio-technol.* **2001**, *3*, 36–44.
- [43] F. Marin, P. Corstjens, B. Gaulejac, E. de Vrind De Jong, P. Westbroek, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 20667–20675.
- [44] S. Weiner, W. Traub, H. Lowenstam, *Biomaterialization and Biological Metal Accumulation*, Reidel, Dordrecht, **1983**.
- [45] H. Kasai, N. Ohta, *Studies of Molluscan Paleobiology. Professor Masae Omori Memorial Volume*, Niigata University Press, Niigata, ■■■Japan? ■■ **1981**.
- [46] L. Bédouet, A. Marie, L. Dubost, J. Peduzzi, D. Duplat, S. Berland, M. Puisségur, H. Boulzaguët, M. Rousseau, C. Milet, E. Lopez, *Mar. Biotechnol.* **2007**, *9*, 638–649.
- [47] K. Mann, B. Macek, J. Olsen, *Proteomics* **2006**, *6*, 3801–3810.
- [48] L. Bédouet, M. Schuller, F. Marin, C. Milet, E. Lopez, M. Giraud, *Comp. Biochem. Physiol. Part B* **2001**, *128*, 389–400.
- [49] F. Marin, R. Amons, N. Guichard, M. Stigter, A. Hecker, G. Luquet, P. Layrolle, G. Alcaraz, C. Riandet, P. Westbroek, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 33895–33908.
- [50] J. Waite, A. Saleuddin, S. Andersen, *J. Comp. Physiol.* **1979**, *130*, 301–307.
- [51] K. Nagai, N. Yano, K. Morimoto, H. Miyamoto, *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **2007**, *146*, 207–214.
- [52] F. Marin, B. Pokroy, G. Luquet, P. Layrolle, K. De Groot, *Biomaterials* **2007**, *28*, 2368–2377.
- [53] B. Marie, G. Luquet, L. Bédouet, C. Milet, N. Guichard, D. Medakovic, F. Marin, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2515–2523.
- [54] J. Bartlett, J. Simmer, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **1990**, *1*, 425–441.
- [55] A. Martin, V. David, J. Laurence, P. Schwartz, E. Lafer, A. Hedge, P. Rowe, *Endocrinology* **2008**, *149*, 1757–1772.
- [56] D. Jackson, C. McDougall, K. Green, F. Simpson, G. Wörheide, B. Degnan, *BMC Biol.* **2006**, *4*, 40–49.
- [57] D. Jackson, G. Wörheide, B. Degnan, *BMC Evol. Biol.* **2007**, *7*, 160–177.
- [58] G. Haszprunar, C. Schander, K. Halanych, *Phylogeny and Evolution of the Mollusca*, University of California Press, Berkeley, **2008**.
- [59] D. Chateigner, C. Hedegaard, H. Wenk, *J. Struct. Geol.* **2000**, *22*, 1723–1735.
- [60] A. Checa, T. Okamoto, J. Ramirez, *Proc. R. Soc. London Ser. B* **2006**, *273*, 1329–1337.
- [61] U. Laemmli, *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
- [62] J. Morrissey, *Anal. Biochem.* **1981**, *117*, 307–310.
- [63] R. Zacharius, T. Zell, J. Morrison, J. Woodlock, *Anal. Biochem.* **1969**, *30*, 148–152.
- [64] R. Wall, T. Gyi, *Anal. Biochem.* **1988**, *175*, 298–299.
- [65] R. Lev, S. Spicer, *J. Histochem. Cytochem.* **1964**, *12*, 309.
- [66] K. Campbell, D. MacLennan, A. Jorgensen, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 11267–11273.
- [67] K. Maruyama, T. Mikawa, S. Ebashi, *J. Biochem.* **1984**, *95*, 511–519.
- [68] R. Schuster, *J. Chromatogr.* **1988**, *431*, 271–284.
- [69] J. Rohrer, *Anal. Biochem.* **2000**, *283*, 3–9.
- [70] I. Barbosa, S. Garcia, V. Barbier Chassefière, J. P. Caruelle, I. Martelly, D. Papy Garcia, *Glycobiology* **2003**, *13*, 647–653.
- [71] L. Addadi, S. Weiner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 4110–4114.
- [72] S. Albeck, L. Addadi, S. Weiner, *Connect. Tissue Res.* **1996**, *35*, 365–370.
- [73] Q. Feng, G. Pu, Y. Pei, F. Cui, H. Li, T. Kim, *J. Cryst. Growth* **2000**, *216*, 459–465.
- [74] G. Fu, S. Qiu, C. Orme, D. Morse, J. De Yoreo, *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 2678–2683.
- [75] L. Treccani, K. Mann, F. Heinemann, M. Fritz, *Biophys. J.* **2006**, *91*, 2601–2608.
- [76] B. Ma, K. Zhang, C. Hendrie, C. Liang, M. Li, A. Doherty Kirby, G. Lajoie, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, *17*, 2337–2342.

Received: January 5, 2009

Published online on ■■■, 2009



## Nacre evolution: a proteomic approach

Benjamin MARIE<sup>1</sup>, Nathalie LE ROY<sup>1</sup>, Arul MARIE<sup>2</sup>, Lionel DUBOST<sup>2</sup>, Christian MILET<sup>3</sup>, Laurent BEDOUE<sup>3</sup>, Michel BECCHI<sup>4</sup>, Isabelle ZANELLA-CLEON<sup>4</sup>, Daniel JACKSON<sup>5</sup>, Bernard DEGNAN<sup>5</sup>, Gilles LUQUET<sup>1</sup> and Frédéric MARIN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UMR 5561 CNRS, Biogeosciences, Université de Bourgogne, 6 Bd. Gabriel F-21000, France  
e-mail: benjamin.marie@u-bourgogne.fr; frederic.marin@u-bourgogne.fr

<sup>2</sup>Département RDDM, Plateforme de Spectrométrie de Masse et de Protéomique, MNHN, 75231 Paris, France

<sup>3</sup>UMR CNRS 5178, Biologie des Organismes Marins et Ecosystèmes, MNHN, 75231 Paris, France

<sup>4</sup>UMR 5086 CNRS, Institut de Biologie et de Chimie des Protéines (IBCP), 69367 Lyon, France

<sup>5</sup>School of Integrative Biology, University of Queensland, 4072 Queensland, Australia

### ABSTRACT

From an evolutionary viewpoint, the molluscan nacre constitutes a fascinating object. This microstructure appeared early, in the Lower Cambrian period, about 530 million years ago, and since then, has been kept unchanged until today. Nacre is restricted to the conchiferan mollusks, where it occurs in three main classes, bivalves, gastropods and cephalopods. The aim of the present study is to investigate whether all nacres are built from the same “macromolecular tools”, proteins of the nacre matrix. To this end, we studied three new nacre models, the freshwater bivalve *Unio pictorum*, the cephalopod *Nautilus macromphalus*, and the gastropod *Haliotis asinina*, to which we applied a combined biochemical and proteomic characterization of their respective nacre matrices. The results of our approach, that can be defined as “shellomics” (proteomics applied to shell proteins) shed a new light on the macroevolution of nacre matrix proteins and on the *in vitro* design of nacre-like biomaterials.

### INTRODUCTION

Because of its exceptional toughness, of its commercial value in jewelry, of its remarkable biocompatibility properties when implanted *in vivo*, nacre is by far the most studied molluscan shell microstructure [1] and many authors consider it as the reference model for understanding at the micro and nano scales how molluscs control the regular deposition of calcium carbonate tablets [2]. On a structural viewpoint, nacre consists of a regular superimposition of polygonal flat aragonitic tablets of 0.5- $\mu\text{m}$  thick, embedded in a peripheral thin organic matrix [3]. Biochemical characterizations, mainly performed on two models, the pearl oyster *Pinctada* sp. and the abalone *Haliotis* sp., have shown that the nacre matrix comprises a large set of macromolecular components including chitin, hydrophobic ‘framework’ proteins and several soluble proteins and glycoproteins [4].

The nacre appeared early in the fossil record, somewhere in the Cambrian period [5]. Since then, it has been kept almost unchanged throughout the Phanerozoic time. Nacre is represented in at least three classes, bivalves, gastropods and cephalopods. In monoplacophorans, true nacre is only observed in one extant genus [6]. Taking into consideration the phylogenetic tree shown in Fig. 1, one wonders whether all nacre microstructures are constructed from similar matrix proteins assemblages. Giving an answer to this question will shed a light on the process of recruitment of nacre matrix proteins in the Cambrian, and on the evolutionary constraints exerted on these proteins during the Phanerozoic.

To this end, we investigated three new nacre models, the freshwater bivalve *Unio pictorum*, the cephalopod *Nautilus macromphalus*, and the gastropod *Haliotis asinina*. We applied to their nacre matrices a biochemical and proteomic approach. We obtained numerous peptide sequences, which represent a sampling of the whole nacre proteins. These data were compared to those obtained from already characterized nacre models, including the abalone *Haliotis* sp., the fan mussel *Pinna nobilis* and the pearl oyster *Pinctada* sp. Surprisingly, our results suggest that nacre proteins may be less evolutionary constrained than expected, and/or that similar types of nacre may be constructed through different biochemical pathways. This may have important implications for the *in vitro* design of nacre-like biomaterials.

