HAL
archives-ouvertes.fr

Étude des processus de biominéralisation de la nacre chez l'ormeau européen haliotis tuberculata

Widad Ajili

To cite this version:

Widad Ajili. Étude des processus de biominéralisation de la nacre chez l'ormeau européen haliotis tuberculata. Chimie inorganique. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS160 . tel-02466424

HAL Id: tel-02466424

https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02466424

Submitted on 4 Feb 2020

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

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

Sorbonne Université

Ecole doctorale Sciences de la Nature et de l'Homme : évolution et écologie

Laboratoire Chimie de la Matière Condensée de Paris

ETUDE DES PROCESSUS DE BIOMINERALISATION DE LA NACRE CHEZ L'ORMEAU EUROPEEN *HALIOTIS TUBERCULATA*

Par Widad AJILI

Thèse de doctorat de Chimie

Dirigée par Thierry Azaïs, Stéphanie Bordenave et Nadine Nassif

Présentée et soutenue publiquement le 30 Novembre 2018

Devant un jury composé de :

M. Antonio Checa	Professeur, Université de Grenade	Rapporteur
Mme. Anne Lesage	Ingénieure de Recherche, CRMN, Lyon	Rapporteur
M. François Guyot	Professeur, MNHN, Paris	Examinateur
M. Frédéric Marin	Directeur de Recherche CNRS, Univ. de Bourgogne	Examinateur
M. Jaroslaw Stolarski	Professeur, Polish Academy of Sciences	Examinateur
M. Thierry Azaïs	Maître de Conférence, Sorbonne Université	Co-directeur
Mme. Stéphanie Auzoux-Bordenave	Maître de Conférence, Sorbonne Université	Co-directrice
Mme. Nadine Nassif	Chargée de Recherche, CNRS	Co-directrice

L'imagination est plus importante que le savoir.

- *Albert Einstein* -

Mathématicien, Physicien, (1879 - 1955)

Sommaire

Introduction Générale - 1 -

Chapitre I: Etat de l'art - 7 -

I. La Biominéralisation - 9 -

I.1. Contexte géochimique - 9 -

I.2. Biominéralisation : définition et généralité - 11 -

I.3. Diversité des biominéraux et organisation hiérarchique à l'origine d'architectures complexes - 15 -

II. Les systèmes à base de carbonate de calcium - 23 -

II.1. Le Cycle du Carbone - 23 -

I.2. Le carbonate de calcium dans le Vivant - 25 -

I.3. Diversité des systèmes : exemples marquants - 27 -

III. Les Mollusques - 34 -

III.1. Généralités - 34 -

III.2. Description structurale de la coquille des mollusques - 36 -

III.3. Aspects physiologiques et cellulaires - 42 -

III.4. Les composants organiques dans la coquille des mollusques - 46 -

III.5. Formation de la coquille larvaire au cours du développement chez les mollusques - 53 -

IV. Consensus au sein des mécanismes de biominéralisation : la présence d'un précurseur amorphe - 56 -

IV.1. Précurseurs amorphes au sein des systèmes minéralisés - 56 -

IV.2. Le carbonate de Calcium Amorphe (ACC) - 59 -

IV.3. Discussion - 62 -

V. La nacre un matériau fascinant - 65 -

V.1. Description ultrastructurale - 65 -

V.2. Interfaces organo-minérales - 67 -

V.3. Modèle d'organisation de la nacre - 74 -

V.4. Propriétés physiques - 81 -

VI. Modèle d'étude : l'ormeau *Haliotis tuberculata* - 83 -

VI. 1. Intérêt du modèle - 83 -

VI.2. Biologie et Ecologie - 83 -

VI.3. Microstructure de la coquille adulte - 86 -

VI.4. Contrôle biologique chez le genre Haliotis - 87 -

V. Bilan et enjeux de la thèse - 91 -

Chapitre II: Analyse ultrastructurale de la nacre - 95 -

I. Introduction - 97 -

II. Matériel et méthodes - 97 -

II.1. Matériel biologique - 98 -

II.2. Microscopie électronique à balayage avec canon à émission de champ (SEM-FEG) - 99 -

III.3. Abrasion Ionique - 99 -

II.4. Helium Ion Microscopy (HIM) - 101 -

II.5. Cryo-microscopie électronique à balayage (Cryo-SEM) - 102 -

III. Résultats et discussion - 103 -

III.1. Identification de trois zones d'intérêt - 103 -

2. Nacre mature - 106 -

4. Nacre en formation - 108 -

5. Transition entre la couche sphérulithique et la couche nacrée - 113 -

IV. Conclusion du chapitre - 119 -

Chapitre III : Etude des environnements minéraux désordonnés - 123 -

I. Introduction - 125 -

II. **Article 1**: Heterogeneities within the Disordered Mineral Layer of Aragonite Platelets in Abalone Nacre- 129 -

III. Conclusion du chapitre ..... - 163 -

Chapitre IV: Etude de l'interface organo-minérale de la nacre ..... - 165 -

I. Introduction ..... - 167 -

I.1. Les modèles de formation de la nacre ..... - 167 -

I.2. Mise en évidence de différentes interfaces organo-minérales ..... - 174 -

II. Matériel et méthodes ..... - 175 -

III. **Article 2**: Towards a better understanding of the organo-mineral interface in growing abalone nacre ...- 177 -

Chapitre V: Structure et formation de la coquille larvaire ..... - 208 -

I. Introduction ..... - 210 -

I.1. Développement post-embryonnaire de l'ormeau *Haliotis tuberculata* ..... - 212 -

I.1.a. Cycle de développement chez Haliotis tuberculata ..... - 212 -

I.1.b. Microstructure de la coquille au cours du développement, de la larve à la coquille adulte ..... - 214 -

I.2. Contrôle biologique de la formation de la coquille larvaire ..... - 217 -

I.3. Evolution de la composition minéralogique au cours du développement larvaire ..... - 219 -

II. Etude de la coquille larvaire par résonnance magnétique nucléaire du solide ..... - 222 -

II.1. Introduction ..... - 222 -

II.2. Méthodologie ..... - 223 -

II.2.a Problématique rencontrée ..... - 223 -

II.2.b Enrichissement de la coquille en ^{13}C ..... - 225 -

II.2.c. Paramètres expérimentaux des expériences de RMN ..... - 226 -

II.3. Résultats ..... - 227 -

II.3.a. Résultat de l'enrichissement ..... - 227 -

II.3.b. Analyse par RMN des carbonates de la coquille larvaire ..... - 228 -

II.3.c. Etude de des environnements minéraux protonés ..... - 232 -

II.4. Conclusion ..... - 236 -

III. **Article 3**: Intermixed calcium carbonate phosphate phase in the early stages of *Haliotis tuberculata* biomineralization shell as suspect for a common mineral precursor during evolution ..... - 238 -

IV. Immunolocalisation de la lustrine A dans la coquille larvaire ..... - 272 -

IV.1. Introduction ..... - 272 -

IV.2. Méthodologie ..... - 272 -

IV.2.a. Prélèvement des larves et préparation des échantillons ..... - 272 -

IV.2.b. Production d'un anticorps homologue anti-Lustrine A ..... - 274 -

IV.2.c. Correlative Light and Electronic Microscopy ..... - 276 -

IV.3. Résultats ..... - 278 -

IV.3.a. Localisation de Lustrine A dans les larves de 48h ..... - 278 -

IV.3.b. Localisation de la Lustrine A dans les larves de 72h ..... - 280 -

IV.4. Discussion et conclusion ..... - 283 -

V. Conclusion du chapitre ..... - 286 -

Conclusion generale et perspectives ..... - 288 -

Références bibliographiques ..... - 296 -

Liste des abréviations ..... - 316 -

Introduction Générale

Le développement des matériaux modernes de construction fait partie intégrante de notre société actuelle et n'est autre que la conséquence de notre prospérité économique. La croissance de notre société toujours plus dynamique, impose sans cesse le perfectionnement des matériaux utilisés ce qui est bien souvent accompagné d'une augmentation de l'empreinte écologique globale sur notre planète. L'essor de méthodes alternatives qui ne diminuent en rien les prouesses techniques mais qui en même temps respectent les frontières écologiques à ne pas dépasser, fait partie des solutions indispensables mises en place pour éviter une crise écologique planétaire.

La Nature construit depuis des millions d'années ses habitats avec des procédés durables présentant une continuelle source d'inspiration pour les acteurs de la **physique** et la **chimie des matériaux.** Un grand nombre de matériaux à hautes performances techniques sont synthétisés dans la Nature et on peut essayer de s'en approcher pour créer des matériaux synthétiques avec des performances similaires voir supérieures tout en préservant notre éthique écologique. Les chercheurs en chimie des matériaux entreprennent depuis un certain nombre d'années déjà l'ambition de mimer le Vivant. On peut citer, par exemple, le développement des céramiques inspirées de l'émail des dents, de la coquille des mollusques, des spicules des éponges ou encore des diatomées ou bien des polymères similaires aux biopolymères des exosquelettes des arthropodes, à la soie ou encore aux parois des cellules végétales mais aussi les matériaux composites inspirés de l'os, des plumes d'oiseaux ou bien des bois de cerfs (Achal *et al.*, 2015).

La liste des sources potentielles d'inspiration semble infinie et n'est autre que le reflet de l'incroyable diversité de notre planète. Les matériaux biologiques sont souvent composés des éléments basiques usuels communs d'un organisme à l'autre mais dans des proportions différentes et avec une très belle variabilité de structure et d'architecture influençant considérablement les propriétés résultantes. L'élaboration de ces biomatériaux par la Nature sont la conséquence de processus d'auto-assemblages sous contrôle biologique, en s'adaptant aux conditions extérieures et en utilisant les ressources environnementales à disposition. Les

éléments principaux utilisés sont souvent les plus simples, l'Hydrogène, le Carbone, l'Oxygène, l'Azote, le Phosphore, le Souffre, le Silicium, et le Calcium.

Les organismes vivants produisent le plus souvent des structures composites contenant à la fois une fraction organique et inorganique formant des structures organisées complexes aux propriétés multifonctionnelles.

Parmi ces structures on distingue la nacre, exemple parfait de ce que la Nature peut faire de mieux en terme d'architecture et d'organisation. Ce matériau remarquable tout d'abord par sa beauté grâce à l'iridescence qui la caractérise, présente aussi des propriétés mécaniques très intéressantes qui ne sont que la conséquence directe de l'organisation de ses composants entre eux. Le nacre intéresse depuis longtemps les chercheurs qui essaient de s'en inspirer, mais encore faut-il la comprendre pour pouvoir la copier et c'est là que ce travail de thèse intervient, en essayant humblement de préciser le savoir autour de ce matériau fascinant.

La nacre naturellement présente dans la coquille des mollusques forme la couche iridescente sur la face interne de la coquille au contact de l'animal, est à la fois connue et méconnue. Connue car nous avons tous déjà retourné un coquillage pour en admirer les jolies couleurs ou ouvert une huitre en espérant y trouver une perle, mais aussi méconnue car les mystères autour de ce matériau restent certains, le rendant toujours plus spécial.

La nacre est étudiée depuis un certain nombre d'années déjà et l'essor des différentes techniques de microscopie ont permis au fils des études de décrire de plus en plus sa structure en révélant d'avantage à chaque découverte la complexité de ce matériau. Elle n'est faite à la base majoritairement que de « craie », matériau apparaissant comme friable et fragile au premier abord, mais l'astucieuse manière dont les animaux qui sont capables d'en synthétiser l'agencent fait que cette craie devient un mur de brique solide protecteur des agressions extérieurs.

Les briques de ce mur, représentant sa fraction principale, sont des tablettes micrométriques de carbonates de calcium sous forme d'aragonite et sont empilées avec une incroyable

maniaquerie séparées par une couche de ciment organique essentiellement constitué de polysaccharides et de protéines. Cet agencement confère à la nacre ses différentes propriétés, à la fois optiques puisque ces iridescences, couleurs physiques, résultent de la diffraction de la lumière à la surface de ces tablettes empilées, mais aussi mécaniques. En effet grâce à cet empilement de tablettes de minéral apportant rigidité mais aussi grâce à ce ciment organique qui lui apporte élasticité on observe une augmentation d'un facteur 3000 la résistance à la fracture du matériau global par rapport au monocristal d'aragonite qui le compose (Currey, 1977 ; Jackson *et al.* 1988). De plus, la nacre possède une pression de rupture dix fois supérieure à celle du béton (Katti, 2006)

L'engouement autour de ce matériau prend bien tout son sens.

Mais l'étude de la nacre touche un autre domaine que la chimie des matériaux. La **biominéralisation**, discipline assez peu admise ayant du mal à prendre la place qu'elle mérite dans nos esprits, touche à l'étude des structures minéralisées au sein du Vivant. L'étendue et la diversité des tissus minéralisés au sein des organismes étant d'une richesse prodigieuse, la biominéralisation est un domaine de science complexe dont les structures et les mécanismes offrent matière à étudier. La nacre faisant partie intégrante des tissus minéralisés, l'étude de sa structure et des processus biologiques et physicochimiques à l'origine de sa formation s'inscrit tout à fait dans cette discipline au même titre que l'os, les spicules d'oursins ou encore les frustules de diatomées. Ainsi, essayer de comprendre les mécanismes à l'origine de la mise en place de la nacre permet d'étayer le savoir au sein de ce domaine, où l'on s'aperçoit que malgré la grande diversité qui y siège, des similarités sont aussi bien présentes.

Ce travail de thèse s'articule autour de ces deux domaines : En utilisant comme modèle d'étude l'ormeau Européen *Haliotis tuberculata* que l'on peut aisément pécher sur nos côtes bretonnes, nous avons d'une part, réalisé une étude ultrastructurale de la nacre afin de mieux comprendre ce matériau et d'autre part, une étude des mécanismes physico-chimiques et biologiques à l'origine de la biominéralisation de ce matériau du Vivant.

Ce manuscrit s'organise en trois parties.

La première partie est consacrée à une revue bibliographique des données disponibles sur la biominéralisation et plus spécialement les systèmes dont la phase minérale est le carbonate de calcium avec un accent majeur sur les mollusques et la nacre (*Chapitre I*).

La deuxième partie relate sous la forme de quatre chapitres, les résultats et discussions obtenus lors de ces trois années d'étude.

Le chapitre II, présente une étude ultrastructurale de la nacre réalisée sur des échantillons de coquilles adultes.

Le chapitre III traite de l'étude structurale approfondie de l'organisation de la fraction minérale à la surface des tablettes d'aragonite de la nacre.

Le chapitre IV est dédié à l'étude de l'interface organo-minérale au sein de la nacre.

Le chapitre V s'émancipe des trois précédents en s'intéressant non pas à la nacre mature mais à l'étude des processus de formation coquillères au cours du développement larvaire de l'animal en visant notamment à étudier le rôle de protéines matricielles et expliciter le rôle du phosphore inorganique dans la biominéralisation d'une coquille faite de carbonates.

La troisième partie constituera la conclusion et les perspectives de ce travail.

Chapitre I: Etat de l'art

"Biomineralization links soft organic tissues, which are compositionally akin to the atmosphere and oceans, with the hard materials of the solid Earth. It provides organisms with skeletons and shells while they are alive, and when they die these are deposited as sediment in environments from river plains to the deep ocean floor. It is also these hard, resistant products of life which are mainly responsible for the Earth's fossil record.

Consequently, biomineralization involves biologists, chemists, and geologists in interdisciplinary studies at one of the interfaces between Earth and life."

Leadbeater et Riding,

"Biomineralization in Lower Plants and Animals"

1986

I. La Biominéralisation

I.1. Contexte géochimique

La biominéralisation est un phénomène biologique principalement mais il est intéressant de replacer l'émergence de ce procédé dans le contexte géochimique de la Terre afin d'en comprendre tous les enjeux ; la Vie ayant façonné la surface de la Terre en influençant les cycles géochimiques pendant des milliards d'années, l'évolution de la géosphère et de la biosphère est inexorablement liée.

La Terre s'est formée il y a environ 4,6 milliards d'années et les océans sont apparus 150 millions d'années plus tard (***Figure* 1**). Les premiers signes de vie sur Terre, datés d'environ 3,7 milliards d'années, sont associés aux stromatolithes issus de la fossilisation de systèmes bactériens photosynthétiques qui ont produit l'oxygène, à l'origine de l'oxydation de l'atmosphère il y a 2,5 milliards d'années environ.

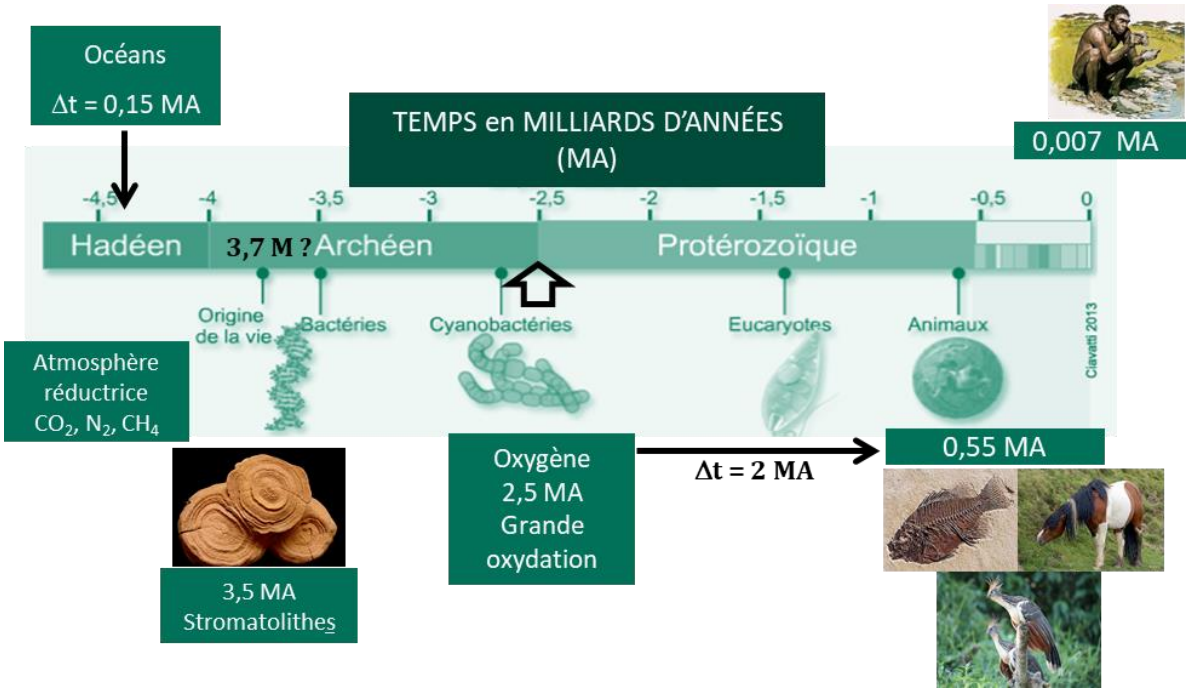


Figure 1 : *Frise chronologique des évènements marquants de l'Histoire de la Terre (D'après Sanchez 2016)*

La composition actuelle en éléments chimiques, résultant de l'évolution de la Terre durant ces milliards d'années montre l'importance qu'a pris l'oxygène (***Figure* 2**) qui représente quasiment la moitié de la composition élémentaire globale. On trouve ensuite énormément de Silicium (25,5 %) puis des métaux comme le Fer et l'Aluminium suivi par le Calcium (3,4%) et enfin d'autres alcalins et alcalino-terreux (Sodium, Potassium, Magnésium). On peut enfin citer, bien derrière, le Carbone et le Phosphore (de l'ordre de 0,09 %), et le Souffre (0,05%).

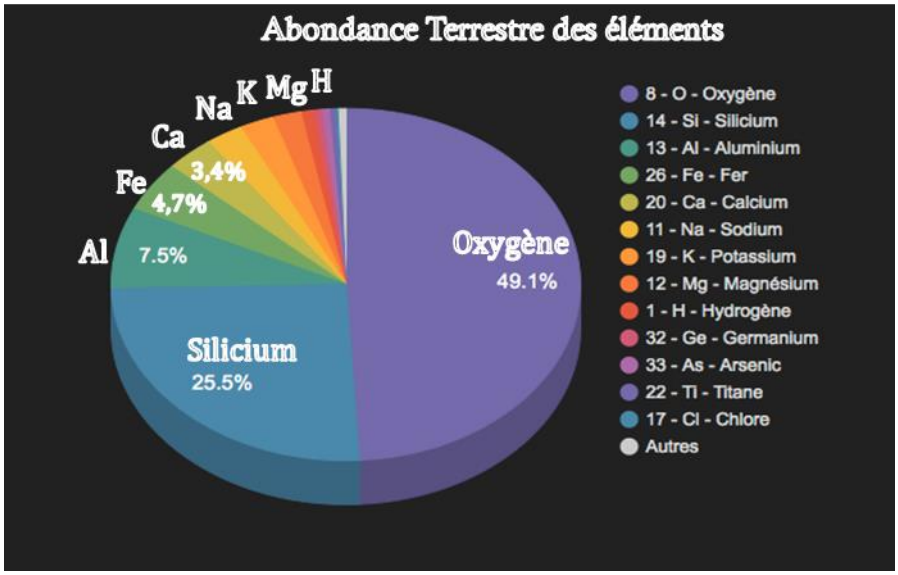


Figure 2 *: Diagramme représentant les abondances des principaux éléments terrestres (D'après Sanchez 2016)*

Cette forte présence d'oxygène implique un enclin vers les formes oxydées des différents éléments ; l'oxygène étant l'élément le plus électronégatif de la classification périodique après le fluor. Le passage d'une atmosphère réductrice à une atmosphère oxydante par l'émergence des activités photosynthétiques a eu des conséquences directes sur la chimie des éléments terrestres et en particulier les métaux comme le fer où l'on observe un changement d'état d'oxydation entrainant sa précipitation. Les autres éléments vont également réagir avec l'oxygène pour donner la silice SiO_2, les carbonates CO_3^{2-}, les oxalates $C_2O_4^{2-}$ ou encore les phosphates PO_4^{3-}.

La silice et les différentes espèces anioniques vont en s'associant aux ions alcalins et alcalino-terreux constituer les principales sources minérales terrestres et, *in fine*, intervenir dans les processus de biominéralisation.

I.2. Biominéralisation : définition et généralité

La Biominéralisation est un terme contenant deux aspects qui semblent aux premiers abords antagonistes. Le préfixe «bio-» rappelle qu'il est question d'organismes vivants et «-minéral» laisse présager qu'il est question de matière inerte. Mais comme l'association de ces deux termes l'indique, le terme de Biominéralisation souligne que Vie et Terre sont forcément liées. Ainsi la Biominéralisation définit ***l'ensemble des phénomènes physico-chimiques, cellulaires et moléculaires par lesquels les organismes vivants élaborent des structures minéralisées***. (Mann, 2001)

La Biominéralisation est omniprésente dans toute l'arbre du Vivant, des bactéries aux arthropodes en passant par les végétaux et jusqu'aux mammifères. Emergeant initialement au sein des procaryotes, avec notamment les cyanobactéries qui ont formés les stromatolithes il y a 3,5 milliards d'années, les structures minéralisées se sont largement répandues au sein des eucaryotes dès la fin du Précambrien (il y environ 600 milliards d'années) et constituent l'un des évènements majeurs permettant le rayonnement des Métazoaires au Cambrien (Knoll, 2003). Le succès remporté par les structures minéralisées est inégalable apportant une multitude de fonctions très diverses comme : la tenue mécanique, la protection, la défense contre les prédateurs et les stress environnementaux ; ou bien encore des fonctions moins intuitives comme : des propriétés optiques, un apport pour la nutrition et la reproduction, des réserves ioniques pour le métabolisme et même l'orientation spatiale par la perception de la gravité ou du champ magnétique.

Il existe plus de 60 types de minéraux différents, appelés ***biominéraux***, répartis dans 55 phylums (Lowenstam & Weiner, 1989) où les organismes ont développé leurs propres stratégies pour construire leurs structures minéralisées.

Malgré la grande diversité des structures minéralisées, que ce soit en termes de composition, de morphologie et de fonction, on retrouve des principes communs aux différents processus de biominéralisation. Ceux-ci font toujours appel à une réactivité dans des **conditions biologiques douces** qui conduit par l'action conjuguée de la **physicochimie** et de la **biologie** à des **structures d'une complexité remarquable** souvent hors de portée des chimistes.

Ces structures minéralisées résultent le plus souvent de l'association d'une fraction organique et d'une phase minérale sous un contrôle cellulaire plus ou moins important.

Les exceptions à ce principe ont conduit à distinguer deux grandes familles de biominéralisation : la minéralisation biologiquement *induite* et la minéralisation biologiquement *contrôlée* ; classification proposée par Stephen Mann en 1983.

- La **minéralisation biologiquement induite** conduit à des structures minéralisées sans contrôle cellulaire actif. Elle ne résulte que de l'interaction directe de l'activité biologique d'un organisme avec son **environnement** sans qu'il y ait de rôle actif du métabolisme sur la formation de la structure minéralisée. Ceux-ci se forment dans un espace ouvert pouvant être en contact avec l'organisme, les cellules pouvant tout de même agir comme support de nucléation et de croissance des cristaux (Weiner & Dove, 2003). La précipitation des minéraux est la conséquence seule de **principes physico-chimiques**, les processus métaboliques ayant seulement une incidence indirecte. Ce mode de biominéralisation est le plus ancien, rencontré essentiellement chez les bactéries, dont les pionnières de la vie, les cyanobactéries il y a 2 milliards d'années, (Lowenstam & Weiner, 1989), mais aussi chez certains protistes, lichens et algues calcaires. Elle concerne

également les minéralisations pathologiques qui se produisent lors de dérèglement physiologiques dans l'organisme (Bazin *et al.*, 2016)

- La **minéralisation biologiquement contrôlée,** qui nous intéresse tout particulièrement dans ce travail et dont on parlera uniquement par la suite, concerne la majorité des systèmes rencontrés chez les métazoaires et fait intervenir tous les types de biominéraux existants. Elle est dite contrôlée car elle résulte de l'implication plus ou moins grande de la machinerie cellulaire. La minéralisation ne se fait donc pas de manière aléatoire mais est le plus souvent intégrée dans le système complexe des réactions métaboliques et se fait sous la gouverne d'une **matrice organique** extracellulaire spécialisée dans cette activité et génétiquement programmée. Elle est le siège de nombreuses régulations et est sensiblement calibrée au cours du cycle de vie de l'être vivant. Les cellules vont ainsi avoir un rôle actif sur la synthèse des biominéraux en induisant un contrôle biologique, qui permet de stabiliser des phases minérales thermodynamiquement moins favorables ou bien de contrôler la nucléation et la croissance (morphologie et taille des cristaux). Pour permettre ce contrôle, la minéralisation se fait dans un **espace confiné**, comme une vésicule extracellulaire, ou un espace dédié délimité par un épithélium mais jamais en contact direct avec l'environnement. Cette notion est désignée par l'appellation de « *space delineation* » (Lowenstam & Weiner 1989).

L'implication biologique conduit à des matériaux hybrides organique-inorganique et pour certains composites où une partie des composants organiques peuvent être directement inclus dans le biominéral final. Dans la majeure partie des cas, la fraction minérale constitue l'élément majoritaire du matériau. La fraction organique minoritaire peut être de différente nature : protéique, lipidique, polysaccharidique.

Les composants organiques sécrétés par l'animal (ou le végétal) présentent dans la plupart des cas une synergie d'action complexe dont les mécanismes qui conduisent à la mise en place de la fraction minérale sont encore très peu compris.

Malgré la diversité des structures qui résulte des différents processus de biominéralisation rencontrés au sein des espèces, il existe des principes généraux laissant penser qu'il pourrait y avoir des mécanismes communs malgré les différences, qui sembleraient être issus d'une stratégie commune sélectionnée au cours de l'évolution. En effet, dans tous les cas nous retrouvons cinq aspects systématiquement respectés dans le cas des systèmes issus de la biominéralisation contrôlée (Sigel *et al.*, 2008).

- La cellule contrôle son environnement proche en créant un milieu physico-chimique spécifique dans lequel une matrice organique constituée de biomacromolécule (protéines, polysaccharides…) est construite.
- Une matrice organique sert de gabarit permettant la mise en place d'un espace dans lequel la minéralisation va avoir lieu en modulant sa structure, sa texture et sa forme (structures poreuses, lamellaires…).
- Une activation de cet espace est réalisée par l'introduction de biomolécules (petites protéines, protéoglycanes…) qui interagissent avec la matrice organique et/ou les minéraux pour permettre la nucléation des précurseurs ioniques.
- Une introduction des précurseurs minéraux dans le microenvironnement
- Un contrôle de la taille et de la morphologie des biominéraux *via* un contrôle biologique.

Ces notions sont les fondements qui permettent l'élaboration de ces si fantastiques structures minéralisées, qui ne seraient pas aussi élaborées et complexes s'il n'y avait ce contrôle biologique. Les matériaux résultants présentent souvent une organisation **hiérarchique tridimensionnelle**, d'une incroyable complexité, suscitant depuis toujours notre fascination, que je vais illustrer dans les prochains paragraphes.

I.3. Diversité des biominéraux et organisation hiérarchique à l'origine d'architectures complexes

I.3.a. Diversité des biominéraux au sein du Vivant

Le **Tableau 1** ci-dessous illustre la diversité de composition et de phase cristalline générale des biominéraux au sein du Vivant.

MINERAUX	ORGANISMES
Carbonate de Calcium $CaCO_3$	
Calcite	Mollusques, Algues, Crustacés, Echinodermes, Mammifères, Foraminifères, Coccolithophoridés
Aragonite	Mollusques, Cnidaires, Téléostéens
Vatérite	Ascidies, Mollusques
Amorphe	Mollusques, Plantes, Crustacés, Echinodermes
Phosphate de Calcium	
Hydroxyapatite $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	Vertébrés
Amorphe	Vertébrés
Oxalate de Calcium	
Whewellite $Ca(C_2O_4) \bullet H_2O$	Plantes
Weddellite $Ca(C_2O_4) \bullet 2H_2O$	Plantes
Sulfates	
Gypses $CaSO_4 \cdot 2H_2O$	Cnidaires
Baryte $BaSO_4$	Cyanophycées
Célestite $SrSO_4$	Acanthaires
Silice SiO_2	
Amorphe	Diatomées, Porifères
Oxydes de fer	
Magnétite Fe_3O_4	Bactéries, Téléostéens, Tortues
Ferrihydrite Fe_2O_3	Eucaryotes

Tableau 1 : *Aperçu de la diversité des biominéraux chez différents groupes d'organismes*

Parmi cette diversité, on distingue 4 types particulièrement bien représentés, les oxydes de fer, la silice, les carbonates et les phosphates. Ces systèmes, en particulier les trois derniers, sont représentés dans l'ensemble des embranchements phylogénétiques du Vivant comme l'illustre la ***Figure* 3** modifiée d'après Knoll, 2003.

Au sein des différents types de biominéraux, il est intéressant de constater que différents polymorphes (*i.e.* présentant la même formule chimique mais ayant des structures cristallines différentes) peuvent être synthétisés bien que certaines formes ne soient pas favorisées thermodynamiquement.

Ce qui est également remarquable avec le Vivant c'est qu'une même structure minéralisée peut remplir plusieurs fonctions.

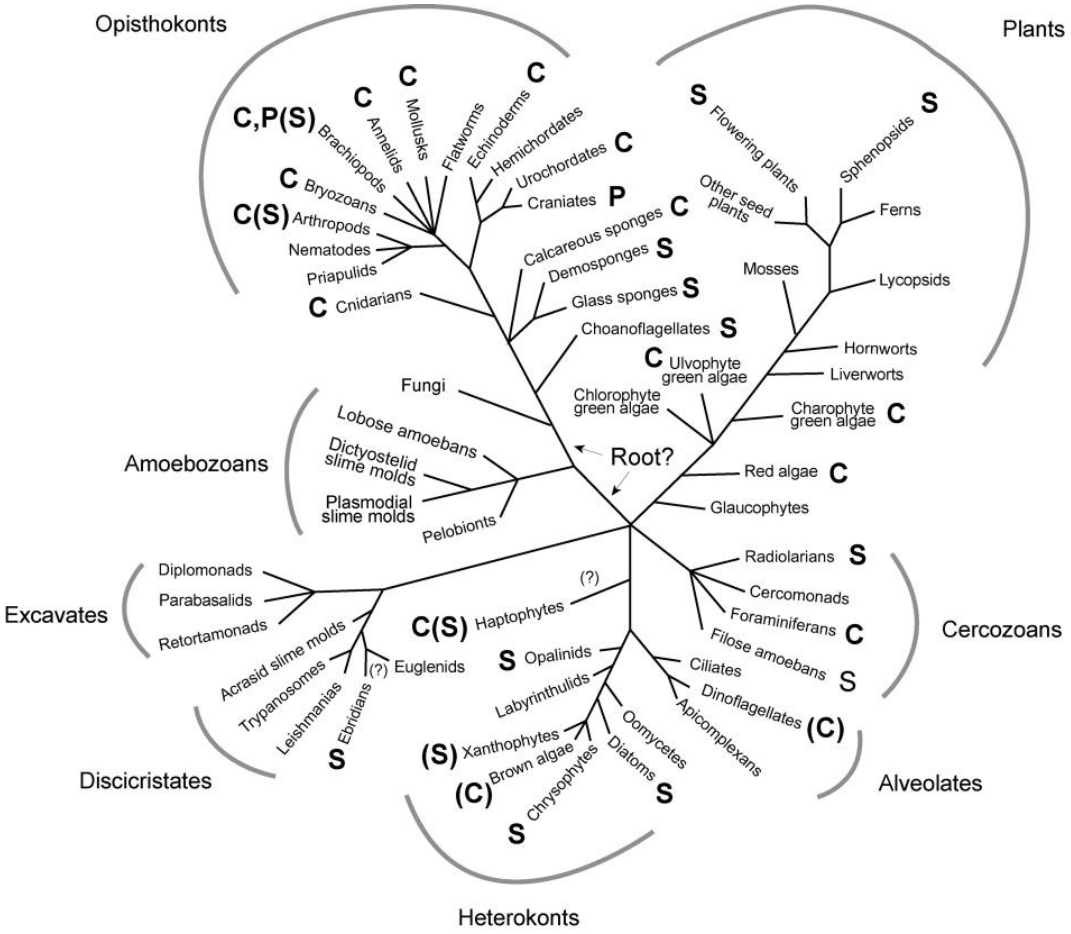


Figure 3 : *Arbre phylogénétique du Vivant mettant en évidence les systèmes minéralisés à base de Carbone (C), de Silice (S), de Phosphore (P) au sein des eucaryotes– Modifié d'après Knoll 2003*

Afin d'illustrer ces propos et en vue de replacer dans un contexte plus large le système que j'ai étudié pendant ces trois années de thèse j'ai choisi dans les paragraphes suivants de donner un aperçu de la diversité des biominéraux à travers la description de quatre systèmes principaux.

I.3.b. Cas des systèmes à base de silice

Des exemples caractéristiques d'organismes capables de synthétiser de la silice biogénique sont les diatomées, les radiolaires et les chrysophycées qui sont des algues unicellulaires très abondantes dans les eaux douces et les océans (Lowenstam & Weiner, 1989). Ces organismes utilisent les silicates dissouts pour construire leurs microsquelettes, une sorte de coque, la frustule, qui leur permet de se protéger des agressions extérieures sans empêcher leur photosynthèse ; la silice étant transparente. Cette silice dissoute sous forme d'acide silicique $Si(OH)_4$ provient de la roche terrestre majoritairement constituées de silicates qui se dissolvent par l'érosion. La silice dissoute est ensuite entraînée vers les eaux et est métabolisée par les organismes.

La silice biogénique est un composé amorphe, polymérique formé des tétraèdres SiO_4 qui s'enchainent pour former des chaînes ou des cycles. L'avantage d'un système polymérique amorphe est qu'il est plus facile d'avoir un contrôle morphologique contrairement aux systèmes cristallins dont la morphologie découle en général de leur maille cristalline. La richesse des structures qui en résulte est assez remarquable comme l'illustre la ***Figure* 4.**

Dans le cas des diatomées, il existe à peu près 100 000 espèces différentes et chacune d'entre elles élabore une frustule dont la morphologie est originale et génétiquement contrôlées. Il s'agit d'une minéralisation contrôlée qui met en jeu un compartiment cellulaire particulier, une organelle spécialisée appelé « silica deposition vesicle » (Reimann et al, 1966 ; Stoermer et al, 1965). Des protéines riches en sérine phosphorylée, acide aspartique et acide glutamique (Wenzl et al, 2008) jouent le rôle d'agents de réticulation pour l'assemblage de longues chaînes de

polyamines qui servent de gabarit et permettent la précipitation de la silice jusqu'à former ces morphologies très complexes (Sumper et al, 2008 ; Kroger et al, 2002).

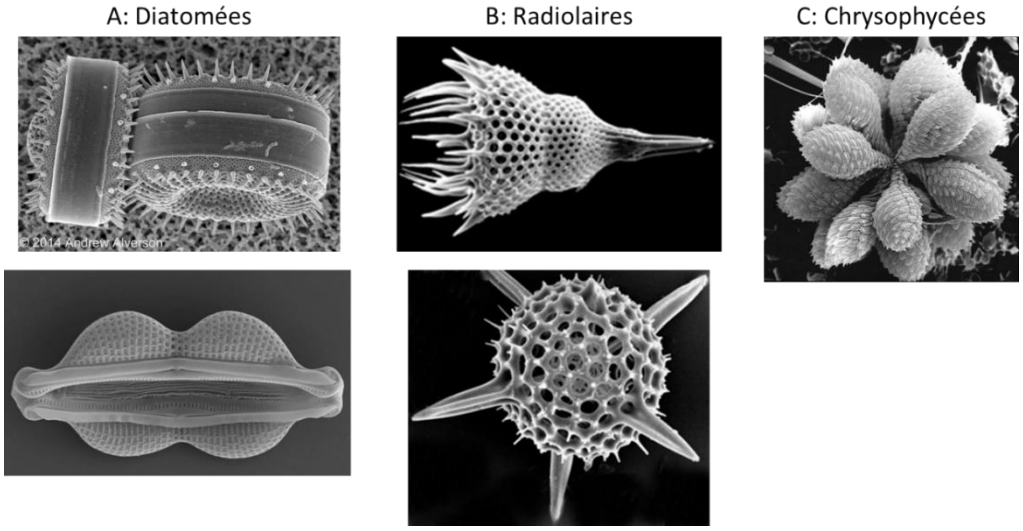


Figure 4 *: Illustrations de la diversité d'architectures au sein des systèmes à base de silice rencontrée chez les algues unicellulaires. A: Exemples de Diatomées, Thalassiosira pseudonana en forme de disque (haut) et Navicula salinarum en forme de « penne »(bas) - Clichés de Andrew Alverson, 2014 ; B: Exemples de Radiolaires Lamprocyclas maritalis (haut) et Rhizoplegma boreale (bas) - C : Clichés d'après Goll & Bjorklund, 2002 ; Exemple de Chrysophycées - cliché de Haeckel 1992*

Cette coque de silice peut être comparée à du verre et démontre la richesse des procédés présents dans la Nature. Le mode de fabrication de ce verre par l'animal dans des conditions douces de pH et température, s'oppose aux procédés industriels qui permettent la fabrication du verre à partir du sable en le chauffant au-dessus de mille degrés; les ressources énergétiques nécessaires étant colossales. Ce procédé biologique de fabrication du verre constitue ainsi une source d'inspiration pour les chimistes qui utilisent le procédé dit « sol-gel » où le feu est remplacé par l'eau. Ce procédé permet, à température ambiante, suite à des réactions de polymérisation de monomères de silice de former progressivement un gel puis un verre, qu'il est possible de mettre en forme.

I.3.c. Cas des systèmes à base d'oxydes de fer

Les oxydes de fer sont une autre classe de biominéraux communément formés par les organismes. Ils peuvent présenter différents rôles comme le stockage du fer, la perception du champ magnétique ou encore apporter de la dureté aux dents (radula des mollusques brouteurs).

L'un des exemples les plus marquants et les plus étudiés sont les bactéries magnétotactiques. Ces bactéries produisent des nanoparticules de magnétite (Fe_3O_4) ou de greigite (Fe_3S_4) qui leur permettent de s'orienter selon le champ magnétique à travers des gradients chimiques afin de se repérer dans l'océan (Faivre & Schüler, 2008).

Pour cela, elles produisent des nanocristaux qu'elles alignent pour former une chaîne intracellulaire et dont chaque nanoparticule est localisée dans un compartiment spécifique appelé magnétosome (***Figure* 5**). Ce compartiment est le lieu de formation de ces cristaux qui sont constitués de magnétite qui présente une taille finale de 30 à 140 nm (Faivre & Schüler, 2008). Ici encore les biominéraux sont soumis à un contrôle biologique essentiel à la mise en place de ces chaînes. On peut relever par exemple le rôle de certaines protéines qui empêchent la transformation de la magnétite en maghémite en la stabilisant (Fisher et al, 2011).

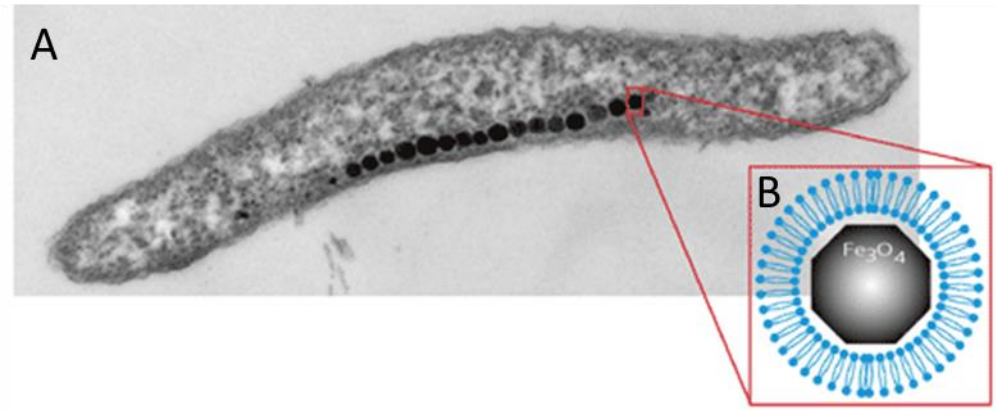


Figure 5 *: A: Cliché d'une bactérie magnétotactique présentant une chaîne de magnétosome ; B: Schéma d'un magnétosome contenant une nanoparticule de magnétite– D'après Schüler, 2008*

Ces nano-aimants naturels vont donner aux bactéries magnétotactiques à la fois une information directionnelle, comme une boussole magnétique, mais aussi une information sur la position à l'image d'une carte magnétique. En effet les bactéries vont orienter, par l'intermédiaire de la chaîne des nano-aimants, leurs déplacements selon les lignes du champ magnétique terrestre. De plus la différence d'espacement qu'il existe entre les lignes du champ magnétique lorsque l'on regarde au niveau des pôles ou de l'équateur permet à la bactérie de se situer en latitude.

I.3.d. Cas des systèmes à base de phosphates

Les systèmes à base de phosphate de calcium se retrouvent essentiellement au sein des vertébrés notamment au niveau des dents et des os.

L'os est un tissu conjonctif constituant l'endosquelette des vertébrés. Cet endosquelette rempli un rôle principal mécanique de soutien permettant à l'animal de supporter son poids. Les os interviennent également dans le déplacement par leur action combinée avec celle des muscles et des articulations. Ils offrent également une protection pour les organes internes. Enfin, le tissu osseux participe directement au métabolisme puisqu'il agit comme un réservoir d'ions afin de réguler l'osmolarité du fluide physiologique.

Dans le tissu osseux, le phosphate de calcium cristallise sous la forme d'hydroxyapatite $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ qui est la phase la plus stable. La fraction minérale est variable d'une espèce à l'autre mais en moyenne elle est d'environ 64% en masse (Currey, 2003 ; Meyers *et al.*, 2008)

Le tissu osseux est un matériau hybride minéral-organique dont la fraction organique représente une assez grande proportion (environ 30% en masse) par rapport aux autres tissus minéralisé où généralement la fraction organique est moins importante (Linton *et al.*, 2002). Cette fraction organique est principalement constituée de collagène de type I, une protéine très fortement représentée dans le Vivant.

Ce tissu hybride présente une organisation hiérarchique 3D particulière reflétant la grande complexité de ce tissu. La nanostructure de l'os est composée de fibrilles de collagène où les cristaux d'apatite vont s'agencer sous le contrôle protéique de petites protéines dites non-collagéniques. (George & Veis, 2008)

L'une des caractéristiques la plus notable de l'os est la dimension multi-échelle de son organisation allant du nanomètre à l'échelle macroscopique où (au moins) sept niveaux distincts d'organisation ont été mis en évidence (Weiner & Wagner, 1998). Les cristaux d'apatite de la phase minérale se présentent sous forme de plaquettes nanométriques (niveau 1) dont l'axe cristallographique *c* coaligne avec l'axe longitudinal des fibrilles de collagènes pour donner des fibrilles minéralisées (niveau 2). Ces fibrilles minéralisées vont ensuite s'assembler pour former des fibres, le coalignement avec les cristaux d'apatite étant préservé (niveau 3). Ces fibres vont ensuite s'assembler à une échelle supérieure adoptant différentes organisations (niveau 4) permettant ainsi l'élaboration de tissus aux structures variées possédant des propriétés mécaniques propres. Une organisation typique est celle de l'os lamellaire, où les fibres s'agencent en un contreplaqué torsadé (organisation cholestérique) permettant d'accroitre les propriétés mécaniques du matériau.

La ***Figure* 6** schématise ces 4 premiers niveaux d'organisation au sein de l'os.

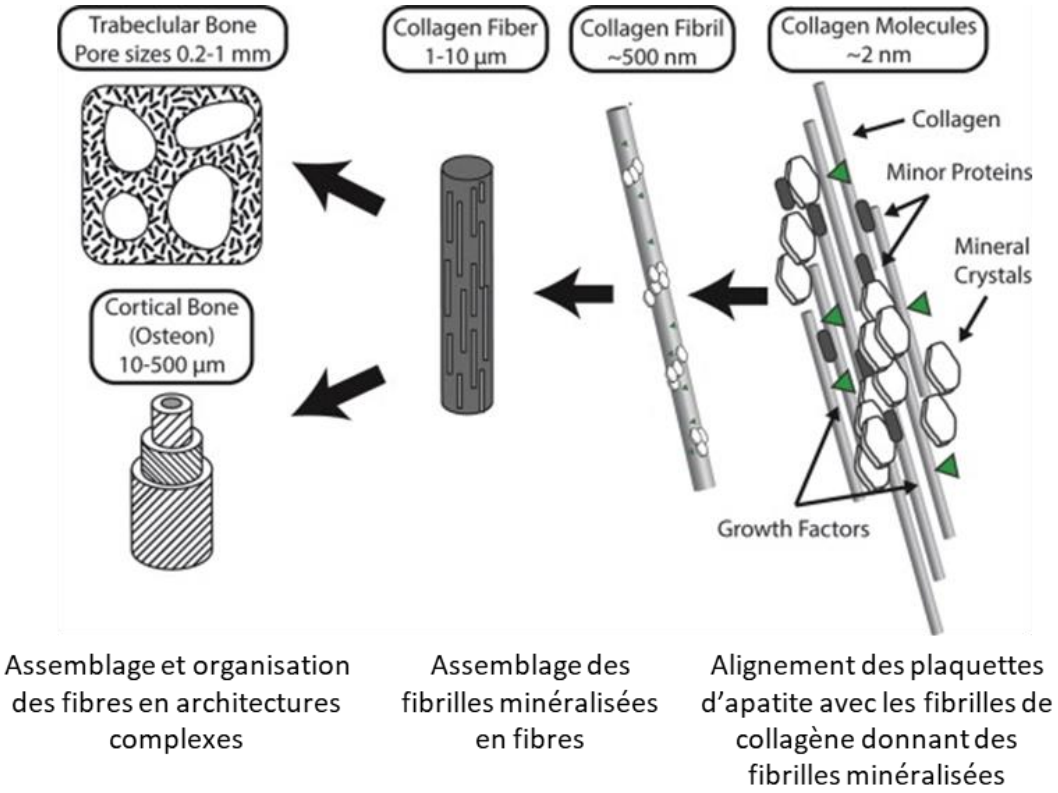


Figure 6 : *Illustration des différents niveaux d'organisation de l'os des vertébrés*

– Schéma modifié d'après Kane & Ma, 2013

Le quatrième biominéral le plus représenté est le carbonate de calcium, qui fait l'objet de la prochaine partie.

II. Les systèmes à base de carbonate de calcium

II.1. Le Cycle du Carbone

Avant de décrire spécifiquement les systèmes biologiques à base de carbonate de calcium, il est intéressant de les replacer au sein du Cycle du Carbone terrestre car ils représentent un maillon essentiel à son équilibre. En effet, les carbonates constituent le plus grand réservoir de carbone de notre planète et leur dissolution et leur précipitation ont un très grand impact sur le cycle global du carbone. (Bernet et al, 2000). Les carbonates précipités représentent ainsi 90 millions de Gigatonnes de carbone ce qui est 4 à 5 fois plus que la fraction de carbone océanique et atmosphérique (Falkowski et al, 2000).

La chimie des carbonates de calcium peut être résumée simplement par ces deux équations :

(1) **Hydratation du CO_2:** $CO_2 + H_2O \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$

(2) **Précipitation du $CaCO_3$:** $Ca^{2+} + HCO_3^- \leftrightarrow CaCO_3 + H^+$

On remarque ainsi l'importance du CO_2 dans cet équilibre qui représente la source de carbone pour la formation des carbonates.

La ***Figure* 7** représente les flux de carbone au sein du cycle entre les différents principaux réservoirs que sont, l'atmosphère, l'hydrosphère (les océans principalement), la biosphère (végétaux, animaux), la lithosphère (les sédiments, la croute terrestre, le manteau terrestre). L'essentiel des flux se fait entre l'atmosphère, les couches superficielles du sol et des océans et la biosphère qui échangent du carbone *via* des processus naturels comme la respiration, la photosynthèse ou lors de la décomposition des constituants de la biosphère.

Il existe un échange primordial entre le CO_2 gazeux de l'atmosphère et sa forme dissoute dans les océans qui tend vers un déséquilibre, c'est-à-dire une dissolution à hauteur de 2 Gigatonnes/an environ vers la dissolution. Le carbone de l'océan est ensuite métabolisé et se retrouve

principalement sous forme de biomasse planctonique et de carbonates. Les carbonates formés sont essentiellement les constituants des coquilles des foraminifères et d'autres espèces capables de synthétiser des coquilles carbonatées. Ces coquilles vont se déposer au fond des océans pour former des sédiments et ensuite les roches sédimentaires qui constituent le réservoir calcaire de notre planète.

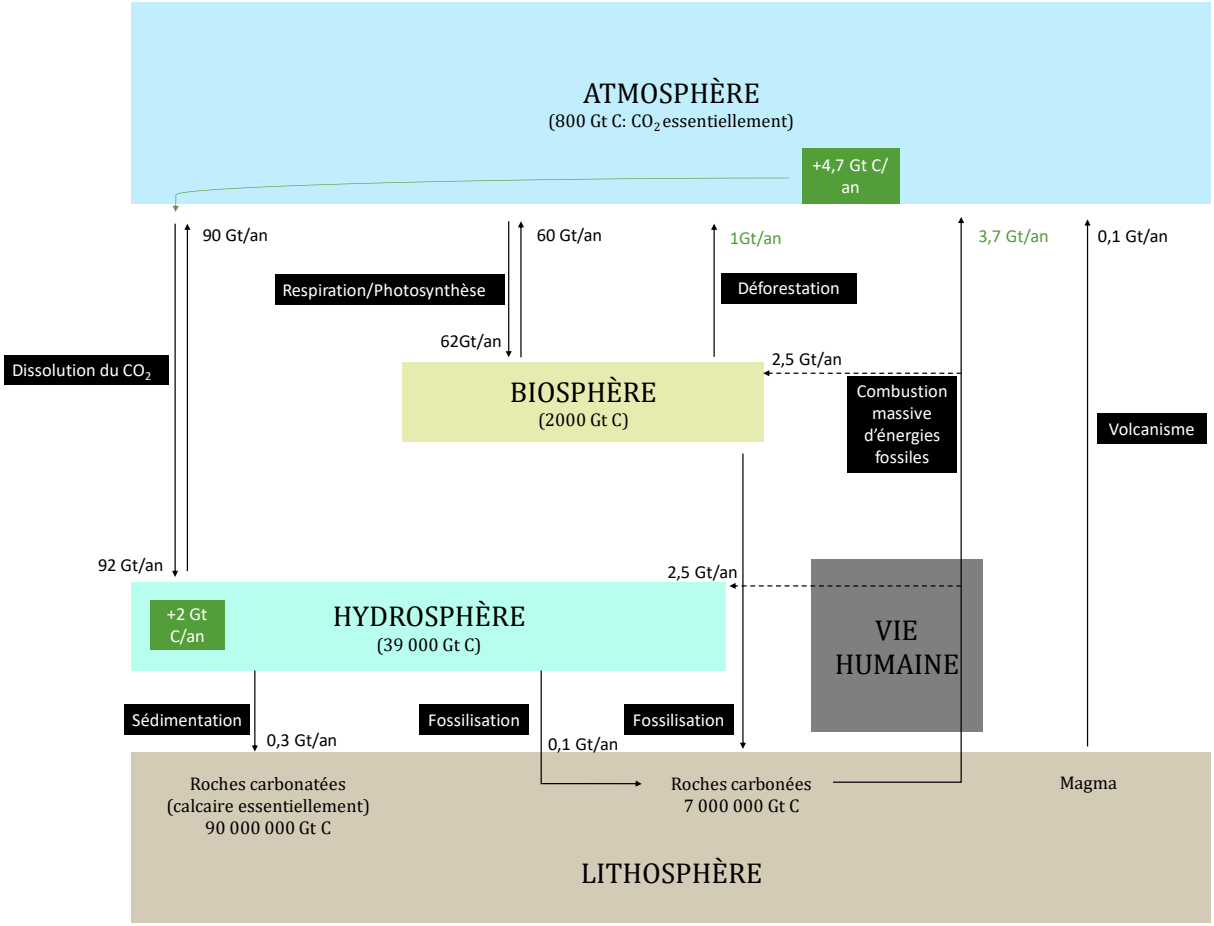


***Figure 7** : Représentation schématique du cycle du Carbone sur Terre*

L'acidification des océans est la conséquence du déséquilibre des flux de CO_2 entre l'atmosphère et l'hydrosphère dû à un apport anormalement plus important par l'atmosphère. Ceci est une répercussion des activités humaines qui induisent 8.7 Gigatonnes de carbone en plus dans l'atmosphère suite à la combustion des énergies fossiles, de l'industrie et des transports et 1 Gigatonne à cause de la déforestation. Les forêts et les océans n'en captent qu'environ 2.5

Gigatonnes chacun, ainsi en moyenne, l'atmosphère garde chaque année 4,4 Gigatonnes de carbone, ce qui augmente l'effet de serre entrainant un réchauffement climatique et l'acidification des océans (scénario pour 2100 : température + 1 à 3°C globaux et pH - 0,1 à 0,3 unités globales d'après Field *et al.*, 2014)

Cet excès du flux de CO_2 vers les océans qui entraine leur acidification, touche l'équilibre des carbonates dont la dissolution augmente, ayant des répercussions sur la biosphère marine et menaçant ainsi la survie de certaines espèces.

Les organismes calcifiants tels que les mollusques sont particulièrement vulnérables à l'acidification des océans et plusieurs études ont montré les effets négatifs sur la biominéralisation de la coquille (Kroecker *et al.*, 2013). Dans ce contexte écologique, il est d'autant plus important de les étudier afin d'anticiper les conséquences que pourront avoir nos déboires écologiques sur leur survie ainsi que sur tout l'écosystème marin dont ils font partie.

I.2. Le carbonate de calcium dans le Vivant

Il existe cinq phases cristallines de carbonates de calcium dont deux sont des phases hydratées. Mais le carbonate de calcium peut aussi se présenter sous forme de phase amorphe (Lowenstam & Weiner, 1989). Au sein des phases cristallines de formule $CaCO_3$ on distingue la calcite qui est une phase trigonale, l'aragonite dont la maille est orthorhombique et enfin la vatérite qui est une phase hexagonale comme montré en ***Figure* 8**.

Ces trois phases diffèrent par leur stabilité, la vatérite est la phase la moins stable, plus soluble que les autres par opposition à la calcite qui est la plus stable thermodynamiquement dans les conditions normales de température et de pression. L'aragonite est décrite comme ayant un comportement intermédiaire. On retrouve ces trois polymorphes au sein du Vivant. (Plummer et Busenberg, 1982)

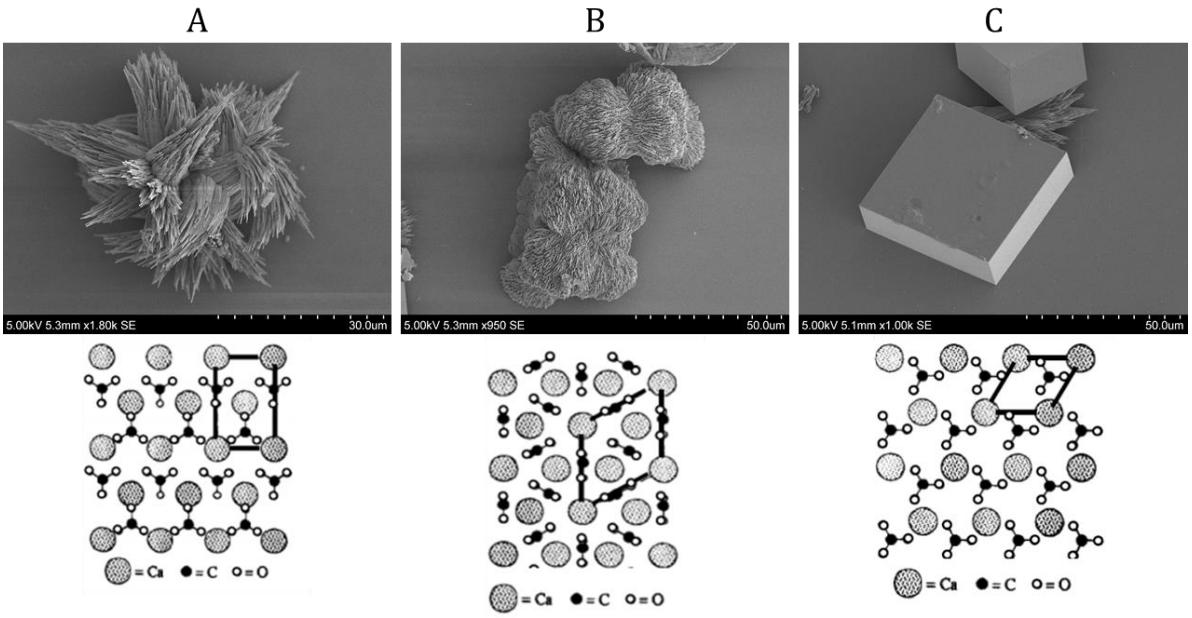


Figure 8 : *Illustration des trois polymorphes de carbonate de calcium. Cliché de microscopie électronique à balayage et schéma de la maille cristalline associée de cristaux de : A) Aragonite ; B) Vatérite ; C) Calcite. Phases obtenues selon la synthèse par diffusion de vapeur d'ammoniac s'inspirant du protocole de synthèse de Addadi et al., 1987*

Les structures à base de carbonate de calcium sont essentiellement présentes sous la forme d'exosquelettes, tels que les coquilles d'œufs ou de mollusques ou bien les carapaces des crustacés, qui assurent une fonction de protection et de maintien des tissus. Ils peuvent avoir d'autres fonctions comme agir tels des capteurs de gravités pour les otolithes (Mergner, 1999), ou bien jouer le rôle de lentilles chez certaines espèces comme les chitons.

La ***Figure* 3**, précédemment introduite à la page 14, montrant la répartition des principaux systèmes minéralisés dans le Vivant, permet de constater la place dominante des systèmes à base de carbonate de calcium, qui sont les plus représentés en termes de diversité taxonomique. Les clades les plus importants en termes de biominéralisation du carbonate de calcium sont les coccolithophores, les coraux, les échinodermes, les brachiopodes et les mollusques.

I.3. Diversité des systèmes : exemples marquants

I.3.a. Les Coccolithophoridés

Les coccolithophoridés sont des micro-algues unicellulaires phytoplanctoniques. Elles sont photosynthétiques contribuant ainsi à piéger le CO_2 par la photosynthèse et constituant une très grande partie du réservoir calcaire *via* la formation de carbonate de calcium. Elles produisent ainsi un exosquelette de carbonate de calcium appelé coccosphère formé de plaquettes de **calcite,** les coccolithes. Chaque coccolithe est lui-même constitué de l'assemblage de 30 à 40 entités élémentaires d'une taille de quelques microns qui ont souvent la forme d'un marteau avec une tige et une tête, comme le montre la ***Figure* 9** (exemple d'*Emiliana huxleyi*). La diffraction électronique de ces entités élémentaires indique qu'il s'agit de monocristaux dont l'axe principal est orienté selon l'axe cristallographique *c* de la calcite constitutive. (Paasche, 2001)

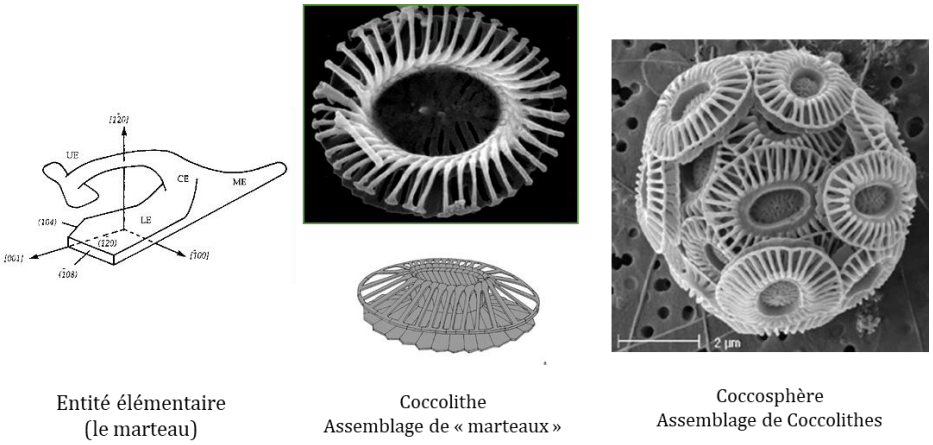


Figure 9 : *Illustration de l'organisation des coccosphères, chez les coccolithophoridés ; exemple de Emiliana huxleyi – Modifié d'après Paasche, 2001*

Ces organismes, d'une esthétique assez fascinante, sont encore une fois un exemple qui reflète l'organisation multi-échelle des tissus minéralisés

I.3.b. Les crustacés

La biominéralisation est bien répandue au sein des crustacés, groupe appartenant aux arthropodes, qui présentent très souvent un exosquelette rigide leur apportant soutien et protection. La croissance et toute la physiologie de l'animal sont fortement liées à des cycles de mues caractérisés par un renouvèlement complet de cet exosquelette à chaque cycle.

Tous les arthropodes synthétisent une cuticule organique par le procédé dit de sclérotisation. Cette cuticule de nature hydrophobe joue un rôle essentiel notamment pour les échanges avec le milieu extérieur en s'opposant à la perte d'eau comme c'est le cas chez les arachnides et les insectes (Ansenne et al, 1990).

Chez la plupart des crustacés, on observe ensuite une minéralisation de cette cuticule, ce qui permet l'élaboration de structures bien plus rigides telles que la carapace du crabe.

La carapace des crustacés présente aussi une structure complexe avec une organisation hiérarchique allant du nanométrique au macroscopique lui conférant des propriétés mécaniques remarquables.

Elle est constituée d'une matrice organique essentiellement faite de chitine (polysaccharide) et de protéines qui est ensuite minéralisée par du carbonate de calcium sous forme de **calcite**. La matrice présente un arrangement de type cholestérique (structure de type contreplaqué torsadé) comme dans le collagène de l'os (Bouligand 1972 ; Giraud-Guille *et al.* 2004).

La cuticule minéralisée des crustacés, et plus précisément du crabe, est constituée de trois couches, l'épicuticule, l'exocuticule et l'endocuticule, et enfin la couche membranaire comme l'illustre la ***Figure* 10.** La cuticule est minéralisée sur son ensemble à l'exception de certaines régions articulaires afin de garder de la flexibilité pour le mouvement.

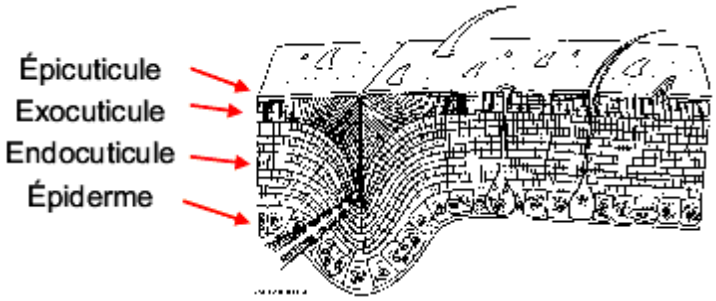


Figure 10 : *La cuticule des Arthropodes. La mince épicuticule est imprégnée de cires qui l'imperméabilise (Morin, 2002)*

La source principale de calcium est de nature exogène. Il est internalisé pas l'animal à partir du milieu extérieur. L'eau de mer assez concentrée en calcium (10mM) offre aux crustacés marins une facilité pour l'élaboration de leur carapace contrairement aux crustacés d'eau douce ou aux crustacés terrestres où le milieu est beaucoup plus pauvre en calcium.

Les crustacés ont développé différentes stratégies pour optimiser la calcification de leur cuticule notamment en accumulant le calcium pendant toute la période précédant la mue afin d'avoir un apport suffisant le moment opportun (Meyran, 1984 ; Greenaway 1985). On a ainsi un métabolisme actif permettant une sécrétion cyclique du calcium stocké.

I.3.c. Les coraux

Les coraux ont une place primordiale parmi les organismes minéralisés de par leur capacité à former des colonies. Ils sont à l'origine des récifs coralliens qui sont l'une des plus grandes structures d'origine biologique du monde couvrant une surface de 280 000 km^2. Par ailleurs, les coraux servent également de marqueurs pour la reconstruction de paléoclimats grâce à l'analyse de leur composition. En effet, ils construisent leur squelette à partir de carbonate et de calcium présents dans l'eau de mer et incorporent des éléments trace tels que le strontium et le magnésium. La variation des différents isotopes présents dans les squelettes formés au cours des différentes périodes de l'histoire de notre planète permet de reconstituer les environnements climatiques passés dont la température des océans. (Fantazzini *et al.*, 2015)

Ainsi l'étude de la biominéralisation des coraux est biologiquement et géochimiquement fondamentale.

Parmi les coraux, on distingue ceux à corps mous qui sont souvent en symbiose avec une algue et ceux à corps durs capables de synthétiser un exosquelette calcifié dont certains exemples sont présentés sur la ***Figure* 11**. Cet exosquelette est constitué d'**aragonite**.

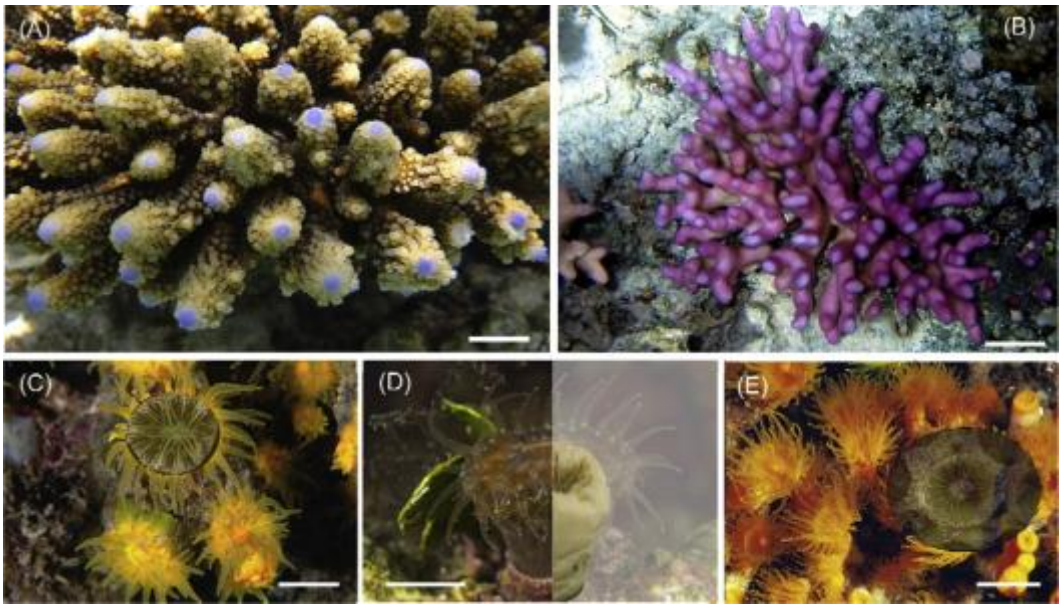


Figure 11 : *Photographies de coraux scléractiniaires montrant la diversité de squelettes chez les principales espèces méditérianéenne étudiées (Barre d'échelle : 1cm). A : A. digitifera ; B : S. pistillata ; C : LA. pruvoti; D : B. europaea ; E : caespitosa - D'après Falini et al., 2015*

Le début de l'étude des coraux date d'il y a 150 ans, néanmoins il reste une certaine part d'ombre quant à la compréhension de la calcification de leur squelette. Initialement, la formation des squelettes des coraux était considérée comme un phénomène minéralogique (Barnes, 1970). Ainsi, les structures étaient décrites comme étant formées de cristaux d'aragonite dont la mise en place serait dépourvue de contrôle biologique, obéissant seulement aux conditions physicochimiques environnementales. Progressivement le débat au sein de la communauté s'oriente vers une possible implication biologique, laissant apparaitre d'abord l'hypothèse d'une combinaison de procédés abiotiques et biotiques et enfin plus récemment l'idée d'un contrôle

biologique très spécifique par le biais des composants d'une matrice organique (Drake *et al.*, 2013 ; Falini *et al.*, 2015).

Le principal ordre des coraux durs est formé par les scléractiniaires (*Scleractinia*) qui sont des coraux exclusivement marins souvent sphériques ou en formes de buissons de cornes plus ou moins complexes. L'animal est constitué d'un polype qui recouvre le squelette de carbonate de calcium se trouvant à la base de la structure. Dans les coraux coloniaux les polypes sont reliés entre eux par un tissu appelé le coenosarc qui est absent chez les coraux solitaires (Falini *et al.*, 2015). Le tissu des coraux est constitué de deux épithélium, l'endoderme et l'ectoderme. On distingue au sein de l'ectoderme les cellules calicoblastiques responsables de la sécrétion du squelette de carbonate de calcium. Les cellules calicoblastiques sont à l'origine de la sécrétion de la matrice organique et des ions permettant la formation du squelette aragonitique. Les cristaux d'aragonite se forment au niveau de zones précises appelées centres de calcification (COCs) qui constituent des points de nucléation pour la future phase minérale. Ces zones du squelette minéral contiennent une fraction organique plus importante que le reste du squelette qui est pauvre en fraction organique de manière générale c'est à dire à hauteur de 1%. De plus, on trouve dans cette région une cristallinité inférieure au sein de la fraction minérale et une plus grande proportion d'éléments traces tel que le magnésium, le strontium et le baryum par rapport au reste du squelette. (Falini *et al.*, 2015)

I.3.d. Les oursins

Les échinodermes élaborent un endosquelette minéralisé composé de plaques organisées en un réseau tridimensionnel (le stéréome) et liés les unes aux autres par du tissu conjonctif. Chez les oursins (Echinides), ces plaques juxtaposées sont soudées en une structure rigide de forme plus ou moins globuleuse appelée le test. L'endosquelette des oursins comprend aussi les piquants, les pédicellaires et les dents. Les piquants sont de longues épines de **calcite** et très riche en magnésium (1000 à 2000 ppm d'après P. Swart, 1980). Le minéral est très poreux contenant

des cavités interconnectées (Su et al 2000). Ils assurent la protection de l'oursin contre les prédateurs, et interviennent dans la locomotion.

Même si les épines des oursins peuvent mesurer jusqu'à plusieurs dizaines de centimètres, il est surprenant de voir qu'elles diffractent comme un monocristal sous un faisceau de rayons X. Cette observation a longtemps alimenté le débat sur la nature cristalline de cette phase minérale partageant la communauté des chercheurs. Petit à petit l'hypothèse que l'épine est en réalité un agrégat de cristallites de calcite parfaitement ordonnée a été retenue (Seto *et al.*, 2012).

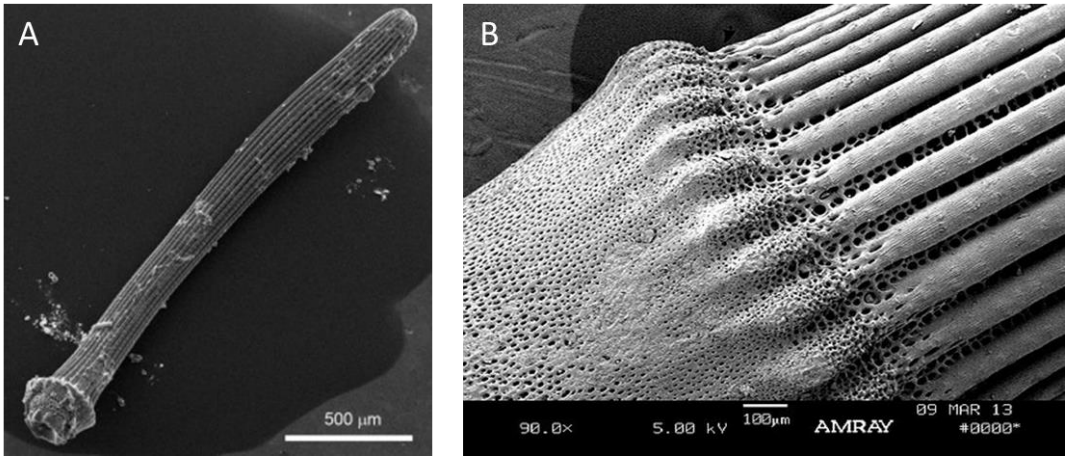


Figure 12 *:Clichés de microscopie électronique à balayage montrant la structure de l'épine d'oursin. A : Vue générale; B : Cliché à plus haut grandissement, montrant la structure poreuse finement organisée du squelette de l'épine d'oursin (Crédit photo : A. Kahn)*

Les épines des oursins présentent une résistance mécanique assez remarquable presque aussi élevée que celles des coquilles des mollusques malgré la grande porosité au sein de la phase minérale **(*Figure* 12)**. La calcite de synthèse a tendance à se cliver facilement le long de ses plans cristallins, contrairement aux épines d'oursin qui ont tendance à se cliver de manière conchoïdale malgré la très grande proportion de fraction minérale calcitique (jusqu'à 99%) (Weber *et al.*, 1969). Il a été proposé que ces propriétés mécaniques remarquables étaient dues aux protéines incluses au sein du squelette lors de sa croissance. (Kim *et al.*, 2011)

Ces quatre exemples de systèmes carbonatés démontrent la diversité que l'on retrouve au sein de différents tissus minéralisés bien qu'ils soient constitués de phases minérales de même nature.

Le dernier exemple de systèmes minéralisé, présenté dans les paragraphes suivant et qui est au cœur du sujet de cette thèse est la coquille des mollusques contenant la nacre.

III. Les Mollusques

III.1. Généralités

Les mollusques forment l'un des phylums les plus diversifiés au sein des non-vertébrés et le plus important par la taille après celui des arthropodes.

Ce sont des protostomiens triploblastiques (le blastopore donnera la bouche chez l'adulte), lophotrochozoaires car ils passent par une étape de larve ciliée nageuse (larve trochophore). Ils sont caractérisés par leur corps mou et la présence d'une radula. Ils présentent également une large sole pédieuse musculeuse et un tissu spécifique appelé manteau qui entoure les organes internes de l'animal et sécrète les formations calcifiées (Lecointre & Le Guyader, 2001).

Les mollusques représentent environ 118 000 espèces regroupé en huit classes inégales, dont la phylogénie est représentée sur la ***Figure* 13.**

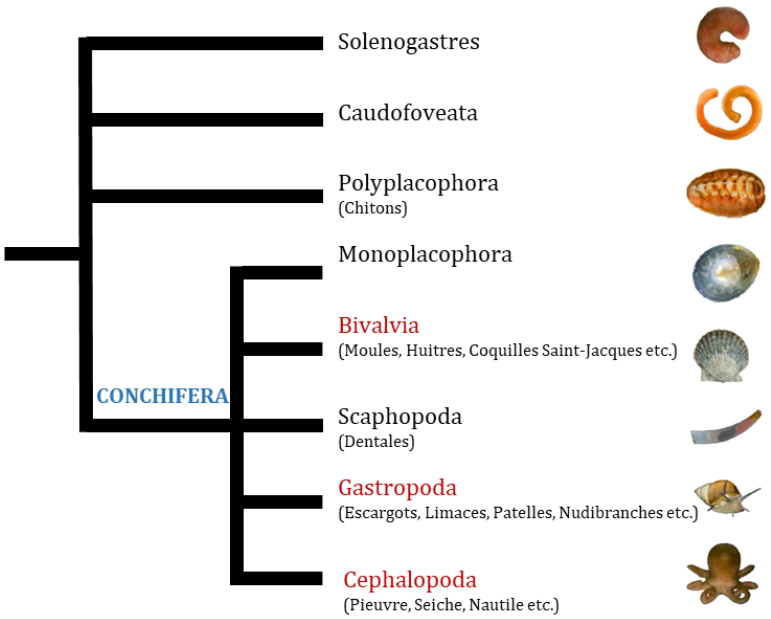


Figure 13 : *Phylogénie des Mollusques. Les conchifères regroupent l'ensemble des groupes possédant une coquille d'uen seule pièce. Les Gastéropodes et les Céphalopodes sont des viscéroconque; ils possèdent une tête distincte très développée et une coquille qui ne protège que les viscères tandis que les Scaphopodes et les Bivalves sont des loboconques ; ils n'ont pas de tête et la totalité du corps est protégé par la coquille. Les mollusques nacriers sont représentés en rouge – Modifié d'après Kocot et al., 2016*

Les mollusques élaborent une grande diversité de structures minéralisées dont la majorité contient des carbonates ou des phosphates. La présence d'un corps mou est sans doute à l'origine de la sélection au sein de ce phylum de stratégies pour maintenir et protéger les tissus mous contre les prédateurs ou la dessiccation : spicules, plaques calcaires, coquille. La structure la mieux étudiée est la coquille calcifiée des Conchifères synthétisée par un tissu spécialisé, le manteau. Sa morphologie et sa composition varient, selon les groupes, de celle unique et spiralée des gastéropodes aux deux valves articulées chez les bivalves.

La présence d'une coquille (externe ou interne) secrétée par le manteau caractérise le clade des Conchifères regroupant les Monoplacophores, les Gastéropodes, les Céphalopodes, les Bivalves et les Scaphopodes. Le succès évolutif des mollusques peut être attribué, en partie, à la capacité adaptative de cette coquille (Kocot *et al.* 2016). Les gastéropodes représentent la classe des mollusques la plus diversifiée, et la plupart d'entre eux possèdent une coquille univalve spiralée mais certains comme les limaces, ont complètement perdu leur coquille au cours de l'évolution. Au sein des céphalopodes, classe dont les membres sont caractérisés par des tentacules préhensiles, certains présentent une coquille externe (exemple du nautile), ou interne (seiche, calmar) ou même absente comme dans le cas de la pieuvre et la limace.

Elle est également absente chez les Solénogastres, les Caudofocéates qui ne présentent pas de coquille à proprement parler, leur corps est tout de même recouvert de spicules calcaires. Les polyplacophores sécrètent une coquille dorsale atypique constituée de huit plaques calcaires articulées entre elles. La ***Figure* 14** ci-dessous illustre la diversité des structures minéralisées au sein du phylum des mollusques.

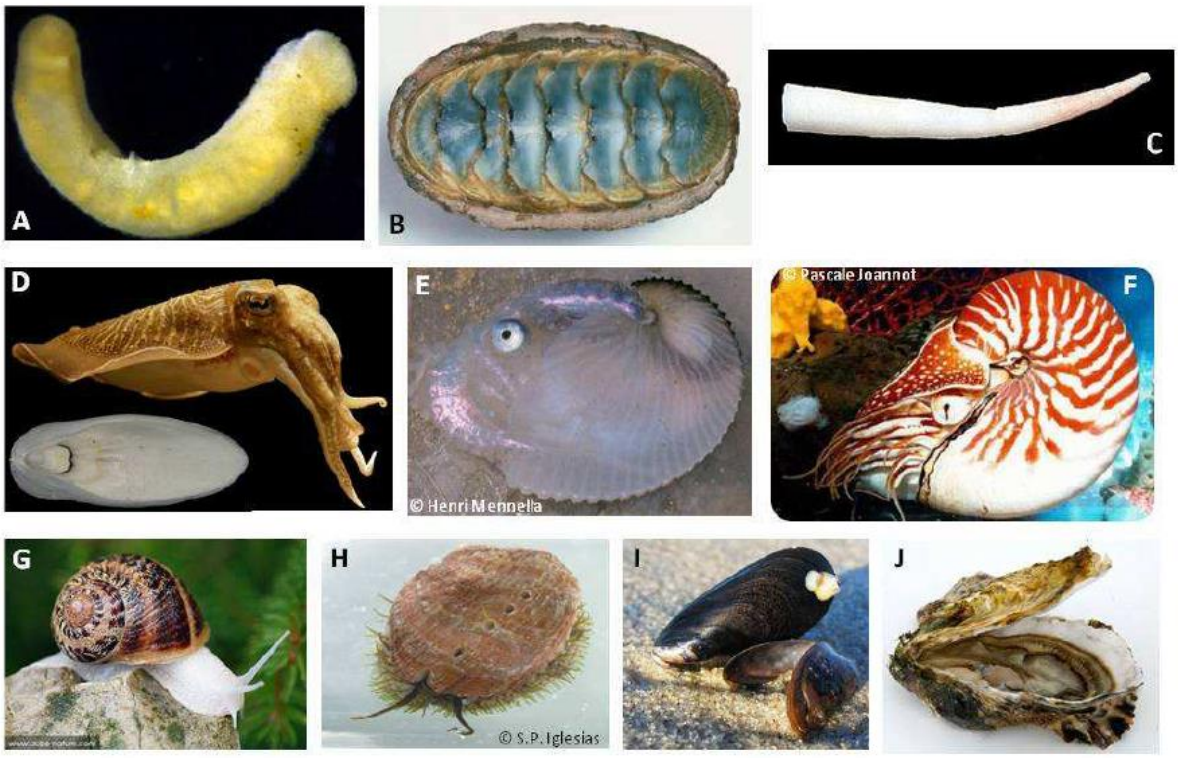


Figure 14 : *Diversité des exosquelettes calcifiés dans les différents clades de Mollusques ; A) Solénogastre mesurant 1 à 15 cm de longueur avec un corps recouvert de spicules ; B) Chiton (Polyplacophore) mesure entre 2 et 3 cm avec 8 plaques dorsales articulées ; C) Coquille d'un dentale (Scaphopode), mesurant en moyenne 5 cm ; D) , E), F) Céphalopodes : la seiche et son os interne (jusqu'à 65 cm avec les tentacules), l'Argonaute dans sa coquille spiralée transparente (10 cm) et le Nautile (jusqu'à 20 cm) ; G) et H) Gastéropodes : escargot Gris (4 cm), ormeau européen (jusqu'à 13 cm) ; I) et J) Bivalves : Coquilles de moules (5 cm) et l'huître creuse (10 cm) – D'après Gaume 2010*

La coquille des mollusques est l'une des structures minéralisées les plus étudiées par la communauté car sûrement l'une des plus fascinantes. La formation et la structure de ces coquilles sont issus de phénomènes d'une grande complexité pour lesquels il persiste certaines interrogations.

III.2. Description structurale de la coquille des mollusques

Quelle que soit l'origine taxinomique de l'espèce en question, la coquille des mollusques est toujours constituée de plusieurs couches minéralisées qui se superposent pouvant aller de 2 à 5. Ces couches minéralisées sont généralement surmontées d'une couche externe purement

organique. La ***Figure* 15** représente un cliché en microscopie électronique à balayage de la section de la coquille de *Unio pictorum*, un bivalve d'eau douce européen (Marin *et al.*, 2012).

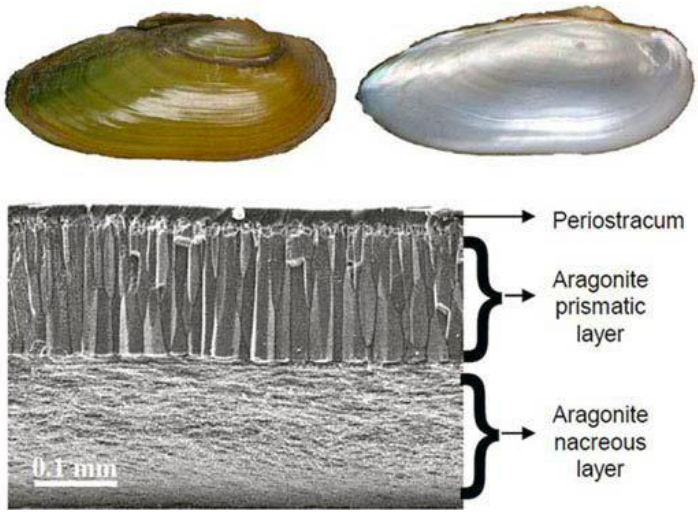


Figure 15 : *Microstructure de la coquille du mollusque d'eau douce Unio pictorum montrant une organisation typique en trois couches : le périostracum (couche organique) et la couche prismatique (Aragonite ou Calcite) et la couche nacrée (Aragonite)- D'après Marin et al., 2012*

Cet exemple offre un aperçu de l'organisation fréquente de la coquille des mollusques. On distingue de l'extérieur vers l'intérieur de la coquille 3 couches : (i) d'abord une fine couche purement organique appelée **périostracum** constituée de chitine, de protéines et de pigments à l'origine des colorations de la face externe des coquilles. (ii) Sous le périostracum se trouve une couche minéralisée constituée de cristaux allongés disposés perpendiculairement à la surface de la coquille. Il s'agit de la **couche prismatique**. Cette couche peut être, suivant les espèces, soit aragonitique, soit calcitique. (iii) Sous cette première couche on distingue une autre couche minérale très importante qui représente 50% de l'épaisseur totale de la coquille. Cette couche est la **couche nacrée** et constitue la couche la plus interne de la coquille de nombreux mollusques, dits mollusques nacriers, comme les moules, les huîtres, les ormeaux ou encore le nautile. Cette couche est obligatoirement aragonitique. La description de ce matériau, élément central de l'étude entreprise lors cette thèse fera l'objet de la prochaine partie.

La description qui vient d'être faite de la coquille d'*Unio pictorum*, correspond au modèle typique de la coquille de mollusques mais il existe en réalité une importante diversité en termes de microstructures. La ***Figure* 16** (Marin *et al.* 2012) offre un aperçu de cette diversité.

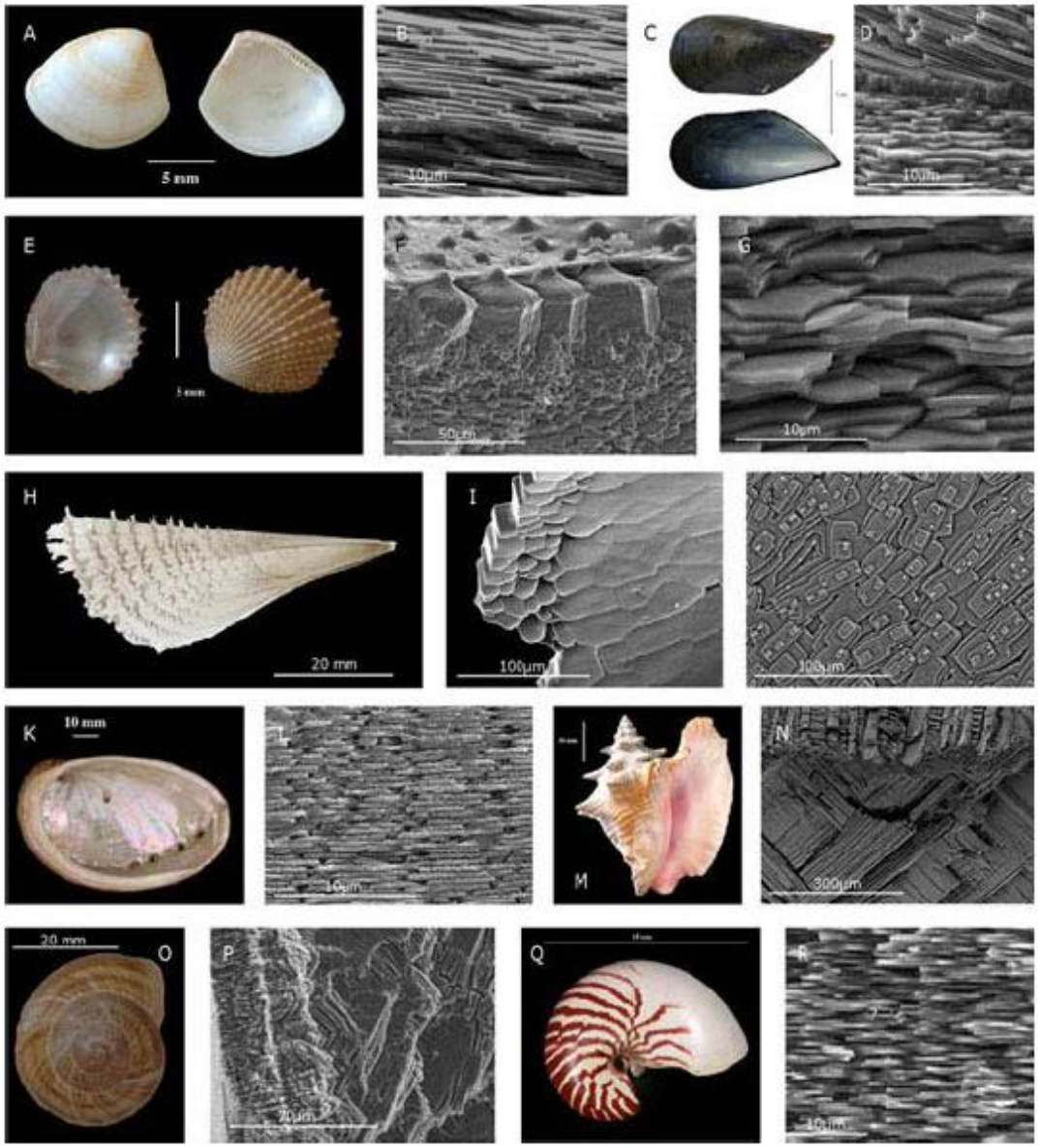


Figure 16 : *Quelque exemples de coquilles de mollusques et de leurs microstructures associées. A) Bivalve Nucula sulcata avec B) sa couche nacrée ; C) Bivalve Mytilus edulis avec D) la transition entre sa couche nacrée et prismatique ; E) Bivalve Neotrigonia sp. avec F) la transition entre la couche nacrée et la couche prismatique ; H) Bivalve Pinna nobilis avec I) le bord de sa couche nacrée et J) ses tablettes de nacre en formation; K) Gastéropode Haliotis tuberculata avec L) sa couche nacrée ; M) Gastéropode Strombus gigas avec N) sa microstructure lamellaire croisée ; O) Gastéropode Helix pomatia avec P) sa microstructure lamellaire croisée et Q) Céphalopode Nautilus macromphalus avec R) ses tablettes de nacre – D'après Marin et al. 2012*

Les différents types de microstructures présentes dans la coquille des mollusques ont fait l'objet de nombreux travaux principalement chez les bivalves et les gastéropodes d'intérêt économique. L'ensemble des descriptions de ces structures ont été regroupées dans la revue de Marin *et al.* 2012.

La ***Figure* 17** suivante simplifiée d'après la figure originale de Carter et Clark (1985) regroupe les différents types de microstructures rencontrées chez les mollusques qui seront détaillés dans les prochains paragraphes.

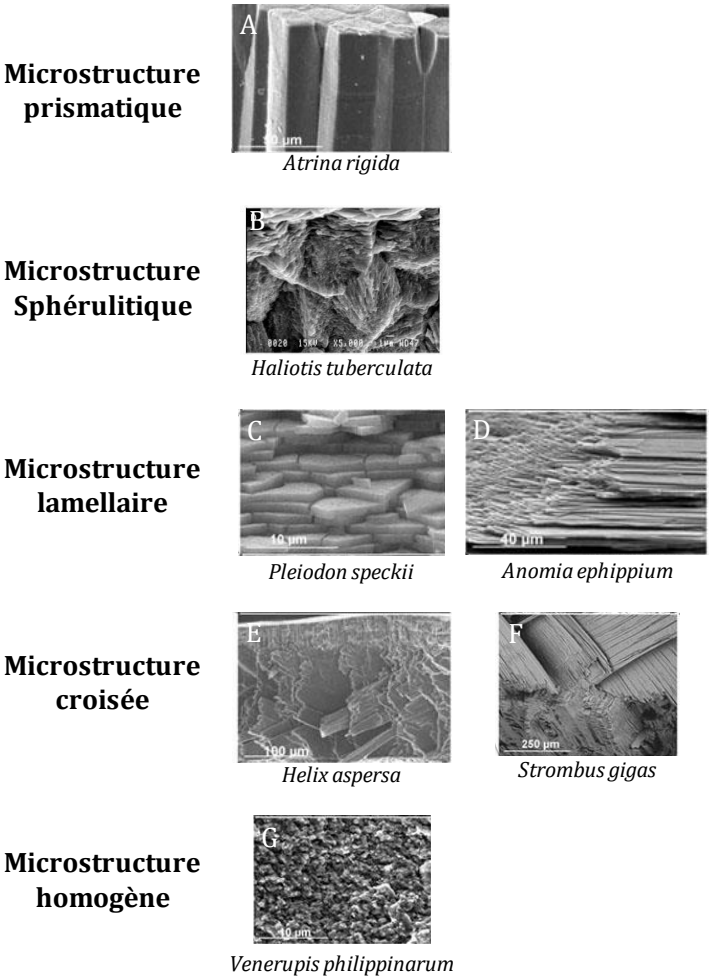


Figure 17 : *Clichés en MEB illustrant les cinq microstructures principales rencontrées dans la coquille des mollusques – Modifié d'après Carter and Clark 1985*

La **couche prismatique** est constituée d'objets cristallins allongés pouvant être rectangulaires ou plus arrondis **(*Figure* 17A).** Ils sont regroupés et relativement alignés mais ne s'imbriquent pas totalement les uns avec les autres (Carter *et al.*, 1985). Ces prismes peuvent être de taille variable d'une espèce à l'autre. Chez la moule *Pinna nobilis* calcitique, ils sont par exemple de grande taille, orientés perpendiculairement à la surface mais sont fins et positionnés de manière obliques par rapport à la surface chez la moule *Mytilus edulis*, ou encore incurvés chez la palourde *Venerupis philipinarum* et presque parallèles à la surface (Popov, 1992, Trinkler *et al.*, 2011)

Toutes ces différences laissent penser que ces prismes ne sont pas produits d'une manière universelle d'une espèce à l'autre mais impliquent différents mécanismes de croissance cristalline. En effet, lors de la mise en place de la couche prismatique, différents paramètres entrent en compte, comme l'initiation de la croissance des primes sur la surface interne du périostracum, les effets stériques ou encore la position de l'épithélium impliqué dans le contrôle de la minéralisation (Checa & Rodriguez-Navaro, 2001).

Un autre type de microstructure dite **sphérulitique (*Figure* 17B),** qui se réfère à la présence d'objets sphériques, est constituée de cristaux dont la croissance s'initie en leur centre (Marin *et al.*, 2012). Ces sphérulites sont souvent à la base de croissance des prismes en particulier dans le cas où la croissance est privilégiée dans une direction (Cuif *et al.*, 1983). Ce type de biominéral se retrouve également chez certains organismes comme dans la coquille de l'ormeau Européen *Haliotis tuberculata* (Gaume *et al.*, 2010) sous la forme d'une couche sphérulitique entre le periostracum et la couche nacrée à la place de la couche prismatique.

Il a été récemment observé que les sphérulites étaient souvent produits en cas de « stress », pour remédier à une situation d'urgence telle qu'une brèche à combler lors de la réparation coquillère. (Marin *et al.*, 2012)

La **microstructure de type lamellaire** est une appellation utilisée pour caractériser des structures constituées de petites unités plates, parallèles à la surface sur laquelle ils se déposent (Carter & Clark, 1985). Ces petites unités peuvent être de différentes formes telles que des baguettes, des tablettes, ou des tablettes allongées (lattes). Les deux types de structures les plus connues sont les microstructures nacrées **(*Figure* 17 C)** et foliées **(*Figure* 17 D).** La nacre, dont la structure sera détaillée dans la Paragraphe V, correspond à un assemblage de tablettes d'aragonite qui s'empilent pour former un matériau lamellaire dense et qui constitue la partie intérieure iridescente de la coquille de nombreux mollusques (Fleury *et al.*, 2008). La microstructure foliée est constituée de petites lattes de calcite qui forment des feuillets superposés (Runnegar et al, 1984). Cette structure est très courante chez les huîtres par exemple. La structure foliée est beaucoup moins résistante que la nacre. Néanmoins ces structures lamellaires sont beaucoup plus résistantes que les couches prismatiques et sphérulithique. (Marin *et al.*, 2012).

On distingue également les **structures croisées** qui sont les structures les plus complexes car constituées d'au moins deux orientations différentes des unités cristallines qui la composent (Carter *et al.*, 1985). Il existe différents types d'entrecroisements selon les espèces, cette géométrie se retrouvant majoritairement chez certains bivalves et gastéropodes. La plus connue est la microstructure lamellaire croisée qui consiste en un arrangement d'aiguilles d'aragonite en contreplaqué (***Figure* 17E et F**) (Shimamoto *et al.*, 1986). Même si cette microstructure est moins performante que la nacre en terme de résistance mécanique elle représente tout de même une bonne stratégie de la part des mollusques. En effet, elle combine un coût énergétique moindre, car elle est constituée d'une quantité de matière organique plus faible que la nacre, associé à des propriétés mécaniques tout de même intéressantes avec notamment une bonne aptitude à stopper la formation de fêlures (Kamat *et al.*, 2000 ; Pokroy & Zolotoyabko, 2003). Les mécanismes de formations de cette couche sont particulièrement méconnus.

Les **microstructures homogènes** correspondent à des structures qui ne présentent aucune organisation particulière des cristaux visible en microscopie optique ou électronique **(*Figure* 17G).** Elles sont ainsi généralement granulaires, pouvant présenter une taille de grain variable d'un exemple à l'autre. Ce type de structure est très fréquent chez certains bivalves hétérodontes et il a été observé qu'elles étaient souvent présentes dans les zones de réparation coquillère, comme chez *Venerupis philipinarum* une palourde qui sécrète ce type de microstructures suite à des infections bactériennes (Trinkler *et al.*, 2011). Les grains vont ensuite se réorganiser en microstructure croisée en formant des aiguilles.

Enfin les derniers types de microstructures sont les structures **hélicoïdales**, les **spicules ou cristaux isolés**. Ce sont des microstructures rares souvent retrouvées dans les zones de réparation, ou bien associées au périostracum dans le cas des spicules isolées.

III.3. Aspects physiologiques et cellulaires des processus de formation de la coquille des mollusques

De manière générale, les processus physiologiques de formation de la coquille sont communs à tous les mollusques. Le mécanisme général est illustré sur la ***Figure* 18.** Ce schéma met en évidence trois zones clés impliquées dans la formation de la coquille : (*i*) le **manteau** et son **épithélium externe**, (*ii*) le **périostracum** et la zone de formation de la coquille et (*iii*) l'espace entre l'épithélium externe du manteau et la coquille en formation appelé **l'espace extrapalléal**. Le schéma de la **figure** 18 présente les interactions entre ces différents constituants dont le rôle sera décrit ci-dessous.

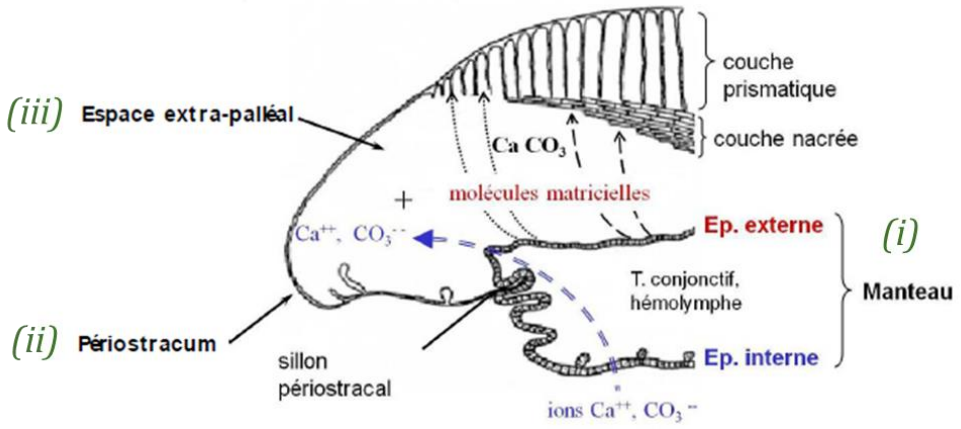


Figure 18 : *Schéma représentant le processus général de la minéralisation de la coquille nano-prismatique d'un bivalve modèle. Création de l'espace extrapalléal (largement agrandi sur le schéma) entre l'épithélium et le périostracum permettant la concentration des ions apportés par les cellules du manteau et l'hémolymphe. D'après Saleudin & petit 1983, modifié par Gaume 2010)*

III.3.a. Le manteau et les cellules de l'épithélium externe

La biominéralisation chez les mollusques est un phénomène biologiquement contrôlé par un épithélium (Simkiss *et al.*, 1989) qui fait partie d'un organe appelé le manteau. Le manteau est un tégument cilié qui recouvre l'intérieur de la coquille et qui est constitué d'un épithélium interne en contact avec le milieu extérieur comme l'eau de mer, des tissus internes (muscles palléaux, nerfs, tissus conjonctifs) et un épithélium externe dit épithélium calcifiant car il fait face à la coquille et sécrète tous les constituants nécessaires à sa formation.

Des études ont proposé que le manteau n'était pas homogène sur toute sur sa surface et qu'il présentait des spécificités en fonction de la microstructure de la coquille en contact avec lui (Sudo *et al.*, 1997 et Jolly *et al.*, 2004). En effet, des études réalisées sur des bivalves nacro-prismatiques ont montré que les cellules du manteau sécrètent différentes protéines en fonction du type de microstructure (couche prismatique, couche nacrée) en contact avec elles. Ceci montre que le contrôle biologique diffère en fonction de la nature et/ou la structure de la phase minérale déposée.

III.3.b. Le périostracum

Le périostracum est de nature exclusivement organique et composé de chitine, de protéines et de pigments. Il joue plusieurs rôles dans la formation de la coquille. C'est d'abord un support pour les premières phases minérales lorsqu'elles se déposent. Deuxièmement, il permet de délimiter un espace (l'espace extrapalléal) afin de permettre un confinement et donc une concentration des ions nécessaire à la formation des phases minérales de carbonate de calcium. Il joue également différents rôles tel que la protection contre la dissolution de la coquille, en particulier dans des milieux acides (Isaji *et al.*, 1993). Il empêche aussi la colonisation par d'autres organismes (Bers *et al.*, 2006) et enfin il assure une fonction de camouflage par la présence des différents pigments qui le constituent afin de se protéger des prédateurs.

III.3.c. L'interface entre le manteau et le périostracum

L'épithélium externe du manteau n'est pas en contact direct avec la coquille mais en est séparé par un espace extrapalléal. Cet espace est rempli d'un fluide appelé fluide extrapalléal. Seules quelques analyses ont été effectuées sur ce fluide jusqu'à présent car il est difficile de l'extraire mais il semblerait que ce fluide contient des ions inorganiques (Misogianes *et al.*, 1979 et Saha *et al.*, 2000), des protéines (Yin *et al.*, 2005 et Ma *et al.*, 2007) et des glycosaminoglycanes (GAGs) (Moura *et al.*, 2000 et Lopes-Lima *et al.*, 2005).

En parallèle de ce qui a été décrit précédemment sur le manteau, la composition du fluide extrapalléal n'est pas homogène sur tout son volume et varie du centre de la coquille vers l'extérieur de même que celle-ci varie d'une saison à l'autre (Moura *et al.*, 2000).

Les ions présents dans ce fluide sont assez nombreux ; en plus des précurseurs ioniques de la biominéralisation, les ions calcium et bicarbonate, on trouve différents autres ions comme Na^+, K^+, Mg^{2+}, Cl^-, SO_4^{2-} ainsi que des éléments mineurs comme le strontium et le fer. Le pH est en

général basique allant de 7,4 à 8,3 en fonction, respectivement, des mollusques d'eau douce ou marins.

III.3.d. Les composants inorganiques

Les **ions calcium** Ca^{2+} sont apportés de différentes manières par la nourriture, la filtration de l'eau environnante, ou par diffusion passive à travers les tissus de l'animal. Ils sont ensuite transportés par l'hémolymphe et semblent être stockés de manière transitoire dans les tissus conjonctifs du manteau ou dans l'épithélium externe calcifiant (Wilbur et Saleuddin 1983). Deux modes de stockages peuvent avoir lieu, soit sous forme (*i*) « soluble » où les ions calcium sont séquestrés par des protéines complexant le calcium ou dans le réticulum endoplasmique ou (*ii*) « insoluble », stockés sous forme de granules. Dans le premier cas, le stockage est limité et doit être sollicité seulement pour une petite partie du calcium requis. Dans le deuxième cas, les grains sont sous forme d'un carbonate de calcium amorphe (ACC) pouvant être facilement dissous postérieurement. Ils peuvent être intracellulaires au niveau du tissu conjonctif ou de l'épithélium externe du manteau ou encore dans les hémocytes (Addadi *et al.*, 2006)

Les **ions bicarbonate** HCO_3^{2-} proviennent de différentes sources, à savoir l'alimentation, l'eau du milieu extérieur, ou par diffusion à travers le corps de l'animal. Dans le dernier cas, les ions sont transportés par l'hémolymphe de la même manière que le calcium. Le bicarbonate peut aussi être issu de l'activité métabolique du dioxyde de carbone (issu de la respiration) suite à son hydratation par une enzyme, l'anhydrase carbonique. (Marin *et al.*, 2012)

Les ions présents au niveau du manteau vont être massivement libérés dans l'espace extrapalléal. La présence de canaux membranaires tels que les pompes Ca-ATPases ou les canaux à ions bicarbonates est essentielle pour permettre d'augmenter localement la concentration de ces ions afin d'atteindre les conditions de sursaturation. Les autres ions précédemment énoncés sont également libérés dans l'espace extra-palléal et sont ensuite incorporés dans la coquille. En parallèle les cellules de l'épithélium externe du manteau libèrent les protéines et glycoprotéines

par exocytose. Les ions et les molécules organiques interagissent de manière contrôlée et s'assemblent pour former le biominéral selon l'équation :

$$Ca^{2+} + HCO_3^- \leftrightarrow CaCO_3 + H^+$$

Cette équation montre que la formation du carbonate de calcium est accompagnée de la libération d'un proton ce qui va acidifier le milieu. Afin d'empêcher la réaction de se faire dans le sens inverse et de redissoudre le carbonate de calcium formé, plusieurs possibilités apparaissent.

- Ce proton peut être absorbé par les cellules du manteau par les pompes à protons membranaires H^+-ATPases (Coimbra *et al.*, 1988).
- La deuxième possibilité proposée par Wilbur et Saleuddin en 1983 est que ce proton est retiré du milieu en interagissant avec le bicarbonate libre pour donner du CO_2 et de l'eau grâce à l'action de l'anhydrase carbonique. Le CO_2 généré quitte ensuite le milieu intérieur en diffusant vers le milieu extérieur ou bien vers le manteau.
- Une autre possibilité, en particulier pour les mollusques terrestres, proposée il y a bien longtemps en 1969 par Campbell *et al.*, suggère que le proton généré se complexe avec de l'ammoniac NH_3 pour former de l'ion ammonium NH_4^+. L'ammonium serait issu du métabolisme de l'urée en étant un produit de dégradation suite à l'action de l'uréase.