## EXPERIMENTAL DETAILS

Fresh shells of the bivalve *Unio pictorum*, the gastropod *Haliotis asinina*, and the cephalopod *Nautilus macromphalus* were collected on the Seine river (France), the East-coast of Australia and the coast of New Caledonia, respectively. For observation with scanning electronic microscope (JEOL 6400), freshly fragmented shells were carbon-sputtered prior to direct observation on secondary electron mode. The nacre acido-soluble matrix (ASM) and acido-insoluble matrix (AIM) were extracted from each species shells after a cold decalcification with 5% acetic acid, as previously described [8].

The carbonic anhydrase (CA) activity was measured for the nacre ASMs of each investigated species according to the colorimetric method of Maren [9]. Acetazolamide was used as a specific inhibitor of the CA activity. The ASMs were assayed for their capacity to inhibit *in vitro* the precipitation of calcium carbonate [8]. As positive controls, soluble matrices extracted from calcitic prisms were also tested.

Macromolecular components of the matrices were separated on 1-D SDS-PAGE (12% or 15% acrylamide) or on 2-D gels using pH 3 to 10 strips and 4-16% acrylamide gels, under denaturing conditions [8]. Gels were stained with Coomassie Brilliant Blue (CBB), and bands or spots were excised prior to mass spectrometry analysis. For the proteomic analysis, samples were digested with trypsin (5h, 37°C) after reduction/alkylation with dithiothreitol and iodoacetamine, as described previously [8]. Digested samples were injected on micro- or nano-LC column (PepMap100 C<sub>18</sub>; 5µm; 100Å; 300µm x 5mm, Dionex) for peptide separation at a flow rate of 0.300µL/min with linear gradient of 5 to 80% acetonitrile in 0.1 formic acid over 60min, then analyzed with Q-Star ESI Quadrupole / time-of-flight tandem mass spectrometers, (ESI-qQ-TOF-MS/MS). A 1s-TOFMS survey scan was acquired, then the most intense peptides with charge state of two to four were selected for 2s-MS/MS fragmentation and dynamically excluded for 60 s. The collision energy was set by the software according to the charge and mass of the precursor ion. The MS and MS/MS data were recalibrated using internal reference ions from a trypsin autolysis peptide at  $m/z$  842.51  $[M + H]^+$  and  $m/z$  421.76  $[M + 2H]^{2+}$ .

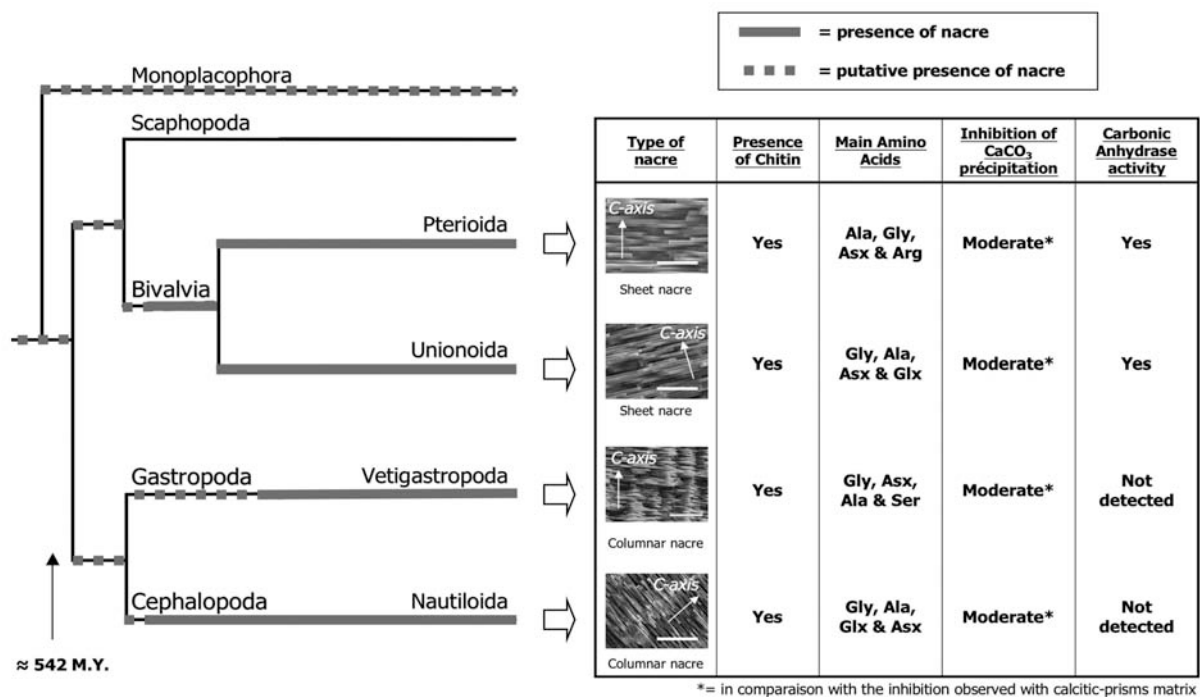
Because of the lack of genome sequence information for *Unio pictorum* and *Nautilus macromphalus*, sequence identification was performed manually by *de novo* sequencing of MS/MS spectra. The new peptide sequences were compared to known protein sequences, by BLAST approach using ExPasy-, NCBI- and UNIPROT-BLAST on line tools ([www.expasy.ch](http://www.expasy.ch), [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) and [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) or BLAST with our own set of calcification-related proteins using NPS@ on-line tools (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>). For *Haliotis asinina*, the spectral identification by sequence database searching method was performed by automated interpretation of MS/MS spectra using MASCOT software against the 1,915 nucleotide sequences available on-line from NCBI server [10, 11]. Candidate

sequences were manually confirmed by the observation of all the MS/MS spectra of peptides that give significant results.

## DISCUSSION

### Nacre and biochemical properties of associated matrices

Figure 1 summarizes some of the biochemical properties that can be observed in the different tested naces. The four matrices comprise chitin; they are enriched in few amino acid residues, Gly, Ala, Asx, and in a lesser extent, Arg, Glx or Ser. All of them inhibit calcium carbonate *in vitro* but this effect is rather moderate in comparison to the one recorded with acidic shell matrices extracted from calcitic prisms. We recorded a substantial carbonic anhydrase activity in the nacre matrix of *Unio pictorum* [12] and of *Pinctada margaritifera*, but did not observe any CA activity in the nacre matrix of the nautilus and of the abalone. We cannot exclude that, in these two species, CA activity is associated to the insoluble matrix.

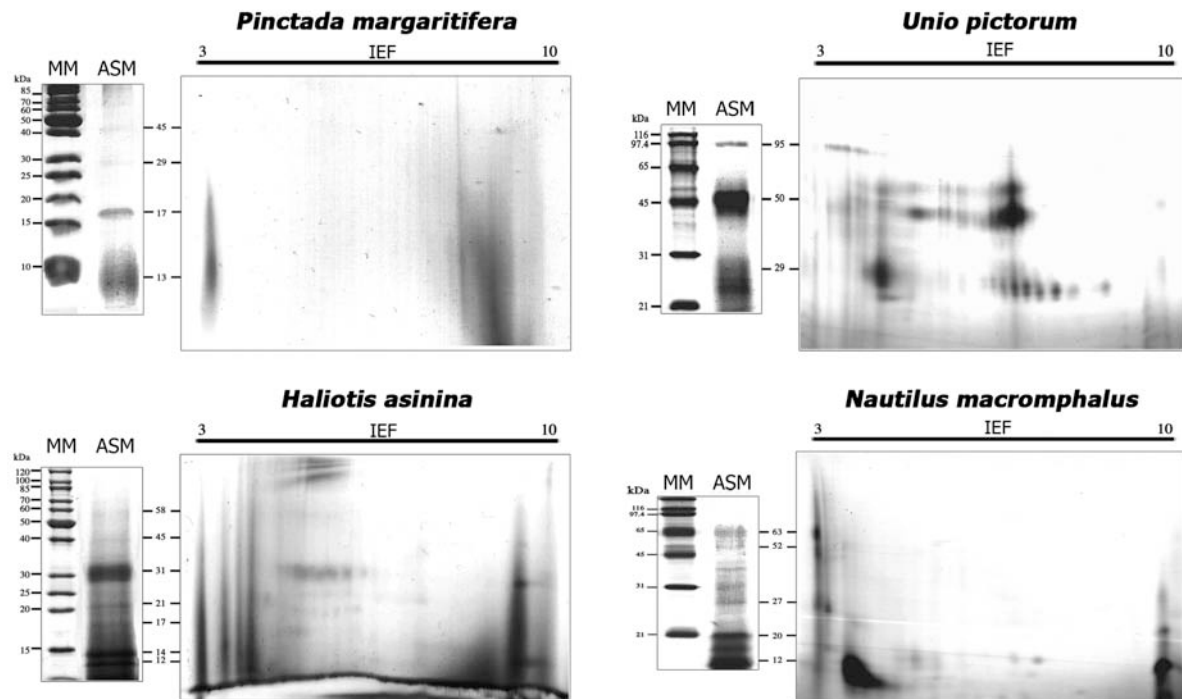


**Figure 1.** Distribution of nacre within conchiferan mollusk classes. From Checa and coworkers [6], the occurrence of nacre in extant monoplacophorans is certified for one genus only. On the cladogram, we superimposed few biochemical characteristics of the nacre matrices. Chitin was identified in a previous study [13], and since, has been verified by FTIR (unpublished data). For the clarity of the figure, some bivalvian nacre-bearing taxa (Nuculoida, Anomalodesmata) are not represented. The Vetigastropoda order contains all nacreous gastropods according to [7].

### 1D and 2D gel electrophoresis

Figure 2 presents 1D and 2D gel electrophoresis data obtained from the four studied mollusks. The electrophoretic patterns are different from species to species. On 1D gels, the acid-soluble matrices comprise few discrete bands and smearing macromolecules. On 2D gels, the four extracts are characterized by the presence of acidic macromolecules (that migrate to the left side of 2D gels). *Pinctada* and *Haliotis* matrices are characterized by the abundance of

smearing materials. In *Unio pictorum*, one notices series of spots of the same molecular weight, but of different *pI*, which suggest the presence of different isoforms (phosphorylations /glycosylations) of the same protein.



**Figure 2:** Analysis of nacre acido-soluble matrices (ASMs) on 1-D and 2-D gel electrophoresis for *Pinctada margaritifera* (Bivalvia, Pterioidea), *Unio pictorum* (Bivalvia, Unionoidea), *Haliotis asinina* (Gastropoda, Vetigastropoda) and *Nautilus macromphalus* (Cephalopoda, Nautiloidea). Gels were stained with CBB.

## **Proteomics data**

For the nacre proteins of *Unio pictorum*, the complete ASM was digested with trypsin and analyzed with a mass spectrometer in MS/MS mode [14]. Alternatively, the main proteinaceous bands observed on 1-D gels, which migrate at 12, 16, 29, 50 and 95 kDa, were excised then digested before being analyzed. The *de novo* interpretation of MS/MS spectra allowed deducing the amino acid sequence of each peptide. Many internal sequences (between 8 and 21 residue long) were obtained for these proteins: around 15 new sequences for P95, P29, P16 and P12, respectively, around 30 for P50, and more than 100 new internal sequences for the total ASM.

Similarly, for the nacre proteins of *Nautilus macromphalus*, the complete matrices (ASM and AIM) and a 63-kDa band (provisionally named *Nautilin63*) observed on 1-D gel were digested with trypsin, prior to mass spectrometer analysis and to the *de novo* sequencing of the observed peptides. We obtained more than 30 new internal sequences of 8-20 amino acid residues long for *Nautilin63*, and 40 sequences of 6-17 residues long for the complete matrices [14].

The MS/MS data, obtained from spots or bands of *Unio pictorum* or *Nautilus macromphalus* shell matrices show that identical peptides are present in different proteins of each matrix. Additionally, in *Unio pictorum*, short motifs like -NNLLGELGL- or -LFVDFLK- are repeated several times in different protein bands (P50-P29, or P29-P16, respectively). These observations may indicate that some specific protein domains can be used as ‘functional blocks’ by different shell matrix proteins. An alternative explanation

suggests that high molecular weight proteins may be preferentially cleaved in smaller fragments: for example, P29 could constitute a cleavage product of P50 or P95.

A different strategy was performed to investigate the nacre protein of *Haliotis asinina*. After digestion of nacre matrices with trypsin, MS/MS spectra of obtained peptides were analyzed using MASCOT online tool against already published transcriptomic data set (ESTs). From the 1,915 sequences encoding putative mantle protein identified by Jackson and co-workers [10, 11], we could annotate 8 ESTs (Expressed Sequence Tags), respectively ML3A11, ML6A10, ML5A7, ML7A11, ML8B1, ML1E6, ML5H8 and ML5B8 as true nacre proteins. These proteins, of 120 to 280 residues long, were not described before. Our study also confirmed that Sometsuke is truly a nacre matrix protein. On the other hand, we found neither Vm1 nor Vm2 in nacre extracts.

All the new sequences were searched for homology. Surprisingly, few of them match with known sequences.

**Table 1:** Nacre proteins characterized from mollusk shells. The new nacre proteins identified in our study are indicated in bold. The references of the known proteins can be found in [1]. The function (or homology) of some of the proteins is indicated in parenthesis.

<b>BIVALVIA</b>		<b>GASTROPODA</b>	<b>CEPHALOPODA</b>
<b>Pterioida</b>	<i>Unionoidea</i>	<b>Vetigastropoda</b>	<b>Nautiloidea</b>
<u><i>Pinctada sp.</i></u>	<u><i>Unio pictorum</i></u>	<u><i>Haliotis rufescens</i></u>	<u><i>Nautilus macromphalus</i></u>
Nacrein/N66 (CA), N14/N16/Perline, Linkine, MSI60 (silk-fibroin like), MSI7, N19, Mpn88, Several <10-kDa peptides	<b>P95 (Ca-binding), P50 (Ca-binding, CA?), P29 (Ca-binding), P16, P12, 100 news peptides</b>	AP7, AP24, LustrinA	<b>Nautilin63, 40 news peptides</b>
<i>Pinna nobilis</i>		<i>Haliotis laevigata</i>	<b>Nautilus pompilius</b>
Mucoperlin (mucin-like)		Perlucin (lectin), Perlwapin (protease inhibitor), Perlinhibin, Perlustrin (EGF-binding)	60-, 32-, 12-kDa (N-terminal only)
<i>Atrina Vexillum</i>		<i>Haliotis asinina</i>	
55-, 20-, 15 kDa (N-terminal only)		<b>ML3A11 (P-Rich), ML6A10, ML5A7, ML7A11 (GN- &amp; D-Rich), ML8B1, ML1E6 « Sometsuke » (KU domain), ML5H8, ML5B8 (lectin?)</b>	
<i>Mytilus edulis</i>			
21-kDa protein (N-terminal)			

## CONCLUSIONS

Our study presents proteomic results obtained from nacre matrices of different mollusks. This approach provides a wealth of information, for non-sequenced organisms, as well as for sequenced ones. In this second case, the combination of proteomics and genomics or transcriptomics is extremely powerful since it allows annotating the genes, the proteins of which are undoubtedly constituents of the shell matrix, leaving aside expressed genes which have only a putative role in shell biomineralization.

Our study has macro-evolutionary implications. Because nacre is supposed to represent a plesiomorphic character shared by different mollusk classes [6] and because it is evolutionary constrained, our proteomic approach should allow detecting several sequence homologies from class to class. This is surprisingly not the case. Most of our sequence data do not align with sequences of known nacre proteins. Different explanations can be put forward to explain our findings: since the different nacre-bearing mollusks have diverged early, their corresponding nacre proteins have accumulated mutations, which completely blurred the original signal. A second explanation is that the conserved protein domains - if they exist - are short and may escape our proteomic screening. A third explanation is that nacres can be constructed through different biochemical pathways, by using different macromolecular assemblages. Whatever the explanation, this gives interesting perspectives for the *in vitro* synthesis of biomimetic materials.

## ACKNOWLEDGMENTS

The work of B. Marie, N. Le Roy, G. Luquet and F. Marin is financially supported by an ANR (ACCRO-EARTH, ref. BLAN06-2\_159971, coordinator G. Ramstein, LSCE) during the period 2007-2010. B. Marie was supported by PhD fellowship (nov. 2004-nov. 2007; N° 15351, Ministère Délégué à la Recherche et aux Nouvelles Technologies).

## REFERENCES

1. F. Marin, G. Luquet, B. Marie and D. Medakovic, *Curr. Top. Dev. Biol.* **80**, 209 (2007).
2. H. Cölfen, *Top. Curr. Chem.* **271**, 1 (2007).
3. H. K. Erben, *Biomim. Res. Rep.* **4**, 15 (1972).
4. T. Samata, *Thalassas* **20**, 25 (2004).
5. W. Feng and W. Sun, *Acta Paleont. Polonica* **48**, 21 (2003).
6. A. Checa, J. Ramirez-Rico, A. Gonzalez-Segura and A. Sanchez-Navas *Naturwissenschaften* **96**, 111 (2009).
7. W. F. Ponder and D. R. Lindberg in *Origin, and Evolutionary Radiation of the Mollusca*, edited by J. D. Taylor (Oxford University Press, 1996) pp 135-154.
8. B. Marie, G. Luquet, J. P. Pais de Barros, N. Guichard, S. Morel, G. Alcaraz, L. Bollache and F. Marin, *FEBS J.* **274**, 2933 (2007).
9. T. Maren *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **130**, 26 (1960).
10. D. Jackson, C. McDougall, K. Green, F. Simpson, G. Wörheide and B. Degnan *BMC Biol.* **4**, 40 (2006).
11. D. Jackson, G. Wörheide and B. Degnan *BMC Evol. Biol.* **7**, 160 (2007).
12. B. Marie, G. Luquet, L. Bédouet, C. Milet, N. Guichard, D. Medakovic and F. Marin *ChemBioChem* **9**, 2515 (2008).
13. G. Goffinet and C. Jeuniaux *Cahiers Biologie Mar.* **20**, 341 (1979).
14. B. Marie, F. Marin, A. Marie, L. Bédouet, L. Dubost, C. Milet, G. Alcaraz and G. Luquet *ChemBioChem* In press (2009).