Le processus de formation de la coquille fait également intervenir des composants moléculaires organiques jouant un rôle crucial et qui seront détaillés dans les prochains paragraphes.

III.4. Les composants organiques dans la coquille des mollusques

La coquille des mollusques contient peu (inférieur à 5%) de fraction organique en proportion de la phase minérale comme l'a mis en évidence Frémy dans les coquilles et les os il y a plus d'un siècle en 1855 (Frémy, 1855). Petit à petit, l'étude de cette fraction organique se précise. En 1972 Grégoire *et al.*, introduisent le terme de matrice organique qui est proposée

comme étant un mélange de composants macromoléculaires extracellulaires sécrétés pour guider la minéralisation ou du moins pour être utilisés comme substrat pour le dépôt des phases minérales.

Les études quantitatives qui ont suivi montrent que la fraction organique représente entre 0,01 et 5 % de la masse de la coquille. Même si ces proportions paraissent faibles, cela suffit pour que les composants organiques aient une influence considérable, que ce soit pour le contrôle de la biominéralisation mais aussi en termes de propriétés mécaniques. Les variations de la quantité d'éléments organiques dans la coquille dépendent de la microstructure (Weiner *et al.*, 1975).

Parmi les composants organiques on distingue deux fractions : Les **composants non protéiques** (polysaccharides, lipides, pigments…) et les **protéines** de la coquille.

III.4.a. Les polysaccharides

En termes de quantité, les polysaccharides représentent la seconde classe des macromolécules organiques présente dans la coquille après les protéines. La molécule dominante et caractéristique est la **chitine**. La chitine est constituée d'une longue chaîne polymérique insoluble composée du monomère N-acétyl glucosamine (***Figure* 19**). La chitine est largement distribuée au sein de la coquille mais il n'est pas encore parfaitement établi qu'elle soit présente dans tous les types de microstructures. Comme il sera décrit plus précisément dans le Paragraphe V, la nacre est la microstructure où la chitine joue un rôle clé pour l'élaboration de la structure 3D qui la caractérise.

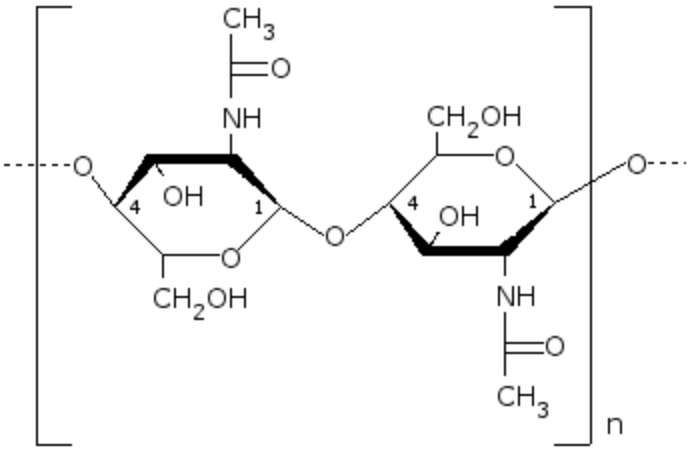


Figure 19 : *Formule chimique de la Chitine ou n correspond au nombre de répétition du monomères au sein du biopolymère*

La synthèse de la chitine est permise grâce à une enzyme, la chitine synthase (Weiss *et al.*, 2006) dont l'inhibition entraine de sérieux défaut dans les microstructures dont la nacre (Schönitzer *et al.*, 2007). Dans la coquille des mollusques, la chitine est présente sous sa forme β présentant des feuillets antiparallèles et forme des complexes supramoléculaires en s'associant à d'autres molécules telles que des protéines. Il existe ainsi des protéines ayant des motifs liants la chitine appelés motifs de Rebers-Riddiford (Inoue *et al.*, 2001).

En plus de la chitine, il existe d'autres polysaccharides liés de manière covalente aux protéines formant des glycoprotéines, les protéoglycanes (Marie *et al.*, 2008). Mais il semblerait qu'il y ait également des polysaccharides libres dans le milieu sous forme sulfatée notamment (Marie *et al.*, 2008). Ils joueraient un rôle coopératif avec les protéines pour concentrer le calcium (Lowenstam *et al.*, 1989).

III.4.b. Les protéines de la coquille des mollusques

Les protéines de la coquille des mollusques sont étudiées depuis plus de cent ans. Pour cela, la méthode usuelle consiste à dissoudre la coquille par de l'EDTA ou un acide faible (afin d'éliminer la fraction minérale) et d'extraire du milieu résultant les protéines par centrifugation. Cela a permis la mise en évidence de deux types de protéines : les **protéines dites solubles** et les **protéines dites insolubles.**

La fraction protéique soluble est riche en acides aminés acides hydrophiles, en particulier l'acide aspartique, alors que la fraction insoluble est riche en acides aminés hydrophobes tels que la glycine et l'alanine (Lowenstam *et al.*, 1989 ; Grégoire *et al.*, 1972).

Les protéines solubles sont présentes au sein du minéral de manière **intracristalline** alors que les protéines insolubles sont situées autour de la phase cristalline tapissant les feuillets de chitine, elles sont qualifiées d'**intercristallines.**

De ces observations, un modèle s'est dégagé (Lowenstam *et al.*, 1989) proposant que les protéines insolubles agiraient comme un gabarit alors que les protéines acides seraient d'avantage impliquées dans la nucléation de cristaux. Ces dernières seraient impliquées dans l'inhibition de la minéralisation, la biominéralisaton étant subtilement gouvernée par un équilibre entre inhibition et nucléation des phases minérales.

Environ 40 à 50 protéines ont été identifiées au sein des coquilles des mollusques largement étudiées par Marin *et al.*, et dont certaines seront détaillées dans le Paragraphe VI.4. dédié au contrôle biologique dans le genre Haliotis.

III.4.c. Les enzymes de la biominéralisation

- Anhydrase carbonique :

Les anhydrases carboniques, classées par types, sont considérées comme les enzymes clés pour le contrôle biologique de la coquille des mollusques car elles catalysent l'hydratation réversible du dioxyde de carbone permettant la formation des ions bicarbonates et des protons selon l'équation :

$$CO_2 + H_2O \Leftrightarrow HCO_3^- + H^+$$

Il s'agit de métallo-enzymes dont le site actif est constitué de trois histidines liant trois atomes de **Zinc (*Figure* 20).** Ces enzymes sont ubiquitaires, présentes dans tous les types cellulaires et présentes dans tous les règnes du Vivant mais leurs rôles sont multiples. Elles interviennent notamment dans la respiration lors du transport du dioxyde de carbone dans le sang sous forme de bicarbonate (Meldrum et Roughton, 1933), dans l'équilibre acide-base, le contrôle de la ventilation, le transport d'ions, la photosynthèse, la chemoréception et la néoglucogénèse (Henry, 1996).

-.

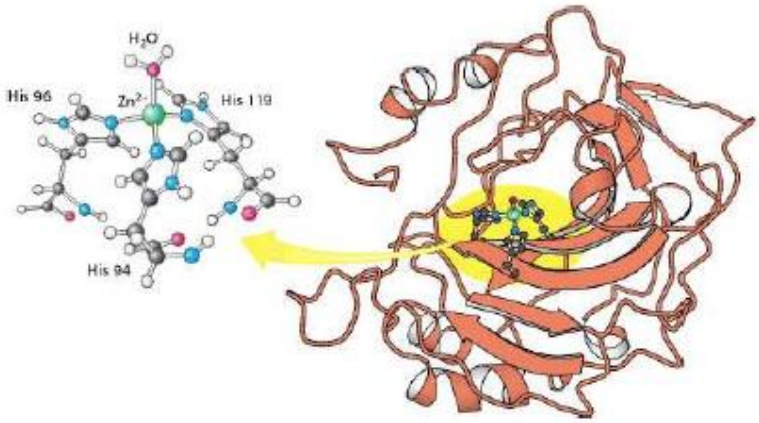


Figure 20 : *Structure tridimensionnelle de l'anhydrase carbonique humaine de type II : Le site actif se compose de trois histidines liant un atome de zinc, indispensable à l'activité de l'enzyme – D'après Berg et al., 2002*

En 1948, Freeman et Wilbur propose un autre rôle pour ces enzymes. Elles seraient impliquées dans la formation des ions bicarbonate pour la précipitation du carbonate de calcium. Le rôle direct de l'anhydrase carbonique a été démontré en 1956 chez l'huitre *Crassostrea gigas* (Wilbur & Jodrey 1956) puis confirmée dans l'escargot d'eau douce par Freeman en 1960 par des expérience d'inhibition notamment. Des expériences ultérieures chez des larves de mollusques et des individus adultes ont permis de mettre en relation l'activité de l'anhydrase carbonique avec les étapes de formation de la coquille larvaire des mollusques (Medakovic, 2000 et Gaume *et al.*, 2011)

La découverte chez les mollusques de la nacréine semble confirmer le rôle de l'anhydrase carbonique dans la biominéralisation (Miyamoto *et al.*, 1996). La nacréine est une protéine matricielle de la nacre possédant deux domaines anhydrases carboniques séparés par un long domaine de répétitions glycine asparagine pouvant lier le calcium **(*Figure* 21).** Le modèle proposé par Miyamoto suppose que la nacréine accélèrerait la formation des ions bicarbonates, puis en liant le calcium par son domaine intermédiaire acide permettrait de favoriser la formation de carbonate de calcium.

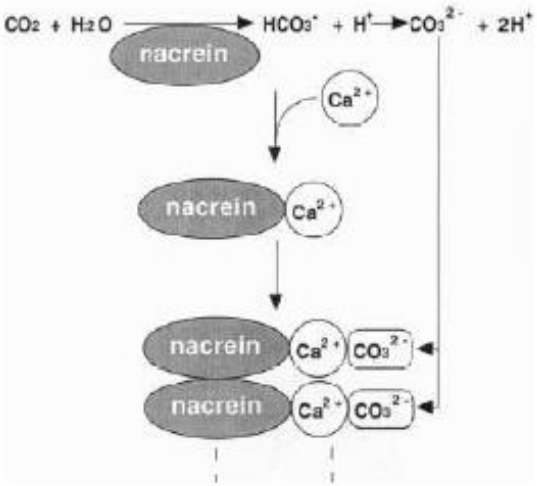


Figure 21 : *Schéma proposant un rôle pour la nacréine dans la formation des cristaux de carbonate de calcium – D'après Miyamoto et al., 1996*

- **Phosphatase alcaline**

Comme les anhydrases carboniques, la phosphatase alcaline est également une enzyme ubiquitaire. Cependant son implication directe dans la formation de la coquille des mollusques est beaucoup plus soumise à controverse. La phosphatase alcaline fait partie de la famille des glycoprotéines de surface cellulaire qui catalyse l'hydrolyse des phosphomonoesters de façon non spécifique en relarguant un phosphate inorganique, à pH alcalin.

On la retrouve chez les mammifères où elle permettrait d'augmenter localement la concentration en phosphore inorganique pour favoriser la précipitation du phosphate de calcium (Herbert *et al.*, 1997).

Chez les mollusques, une activité de la phosphatase alcaline a été détectée dans la zone du manteau chez plusieurs espèces de bivalves et gastéropodes (Bevelander et Benzer, 1948 ; Timmermans, 1969 ; Blasco *et al.*, 1993 ; Duvail et Fouchereau-Peron, 2001 ; Marxen *et al.*, 2003) ainsi que dans la nacre de *Pinctada maxima* (Le Faou, 1996). Chez l'ormeau *Haliotis tuberculata*, une augmentation de l'activité de l'enzyme a été corrélée aux phases de forte croissance coquillère (Duvail et Fouhereau-Peron, 2001). Chez la palourde, elle a été détectée dans la glande digestive, la branchie, le pied, le siphon et le manteau. L'activité est variable selon la saison. En effet, elle est plus importante en été qu'en hiver et décroit avec la taille de l'animal reflétant probablement une diminution du dépôt coquiller avec l'âge de l'organisme (Blasco *et al.*, 1993).

La coquille des mollusques étant minéralisée sous forme de carbonate de calcium et non de phosphate de calcium comme chez les vertébrés, la fonction de cette enzyme chez les mollusques n'est pas encore comprise. Différents rôles ont été proposés :

- Déplacement ou co-transport des ions H^+ lors de la précipitation du minéral (Simkiss, 1976)
- Transport du calcium (Manigault, 1939 ; Russel *et al.*, 1972)
- Sécrétion du calcium au niveau de l'espace extra-palléal (Timmermans, 1969)

- Bicarbonate-ATPase (Simkiss, 1976 ; Simkiss et Wilbur, 1977)
- Synthèse de matrice (Tsujii, 1976)
- Maturation des protéines matricielles (Marxen *et al.*, 2003b) par une action phosphoprotéine phosphatase (Lau et al, 1985)
- Fournisseur d'énergie par coupure de la liaison phosphate

Nous reviendrons sur cette protéine dans le Chapitre V dont la partie V.II est dédié à l'étude de la présence de phosphore dans la coquille larvaire.

- **Chitine synthase**

Weiss et ses collaborateurs ont cherché à mieux décrire l'interface organominérale en s'intéressant à la formation de la chitine. La chitine serait synthétisée par un complexe transmembranaire, la chitine synthase. Le séquençage complet de l'ADNc d'une chitine synthase présente chez *Atrina rigida* leur a permis de révéler la présence d'un domaine de tête de myosine qui pourrait interagir avec les composants du cytosquelette pour réguler la formation des cristaux de carbonate de calcium (Weiss *et al.*, 2006). Les auteurs ont également étudié l'expression d'un gène homologue chez la moule *Mytilus galloprovincialis*. Les résultats ont montré que le gène de la chitine-synthase était exprimé spécifiquement dans le tissu formant la coquille larvaire. L'inhibition de la chitine-synthase lors du développement larvaire de la moule a montré des modifications dramatiques de la structure et donc de la fonctionnalité de la coquille à ce stade notamment au niveau de la jonction entre les deux valves et des bords de croissance (Schönitzer & Weiss, 2007).

III.5. Formation de la coquille larvaire au cours du développement chez les mollusques

Lors du développement post-embryonnaire des mollusques, la coquille se forment en général très tôt (quelques heures après l'éclosion des larves) et a une origine ectodermique

(Marin *et al.*, 2012). Sa formation est variable d'un taxon à l'autre et dépend des modes de développement post-embryonnaire.

On distingue deux modes de développement post-embryonnaire au sein des mollusques. Le premier est le plus répandu et concernent notamment les bivalves, les monoplacophores, les gastéropodes et les scaphopodes. Il caractérisé par une transition entre une larve trochophore ciliée qui se met en place en premier, vers une larve véligère qui subit ensuite une métamorphose permettant l'entrée dans la phase juvénile. La larve véligère est caractérisée par l'acquisition du vélum, une couronne de cils qui lui permet de nager plus facilement. Chez les gastéropodes, cette larve véligère subit un évènement crucial, la torsion qui correspond à une rotation de 180° entre la tête et le pied et qui modifie le positionnement relatif de la coquille, du manteau et de la masse viscérale. La métamorphose, ayant lieu à la fin du stade véligère, marque le passage de la vie pélagique de la larve à la vie benthique du juvénile. Elle est caractérisée par la perte du velum, le développement du pied, la réorganisation de la glande digestive et des organes de reproduction. Le second mode de développement post-embryonnaire est direct c'est-à-dire sans passage par des stades larvaires et sans métamorphose impliquant une ressemblance entre le juvénile et l'adulte qui ne diffèrent que par la taille. Ce mode particulier est très répandu chez les céphalopodes. (Marin *et al.*, 2012)

Chez les bivalves, scaphopodes et gastéropodes, le processus de formation de la coquille débute dès la fin de la gastrulation par la mise en place de cellules épithéliales qui vont définir le champ coquillier qui correspond à la zone où la coquille va commencer à se former (Kniprath *et al.*, 1981). Ces cellules sont ensuite invaginées de façon transitoire laissant seulement les cellules périphériques qui ne sont pas internalisées et qui produisent une pellicule externe, le futur périostracum. Ce dernier aura le rôle de support pour le dépôt des premières phases minérales. Suite à la mise en place de ce pré-périostracum, une extériorisation des cellules du champ coquillier qui s'effectue et qui lui permet de se propager. On constate ensuite un aplanissement de

ces cellules qui se divisent pour donner le manteau (Kniprath *et al.*, 1981). Ceci est accompagné de l'extension du périostracum.

Entre le périostracum et les cellules du champ coquillier, les premières étapes de la minéralisation débutent. Chez les bivalves, elle est marquée par la mise en place de la prodissoconque I formant une fine couche minéralisée granulaire qui donne ensuite la prodissoconque II caractérisée par des lignes de croissance concentriques suite à des modifications du procédé de calcification. Après la métamorphose, la coquille évolue d'avantage et la dissoconque s'ajoute à la prodissoconque II. Chez les gastéropodes on observe des étapes similaires mais on parle de protoconque I et II et de téloconque après la métamorphose. (Kniprath *et al.*, 1981)

La minéralogie et la microstructure de la coquille larvaire ont été étudiée dans un certain nombre d'organismes modèles : l'escargot d'eau douce *Biomphalaria glabrata* (Hasse *et al.*, 2000 et Marxen *et al.*, 2003), la moule *Mytilus edulis* (Medakovic *et al.*, 2000), l'huitre *Ostrea edulis* (Medakovic *et al.*, 1997 et Weiss *et al.*, 2002) la palourde américaine *Mercenaria mercenaria* (Weiss *et al.*, 2002), l'huitre perlière *Pinctada margaritifera* (Mao *et al.*, 2001) et l'ormeau Européen *Haliotis tuberculata* (Auzoux-Bordenave *et al.*, 2010). Certaines études ont mis en évidence la présence de carbonate de calcium amorphe ACC qui serait la première phase minérale mis en place dans la coquille des mollusques en particulier dans la protoconque I et la prodissoconque I (Hasse *et al.*, 2000 ; Weiss *et al.*, 2002 ; Auzoux-Bordenave *et al.*, 2010). Ces travaux ont montré que l'aspect granulaire de la première couche déposée était dû à la présence de carbonate de calcium amorphe, et qu'apparaissait ensuite le dépôt d'une deuxième couche prismatique au contact de la couche granulaire.

Les étapes spécifiques de la mise en place de la coquille au cours du développement de *Haliotis tuberculata* seront illustrées et décrites dans l'introduction du Chapitre V.

IV. Consensus au sein des mécanismes de biominéralisation : la présence d'un précurseur amorphe

Les précédents paragraphes montrent l'étendue des systèmes minéralisés au sein du Vivant qui présentent une grande diversité que ce soit en terme de composition, de structure ou de morphologie. Chaque groupe phylogénétique a ses propres spécificités.

Malgré cette diversité on retrouve certains points communs comme le caractère hybride organique/inorganique de ces matériaux ainsi que le rôle des composants organiques qui servent souvent de guides voir de trames, permettant de délimiter un espace nécessaire à la précipitation de la phase minérale. On peut également noter l'organisation hiérarchique de ces structures minéralisées qui permettent souvent le perfectionnement des propriétés mécaniques.

Une autre similarité semble se dessiner. Lors de la formation des tissus minéralisés, la mise en place de la phase minérale cristalline semble démarrer par une étape transitoire où le minéral est plus désorganisé laissant penser que la minéralisation s'opère grâce à un précurseur amorphe qui se déposerait en premier et cristalliserait ensuite pour donner la phase minérale finale.

IV.1. Précurseurs amorphes au sein des systèmes minéralisés

Bien qu'il a été longtemps présumé que les organismes construisaient leurs tissus minéralisés directement à partir d'une solution saturée en ions, l'idée de l'existence d'un précurseur amorphe fait de plus en plus consensus. En effet, les études sur les procédés de biominéralisation au sein de nombreux organismes ont permis de mettre en évidence la présence de précurseurs amorphes, laissant penser qu'il s'agirait ainsi d'une stratégie commune à de nombreux phylums.

La première observation d'un précurseur amorphe a été faite en 1967 sur la dent du chiton (mollusque, Polyplacophores), par Towe et Lowenstam. La dent du chiton composée d'oxyde de fer, étant toujours en perpétuelle croissance, les différentes étapes de l'évolution du minéral en formation peuvent être aisément suivies. Les auteurs ont ainsi pu mettre en évidence la présence

d'une première phase faite de ferrihydrite, une phase d'hydroxyde de fer très désorganisée qui est ensuite remplacée par de la magnétite qui est un oxyde de fer cristallin.

Par la suite des études *in vitro* ont permis de voir que pour de nombreux systèmes minéraux mimétiques de phases minérales biologiques, il y avait souvent un passage par un précurseur amorphe qui se transforme ensuite en une phase cristalline. On peut citer par exemple le travail de Brecevic *et al.*, 1972 qui a permis de mettre en évidence la transformation *in vitro* du phosphate de calcium amorphe (ACP) en octacalcium phosphate (OCP) puis en hydroxyapatite (HAP) carbonatée ouvrant la discussion d'une telle transformation dans le tissu osseux. De la même manière, quelques années plus tard, la détection d'une phase amorphe *in vitro* de carbonate de calcium (ACC) a été mise en évidence par Brecevic *et al.*, 1989 et Clarkson *et al.*, 1992.

Depuis la première découverte d'un précurseur amorphe chez le chiton, de nombreux autres cas présentant une phase amorphe transitoire ont été reportés, dont j'ai choisi ici de citer à mon sens les principaux exemples :

- **Bactéries**

Chez certaines bactéries magnétotactiques il a été montré par Mann *et al.*, en 1985 par microscopie électronique à transmission et spectroscopie Mössbauer, la présence d'un oxyde de fer hydraté amorphe, la ferrihydrite qui se transforme en magnétite. Beaucoup plus récemment Faivre *et al.*, ont mis en évidence que la première phase ne serait pas de la ferrihydrite mais un phosphate ferrique amorphe. Cette phase a été mise en évidence par spectroscopie XANES et EXAFS notamment. De plus, en 1972, Hallberg *et al.*, ont mis en évidence par diffraction des rayons X dans des bactéries sulfato-réductrices, des phases cristallines de sulfites de fer et de zinc dont la formation est précédée par le dépôt d'une phase amorphe.

- **Vertébrés**

Chez les vertébrés, la discussion sur la présence d'une phase transitoire amorphe menant à l'hydroxyapatite a été proposée par Walter Brown en 1976 et reprise par Nelson *et al.*, 1986, soutenant l'idée que l'on a un passage par une phase d'OCP. Le principal argument repose sur le fait que les plaquettes d'hydroxyapatite ont une morphologie inattendue compte tenu de la présence à la symétrie hexagonale de sa maille cristalline contrairement à l'OCP forme des cristaux plats.

Plus récemment les travaux de Crane *et al.*, de 2006 montrent par l'étude en spectrométrie Raman d'une zone du crane de souris en formation, que la première phase déposée est similaire à de l'OCP. Cette conclusion se base sur le signal obtenu dans cette région contrairement à une zone mature où seule de l'hydroxyapatite a été détectée. Il semblerait aussi que dans cette zone en formation la présence d'ACP peut être proposée sur la base d'un signal large typique d'une phase amorphe.

Plus tard, Mahamid *et al.* ont montré que la majeure partie du minéral en formation de la nageoire caudale du poisson zèbre, est constituée d'ACP sous forme de particules sphériques qui s'agrègent pour former des plaquettes (Mahamid *et al.*, 2008, 2010, 2011). Ces conclusions reposent sur des analyses en DRX couplées à du WAXS/SAXS et de la cryo-microscopie à haute résolution.

La présence d'une couche amorphe d'ACP entourant les plaquettes d'apatite dans l'os (Wang *et al.*, 2013) a été démontrée par Résonnance Magnétique Nucléaire à l'état solide. Cette observation semble aller dans le sens de la présence d'un précurseur amorphe dans l'os également.

Ainsi au vu de ces premiers exemples, il semblerait que la présence de précurseurs amorphes touche de nombreux systèmes minéraux différents. L'exemple de précurseur amorphe qui semble le plus étendu dans le Vivant est le carbonate de calcium amorphe (ACC) qui a été observé dans

de nombreux organismes et nous intéresse particulièrement dans le cadre de cette thèse. Ainsi le prochain paragraphe regroupe les différents systèmes où a été identifié de l'ACC, de manière transitoire ou non.

IV.2. Le carbonate de Calcium Amorphe (ACC)

Le **Tableau 2** regroupe l'ensemble des taxons où de l'ACC a été détecté.

Systèmes	Phylum	Références
Dent du chiton	Mollusques	Towe and Lowenstam,., 1967
Stromatolithes	Bactéries	Golubic *et al.*, 1981 ; Lowenstam, 1986
Feuilles de plantes	Végétaux	Setoguchi *et al.*, 1989 Levi-Kalisman *et al.*, 2002
Larve d'oursin	Echinodermes	E. Beniash *et al.*, 1997
Larve de gastéropode	Mollusques	Hasse *et al.*, 2000 Marxen *et al.*, 2003 Weiss *et al.*, 2002
Oursin adulte	Echinodermes	Politi *et al.*, 2004 Albéric *et al.*, 2018
Crustacés	Arthropodes	Dillaman *et al.*, 2005
Coquille adulte bivalves	Mollusques	Rousseau *et al.*, 2005
Annélides	Annélides	Gago-duport *et al.*, 2008 Lee *et al.*, 2008
Brachiopodes	Brachiopodes	Griesshaber & Schmahl, 2009
Coquille adulte gastropodes	Mollusques	De vol et al, 2015
Coraux	Cnidaires	Von Euw et al., 2017

Tableau 2 : *Récapitulatif dressant la distribution de carbonate de calcium amorphe (ACC) au sein des différents phyla classés par ordre chronologique de découverte*

Nous allons présenter plus en détail quatre systèmes: les échinodermes, les crustacés, les coraux et les mollusques.

- **Echinodermes**

Il est maintenant bien accepté que la minéralisation de l'épine d'oursin commence par le dépôt de phases de carbonate de calcium amorphes (ACC) qui seraient stabilisées par une fraction organique. Ceci a été initialement mis en évidence dans les épines des larves d'oursin qui présentent d'abord une phase d'ACC hydratée à durée de vie courte qui se transforme rapidement en une deuxième phase d'ACC anhydre qui cristallise lentement en calcite. Ceci a d'abord été mis en évidence par Beniash *et al.* en 1997 puis confirmé par Politi *et al.* 2006 et 2008 et Seto *et al.*, 2012). Dans les épines adultes la présence d'une phase stable désordonnées et hydratée de $CaCO_3$ a été mise en évidence par RMN par Albéric *et al.*, 2018.

- **Les crustacés**

Jusqu'à très récemment, il était pensé que la minéralisation se faisait directement sous forme cristalline (Calcite ou Mg-Calcite) mais des recherches récentes ont mis en évidence la présence d'ACC en suivant la minéralisation de la carapace du crabe bleu *Callinectes sapidus*, (Dillaman *et al.*, 2005). Lors des premières heures de calcification l'ACC se transforme ensuite en calcite. Il a été également observé la présence de phosphate de calcium amorphe (ACP) en quantités variables, et plus ou moins présent d'une espèce à l'autre (Dillaman *et al.*, 2005 ; Boßelman *et al.*, 2007).

Cette présence de phases minérales amorphes persistantes dans la cuticule des crustacés pose des questions quant à leurs rôles. Il est proposé qu'elles apportent à la cuticule flexibilité, plasticité permettant une optimisation des propriétés mécaniques (Al-Sawalmih *et al.*, 2009). De plus l'ACC permettrait plus aisément de mobiliser le calcium pouvant être utile lors des phases de décalcifications/recalcification au cours des différents cycles de mues (Luquet, 2011).

- **Coraux**

Les mécanismes de croissance du squelette aragonitique des coraux ne sont pas encore parfaitement bien connus et ont fait l'objet d'un certain nombre de propositions au sein de la communauté durant les dernières années. L'évolution des modèles proposés est due à une meilleure compréhension du contrôle biologique écartant l'hypothèse d'un procédé purement physicochimique. Une étude par Résonnance Magnétique Nucléaire et microscopie électronique réalisée par Von Euw *et al.* 2017 met en évidence que la croissance du squelette se fait en plusieurs étapes qui se répètent de manière cyclique. On aurait d'abord la sécrétion de la matrice organique par les cellules de l'ectoderme. Cette matrice se présentant sous forme de fibres, constituerait des points de nucléation pour le dépôt de nanoparticules d'ACC. Il s'agirait ainsi d'une nucléation hétérogène de la phase solide minérale qui serait contrôlée par des protéines riches en acides aminés acides. Ces protéines ont été observées comme étant fortement liées à l'ACC dont une certaine partie est piégée au sein des particules de minéral. L'ACC serait également riche en magnésium lui permettant d'être plus stable et de prolonger son état amorphe avant de cristalliser en aragonite dont la croissance se fait par agrégation des nanoparticules d'ACC.

Le schéma suivant de la ***Figure* 22** proposé par les auteurs résume ce mécanisme.

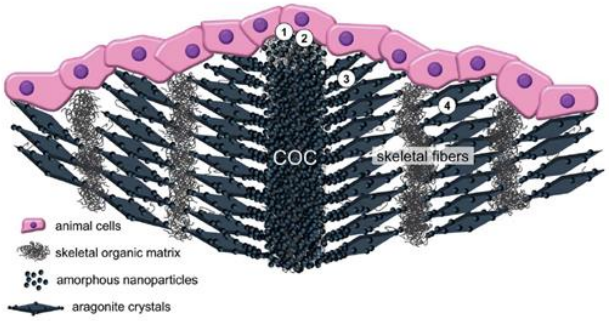


Figure 22 : *Modèle de croissance du corail. On a d'abord sécrétion de la matrice organique puis déposition de nanoparticules de Mg-ACC qui évolue en cristaux d'aragonite permettant la croissance du squelette par attachement des nanoparticules précurseurs. La croissance du squelette se fait ainsi selon un modèle de croissance par couche – D'après Von Euw et al., 2017*

- **Mollusques :**

La première démonstration de la présence d'ACC comme précurseur de l'aragonite de la coquille des mollusques a été rapportée par (Hasse *et al.*, *2*000 et Marxen *et al.*, 2003). Leur étude a été réalisée sur des jeunes larves âgées de quelques heures (72 heures) d'un gastéropode d'eau douce *Biomphalaria glabrata. Ils ont* utilisé la spectrométrie EXAFS pour révéler la présence d'ACC alors que la coquille adulte ne montre que des raies caractéristiques de l'aragonite.

La présence d'un précurseur d'ACC dans la coquille larvaire a été confirmée par Weiss *et al.*, en 2002 lors de son étude sur les bivalves marins *Mercenaria mercenaria* et *Crassostrea gigas* par des techniques de microscopie à lumière polarisée, spectroscopies infrarouge et Raman et microscopie électronique à balayage.

En revanche, il n'y a à ce jour que très peu d'étude qui démontre la présence d'ACC dans la coquille adulte. Nassif *et al* ont montré en 2005 par HR-TEM et RMN à l'état solide du ^{13}C, l'existence d'une couche amorphe à la surface des plaquettes d'aragonite de la nacre de *Haliotis laevigata,* une observation que nous faisons également dans notre modèle d'étude et que sera développée dans le Chapitre III.

Plus récemment l'équipe de Pupa Gilbert (De vol gilbert *et al.*, 2015), en utilisant la technique de spectro-microscopie électronique en photoémission (PEEM), détecte la présence d'ACC au niveau du front de croissance des tablettes de nacre du gastéropode *Haliotis rufescens*.

IV.3. Discussion

La présence d'un précurseur amorphe transitoire semble être de plus en plus observé et ainsi commun à de nombreux systèmes biominéralisés et en particulier dans les systèmes à base de carbonate de calcium marqués par la présence d'ACC se transformant ensuite en calcite ou en aragonite. En revanche, les mécanismes par lesquels ces phases amorphes sont stabilisées, déstabilisées et transformées sont encore largement méconnus.

En effet, au vu des différents exemples détaillés ci-dessus ou cités dans le Tableau 2, on peut en déduire que presque l'ensemble de l'arbre phylogénétique du Vivant pourrait être concerné par la présence d'un précurseur minéral amorphe.

Cette observation s'inscrit dans le débat sur le lien phylogénétique qu'il peut y avoir entre les organismes minéralisés en posant ainsi la question d'une évolution commune entre ces systèmes.

Les échinodermes, les mollusques, les arthropodes, les annélides et les vertébrés représentent à eux seuls une très grande partie de phylogénie laissant envisager la possibilité de l'existence d'un ancêtre commun ayant employé la stratégie d'un précurseur amorphe à la base de tous les animaux à symétrie bilatérale (Weiner *et al.*, 2009). Mais l'observation récente de précurseurs amorphe chez les coraux laisse penser que cette stratégie est apparue encore avant dans l'évolution d'autant plus que les bactéries semblent également utiliser ce type de mécanismes. Seule cette connexion évolutive pourrait expliquer que cette stratégie soit aussi repandue même si cela n'empêche pas qu'il existe des exceptions au sein de certains phylums. L'autre possibilité qui n'a pas encore été réfutée même si elle parait moins probable au sein de la communauté est que cette stratégie commune soit le résultat de différentes convergences évolutives amenant à des apparitions indépendantes de cette même stratégie du précurseur amorphe.

Une dernière précision que soulignent Weiner et son équipe (Weiner *et al.*, 2009) et que nous pourrions apporter à ce paragraphe concerne l'emploi du terme « amorphe ». En effet, ce terme paraît inapproprié car « amorphe » implique que les atomes sont arrangés selon aucun ordre ce qui est très rarement le cas. Or on trouve toujours un niveau d'ordre que ce soit simplement par l'ordre apporté par les atomes d'oxygène liés de manière covalente à l'atome de carbone au sein d'un carbonate par exemple. Ce niveau d'ordre, même s'il peut être de l'ordre de quelques Angström ou plus, existe et empêcherait l'emploi du terme amorphe pour caractériser ce type de matériaux. Ainsi on préfèrera parler de **phase désordonnée** plutôt que phase amorphe.

Les différents systèmes que j'ai présentés montre que dans le domaine de la biominéralisation on oscille systématiquement entre différence, apportant singularité à chacun des systèmes étudiés, mais aussi similarité laissant penser que finalement tous ces systèmes ne sont pas si différents les uns des autres. C'est en gardant cet aspect à l'esprits que nous avons réalisés ces travaux de thèse qui se focalisent sur l'étude de la biominéralisaton chez les mollusques et en particulier de la nacre, un matériau remarquable et qui est présenté dans la prochaine partie.

V. La nacre un matériau fascinant

De toutes les microstructures présentes dans la coquille des mollusques, la nacre est l'une des plus fascinantes que ce soit en termes d'architecture ultrastructurale ou bien de propriétés physiques. C'est une microstructure très conservée au cours de l'évolution qui est présente chez la quasi-totalité des mollusques conchifères (Gastéropodes, Bivalves, Céphalopodes et Monoplacopjores) (Marin *et al.*, 2012)

V.1. Description ultrastructurale

La nacre est une structure de type lamellaire constituées de tablettes d'aragonite ayant une forme pouvant aller du polygone à une forme plutôt arrondie dont l'épaisseur varie de 0,5 à 1 µm et dont le diamètre peut aller jusqu'à plusieurs dizaines de microns.

Les tablettes sont empilées en étant étroitement liées par un fin ciment organique, constitués de chitine et de protéines mesurant quelques dizaines de nanomètres et formant un ensemble de feuillets parallèles d'une incroyable régularité. L'édifice formé est un matériau très dense ne présentant pas ou peu d'interstices.

Plusieurs types d'empilements existent. La ***Figure* 23** présente les deux empilements les plus fréquents.

La microstructure la plus fréquente est celle en dite en **« mur de briques »** exclusivement présente chez les bivalves. L'observation d'une section de cette microstructure révèle que les tablettes sont empilées en quinconce à l'image d'un mur de briques. **(*Figure* 23 A et B).** Au sein de cet arrangement les axes cristallographiques *a, b et c* sont co-orientés d'une tablette à l'autre, avec l'axe *c* perpendiculaire à la surface des tablettes et l'axe b parallèle à l'axe de croissance latéral (Checa *et al.*, 2006).

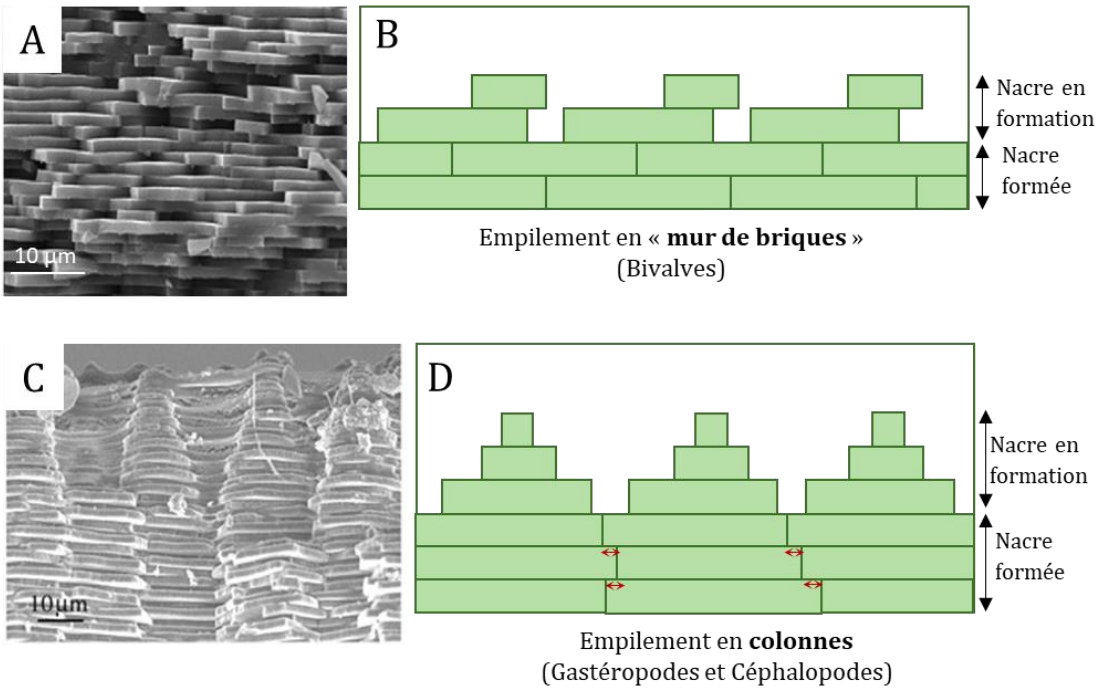


Figure 23 : *Différents types d'empilement de la nacre rencontrés chez les mollusques avec A) Cliché MEB (Marin et al, 2008) d'une fracture au sein de la nacre en « mur de briques » du bivalve Unio Pictorum avec B) la représentation schématique de l'organisation en « mur de brique » ; C) Cliché MEB (Checa et al., 2006) d'une fracture au sein de la nacre en « colonne » du gastéropode Calliostoma zyziphynus avec D) la représentation schématique de l'organisation en colonne*

La deuxième configuration la plus courante est dite **« en colonne »** et est retrouvée chez les gastéropodes **(*Figure* 23C et D)** mais aussi chez le céphalopode *Nautilus*. Dans ce cas, les tablettes croissent les unes sur les autres en formant des empilements en colonnes (Lin *et al.*, 2005). Au sein d'une colonne, les tablettes ne sont pas parfaitement alignées, on observe un léger décalage latéral (irrégulier) induit une interpénétration des colonnes et ainsi une association plus étroites entre les colonnes voisines (flèches rouges sur la ***Figure* 23D**). Les tablettes d'une même colonne sont co-orientées, avec leur axe *c* dans la même direction que l'axe de croissance de la colonne. En revanche, d'une colonne à l'autre, les axes *a* et *b* ne sont pas co-orientés. (Marin *et al.*, 2012)

La nacre est un matériau constitué de trois éléments principaux, la phase minérale de nature aragonitique, la chitine et des protéines (de différentes natures). Cette fraction organique

ne constitue que 5% du matériau global que ce soit en masse ou en volume (Jackson *et al.*, 1988) mais joue un rôle primordial dans la mise en place et les propriétés de la nacre.

V.2. Interfaces organo-minérales

La nacre, quelle que soit le type de microstructures, en colonnes ou en mur de briques est une structure complexe par son architecture globale, mais cette complexité est aussi visible à une échelle plus locale de par l'organisation de la fraction organique et l'interaction entre les deux phases (organique et minérale).

La fraction organique peut être divisée en deux catégories : la **matrice intercristalline** qui correspond aux composants organiques insolubles en milieu acide et qui reste autour des tablettes et la **matrice intracristalline** qui correspond à des composants organiques solubles en milieu acide et qui est présente au sein même du minéral.

V.2.a. Matrice organique intercristalline

La matrice inter-cristalline est constituée de deux types de feuillets : la **matrice interlamellaire** séparant les faces longitudinales des tablettes (flèches bleues ***Figure* 24B**) et la **matrice intertabulaire** (flèches rouge ***Figure* 24A et B**) séparant les faces latérales des tablettes.

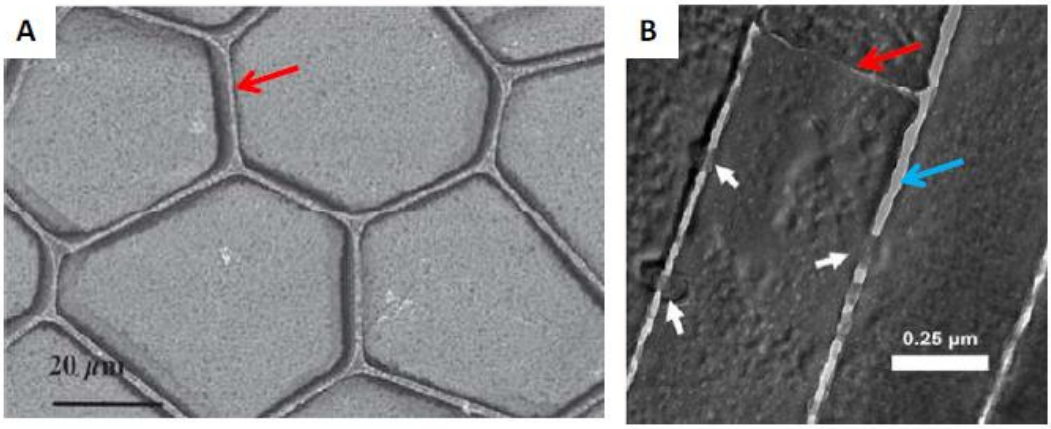


Figure 24 : *Organisation de la matrice organique dans la couche prismatique d'un bivalve et la nacre d'un gastéropode. A) Cliché MEB d'une section transversale de la couche prismatique calcitique de la coquille de Pinna nobilis (Marin et al., 2005) et B) Image MET d'une section longitudinale de la couche nacrée de la coquille de l 'ormeau Haliotis rubescens (Lin et al., 2008). La matrice intercristalline intertabulaire est indiquée par des flèches rouges et la matrice intercristalline interlamellaire par une flèche bleue. Les flèches blanches pointent les ponts minéraux entre les plaquettes superposées.*

La **matrice interlamellaire** est constituée d'un feuillet hétérogène de 20 à 50 nm déposé de manière parallèle à la surface des tablettes et perpendiculaire à l'axe *c* de la phase minérale. Il a été montré que le feuillet était constitué d'une couche dense aux électrons de chitine prise en sandwich entre deux couches moins denses au électrons faites de matériel protéiques (Nakahara *et al.*, 1991).

Ces composants protéiques ont été attribués à des protéines riches en acides aminés hydrophobes tels que la sérine, glycine et l'alanine (environ 50%) (Degens *et al.*, 1976). Ces protéines sont semblables aux protéines de type fibroïne de la soie (Nakahara *et al.*, 1982). L'étude par diffraction des rayons X de cette matrice insoluble a montré que cette fraction organique avait tendance à s'organiser en feuillets β et que cette organisation coïnciderait avec les orientations cristallines des axes *a* et *b* de l'aragonite des tablettes (Lucas *et al.* 1960).

Des études *in vitro* ont montré que la chitine β purifiée de l'os de seiche *Loligo* mélangée à de la soie des cocons du ver à soie *Bombyx mori* induisait la formation de la phase aragonitique (Falini *et al.* 1996).

Le feuillet de la matrice interlamellaire présente une certaine porosité (entre 5 et 5 nm, de diamètre et environ 1400-1900 pores en contact avec une tablette) (Schäffer *et al.*, 1997 et Song *et al.*, 2003). Cette porosité permettrait l'établissement de ponts minéraux entre les tablettes superposées (flèches blanches sur la ***Figure* 24B**) d'après la théorie proposée par Schäffer et al en 1997. La présence de ces ponts permettrait la continuité cristalline d'une tablette à l'autre.

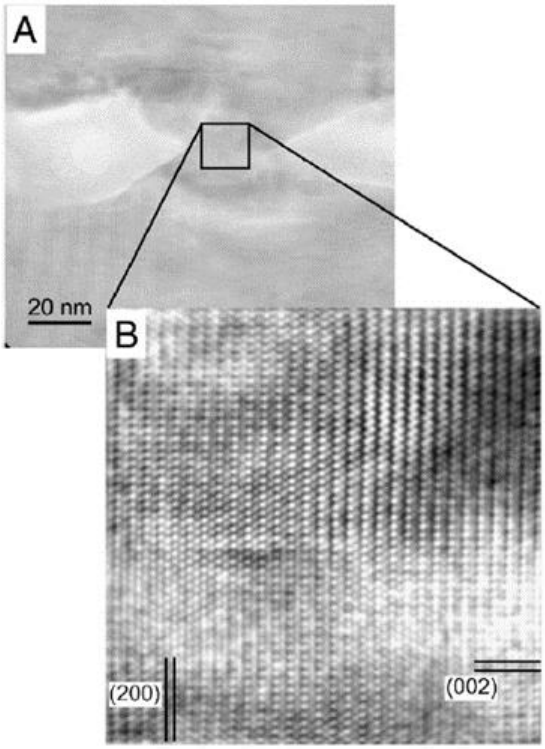


Figure 25 *: Observation d'une section transversale de 50nm réalisée au sein de la nacre obtenue par ultramicrotomie et dont la surface a été lissée par un flux d'ion Galium focalisé (FIB) Clichés de MET d'un pont minéral A) à faible grandissement et B) à plus fort grandissement du pont minéral montrant sa cristallinité dont la distance entre les plans permet de vérifier la nature aragonitique du pont minéral. La nature cristalline de ces ponts permettrait de conserver la continuité cristalline entre les plaquettes – D'après Gries et al., 2009*

La **matrice intertabulaire** correspond à la matrice que l'on peut trouver entre deux tablettes côte à côte séparant latéralement les tablettes d'une même ligne (Nakahara *et al.*, 1991) (flèches rouges sur la ***Figure* 24A et B**).

V.2.b. Matrice organique intra-cristalline

Il est difficile d'étudier les protéines inter-cristallines du fait de l'étroit assemblage qu'est la nacre. Ainsi, jusqu'à présent aucune protéine n'a pu être purifiée à partir de tablettes de nacre, après avoir retiré la matrice inter-cristalline, permettant d'étudier spécifiquement la nature de la fraction intra-cristallines. (Heineman et al, 2011).

Les études qui ont permis d'appréhender au mieux cette fraction protéique sont généralement des études d'histochimie.

Les composants organiques intracristallins de la nacre mature ont été en premier lieu révélés par Crenshaw et Riestedt en 1975 par des techniques d'histochimie. Ils ont notamment mis en évidence qu'au cœur d'une tablette se trouvaient des polysaccharides sulfatés qu'ils ont proposés comme étant impliqués dans la nucléation minérale. En 1979, après dissolution de la phase minérale, Mutvei a été observé par microscopie électronique une organisation complexe de ces molécules intra-cristallines sous forme de stries de croissance concentriques notamment.

Plus récemment, les observations histologiques sur le nautile et sur le bivalve *Atrina rigida* suggèrent l'existence d'une zone de nucléation centrale (Addadi, *et al.*, 2006). En effet, l'observation d'une organisation concentrique des composants organiques laisse penser que la dynamique de formation est initiée au centre des tablettes. Chez le nautile *Nautilus sp*, quatre zones concentriques ont été identifiées : une zone centrale riche en carboxylates qui seraient impliqués dans la nucléation de l'aragonite, un fin anneau riche en sulfate, puis de nouveau un domaine large riche en carboxylate et enfin une matrice riche en sulfate et en carboxylate qui entoure la tablette. Chez *Atrina rigida*, cette organisation concentrique est nettement moins marquée. Elle présente seulement une zone centrale qui serait, selon les auteurs, la zone de nucléation riche en protéines impliquées dans la nucléation grâce à leurs groupements carboxylates, puis une zone intermédiaire où les protéines seraient moins concentrées et enfin la matrice organique extérieure entourant la tablette.

Le travail de Marthe Rousseau apporte de nouvelles données quant à l'organisation de la matière organique au sein des tablettes. En effet, l'étude par AFM (Atomic Force Microscopy) de la perle de l'huître *Pinctada maxima* montre que la matrice organique est constituée d'un réseau poreux qui divise la phase minérale en nanograins agrégés d'une taille d'environ 45 nm (Figure 26 Rousseau *et al.*, 2005).

La même année, Oaki et Imai, observent la perle de nacre en microcopie électronique (Field-emission scanning electron microscopy, FESEM et Field-emission transmission electron microscopy FETEM), et arrivent à la même conclusion, chaque tablette serait constituée de sous éléments sous forme de nano-tablettes de 30 à 180 nm de long et d'épaisseur inférieure à 100nm qui s'auto-assemble et s'auto-orientent.

D'après ces observations, Rousseau *et al.*, propose l'idée que les nanograins sont en réalité des nano-tablettes (**Figure 26B**) qui seraient encapsulées dans un réseau continu d'une phase organique intra cristalline à l'apparence d'une mousse (**Figure 26A**) et qui serait, avant la mise en place de la phase minérale, une sorte d'émulsion.

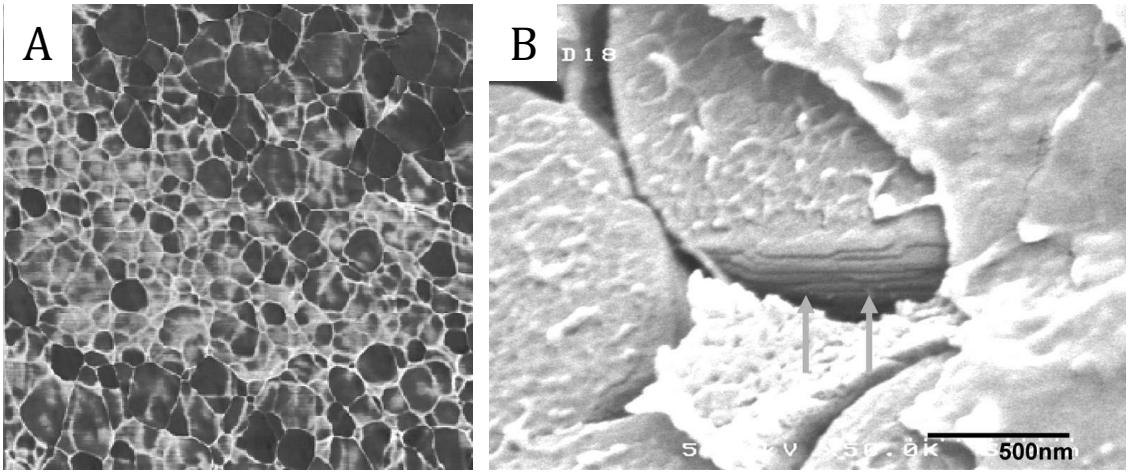


***Figure** 26 : A : Cliché obtenu par AFM en contraste de phase de la surface polie de la nacre montrant l'aspect d'une mousse de la matrice intracristalline ; B : Cliché en MEB d'une tablette en croissance montrant une structure laminaire – D'après Rousseau et al., 2005*

V.2.c. Mésocristallinté ou organisation structurale du minéral au sein des tablettes de nacre

L'aragonite des tablettes de la nacre a des caractéristiques cristallines particulières. En effet, elle se comporte comme un monocristal lorsqu'elle est étudiées par diffraction des rayons-X alors que les tablettes sont constituées d'un ensemble d'entités cristallines assemblées. Elles formeraient donc un matériau polycristallin. Mais comme la phase minérale contient des éléments

organiques en son sein, on parle de mésocristallinité, concept introduit par Mann en 1988 et appuyé par Cölfen et Antionetti en 2005 (Wang *et al.*, 2005). Les mésocristaux sont définis comme étant un ensemble de cristaux colloïdaux qui se forment à partir de nanocristaux alignés avec une cohérence cristallographique.

La surface granulaire et rugueuse des tablettes montrant des sous unités comme il a été dit précédemment résulterait d'un tel mécanisme (Rousseau *et al.*, 2005).

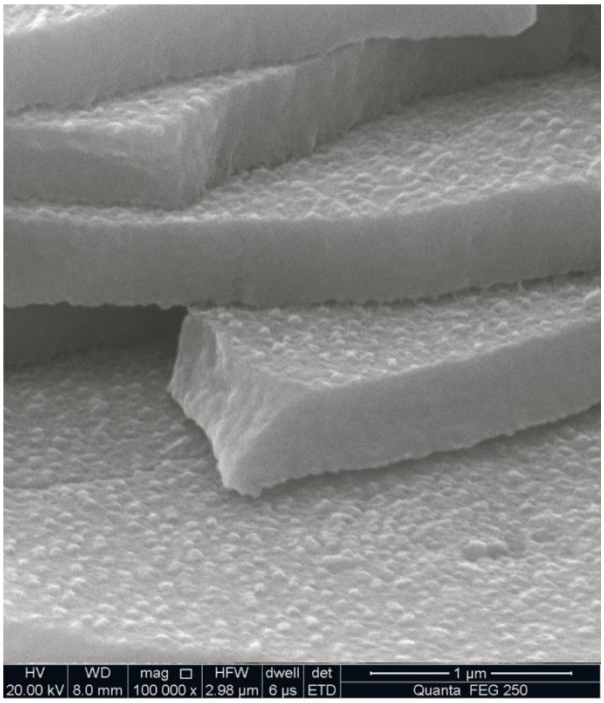


Figure 27 : *Cliché en MEB montrant la surface des tablettes d'aragonite de la nacre après fracture révélant les aspérités à la surface des tablettes d'aragonite – D'après Sun et al. 2016*

La présence d'aspérités à la surface des tablettes **(*Figure* 27)** ayant une taille d'environ 30-100nm de diamètre, 10 nm de hauteur et espacées les unes des autres de 60-120nm, va dans le sens d'une mésocristallinité au sein de la nacre (Wang *et al.*, 2001).