## VII. PERSPECTIVES ET CONCLUSION

### VII.1. Niveaux d'analyse des biominéralisations

### VII.2. Axe 1 : origine et évolution des biominéralisations carbonatées

- a. Les protéines acides
- b. Origine et évolution de la nacre des mollusques
- c. Activité anhydrase carbonique et biominéralisation carbonatée
- d. Les systèmes calcifiants des métazoaires ; vers une synthèse évolutive

### VII.3. Axe 2 : contrôle de la biominéralisation par la matrice

- a. Le problème calcite/aragonite chez les mollusques
- b. Localisation de protéines à la surface de biominéraux carbonatés
- c. Autres questions d'importance

### VII.4. Axe 3 : diagenèse des matrices calcifiantes

- a. Diagenèse de laboratoire
- b. Paléobiochimie des matrices calcifiantes
- c. Interactions peptide-minéral : phage display

### VII.5. Développements techniques

### VII.6. Le futur de la biominéralisation ?

- a. De la prospective en science
- b. Références bibliographiques

## VII.1. NIVEAUX D'ANALYSE DES BIOMINÉRALISATIONS

Dans un article récent consacré aux enzymes dans la biominéralisation, et dont je suis co-auteur avec Ingrid Weiss (Weiss and Marin, 2008), nous présentons un schéma (Fig. 1, p 75) qui montre les niveaux auxquels les enzymes interviennent dans la biominéralisation chez des organismes pluricellulaires. Dans le cas de la biominéralisation de la coquille chez les mollusques, je reprends ce schéma général (cf. Fig. 18 ci dessous), qui délimite plusieurs champs d'investigation des biominéralisations selon une logique spatiale et temporelle :

- Niveau 1 : développement.
- Niveau 2 : physiologie cellulaire.
- Niveau 3 : évènements extracellulaires.
- Niveau 4 : maturation des biominéraux.
- Niveau 5 : évolution post-mortem.

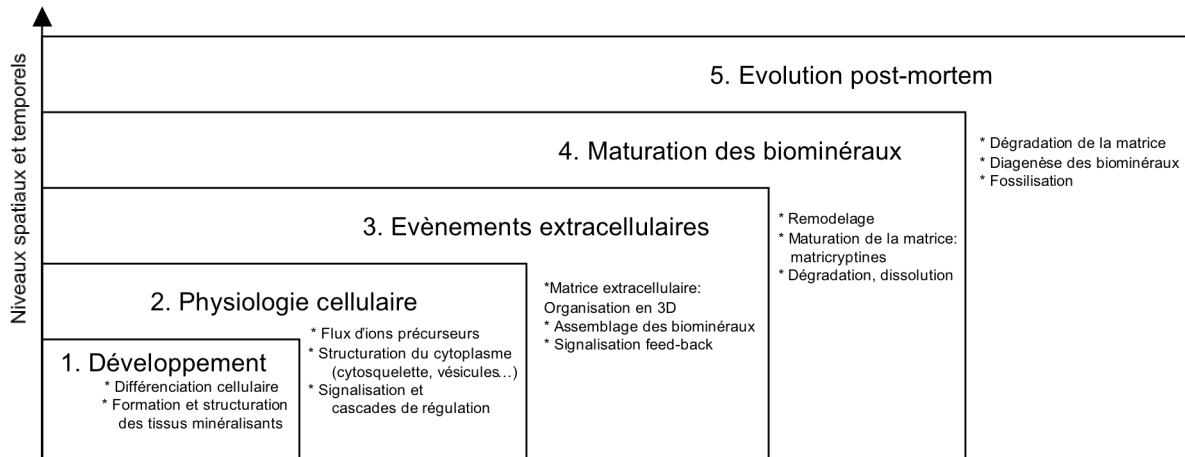


Fig. 18. Les différents niveaux d'analyse des biominéralisations chez les métazoaires (adapté de Weiss and Marin, 2008).

La biominéralisation de la coquille des mollusques peut être appréhendée selon chacun de ces niveaux. Le niveau 1 correspond à tous les évènements moléculaires et cellulaires depuis l'œuf fécondé jusqu'à la formation d'un individu juvénile. Lors de cette étape, la mise en place de la biominéralisation est contrôlée par des réseaux de gènes de développement. Si ces réseaux commencent à être bien connus chez le modèle oursin (Wilt and Killian, 2008), il n'en est pas de même chez les mollusques, pour lesquels nos connaissances demeurent extrêmement parcellaires, ainsi que je le soulignais dans le paragraphe IV consacré aux aspects développementaux.

Le niveau 2 désigne les évènements intracellulaires *sensu lato*. Ces évènements englobent la régulation des ions précurseurs calcium et bicarbonate, la structuration spatiale du cytoplasme des cellules impliquées dans la minéralisation, les cascades de régulation, la signalisation cellulaire. Dans le cas de la biominéralisation de la coquille des mollusques, des avancées ont été faites, mais ce chantier reste largement inexploré.

Le niveau 3, celui que j'appelle « événement extracellulaires », est le plus familier, puisqu'il concerne les matrices calcifiantes. C'est le niveau central de la biominéralisation. Ce niveau constitue le cœur de ma recherche, et le thème central de ce mémoire. Ici encore, nos

connaissances ont progressé depuis une décennie, mais elles restent limitées à quelques modèles biologiques, tels que l'ormeau ou l'huître perlière.

Le niveau 4 désigne les phénomènes de maturation des biominéraux. C'est sans doute le niveau le moins connu, de manière générale. Dans certains systèmes minéralisés, os ou dent, la maturation joue un rôle dans l'évolution des propriétés des biominéraux produits : certaines protéines de la matrice extracellulaire sont clivées enzymatiquement, et libèrent des fragments bioactifs, qui peuvent avoir un rôle dans la signalisation cellulaire. On parle alors de matricryptines (Davis *et al.*, 2000 ; Ricard-Blum and Faye, 2005). Chez les mollusques, les phénomènes de maturation coquillière sont un territoire totalement inexploré.

Finalement, le dernier niveau correspond à tous les événements post-mortem, que l'on désigne généralement sous le nom de processus taphonomiques et diagénétiques. Chez les mollusques, ces processus, qui concernent la phase minérale ainsi que la matrice coquillière, ont été abordés lors de travaux déjà anciens. A l'aune des progrès techniques accomplis ces dernières années, les processus de diagenèse des coquilles de mollusques mériteraient d'être réévalués sans tarder.

**En prenant en compte ces différents niveaux d'analyse, je souhaite continuer à structurer ma recherche selon trois grands axes :**

- **AXE 1 : origine et évolution des biominéralisations carbonatées chez les métazoaires.** Cet axe de recherche constitue le corps central de mon activité pour la décennie à venir. Il fait intervenir **les niveaux 1, 2 et 3** précédemment définis.

- **AXE 2 : contrôle de la biominéralisation par la matrice.** Cet axe s'intéresse aux fonctions des protéines des matrices calcifiantes, et donc, à leur interaction avec la phase minérale. Cet axe de recherche est focalisé spécifiquement sur le **niveau 3**.

- **AXE 3 : maturation et diagenèse (au sens large) des matrices calcifiantes des biominéraux carbonatés.** Effleurée jusqu'à maintenant, et subordonnée au second axe de recherche, cette thématique requiert un développement propre, dans la mesure où tous les outils sont disponibles. Cet axe de recherche intègre les **niveaux 4 et 5**.

## VII.2. AXE 1 : ORIGINE ET EVOLUTION DES BIOMINERALISATIONS CARBONATEES

Située au cœur de notre recherche, cette thématique de recherche s'inscrit dans le long terme. Les questions posées il y a quelques années restent d'actualité : Y-a-t-il une origine unique à tous les systèmes calcifiants chez les métazoaires ? Au contraire, chaque phylum a-t-il « inventé » son propre mode de biominéralisation ? Les 6 années passées ont permis d'avancer sur ces questions. Nous allons passer en revue les chantiers qui seront poursuivis et qui ont trait à l'origine et l'évolution des biominéralisations chez les métazoaires.

### a. Les protéines acides

Les protéines acides continuent d'occuper un rôle central dans la minéralisation carbonatée, puisqu'elles font « le lien entre le monde inorganique carbonaté et le monde organique ». Il est possible que ces protéines soient moins contraintes évolutivement qu'initialement suspecté. Nos données semblent montrer que les contraintes évolutives s'exercent sur de courts segments (de quelques acides aminés) de ces protéines et que d'autres domaines protéiques sont beaucoup moins contraints, donc plus sensibles à des mutations rapides, qui n'affectent pas la fonction de ces protéines (cf. chapitre V). Les domaines protéiques contraints pourraient être les domaines impliqués dans la reconnaissance d'une surface minérale carbonatée, calcite ou aragonite, les domaines moins contraints ayant le rôle de « spacers ». Selon une hypothèse alternative, la reconnaissance entre une surface minérale carbonatée et une protéine ne nécessite pas une grande spécificité. Ces deux hypothèses doivent être testées dans un futur proche.

Concrètement, nous continuerons à utiliser le modèle *Pinna nobilis*, qui est un bon modèle biologique. Dans le cadre du contrat européen (thèse P. Narayanappa), il est prévu d'identifier et de caractériser les ARN messagers codant la caspartine et la calprismine, afin d'en obtenir les séquences complètes. La répartition de ces transcrits dans les tissus mous (manteau calcifiant) de *P. nobilis* sera étudiée par hybridation *in situ*. Au niveau protéique, un nouvel anticorps polyclonal dirigé contre la calprismine a été préparé, début 2009. Il sera utilisé, conjointement à l'anticorps dirigé contre la caspartine (déjà largement utilisé) en immunohistologie sur tissu mou. Nous avons récemment fait des campagnes de collectes de *P. nobilis* juvéniles, qui seront utilisées à cette fin. Le nouvel anticorps sera également utilisé sur coquille de *Pinna nobilis* pour un immuno-marquage à l'or, selon notre technique déjà rôdée avec l'anticorps anti-caspartine.