Cet aspect est également illustré par les observations en MET de Kröger *et al.*, 2009 de tablettes de nacre qui montrent la présence de nanoaspérités (qu'il a appelées « voids ») d'un diamètre allant de 30 à 100 nm et de 10 nm de hauteur environ (***Figure* 28**). Des mesures en

analyse dispersive en énergie (EDX) et en Spectroscopie des pertes d'énergie (EELS) ont permis de conclure que ces aspérités étaient particulièrement riches en carbone en comparaison avec le reste de la tablette, laissant penser qu'il s'agit de composants organiques telles que des protéines piégées au sein du minéral. Ces nanoaspérités ont été modélisées et présenteraient une forme très facettée (***Figure* 28B**)

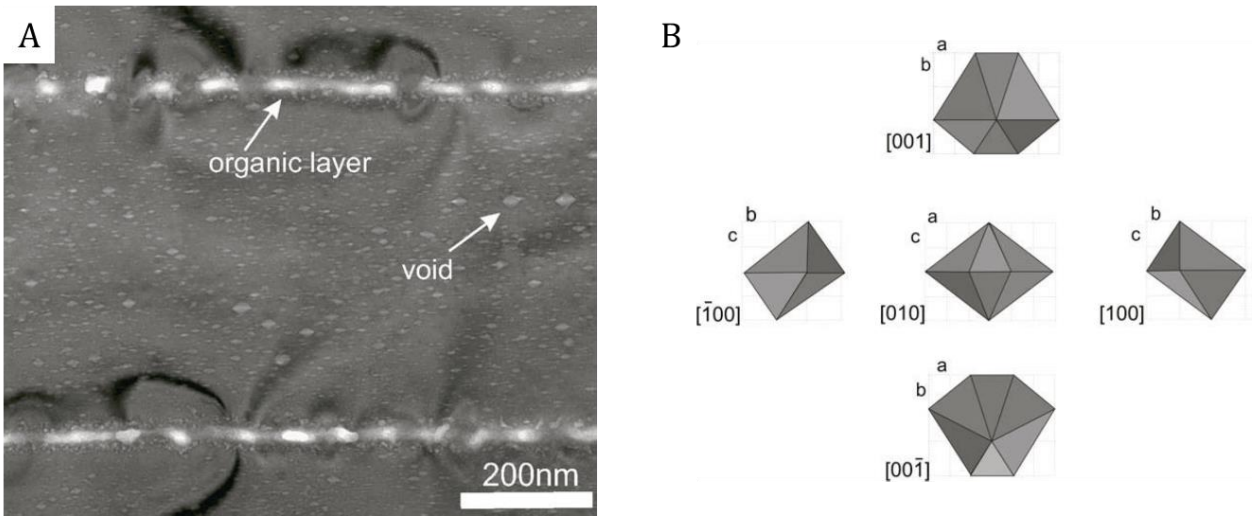


Figure 28 : *A) Cliché MET d'une section fine réalisée au sein d'une tablette de nacre permettant de mettre en évidence des nanoaspérités facettées et B) leur Modélisation– D'après Heineman et al., 2011 modifié à partir des travaux de Kröger et son équipe (Gries et al., 2009)*

Notons que la forme de ces aspérités rappelle les synthèses effectuées *in vitro* de calcite avec des copolymères à bloc hydrophiles (Page *et al.*, 2008) et (Krins *et al.*, 2011). Dans le premier exemple, la calcination des cristaux a mené à la formation de pores facettés de forme rhomboédrique qui confirmerait l'inclusion de molécules organiques au sein du cristal ionique pour la première fois. Dans le second exemple, des tests mécaniques sur des cristaux (non calcinés) ont montré le bénéfice de ces inclusions sur les propriétés mécaniques du cristal.

V.3. Modèle d'organisation de la nacre

V.3.a. Différentes observations

Certains aspects des mécanismes à l'origine de la formation de la nacre demeurent incompris malgré les hypothèses proposées. Néanmoins un certain nombre d'observations ont été faites au cours des dernières dizaines d'années.

- **Un gabarit organique nécessaire pour l'arrangement 3D des tablettes**

Tout d'abord, la microstructure lamellaire de la nacre en feuillets superposés de manière régulière suggère que les processus moléculaires à l'origine de sa formation sont une somme de séquences répétitives (Marin *et al.*, 2012). De plus, il est clairement établi par la communauté scientifique que le réseau organique dont les composants sont sécrétés par l'épithélium extérne du manteau se met en place avant la cristallisation des tablettes d'aragonite. (Checa *et al.*, 2006) (***Figure* 29**)

Des observations réalisées chez les gastéropodes *Haliotis tuberculata* et *Haliotis laevigata* par Heinemann *et al.*, 2011, au niveau de l'interface organo-minérale où les colonnes de la nacre en formation se mettent en place, permettent de se rendre compte de l'importance du rôle de la matrice organique dans ce processus. Les échantillons ont été fixé chimiquement au glutaraldéhyde (2,5%) afin de conserver les protéines de la fraction organique et les clichés de microscopie électronique à balayage montrent que les plaquettes adjacentes en formation sont séparées par les feuillets organiques parallèles et relient les colonnes entre elles (flèches noires ***Figure* 29).** On distingue au-dessus des colonnes un certain nombre de feuillets déposés par l'animal et ceux-ci sont ensuite progressivement remplis par les précurseurs de l'aragonite qui traversent les feuillets par des pores de diamètre d'environ 50 à 200 nm pour former des ponts minéraux entre les tablettes superposées (Lin *et al.*, 2005 et Bezares *et al.*, 2008).

Figure 29 : *Cliché de MEB du front de croissance de la nacre après traitement au glutaraldéhyde et point critique du CO_2 en vue de préserver les feuillets organiques parallèles marqués par les flèches noires – D'après Heinemann et al., 2011*

Ces feuillets organiques constituent une sorte de gabarit pour la mise en place de la phase minérale et notamment pour la nucléation de l'aragonite. Le mécanisme de croissance de la tablette a été depuis très longtemps proposé comme étant une croissance par **hétéroépitaxie** où la croissance minérale se fait ion par ion après l'étape de nucléation sur la matrice organique (Weiner *et al.*, 1984). Cependant l'implication de ce gabarit organique a été controversé par la théorie des **ponts minéraux** de Schäffer *et al.*, 1997 qui indiquerait que la nucléation aurait lieu au niveau de ces points de contacts minéraux, on parle d'**homoépitaxie**.

Nous pouvons remarquer que ces deux modèles ne sont pas forcément en contradiction. En effet, on pourrait penser que la première étape est régie par un mécanisme d'hétéroépitaxie puis la croissance en épaisseur se ferait par homoépitaxie.

Ces différentes théories seront d'avantage décrites dans l'introduction du Chapitre IV dédié à l'étude des interfaces organo-minérales de la nacre.

- **Un site de nucléation central au cœur des tablettes**

Il semble y avoir un consensus général sur le fait que les tablettes de la nacre croissent à partir de leur centre. Les observations histochimiques, détaillées précédemment, de l'organisation de la matière organique intracristallines réalisée par Crenshaw and Ristedt (1976) et confirmées par Nudelman en 2006 semblent faire écho à l'observation par Heinemann *et al.*, 2011 sur la face longitudinale des tablettes du gastéropode *Haliotis laevigata*, d'un point central (flèches noires sur la ***Figure* 30)** sur chaque tablette. Cette observation suggère que la croissance débute à ce point central et qu'il s'agit d'un résidu associé au point de nucléation des tablettes.

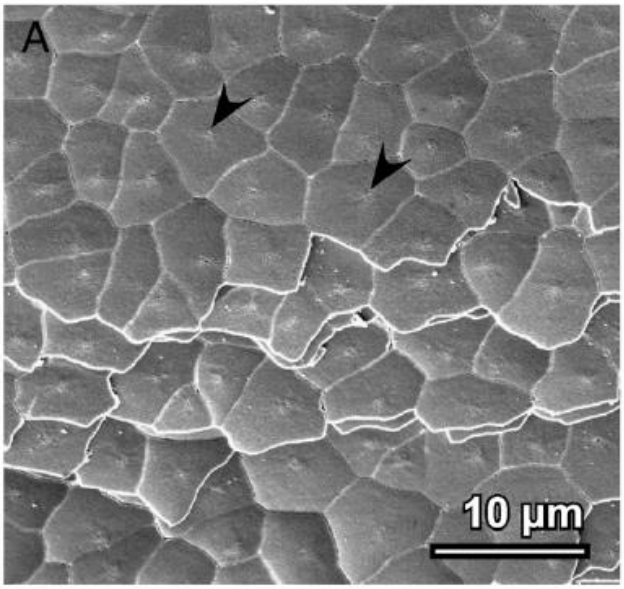


Figure 30 : *Clichés en MEB de la face longitudinale de la nacre de Haliotis laevigata. les tablettes matures présentant un diamètre allant de 5 à 10 µm présentent en leur centre une structure visible (flèches noires). Ces structures seraient possiblement la zone de contact avec la prochaine tablette au-dessus – D'après Heineman et al., 2011*

Les observations de ce point central au MEB semblent cohérentes avec des observation réalisées par AFM **(*Figure* 31)** de la nacre déminéralisée chez *Haliotis laevigata* qui révèle, en plus de la structure en nid d'abeille formée par la matrice organique intercristalline entourant les tablettes polygonales (Schäffer *et al.*, 1997 et Bezares *et al.*, 2008), la présence au centre des

tablettes d'un pore qui suggère la présence d'un canal qui connecterait les tablettes empilées verticalement en plus de tous les autres petits ponts minéraux (Heinemann *et al.*, 2011).

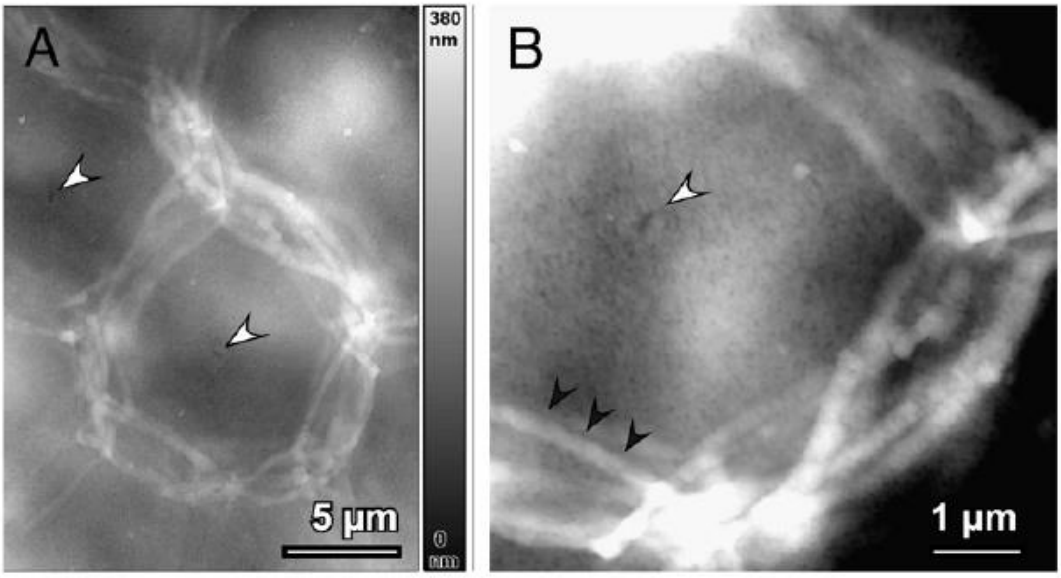


Figure 31 : *Images AFM du feuillet organique latéral de la nacre de la coquille de Haliotis laevigata. A) Surface d'une plaquette déminéralisée permettant de voir la matrice inter-lamellaire qui entoure latéralement les plaquettes avec la mise en évidence d'un pore central (flèche blanche) ; B) Cliché à plus fort grandissement de la région centrale- D'après Heineman et al., 2011*

- **Un espace entre les tablettes rempli d'un gel protéique**

Les observations en cryo-MET de coupes de la nacre du bivalve *Atrina* par Levi-Kalisman en 2001 apportent un nouvel aspect pour la compréhension de la structure de la nacre. En effet cette technique qui permet de conserver l'état d'hydratation de l'échantillon par la congélation a permis de mettre en évidence la sécrétion des protéines de soies dans un gel désorganisé dans lequel la phase minérale croit. Ce gel contient également des protéines acides décrites comme impliquées dans la nucléation du minéral.

- **Une couche amorphe à la surface des tablettes**

L'observation par Nassif *et al.* en 2005 d'une couche régulière (3 à 5 nm d'épaisseur) d'ACC à la surface des tablettes cristalline d'aragonite de la nacre de *Haliotis laevigata* a permis d'affiner la description de l'ultrastructure de la nacre. Cependant son rôle n'a pas encore été compris.

Cette observation nous intéresse tout particulièrement dans le Chapitre III de ce manuscrit et sera décrite plus en détail.

V.3.c. Scénario général de la formation de la nacre

Le schéma présent en ***Figure* 32A et B** permet de situer un certain nombre des différents aspects abordés précédemment sur l'organisation de la coquille et plus spécifiquement des tablettes d'aragonite de la nacre.

En résumé de cette abondante bibliographie, Marin *et al.*, 2012 ont proposé une chronologie de la formation de la nacre selon les étapes suivantes :

1. Assemblage de la matrice organique : les cristallites de chitine s'auto-organisent en feuillets successifs parallèles, perpendiculaires au futur axe *c* des tablettes de minéral. En parallèle, les espaces entre les feuillets sont remplis d'un gel constitués d'un mélange de protéines hydrophobes et de protéines polyanioniques. Ce gel permet de maintenir l'espace entre deux feuillets de chitine sous-jacent et constitue le milieu dans lequel les tablettes vont croître.
2. Formation des premières phases minérales : les premiers éléments minéraux qui interviennent sont des nanoparticules vraisemblablement amorphes. La formation d'un précurseur minéral transitoire amorphe semblant être un principe général en biominéralisation (voir Paragraphe IV). La manière dont les particules amorphes sont acheminées au niveau du site de nucléation est encore peu comprise ; s'agirait-il d'une

simple diffusion à travers le gel ou bien d'un transport *via* des vésicules sécrétées par l'épithélium extérieur du manteau ?

3. Nucléation de chaque tablette : il est présumé que chaque tablette commence à cristalliser et croit à partir d'un point central contenant des composants polyanioniques tels que des carboxylates et des sulfates. Les nano-éléments s'auto-organisent à partir du centre, s'orientent et forme le mésocristal qui compose la future tablette. Leur assemblage piège une part de la matrice organique.
4. Croissance des tablettes : chaque tablette croit d'abord plutôt verticalement jusqu'à atteindre le feuillet de chitine supérieur puis s'étend latéralement. La croissance latérale se produit au dépend du gel qui se retrouve progressivement repoussé avec une incorporation de certaines protéines polyanioniques dans les tablettes en formation. Lorsque deux tablettes voisines se rejoignent la croissance s'arrête par inhibition de contact. Le gel résiduel se retrouve piégé entre les bords des deux tablettes voisines et ses constituants vont polymériser pour former une matrice insoluble, la matrice intertabulaire entre deux tablettes voisines.

Il n'est pas à exclure qu'au niveau de la fine interface (environ 5 nm) entre la tablette et le gel, il est possible de garder une couche amorphe stabilisée par la présence d'impuretés qui s'agrègeraient lors de la croissance. Cette couche correspondrait à la couche amorphe observée à la surface des tablettes.

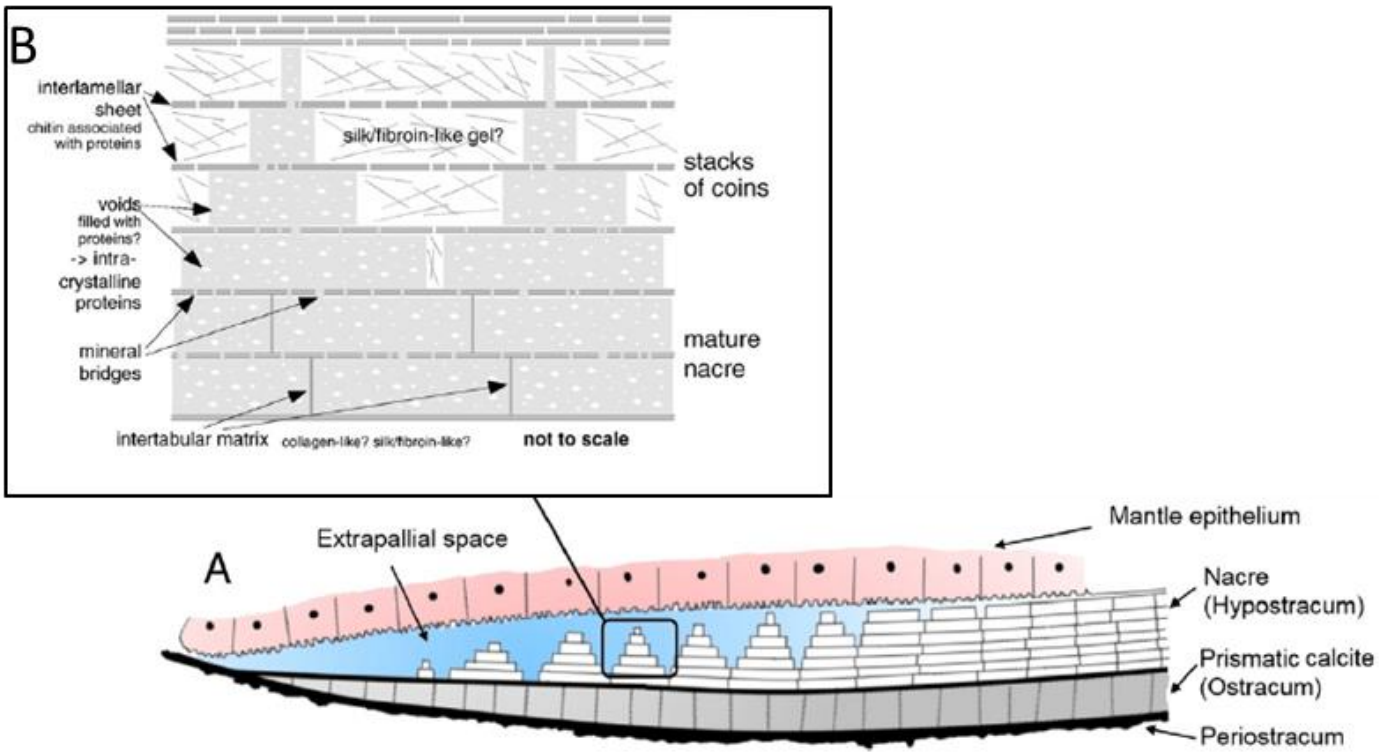


***Figure** 32 A) Représentation schématique de la section longitudinale chez Haliotis . Les cellules de l'épithélium du manteau contrôlent la composition du fluide extrapalléal, les différentes couches se mettent en place par un procédé d'auto-organisation avec d'abord un dépôt du Périostracum, puis de la couche prismatique et enfin de la nacre. B) Représentation schématique d'une colonne de tablettes de nacre en formation : La matrice interlamellaires est sécrétée en premier forant des feuillets parallèles dont l'espace les séparant est rempli par un gel de protéines de soie. Les tablettes d'aragonite croient entre ces feuillets organiques. Les plaquettes contiennent des « voids » qui sont probablement des protéines intracristallines et sont connectées pas des ponts minéraux. Latéralement entre les tablettes, il existe une matrice dite inter tabulaire qui serait constituée principalement de protéines de soie – D'après Heineman et al., 2011*

Modifié d'après Heinemann et al., 2011

V.4. Propriétés physiques, applications en Science des Matériaux et intérêts économiques

Comme nous l'avons vu, la nacre est jusqu'à présent la microstructure la plus solide produite par les mollusques. Les études mécaniques ont montré que sa résistance à la fracture est plus de trois mille fois plus importante que l'aragonite seule qui la compose lorsqu'elle est précipitée dans des conditions géologiques (Taylor *et al.*, 1972 ; Weiner, 1986 ; Sun *et al.*, 2012).

La coquille des mollusques est souvent constituée de plusieurs couches minérales et organiques. Les couches minérales qu'elles soient prismatique, sphérulitique ou nacrée présentent des particularités d'organisation et de composition qui leur sont propres. Il semblerait que la stratégie de superposer des couches minérales de différentes structures soit apparue très tôt dans l'histoire des mollusques et semble être bien conservée dans leur évolution (Marin *et al.*, 2012). La couche prismatique a une résistance à la fracture modérée mais est caractérisée par une certaine flexibilité qui est renforcée par le périostracum purement organique. Comme nous l'avons vu, la couche nacrée est caractérisée par sa rigidité qui présente une très haute résistance à la fracture grâce à son ultrastructure particulière. Mais cette rigidité pourrait entrainer tout de même une tendance à se fêler facilement lorsque la coquille est soumise à des torsions. Ainsi l'association de ces deux couches complémentaires permet à la coquille d'être un matériau biologique alliant dureté et élasticité. De plus la présence de plusieurs couches aux textures et aux densités différentes apporte un autre avantage non négligeable car lors d'une fracture de la coquille, celle-ci ne peut se propager directement dans toute l'épaisseur de la coquille grâce aux interfaces crées par cette superposition de couches.

Ainsi, la nacre est un matériau composite modèle pour le développement de matériaux synthétiques bioinspirés aux propriétés mécaniques performantes (Fritz *et al.*, 1998 ; Feng *et al.*, 2000 ; Deville *et al.*, 2006).

De plus, un autre intérêt de la nacre concerne le développement de biomatériaux en tant qu'implants osseux. En effet elle présenterait un fort potentiel pour la régénération osseuse en étant une source de molécules organiques bioactives (Lopez *et al.*, 1992 et Westbroek *et Marin.*, 1998). Certaines études *in vivo* sur des vertébrés ou bien *in vitro* sur des cellules, ont montré que la nacre ou ses composants extraits auraient des propriétés ostéoinductives et favoriseraient l'ostéogénèse (Atlan *et al.*, 1997 et Almeida *et al.*, 2001).

Enfin, la nacre est caractérisée ses propriétés optiques conséquence de sa microarchitecture la rendant très attractive en joaillerie. Ainsi la perliculture s'est très répandue dans le pacifique en particulier au Japon, Chine, Indonésie, Mexique, Philippines, Australie et en Polynésie.

Afin d'étudier plus en détail les processus de formation coquillère et plus particulièrement de la nacre l'ormeau Européen *Haliotis tuberculata*, un mollusque nacrier qui présente un intérêt économique et écologique a été choisi comme modèle d'étude pour cette thèse.

VI. Modèle d'étude : l'ormeau *Haliotis tuberculata*

VI. 1. Intérêt du modèle

Notre modèle d'étude est un gastéropode marin de la famille des *Haliotidés, Haliotis tuberculata* qui présente un intérêt économique et écologique. Très recherché pour sa chair comestible, l'ormeau fait l'objet en Bretagne d'une important activité de pêche et son aquaculture est en plein essor. De plus, la nacre de ce gastéropode est très utilisée en joaillerie et en marqueterie. C'est donc un excellent modèle de référence pour nos études.

Notre collaboration avec l'écloserie France Haliotis (S. Huchette, Plouguerneau) nous permet d'avoir accès à tous les stades de développement en conditions contrôlées. Ceci nous donne deux avantages majeurs d'abord en ce qui concerne la reproductibilité de nos expériences et aussi car elle nous permet d'étudier la coquille à différents stades de sa formation.

VI.2. Biologie et Ecologie

L'ormeau est un mollusque marin conchifère viscéroconque signifiant qu'il possède une coquille univalve dorsale qui ne protège que les viscères. Il appartient à la classe des gastéropodes caractérisée par des particularités anatomiques qui résultent d'un processus évolutif où l'on observe une torsion de 180° au stade larvaire leur donnant une asymétrie caractéristique.

- **Groupe des haliotidés, lignée très ancienne (60-75 MA)**

D'après les différentes sources disponibles, on distinguerait un peu moins d'une soixantaine d'espèces d'ormeau réparties à travers le monde (Geiger, 1999) vivant dans les eaux tempérées et tropicales, dont 14 espèces commercialisées **(*Figure* 33).**

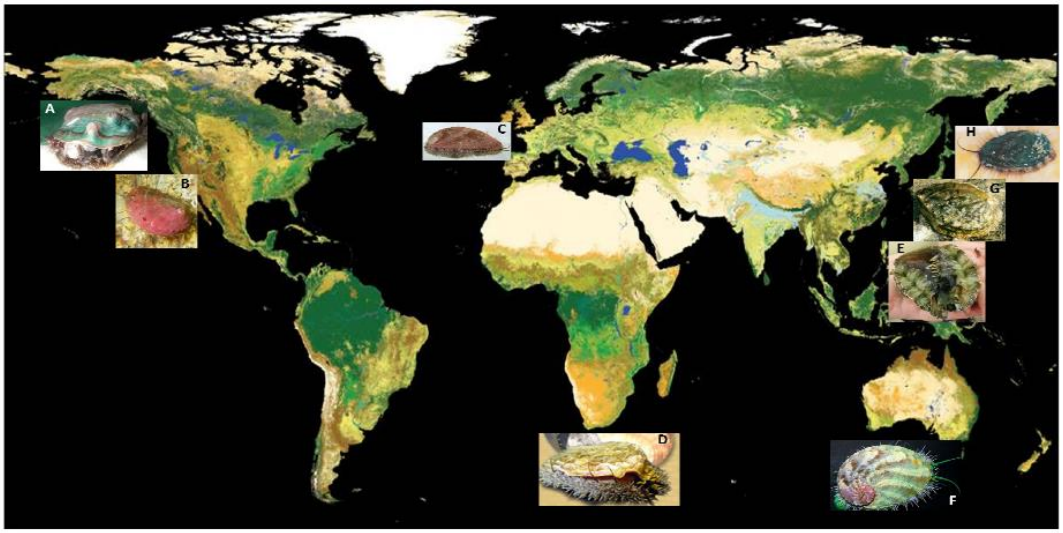


Figure 33 : *Répartition mondiale des huit espèces d'ormeaux les plus exploités dans le monde avec C) Haliotis tuberculata, l'ormeau Européen très abondant sur les côtes Atlantiques Nord-Est – D'après Gaume 2010*

L'unique espèce d'ormeau vivant sur les côtes de l'Atlantique Nord-Est est l'ormeau Européen, *Haliotis tuberculata* décrit par Linnaeus (1758) La répartition de l'espèce s'étend des côtes anglo-normandes au Nord jusqu'aux côtes sénégalaises au Sud et en passant par le bassin Méditerranéen **(*Figure* 34).**

Figure 34 : *Répartition géographique de l'Ormeau Européen Haliotis tuberculata – D'après Geiger, 1999*

Les Haliotidés sont des animaux benthiques vivant sur les rochers présents dans les zones de balancement des marées entre 10 et 40 mètres de profondeur où ils peuvent trouver leur nourriture favorite, l'algue rouge *Palmaria Palmata* donnant à leur coquille une couleur rouge/brune.

- **Anatomie de l'ormeau Européen**

L'anatomie de l'ormeau est étudiée en détails dans les ouvrages de Crofts (1929) et Bevelander (1988). La ***Figure* 35** représente différentes vues externes de l'ormeau européen. Sa coquille est aplatie de forme auriculée et percée de pores respiratoires. Lorsque l'animal est relaxé, les tentacules céphaliques et les yeux dépassent de la partie antérieure de la coquille qui est bordée par l'épipodium, une extension sensorielle du pied (**Figure** 28 A-B). Lorsque l'animal est rétracté et collé à son substrat, la coquille protège entièrement son corps de la prédation. La première spire coquillière se situe sur la partie postérieure de la coquille et c'est à partir de cette zone que se forment les pores respiratoires distribués sur le bord gauche. Ils sont au nombre de 5 à 6 et s'ouvrent et se referment au fur et à mesure de la croissance coquillère. Ils permettent les flux d'eau à travers la cavité palléale pour la respiration, l'émission des gamètes et l'excrétion.

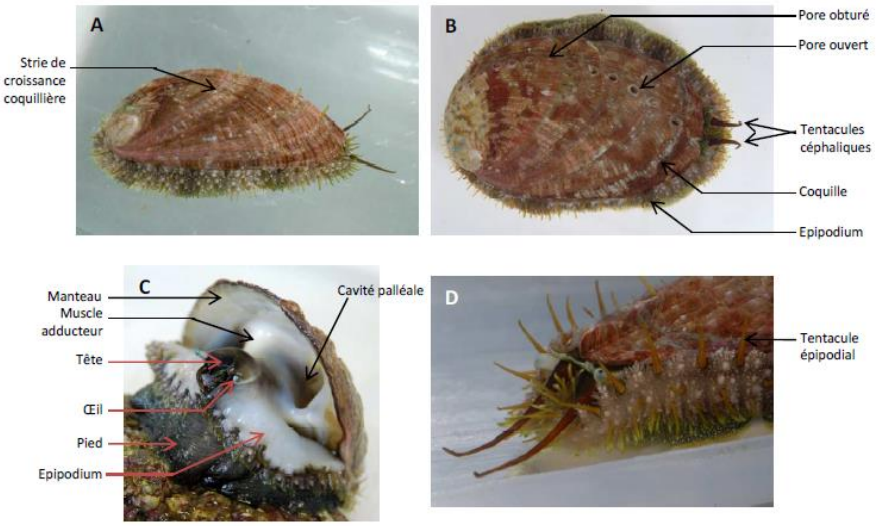


Figure 35 : *Vues externes d'Haliotis tuberculata A Vue du côté droit, B) Vue dorsale, C) Vue de face, D) Vue antérieure – D'après Gaume et al., 2010*

VI.3. Microstructure de la coquille adulte

La coquille de *Haliotis tuberculata* est constituée de trois couches superposées. La première est le périostracum la couche organique externe pigmentée dont les ornementations sont visibles à l'œil nu en vue dorsale **(*Figure* 35B).** Ces couches sont visibles sur la coupe longitudinale observée en microscopie optique effectuée sur une coquille de *Haliotis tuberculata* **(*Figure* 36).**

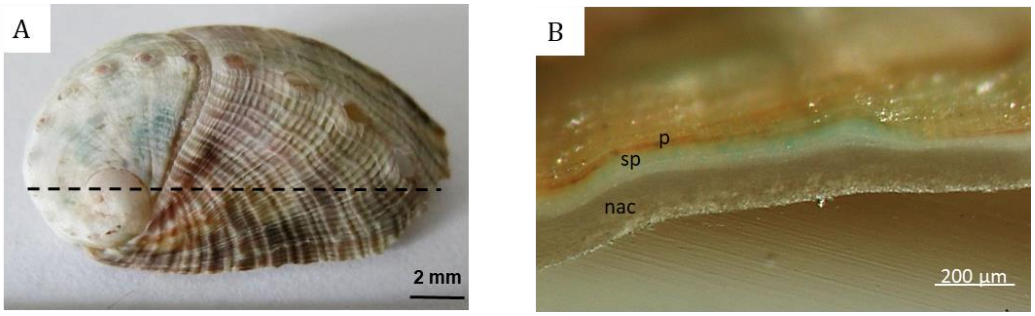


Figure 36 : *A) Vue externe de la coquille adulte de 1 an de Haliotis tuberculata montrant l'axe longitudinal selon lequel la coupe a été réalisée ; B) Surface polie de la section montrant les trois couches constitutives (p=périostracum, sp=couche sphérulitique, nac=nacre) – Clichés de S. Bordenave, MNHN*

De simples cassures effectuées sur des coquilles fraîches et observée au MEB permettent de révéler la microstructure de ces couches comme le présente la ***Figure* 37** effectués par Gaume *et al.*, 2010. Les clichés montrent que la coquille est constituée d'une couche dite sphérulitique externe et une couche nacrée interne. L'agrandissement de la couche sphérulithique sur la ***Figure* 37C** permet de voir que cette microstructure est marquée par la présence de gros cristaux de carbonate de calcium de nature aragonitique. La couche nacrée présente une organisation en colonne typique de la nacre des gastéropodes **(*figure* 37B)**

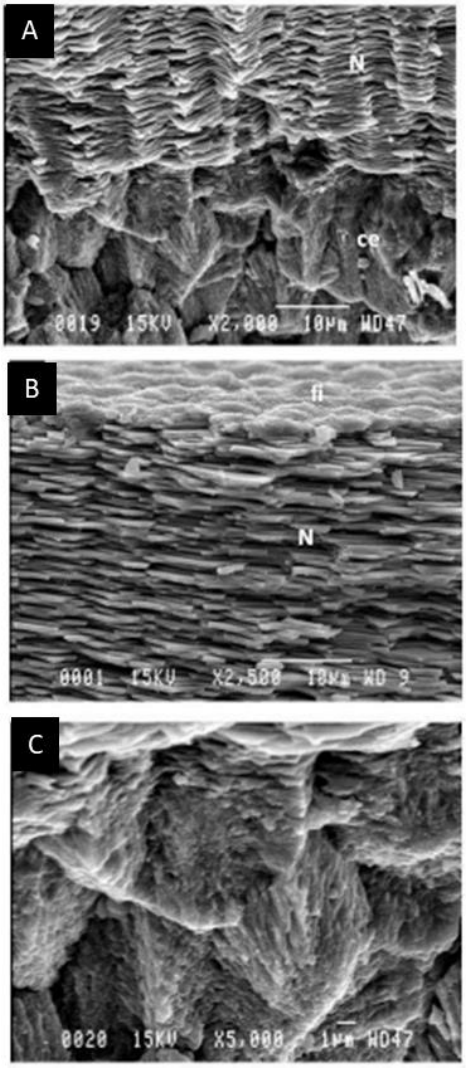


Figure 37 : *Microstructure de la coquille adulte d'Haliotis tuberculata observée en MEB. A) Cliché MEB montrant les deux couches minéralisées de la coquille de l'ormeau Européen. B) la couche nacrée et C) la couche sphérulitique– D'après Gaume et al., 2010*

VI.4. Contrôle biologique chez le genre Haliotis

Comme chez tous les mollusques conchifères le contrôle biologique de la biominéralisation est essentiellement assuré par les protéines sécrétées par le manteau. Comme on a pu le voir, on peut distinguer deux types de protéines : d'abord les protéines dites « insolubles », inter-cristallines, présentes avec la chitine au niveau du feuillet organique interplaquettaire et se retrouvant également au niveau des bords latéraux en formant des barrières verticales entre deux tablettes voisines. Par ailleurs, on distingue les protéines dites

« solubles », en forte interaction avec la phase minérale, pouvant même être intracristallines en étant présentes au sein même des tablettes

Au sein des gastéropodes, et particulièrement pour le genre *Haliotis*, plusieurs protéines intracristallines ont été identifiées. Les principales sont regroupées dans le **Tableau 3** et décrites dans les prochains paragraphes.

Protéine	Poids Moléculaire (kDa)	Acides Aminés les plus abondants	Espèce d'Haliotis	Fonctions potentielles	Références bibliographiques
Perlucine	18.155	Leu (9.7%) Arg (8.4%)	*H. laevigata*	Liaison au Calcium et à la chitine, rôle dans la nucléation du CaCO3 et augmentation de la vitesse de croissance des cristaux	Blank *et al.*, 2003
Perlustrine	9.338	Cyst (14.3%), Pro(9.5%) Leu (8.3%)	*H. laevigata*	Interaction avec l'épithélium du manteau permettant sa prolifération	Weiss *et al.*, 2001
Perlwapin	14.528	Cys (18.7%), Pro (15.7%), Gly (11.9%)	*H. laevigata*	Inhibition cristalline avec une forte interaction avec certaines faces des cristaux de carbonate de calcium	Treccani et al, 2006
Perlinhibin	4.793	Cys (19.5%), His (17.1%), Arg (14.6%)	*H. laevigata*	Inhibition de la croissance cristalline en particulier de la calcite	Mann *et al.*, 2007
AP7	9.935	Leu (9.7%), Arg, Cys, Ser, Tyr (8.0%) Ala, Asp. Cly, Ile, Thr (6.8%)	*H. rufescens*	Ralentissement de la croissance cristalline	Michenfelder *et al.*, 2003
Lustrine A	142.209	Ser (16.4%), Pro (13.9%), Gly (13.4%)	*H. rufescens* *H. tuberculata*	Protéine de matrice des feuillets interlamellaires de la nacre	Shen *et al.*, 1997 Gaume *et al.*, 2010

Tableau 3 : *Récapitulatif des protéines solubles présentes dans la matrice organique de la couche nacrée des gastéropodes du genre Haliotis – Modifié d'après Heinemann et al, 2011*

La perlucine est la protéine la plus concentrée dans la nacre de *Haliotis laevigata*. Il s'agit d'une lectine de type C, liant le calcium qui serait également connectée à la chitine. Elle serait impliquée dans la nucléation du carbonate de calcium et l'augmentation de la vitesse de croissance des cristaux (Blank *et al.* 2003).

La perlustrine est l'une des protéines les plus abondante dans la nacre de *Haliotis Laevigata* qui semblerait n'avoir aucune relation avec la croissance cristalline. En revanche, il

semblerait qu'elle soit en lien avec l'IGF (Insuline Groxth Factor) en s'y connectant. Elle serait en interaction avec l'épithélium du manteau et serait impliqué dans le contrôle de sa prolifération (Weiss *et al.*, 2001).

La perlwapin étudiée chez *Haliotis Laevigata* également est une protéine comprenant 134 acides aminés avec trois séquences répétées de 40 acides aminés acides très similaires aux Whey Acidic Protéins (WAP). Des observations en AFM ont montré des propriétés inhibitrices de croissance cristalline par une interaction forte avec certaines faces des cristaux de carbonate de calcium (Treccani *et al.*, 2006).

La perlinhibin qui a été étudiée notamment par Mann *et al.*, 2010 chez *Haliotis Laevigata* est un inhibiteur de la croissance cristalline également. C'est une toute petite protéine (4,8kDa). Sa séquence de 41 acides aminés contient en majorité de la cystéine (19,5%), de l'histidine (17%) et de l'arginine (14,6%). C'est une protéine très compacte avec 4 ponts disulfures. Des études en AFM ont montré qu'elle se liait spécifiquement à la calcite inhibant sa croissance (Mann *et al.*, 2007).

Deux autres protéines, AP7 et AP24 ont été purifiées de la nacre de *Haliotis rufescens*. Ces protéines auraient une influence sur la croissance cristalline du carbonate de calcium. Les acides aminés situés dans la région N-terminale aurait pour action de ralentir la croissance (Michenfelder *et al.*, 2003) .

La Lustrine A est la protéine la plus grande en terme de poids moléculaire rencontrée dans la nacre chez *Haliotis.* Elle a été isolée à partir de la coquille de *Haliotis rufescens* et a été a été clonée et caractérisée à partir de son ADNc (Shen *et al.* 1997). Elle partage des similarités avec le collagène par la présence de domaines riches en glycine. Elle présente également un domaine riche en cystéines et proline répétés huit fois chacun (Shen *et al.*, 1997). Il est suggéré que ce domaine serait un lien entre le minéral et les protéines et/ou la chitine au sein des feuillets interlamellaires (Smith *et al.*, 1999).

Chez *Haliotis tuberculata,* il y a peu d'études disponibles sur l'identification des protéines matricielles et leur rôle dans le contrôle de la formation coquillière. Le chapitre V présente les dernières avancées concernant le contrôle protéique de la biominéralisation chez Haliotis tuberculata, en particulier aux stades précoces de développement.

V. Bilan et enjeux de la thèse

Ce premier chapitre a eu la volonté de présenter le vaste champ de recherche de ce que la Biominéralisation représente pour la communauté des scientifiques. Son étude fait appel à différentes disciplines et permet de croiser les communautés scientifiques car la caractérisation de ces différents systèmes minéralisés touche à la fois la Biologie, la Chimie et la Physique.

Les tissus minéralisés sont le siège d'une incroyable diversité que ce soit en termes de composition, de morphologie et de fonction.

Au sein de la communauté scientifique, l'étude de la Biominéralisation est appréhendée sous différents angles ; quatre, en particulier, peuvent être détaillés :

- Le premier concerne l'étude des biominéraux que ce soit en termes d'ultrastructure ou de propriétés. Il s'agit du niveau le plus étudié par la communauté des Chimistes et des Physiciens où des progrès considérables ont été réalisé ces dernières années en termes de résolutions spectrales des techniques des caractérisation (microscopie électroniques, EELS, STXM…).

- Le deuxième correspond à une approche plus biologique et concerne l'étude des évènements intracellulaires qui englobent la régulation des ions précurseurs, l'organisation interne des cellules impliquées dans le contrôle de la biominéralisation et la synthèse et/ou sécrétion des protéines directement liées à ce phénomène. Il existe une variété considérable d'agents biologiques impliqués dans la biominéralisation et l'étude des phénomènes mis en jeu est donc extrêmement complexe.

- Le troisième angle est lié à la genèse des biominéraux, i.e. leur nucléation et leur croissance. Il s'agit notamment de tous les évènements moléculaires et cellulaires depuis l'œuf fécondé jusqu'à la formation des premières trames minéralisées. Lors de ces étapes, la minéralisation est contrôlée par les gènes du développement et les acteurs biologiques sont donc essentiels.

Cette approche combine souvent des compétences en Biologie et en Chimie. Les interrogations en termes de structure et de composition autour des premières phases minérales sont nombreuses malgré un consensus qui semble se faire autour de l'existence d'un précurseur amorphes des futures structures cristallines.

- Le dernier angle d'étude que l'on peut dégager concerne l'origine et l'évolution des structures minéralisées au cours de l'histoire de notre planète. Malgré une grande diversité, la mise en évidence de similarités laisse entrevoir des mécanismes de formation communs au sein de cette grande famille de tissus minéralisées. Ces points communs peuvent être la conséquence de deux évènements antagonistes : La première hypothèse serait qu'au cours de l'évolution différentes convergences évolutives aléatoires auraient eu lieu séparément entrainant des apparitions indépendantes de ces attributs communs dans différents phylums phylogéniques. La deuxième serait qu'au contraire il existerait un ou des ancêtres communs aux organismes minéralisés qui auraient évolués vers des systèmes distincts avec des particularités propres mais tout en gardant des mécanismes communs.

La coquille des mollusques et plus particulièrement la nacre sont étudiées depuis plus de 150 ans, en particulier au niveau de trois aspects: **structure**, **formation** et **propriétés**. Durant ces décennies de recherche, de grandes avancées ont été réalisées dans la compréhension de ces trois axes d'étude qui sont intimement liés. En effet, la découverte de détails structuraux comme les ponts minéraux, la co-orientation cristalline des tablettes entre-elles, où encore l'hétérogénéité de la surface de la phase minérale et la nature des composants organiques, permettent de dresser des conclusions sur les mécanismes de formation. De même, les propriétés macroscopiques (mécaniques et optiques) peuvent être comprises grâce à l'étude de l'ultrastructure du matériau.

Malgré les avancées qui ont été réalisées concernant ce matériau complexe et remarquable, de nombreuses questions restent à élucider. Au vu de cet Etat de l'Art, j'entrevois trois problématiques majeures sur lesquelles il reste matière à étudier:

- La structure et la composition de la phase minérale ;
- L'assemblage de la fraction organique et son interaction avec la phase minérale ;
- Les processus de cristallisation du carbonate de calcium.

C'est en essayant de prendre en compte les quatre angles d'études de la Biominéralisation précédemment introduit que nous avons cherché à contribuer au savoir autour de ces trois problématiques. Ainsi, voici sous forme de quatre chapitres les résultats que nous avons obtenus au cours de ces trois années de thèse dédiées à l'étude de la biominéralisation de la coquille du mollusque *Haliotis tuberculata* communément appelé l'ormeau Européen.

Le ***Chapitre II***, intitulé **« Analyse ultrastructurale de la nacre par microscopies à haute résolution »**, concernera une étude ultrastructurale de la coquille d'*Haliotis tuberculata* avec une attention particulière portée à la structure nacrée. Pour cela, nous avons mis en œuvre des techniques avancées de préparation d'échantillon (FIB, polissage ionique, cryo préparation) et de microscopie électronique (SEM-FEG, Helium Ion Microscopy).

Le **Chapitre III**, intitulé **« Etude des environnements désordonnés au sein de la nacre »,** sera dédié à la l'étude des environnements minéraux désordonnés de l'aragonite des tablettes de nacre. En effet, ceux-ci se retrouvent, entre autre, à la surface des plaquettes et sont donc en interaction avec la fraction organique. Il est donc essentiel de les décrire pour comprendre le mécanisme de croissance cristalline. Pour cela, nous avons réalisé une étude multinucléaire (^{1}H, ^{13}C, ^{43}Ca, ^{23}Na) par des séquences avancées de RMN à l'état solide.

Le **Chapitre IV,** intitulé **« Caractérisation de l'interface organo-minérale dans la nacre en croissance »,** sera consacré à l'étude de l'interface organo-minérale au sein des tablettes de nacre en formation. Les différentes zones, où sont susceptibles de se retrouver ces interfaces, ont été étudiées. Pour cela des techniques avancées d'imagerie à haute résolution (STXM, EELS) ont été mises en œuvre. Les résultats ont été couplés à ceux issus d'expériences de recouplage dipolaire ^{13}C-^{31}P (REDOR) par RMN à l'état solide. Pour ces dernières, nous avons utilisé une technique innovante d'hyperpolarisation du signal RMN par polarisation dynamique nucléaire (DNP).

Enfin, le **Chapitre V,** intitulé **« Structure et formation de la coquille larvaire »,** sera dédié à l'étude de la coquille aux stades larvaires afin de comprendre d'avantage les processus de formation de la phase minérale ainsi que le contrôle biologique intervenant dans la mise en place de la coquille au cours du développement. Pour cela nous avons mis au point une approche innovante qui consiste à enrichir sélectivement la coquille larvaire en ^{13}C de manière à étudier sa structure et son interface organo-minérale par RMN à l'état solide. L'étude par RMN notamment a également permis de mettre en lumière la présence de phosphate dans la mise en place de la coquille carbonatée d'*Haliotis* et les liens qu'il pourrait y avoir entre biominéralisation carbonatée et phosphatée seront discutés; nous amenant à une réflexion au sujet d'une possible connexion entre les différents systèmes minéralisés au sein du Vivant. Enfin une attention particulière a été portée à la Lustrine A protéine matricielle de la nacre et dont la localisation a été étudiée par un technique innovante de microscopie corrélative (CLEM) dans le cadre d'une étude préliminaire.

Chapitre II: Analyse ultrastructurale de la nacre

I. Introduction

L'essor des techniques de microscopie a permis au fil des avancées technologiques de caractériser de plus en plus précisément l'ultrastructure de la nacre et plus généralement de la coquille. Malgré l'abondance des études réalisées par le biais de ces techniques, de nombreuses interrogations persistent et les nouvelles observations offrent continuellement de nouveaux éléments permettant de mieux comprendre son ultrastructure et par ces biais ses mécanismes de formation.

Ce chapitre est dédié à l'étude ultrastructurale réalisée par une combinaison de techniques de pointe de microscopie électronique (microscope électronique à balayage équipé d'un canon à émission de champ et la microscopie à balayage d'ions d'hélium) et de préparation d'échantillon (abrasion ionique par faisceau d'ions focalisé, Polissage ionique) sur des échantillons de coquilles de *Haliotis tuberculata*. Les observations réalisées dans ce chapitre permettent de décrire finement notre matériel d'étude, étape préalable aux analyses structurales et biologiques qui seront développées dans les chapitres III et IV notamment. En effet avant de focaliser notre étude sur des zones plus locales nous avons réalisé une étude structurale générale de la nacre afin de mettre en évidence différentes zones d'intérêt. Un effort particulier a été porté sur l'analyse de la transition entre la couche sphérulithique et la couche nacrée car peu de données sont présentes dans la littérature à ce sujet.

Pour cela nous avons réalisé notre étude au niveau du bord de croissance afin de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de la formation de la coquille et en particulier les mécanismes de formation de la nacre.

II. Matériel et méthodes

Pour un matériau tel que la nacre, comme pour tout matériau biologique de manière générale, l'un des problèmes majeurs rencontrés lors de leur étude concerne la préparation des

échantillons. Dans notre cas, nous avons été confronté à une difficulté liée au fait que la coquille et plus particulièrement la nacre est un matériau d'une grande dureté, ainsi la réalisation de coupes fines est délicate et les techniques de microtomie classiques sont difficiles à utiliser.

Nous nous sommes ainsi tournés vers des techniques de préparation d'échantillon adaptées telles que l'abrasion ionique par faisceau d'ion Gallium focalisé (FIB) et le polissage ionique.

Le deuxième paramètre à prendre en compte lors d'une étude de la nacre par microscopie concerne le fait que la coquille est aussi hydratée et constituée d'une fraction organique, en plus de sa phase minérale. Ainsi la préservation de l'eau de structure et des composants organiques fragiles apparait comme essentielle pour pouvoir étudier l'ultrastructure de ce matériau. Ainsi les étapes préalables de fixation chimique des éléments organiques, de point critique ou l'utilisation de cryo-microscopies sont des techniques adaptées et que nous avons essayé d'utiliser.

II.1. Matériel biologique

Les différents clichés de microscopie électronique à balayage et microscopie à balayage d'ions Hélium, ont été réalisés sur un échantillon de coquille d'ormeau Européen *Haliotis tuberculata* âgé de 1 an provenant de l'écloserie d'ormeau *France Haliotis* située à Plouguerneau en Bretagne (Finistère Nord). A ce stade, la coquille mesure environ 1,2 cm et est déjà nacrée. La coquille a été maintenue à sec et à température ambiante jusqu'aux observations.

Les clichés de cryo-microscopie à balayage ont été réalisés sur une coquille de 6 mois, fraîchement disséquée et qui a été fixée chimiquement par une solution de fixation à 1% de Paraformaldéhyde et 1,5% de Glutaraldéhyde en vue de conserver au maximum la fraction organique. A cet âge la coquille mesure environ 0,6 cm de longueur.

II.2. Microscopie électronique à balayage avec canon à émission de champ (SEM-FEG)

L'échantillon a été observé par un microscope électronique à balayage équipé d'un canon à émission de champ (Scanning Electron Microscopy Field Emission Gun, SEM-FEG) permettant une meilleure résolution des images (1,1 nm à 20 kV et 2,5 nm à 1 kV). Le modèle du microscope est : MEB-FEG Zeiss Ultra55 de la plateforme de microscopie de l'Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie (IMPMC). Les clichés ont été réalisés avec Imène Estève, responsable technique de la plateforme.

Ce microscope permet de travailler en tension variable en continu de 100 V à 30 kV, pour ces observations nous nous sommes placé généralement à 3kV.

Un dépôt de 10nm de carbone a été réalisé avant les observations à l'aide d'un Métalliseur/Evaporateur Carbone Haute Résolution (Leica EM SCD500) pour éviter la surcharge des électrons à la surface de l'échantillon.

III.3. Abrasion Ionique

Comme évoqué, la dureté de la coquille rendant la microtomie classique difficile, nous nous sommes tournés vers l'abrasion ionique

Cette technique dont le principe est illustré par le schéma de la ***Figure* 38**, repose sur l'utilisation d'un flux d'ions envoyé perpendiculairement à la surface du matériau qui vont ioniser la matière et ainsi creuser transversalement le matériau faisant apparaitre une surface lisse propice à une analyse détaillée. Cette technique permet ainsi de creuser dans le matériau et d'accéder plus aisément à l'organisation tridimensionnelle.

La source ionique est une source d'ions Galium Ga^+ qui sont des ions lourds pouvant être accélérés entre 1 kV et 30 kV. L'abrasion ionique résulte de l'éjection d'atomes ou d'ions de l'échantillon par des chocs principalement élastiques entre les ions gallium et le solide. Cette

interaction conduit à l'émission d'ions secondaires ou d'atomes neutres et d'électrons secondaires. Les atomes éjectés se redéposent majoritairement à l'arrière du front d'avancement du faisceau d'ions.

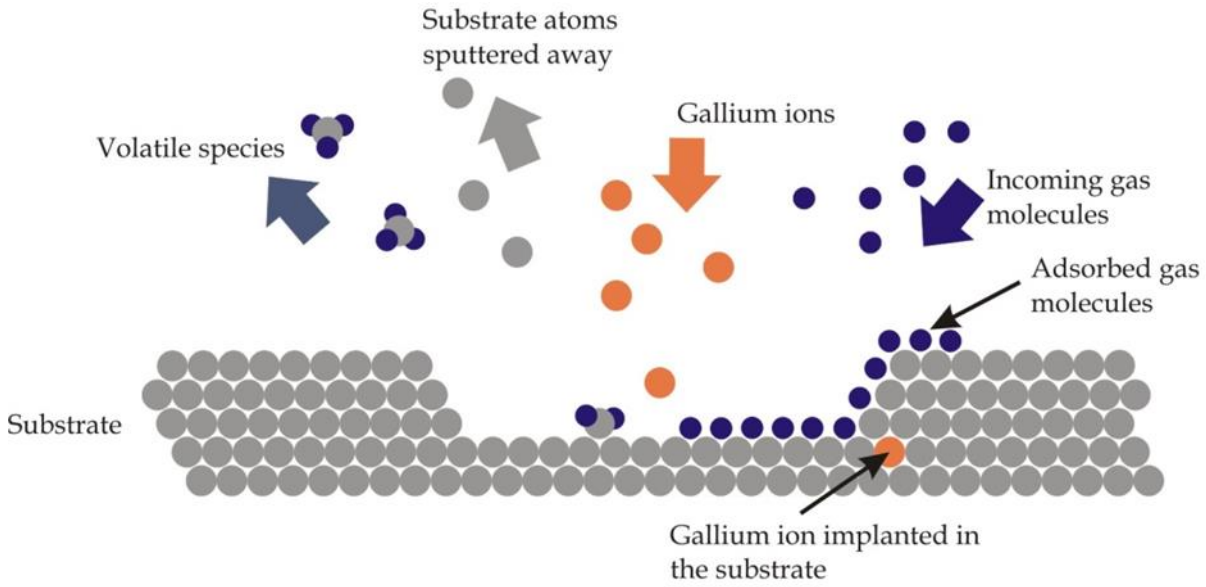


Figure 38 *: Schéma représentant le principe de l'abrasion ionique – D'après Prestigiacomo et al., 2004*

II.3.a. Foccused Ion Beam (FIB)

Dans notre cas, nous avons utilisé un SEM-FEG équipé d'un dispositif permettant de réaliser de l'abrasion ionique grâce à un faisceau d'ions focalisé (FIB). Cette colonne ionique émet de façon localisé des ions Ga^+ accélérés permettant d'abraser la matière localement et de manière précise à l'échelle du micromètre voire du nanomètre tout en visualisant au MEB la zone d'intérêt au cours de l'usinage. Ainsi cette technique est plutôt utilisée pour l'analyse de petites zones (de l'ordre de la centaine de micromètre) grâce à la précision de son faisceau d'ions (résolution de 7 nm à 30 kV).

Cet instrument est aussi équipé d'un système de dépôt local métallique (Platine Pt) permettant de protéger la zone d'intérêt de l'abrasion, lors de la préparation d'une lame FIB qui sera détaillée dans la partie Matériel et Méthode du chapitre IV. L'instrument dispose également

de micromanipulateurs qui sont des pointes fines en tungstène et qui permettent de manipuler la lame fine.

L'instrument que nous avons utilisé est le Zeiss Neon40EsB doté d'une source électronique type FEG-Schottky.

II.3.b. Polissage ionique

De plus nous avons utilisé un polisseur ionique qui selon le même principe d'abrasion ionique que le FIB permet de polir ioniquement de manière rapide de grandes surfaces. Cette technique contrairement au FIB, permet ainsi d'observer de larges zones (de l'ordre du centimètre) dont la surface est lisse et donc plus propice à l'observation et l'analyse.

Nous avons ainsi utilisé ces différentes techniques reposant sur l'abrasion ionique pour creuser dans les différentes zones de la nacre et analyser l'ultrastructure de ses différentes zones.

II.4. Helium Ion Microscopy (HIM)

La microscopie à balayage d'ions d'hélium est une technique de microscopie dont le principe de base est le même que celui d'un microscope électronique à balayage classique mais dont la source est un faisceau d'ions d'hélium et non d'électron. Les atomes d'hélium peuvent être focalisés de manière plus fine et sont à l'origine d'une plus petite poire d'interaction avec la matière que les électrons. Ainsi les images obtenues par HIM sont de meilleure résolution : moins de 0,3 nm à une énergie d'émission de 25-30 kV.

Il a été également observé que le HIM était à l'origine d'un meilleur contraste que le MEB. En effet, les atomes d'hélium étant à l'origine de 3 à 9 électrons secondaires contre 1 par les électrons du MEB, cela permet de créer un meilleur signal avec un plus grand contraste entre les différents matériaux, on a ainsi une plus grande profondeur de champs.

Les échantillons ont été recouverts d'une couche de platine de 2,3 nm, permettant d'empêcher la surcharge des atomes d'hélium à la surface du matériel observé et ainsi d'obtenir de meilleures images.

Les observations ont été réalisées à la plateforme du Rutgers Institute for Advanced Materials, (Devices and Nanotechnology (IAMDN) (Rudgers University, USA) et le microscope utilisé est le Carl Zeiss ORION PLUS SHIM.

II.5. Cryo-microscopie électronique à balayage (Cryo-SEM)

Une cryofracture a été réalisée à l'aide d'une enceinte de cryofracture (BAF 400T, Balzers) de manière longitudinale sur la coquille de 6 mois précédemment décrite. Des observations en Microscopie Électronique à Balayage haute résolution (GeminiSEM 500, Zeiss) pourvu d'un équipement cryo (VCT100, Leica) ont été réalisées. Aucune interruption de la chaine du froid entre la fracture et les observations n'a eu lieu. Ainsi la conservation de la fraction organique est optimale.

III. Résultats et discussion

III.1. Identification de trois zones d'intérêt

La coquille de *Haliotis tuberculata,* comme tous les mollusques de manière générale, croit du bord dorsal vers le bord ventral. Ainsi le bord ventral est le plus jeune et contient le domaine de croissance qui constitue la zone où la coquille est en train d'être nouvellement formée. Sur la ***Figure* 39A**, qui présente les différentes zones étudiées, la zone 1 est par conséquent plus jeune que la zone 2, elle-même plus jeune que la zone 3.

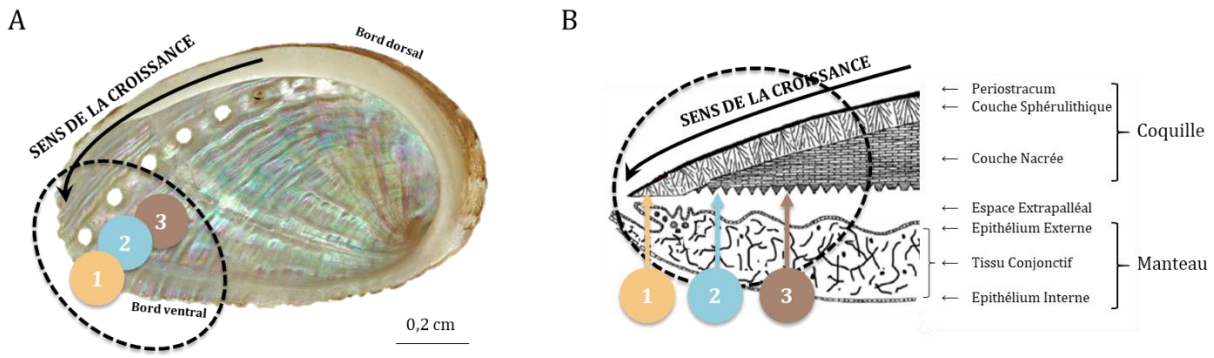


Figure 39 : *Localisation de la zone de croissance dans la coquille d'Haliotis tuberculata. A : vue supérieure de la face interne ; B. Schéma (© Stéphanie Bordenave, MNHN) de la région d'intérêt montrant les trois zones du domaine de croissance du bord ventral : Zone 1 : couche sphérulithique ; zone 2 : zone de transition ; zone 3 : couche nacrée*

Comme le représente La ***Figure* 39B**, ce bord de croissance est une zone d'étude intéressante car elle donne accès aux différentes couches de la coquille en particulier la couche sphérulithique et la couche nacrée. En effet, la nacre se déposant au-dessus de la couche sphérulithique (qui se dépose donc avant), cette zone de croissance offre la possibilité d'observer à la fois la couche sphérulithique fraichement déposée mais également la couche nacrée se déposant petit à petit par-dessus. Il est aussi possible d'étudier la transition entre les deux couches.

L'échantillon que nous avons utilisé est présenté sur la ***Figure* 40**. Il s'agit du bord de croissance qui a été prélevé après cassure manuelle d'une coquille de 1 an.

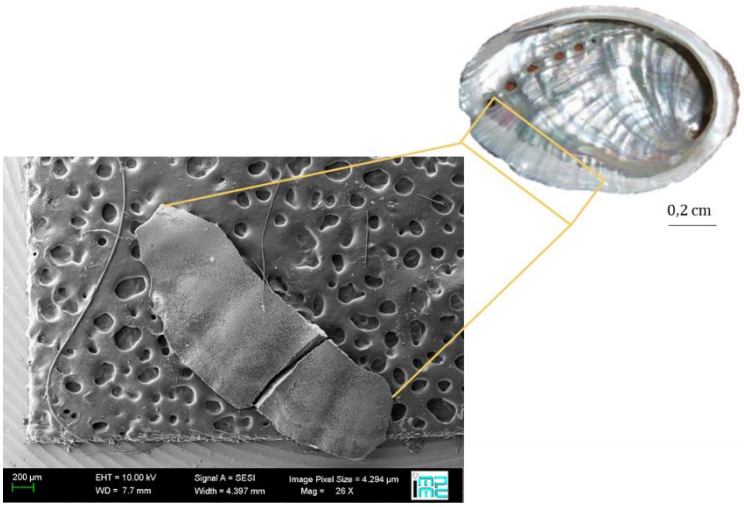


Figure 40 : *Echantillon analysé : bord de croissance d'une coquille de Haliotis tuberculata âgée de 1 an.*

La ***Figure* 41** présente une vue d'ensemble de la région analysée. On observe sur ce cliché SEM-FEG que ce domaine de croissance est constitué de trois zones distinctes dont les transitions sont progressives. Ces trois zones ont été numérotées de 1 à 3 de la zone la plus jeune à la plus âgée de la même manière que sur la représentation schématique de la **Figure** 39A.

L'observation du bord en croissance de la coquille a permis de caractériser 3 zones d'intérêt **(*Figure* 41):**

Zone 1. La couche sphérulithique, constituée de gros cristaux semblant anarchiques pris dans une matrice organique « lâche » ; en effet cette dernière présente des pores en son sein qui peuvent atteindre 1 µm de diamètre.

Zone 2. La nacre en formation, caractérisée par un ensemble d'empilements de tablettes d'aragonite espacés les uns des autres et reliés par une matrice organique plus dense.

Zone 3. La nacre mature, constituée d'une multitude de tablettes jointes les unes aux autres donnant au matériau un aspect dense caractéristique de la nacre.

Nous avons ensuite cherché à caractériser plus finement l'ultrastructure de ces trois zones.

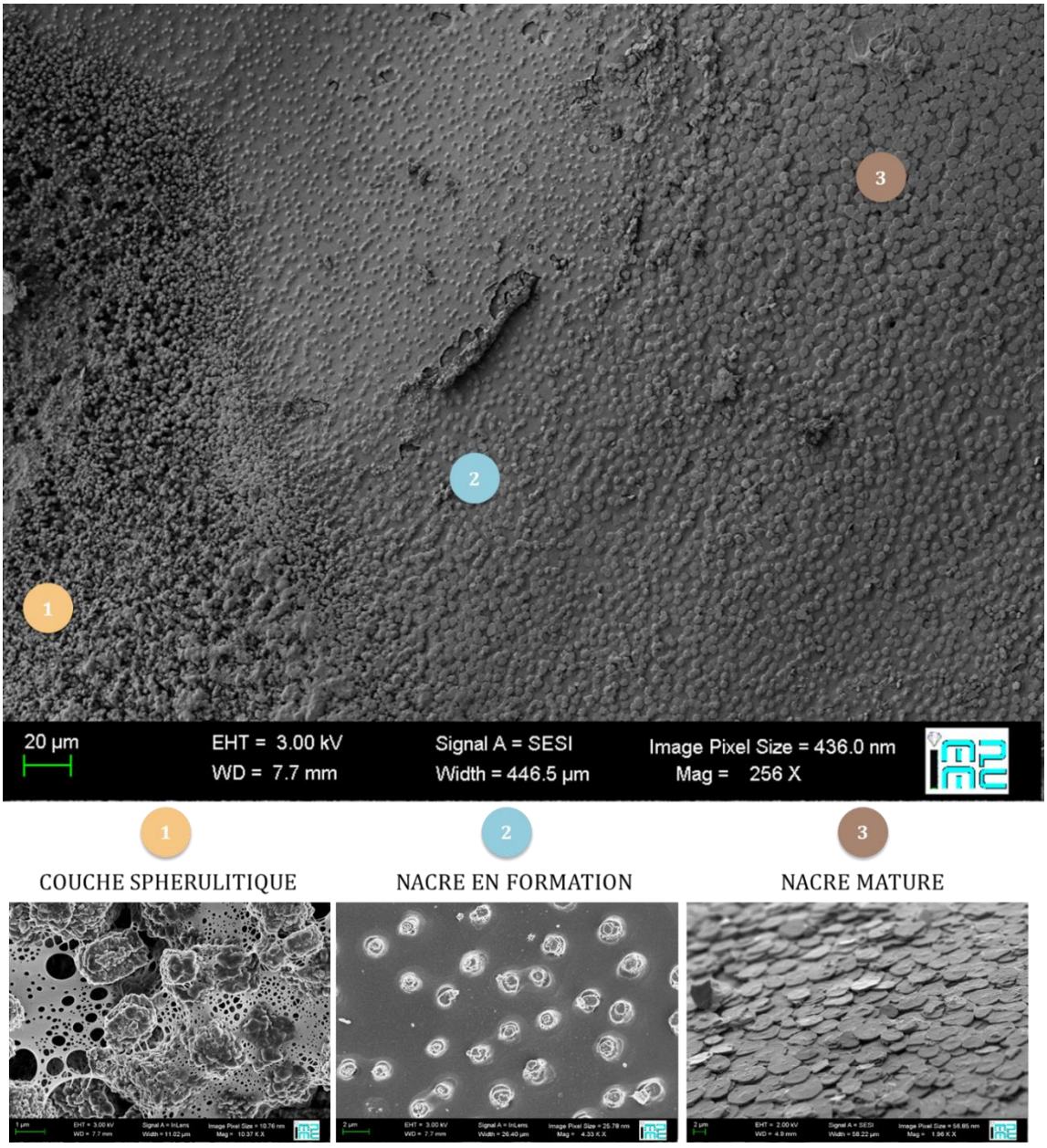


Figure 41 : *Cliché de microscopie électronique à balayage (SEM-FEG) du bord de croissance dans sa globalité où sont mises en évidence trois zones distinctes : la couche sphérulitique annotée 1, la nacre en formation annotée 2 et la nacre mature annotée 3*

2. Nacre mature

La zone 3 du domaine de croissance présenté sur la ***Figure* 41** correspond à la nacre mature où les plaquettes sont toutes quasiment reliées les unes aux autres. Nous avons réalisé par FIB une travée au sein de ces tablettes permettant de visualiser l'empilement en profondeur et d'accéder à l'architecture tridimensionnelle (***Figure* 42A**).

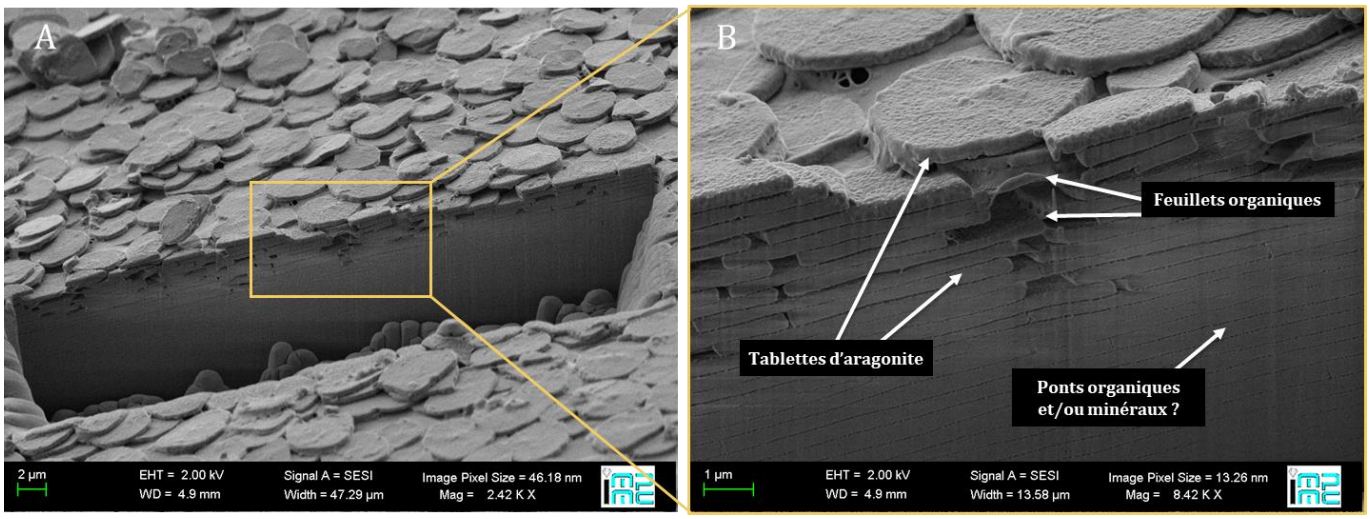


Figure 42 : *A) Cliché SEM-FEG montrant une travée au sein de la zone 3 du domaine de croissance effectuée par FIB et B) Grandissement de la travée permettant de mettre en évidence les tablettes complètement jointes en profondeur et les tablettes en croissance dans les couches de surface. Ce cliché permet aussi d'observer la présence du feuillet organique interlamellaire et la présence de ponts liants les tablettes.*

Le fort grandissement de la ***Figure* 42B** permet de voir que seules les dernières couches (environ les 10 dernières) sont encore en formation latéralement. En revanche, les couches profondes de ce cliché illustrent parfaitement le caractère très dense de la nacre mature à l'origine de sa grande résistance mécanique. Ces tablettes sont relativement très régulières en épaisseur ne présentant quasiment pas de défauts à cette échelle. On distingue très bien la présence au niveau des bords longitudinaux des tablettes les ponts (voir ***Figure* 42B**) qui relient les tablettes. Ces ponts ont des diamètres inférieurs à 50nm et il y a jusqu'à 10 ponts par micromètre sur cette coupe transversale. Ces observations sont cohérentes avec la littérature où il est décrit que les ponts ont un diamètre entre 5 et 50nm et une densité de 100 ponts par µm2 (Schäffer *et al.*, 1997). La nature de ces ponts n'est pas encore parfaitement connue puisqu'ils sont proposés comme étant minéraux (Schäffer *et al.*, 1997) et/ou organiques (Rousseau *et al.*, 2005).

Au niveau des couches supérieures, où les tablettes sont encore en croissance, on distingue les feuillets organiques qui séparent les tablettes. Ces feuillets organiques semblent lâches et troués (***Figure* 42B**). Lorsque les tablettes ont terminé leur croissance, toutes les couches sont formées de tablettes parfaitement jointes jusqu'à la surface comme l'illustre les clichés suivants réalisés par Hélium Ion Microscopy (HIM) (***Figure* 43**) permettant de voir que la surface de la nacre très mature est lisse ne présentant presque plus d'interstices.

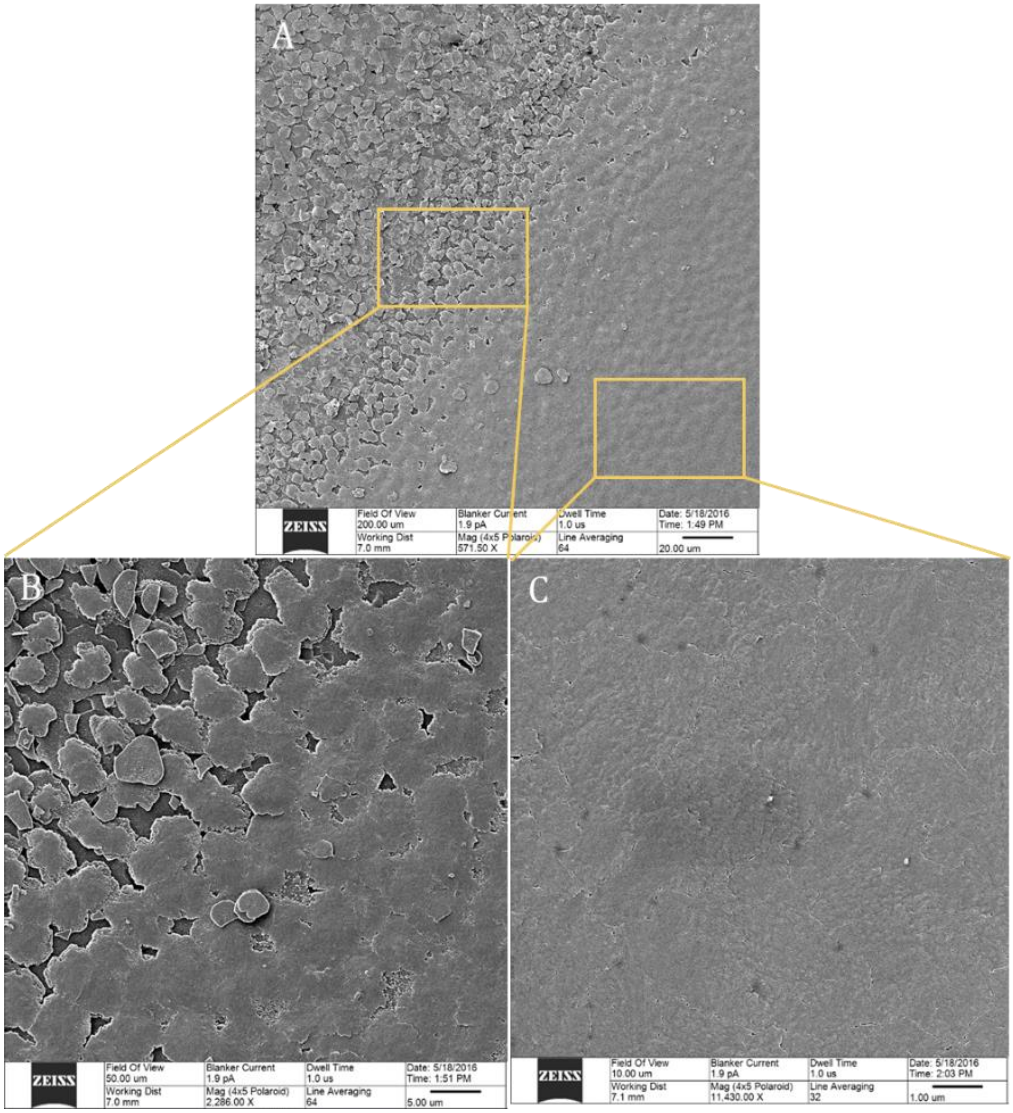


***Figure** 43 : Clichés réalisés par Helium Ion Microscopy A) d'une zone très mature de la nacre de la coquille de Haliotis tuberculata et d'un grandissent B) d'une zone de transition entre un zone mature et très mature et C) de la zone très mature où les tablettes sont toutes jointes.*

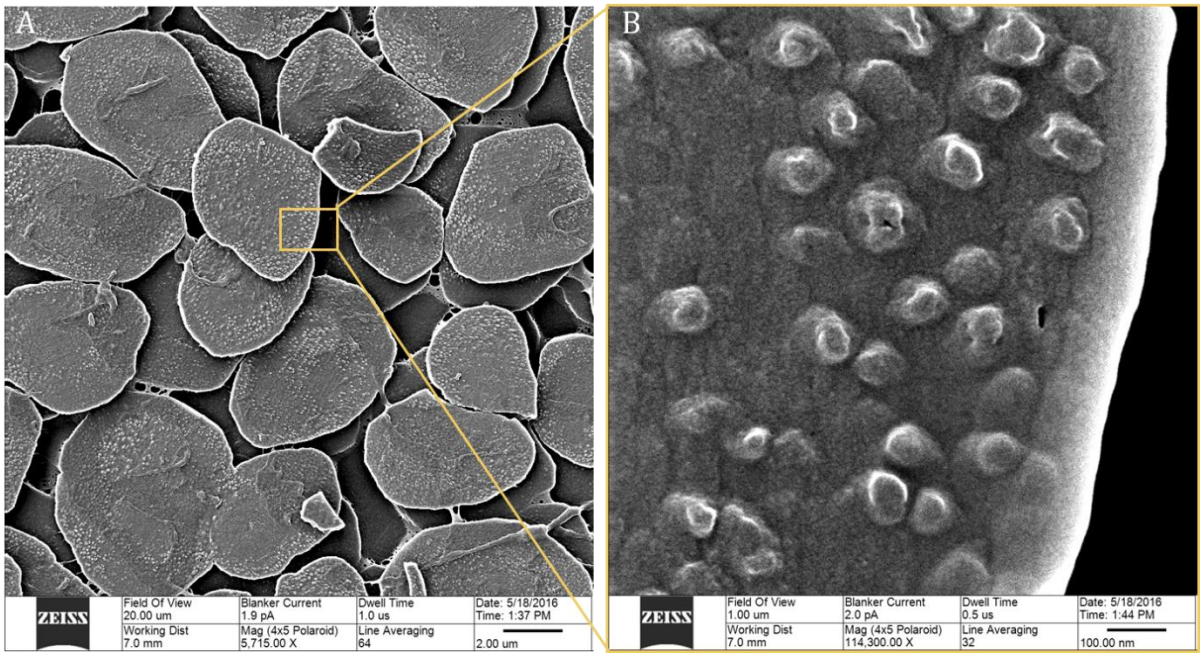


***Figure** 44 : Cliché HIM de A) la surface de tablettes en formation, et B) à plus fort grandissement la surface d'une tablette mettant en évidence des nanoaspérités de taille d'environ 50 nm*

De plus, l'observation fine de la surface de ces tablettes (***Figure* 44A**) permet de distinguer un ensemble de rugosités de surface nanométrique sous la forme de nanograins d'un diamètre environ égal à 50 nm (***Figure* 44B**). Ce diamètre est dix fois supérieur au diamètre d'un pont minéral (Schäffer *et al.*, 1997 et Song *et al.*, 2003). Ces nanograins ont déjà été observés (Wang *et al.*, 2001) et dont le diamètre avait été mesuré à 30-100 nm ; ceci est cohérent avec nos observations. La véritable nature de ces structures est encore inconnue.

4. Nacre en formation

La zone annotée 2 sur le cliché de la ***Figure* 41** correspond à une zone où la nacre est beaucoup plus jeune présentant des colonnes de tablettes moins nombreuses et espacées les unes des autres par une matrice organique dense (***Figure* 45A**). On observe à la surface des petits « plots » constitués de quelques tablettes empilées. Les plus jeunes ont une apparence de « sapins » avec un empilement de tablettes dont la taille est croissante de la base au sommet où la dernière tablette formée est quasi sphérique (***Figure* 45B**) contrairement aux empilements légèrement plus anciens qui présentent au sommet une surface plate.

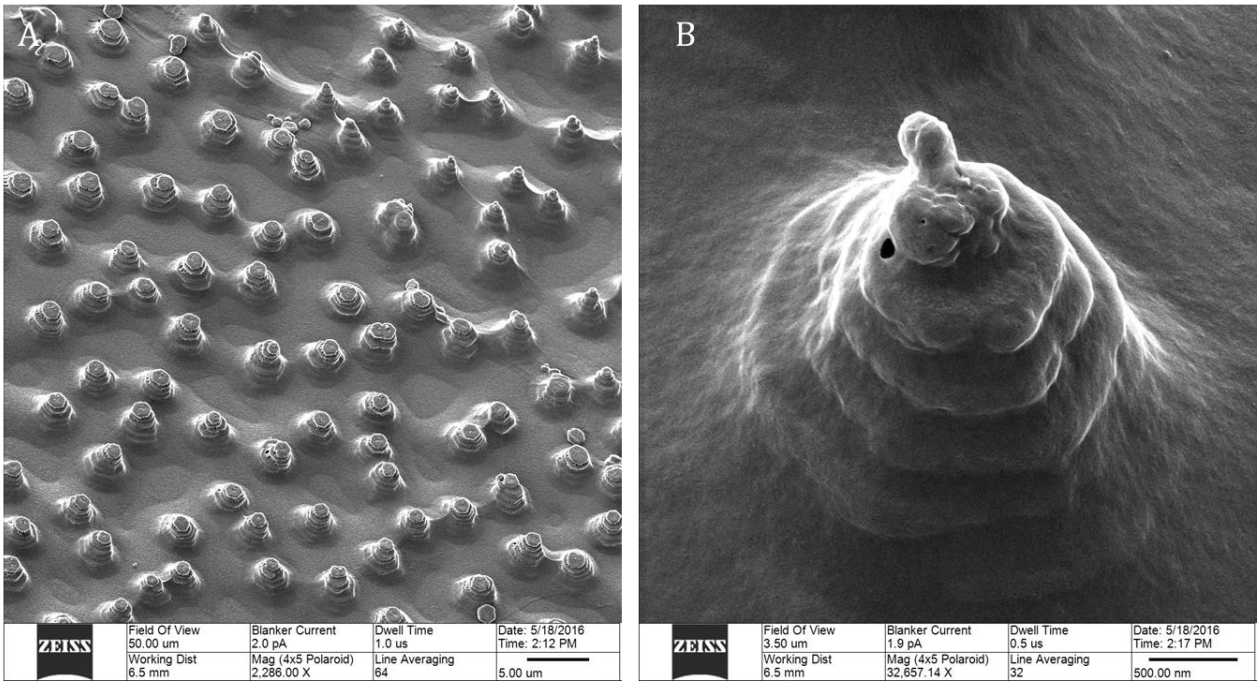


Figure 45 : *Clichés HIM de la surface de la nacre en formation A) à faible grandissent et B) plus fort grandissement où l'on observe un « très jeune » empilement de tablettes d'aragonite*

L'observation d'un empilement de tablettes « jeunes » (***Figure* 46**) montre que les tablettes superposées sont séparées par un feuillet organique poreux, comme il a été observé entre les tablettes de la zone 3. Ce feuillet a également un aspect très similaire à la matrice reliant les cristaux de la couche sphérulithique (***Figure* 41**).

La matière organique séparant les empilements voisins semble beaucoup plus dense mais présente tout de même un aspect poreux (***Figure* 46**).

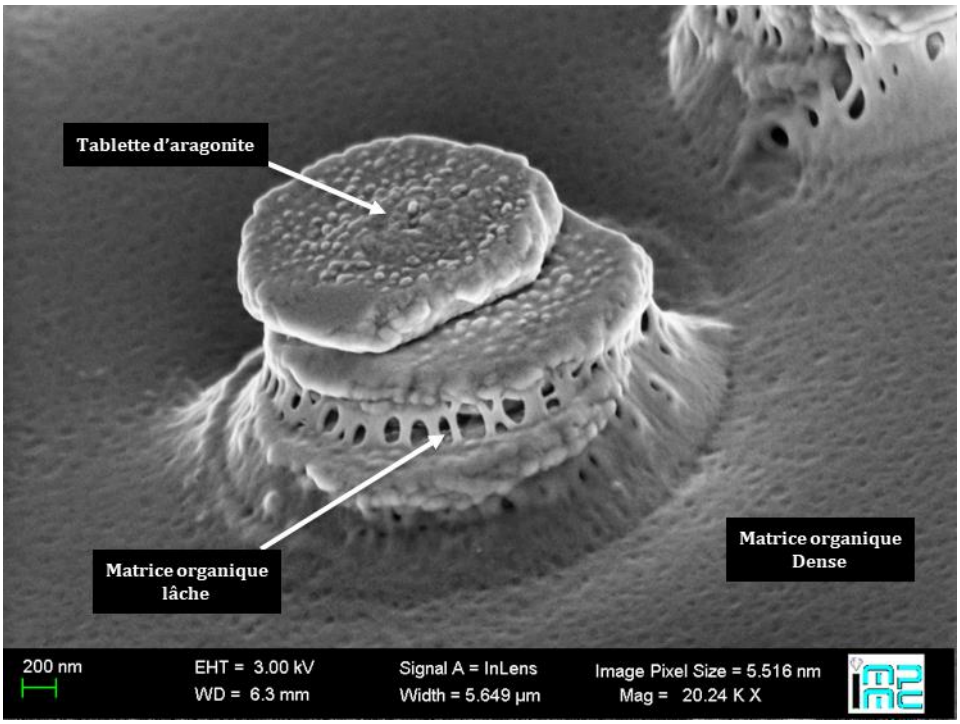


***Figure** 46 : Cliché SEM-FEG montrant un jeune empilement de tablettes d'aragonite séparées par un feuillet organique poreux, et présentant une surface granulaire typique. La dernière tablette formée est plate. Les empilements sont entourés par une matrice organique poreuse plus dense.*

On distingue ici aussi les nanoaspérités de surface sur ces tablettes.

Afin de mieux observer ces empilements nous avons également réalisé par FIB une travée dans cette zone (***Figure* 47**). L'abrasion du FIB a permis de révéler la partie plus profonde des colonnes comme le montre le cliché de la **Figure** 10D. Ce cliché montre les colonnes de nacre en croissance qui se rejoignent petit à petit pour former le solide empilement final.

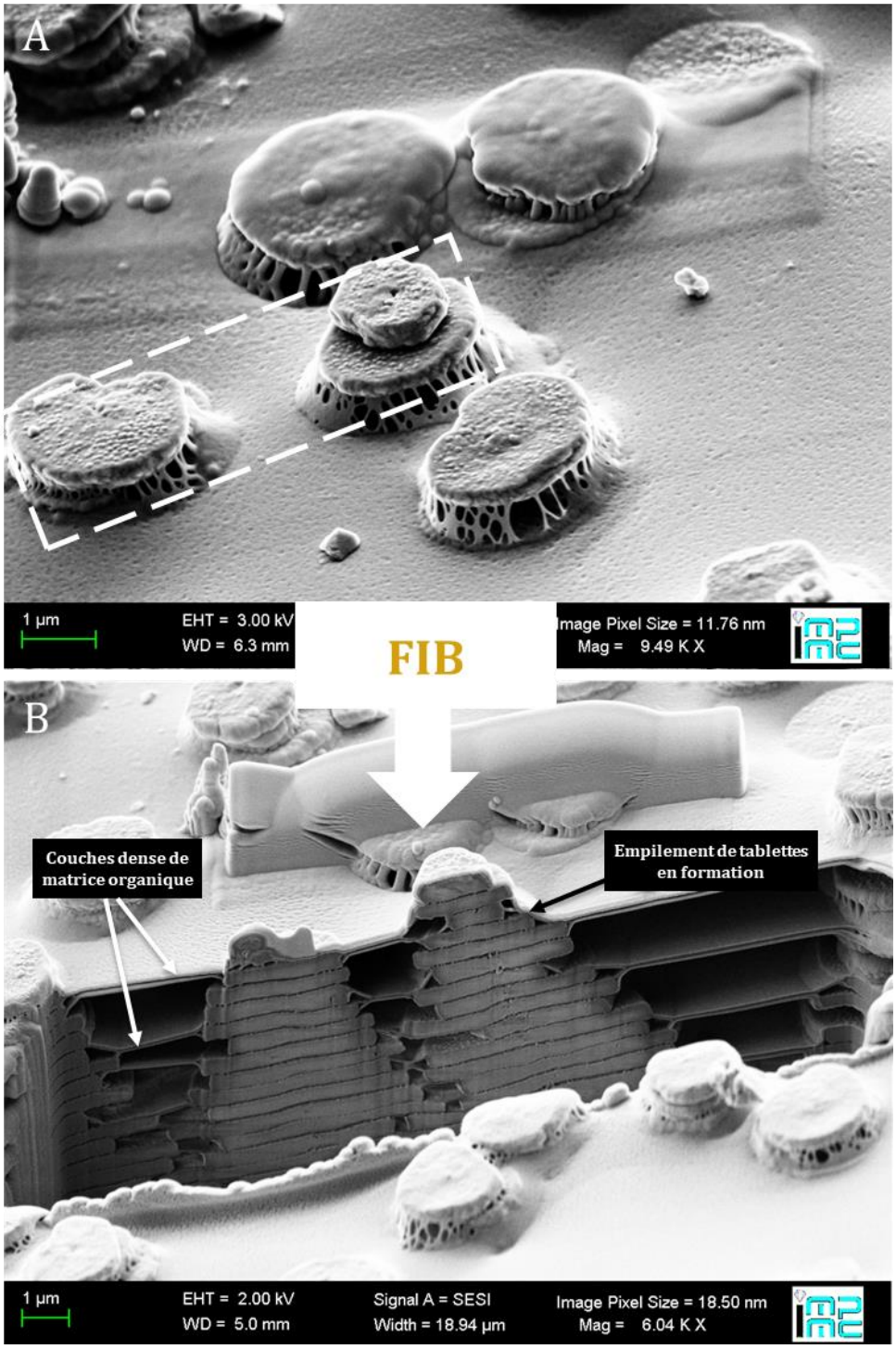


***Figure 47**: Mise en évidence de colonnes de tablettes d'aragonite en formation dans une section transversale de nacre chez l'ormeau HT. Clichés SEM-FEG A) présentant la zone d'intérêt en pointillés où l'abrasion par FIB sera réalisée et B) révélant après réalisation d'une travée au sein des deux empilements voisins..*

On remarque sur la ***Figure* 47B**, que les feuillets organiques interlamellaires sont collés les uns avec les autres. Ceci semble dû au vide primaire présent dans la chambre du MEB qui induit l'adhésion des feuillets entre eux et entraîne cet artéfact visuel. Nous avons vérifié cela par cryo-microscopie (***Figure* 48**). Comme évoqué précédemment, cette technique permet de figer par le froid les structures hydratées des tissus. Les observations montrent que les feuillets restent parallèles et sont espacés les uns par rapport aux autres même si les tablettes ne sont pas parfaitement formées. Ceci semble en accord avec les observations de Nudelman *et al.*, qui ont été les premiers à utiliser la cryo-microscopie pour l'étude de la nacre en 2000.

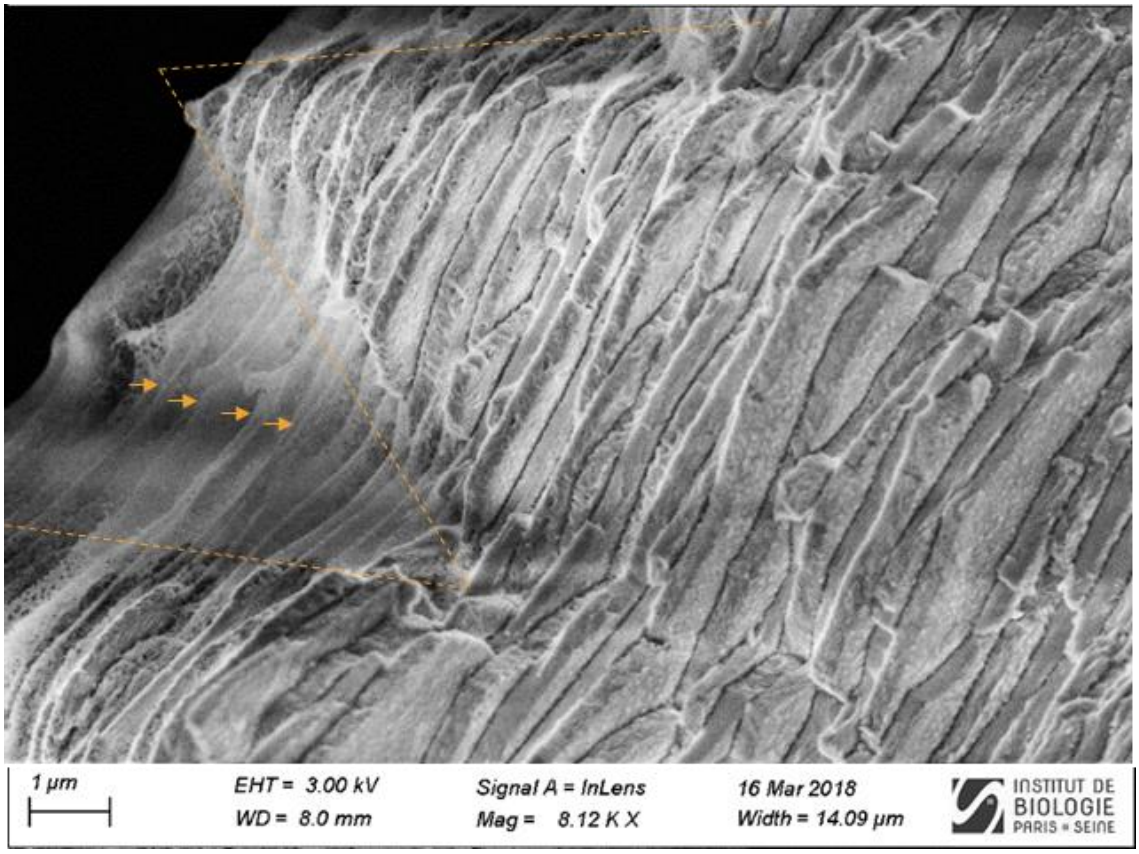


***Figure 48**: Cliché de cryo-microscopie électronique à balayage d'une cryofracture réalisée dans une coquille âgée de 6 mois fixée chimiquement. Les structures organiques sont ainsi conservées et figées par le froid.*

On peut ainsi voir les feuillets interlamellaires (flèches jaunes) restés parallèles entre deux colonnes en formation (pointillés jaunes) : l'espace entre les feuillets organiques interlamellaires est conservé.

Cette zone de la nacre en croissance fera l'objet d'études plus approfondies dans le Chapitre IV dédié à l'étude de l'interface organominérale dans la nacre en croissance.

5. Transition entre la couche sphérulithique et la couche nacrée

La couche sphérulitique est formée de gros cristaux d'une taille micrométrique (entre 1 et 2 µm) qui semblent désorganisés et retenus au sein d'une matrice organique lâche (diamètre des pores de 1 µm à quelques centaines de nanomètres) comme le montre la ***Figure* 49A**.

Le cliché à plus fort grandissement effectué par HIM (***Figure* 49B**) permet de voir que ces cristaux semblent être des agrégats constitués d'une multitude de petites plaquettes de quelques centaines de nanomètres organisées avec une orientation commune locale.

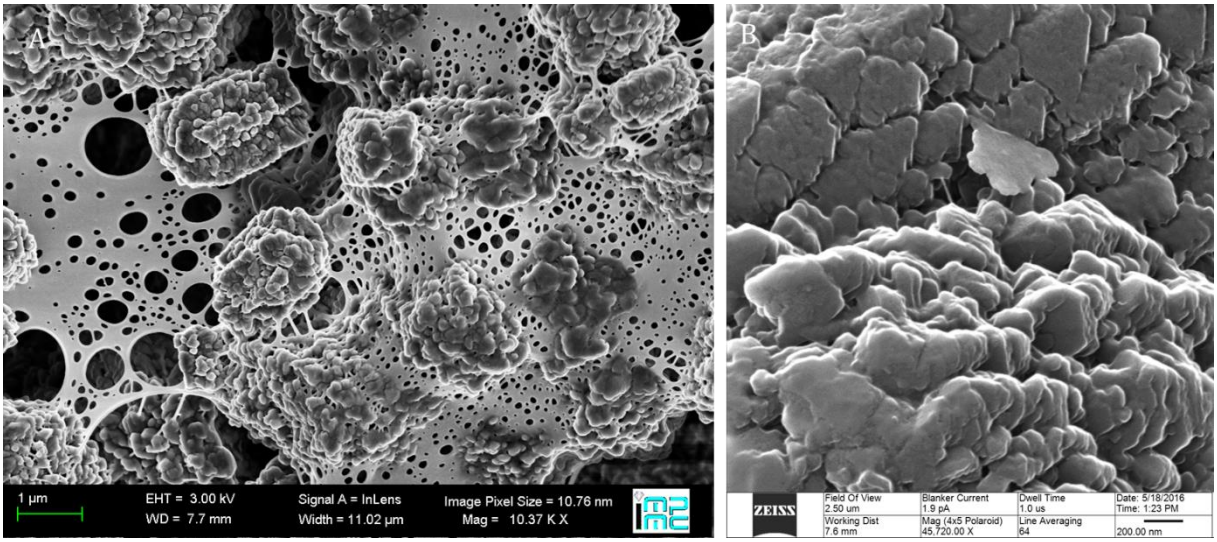


Figure 49 *: A) Cliché SEM-FEG d'une vue générale de la couche sphérulithique révélant la présence de cristaux de taille micrométrique présentant une organisation de type anarchique et entourés d'une matrice organique lâche présentant des pores de taille variable allant du micron à la centaine de nanomètre ; B) Cliché HIM à plus fort grandissement de la surface des cristaux d'aragonite de la couche sphérulitique qui semble montrer la présence de petites plaquettes plates de taille nanométriques et orientées localement.*

Afin de mieux comprendre comment la couche nacrée se met en place au-dessus de la couche sphérulithique, nous nous sommes intéressés à la zone de transition entre ces deux couches, où les tablettes de nacre nouvellement formées se mettent en place. Nous avons ainsi creusé à la

jonction entre les deux couches qui affleurent à la surface selon la ligne jaune représentée sur les clichés de la ***Figure* 50A et B**.

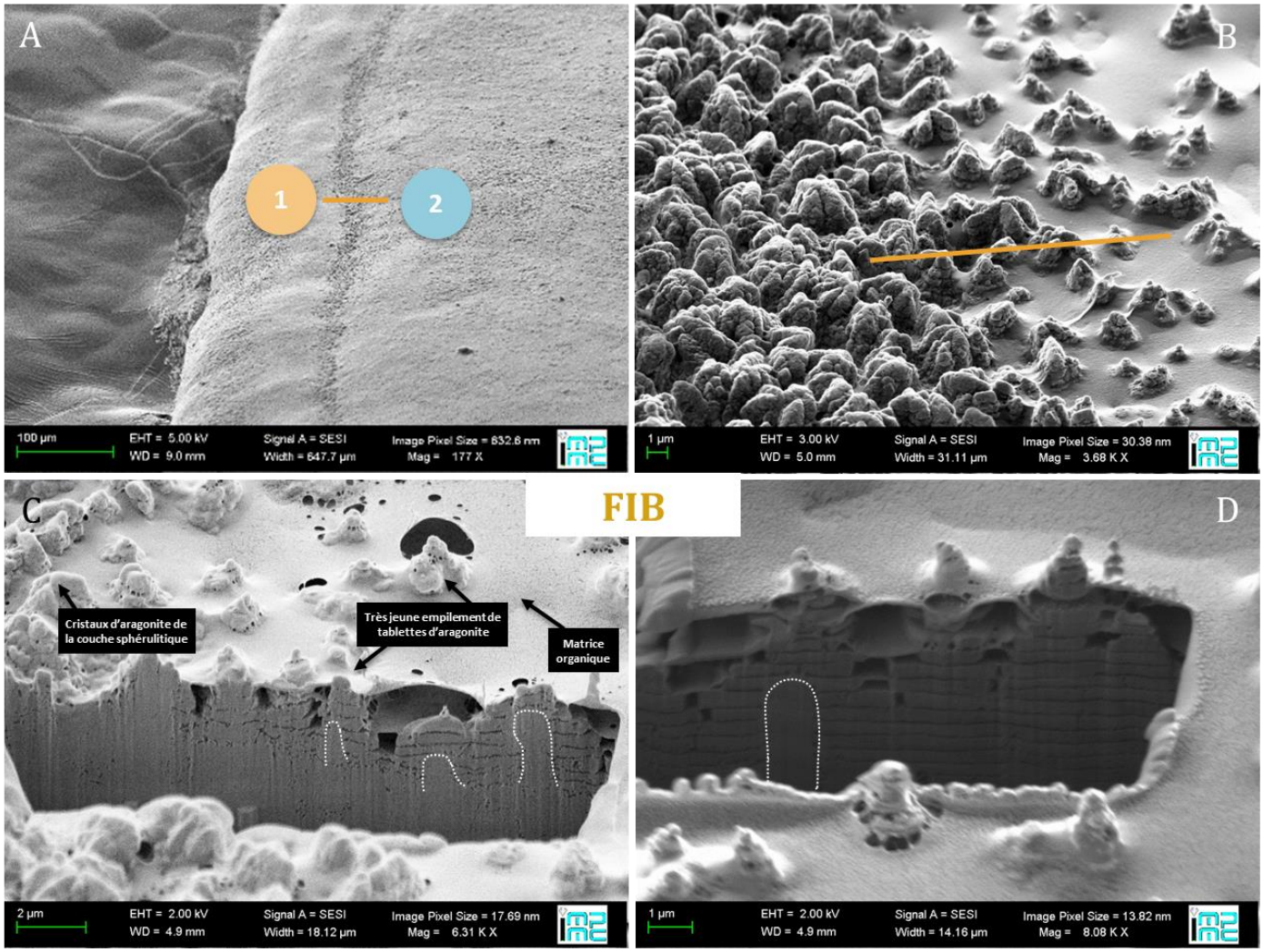


Figure 50 : *Utilisation du FIB pour l'observation de la transition entre la couche sphérulitique et la couche nacrée. Clichés SEM-FEG de A) la vue générale de la surface de cette transition, marquée par la présence d'une jonction bien visible qui sépare les deux domaines ; B) agrandissement sur cette zone de transition ; la réalisation par FIB de travées au sein de la coquille dans la zone de transition entre les deux couches, C) à faible et D) fort grandissement.*

Les clichés **C et D** de la ***Figure* 50** permettent de visualiser cette transition mise en évidence par FIB. Cette vue transversale permet de voir que les « très jeunes » empilements qui affleurent à la surface et qui ressemblent approximativement à des tablettes qui s'empilent, reposent systématiquement en leur centre sur un socle formé d'un seul bloc sans tablettes visibles. Ces socles sont soulignés par des traits en pointillés blancs (**Figure 50C et D**). Ces structures semblent être des cristaux provenant de la couche sphérulithique sous-jacente qui constitueraient une base

pour la mise en place des premières tablettes de nacre lors de la croissance en longueur de la coquille.

De manière à observer plus en profondeur et mieux comprendre cette transition entre les couches sphérulitique et nacrée, nous avons réalisé une fracture perpendiculaire au bord ventral de la coquille au sein du même échantillon (***Figure* 51A**).

La ***Figure* 51B** présente la section transversale mise en évidence par la fracture de la coquille. On y distingue les deux couches, nacrée et sphérulithique superposées.

Pour une observation plus fine de cette tranche nous avons eu recours au polissage ionique permettant d'obtenir une surface lisse. La ***Figure* 51D**, présentant la tranche après polissage, est centré sur la zone de transition entre les deux couches. La ***Figure* 51E** est un agrandissement de cette transition. On remarque que le front qui sépare les deux couches n'est pas rectiligne mais laisse imaginer que la mise en place de la nacre se fait par séquences successives dont les avancées se font au-dessus d'une base de nature sphérulithique.

Cette observation est en accord avec les modalités de la croissance coquillère chez les mollusques qui ne se déroule pas uniformément tout au long de l'année, mais de manière discontinue. En effet, des périodes de croissance active alternent avec des périodes de ralentissement qui sont principalement liées au conditions environnementales, notamment le pH, la disponibilité en nourriture et en ions particulièrement en calcium, et la température, des paramètres qui influent directement sur la rapidité de synthèse des coquilles.

Ceci est d'autant plus visible lorsque l'on regarde l'extrémité de la coquille, présentée sur la ***Figure* 51C** qui illustre cette croissance discontinue, où l'on distingue clairement la superposition des couches granuleuses de nature sphérulithiques.

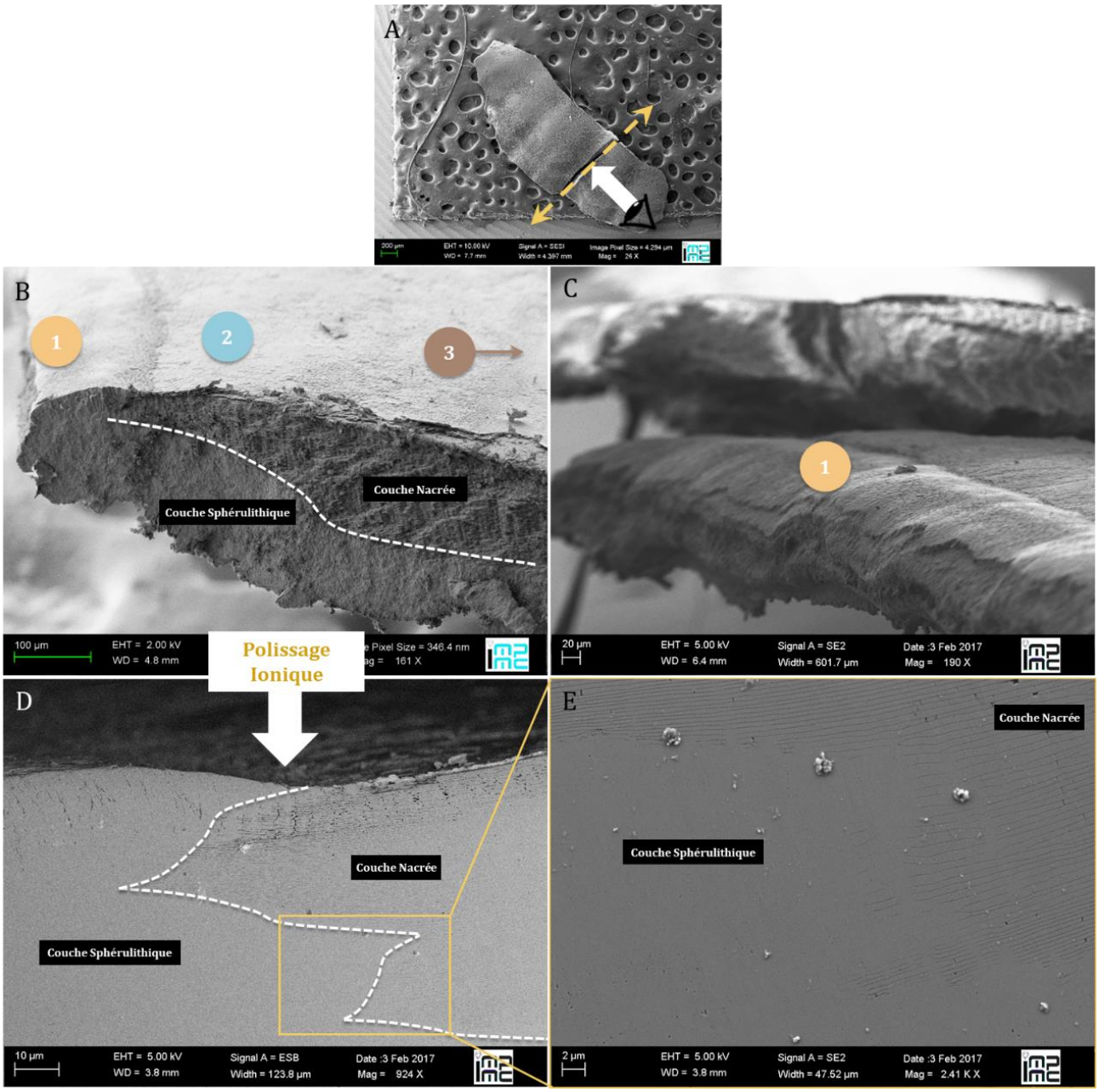


Figure 51 : *Présentation de la zone de transition entre la couche sphérulithique et a couche nacrée permettant d'illustrer la croissance discontinue de la coquille. Clichés SEM-FEG A) de la fracture réalisée perpendiculairement au bord de la coquille au sein du domaine de croissance ; B) de la vue de la tranche de la coquille avant polissage permettant de visualiser les deux couches superposées de la coquille ; C) de la vue antérieure de la coquille permettant de voir la superposition de couches formant la coquille ; D) de la vue de la tranche de la coquille après polissage ionique permettant de voir la naissance de la couche nacrée à partir de la couche sphérulithique ; et enfin E) à plus fort grandissement de la transition entre les deux couches.*

La ***Figure* 52** présente des clichés de la zone comportant les toutes dernières tablettes de nacres formées, au niveau de la transition avec la couche sphérulithique. La **figure** 52A et B présentent une vue générale et les **Figure**s 52C et D sont des clichés à plus fort grandissement.