Cette phase préparatoire de caractérisation complète de ces deux protéines acides servira à un travail comparatif sur d'autres formes calcifiantes. Nous prévoyons l'élaboration de sondes oligonucléotidiques d'une part, et d'anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes d'intérêt, d'autre part, chez la caspartine et la calprismine. Les sondes oligonucléotidiques serviront à cribler par RT-PCR un grand nombre de tissus calcifiants, extraits de bivalves, et plus largement de mollusques, de brachiopodes, de cnidaires et d'échinodermes. Cette opération vise à identifier et amplifier des ARN messagers de protéines possédant des domaines codés par les sondes. Par cette opération, il sera possible de mettre en évidence (ou non) une ou plusieurs familles de protéines de type caspartine ou calprismine (« caspartin-like », « calprismine-like »). La variabilité des membres constitutifs de cette ou ces familles sera alors appréciée et quantifiée. En parallèle, un travail similaire sera réalisé au niveau protéique, avec les anticorps polyclonaux et monoclonaux, qui seront utilisés contre les matrices calcifiantes extraites des organismes ayant été utilisés pour le criblage oligonucléotidique. Cette opération visera à démontrer la présence effective, dans la

matrice calcifiante, des protéines déduites de leurs transcrits respectifs. Les protéines immuno-réactives sur Western blot pourront alors être partiellement séquencées, afin de vérifier l'identité entre l'expression des transcrits et les protéines identifiées dans la matrice. L'objectif final sera ainsi de reconstituer l'histoire évolutive de la famille de protéines acides de type « caspartine » ou calprismine ».

### **b. Origine et évolution de la nacre des mollusques**

Nos résultats obtenus en protéomique sur les matrices de nacre de la moule d'eau douce *Unio pictorum* et du nautilus *Nautilus macromphalus* ont montré que les protéines associées à ce type de microstructures montrent une grande variabilité. Ces résultats novateurs, qui sont en cours de publication, suggèrent 2 hypothèses évolutives fondamentalement différentes, qui s'excluent mutuellement :

- les matrices associées aux nacres dérivent toutes d'un type ancestral (origine unique), la variabilité étant causée par l'accumulation, au cours des temps géologiques, de mutations « au hasard ». Dans ce cas, il est possible, de manière similaire à ce que nous avons décrit plus haut (a. « Les protéines acides »), que les contraintes évolutives sur les protéines de nacre soient exercées, non pas sur toute la séquence protéique, mais sur de courts domaines protéiques essentiels, d'autres domaines présentant une grande variabilité.

- les matrices associées aux nacres n'ont pas une origine unique. Dans ce cas, cela signifie qu'il est possible de « construire » de la nacre, en empruntant des « trajets biochimiques » différents. En d'autres termes, cela signifie que la microstructure « nacre » peut être considérée comme un attracteur. Ce concept est tout à fait intéressant à tester, à valider ou à infirmer.

Dans cette perspective, le chantier sur l'origine de la nacre sera poursuivi par une approche protéomique, en utilisant d'autres modèles nacrés, à titre de comparaison : bivalves (ptériomorphes, paléohétérodontes, anomalodesmata), gastéropodes nacrés.

Les concepts énoncés plus haut pourront aussi être étendus à d'autres types de microstructures coquillères chez les mollusques, tels les prismes (calcitiques ou aragonitiques), la microstructure foliée, les microstructures lamellaires croisées... Les microstructures coquillères apparaissent comme des « propriétés émergentes ». Cette notion offre des perspectives fascinantes dans le domaine des matériaux biomimétiques.

### **c. Activité anhydrase carbonique et biominéralisation carbonatée**

L'anhydrase carbonique est une enzyme clé des systèmes calcifiants. C'est aussi une enzyme très ubiquiste, cytoplasmique ou membranaire, dont l'ancienneté remonte sans doute bien avant l'explosion Cambrienne. L'anhydrase carbonique serait en fait apparue pour réguler l'équilibre acide-base intracellulaire.

Une des particularités des matrices calcifiantes extracellulaires est de posséder une activité anhydrase carbonique (Marie *et al.*, 2008), alors que cette enzyme est avant tout intracellulaire. Dans certains cas, des protéines matricielles de nacre à domaines anhydrase carbonique ont été identifiées : c'est le cas de la nacréine ou de la N66 (Miyamoto *et al.*, 1996 ; Kono *et al.*, 2000 ; Miyamoto *et al.*, 2003). Il est fascinant d'observer que ces deux protéines ne sont pas des anhydrase carbonique à proprement parler, mais qu'elles contiennent deux sous-domaines anhydrase carbonique (fonctionnels, dans le cas de la nacréine) flanqués de domaines structurels très différents.

Nous pouvons retracer un scénario évolutif dans ses grandes lignes : l'anhydrase carbonique aurait été cooptée pour la minéralisation à la transition Protérozoïque/Cambrien. Cette transition aurait été marquée par l'externalisation de cette enzyme, c'est-à-dire, son expression en domaine extracellulaire. Ce phénomène aurait été accompagné d'un « bricolage génétique », par échange d'exon (« exon shuffling »), aboutissant à une protéine extracellulaire fonctionnant à la fois comme une enzyme et comme une protéine liant la phase minérale.

Dans le cadre de la thèse de Nathalie Le Roy, la présence d'anhydrase carbonique est et sera recherchée dans des matrices minéralisantes de diverses espèces de mollusques et crustacés couramment étudiées au sein de notre laboratoire. Il s'agira ensuite de caractériser et séquencer la ou les protéines correspondantes, par les méthodes biochimiques et de biologie moléculaire. Les séquences obtenues seront comparées entre elles.

L'objectif sera d'établir une phylogénie des anhydrases carboniques chez les métazoaires, et en particulier, de celles strictement impliquées dans la minéralisation des squelettes et structures de stockage calcique. Cette phylogénie permettrait de déduire des scénarios sur l'origine des systèmes calcifiants à l'aube du Cambrien, ainsi que sur leur évolution au cours des temps géologiques.

#### **d. Les systèmes calcifiants des métazoaires : vers une synthèse évolutive**

Depuis 2004, date à laquelle nous avons publié la première revue sur les protéines de coquille de mollusques (Marin and Luquet, 2004), le domaine a évolué de manière rapide, tant au niveau du nombre de protéines caractérisées, qu'au niveau des concepts qui décrivent la transition « liquide précurseur-biominéral ». A titre d'exemple, en 2004, les séquences complètes de 16 protéines avaient été obtenues, et 8 autres protéines avaient été partiellement séquencées. En 2008, ces chiffres étaient respectivement de 43 séquences complètes et 31 séquences partielles (Marin *et al.*, 2008). Il y a tout lieu de croire que ce chiffre va augmenter de manière exponentielle, notamment grâce aux approches protéomiques ou transcriptomiques.

Avec la publication, année après année, de nouvelles protéines associées aux biominéralisations carbonatées, chez les cnidaires, les mollusques, les arthropodes, les échinodermes, une partie de notre travail consiste à analyser *in silico* les nouvelles données publiées, et à les archiver, pour l'instant, de manière très sommaire.

Dans le cas de la thèse européenne de Paula Silva, nous mettons en place une base de données sur les protéines matricielles des tissus calcifiants chez les métazoaires. Il s'agira de dégager les caractéristiques biochimiques des protéines enregistrées dans les différentes bases de données moléculaires (SwissProt, NCBI, PIR, etc...), en nous aidant des programmes disponibles sur le site web <http://expasy.org/>. Ainsi, seront obtenus les paramètres descriptifs des structures primaires et secondaires, les homologies avec d'autres protéines connues, les prédictions concernant les modifications post-traductionnelles (glycosylations, phosphorylations, sulfation, etc...).

Ce travail d'importance sera utile pour dégager les grandes tendances évolutives enregistrées par les protéines des matrices calcifiantes. Il servira donc à l'élaboration d'une synthèse évolutive.

## VII.3. AXE 2 : CONTROLE DE LA BIOMINERALISATION PAR LA MATRICE

Cet axe de recherche constitue le « second cœur » de notre activité. Il vise à comprendre les fonctions des protéines associées aux biominéralisations carbonatées, leurs interactions avec la phase minérale. Cet axe de recherche vise à replacer la matrice extracellulaire dans un contexte dynamique : la minéralisation est une suite d'évènements moléculaires séquentiels où « chaque acteur de la matrice calcifiante » (protéines ou polysaccharides) intervient à un temps donné, dans un lieu donné. Une illustration de cette temporalité nous est donnée par le scénario hypothétique proposé par Addadi et al. (2006), qui concerne la nacre de mollusques, laquelle serait formée en 4 étapes : auto-assemblage d'une armature chitineuse, puis d'un gel protéique entre les feuillets de chitine ; formation, dans ce gel, des premiers minéraux en carbonate de calcium amorphe ; nucléation des tablettes d'aragonite par l'intermédiaire des protéines acides ; croissance des tablettes en épaisseur, puis en largeur, jusqu'à atteindre la confluence. Clairement, la matrice contrôle tous les aspects de la minéralisation, depuis les stades les plus précoces, jusqu'à l'emballage final et l'émergence d'une architecture organo-minérale hiérarchisée.

J'ai volontairement dissocié ici les axes de recherches 1 (origine et évolution des biominéralisations carbonatées) et 2 (contrôle de la minéralisation par la matrice). Il faut savoir cependant que ces deux axes sont liés, même si le premier s'intéresse plus au patron et au processus évolutif et que le second s'intéresse exclusivement au « processus de fabrication ».

Je vais lister quelques questions d'importance concernant le contrôle de la minéralisation par la matrice.