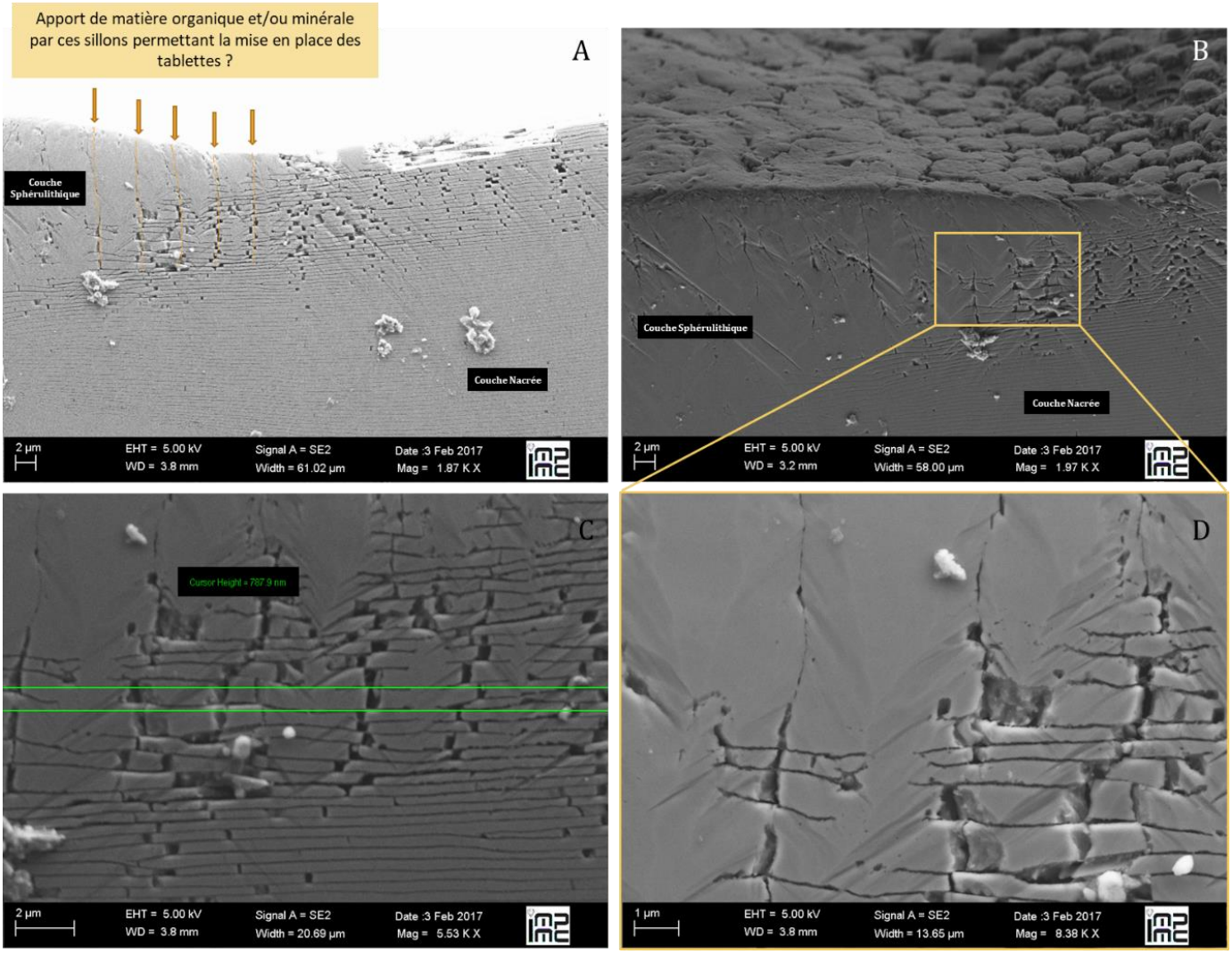


Figure 52: *Clichés SEM-FEG des plus jeunes tablettes en cours de formation à la transition directe avec la couche sphérulithique, montrant A et B) une vue globale de cette transition permettant de mettre en évidence des sillons entre la surface et les tablettes en profondeur ; à plus fort grandissement C) les toutes dernières tablettes formées qui ont une organisation irrégulière inhabituelle de la nacre déjà formée et D) les sillons à partir desquels les tablettes semblent se former.*

Dans cette zone, on observe en profondeur (environ 10µm sous la surface) les tablettes nouvellement formées qui sont irrégulières, non uniformes en taille et en forme contrairement aux tablettes sous-jacentes plus matures. (***Figure* 52C**). Ceci semble indiquer que les tablettes

continuent à croître même sous la couche sphérulithique qui a été déposée par l'animal au niveau de ce bord de croissance

De plus, on distingue des sortes de sillons verticaux entre la surface et les tablettes en formation qui semblent être le lieu de formation des nouvelles tablettes. Ces sillons sont bien visibles sur le cliché à fort grandissement présenté sur la ***Figure* 52D**. Ils présentent un espacement relativement régulier de 2-3µm et traverse la couche sphérulitique jusqu'à atteindre la couche nacrée recouverte.

Au vue de ces observations, l'idée que ces sillons sont une voie par laquelle des composants organiques et/ou minéraux seraient apportés, pour permettre la fin de la formation des tablettes de nacre, peut être envisagée. (Flèches jaunes sur la ***Figure* 52A**).

IV. Conclusion du chapitre

Ce chapitre permet ainsi de compléter la vision globale que l'on dispose de la structure de la coquille de *Haliotis tuberculata* et plus généralement des gastéropodes et des mollusques en décrivant finement l'ultrastructure de la nacre chez *Haliotis tuberculata* et de la zone de transition entre la couche sphérulitique et la couche nacrée. Les observations que nous avons réalisées permettent de mettre en lumière de nouveaux aspects à intégrer pour la compréhension des mécanismes de croissance de la coquille qui ne sont pas encore parfaitement compris et notamment la transition entre la couche sphérulithique et la couche nacrée qui est une zone très peu étudiée.

La ***Figure* 53** résume un certain nombre d'observations présentées dans ce chapitre et propose un modèle de croissance de la coquille en se focalisant sur les évènements qui auraient lieu au niveau de la jonction entre la couche sphérulithique et la couche nacrée dans le domaine de croissance de la coquille.

La coquille semble croître selon deux mécanismes distincts en fonction de la zone observée.

On a d'abord une croissance en longueur s'opérant exclusivement à la transition entre la couche sphérulithique et la couche nacrée au niveau de la zone de croissance située près du bord ventral de la coquille. A ce niveau, il existe un contact direct entre les deux couches.

La croissance commence tout d'abord par la mise en place d'une couche sphérulitique qui correspond au **point 1** de la ***Figure* 53**.

Les observations au **point 2** ont montré qu'en surface se trouvent les toutes premières tablettes de nacre qui se forment sur les cristaux de la couche sphérulithique qui semblent constituer un support pour la mise en place des tablettes. Ces observations semblent en accord avec les observations de Olson *et al.* en 2013 qui ont montré l'existence d'une continuité

cristallographique entre les cristaux d'aragonite de la couche sphérulitique et les tablettes de la couche nacrée.

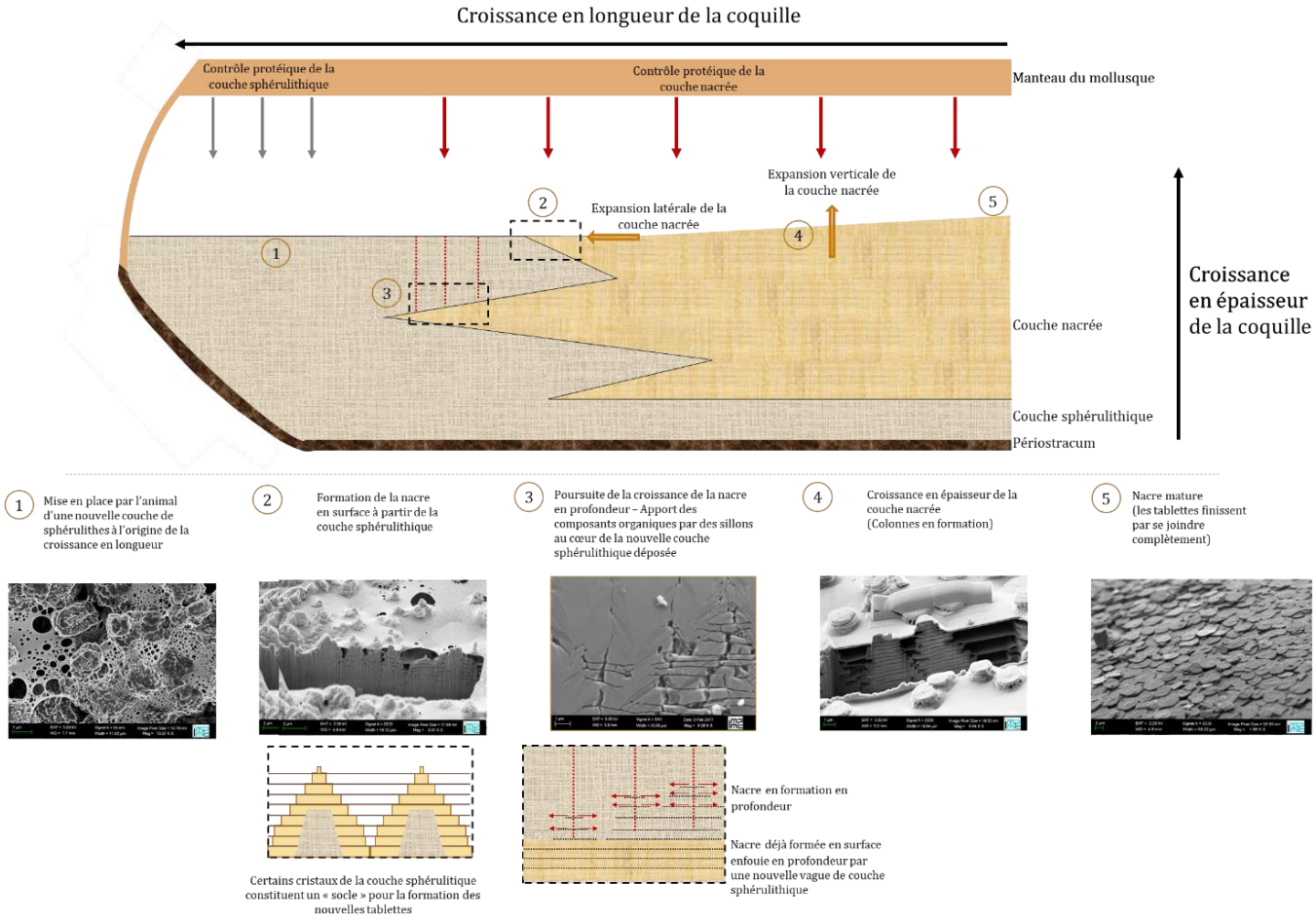


Figure 53 : *Schéma récapitulatif des observations effectuées des différentes zones d'intérêts en croissance permettant de proposer un modèle de croissance de la coquille de l'ormeau Européen Haliotis tuberculata*

Au cours de la croissance, la couche nacrée en formation va parfois être recouverte par une nouvelle couche sphérulitique. Ainsi certaines tablettes dont la croissance n'est pas terminée se retrouvent enfouies.

La croissance de ces tablettes enfouis va ainsi se poursuivre en profondeur. L'observation de sillons reliant la surface et les tablettes en formation suggère que cette croissance est permise par

des composants minéraux et/ou organiques qui y sont acheminés. Ce mécanisme est schématisé par le **point 3** de la ***Figure* 53**.

D'autre part la croissance en épaisseur de la coquille caractérisée par la formation des colonnes de tablettes d'aragonite qui sont empilées de manière régulière et uniforme, représenté par le **point 4** de la ***Figure* 53**. Cette croissance est très étudiée dans la littérature. La base de ces colonnes serait constituée des premières tablettes formées dans le domaine de croissance.

Les colonnes en formation se distinguent les unes des autres car les tablettes ne sont pas toutes accolées les unes aux autres. Puis, suite à la croissance latérale des tablettes, elles forment un matériau dense typique de la nacre mature comme le montre le **point 5** de la ***Figure* 53**.

Dans ces deux mécanismes, l'implication de la fraction organique apparait comme primordiale. En effet, la régionalisation du manteau, l'organe de contrôle de la biominéralisation de la coquille, proposée par (Sudo *et al.*, 1997 et Jolly *et al.*, 2004), suggère que cette transition de la couche sphérulithique vers la couche nacrée de fait sous la gouverne d'un contrôle protéique spécifique de la région du manteau en contact avec la coquille.

Dans la suite de ce manuscrit, nous avons concentré nos analyses sur les mécanismes de croissance des colonnes de la nacre notamment à partir de l'observation d'une lame fine obtenue par FIB dans la zone de croissance de la nacre que nous avons présentée précédemment.

L'étude de l'ultrastructure de la nacre, en particulier au niveau des zones de croissance par des techniques de haute résolution spatiale (HR-TEM, STXM et EELS) est détaillée dans le deux prochains Chapitres. Le Chapitre III est consacré à l'étude de la surface minérale des plaquettes d'aragonite et le Chapitre IV traite de l'interface organo-minérale au niveau des zones de croissance. Ces analyses sont complétées par des études multinucléaires de Résonnance Magnétique Nucléaire (RMN) à l'état solide afin de corréler nos observations avec des données structurales à l'échelle atomique.

Chapitre III : Etude des environnements minéraux désordonnés

I. Introduction

Ce chapitre est dédié à l'analyse des environnements minéraux désordonnés au sein de tablettes d'aragonite de la nacre. Il est présenté sous forme d'un article soumis à *Crystal Growth and Design* et intitulé : *« Heterogeneities within the Disordered Mineral Layer of Aragonite Platelets in Abalone Nacre* ».

La nacre possède à l'échelle microscopique une architecture lamellaire hybride régulière. Néanmoins, des observations à plus petite échelle rendent compte d'une organisation beaucoup plus complexe de ce matériau.

Un nouvel élément essentiel de l'ultrastructure de ce matériau biologique a été mis en évidence récemment par l'observation d'une couche non cristalline à la surface des tablettes d'aragonite de la nacre. Cette couche de surface a été observée pour la première fois (Nassif et al en 2005) par HR-TEM au sein des tablettes d'aragonite de la nacre mature de *Haliotis laevigata.* Elle se présente sous l'aspect d'une couche uniforme non cristalline d'une épaisseur régulière de 5 nm environ.

Cette couche aurait pu être perçue comme un artéfact dû à l'irradiation du faisceau d'électrons du microscope mais les auteurs ont écarté cette hypothèse en montrant que cette couche amorphe cristallise en aragonite lors de la focalisation du faisceau d'électrons. Des analyses par RMN à l'état solide des noyaux ^{1}H et ^{13}C réalisées sur les mêmes échantillons ont permis aux auteurs de démontrer l'existence d'environnements minéraux désordonnés qu'ils ont attribués à de l'ACC.

L'observation de cette couche amorphe à la surface des tablettes d'aragonite a changé la vision classique de l'organisation des tablettes de la nacre où un contact direct était souvent décrit entre l'aragonite cristalline et le feuillet organique qui l'entoure.

Le mécanisme de formation de cette couche amorphe n'est pas encore compris mais les auteurs proposent deux hypothèses. La première serait que cette couche serait stabilisée par l'incorporation « d'impuretés », lors de la cristallisation de l'aragonite, qui se concentreraient à l'extrémité de la tablette. La deuxième serait que cette couche stabiliserait l'orientation cristalline inhabituelle selon l'axe [001] de l'aragonite. La très haute énergie de surface serait ainsi diminuée. Quant au rôle de cette couche amorphe, elle agirait comme une couche favorisant l'interface entre la tablette de minéral et le feuillet organique.

L'existence de cette couche amorphe peut être aussi reliée aux mécanismes de formation proposés pour la nacre. En effet la présence de cette couche de surface amorphe pourrait être la conséquence de l'existence de précurseurs minéraux amorphe et résulterait de leur agrégation lors de la formation de l'aragonite. Cette hypothèse a été proposée par Xu *et al.* en 2013 suite à l'observation chez le bivalve *Perna viridis* d'une couche amorphe à la surface de tablettes de nacre en croissance.

Si l'étude de cette couche amorphe apparaît primordiale pour la compréhension des mécanismes de biominéralisation de la nacre, il n'existe que très peu d'études structurales sur cette couche.

Dans les travaux soumis au journal *Crystal Growth and Design*, nous avons effectué une étude structurale de haute résolution de cette couche de surface chez *Haliotis tuberculata*.

Dans cette étude, les observations ont été réalisées sur une lame FIB réalisée dans la zone de la nacre en formation décrite dans le chapitre précèdent et dont la préparation sera détaillée dans la section Matériel et Méthode du chapitre IV. Sur cette lame, on distingue à la fois des zones où les tablettes sont en croissance et des zones où les tablettes sont déjà formées. Les observations présentées dans ce chapitre concernent uniquement les zones déjà formées contrairement au Chapitre IV dédié aux zones en croissance.

L'observation par HR-TEM de cette lame a révélé la présence d'une même couche non cristalline en surface des tablettes d'aragonite d'une épaisseur de 5 nm.

Nous avons réalisé une étude multinucléaire (^{1}H, ^{13}C, ^{23}Na, ^{43}Ca) par RMN à l'état solide de la couche nacrée d'*Haliotis tuberculata*. Cette étude nous a permis de caractériser finement la composition ionique de cette couche de surface. Les cations ont été étudiés par RMN des noyaux ^{23}Na et ^{43}Ca alors que les anions ont été étudiés par RMN du noyau ^{13}C.

La difficulté d'une telle étude résidait dans le fait que les fractions organiques et minérales sont composées de carbone. Pour étudier spécifiquement la fraction minérale désordonnée par RMN du noyau ^{13}C, nous avons utilisé le fait que les temps de relaxation spin-réseau $T_2(^{1}H)$ des fractions organique et minérale sont très différents. De ce fait, nous avons mis au point une séquence où un écho sur le noyau ^{1}H sélectionne les espèces de plus long $T_2(^{1}H)$ pour ensuite transférer leur aimantation au noyau ^{13}C (Séquence ^{1}H-echo-^{13}C CP MAS).

Concernant les cations Ca^{2+}, il n'existe que très peu d'étude de carbonate de calcium par RMN du noyau ^{43}Ca en raison de sa très faible sensibilité due à un rapport gyromagnétique bas (7% de celui du ^{1}H) et une très faible abondance naturelle (0,14%). Pour cela, nous avons bénéficié de l'utilisation d'un très haut champ magnétique statique (16,5 T) couplé à une séquence qui permet d'augmenter le signal de noyaux quadripolaires. La différenciation des environnements cristallins et désordonnés s'est faite sur la base d'une différence en temps de relaxation longitudinaux $T_1(^{43}Ca)$.

Enfin, pour la première fois, la présence d'ion Na^{+} dans un environnement désordonné a été démontré par RMN du noyau ^{23}Na.

Cette étude a révélé que le domaine minéral désordonné n'est pas de l'ACC *stricto sensu* contrairement à ce qui souvent affirmé et que sa nature hétérogène est caractérisée par :

- La présence d'ions carbonates et bicarbonates.

- Une variation du désordre local.
- La présence de molécules d'eau.
- La présence d'ion Ca^{2+} et d'ion Na^{+} comme contre-ions ; ces derniers étant surtout associés aux ions bicarbonates.

Ces observations semblent montrer que finalement au sein du « désordre », il y a quand même de l' « ordre », révélant une organisation de la nacre toujours plus surprenante d'une découverte à l'autre.

II. Article 1: Heterogeneities within the Disordered Mineral Layer of Aragonite Platelets in Abalone Nacre

Widad Ajili,[a] Guillaume Laurent,[a] Nicolas Menguy,[b] Axel Gansmuller,[c] Sylvain Huchette,[d] Stéphanie Auzoux-Bordenave,[e] Nadine Nassif[a] and Thierry Azais[a]*

[a] *Sorbonne Université, CNRS, Collège de France, Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris (LCMCP), 4, place Jussieu, F-75005, Paris, France.*

[b] Sorbonne Université, UMR CNRS 7590, Muséum National d'Histoire Naturelle, IRD, Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie, IMPMC, F-75005 Paris, France.

[c] *CRM2 UMR 7036 CNRS-Université de Lorraine, Bvd. des Aiguillettes, BP 70239, Vandoeuvre-lès-Nancy F-54506, France*

[d] *Ecloserie France Haliotis, Kérazan, 29880 Plouguerneau, France*

[e] *Sorbonne Université, UMR BOREA, Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques, MNHN/CNRS-7208/IRD-207/UPMC, Muséum National d'Histoire Naturelle, Station Marine de Concarneau, Place de la Croix 29900 Concarneau.*

* corresponding author : thierry.azais@upmc.fr

Submitted to Crystal Growth and Design, September 2018

Abstract

A disordered mineral layer is described at the surface of platelets in abalone nacre of *Haliotis laevigata*. Since this observation has changed the view of the organo-mineral interface proposed previously as a direct interaction between the aragonite crystalline core and the organic matrix. The structural description of such disordered mineral domains is described as homogeneous being a key for a comprehensive view of the organization of such hybrid material. Here, we investigate nacre in European abalone *Haliotis tuberculata* through high-resolution transmission electron microscopy (HR-TEM) and multinuclear solid state nuclear magnetic resonance (ssNMR). The presence of a disordered domain around aragonite crystals is likely shown through HR-TEM observations. The structure and the ionic composition of the disordered mineral environments are investigated through ^{1}H, ^{13}C, ^{43}Ca and ^{23}Na ssNMR. Interestingly, we demonstrate that the disordered mineral domain in nacre is heterogeneous in terms of structure and composition. At least 3 different carbonates species are evidenced, including CO_3^{2-} and HCO_3^- present in the same domain and closely associated to rigid H_2O molecules. The local disorder around these ions is not homogeneous. Indeed, some CO_3^{2-} have an aragonitic environment and are rather ordered whereas the chemical surrounding around HCO_3^- is highly distributed. The analysis of potential cations as counter-ions revealed the presence of disordered Ca^{2+} and, for the first time, the presence of Na^+ closely associated to HCO_3^-. Based on these structural data, we propose an atomic-level model for the disordered domain in *Haliotis tuberculata*'s nacre where the protonation level of carbonate ions, the proportion of sodium ions and the local disorder are increasing from the inner to the outer part of the surface layer. These results give an unprecedented structural view of the surface domain around aragonite tablets in nacre.

Introduction

The shell of marine mollusks is a composite material composed of calcium carbonate, $CaCO_3$, intimately associated with an organic matrix secreted by the mantle epithelial cells[1–3]. An outer organic layer (periostracum), an intermediate prismatic layer and an internal nacreous layer are typically observed in adult shells. The mineral formation is controlled by specific macromolecules secreted by the mantle[4–8]. This mineral phase represents about 95 w% of the natural composite material[9]; the remaining 5 w% being the organic matrix.

The mineral phase in nacre crystallized in the form of aragonite tablets and their organization varies from one species to another, forming brick wall-like disposition for bivalves or a columnar structure in the case of gastropods[10] Because of its lamellar architecture and hybrid composition, nacre exhibits remarkable mechanical properties especially in terms of fracture resistance which can be three thousand times higher compared to a single crystal of aragonite[11]

The resulting confluent aragonite tablets are characterized by a diameter ranging from 5 to 10 µm and a thickness of about 0.5 µm. A 20 nm thick organic matrix layer composed of polysaccharide and proteins surrounds the mineral tablets[12,13].

The polysaccharide is made of β-chitin. The antiparallel chains of α-chitin in arthropods and fungi for example, are the most common form found in Nature while β-chitin self-organized in parallel polymeric chains. The second organic component is composed of two different types of proteins. Silk proteins present similarities with the arthropod silk. They are the major protein fraction and are present as a hydrogel-like state in interaction with the β-chitin layer[14]. This fraction is proposed to be involved in nacre formation by controlling the growth in thickness of aragonite tablets[14]. The second type of proteins is the so-called “acidic proteins” as they are soluble in acidic extracting-solvent. They are particularly rich in aspartic amino acid and are proposed to be involved in the nucleation of calcium carbonate and in the selection of the aragonite polymorph by inhibiting calcite nucleation[6,7,15].

The nacre formation is described to begin with the set-up of the organic layers acting as a scaffold for the building of the nacreous layers. The mineral phase is described to grow afterwards in-between these layers.

Mature aragonite tablets are described as single crystals due the observation of a unique electron diffraction pattern[16] and an homogeneous crystalline network by HR-TEM[17]. Moreover, these crystals are co-oriented along their *c*-axis parallel to the platelets stacking. Different crystallization processes are proposed in the literature to explain such organization and no consensus appears to emerge yet. Heteroepitaxy mechanism was first described. In this process, the organic fraction acts as a template where the carboxylic groups are the nucleation sites for the calcium ions; the overall matching with the crystalline lattice of aragonite[18]. Afterwards, mineral bridges between adjacent tablets where described implying the common homoepitaxial process for ionic crystals[17,19]. In addition, scanning electronic microscopy (SEM)[14] and atomic force microscopy (AFM)[20] observations revealed that aragonite crystals display a specific arrangement resulting from a possible assembly of colloidal nanoparticles with an average size of 50-100 nm. This would discard an epitaxial mechanism. One alternative is that calcium carbonate precursors are first deposited as amorphous nanograins that crystallized afterwards. Moreover, it was shown that intracrystalline organic molecules are entrapped within individual crystallites inducing anisotropic lattice distortions in *Perna canaliculus*[21]. Concomitantly, aragonite tablet in nacre is more recently described as mesocrystal with co-oriented nanocrystals diffracting like a single crystal[22]. Thus, aragonite tablets are not perfect single crystals and a local disorder exists at the nanoscopic scale.

In parallel, an amorphous calcium carbonate (ACC) layer at the surface of the aragonite tablets from mature nacre in *Haliotis laevigata* was demonstrated through HR-TEM and ^{13}C ssNMR[23]. Such a layer was also observed in forming nacre tablets in *Perna viridis* [24]. In fact, the exact nature of this amorphous-like phase is still unclear due to the difficulties in determining the atomic composition but also the role of this layer although the presence of a distinct surface mineral domain around the crystalline core of some biominerals in calcified tissues appears more common[25]. Different attempts are found in the literature to clear these issues. More precisely, specific analytical techniques are used

to obtain structural information at the atomic level. Solid state NMR appears a key technique in this field[26,27]. As mentioned above, ^{13}C ssNMR was efficient to reveal disordered carbonates in a proton-rich environment in the nacre of *Haliotis laevigata* that were assigned to the ACC surface layer of nacre[23]. Additionally, it was shown that this surface layer contains hydrogen carbonate groups and water molecules presumably at its outer surface[28]. More recently, the whole aragonitic shell of *Perna canaliculus* (not only the nacreous part) was studied through ssNMR[29] in order to describe the organo-mineral interface. Different disordered carbonate environments were identified and assigned to "exposed carbonate", in interaction with the organics molecules, and "buried carbonate" defects within the mineral bulk in the aragonite tablet surface region.

In this work, we report the detailed structural analysis of the disordered mineral domain in nacre of the European abalone *Haliotis tuberculata*. The larval development and the shell formation were previously studied showing that the early larval shell is mostly composed of ACC, followed subsequently by the deposition of aragonite in the juvenile and the adult shells[30,31]. The abalone adult shell is composed of two main aragonitic layers underlying the periostracum, namely the outer sphrerulitic layer and the innermost nacreous layer. The abalone nacre has been extensively studied revealing a typical columnar structure, remarkable mechanical properties and potential uses in jewellery and as biomaterial[4,12,13,32,33]. To go further, we performed in this study an atomic level analysis of the aragonite surface layer in *Haliotis tuberculata*'s nacre through HR-TEM and multinuclear (including ^{1}H, ^{13}C, ^{43}Ca and ^{23}Na) ssNMR in order to localize spatially the disordered mineral environments and identify the nature of the ions that compose it. Our results reveal certain structural heterogeneities within the disordered mineral domain that therefore cannot be assigned to an ACC phase *stricto sensu*. In particular, we highlight the presence of different divalent (CO_3^{2-} and Ca^{2+}) as well as monovalent ions (HCO_3^{2-} and Na^{+}). In addition, we analyzed the local disorder around these ions that is found to be not homogeneous in such disordered domain. This new data provides new insights to improve our understanding of the organo-mineral interface fundamental for the formation of this biological material.

Experimental section

Biological material and reference sample synthesis

One and four years-old European abalone, *Haliotis tuberculata,* specimens were obtained from *France Haliotis* farm (Plouguerneau, France). After dissection, shells measuring around 1 (1-year-old) or 5 cm (4-years-old) long were washed with distilled water.

ACC reference sample was prepared according to the synthesis reported by Jiang *et al.*[34]. Mg-ACC was obtained by mixing calcium chloride (0.1 M) and magnesium chloride hexahydrate (0.5 M). Anhydrous sodium carbonate (0.1 M) was then added rapidly to the mixed solution though mechanical stirring at ambient temperature. The precipitated colloidal phase was filtrated immediately and washed by ethanol. The precipitate was dried in a vacuum desiccator for one day. The obtained magnesium amorphous calcium carbonate (Mg-ACC) powder was observed by Scanning Electronic Microscopy (SEM) revealing the occurrence of spherical nanoparticles typical of Mg-ACC. The amorphous nature of the particle was checked by X-ray diffraction (XRD).

Aragonite reference sample was prepared according to synthesis reported by Matijevic *et al.*[35] where 0.25 M of $CaCl_2$ was mixed to ^{13}C-labeled Urea (2.25 M). The obtained solid was filtrated using 0,22 µm Millipore membranes and rinsed with distilled water. The precipitate was finally dried in a vacuum oven overnight at 90°C and then stored in a desiccator. The sample was examined by SEM and XRD revealing a pure aragonite phase of needle-like morphology.[35]

HR TEM

Focused Ion Beam (FIB) was performed on the nacre layer of a *Haliotis tuberculata* 1 year-old shell using Zeiss Crossbeam Neon40 at IMPMC (Sorbonne Université, Paris). A thin section of approximatively 100 nm in thickness has been prepared and observed by HR-TEM. The observations experiments were performed on a JEOL-2100F microscope operating at 200 kV, equipped with a field

emission gun, a JEOL detector with an ultrathin window allowing detection of light elements, and a scanning TEM (STEM) device, which allows Z-contrast imaging in HAADF mode (STEM-HAADF).

Solid-State NMR

For the ssNMR analyses, the outer layers (the periostracum and the sphrerulitic layer) of *Haliotis tuberculata*'s shell of a 4-years-old specimen were removed by sanding in order to obtain only the nacreous layer. Nacre was then manually grinded in an agate mortar and the resulting powder directly packed into a 7 mm (~400 mg) or a 4 mm (~150 mg) NMR rotor.

^{13}C solid state NMR spectroscopy experiments were carried out on a Bruker Avance III spectrometer operating at a magnetic field of 7.1 T. The corresponding Larmor frequencies are 300.29 MHz for ^{1}H and 75.51 MHz for ^{13}C. Powder samples were packed into 7 mm zirconia rotors and spun at the magic angle at a frequency ν_{MAS} = 5 kHz. Direct acquisition spectrum was recorded with a recycle relay RD = 2000 s. ^{1}H-^{13}C CP MAS experiments were recorded with RD = 1 or 10 s. ^{1}H-echo-^{13}C CP MAS experiment was performed through the addition of a ^{1}H echo sequence ($\pi/2$-τ-π-τ), before a standard cross polarization sequence. The ^{1}H echo delay τ corresponds to one rotor period *i.e.* 0.2 ms. The contact time t_{CP} is indicated in the **Figure** captions. Two dimensional ^{1}H-echo-^{13}C CP MAS experiment was performed through the addition of an evolution period (t_1) after the ^{1}H-echo allowing the refocusing of the ^{1}H chemical shift. Two dimensional ^{1}H-echo-^{13}C CP MAS spectrum was recorded using 6720 transients and 32 t_1 increments. The set-up of the Hartmann-Hahn condition was performed directly on the nacre sample in order to maximize the sensitivity.

Crystalline $NaHCO_3$ (>99.7%) and isotopically labeled crystalline $Na_2{}^{13}CO_3$ (>99.9%) references have been purchased from Sigma Aldrich. Low MAS experiments were performed on a Bruker NMR Avance III spectrometer operating at 14T (^{1}H NMR frequency of 600 MHz) with a Bruker 4mm MAS triple-resonance probe, at MAS frequency ν_{MAS} = 2 kHz. For $Na_2{}^{13}CO_3$, ^{13}C spectrum was recorded by direct ^{13}C excitation. For $NaHCO_3$, ^{13}C spectrum was recorded by ^{1}H-^{13}C

CP excitation (t_{CP} = 4ms). Δ_{CSA} and η_{CSA} were obtained by adjusting the spinning sideband intensities with the DMFIT software.

^{43}Ca solid state NMR spectroscopy experiments were carried out on a Bruker Avance III spectrometer operating at a magnetic field of 16.44 T. The corresponding Larmor frequency is 20,2 MHz for ^{43}Ca. Powder samples were packed into 4 mm zirconia rotors and spun at the magic angle at a frequency ν_{MAS} = 14 kHz. ^{43}Ca direct excitation after dual frequency sweep preparation (^{43}Ca DFS NMR) spectra were recorded with variable RD indicated in the **Figure** captions.

^{23}Na solid state NMR spectroscopy experiments were carried out on a Bruker Avance III spectrometer operating at a magnetic field of 7.1 T. The corresponding Larmor frequency is 79.390 MHz for ^{23}Na. Powder samples were packed into 7 mm zirconia rotors and spun at the magic angle at a frequency ν_{MAS} = 5 kHz. Direct acquisition spectra was recorded with a recycle relay RD = 0.5 s. ^{1}H-^{23}Na CP MAS experiments were recorded with RD = 10 s and t_{CP} = 1 ms. The set-up of the Hartmann-Hahn condition was performed directly on the nacre sample in order to maximize the sensitivity. Low power radio-frequencies irradiation conditions (typically ν_{RF}(^{1}H) = 5 kHz) were chosen in order to avoid distortion of the quadrupolar ^{23}Na lineshape. {^{23}Na}-^{1}H TRAPDOR experiments was recorded with RD = 10 s and a recoupling delay τ of 10 rotor periods *i.e.* 0.2 ms.

Chemical shifts were referenced (0 ppm) to TMS (^{1}H and ^{13}C), saturated aqueous solution of $CaCl_2$ (^{43}Ca) and NaCl (^{23}Na).

DFT calculations

Geometry optimizations and NMR shielding calculations were carried out by the DFT based CASTEP 8.0 DFT code[36,37] using the Perdew–Burke–Ernzerhof generalised gradient approximation (PBE-GGA)[38]. The structures were described as extended solids using periodic boundary conditions. In all calculations, the so-called “ultra-soft” pseudopotentials (USPP)[39] were used to describe the interaction of the valence electrons with the nuclei and core electrons.

The all-electron information, needed for the calculation of NMR shielding constants, was reconstructed using the GIPAW[36] method. The wave functions were expanded using a plane wave (PW) basis set with a kinetic energy cut-off of 600 eV that produces converged results for both the geometry optimisation and the calculation of NMR parameters.

The self-consistent field (SCF) calculations were considered to be converged when the total energy of the system was stable within 10^{-5}eV (10^{-7}eV for isolated molecules) for geometry optimization and 10^{-8} eV for NMR calculations. The integrals were calculated over the Brillouin zone with k-point spacing <0.03 $Å^{-1}$ on the Monkhorst–Pack (MP) mesh. The size of standard grid was set to 2 and size of fine grid to 3. For the Na_2CO_3[40] and $NaHCO_3$[41] crystals, geometry optimization was performed with semi-empirical dispersion correction using the Tkatchenko-Scheffler scheme prior to magnetic resonance calculations. For calculations on isolated molecules, one molecule was placed into a 25x25x25 Angström Supercell to avoid intermolecular interactions.

In order to compare the GIPAW calculated ^{13}C shielding values directly with the experimentally measured isotropic chemical shift values the following expression was used:

$$\delta_{iso,\ calc} = \sigma_{ref} - \sigma_{iso}$$

where σ_{ref} = 170.9 ppm is used for ^{13}C (TMS)[42,43]

Results and Discussion

Transmission electron microscopy

There are only few examples of the description of an amorphous layer in nacre. So far, only two articles reported such observation.[23,24] This is due in part to the exceptional mechanical properties of the material; the preparation of a thin section becoming a tedious and hazardous procedure. To overcome this problem, we used focused ion beam (FIB) to produce a thin cross-section. Then, the presence of a possible surface layer around the aragonite platelets of *Haliotis tuberculata*'s nacre was investigated by HR-TEM. **Figure** 1a. displays a STEM-HAADF view of the investigated zone where the stacking arrangement of the aragonite tablets is likely seen. HR-TEM observation reveals a continuous amorphous layer coating the crystalline lattice of aragonite. This result is in accordance with the previous observations performed on *Haliotis laevigata*[23] suggesting that the presence of an amorphous layer around aragonite tablets may be more general in abalone nacre than previously assumed. Indeed, the structure of the nacre depends on the mollusc. Nevertheless, within the class of gastropoda it is very similar[4,44,45]

The thickness of such domain is rather homogeneous and is around 5 nm. The amorphous layer appears a little bit thicker compared to that observed for *Haliotis laevigata*: 5 nm *vs*. 3-5 nm, respectively. Such slight difference in thickness is difficult to discuss since experiments from the literature were performed on an older specimen of a different species.

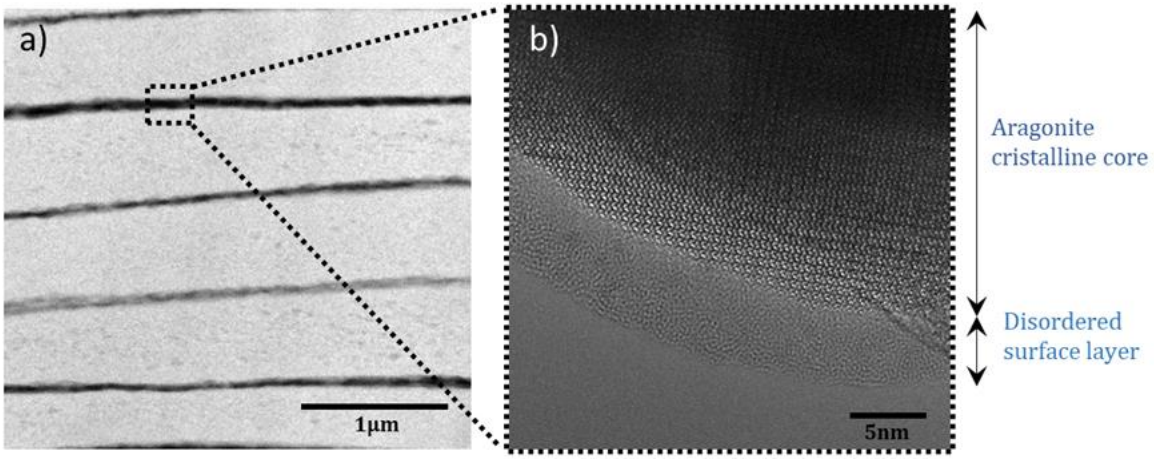


***Figure** 1: a) STEM-HAADF observations of a thin FIB section of Haliotis tuberculata nacre. b) HR-TEM images of the surface of aragonite tablets, revealing the presence of a disordered.*

Solid state NMR study of disordered mineral environments

Carbonate and bicarbonate ions

Interestingly, one open question is the nature of this layer described as an amorphous mineral domain in the literature. To unveil the nature of this surface domain, we used ssNMR to clear its ionic composition. As mentioned above, solid state NMR is a particularly suitable spectroscopy for the study of mineralized biological material thanks to its non-destructive aspect and enables the study of organic and mineral species independently or in a correlated manner in order to probe their interfaces[46,47]. Moreover, it was shown that ssNMR allows the specific edition of surface (*vs.* bulk) biomineral species and provides access to structural and dynamical information at the atomic scale for the surface layer of different biominerals[25,29].

Since nacre is composed of carbon-containing species in both the organic and the mineral fractions. The choice of specific NMR sequences allows the edition of the different components of nacre such as aragonite from the mineral tablets or the surrounding organic matrix. Significantly, **Figure** 2 displays the direct ^{13}C and ^{1}H-^{13}C CP MAS NMR spectra of *Haliotis tubercultata*'s nacre. As the ^{13}C chemical shift allows the identification of the different $CaCO_3$ crystalline polymorphs (calcite,

aragonite and vaterite)[48], the direct ^{13}C acquisition NMR spectrum (Fig. 2a) highlights that the mineral part is composed of highly ordered aragonite crystals as shown by the single thin characteristic resonance at $\delta(^{13}C)$ = 171 ppm (LW =0.6 ppm). Because of its small proportion (less than 5 w%), the organic fraction is hardly observed here.

In contrast, ^{1}H to ^{13}C cross polarization experiments reveals carbon species in proton-rich environment such as found in the organic matrix. Consequently, the ^{1}H-^{13}C CP MAS NMR spectrum, recorded with RD =1s and t_{CP} = 1 ms, reveals the main organic components of *Haliotis tubercultata*'s nacre and in particular, β-chitin (Fig. 2c - specific ^{13}C resonances of β-chitin are indicated in the spectrum).

Finally, the so-called "interfacial" mineral species, which are nearby a proton source, are also accessible through ^{1}H-^{13}C CP MAS NMR experiment. It was shown in the literature that they can be revealed by changing the CP MAS NMR conditions compared to those used to edit the organic components[23,28]. Indeed, longitudinal relaxation time parameters ($T_1(^{1}H)$ and $T_1\rho(^{1}H)$) are much longer for interfacial mineral species. Thus, by using longer recycle delay (RD = 10 s) and contact time (t_{CP} = 10 ms), the organic resonances are no longer observed and a single resonance centered on a similar chemical shift of aragonite is revealed (Fig. 2b). This signal, significantly broader and asymmetric (shoulder on the left), corresponds to interfacial carbonates of *Haliotis tuberculata*'s nacre nearby a ^{1}H-rich environment. Such observation is in accordance with similar experiments performed

with *Haliotis laevigata* for which the resulting ^{13}C signal were assigned to carbonates within the ACC-like surface layer of aragonite tablets[23].

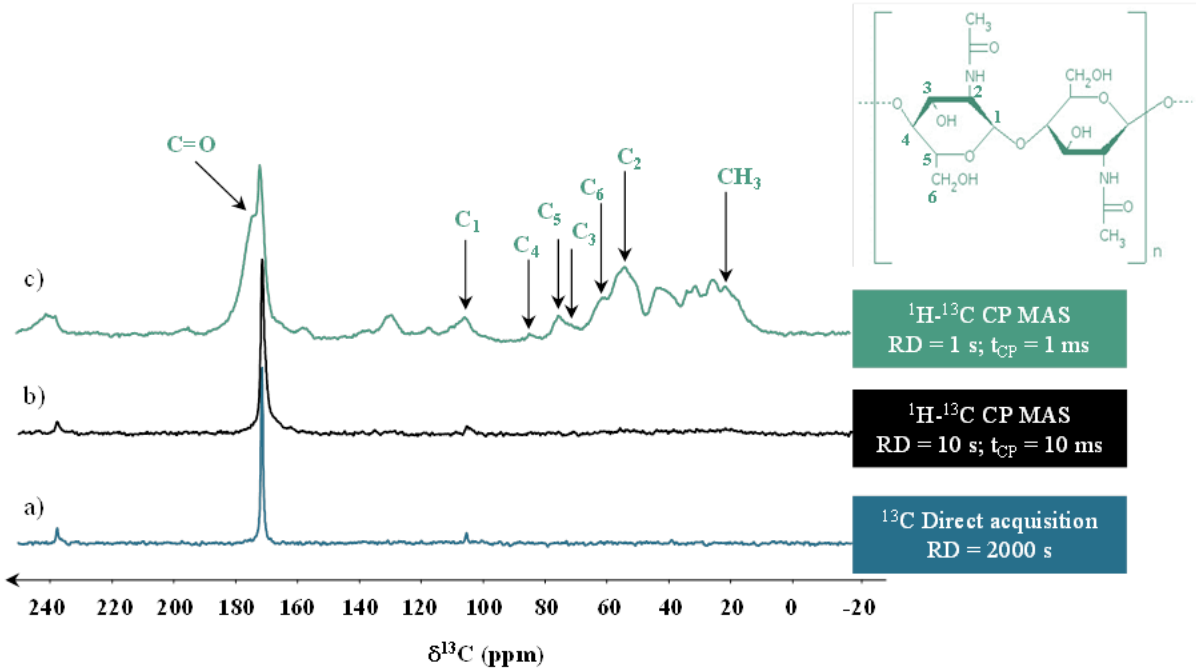


***Figure** 2. ^{13}C NMR spectra of Haliotis tuberculata's nacre: a) direct acquisition (RD = 2000 s), b) CP MAS (RD = 10 s; t_{CP} = 10 ms), c) CP MAS (RD = 1 s; t_{CP} = 1 ms). ^{13}C resonances from chitin are highlighted.*

Decreasing the contact time would be of great interest to characterize more precisely such disordered carbonates. However, at shorter contact time (t_{CP} < 10 ms), the strong overlap with the C=O signal from the organic phase prevents such study (Fig. S1). To avoid the presence of such unwanted ^{13}C organic signals, we have taken advantage of the difference in transverse relaxation time (T_2*(^1H)) between the organic and the disordered mineral domains, particularly at moderate static magnetic field and MAS frequency (B_0 = 7 T and ν_{MAS} = 5 kHz, respectively). Indeed, the proton homonuclear dipolar coupling is higher for the organic phase due to a higher density of proton leading to shorter T_2*(^1H) compared to the disordered mineral phase. Consequently, addition of a ^1H echo sequence ($\pi/2$-τ-π-τ), acting as a T_2*(^1H)-filter, before the cross polarization sequence (^1H-echo-^{13}C CP MAS experiment) enables the removal of organic ^{13}C signals at t_{CP} shorter than 10 ms (Fig. S1). The resulting ^1H-echo-^{13}C CP MAS NMR experiment at short contact time (t_{CP} = 1 ms) displays a

spectrum (Fig. 3) more complex than what is usually shown in the literature[23,28,29]. With the conditions set here, at least three different carbonates resonances are revealed: one sharp resonance at $\delta(^{13}C)$ = 171 (resonance A), a twice larger resonance at $\delta(^{13}C)$ = 170 ppm (resonance B) and a broad one ranging from 161 to 168 ppm with a maximum at 166 ppm (resonance C) that was barely observable at long t_{CP} (10 ms) (Table 1). Interestingly, this experiment highlights that the disordered mineral domain in nacre of *Haliotis tuberculata* is structurally more complex than a standard ACC phase as previously proposed for *Haliotis laevigata*[23]. The resonances A and B possess a chemical shift characteristic of CO_3^{2-} in an aragonitic environment but the assignment of resonance C is less straightforward. According to its chemical shift, resonance C might correspond to several environments: CO_3^{2-} in calcitic or in ACC-like environment (around 168.5 ppm[47]) or HCO_3^- in bicarbonate salt-like environment such as $NaHCO_3^-$ (167 ppm – see Table S1).

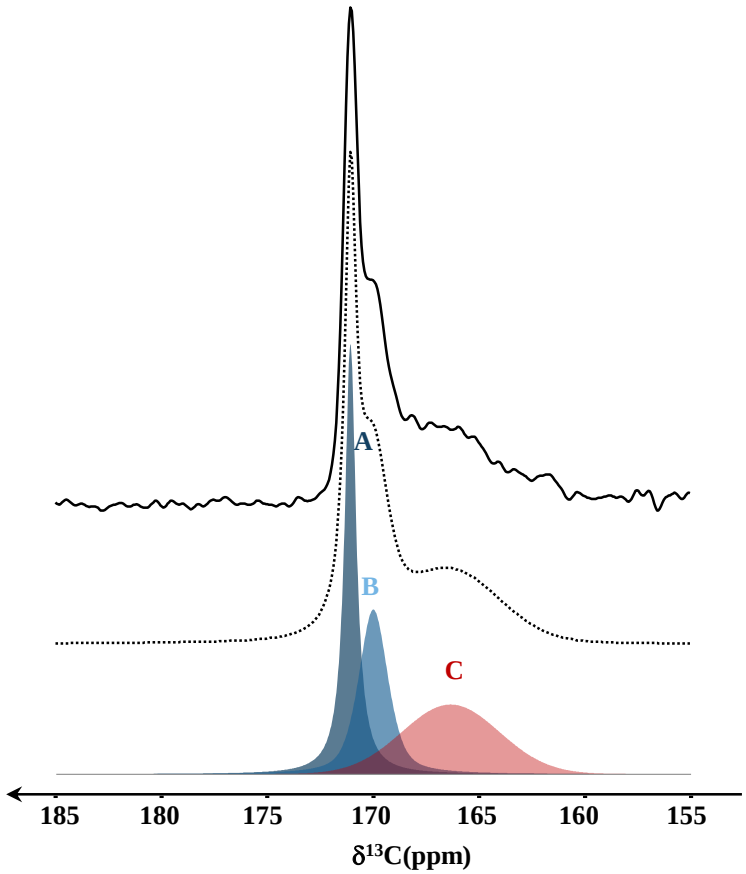


***Figure** 3: ^{1}H-echo-^{13}C CP MAS NMR spectrum of Haliotis tuberculata's nacre (RD = 10 s; tcp = 1 ms) together with its spectral deconvolution highlighting three main resonances.*

	Resonance A	Resonance B	Resonance C
^{13}C Chemical shift (ppm)	171	170	166
Linewidth (ppm)	0.7	1.6	5.4
Δ_{CSA} (ppm)	-53 ± 5	-55 ± 5	+43 ± 5
η_{CSA}	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.8 ± 0.1
T_{CH} (ms)	5 ± 0.5	1.9 ± 0.1	0.9 ± 0.02
Assignment	CO_3^{2-}	CO_3^{2-}	HCO_3^-

Table 1: ^{13}C NMR parameters of the resonance A, B and C evidenced in Fig. 3 and their relative assignement. The ^{13}C CSA tensorial parameters Δ_{CSA} and η_{CSA} are defined as follow: $\Delta_{CSA} = \delta_{33} - \delta_{iso}$ and $\eta_{CSA} = (\delta_{22} - \delta_{11}) / (\delta_{33} - \delta_{iso})$ with $\delta_{iso} = 1/3\ (\delta_{11}+\delta_{22}+\delta_{33})$ and the chemical shielding principal values δ_{11}, δ_{22}, δ_{33} ordered as follows: $|\delta_{33} - \delta_{iso}| \geq |\delta_{11} - \delta_{iso}| \geq |\delta_{22} - \delta_{iso}|$. The cross polarization parameters M_0 and T_{CH} are obtained through Eq. 1.

Besides the isotropic ^{13}C chemical shift, the chemical shift anisotropy (CSA) also informs on the chemical environment. The CSA depends on the electronic distribution around the nucleus and is thus very sensitive to the symmetry of the carbon sites. As a consequence, the origin of the CSA is essentially intramolecular for small rigid molecules with hybridized ^{13}C atomic orbitals. Hence for carbonate ions, the protonation state (CO_3^{2-} *vs.* HCO_3^-) can be determined on the basis of the CSA parameters (Δ_{CSA} and η_{CSA}). For this purpose, we compared theoretical DFT calculations both for free ions (CO_3^{2-} *vs.* HCO_3^-) and crystalline systems (Na_2CO_3 *vs.* $NaHCO_3$) and found very different CSA values being, to some extent, modulated by the crystalline environments (Table S1 and Fig. S2). We also experimentally determined (by the fitting of the spinning side bands manifold) the CSA parameters for the two crystalline reference samples Na_2CO_3 and $NaHCO_3$. It appears that the experimental and theoretical values for the crystalline reference samples are in good agreement and possess characteristic negative (≈ -50 ppm) and positive (≈ +60 ppm) Δ_{CSA} values for Na_2CO_3 and $NaHCO_3$ respectively (Fig. S2 and Table S1). Therefore the determination of ^{13}C CSA can inform on the nature of the various carbonate ions in nacre's disordered mineral domain.

Performing ^{1}H-^{13}C CP MAS experiment at slow MAS frequency (ν_{MAS} = 1.5 kHz) on *Haliotis tuberculata*'s nacre allows the acquisition of CSA spinning side bands manifold and the extraction of CSA parameters (Δ_{CSA} and η_{CSA}) for the three resonances, namely A, B and C. The corresponding spectrum is depicted in **Figure** 4 together with the corresponding fitting (CSA parameters are listed in Table 1). Whereas resonance C possesses a positive Δ_{CSA} value (43 ± 5 ppm), resonance A and B display close negative Δ_{CSA} values (-53 and -55 ± 5 ppm, respectively). According to the CSA parameters determined for the reference crystalline samples, Na_2CO_3 and $NaHCO_3$, resonances A and B can be safely assigned to CO_3^{2-} and the resonance C to HCO_3^-. Such result confirms that the disordered mineral domain in nacre is different from a biogenic ACC for which one homogeneous resonance is observed [49]. By contrast, different carbonates resonances are observed reflecting different chemical environments and different protonation state accounting relatively well structured CO_3^{2-} and more structurally disordered HCO_3^- possessing a distribution of ^{13}C chemical shifts.