### **a. Le problème calcite/aragonite chez les mollusques**

Les mollusques à eux seuls cristallisent ce problème, puisque certains d'entre eux sont capables de synthétiser ces deux polymorphes du carbonate de calcium au sein d'une même coquille. Je n'entrerai pas dans les détails des hypothèses déjà soumises (rôle du magnésium) mais jamais prouvées pour expliquer comment s'effectue la sélection du polymorphe. Par contre, je m'appuierai sur la figure 7, présentée au chapitre IV « Biominéralisation de la coquille des mollusques » (p 70), pour mettre en évidence une relation entre protéines matricielles et polymorphes du carbonate de calcium.

Les protéines coquillières liées à la calcite sont très acides (point isoélectrique théorique inférieur à 4), ou très basiques. Les protéines associées à l'aragonite ont des points isoélectriques plutôt faiblement acides à faiblement basiques. La raison de cette dichotomie est inconnue. Il est important de tester plus avant ce nouveau paradigme de la biominéralisation, en utilisant une approche protéomique.

### **b. Localisation de protéines à la surface de biominéraux carbonatés**

Dans un article remarquable publié il y a une douzaine d'année, l'équipe de Weiner avait montré, lors d'expériences de cristallisation *in vitro* de carbonate de calcium, l'effet d'extraits protéiques de coquille de mollusques (Albeck *et al.*, 1996). Cependant, leur démonstration était incomplète, dans la mesure où les protéines interagissant avec le

carbonate de calcium n'avaient pas été localisées à la surface des biominéraux synthétisés. De plus, cette équipe avait utilisé un mélange de protéines très incomplètement caractérisées.

Au laboratoire, nous maîtrisons la technique de cristallisation de carbonate de calcium *in vitro*. Nous utilisons en routine les techniques électrophorétiques de purification des protéines. Nous maîtrisons par ailleurs la technique de localisation par immunogold suivie d'une observation au MEB en électrons rétro-diffusés. Nous souhaitons combiner ces deux techniques pour visualiser l'adsorption des protéines à la surface des biominéraux produits, afin de voir leur répartition sur chaque face cristalline. Notre démarche sera simplifiée par la possibilité d'indexer les faces cristallines. Cette technique permettra de montrer s'il existe une spécificité de certaines protéines coquillères pour des faces cristallines données.

### **c. Autres questions d'importance**

\* Parmi les autres questions d'importance figure le rôle des polysaccharides dans la minéralisation carbonatée. Avec le modèle *Unio pictorum*, nous avons montré très clairement que les polysaccharides liés de manière covalente aux protéines jouaient de plusieurs manières (Marie *et al.*, 2007). Tout d'abord, ils modifient les propriétés de charge électrique (point isolélectrique) des protéines matricielles, en abaissant leur point isoélectrique, leur conférant ainsi des propriétés polyanioniques ; ils interagissent, mais pas toujours, avec le calcium en solution et peuvent avoir un rôle important dans la fixation labile de cet ion en solution ; ils modifient la morphologie de cristaux de carbonate de calcium synthétisés *in vitro*. Nous souhaitons continuer la caractérisation de ces fractions saccharidiques, et pour certains modèles (*Pinna*, *Unio*), aboutir à une caractérisation plus complète de ces sucres, allant jusqu'à leur séquençage.

\* Nous souhaitons également mettre l'accent sur d'autres types de modifications post-traductionnelles, en particulier, les phosphorylations (des résidus sérine, thréonine, tyrosine), et les sulfations (des résidus tyrosine). En particulier, la sulfation des résidus tyrosine, qui s'opère dans un contexte de structure primaire bien particulier (présence de résidus acides à proximité des résidus tyrosine), n'a jamais été montrée dans les matrices calcifiantes. Pourtant, l'analyse des structures primaires des protéines des matrices calcifiantes laisse à penser qu'elle existe.

\* Les mollusques modifient leur régime sécrétoire dans des cas bien particuliers, notamment lors de phases de réparation coquillière. Nos récents essais réalisés sur la palourde montrent que les matrices calcifiantes des zones réparées sont différentes de celle des coquilles normales, aussi bien par électrophorèse que par immunologie. La traduction de ce changement de régime sécrétoire se trouve dans la microstructure des zones réparées, qui diffère fortement de celle d'une zone coquillière à croissance « normale ». A l'aide de notre batterie d'anticorps polyclonaux dirigés contre des protéines spécifiques, nous souhaitons mettre en évidence ce changement de régime sécrétoire, tant sur des Western blots, que par localisation immuno-histologique (immunogold). Ce travail peut être complété par une approche protéomique différentielle sur des matrices associées aux zones de réparation ou non.

\* Selon une approche similaire, nous souhaitons poursuivre nos travaux sur le développement de la coquille de mollusques (modèles *Ostrea edulis* et *Mytilus edulis*), réalisés en collaboration avec le Center for Marine Research de Rovinj (Croatie, Dr. D. Medakovic). Nous voulons en particulier montrer les éventuels changements de régime sécrétoire accompagnant les transitions prodissoconque I – prodissoconque II, puis prodissoconque II - dissoconque. Ces transitions peuvent être appréhendées, d'une part à



l'aide d'anticorps spécifiques (certains de nos anticorps croisent avec la matrice d'*Ostrea edulis*), mais également par une approche protéomique ou transcriptomique.

## VII.4. AXE 3 : DIAGENESE DES MATRICES CALCIFIANTES

La diagenèse des biominéraux carbonatés et de leur matrice calcifiante est un axe de recherche que nous n'avons abordé que ponctuellement, lors de deux stages de Master successifs, et dans le cadre d'une étude pilote de notre thésard Benjamin Marie sur des moules d'eau douce fossiles du Cénozoïque (Marie *et al.*, *en préparation*). Nous souhaitons dynamiser cet axe de recherche, par le biais d'une thèse par exemple. Bien que cette thématique de recherche – au demeurant passionnante – soit subordonnée à la compréhension des matrices calcifiantes actuelles, nous souhaitons dans le futur la pérenniser ; son émergence est amplement justifiée par les acquis techniques (possibilité de micro-séquençage) et les outils moléculaires (nombreux anticorps disponibles) présents sur Dijon.

A ce jour, on ne sait toujours pas s'il est réaliste de chercher des protéines fossiles dans des coquilles de mollusques fossiles relativement anciens (Paléogènes ou Mésozoïques par exemple) dans la mesure où l'on ne connaît toujours pas leur degré de résistance à la diagenèse. De plus, aucun des travaux (anciens ou récents), basés sur des analyses d'acides aminés de mélanges, n'a été capable de montrer si les protéines extraites de formes fossiles étaient natives ou résultaient de contaminations (bactériennes, fongiques).

Dans ce contexte largement ouvert, la diagenèse des matrices calcifiantes doit être abordée selon trois angles différents : des expériences de diagenèse de laboratoire, des caractérisations de matrices fossiles, des expériences visant à comprendre les interactions organo-minérales. Voyons successivement ces trois aspects.

### a. Diagenèse de laboratoire

La plupart des (rares) expériences de stabilité des protéines des tissus calcifiants ont été réalisées sur des mélanges de protéines, ou bien sur des modèles minéralisants bien connus (os, par exemple). De ce fait, les expériences de mesure de la stabilité thermique de la caspartine, protéine de coquille de mollusque, constituent une première dans le domaine. Elles ont fait l'objet d'une petite publication (Marin *et al.*, 2007). Elles ont montré que cette protéine acide intracristalline était stable jusqu'à un seuil (100-110°) au-delà duquel elle se dégradait assez rapidement. Nous avons pu suivre la dégradation de cette protéine par des techniques immunologiques utilisant l'anticorps polyclonal dirigé contre la caspartine.

Nous souhaitons poursuivre cette démarche analytique avec d'autres protéines que nous avons identifiées, qu'il s'agisse de protéines associées à des microstructures aragonitiques, telles que la P95, la P50 ou P29, ou d'autres liées à la calcite (calprismine), pour laquelle nous disposons d'un nouvel anticorps. Notre démarche utilise des anticorps polyclonaux. Elle est basée sur la spécificité de la reconnaissance anticorps-antigène. Lorsque la protéine d'intérêt se dégrade progressivement, la reconnaissance immunologique diminue, et cette diminution est quantifiable par des tests ELISA ou par des western-blots ou dot-blots. Notre démarche sera complétée par l'utilisation d'anticorps monoclonaux, dirigés contre des domaines protéiques choisis. Ces anticorps permettront de visualiser quels sont les domaines d'une protéine donnée qui se dégradent en premier et ceux qui résistent à la dégradation. De ce fait, l'outil

immunologique permet véritablement de reconstituer l'évolution diagénétique d'une protéine donnée.

### **b. Paléobiochimie des matrices calcifiantes**

Les essais réalisés par B. Marie sur des moules d'eau douce Cénozoïques (Lutétien du Bassin de Paris) dont les microstructures coquillières sont extrêmement bien conservées ont montré la présence d'une matrice organique résiduelle, dont le caractère autochtone n'est pour le moment pas attesté (données non publiées). Par des essais sur des formes fossiles bien préservées, d'abord récentes (Néogènes), puis plus anciennes (Paléogènes, Mésozoïques), nous souhaitons poursuivre ce type de caractérisation, en nous entourant des précautions d'usage : vérification préalable de l'état diagénétique des squelettes sur lame mince par observation en cathodo-luminescence, analyse d'éléments mineurs, observations au MEB... Les extractions seront réalisées dans les conditions maximales de stérilité, et les constituants organiques extraits, analysés selon nos techniques de laboratoire courantes. Les extraits, étant donné leur faible quantité, seront soumis à une analyse de type protéomique, en vue de déterminer de nombreuses séquences peptidiques, qui seront comparées à celles des bases de données.

### **c. Interactions peptide-minéral : phage display**

Dernier aspect de la diagenèse des matrices calcifiantes, nous souhaitons développer un volet concernant les interactions entre les peptides et une phase minérale en carbonate de calcium (calcite ou aragonite), par la technique de « phage display » ou « peptide display ». Cette technique, largement utilisée dans le domaine des semi-conducteurs et des matériaux composites organo-minéraux, permet de sélectionner les peptides en fonction de leur affinité pour une surface minérale donnée, selon un principe que j'ai expliqué à la fin du chapitre consacré aux protéines acides. Des tests de laboratoire permettront de voir quels sont les peptides préférentiellement adsorbés sur une surface minérale carbonatée. Nous serons ainsi en mesure de tester la congruence des données de laboratoire et de celles obtenues sur des fossiles bien préservés.

## **VII.5. DEVELOPPEMENTS TECHNIQUES**

Depuis 2007, avec le modèle d'étude moule d'eau douce (*Unio pictorum*) puis avec le nautilus (*Nautilus macromphalus*), nous avons amorcé une approche protéomique dans l'étude des matrices calcifiantes.

L'approche protéomique est particulièrement adaptée à la problématique de l'origine Cambrienne des systèmes calcifiants chez les métazoaires. Par rapport à une approche plus « classique », impliquant la purification d'une ou de quelques protéines et l'obtention de leurs séquences N-terminale, l'approche protéomique permet un gain de temps, très appréciable lorsque les objectifs *in fine* consistent à comparer différents systèmes calcifiants entre eux. Elle permet de visualiser d'un coup la composition d'un mélange complexe de protéines, ce qui est typiquement le cas des matrices calcifiantes extracellulaires. Bien entendu, l'approche protéomique doit être accompagnée d'un développement d'analyses *in silico*, permettant un traitement rapide d'un volume croissant de données.

Parmi les autres développements techniques que nous souhaitons mettre en place, citons le phage display, basé sur des kits commercialisés. Il s'agit de banques de bactériophages modifiés génétiquement comportant une boucle peptidique (externe à la capsid virale), codée par l'ADN phagique. Basée sur une approche combinatoire, cette technique permet de sélectionner les séquences peptidiques, qui ont une affinité élevée pour une surface minérale. Utilisée sur des surfaces calcitiques ou aragonitiques, cette technique devrait apporter des informations de laboratoire complémentaires à celles obtenues sur des organismes fossiles.

Enfin, on peut imaginer qu'à l'horizon 2015, lorsqu'un répertoire important de protéines de matrices calcifiantes aura été identifié, des biopuces soient générées et utilisées pour obtenir le patron d'expression temporelle des gènes codant des protéines matricielles, à divers stades de développement (trochophore, véligères, adultes), sous différentes conditions (salinité, température, apports nutritionnels, etc...). Une approche similaire pourrait être envisagée au niveau protéique (puces à protéines), bien que cette technique soit pour le moment moins fiable et plus coûteuse.

## VII.6. LE FUTUR DE LA BIOMINÉRALISATION ?

### a. De la prospective en science

Arrivé au terme de ce manuscrit, la tentation serait grande de conclure sur un exercice de prospective de la discipline « biominéralisation » sur le long terme. Je ne m'y risquerai pas, au-delà d'une dizaine d'années... J'ai simplement à l'esprit l'anecdote suivante : mon père, qui n'était pas un scientifique - loin s'en faut - mais un pur autodidacte curieux de tout et en particulier de la *Res scientifica* (il avait commencé à travailler à 14 ans) m'avait légué un jour sa collection reliée de « Sciences et Avenir », qu'il avait minutieusement archivée, numéro après numéro, depuis le n°4 (il n'avait pu se procurer les 3 premiers numéros) de Février 1947 jusqu'à Décembre 1973. Avec le recul, la relecture des nombreux articles de prospective en science et techniques, qui fleurissaient dans cette revue de vulgarisation, est un exercice plutôt instructif. En effet, presque toutes les prédictions scientifiques couchées sur le papier se sont révélées fausses ou largement tronquées !!! Ainsi, pour ne citer que deux exemples, beaucoup d'entre elles voyaient à l'horizon 2000 des moyens de transport individuels et collectifs révolutionnaires ou affirmaient avec force que le cancer serait vaincu. On connaît la suite... En revanche, ces prévisions n'ont absolument pas anticipé la révolution biologique, ont largement sous-estimé la révolution des techniques de communication, ou ont tout simplement passé sous silence les nanotechnologies.

De manière générale, la distorsion entre une prévision scientifique et une réalité ultérieure avérée est un fait en science et l'exercice de prospective est malaisé, même s'il est nécessaire dans l'orientation et le choix à moyen terme des stratégies scientifiques.

En ce qui concerne le domaine des biominéralisations (à l'exclusion des recherches sur les os et les dents, qui ont déjà plusieurs longueurs d'avance), voici comment j'envisage les prochaines évolutions : les approches transcriptomiques (EST) et protéomiques vont continuer à se développer, notamment sur des systèmes biologiques peu étudiés tels que les cnidaires, les spongiaires... ou les mollusques. En parallèle, le séquençage haut débit de génomes tracera sa route, fournissant profusion de données moléculaires qu'il s'agira alors d'annoter, ce qui implique en aval des analyses *in silico* robustes et pertinentes. Souhaitons que les mollusques, encore aujourd'hui largement sous-représentés dans les programmes de séquençage génomiques (Simison and Boore, 2008), soient mieux servis dans le futur.

On peut également miser sur un retour, déjà largement amorcé, des techniques physiques d'analyse non destructives, permettant de comprendre *in situ* les relations organo-minérales sans avoir à dissoudre la structure minéralisée. Les récentes avancées en NanoSims par exemple offrent des perspectives intéressantes, permettant d'associer le tissu vivant à la minéralisation produite (Rousseau *et al.*, 2009). Bien que, sur la décennie écoulée, la microscopie de force atomique (AFM) n'ait pas tenu toutes ses promesses dans le domaine des biominéralisations, les toutes dernières avancées permettent d'envisager prochainement un apport essentiel de cette technique dans la visualisation de l'interaction d'une protéine donnée et de son substrat minéral (Tarasevich *et al.*, 2009).

Les concepts d'auto-assemblage, de propriétés émergentes devraient pouvoir continuer à creuser leur sillon, là où une approche réductionniste trouve ses limites. Les biominéralisations sont par essence des objets complexes aux propriétés émergentes, qui résultent d'une chimie complexe, sans doute non-aqueuse (Addadi *et al.*, 2006) faisant intervenir du tissu vivant, de nombreuses macromolécules aux multiples fonctionnalités, des ions minéraux, le tout impliqué dans une transition de phase liquide-solide dont les grandes lignes sont encore hors de portée de notre compréhension. Espérons juste que, dans le

domaine de l'évolution, le développement de ces concepts, à la frontière ténue entre physique et métaphysique, ne soit pas l'occasion pour les partisans d'un certain créationnisme déguisé (qu'il s'agisse de « l'Intelligent Design » ou toute autre formulation à la connotation identique nauséabonde) de glisser le pied dans la porte entrouverte...

## **b. Références bibliographiques**

- Addadi, L., Joester, D., Nudelman, F., and Weiner, S. (2006). Mollusk shell formation: a source of new concepts for understanding biomineralization processes. *Chem. Eur. J.* **12**, 980-987.
- Albeck, S., Weiner, S., and Addadi, L. (1996). Polysaccharides of intracrystalline glycoproteins modulate calcite crystal growth *in vitro*. *Chem. Eur. J.* **2**, 278-284.
- Davis, G. E., Bayless, K. J., Davis, M. J., and Meininger, G. A. (2000). Regulation of tissue injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules. *Am. J. Pathol.* **156**, 1489-1498.
- Kono, M., Hayashi, N., and Samata, T. (2000). Molecular mechanism of the nacreous layer formation in *Pinctada maxima*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **269**, 213-218.
- Marie, B., Luquet, G., Pais De Barros, J. P., Guichard, N., Morel, S., Alcaraz, G., Bollache, L. and Marin, F. (2007). The shell matrix of the freshwater mussel *Unio pictorum* (Paleoheterodonta, Unionoida). Involvement of acidic polysaccharides from glycoproteins in nacre mineralization. *FEBS Journal* **274**, 2933-2945.
- Marie, B., Luquet G., Bédouet, L., Milet C., Guichard, N., Medakovic, D., and Marin, F. (2008). Nacre calcification in the freshwater mussel *Unio pictorum*: carbonic anhydrase activity and purification of a 95-kDa calcium-binding glycoprotein. *ChemBiochem* **9**, 2515-2523.
- Marin, F., and Luquet, G. (2004). Molluscan shell proteins. *C. R. Palevol.* **3**, 469-492.
- Marin, F., Morin, V., Knap, F., Guichard, N., Marie, B., Luquet, L., Westbroek, P., and Medakovic, D. (2007). Caspartin: Thermal Stability and Occurrence in Mollusk Calcified Tissues. In "Biomineralization, from Paleontology to Materials Science" (J.L. Arias and M.S. Fernandez, Eds.) pp. 281-288. Editorial Universitaria, Santiago de Chile.
- Marin, F., Luquet, G., Marie, B. and Medakovic, D. (2008). Molluscan shell proteins : primary structure, origin and evolution. *Curr. Top. Dev. Biol.* **80**, 209-276.
- Miyamoto, H., Miyashita, T., Okushima, M., Nakano, S., Morita, T., and Matsushiro, A. (1996). A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9657-9660.
- Miyamoto, H., Yano, M., and Miyashita, T. (2003). Similarities in the structure of nacrein, the shell-matrix protein, in a bivalve and a gastropod. *J. Mollusc. Stud.* **69**, 87-89.
- Ricard-Blum, S., and Faye, C. (2005). Les collagènes associés aux membranes basales et leur matricryptines. *J. Soc. Biol.* **199**, 321-328.
- Rousseau, M., Meibom, A., Gèze, M., Bourrat, X., Angellier, M., and Lopez, E. (2009). Dynamics of sheet nacre formation in bivalves. *Biomaterials* **165**, 190-195.
- Simison, W. B., and Boore, J. L., 2008. Molluscan evolutionary genomics. In *Phylogeny and Evolution of the Mollusca* (W. F. Ponder and D. R. Lindberg eds.), University of California Press, Berkeley : 447-461.
- Tarasevich, B. J., Lea, S., Bernt, W., Engelhard, M., and Shaw, W. J. (2009). Adsorption of amelogenin onto self-assembled and fluoroapatite surfaces. *J. Phys. Chem.* **B19**, 1833-1842.
- Weiss, I. M., and Marin, F. (2008). The role of enzymes in biomineralization processes. *Met. Ions Life Sci.* **4**, 71-126.
- Wilt, F. H., and Killian, C. E. (2008). What genes and genomes tell us about calcium carbonate biomineralization. *Met. Ions Life Sci.* **4**, 37-69.