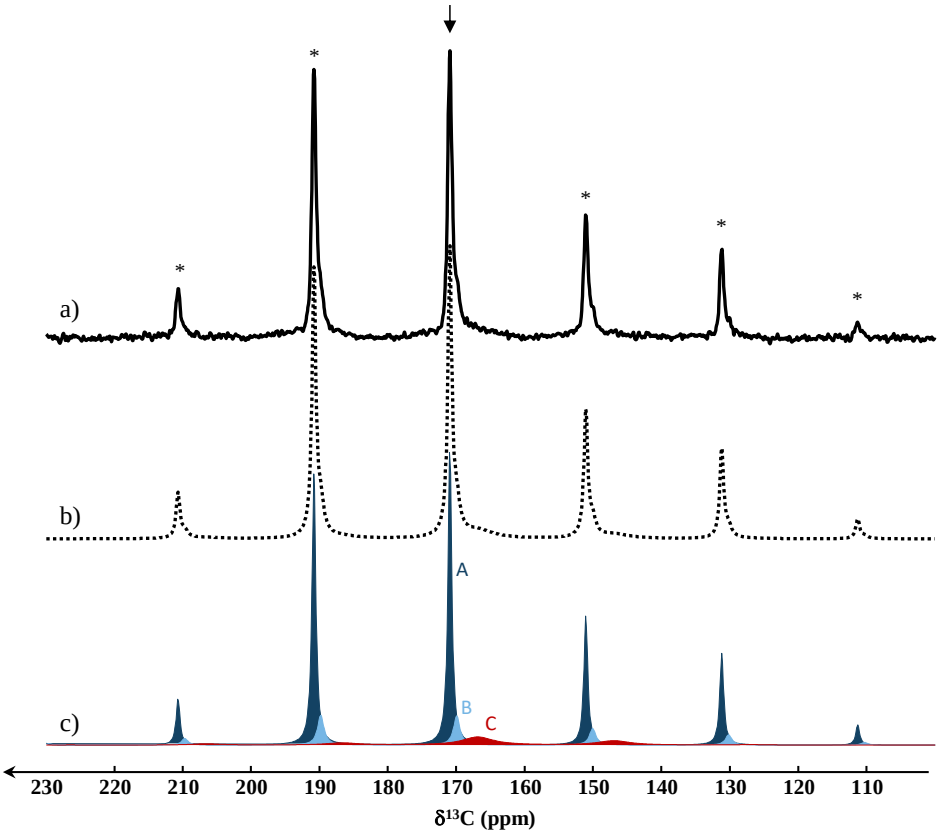


***Figure** 4. a) ^{1}H -^{13}C CP MAS NMR spectrum (ν_{MAS} = 1.5 kHz) of Haliotis tuberculata's nacre and b) the corresponding fitting: c) dark blue: resonance A; light blue: resonance B; red: resonance C. arrow: isotropic resonance; stars: spinning side bands.*

In order to identify the source of proton magnetization in the CP experiment, we performed two dimensional ^{1}H-echo-^{13}C CP MAS NMR experiment at short contact time (t_{CP} = 4 ms) as shown in **Figure** 5. Two main ^{1}H resonances are identified at 5 and 14.5 ppm corresponding to H_2O and proton from HCO_3^-, respectively. The assignment was made on the basis of 2D ^{1}H-^{13}C HETCOR spectrum of $NaHCO_3$ – see Fig. S3). The latter resonance confirms the presence of bicarbonate in the disordered domain. More specifically, both carbonates A, B and bicarbonate C correlate with protons from hydrogencarbonate and water. This result demonstrates a spatial proximity between the carbonate ions and these two sources of protons and suggests that these species are located in the same disordered domain. The careful examination of the correlation resonance involving bicarbonate C reveals a distribution of chemical shift both for ^{13}C (from 164 to 169 ppm) and ^{1}H resonances (from 13 to 15 ppm) where $\delta(^{1}H)$ decreases together with $\delta(^{13}C)$.

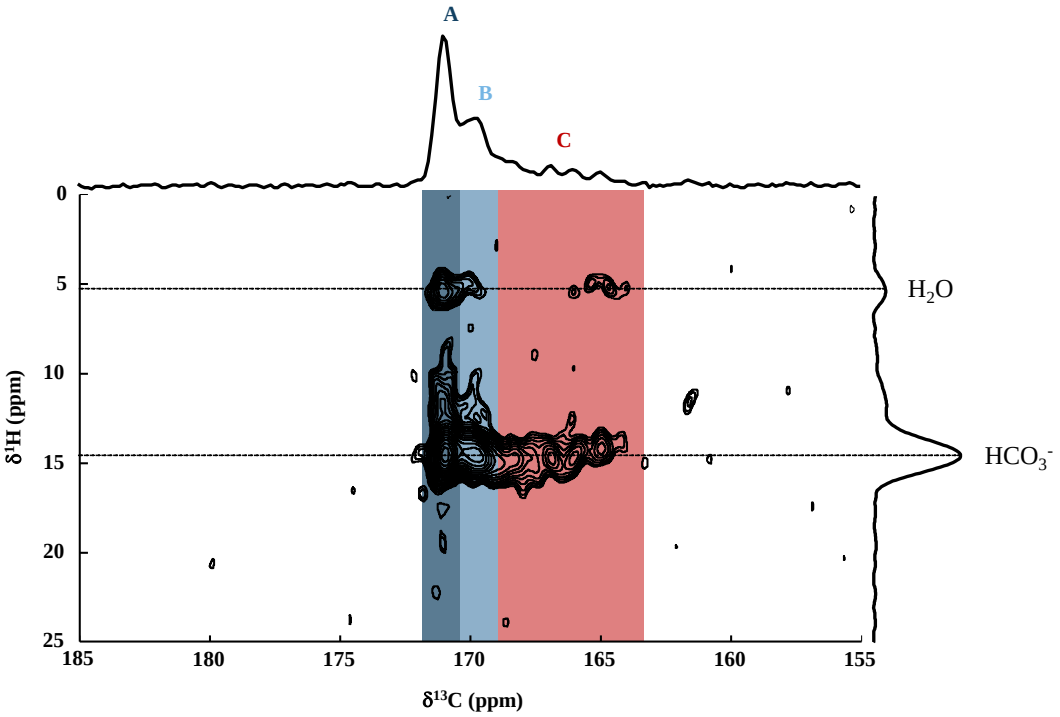


***Figure** 5. 2D ^{1}H-Echo-^{13}C CP 2D MAS NMR spectrum (t_{CP} = 4 ms) of Haliotis tuberculata's nacre.*

To go further in the study of the disordered environment, we performed an analysis of the CP dynamic through the variation of the contact time $t_{CP.}$ The ^{13}C magnetization evolution is a direct indication of the ^{1}H-^{13}C dipolar coupling strength that depends on the ^{1}H-^{13}C spatial proximity between the two nuclei and thus informs on proton environment around carbonate ions.

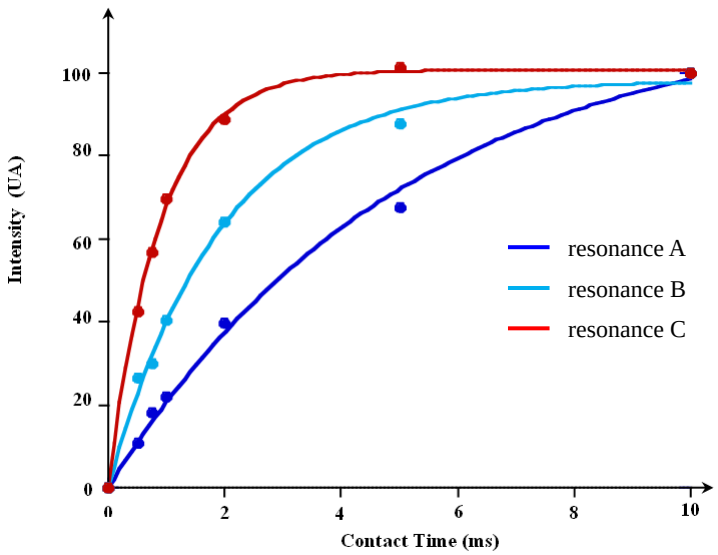


***Figure** 6: Evolution of the normalized ^{13}C magnetization recorded through variable contact time ^{1}H-Echo-^{13}C CP MAS NMR experiments for Haliotis tuberculata's nacre. Dark blue: resonance A; light blue: resonance B; red: resonance C. Solid lines are the numerical simulations according to Eq. 1.*

Figure 6 shows the evolution of the normalized ^{13}C magnetization for the three resonances of interest and the corresponding numerical simulation carried out through the classical I-S model:

$$M(t) = M_0 \times (1 - \exp(-t_{CP}/T_{CH})) \qquad (1)$$

where M_0, t_{CP}, T_{CP}, are the CP intensity, the contact time, the CP rate constant, respectively. Table 1 gathers the numerically extracted CP dynamic parameters. One can notice that no spin-lattice relaxation in the rotating frame is observed up to 10 ms. Different CP MAS behaviors emerge: resonance C exhibits a rapid growth of the ^{13}C magnetization (short T_{CP}) characteristic of bicarbonate for which the main source of proton is intramolecular. On the other hand, carbonate A possesses the slowest magnetization growth meaning the furthest proton source (water molecule and proton from bicarbonate according to the 2D HetCor). Interestingly, carbonate B possesses intermediate T_{CH} value revealing that carbonate B is closer to the proton source (still water molecule and proton from bicarbonate according to the 2D HetCor) than carbonate A.

As a conclusion, the ^{13}C ssNMR study reveals that disordered mineral domain in nacre of *Haliotis tuberculata* is composed of bicarbonates and at least two types of ^{1}H-polarizable carbonates. These carbonates are distinguished on the basis of their relative proximity respect to the proton source.

As a consequence, our results suggest that the interfacial disordered mineral domain is composed of *(i)* a first layer of slightly disordered carbonate in an aragonitic environment; *(ii)* a second layer of more distorted carbonates close to structural water and bicarbonates; and finally, *(iii)* a third layer near the outer surface with highly disordered bicarbonates.

If some ssNMR structural studies of carbonates ions and their interface in carbonate-based biomineralized systems exist in the literature[23,28,49–51] according to our knowledge, an equivalent study of the cations as counter-ions is missing. We first investigated the most abundant, namely Ca^{2+}.

Counter ion study : Ca^{2+}

There are only few examples of biogenic calcium carbonate study through ^{43}Ca solid state NMR. To the best of our knowledge, only one paper reports ^{43}Ca NMR spectra of aragonite from coral and from mother-of-pearl[52]. Such a study would be essential to investigate the local environment around Ca^{2+} within both the crystalline lattice and the disordered environments of the nacre tablets. The ^{43}Ca nucleus is of very low sensitivity due to its low natural abundance (0.14 %), its low gyromagnetic ratio (7% compared to $\gamma(^{1}H)$) and its spin 7/2. Thus, natural abundance experiments usually require large sample volumes, high magnetic field and signal-enhancing NMR pulse sequences such as dual frequency sweep (DFS)[53].

Figure 7a displays the ^{43}Ca DFS NMR spectra of *Haliotis tuberculata*'s nacre recorded at 16.44 T. A single thin resonance at $\delta(^{43}Ca)$ = -30 ppm is observed in agreement with a synthetic aragonite reference sample (Fig. 7e). However, we note that the linewidth is larger in the case of nacre revealing a higher local disorder in the crystalline lattice of the biogenic sample. It was shown that $T_1(^{43}Ca)$ in synthetic highly crystalline aragonite is unusually long for a quadrupolar nucleus[54]. Thus, reducing the recycle delay from 30 to 1 s (Fig. 7a-c) leads to the decrease of the relative intensity of the ^{43}Ca crystalline aragonite resonance and reveals the presence of a deshielded signal as a left broad shoulder (δ = -26 ppm, LW = 20 ppm). The gaussian lineshape of this signal suggests the presence of

highly disordered environments (Fig. 7d). This is confirmed by the comparison with the ^{43}Ca DFS NMR spectrum of an ACC reference sample that displays analogous position and linewidth (Fig. 7f). To the best of our knowledge, this is the first time that highly disordered Ca^{2+} environments are evidenced in nacre. This result strongly suggests that Ca^{2+} ions localize within the disordered mineral domain as counter-ions of the carbonates evidenced previously.

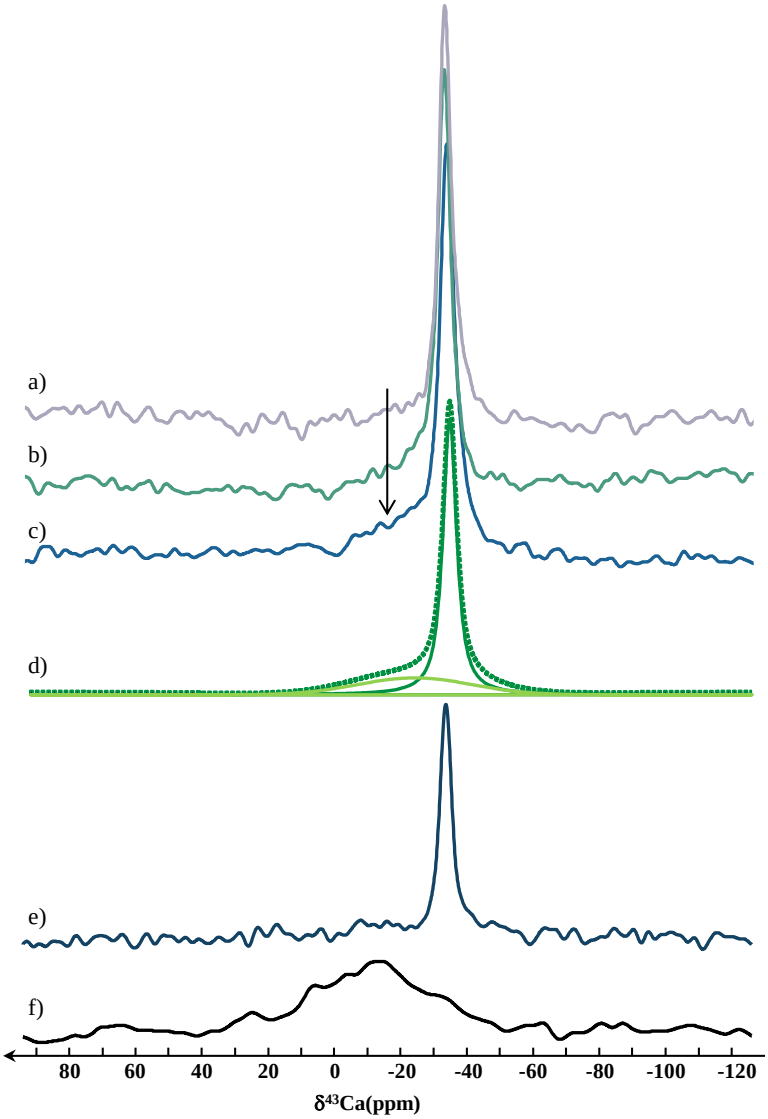


***Figure** 7: ^{43}Ca DFS NMR spectra of Haliotis tuberculata's nacre recorded with the following recycle delays: a) RD = 30 s, b) RD = 5 s, c) RD = 1 s. d) fitting of the spectrum c). ^{43}Ca DFS NMR spectra of e) synthetic aragonite and f) ACC. The arrow highlights calcium in disordered environments*.

Counter ion study : Na^+

The presence of monovalent anions (HCO_3^-) in such disordered mineral domain also questions the presence of monovalent cations as counter-ions in addition to Ca^{2+}, and, in particular, Na^+ due to the high amount of such ion in sea water (10.7 $g.L^{-1}$). To the best of our knowledge, investigation by ^{23}Na ssNMR of Na^+ in nacre is also performed for the first time. Direct ^{23}Na acquisition NMR spectrum (Fig. S4) displays three resonances centered at 0, -16 and -22 ppm. The 0 ppm resonance corresponds to residual NaCl (Fig. S4), certainly originating from see water. The 1D ^1H-^{23}Na CP MAS NMR spectrum displays only one broad single resonance centered at -16 ppm without any quadrupolar lineshape. This suggests a disordered environment for the sodium. The two dimensional ^1H-^{23}Na Hetcor experiment (Fig. 8) shows that the species strongly correlates with protons from bicarbonates ions at $\delta(^1H)$ = 14.5 ppm, evidencing the presence of Na^+ as counter-ions. Such result is confirmed through $\{^{23}Na\}$-^1H TRAPDOR experiments (Fig. S5) where a strong dephasing of the 14.5 ppm resonance of the ^1H spectrum is observed after ^{23}Na irradiation. Hence, we demonstrate that, in addition to calcium ions, sodium ions are present in the disordered mineral domain where they may balance the charge of bicarbonates.

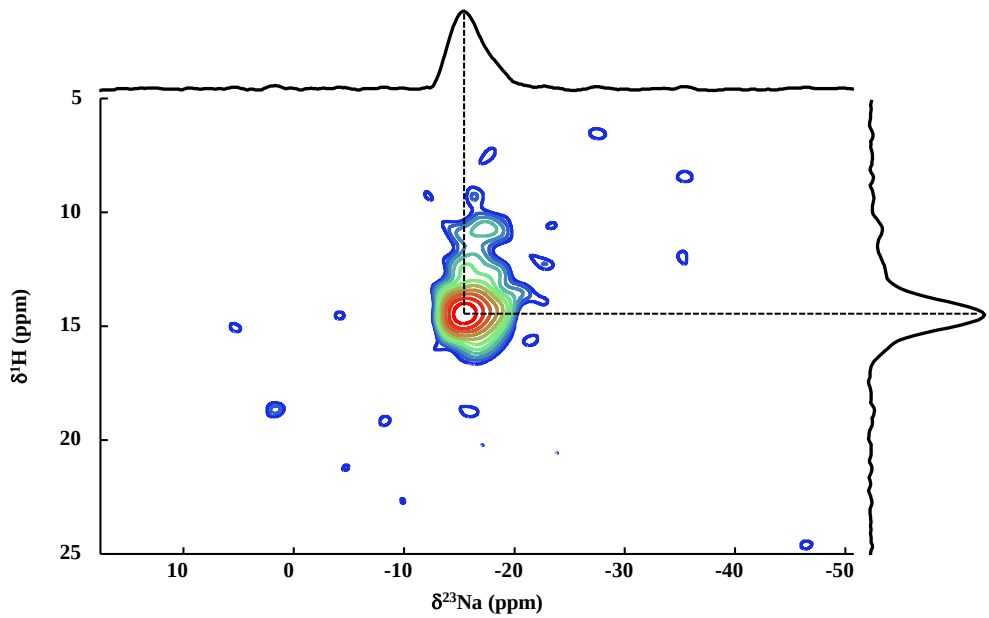


***Figure** 8: 2D ^1H–^{23}Na HetCor NMR spectrum of Haliotis tuberculata's nacre (ν_{MAS} = 14 kHz; RD = 10 s; t_{CP} = 1 ms).*

Discussion

In summary, the multinuclear ssNMR analysis highlights that the disordered mineral domain is structurally more complex than a typical ACC. Indeed, synthetic or biogenic ACC displays an homogeneous distribution of chemical environments around CO_3^{2-} and Ca^{2+} leading to a distribution of ^{13}C and ^{43}Ca chemical shifts. In contrast, the disordered mineral domain of *Haliotis tuberculta*'s nacre is structurally heterogeneous both in terms of structure and composition. Three different carbonates species, including CO_3^{2-} and HCO_3^-, localize inside such domain. The local disorder around these ions is not homogeneous as some CO_3^{2-} have an aragonitic environment and are quite ordered whereas the chemical surrounding around HCO_3^- is highly distributed.

Concerning Ca^{2+}, these ions exhibits surprisingly a much more disordered chemical environment (close to what is found in ACC) compared to the more structured carbonates. Noticeably, ^{43}Ca seems to be very sensitive to structural disorder compared to ½-spins such as ^{13}C. Along the line of such hypothesis, the case of ^{31}P and ^{43}Ca in apatite may help to illustrate these differences in line width. Indeed, bone apatite crystalline lattice is more disordered than synthetic hydroxyapatite. As a consequence, the ^{31}P (I = ½) ssNMR spectrum of bone apatite is larger than stoichiometric apatite but still characteristic of a crystalline sample[55]. Moreover, the effect of the local disorder in the crystalline lattice on the ^{43}Ca ssNMR spectrum is much stronger. Hence, while two ^{43}Ca resonances (*i.e.* corresponding to the two crystalline sites) are observed in synthetic apatite, only one broad featureless resonance is observed in bone apatite[56] as observed here in nacre.

From all the results, we propose a structural model of the disordered mineral domains in *Haliotis tuberculata*'s nacre (Fig. 9). Schematically, it can be described as follow: onto a highly crystalline aragonite core stands a first layer of aragonitic carbonates polarizable by a proton-source; then a second type of carbonate, still aragonitic but more distorted, are closer to the proton source composed of rigid structural water and protons from bicarbonate. Calcium ions stand close to these carbonates ensuring

the electroneutrality; finally, bicarbonates exhibiting a high molecular disorder are also close to rigid water molecules are present and associated to sodium ions as counter-ions.

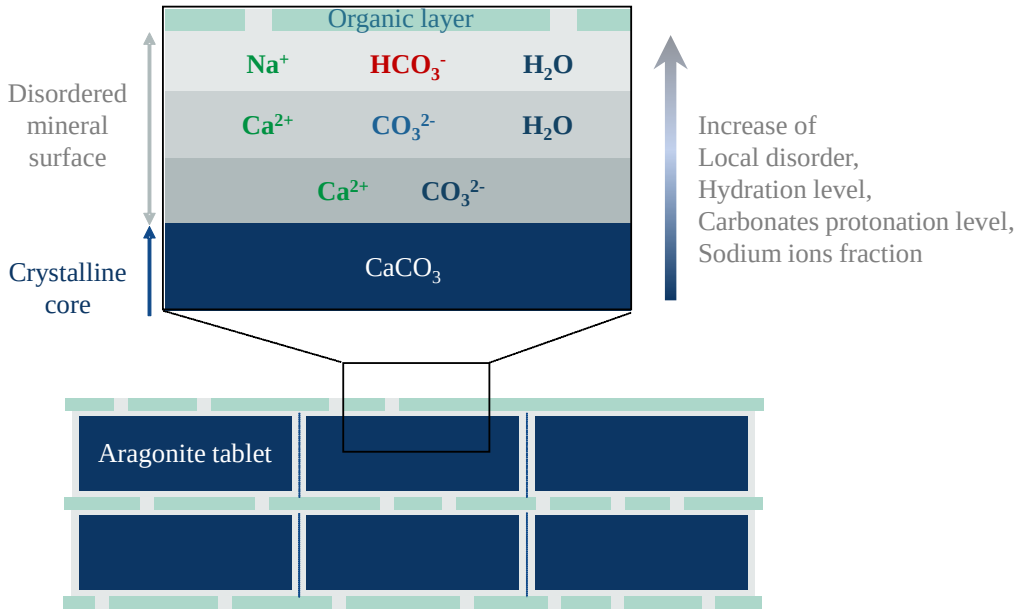


***Figure** 9. Schematic representation of the disordered mineral layer standing around aragonite tablets of Haliotis tuberculata's nacre.*

As mentioned above, interestingly, the presence of a disordered mineral domain has also been evidenced in bone where the bone apatite platelets are covered by an amorphous-like hydrated surface layer. This similar structural organization of these biominerals may result from certain common processes in the formation of biological mineralized tissues even if the mineral phases are different. Indeed, the deposition of amorphous transient mineral precursors were proposed as a first step of mineral nucleation both for bone apatite[57,58] and aragonite from nacre[31,59]. The observed disordered surface domain could result from the incomplete transformation of the amorphous mineral precursors.

Conclusion

Our results give an unprecedented representation at the atomic scale of the ions repartition within the mineral disordered layer around aragonite tablets in nacre from the European Abalone *Haliotis tuberculata*. We demonstrate the presence of Na^+, in addition to the calcium ions, and their role as counter-ions of bicarbonates within such layer. Their presence questions their role as stabilizing agents of the disordered layer by interacting with the HCO_3^- ions. This finding will be helpful for further experiments dedicated to the understanding of the interface of such layer with the organic matrix and the understanding of nacre formation.

Acknowledgments

The authors thank Imène Estève (IMPMC, Sorbonne Université) for the preparation of the FIB section and Guy Rodgers for fruitful discussions. This work was supported by the Labex MATISSE (Sorbonne Université) and the Région Bretagne. High Performance Computing resources were partially provided by the EXPLOR centre hosted by the University de Lorraine. Biological samples were kindly provided by France Haliotis (Kerazan, Plouguernau, France).

References

(1) Boggild, O. B. *The shell structure of mollusks* 1st edition, 1930.
(2) Saleuddin, A. S. M.; Wilbur K. M. Shell Formation in the Mollusca. *Academic Press*. **1983**, 235–287.
(3) Watabe, N. Shell Structure in The Mollusca. *Academic Press New York*. **1988**, p Vol 11 pp.69-104.
(4) Nakahara, H.; Bevelander, G.; Kakei, M. Electron Microscopic and Amino Acid Studies on the Outer and Inner Shell Layers of Haliotis Rufescens. *Japanese Journal of Malacology*. **1982**, 41(1), 33-46.
(5) Lowenstam, H. A.; Weiner, S. *On Biomineralization*; Oxford University Press, **1989**.
(6) Belcher, A. M.; Wu, X. H.; Christensen, R. J.; Hansma, P. K.; Stucky, G. D.; Morse, D. E. Control of Crystal Phase Switching and Orientation by Soluble Mollusc-Shell Proteins. *Nature* **1996**, *381* (6577), 56–58.
(7) Falini, G.; Albeck, S.; Weiner, S.; Addadi, L. Control of Aragonite or Calcite Polymorphism by Mollusk Shell Macromolecules. *Science* **1996**, *271* (5245), 67–69.

(8) Marin, F.; Luquet, G. Molluscan Shell Proteins. *Comptes Rendus Palevol* **2004**, *3* (6), 469–492.
(9) Schneider, A. S.; Heiland, B.; Peter, N. J.; Guth, C.; Arzt, E.; Weiss, I. M. Hierarchical Super-Structure Identified by Polarized Light Microscopy, Electron Microscopy and Nanoindentation: Implications for the Limits of Biological Control over the Growth Mode of Abalone Sea Shells. *BMC Biophys.* **2012**, *5* (1), 19.
(10) Marin, F.; Luquet, G.; Marie, B.; Medakovic, D. Molluscan Shell Proteins: Primary Structure, Origin, and Evolution. In *Current Topics in Developmental Biology, Vol 80*; Schatten, G. P., Ed.; Elsevier Academic Press Inc: San Diego, 2008; Vol. 80, pp 209–276.
(11) Sun, J.; Bhushan, B. Hierarchical Structure and Mechanical Properties of Nacre: A Review. *RSC Adv.* **2012**, *2* (20), 7617–7632.
(12) Jackson, A. P.; Vincent, J. F. V.; Turner, R. M. The Mechanical Design of Nacre. *Proc R Soc Lond B* **1988**, *234* (1277), 415–440.
(13) Heinemann, F.; Launspach, M.; Gries, K.; Fritz, M. Gastropod Nacre: Structure, Properties and Growth — Biological, Chemical and Physical Basics. *Biophys. Chem.* **2011**, *153* (2), 126–153.
(14) 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* (4), 980–987.
(15) Weiner, S.; Dove, P. M. An Overview of Biomineralization Processes and the Problem of the Vital Effect. *Rev. Mineral. Geochem.* **2003**, *54* (1), 1–29.
(16) Feng, Q. L.; Cui, F. Z.; Pu, G.; Wang, R. Z.; Li, H. D. Crystal Orientation, Toughening Mechanisms and a Mimic of Nacre. *Mater. Sci. Eng. C* **2000**, *11* (1), 19–25.
(17) Checa, A. G.; Cartwright, J. H. E.; Willinger, M.-G. Mineral Bridges in Nacre. *J. Struct. Biol.* **2011**, *176* (3), 330–339.
(18) Weiner, S.; Traub, W. Macromolecules in Mollusc Shells and Their Functions in Biomineralization. *Phil Trans R Soc Lond B* **1984**, *304* (1121), 425–434.
(19) 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.; *et al.* Does Abalone Nacre Form by Heteroepitaxial Nucleation or by Growth through Mineral Bridges? *Chem. Mater.* **1997**, *9* (8), 1731–1740.
(20) Rousseau, M.; Lopez, E.; Stempflé, P.; Brendlé, M.; Franke, L.; Guette, A.; Naslain, R.; Bourrat, X. Multiscale Structure of Sheet Nacre. *Biomaterials* **2005**, *26* (31), 6254–6262.
(21) Pokroy, B.; Fieramosca, J. S.; Von Dreele, R. B.; Fitch, A. N.; Caspi, E. N.; Zolotoyabko, E. Atomic Structure of Biogenic Aragonite. *Chem. Mater.* **2007**, *19* (13), 3244–3251.
(22) Niederberger, M.; Cölfen, H. Oriented Attachment and Mesocrystals: Non-Classical Crystallization Mechanisms Based on Nanoparticle Assembly. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8* (28), 3271–3287.
(23) Nassif, N.; Pinna, N.; Gehrke, N.; Antonietti, M.; Jäger, C.; Cölfen, H. Amorphous Layer around Aragonite Platelets in Nacre. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102* (36), 12653–12655.
(24) Zhang, G.; Xu, J. From Colloidal Nanoparticles to a Single Crystal: New Insights into the Formation of Nacre's Aragonite Tablets. *J. Struct. Biol.* **2013**, *182* (1), 36–43.
(25) Wang, Y.; Euw, S. V.; Fernandes, F. M.; Cassaignon, S.; Selmane, M.; Laurent, G.; Pehau-Arnaudet, G.; Coelho, C.; Bonhomme-Coury, L.; Giraud-Guille, M.-M.; *et al.* Water-Mediated Structuring of Bone Apatite. *Nat. Mater.* **2013**, *12* (12), 1144–1153.
(26) Huang, S.-J.; Tsai, Y.-L.; Lee, Y.-L.; Lin, C.-P.; Chan, J. C. C. Structural Model of Rat Dentin Revisited. *Chem. Mater.* **2009**, *21* (13), 2583–2585.
(27) Jäger, C.; Welzel, T.; Meyer-Zaika, W.; Epple, M. A Solid-State NMR Investigation of the Structure of Nanocrystalline Hydroxyapatite. *Magn. Reson. Chem.* **2006**, *44* (6), 573–580.
(28) Jäger, C.; Cölfen, H. Fine Structure of Nacre Revealed by Solid State ^{13}C and ^{1}H NMR. *CrystEngComm* **2007**, *9* (12), 1237–1244.

(29) Ben Shir, I.; Kababya, S.; Katz, I.; Pokroy, B.; Schmidt, A. Exposed and Buried Biomineral Interfaces in the Aragonitic Shell of Perna Canaliculus Revealed by Solid-State NMR. *Chem. Mater.* **2013**, *25* (22), 4595–4602.
(30) Auzoux-Bordenave, S.; Badou, A.; Gaume, B.; Berland, S.; Helléouet, M.-N.; Milet, C.; Huchette, S. Ultrastructure, Chemistry and Mineralogy of the Growing Shell of the European Abalone Haliotis Tuberculata. *J. Struct. Biol.* **2010**, *171* (3), 277–290.
(31) Auzoux-Bordenave, S.; Brahmi, C.; Badou, A.; Rafélis, M.; Huchette, S. Shell Growth, Microstructure and Composition over the Development Cycle of the European Abalone Haliotis Tuberculata. *Mar. Biol.* **2015**, *162*, 687–697.
(32) Fritz, M.; Belcher, A. M.; Radmacher, M.; Walters, D. A.; Hansma, P. K.; Stucky, G. D.; Morse, D. E.; Mann, S. Flat Pearls from Biofabrication of Organized Composites on Inorganic Substrates. *Nature* **1994**, *371* (6492), 49–51.
(33) Chateigner, D.; Hedegaard, C.; Wenk, H.-R. Mollusc Shell Microstructures and Crystallographic Textures. *J. Struct. Geol.* **2000**, *22* (11), 1723–1735.
(34) Jiang, J.; Gao, M.-R.; Qiu, Y.-H.; Yu, S.-H. Gram-Scale, Low-Cost, Rapid Synthesis of Highly Stable Mg-ACC Nanoparticles and Their Long-Term Preservation. *Nanoscale* **2010**, *2* (11), 2358–2361.
(35) Wang, L.; Sondi, I.; Matijevic, E. Preparation of Uniform Needle-Like Aragonite Particles by Homogeneous Precipitation. *J. Colloid Interface Sci.* **1999**, *218* (2), 545–553.
(36) Pickard, C. J.; Mauri, F. All-Electron Magnetic Response with Pseudopotentials: NMR Chemical Shifts. *Phys. Rev. B* **2001**, *63* (24), 245101.
(37) Clark, S. J.; Segall, M. D.; Pickard, C. J.; Hasnip, P. J.; Probert, M. I. J.; Refson, K.; Payne, M. C. First Principles Methods Using CASTEP. *Z. Für Krist. - Cryst. Mater.* **2009**, *220* (5/6), 567–570.
(38) Perdew, J. P.; Burke, K.; Ernzerhof, M. Generalized Gradient Approximation Made Simple. *Phys. Rev. Lett.* **1996**, *77* (18), 3865–3868.
(39) Yates, J. R.; Pickard, C. J.; Mauri, F. Calculation of NMR Chemical Shifts for Extended Systems Using Ultrasoft Pseudopotentials. *Phys. Rev. B* **2007**, *76* (2), 024401.
(40) Taga, T. Crystal Structure of $Na_2CO_3.10H_2O$. *Acta Crystallogr. B* **1969**, *25* (12), 2656–2658.
(41) Sass, R. L.; Scheuerman, R. F. The Crystal Structure of Sodium Bicarbonate. *Acta Crystallogr.* **1962**, *15* (1), 77–81.
(42) Gervais, C.; Dupree, R.; Pike, K. J.; Bonhomme, C.; Profeta, M.; Pickard, C. J.; Mauri, F. Combined First-Principles Computational and Experimental Multinuclear Solid-State NMR Investigation of Amino Acids. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109* (31), 6960–6969.
(43) Zheng, A.; Liu, S.-B.; Deng, F. ^{13}C Shielding Tensors of Crystalline Amino Acids and Peptides: Theoretical Predictions Based on Periodic Structure Models. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30* (2), 222–235.
(44) Wise, S. W. Microarchitecture and Deposition of Gastropod Nacre. *Science* **1970**, *167* (3924), 1486–1488.
(45) Weiss, I. M.; Kaufmann, S.; Mann, K.; Fritz, M. Purification and Characterization of Perlucin and Perlustrin, Two New Proteins from the Shell of the Mollusc Haliotis Laevigata. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *267* (1), 17–21.
(46) Duer, M. J. The Contribution of Solid-State NMR Spectroscopy to Understanding Biomineralization: Atomic and Molecular Structure of Bone. *J. Magn. Reson.* **2015**, *253*, 98–110.
(47) Shir, I. B.; Kababya, S.; Schmidt, A. Molecular-Level Structure-Property Relationships in Biogenic Calcium Carbonates: The Unique Insights of Solid-State NMR Spectroscopy. *Isr. J. Chem.* **2014**, *54* (1–2), 74–85.
(48) Nebel, H.; Epple, M. Continuous Preparation of Calcite, Aragonite and Vaterite, and of Magnesium-Substituted Amorphous Calcium Carbonate (Mg-ACC). *Z. Für Anorg. Allg. Chem.* **2008**, *634* (8), 1439–1443.

(49) Akiva-Tal, A.; Kababya, S.; Balazs, Y. S.; Glazer, L.; Berman, A.; Sagi, A.; Schmidt, A. In Situ Molecular NMR Picture of Bioavailable Calcium Stabilized as Amorphous CaCO3 Biomineral in Crayfish Gastroliths. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**.
(50) Gertman, R.; Ben Shir, I.; Kababya, S.; Schmidt, A. In Situ Observation of the Internal Structure and Composition of Biomineralized Emiliania Huxleyi Calcite by Solid-State NMR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (40), 13425–13432.
(51) Albéric, M.; Caspi, E. N.; Bennet, M.; Ajili, W.; Nassif, N.; Azaïs, T.; Berner, A.; Fratzl, P.; Zolotoyabko, E.; Bertinetti, L.; *et al.* Interplay between Calcite, Amorphous Calcium Carbonate, and Intracrystalline Organics in Sea Urchin Skeletal Elements. *Cryst. Growth Des.* **2018**, *18* (4), 2189–2201.
(52) M. Widdifield, C.; Moudrakovski, I.; L. Bryce, D. Calcium-43 Chemical Shift and Electric Field Gradient Tensor Interplay: A Sensitive Probe of Structure, Polymorphism, and Hydration. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16* (26), 13340–13359.
(53) Schurko, R. W.; Hung, I.; Widdifield, C. M. Signal Enhancement in NMR Spectra of Half-Integer Quadrupolar Nuclei via DFS–QCPMG and RAPT–QCPMG Pulse Sequences. *Chem. Phys. Lett.* **2003**, *379* (1), 1–10.
(54) Huang, Y.-C.; Mou, Y.; Tsai, T. W.-T.; Wu, Y.-J.; Lee, H.-K.; Huang, S.-J.; Chan, J. C. C. Calcium-43 NMR Studies of Polymorphic Transition of Calcite to Aragonite. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116* (49), 14295–14301.
(55) Wang, Y.; Euw, S. V.; Laurent, G.; Crevant, C.; Bonhomme-Coury, L.; Giraud-Guille, M.-M.; Babonneau, F.; Nassif, N.; Azaïs, T. Impact of Collagen Confinement vs. Ionic Substitutions on the Local Disorder in Bone and Biomimetic Apatites. *Mater. Horiz.* **2014**, *1* (2), 224–231.
(56) Xu, J.; Zhu, P.; Gan, Z.; Sahar, N.; Tecklenburg, M.; Morris, M. D.; Kohn, D. H.; Ramamoorthy, A. Natural-Abundance 43Ca Solid-State NMR Spectroscopy of Bone. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (33), 11504–11509.
(57) Mahamid, J.; Sharir, A.; Addadi, L.; Weiner, S. Amorphous Calcium Phosphate Is a Major Component of the Forming Fin Bones of Zebrafish: Indications for an Amorphous Precursor Phase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**.
(58) Mahamid, J.; Aichmayer, B.; Shimoni, E.; Ziblat, R.; Li, C.; Siegel, S.; Paris, O.; Fratzl, P.; Weiner, S.; Addadi, L. Mapping Amorphous Calcium Phosphate Transformation into Crystalline Mineral from the Cell to the Bone in Zebrafish Fin Rays. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107* (14), 6316–6321.
(59) DeVol, R. T.; Sun, C.-Y.; Marcus, M. A.; Coppersmith, S. N.; Myneni, S. C. B.; Gilbert, P. U. P. A. Nanoscale Transforming Mineral Phases in Fresh Nacre. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (41), 13325–13333.

Supporting Information

Table S1

	crystalline reference	**DFT**		**crystalline reference**	**DFT**	
	$Na_2{}^{13}CO_3$ (Aldrich)	$Na_2{}^{13}CO_3$ crystal	CO_3^{2-} free	$NaHCO_3$ (Aldrich)	$NaHCO_3$ crystal	HCO_3^- free
Isotropic Chemical shift	170.7	169.4	181.7	167	165.4	156.5
Δ_{CSA}	-51 ppm	-46.8 ppm	-58 ppm	62 ppm	63.6 ppm	95,5 ppm
η_{CSA}	0,3	0,2	0	0,5	0,5	0,8

Table S1. Comparison of experimental and DFT calculated ^{13}C CSA tensorial parameters for $Na_2{}^{13}CO_3$ and $NaHCO_3$ where Δ_{CSA} and η_{CSA} are defined as follow:

$\Delta_{CSA} = \delta_{33} - \delta_{iso}$ *and* $\eta_{CSA} = (\delta_{22} - \delta_{11}) / (\delta_{33} - \delta_{iso})$ *with* $\delta_{iso} = 1/3\ (\delta_{11}+\delta_{22}+\delta_{33})$ and the chemical shielding principal values δ_{11}, δ_{22}, δ_{33} ordered as follows: $|\delta_{33} - \delta_{iso}| \geq |\delta_{11} - \delta_{iso}| \geq |\delta_{22} - \delta_{iso}|$.

Figure S1

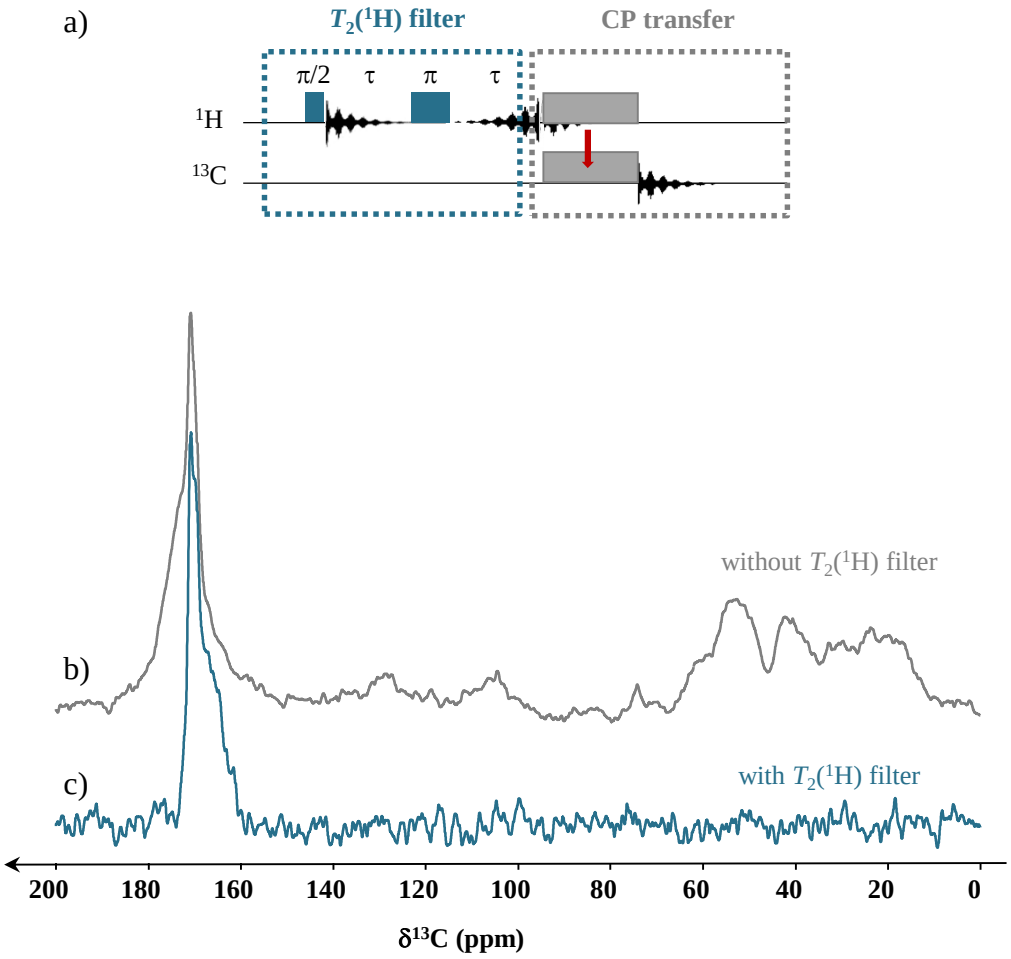


***Figure** S1. a) ^{1}H-echo ^{13}C CP MAS pulse sequence: a rotor synchronized ^{1}H echo (acting as a T_2(^{1}H) filter) is added before the ^{1}H-^{13}C CP transfer. ^{13}C CP MAS NMR spectra of Haliotis tuberculta's nacre recorded with similar CP conditions (ν_{MAS} = 5 kHz; RD = 10 s; t_{CP} = 1 ms): b) standard ^{1}H-^{13}C CP MAS experiment (without T_2(^{1}H) filter) and c) ^{1}H-echo ^{13}C CP MAS experiment (with T_2(^{1}H) filter). The latter allows the removal of organic signals (see main text for details).*

Figure S2

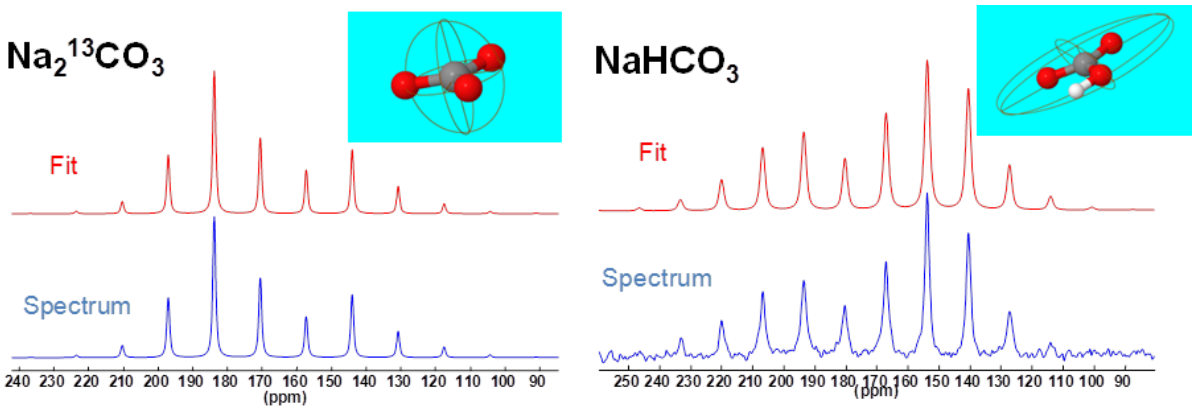


***Figure** S2. Slow MAS ^{13}C NMR spectra of reference samples Na_2CO_3 and $NaHCO_3$ recorded at ν_{MAS} = 2 kH (blue) and their respective fitting (red): a) Direct ^{13}C excitation NMR spectrum of $Na_2{}^{13}CO_3$. b) ^{1}H-^{13}C CP MAS NMR spectrum of $NaHCO_3$ (t_{CP} = 4 ms).*

Figure S3

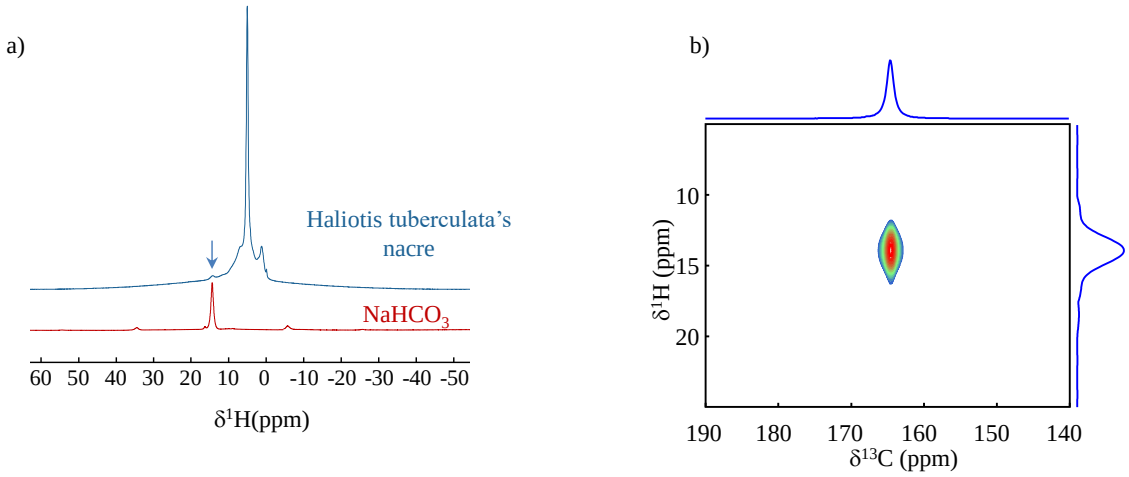


***Figure** S3. a) Comparison of ^{1}H MAS NMR spectra of $NaHCO_3$ and Haliotis tubercuata's nacre (ν_{MAS} = 14 kHz; RD = 10 s). b) ^{1}H-^{13}C HetCor NMR spectrum of $NaHCO_3$.*

Figure S4

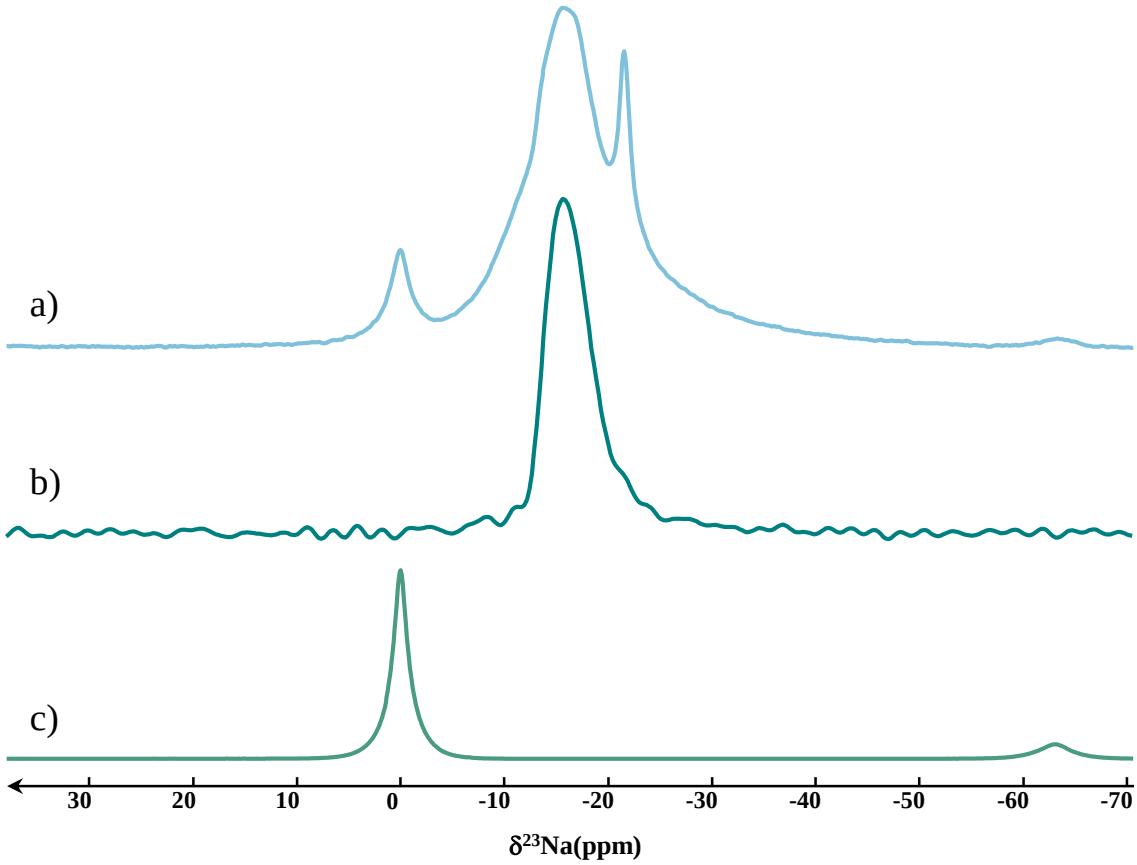


***Figure** S4. ^{23}Na NMR spectra of Haliotis tuberculata's nacre: a) ^{23}Na direct acquisition (RD = 0.5 s). b) ^{1}H-^{23}Na CP MAS (RD = 10 s; t_{CP} = 1 ms). C) ^{23}Na direct acquisition NMR spectrum of NaCl (RD = 0.5 s).*

Figure S5

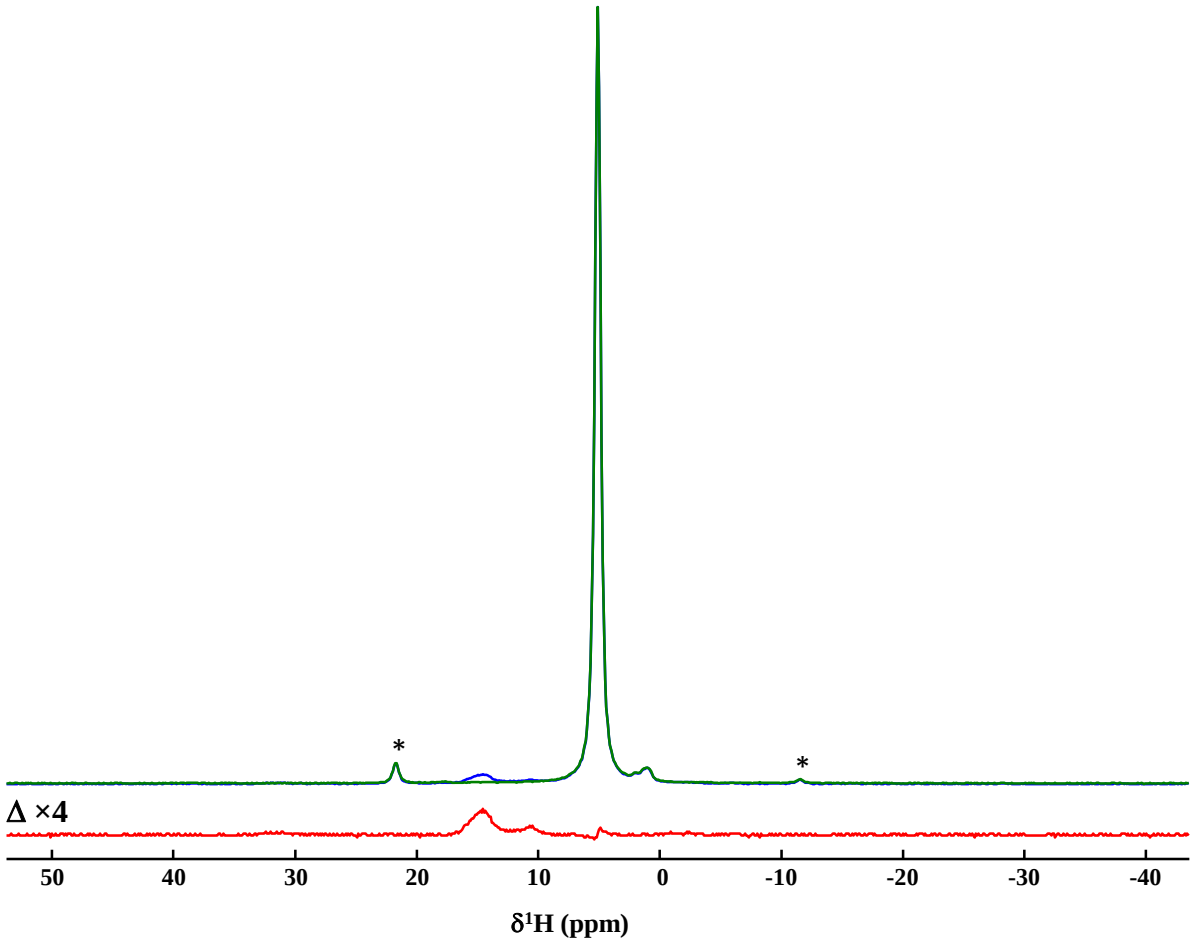


Figure *S5. {^{23}Na}-^{1}H TRAPDOR NMR spectra of Haliotis tuberculata's nacre (ν_{MAS} = 5 kHz; recoupling delay τ = 0.2 ms; RD = 10 s). *: spinning side bands.*

III. Conclusion du chapitre

Cette étude nous a permis de caractériser très finement les environnements minéraux désorganisés au sein de la nacre et ainsi de proposer un modèle d'organisation de la couche de surface des tablettes d'aragonite chez *Haliotis tuberculata*. Celle-ci serait constituée d'un gradient interne en termes (i) de protonation des carbonates, (ii) d'hydratation, (iii) de désordre et (iv) de ratio Ca^{2+}/Na^{+}.