|

|

# TABLE DES MATIERES

Sommaire -----	i
Remerciements (à prise rapide) -----	iii
Avant-propos -----	v
Liste des figures et tables -----	vii
<b>I. Parcours scientifique -----</b>	<b>1</b>
I.1. <i>Curriculum Vitae</i> , en bref... -----	3
I.2. Production scientifique -----	5
a. Publications de rang A -----	5
b. Publications de rang B -----	7
c. Chapitres d'ouvrages -----	7
d. Actes de congrès -----	7
e. Bilan chiffré -----	9
f. Participation à des congrès -----	10
g. Résumés de congrès -----	11
h. Conférences invitées -----	14
i. Conférences grand public -----	15
I.3. Parcours scientifique, en bref... -----	16
a. Période 1989-1994 : doctorat et contrat ATER -----	16
b. Période 1994-2002 : post-doctorat néerlandais et secteur privé -----	17
c. Période 2002-2009 : CR1 CNRS, Université de Bourgogne -----	18
d. Collaborations actuelles et financements -----	19
I.4. Responsabilités -----	21
a. Responsabilités au sein de l'UMR -----	21
b. Organisation du symposium « Vie Primitive, Radiations Anciennes, RST » -----	21
I.5. Expertises diverses -----	22
a. Expertises d'articles -----	22
b. Jury de thèses -----	22
c. Expertises de projets scientifiques -----	23
I.6. Missions de terrain et de laboratoire, stages de formation -----	23
<b>II. Encadrement de recherches et missions d'enseignement -----</b>	<b>25</b>
II.1. Encadrement de recherches -----	26
a. Encadrement pendant le post-doctorat néerlandais -----	26
b. Encadrement dans le contexte de mon contrat de recherche dans le secteur privé -----	30
c. Encadrement à l'Université de Bourgogne -----	32
d. Références bibliographiques -----	35
II.2. Mission d'enseignement -----	36
a. Enseignement réalisé à l'Université d'Orsay -----	36
b. Enseignement effectué pendant mon post-doctorat -----	37
c. Enseignement depuis mon recrutement au CNRS -----	37
<b>III. Une très brève histoire de la biominéralisation à travers quelques concepts-clés ---</b>	<b>39</b>
III.1. La biominéralisation, trois concepts -----	40
III.2. Genèse d'une terminologie -----	40
III.3. Evolution des idées -----	42
a. Flash-back sur les temps anciens : les toutes premières données microscopiques -----	42

b. La nature organo-minérale des biominéralisations -----	42
c. La matrice organique et l'essor de la biominéralisation -----	44
d. La nature hiérarchique des biominéraux -----	45
e. Minéralisation biologiquement induite ou contrôlée -----	46
f. La biominéralisation depuis les quinze dernières années -----	48
g. Où en est la biominéralisation aujourd'hui ? -----	50
h. Références bibliographiques -----	51
<b>IV. Biominéralisation de la coquille des mollusques -----</b>	<b>53</b>
IV. 1. Introduction -----	53
IV.2. Phylogénie des mollusques -----	54
a. Généralités -----	54
b. Problèmes phylogénétiques au sein du phylum -----	55
IV.3. Origine des mollusques -----	56
a. Individualisation du phylum : quand ? -----	56
b. Les premières coquilles -----	57
IV.4. La coquille des mollusques : développement -----	59
a. Généralités -----	59
b. La coquille embryonnaire -----	59
c. La coquille juvénile à adulte : considérations physiologiques -----	62
d. Critique du modèle physiologique -----	66
IV.5. Les protéines des coquilles de mollusque -----	68
a. Caractérisation des protéines coquillières -----	68
b. Les protéines coquillières : diversité -----	69
c. Quelques remarques sur les protéines de coquille -----	76
d. Mécanismes moléculaires d'évolution des matrices coquillières -----	77
e. Quelles origines pour les protéines coquillières ? -----	78
e.1. Le scénario de l'héritage Protérozoïque -----	
e.2. Le scénario des inventions indépendantes et/ou d'évolution rapide -----	
f. Références bibliographiques -----	80
<b>V. Les protéines acides des coquilles de mollusques : exemple de <i>Pinna nobilis</i> -----</b>	<b>87</b>
V.1. Introduction -----	88
V.2. Quelques caractéristiques générales -----	90
V.3. Autres propriétés remarquables -----	93
V.4. Protéines coquillières acides chez <i>P. nobilis</i> -----	95
a. Présentation de l'espèce -----	95
b. Structure de la coquille de <i>P. nobilis</i> -----	96
c. Les protéines coquillières acides -----	99
c.1. Travaux publiés -----	
c.2. Matrice coquillière : article 2 -----	
c.3. La mucoperline : articles 4 et 6 -----	
c.4. Protéines très acides des prismes : articles 10 et 14 -----	
V.5. Origine et évolution des protéines acides dans la minéralisation -----	106
a. Hypothèses -----	106
b. Perspectives : phage display -----	106
c. Références bibliographiques -----	108
V.6. Illustration de la recherche par quelques articles -----	113
a. Article Marin <i>et al.</i> , CRAS, 1994 -----	113
b. Article Marin <i>et al.</i> , J. Biol. Chem., 2000 -----	
c. Article Marin <i>et al.</i> , Prot. Expr. Purif., 2003 -----	131
d. Article Marin <i>et al.</i> , J. Biol. Chem., 2005 -----	139
e. Article Marin <i>et al.</i> , Biomater., 2007 -----	153



<b>VI. De la nacre : considérations macro-évolutives</b> -----	163
VI. 1. Introduction -----	164
a. Une définition de la nacre -----	164
b. Les données anciennes sur la nacre -----	165
c. Les données récentes sur la nacre -----	166
VI.2. Nacre chez les mollusques : origine, répartition, tendances évolutives --	169
a. Répartition de la nacre chez les mollusques conchifères -----	169
b. Origine de la nacre et tendances évolutives -----	170
c. La problématique de l'évolution de la nacre -----	173
VI.3. Nos modèles d'étude –Résultats -----	174
a. Modèle <i>Unio pictorum</i> -----	174
b. Modèle <i>Nautilus macromphalus</i> -----	175
c. Approche protéomique -----	176
d. Matrice de nacre d' <i>Unio pictorum</i> -----	177
e. Matrice de nacre de <i>Nautilus macromphalus</i> -----	179
VI.4. Origine et évolution de la nacre : quelques remarques -----	181
a. Sur la structure de la matrice de nacre -----	181
b. Sur l'évolution de la matrice de nacre -----	181
c. Références bibliographiques -----	183
VI.5. Illustration de la recherche par quelques articles -----	187
a. Article Marie <i>et al.</i> , <i>FEBS J.</i> , 2007 -----	187
b. Article Marie <i>et al.</i> , <i>ChemBioChem</i> , 2008 -----	201
c. Article Marie <i>et al.</i> , <i>ChemBioChem</i> , 2009 (version non corrigée)-----	211
d. Article Marie <i>et al.</i> , <i>MRS Spring Meeting</i> 2009 -----	221
<b>VII. Perspectives et conclusions</b> -----	227
VII.1. Niveaux d'analyse des biominéralisations -----	228
VII.2. Axe 1 : origine et évolution des biominéralisations carbonatées -----	230
a. Les protéines acides -----	230
b. Origine et évolution de la nacre des mollusques -----	231
c. Activité anhydrase carbonique et biominéralisation carbonatée -----	231
d. Les systèmes calcifiants des métazoaires ; vers une synthèse évolutive -----	232
VII.3. Axe 2 : contrôle de la biominéralisation par la matrice -----	233
a. Le problème calcite/aragonite chez les mollusques -----	233
b. Localisation de protéines à la surface de biominéraux carbonatés -----	233
c. Autres questions d'importance -----	234
VII.4. Axe 3 : diagenèse des matrices calcifiantes -----	235
a. Diagenèse de laboratoire -----	235
b. Paléobiochimie des matrices calcifiantes -----	236
c. Interactions peptide-minéral : phage display -----	236
VII.5. Développements techniques -----	237
VII.6. Le futur de la biominéralisation ? -----	238
a. De la prospective en science -----	238
b. Références bibliographiques -----	239
Table des matières -----	241