Ce modèle résulte de l'observation d'une couche non cristalline à la surface des tablettes d'aragonite. Néanmoins, la RMN est une technique qui propose une réponse globale de l'échantillon étudié et qui ne permet pas de localiser spatialement les espèces détectées. Ainsi l'attribution des espèces minérales désorganisées à la couche de surface ne résulte que de conclusions indirectes.

En effet, il pourrait exister d'autres environnements minéraux désorganisés en plus de cette couche de surface, au niveau notamment d'autres interfaces organominérale:

- Au niveau « voids » riches en carbone décrits par Gries *et al.*, 2009. La nature de ces nanoaspérités n'a pas encore été caractérisée. Elle pourrait être de nature organique et/ou minérale.
- Au niveau des sites de nucléation centraux.
- Au niveau des zones de croissance latérales.

Afin de poursuivre cette étude ultrastructurale de la nacre, nous avons dans le Chapitre IV focalisé nos observations et nos analyses sur les zones en croissance de la nacre en vue d'étudier finement les interfaces organo-minérales et de comprendre d'avantage les mécanismes de formation de ce matériau biologique.

Chapitre IV: Etude de l'interface organo-minérale de la nacre

I. Introduction

I.1. Les modèles de formation de la nacre

Bien que la nacre soit étudiée depuis plus de 150 ans, de nombreuses interrogations persistent et notamment en ce qui concerne ses mécanismes de formation. Lors de la mise ne place d'une tablette, on peut mettre en évidence trois phénomènes : la **nucléation**, la **croissance en hauteur** et la **croissance en largeur** de l'aragonite. Il est maintenant admis que les feuillets organiques interlamellaires formés de chitine et de protéines (Addadi and Weiner,1997; Belcher *et al.*, 1996; Mutvei, 1979) se mettent en place en premier, les tablettes d'aragonite se formant ensuite entre ces feuillets parallèles (Bevelander and Nakahara, 1969; Levi-Kalisman *et al.*, 2001),

Le mécanisme général de formation de la nacre est résumé par la ***Figure* 54**.

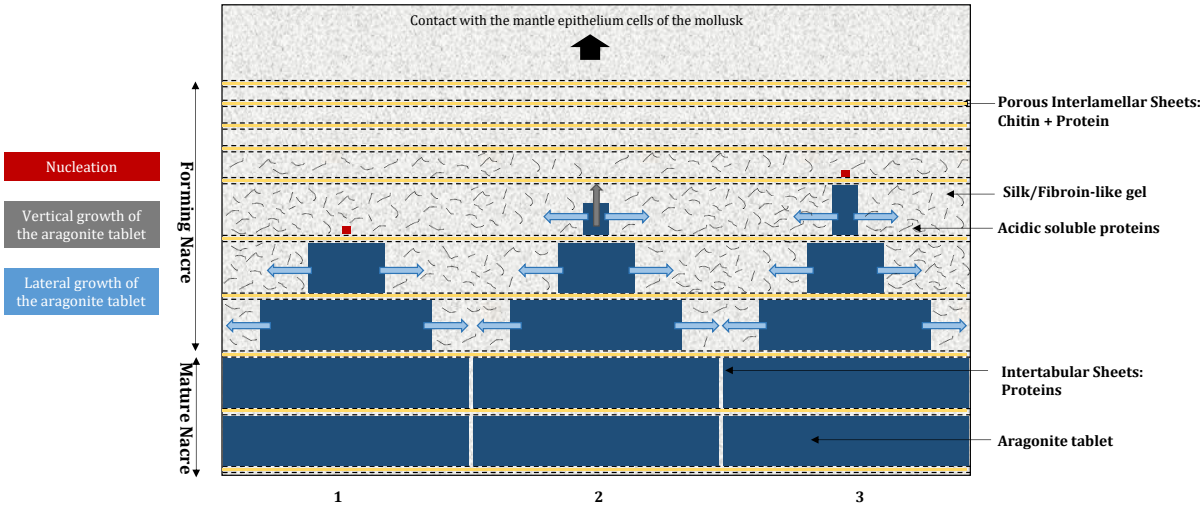


Figure 54 : *Modèle général de formation de la nacre en colonne des gastéropodes et des céphalopodes*

En premier lieu, une étape de nucléation qui va initier la croissance de la phase minérale aragonitique.

La tablette va ensuite croitre verticalement jusqu'à atteindre le feuillet interlamellaire supérieur qui arrête la croissance en épaisseur. En parallèle la croissance latérale a lieu au sein du gel de protéines de soie et de protéines acides et s'arrête dès que deux tablettes voisines se rencontrent par inhibition de contact (Nudelman *et al.*, 2006 and Fritz *et al.*, 1994). Le bord latéral

des tablettes est alors en contact avec le feuillet organique intertabulaire qui s'est créé entre deux tablettes voisines (voir schéma de la ***Figure* 54**).

Lors de cette croissance un certain nombre de protéines sont incluses dans la phase minérale et sont à l'origine de la matrice intra-cristalline. L'inclusion de ces protéines pourrait être à l'origine des nanoaspérités mises en évidence par Gries *et al.* en 2009. En fin de croissance, les tablettes ne sont pas entièrement cristallisées puisqu'il a été montré dans le Chapitre III qu'il subsistait une couche minérale désordonnée en surface.

Au cours des décennies un certain nombre de propositions ont été faites pour expliquer la croissance de la nacre et en particulier pour expliquer le contrôle de la nucléation.

En effet, l'architecture de la nacre présente une remarquable régularité que ce soit du point de vue de l'organisation cristalline, la taille des tablettes, ou bien l'organisation des tablettes entre elles. Cela laisse penser que ce ne peut être la conséquence de phénomènes aléatoires mais qu'au contraire, les épisodes de nucléation et de croissance de l'aragonite sont minutieusement contrôlés.

L'étude des mécanismes de croissance de la nacre par la communauté scientifique a permis de dégager différentes propositions dont deux principales théories, qui paraissent antagonistes: la croissance par **hétéroépitaxie**, la croissance par **ponts minéraux (homoépitaxie)**. Ces deux théories s'affrontent en particulier au sujet de la nucléation du minéral de tablettes.

- Croissance par hétéroépitaxie : Contact organique-minéral

Ce mécanisme a été proposé en premier par Weiner *et al.*, qui suggère que les feuillets organiques agissent comme support pour la nucléation en l'induisant directement (Weiner and Hood, 1975 ; Weiner and Lowenstam, 1986 ; Weiner and Traub, 1980 ; Weiner et al 1984).

Le premier indice menant à l'idée d'une implication de la fraction organique dans le contrôle de la nucléation de la phase minérale vient de tests *in vitro* effectués par Watabe et Wilbur en

1960. Après extraction de la matrice organique de la nacre de différents mollusques, ils ont observé que ces composants organiques permettaient d'induire préférentiellement la cristallisation de l'aragonite au détriment de la calcite. La fraction organique serait ainsi impliquée dans la sélection du polymorphe de carbonate de calcium lors de la formation du minéral *in vitro*.

Les travaux de Crenshaw en 1976 ont permis d'appuyer cette théorie après avoir montré par immunohistochimie sur de la nacre déminéralisée, la présence de **polysaccharides acides** au centre de la tablette ayant potentiellement des propriétés de liaison au calcium. Les travaux soutiennent l'hypothèse selon laquelle ces polysaccharides acides seraient impliqués dans la nucléation du cristal. Cette observation a également été effectuée par Addadi et al en 1987.

En 1979 et 1983, Weiner propose l'existence de protéines riches en acides aminés acides qui auraient une forte attraction pour les ions calcium. Ainsi dans ce modèle d'hétéroépitaxie le feuillet interlamellaire insoluble est constitué d'une couche de chitine organisée prise en sandwich entre deux couches de protéines de soie hydrophobes elles même surplombée de couches de protéines solubles riche en acide aminé acide (Acide aspartique) qui serait le support de la nucléation.

Plus récemment, il a été notamment montré par Nudelman *et al.*, en 2006, et Bezares *et al.*, en 2008, que des protéines riches en acides-aminés acides seraient également impliquées dans la nucléation de l'aragonite. En effet leur localisation au centre de la tablette le suggère fortement. Ces protéines seraient entourées de macromolécules riches en fonctions carboxyliques et en sulfates, selon l'organisation concentrique schématisée sur la ***Figure* 55**. (Nudelman *et al.*, 2006 et Bezares *et al.* en 2008).

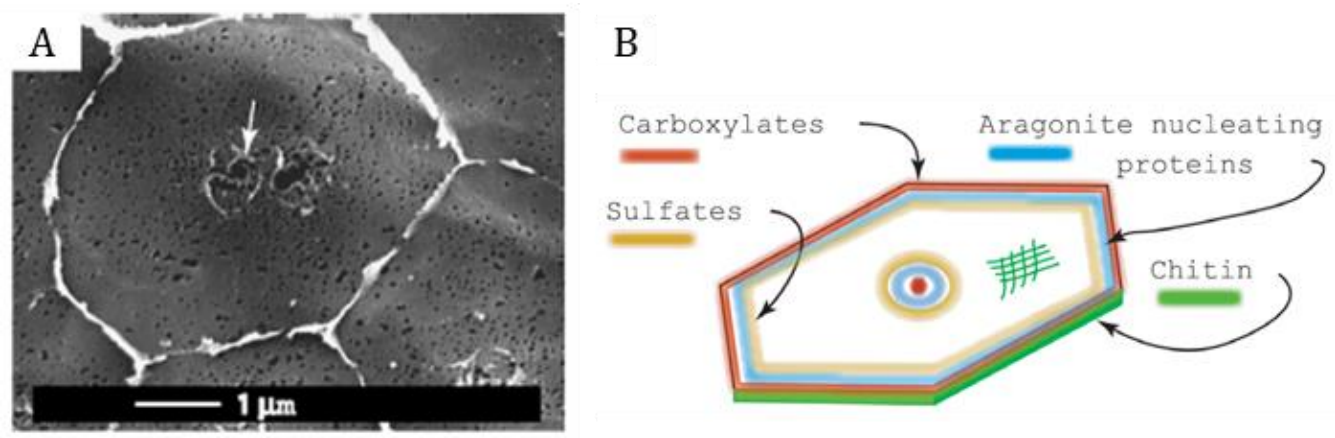


Figure 55 : *Mise en évidence de la présence d'un site central riche en fraction organique A) révélé par microscopie électronique à balayage sur de la nacre déminéralisée et B) schématisé par une organisation concentrique de la matrice intracristalline – D'après Bezares et al., 2008*

En 2015, Nudelman *et al.*, a ainsi pu étayer la théorie de l'hétéroépitaxie en proposant que chaque tablette se forme indépendamment à partir d'un **unique point de nucléation central** de **nature organique.** Ces sites de nucléation seraient riches en protéines acides et seraient adsorbés sur le feuillet de chitine, selon un alignement permettant probablement d'orienter la croissance en colonne des tablettes de nacre (Nudelman *et al.*, 2015).

Lors de la croissance du minéral, il est suggéré que les protéines de soie interlamellaires, permettraient par leur nature hydrophobe d'inhiber de potentielles nucléations non spécifiques en dehors de l'unique site central (Addadi et al, 2006).

Cette théorie de l'hétéroépitaxie avec un site de nucléation unique central peut être résumée par le schéma suivant (***Figure* 56**).

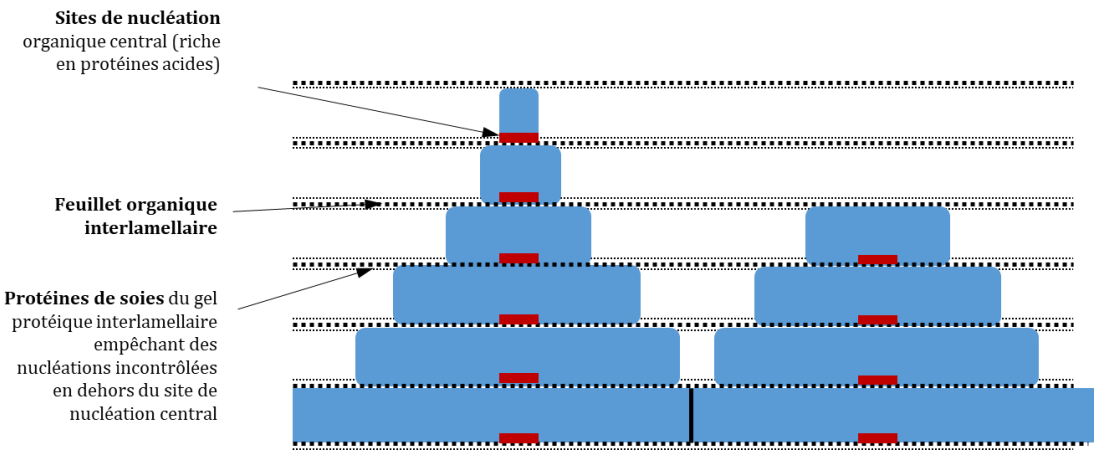


Figure 56 : *Schéma illustrant la croissance de la nacre par hétéroépitaxie en combinant les théories de Weiner et al., et Nudelman et al.*

- La théorie des ponts-minéraux : contact minéral-minéral

A cette première théorie semble s'opposer celle des ponts minéraux qui suggère que la nucléation de l'aragonite s'opère au niveaux de contacts minéral-minéral avec la tablette sous-jacente sans l'intermédiaire de composants organiques. On parle d'**homoépitaxie**.

Cette hypothèse, à l'origine présumée par Wada *et al.* en 1972 et concrètement proposée par Schäffer *et al.*, en 1997, provient de l'observation d'une multitude de pores mesurant 5 à 50 nm de diamètre et d'une densité d'environ 100 pores par μm^2, au niveau du feuillet organique interlamellaire permettant la connexion entre deux tablettes superposées par des ponts minéraux.

Cette théorie suggère qu'il n'y a qu'un seul évènement de nucléation à la base de l'empilement de tablettes. Lorsque la première tablette atteint le feuillet organique supérieur, la croissance

continue sur le deuxième niveau *via* un nanopore pour former un pont minéral qui initie la formation de la deuxième tablette et ainsi de suite. La formation des tablettes supérieure ne serait ainsi que la continuité de la croissance initiée à la base de l'empilement.

Cette théorie semble être appuyée par l'observation réalisée en premier par Manne *et al.*, en 1994, qui montre par AFM une continuité entre toutes les tablettes empilées. Plus tard des études réalisées en diffraction des rayons X au synchrotron (Di Masi and Sarikaya, 2004), et en X-PEEM (X-ray photoélectron mission spectromicroscopy) par Gilbert *et al.*, 2008 et diffraction électronique (TEM-SAED) (Gries et al, 2009) ont permis de montrer un co-alignement cristallographique entre les tablettes empilées avec notamment l'axe *c* toujours perpendiculaire à la surface. Du fait de cette continuité cristallographique, les biocristaux d'aragonite des tablettes d'une même colonne diffractent comme un monocristal d'aragonite

De plus, cette continuité cristallographique a également été observé au sein même de ces ponts minéraux à une échelle locale par HR-TEM (Gries *et al.*, 2009) suggérant que ces ponts sont les connexions qui permettent de conserver la continuité cristalline au sein de toute la colonne. Néanmoins, l'observation de ponts minéraux interrompus par une matrice organique (Checa *et al.*, 2011) suggère qu'il n'y pas de réelle continuité entre les tablettes à travers ces petits pores et ainsi pas de contacts minéral-minéral comme il avait été suggéré. Checa *et al.*, montre la présence de larges pores au centre des tablettes de diamètre environ égal à 200 nm. Ces larges pores centraux uniques pour chaque tablette semblent présenter une continuité cristalline, laissant penser que ces pores sont des ponts minéraux centraux. Les observations de Checa ont été réalisées sur des gastéropodes et des céphalopodes qui présentent une nacre en colonne. Chez les bivalves, les mêmes observations ont été réalisées, mais le large pore est retrouvé sur le bord de la tablette inférieure en contact avec le milieu de la tablette supérieure. (Nudelman et al, 2015). La ***Figure* 57** illustre cette hypothèse.

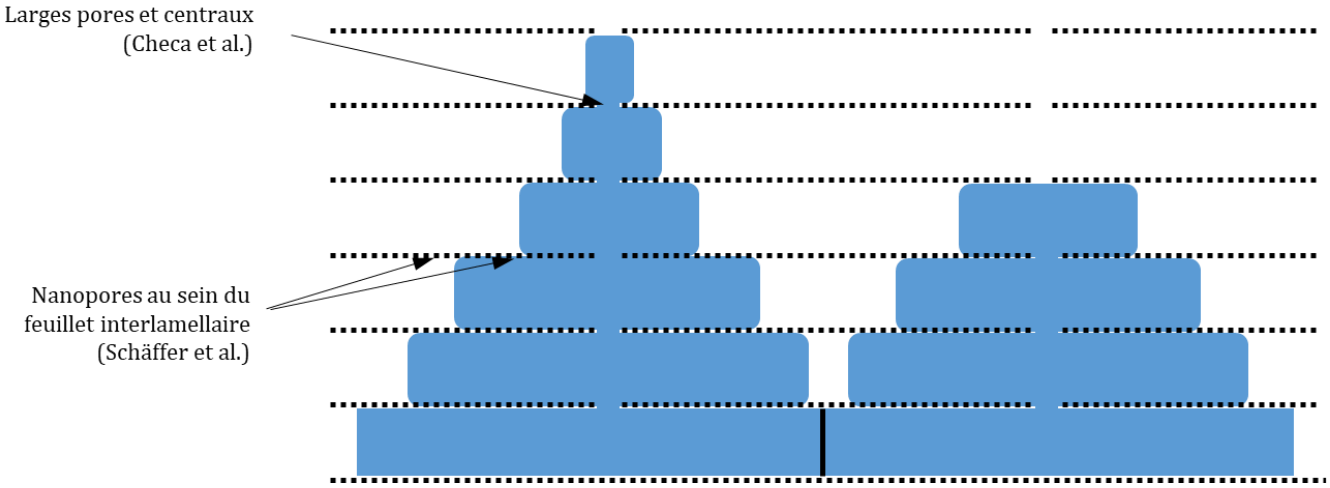


Figure 57 : *Schéma de croissance par ponts minéraux*

- Combinaison de ces deux théories

L'idée que le mécanisme de formation de la nacre résulte d'une combinaison de ces deux processus (hétéroépitaxie et pont minéral) a été proposée par Olson *et al.*, en 2012 et 2013. Cette proposition suggère qu'il y a bien un unique large pont minéral central permettant la continuité cristallographique entre les tablettes mais que ce large pore est entouré par des composants organiques correspondant aux sites de nucléation décrits par Nudelman *et al.* (2006 et 2015). Ainsi on aurait bien des ponts minéraux permettant un contact minéral-minéral mais également une implication de composants organiques permettant de contrôler la nucléation des tablettes. Ce modèle de croissance est représenté sur la ***Figure* 58.**

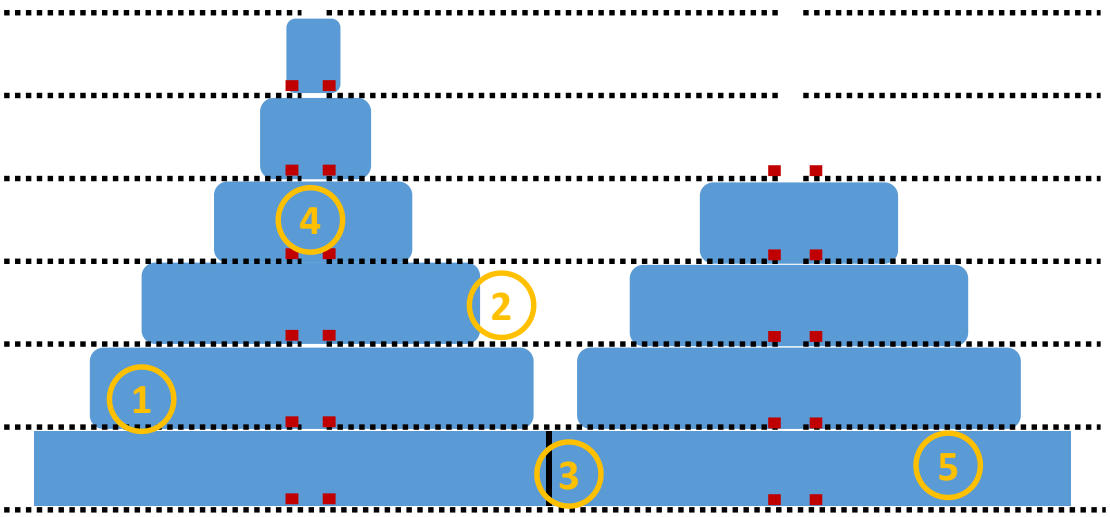


Figure 58 : *Schéma de croissance par homoépitaxie avec contrôle de la nucléation par une fraction organique : Présence de larges pores centraux entourés d'un anneau de composants organiques qui constituent le site de nucléation. (Modèle de Olson et al., 2012, 2013)*

Les points 1, 2, 3, 4 et 5 sont les différentes interfaces organo-minérales que l'on peut dégager de ce modèle.

I.2. Mise en évidence de différentes interfaces organo-minérales

La description ci-dessus des modèles de croissance de la nacre nous permet de mettre en évidence plusieurs interfaces organo-minérales annotées sur la ***Figure* 58** :

- 1 : Interaction entre le bord longitudinal des tablettes avec les feuillets organiques interlamellaires inférieurs et supérieurs
- 2 : Interaction entre les bords latéraux des tablettes en croissance et le gel protéique
- 3 : Interaction entre le bord latéral et la matrice intertabulaire séparant deux tablettes voisines matures
- 4 : Interaction entre le minéral et les composants organiques des sites de nucléation centraux entourant les larges pores centraux
- 5 : Interaction au sein même de la tablette, entre le minéral de la tablette et les nanoaspérités potentiellement organiques observées par Gries *et al.* 2009.

Analyser finement ces différentes interfaces organo-minérales permet de préciser le modèle d'organisation de la nacre et d'ainsi mieux comprendre ses mécanismes de formation.

II. Matériel et méthodes

Pour étudier les mécanismes de croissance de la nacre, nous avons choisi d'étudier une zone de la nacre en formation. En effet en choisissant spécifiquement une zone où les tablettes ne sont pas toutes complètement matures, il est possible de visualiser les zones de croissance et ainsi les différentes interfaces organo-minérales qui jouent certainement un rôle dans ces mécanismes. Pour cela nous avons utilisé l'abrasion ionique par Focused Ion Beam – FIB (voir Chapitre II) pour réaliser une lame mince d'un empilement de tablettes en formation au sein de la nacre d'une coquille de 1 an de *Haliotis tuberculata* (***Figure* 59A**). Les détails de la réalisation de cette lame mince sont présentées ci-dessous.

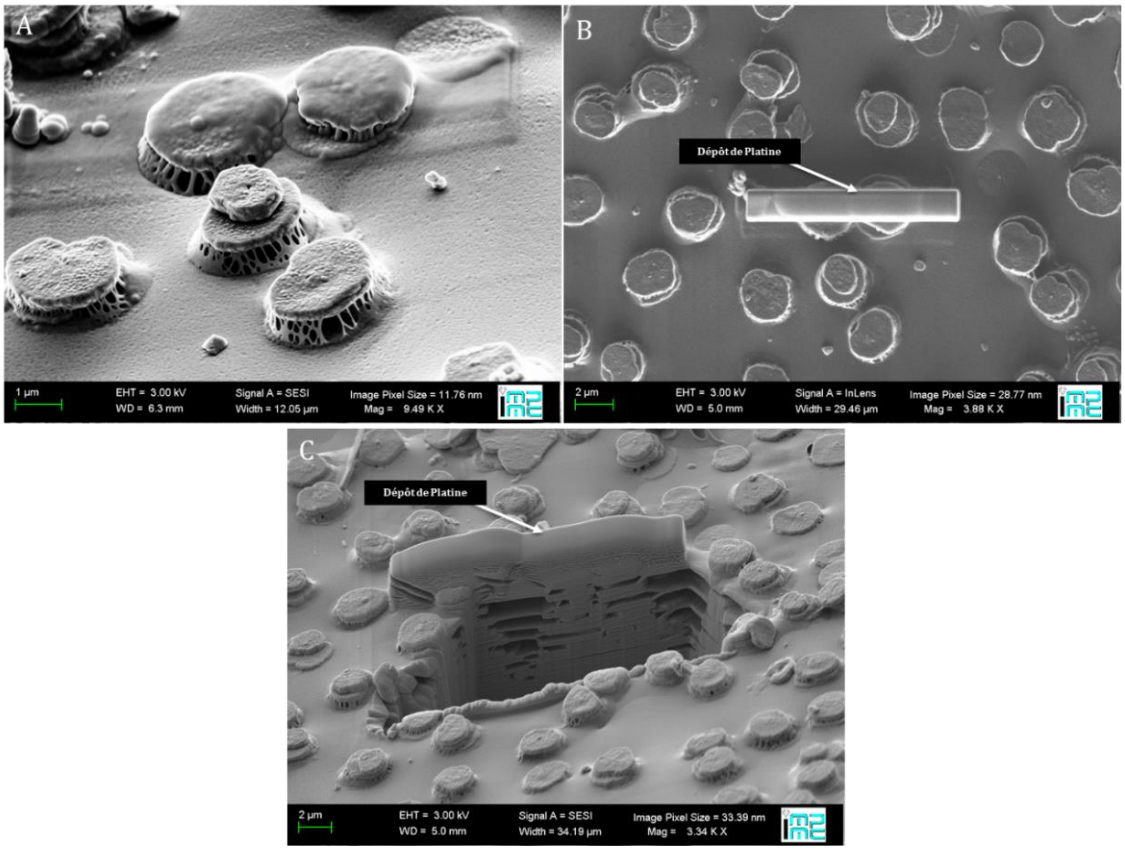


***Figure 59**: Cliché SEM-FEG montrant A) la zone d'intérêt comprenant des empilements de tablettes voisins ; B) le dépôt de platine en vue supérieure permettant de protéger la région d'intérêt et C) la travée réalisée par FIB jusqu'à la zone d'intérêt.*

Pour la réalisation de la lame fine nous avons déposé une couche de Platine permettant de protéger la zone d'intérêt de l'abrasion par les ions gallium (***Figure* 59B**). Avec le faisceau du FIB nous avons ainsi creusé de part et d'autre du dépôt de Platine en vue de dégager la zone (***Figure* 59C**) pour pouvoir extraire la région d'intérêt contenant deux empilements voisins de tablettes d'aragonite.

La lame est ensuite extraite grâce à une pointe de tungstène permettant sa micromanipulation et est collée sur une grille pour l'observation ultérieure en microscopie électronique à transmission. La lame a ensuite été amincie jusqu'à 100 nm d'épaisseur grâce au faisceau du FIB. (***Figure* 60**)

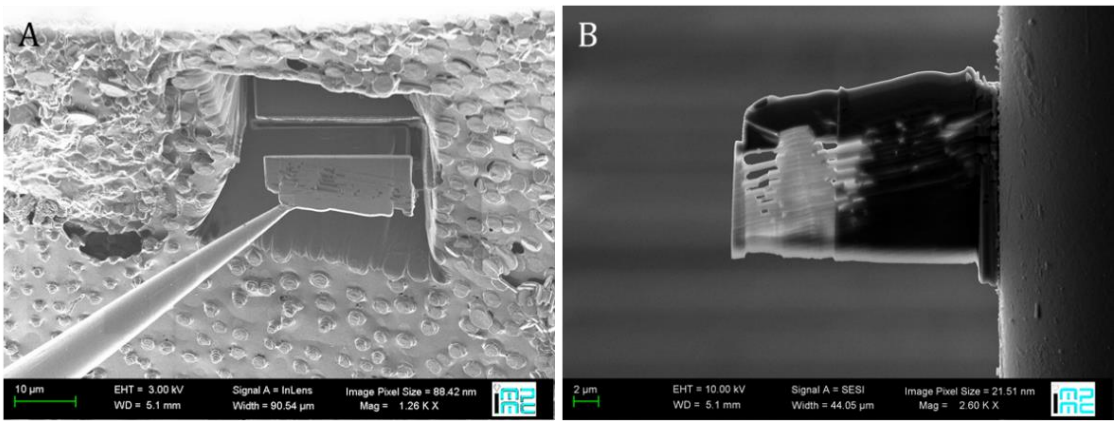


***Figure 60**: A) Manipulation de la lame fine ; B) Amincissement de la moitié de la lame jusque 100 nm d'épaisseur*

Cette lame fine a été analysée grâce à une combinaison de différentes techniques (HR-TEM, RMN, STXM, EELS). Les résultats sont développés dans la suite de ce chapitre présenté sous la forme d'un article scientifique qui sera soumis prochainement.

III. Article 2: Towards a better understanding of the organo-mineral interface in growing abalone nacre

Widad Ajili,[a] Guillaume Laurent,[a] Nicolas Menguy,[b] Karim Benzerara,[b] Marta De Frutos,[c] David Gajan,[d] Anne Lesage,[d] Stéphanie Auzoux-Bodenave,[e] Nadine Nassif,[a] Thierry Azaïs [a]

[a] *Sorbonne Université, CNRS, Collège de France, Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris (LCMCP), 4, place Jussieu, F-75005, Paris, France.*

[b] *Sorbonne Université, UMR CNRS 7590, Muséum National d'Histoire Naturelle, IRD, Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie, IMPMC, F-75005 Paris, France.*

[c] Laboratoire de Physique des Solides, CNRS UMR 8502, Université Paris-Sud, F-91405.

[d] *Institut de Sciences Analytiques (CNRS/ENS-Lyon/UCB-Lyon 1), Université de Lyon, Centre de RMN à Très Hauts Champs, 69100 Villeurbanne, France*

[e] *UMR BOREA "Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques", MNHN/CNRS 7208/IRD 207/UPMCMuséum national d'Histoire naturelle, Station de Biologie Marine de ConcarneauConcarneauFrance*

To be submitted

Abstract

Organo-mineral interfaces are of primary importance in nacre as they are proposed to control the nucleation, growth, orientation and organization of aragonite tablets. In this paper, we investigated immature nacre by paying attention to two key regions: (i) the columnar arrangement and (ii) the lateral surface of growing aragonite. We used high resolution analytical techniques such as high resolution TEM, scanning transmission X-ray microscopy (STXM) and electron energy loss spectroscopy (EELS). In growing columnar arrangement, we evidence large disordered organic inclusions within the center of each tablets. These organic inclusions are oriented in the c-axis direction and extend from one tablet to another through organic bridges. In the case of lateral growth, we evidence a 20 nm thick disordered layer at the surface of immature aragonite tablet. This disordered layer is mainly composed of an organic fraction where carbonates ions are absent. However, the presence of both calcium and phosphate suggests the presence of calcium-binding acidic and phosphorylated proteins in controling the lateral growth of aragonite. The organic layer could be a residue of the interlamellar silk fibroin gel rich in acidic soluble protein in which the tablets grow.

Introduction

Nacre is one of the most fascinating biological hybrid materials due to the complexity of its organization at different scales and as such is studied for more than 150 years (Carpenter 1847). Nacre, also called mother-of-pearl, is produced naturally by some mollusks such as bivalves, gastropods and cephalopods and corresponds to the shiny iridescent inner side of their shell.

This composite material is made of a mineral and an organic fraction. The mineral phase is composed of crystalline aragonite, a polymorph of $CaCO_3$ that represents about 95 wt. % of the

whole material. Aragonite crystals form polygonal tablets measuring 10-20 µm in diameter and 0.5-1 µm in thickness (Weiner 1986; Jackson *et al.* 1989) (**Figure** 1).

The mineral tablets are surrounded by a 20-50 nm thick organic matrix layer composed of two types of organic molecules: polysaccharide and proteins (Jackson et al 1988; Heinemann *et al.* 2011). The polysaccharide is β-chitin, a polysaccharide largely present in Nature. The second organic component is composed of two fractions described as insoluble or soluble in acidic solvents, the so-called silk and acidic proteins, respectively. Silk proteins display similarities with the arthropod silk. They are the major protein fraction and are present as a hydrogel-like state located in-between the β-chitin layer (Addadi *et al.*, 2006). The acidic proteins are particularly rich in acidic amino acid and are dispersed within the silk gel-like phase.

In gastropods, the tablets are stacked in a columnar arrangement where their centers are nearly aligned (Marin *et al.*, 2008). During nacre formation, interlamellar organic membranes are first deposited and act as a template for the mineral deposition. (Bevelander *et al.*, 1969). After nacre formation, the remaining organic fraction is acting as cement joining the aragonite crystals.

The layering organization offers a great example of both regularity and complexity and this particular organization and composition give nacre remarkable mechanical properties in term of strength and toughness: nacre is 3000 times more fracture resistant than the pure crystal of aragonite (Currey 1977; Jackson *et al.* 1988).

The aragonite crystals formation mechanism remains unclear. However, two growing directions are identified: a longitudinal and a lateral growth (***Figure* 1**).

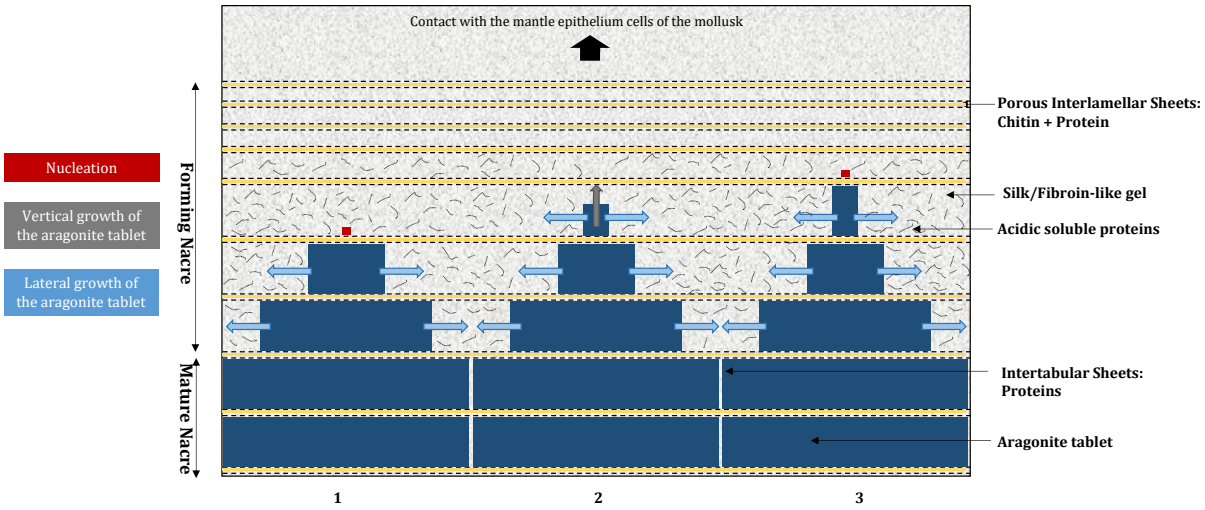


Figure 1 : *Schematic description of the growing steps occurring for aragonite tablets in nacre. 1: mineral nucleation at the center of an underlying tablet; 2: growing in the c axis direction normal to the organic sheets; 3: lateral expansion up to contact inhibition*

The longitudinal growth starts with a mineral nucleation step for which two different mechanisms are proposed.

The **heteroepitaxy** mechanism was first described by Weiner *et al.* (Weiner 1984) and proposed that the mineral nucleation is driven by a direct contact with the organic layers from the organic matrix (Furuhasi et al, 2009 and Lin *et al.*, 2005). Further works (Nudelman *et al.*, 2006 and Bezares *et al.*, 2008) proposed that acidic rich proteins adsorbed onto the chitin layer and localized at the center of a tablet surface would start the aragonite nucleation. Single points of nucleation rich in acidic proteins would be vertically aligned, orienting the nacre columnar arrangement (Nudelman *et al.*, 2006).

The second mechanism is **homoepitaxy** and was first proposed by Schaffer *et al.* in 1997. It suggests that mineral growth occurs though mineral bridges occurring across nanopores located within the organic matrix. This mineral-mineral contact induces a crystallographic continuity between superposed tablets in a nacre column where the c-axis is perpendicular to the organic layer (Shäffer *et al.*, 1997, Heinemann *et al.*, 2011). Nevertheless, it was also proposed that some bridges have an organic nature (Rousseau *et al.* 2005).

Recently, Checa and co-workers have observed unique large pores (~ 200 nm) at the center of the base of each tablets in columnar arrangement leading to central mineral bridges. They assumed that tablets are connected by a tower axis that explains the columnar growth in gastropod shells. (Checa et al 2008, Checa *et al.* 2011).

Recently Olson *et al.* proposed that nacre formation could result from both mechanisms where the unique central large pore, allowing the crystallographic continuity, would be surrounded by acidic organic molecules controlling the mineral nucleation.

After nucleation, the forming crystal grows in the c-direction perpendicular to the organic sheet until it reaches the next pre-positioned organic matrix layer. At this point, the tablet stops to grow in thickness and starts to extend parallel to the organic matrix sheets (Nudelman *et al.*, 2006 and Fritz *et al.*, 1994).

The lateral growth occurs within a confined gel-like phase rich in silk fibroins and acidic proteins. (Bevelander *et al.*, 1969, Nakahara *et al.*, 1991). During the lateral mineral expansion, some organic molecules are entrapped within individual crystallites inducing some anisotropic lattice distortions (Pokroy, 2007). These proteins inclusions might originate the carbon rich voids within aragonite tablets identify by Gries *et al.* in 2009. This lateral growth then ends by contact inhibition with an adjacent crystal.

Once the nacre formation is achieved, aragonite tablets are not fully crystalized as disordered mineral surface layer has been evidenced in *Haliotis laevigata* (Nassif et al PNAS 2005), *Haliotis tuberculata* (Ajili *et al.* in 2018a) or *Perna viridis* (Zhang and Xu, 2013). This disordered layer is proposed to be interfacial between the crystalline aragonite core and the organic matrix.

According to the above mentioned observations and proposed mechanisms, different organo-mineral interfaces can be identified within mature and growing nacre (***Figure* 2**):

i) between the longitudinal mineral surface and the interlamellar organic sheets.

ii) between the lateral mineral face and the silk gel during the lateral growth.

iii) between the lateral mineral face and the intratabular matrix once the tablets lateral expansion is achieved.

iv) At the central nucleation zone of the tablets

v) Within the tablets between the potential organic inclusions and the mineral bulk.

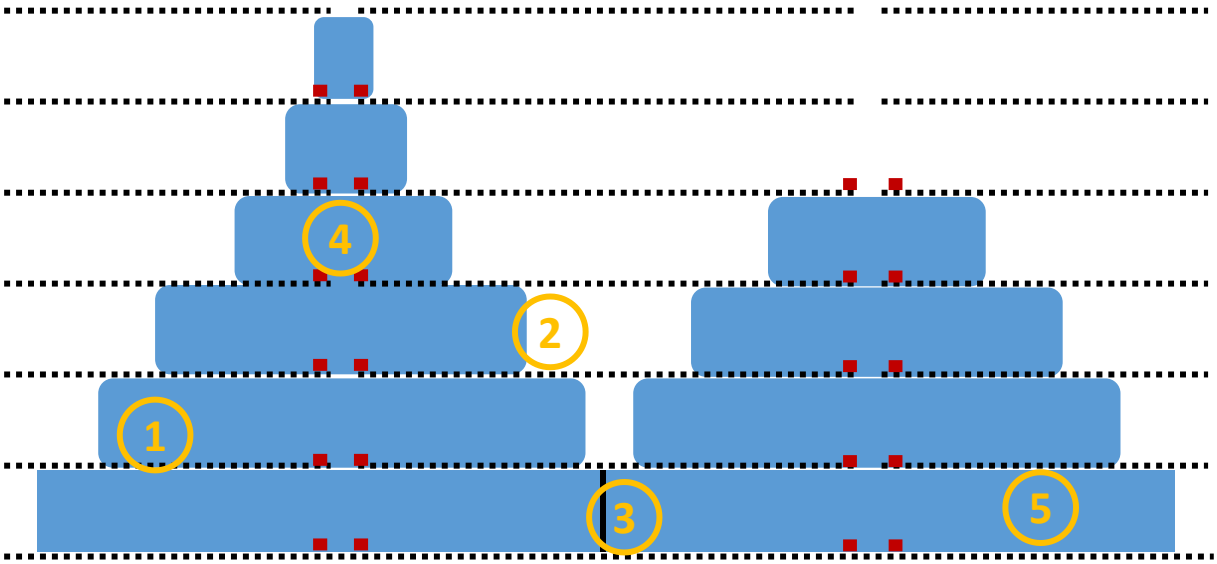


Figure 2*: Location of the different putative organo-mineral interfaces in nacre according to the latest available published data including the Olson model (Oslon et al., 2012, 2013). 1: interface between the longitudinal mineral surface and the interlamellar organic sheets; 2: interface between the lateral mineral face and the silk gel during the lateral growth; 3: interface between the lateral mineral face and the intratabular matrix once the tablets lateral expansion is achieved; 4: central nucleation zone of the tablets; 5: Within the tablets between the organic inclusions and the mineral bulk*

The exact nature of these mineral-organic interfaces is not fully known but acidic proteins seem to be involved. They are described to be mainly present in the silk fibroin gel but they are

also proposed to be present at the nucleation mineral site (Nudelman et al., 2015). It was shown that this family of proteins control crystal nucleation, polymorphism, morphology and orientation of calcium carbonate crystallites *in vitro* and *in vivo* (Belcher *et al.*, 1996, Fang *et al.*, 2011, Addadi 1996, Morse 1996, Weiner 2003). They are characterized by the predominance of acidic amino acids that favor the interaction with the mineral through calcium ions binding. On the other hand, the presence of functional domains like carbonic anhydrase domains allows the enzymatic formation of CO_3^{2-} (Marin *et al.*, 2004). Different proteins post-translational modification can occur such as glycosylation, sulfatation and phosphorylation, which are crucial for their functions (Nudelman *et al.*, 2006). Among them, phosphorylation is one of the most widespread protein post-translational modifications occurring in mineralizing proteins (Veis *et al.*, 1997, George and Veis 2008). In the case of invertebrate, Borbas et al showed that phosphorylated shell matrix was more effective in inhibiting crystal growth than dephosphorylated matrix (Borbas *et al.*, 1991). It is also known that phosphorylation of proteins can affect their interaction with calcium and possibly induice their occlusion inside the crystals (Du *et al.*, 2018).

In this work, we use the European Abalone *Haliotis tuberculata* as a model toaccess the nature of the various organo-mineral interfaces in forming nacre. We focused our analyzes on two key domains within nacre's columnar arrangement: (i) the central region and (ii) the lateral faces of growing aragonite tablets. The focused ion beam (FIB) technique coupled to scanning electronic microscopy (SEM) allowed us the selection of a growing nacre zone in *Haliotis tuberculata*'s shell and the production of a thin section within the growing nacre zone. In addition to high resolution TEM (HR TEM), we use high resolution atomic mapping techniques such as STXM and EELS to gain very local information on the nature of the organo-mineral interface. The distinction between organic *vs* mineral carbons revealed the presence of organic-rich domains aligned in the c-axis direction and located at the right center of superposed nacre's tablet. This organic-rich domain seems to act as an organic vertical "backbone" crossing nacre's column. Similarly, the

discrimination of organic *vs* mineral carbons demonstrates that disordered layer around aragonite crystal in lateral expansion is composed by an external organic-rich layer where carbonates are absent but surprisingly, where calcium ions are present. We also revealed the presence of phosphorus in this layer suggesting the implication of phosphorylated protein at hybrid interfaces. We extend such analysis to ^{13}C-^{31}P distance investigation through solid state NMR in whole nacre. In agreement with data, we evidence proximity of phosphate ions both with the mineral phase (disordered carbonates) and carbonyl groups from the organic matrix.

Experimental section

Biological material and sample preparation

One and four years-old European abalone, *Haliotis tuberculata,* specimens were obtained from *France Haliotis* farm (Plouguerneau, France). After dissection, shells measuring around 1 (1-year-old) or 5 cm (4-years-old) long were washed with distilled water.

For the ssNMR analyses, the outer layers (the periostracum and the sphrerulitic layer) of *Haliotis tuberculata*'s shell of a 4-years-old specimen were removed by sanding in order to obtain only the nacreous layer. Nacre was then manually grinded in an agate mortar and used for the DNP SENS analysis.

Focused Ion Beam preparation

Focused Ion Beam (FIB) was performed on the nacre layer of a *Haliotis tuberculata* 1 year-old shell using Zeiss Crossbeam Neon40 at IMPMC (Sorbonne Université, Paris). A thin section of approximatively 100 nm in thickness has been prepared.

SEM-FEG

Scanning Electron Microscopy Field Emission Gun (SEM-FEG) observations were done at the IMPMC-UPMC-CNRS-IRD (Paris, France) on a Zeiss Ultra55 with an acceleration tension of 3 kV.

HR-TEM

HR-TEM observations experiments were performed at the IMPMC-UPMC-CNRS-IRD (Paris, France) on a JEOL-2100F microscope operating at 200 kV, equipped with a field emission gun, a JEOL detector with an ultrathin window allowing detection of light elements, and a scanning TEM (STEM) device, which allows Z-contrast imaging in HAADF mode (STEM-HAADF).

STXM

STXM experiments were performed on the HERMES Beamline at the SOLEIL synchrotron light source (Belkhou *et al.*, 2015). The SOLEIL storage ring operated at 2.75 GeV and 430 mA stored current in the top-up mode. A plane grating monochromator with a 450 l/mm grating and 25 um exit slit were used for carbon imaging and spectroscopy, providing a theoretical energy resolution better than 100 meV. Energy calibration was accomplished using the well-resolved 3p Rydberg peak at 294.96 eV of gaseous CO_2. A zone plate was used to focus the X-ray beam to a spot size of ~50 nm. An image stacks was collected by scanning the FIB section in x–y direction (image stack) at energy increments of 0.12 eV for carbon, over the 280-320 eV energy range of interest. Counting time was 4 milliseconds per pixel and per energy step. Data were processed using the aXis2000 software. Maps were obtained by fitting the hyperspectral data with endmember spectra extracted from the dataset.

EELS HADF

Samples were analyzed using a VG HB01 Scanning Transmission Electron Microscope (STEM) equipped with a cold field emission gun, a home modified Gatan spectrometer and a

home-made cryo-stage to minimise the beam radiation damage. EEL (electron energy loss) spectra were acquired at 100kV, with an energy dispersion of 0.5 eV/channel, in the spectrum-imaging mode (SI) (Jeanguillaume, *et al.*, 1992). Typical energy resolution was about 1 eV measured from the zero loss peak and the spatial resolution determined by the beam diameter was approximately 1 nm. The energy scale of EEL spectra was calibrated using the peak maximum position of the phosphorus and calcium L23 edges, respectively at 138 eV and 349 eV, according to XANES analysis from Cosmidis *et al.* 2015.

In the SI mode, the focused beam is scanned over a region of interest and a whole spectrum is acquired at each position of the scan. A typical hyperspectral image contains about 10000 spectra. Data were first processed to improve the signal-to-noise ratio by using principal component analysis (PCA) under Hyperspy, an open-source software suite (http://hyperspy.org/) as a filtering method. Elemental maps were then built by removing the background and summing the intensity corresponding to each characteristic edge. The peaks on carbon K-edge associated with the different chemical species were fitted by a gaussian for each beam position, using the NLLS (non-linear least squares) method in Gatan's Digital Micrograph software. The Gaussian amplitude across the analyzed area gives the relative abundance of each species.

Dynamic nuclear polarization surface-enhanced NMR spectroscopy (DNP SENS)

Sample Preparation:

Powder nacre sample was impregnated through incipient wetness impregnation method by a solution of biradicals. AMUPol (18 mM) was dissolved in a glycerol/D_2O/H_2O solution of volume ratio 60/30/10. As nacre is a dense material, 12h of equilibrium was done before DNP SENS analysis to allow the radical solution to enter the sample.

Measurements:

Solid-state DNP SENS experiments were done at CRMN (Lyon, France) and conducted on a Bruker 9.4 T AVANCE-III NMR spectrometer operating at frequencies of 399.95 MHz for ^{1}H and 161.90 MHz for ^{31}P, and under conditions of 8 kHz MAS at 105 K. The spectrometer was equipped with a Bruker 3.2 mm H-X-Y triple resonance variable temperature MAS probe head, a cooling cabinet, and a 263 GHz gyroton microwave source and waveguide system.

^{31}P CP MAS experiments were performed with the following conditions: recycle delay = 10 s; contact time = 5 ms.

^{31}P-^{13}C CP REDOR experiments allows the investigation ^{31}P•••^{13}C spatial proximities. In this sequence, the ^{13}C magnetization is generated by a standard CP step, and then a rotor-synchronized refocusing π pulse is applied on ^{13}C channel. To allow the re-introduction of the ^{31}P-^{13}C dipolar coupling, dephasing ^{31}P π pulses were applied at each rotor period during the ^{13}C evolution. REDOR difference $\Delta S = S_0 - S$ exhibits the ^{13}C resonances dipolarily coupled to ^{31}P, consequence of a spatial proximity between the two nuclei.

^{31}P-^{13}C CP REDOR experiments were performed with following parameters: recycle delay = 5 s; contact time = 10 ms; number of scans = 144; recoupling times = 0.125, 1.125, 2.125, 3.125, 4.125, 5.125, 6.125 and 7.125 ms.

Results and Discussion

SEM FEG observations were used to select the nacre growing zone where aragonite tablets are immature as they are not fully jointed. The ***Figure* 3A** displays tablets emerging from the surface and coated with a porous organic matrix. Two characteristic tablets were chosen and coated with platina (***Figure* 3B**). Then, FIB abrasion was undertaken up to the platina coating and reveals a columnar arrangement of nacre as expected for *Haliotis tuberculate* (***Figure* 3C**). As a result, the FIB section displayed in ***Figure* 3D** and revealed the staking of immature aragonite tablets in a nacre growing zone. Noticeably, the aragonite tablets stack adopts a "Christmas tree" morphology as their width decreases starting from the top of the columnar arrangement.

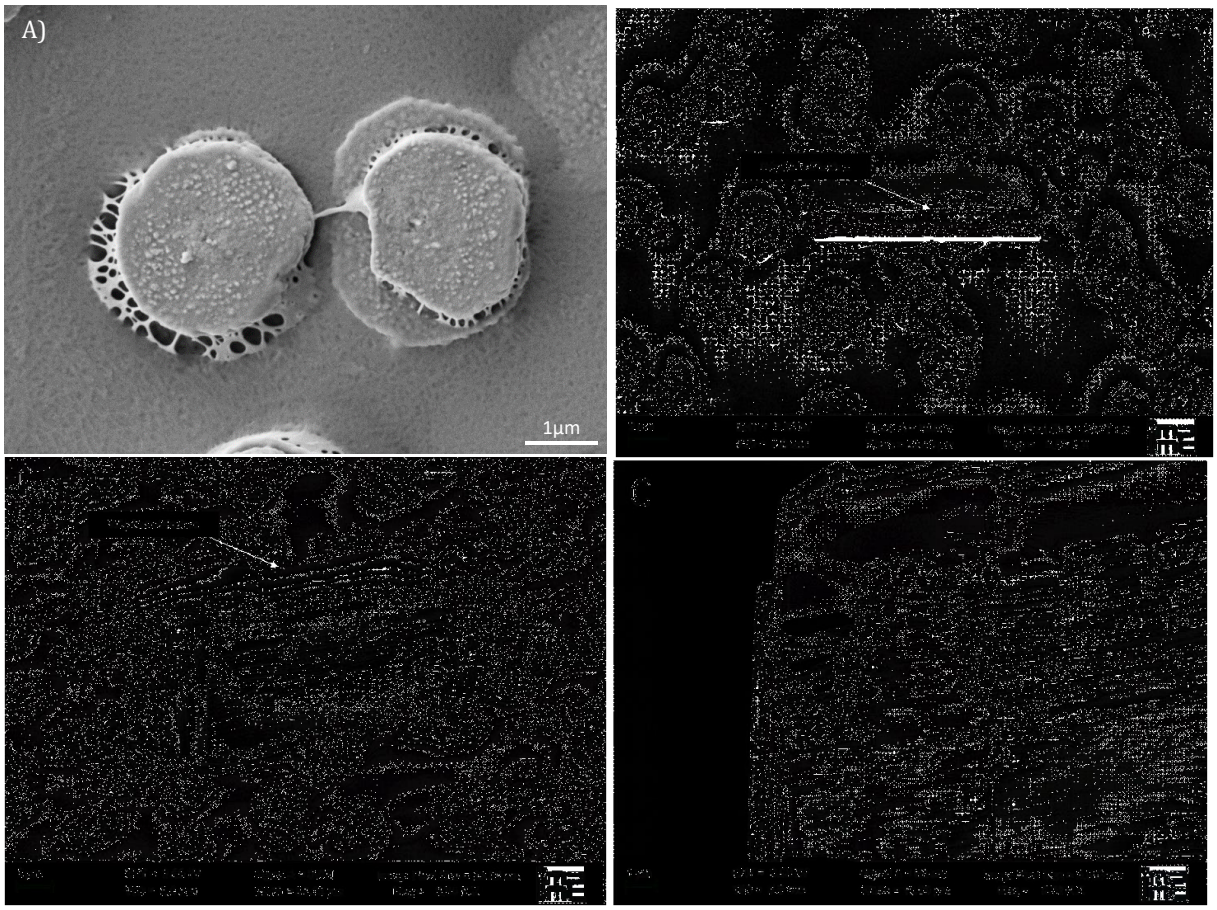


***Figure** 3. SEM FEG observations of A) immature aragonite tablets, B) coated with platina, C) FIB abrasion, D) the resulting FIB thin section*.

Longitudinal growth of aragonite tablets in columnar arrangement

The FIB section was then thinned down to less than 100 nm right in the center of the columnar arrangement. The careful examination through SEM FEG revealed less contrasted zone in the center of the tablets all along the columnar arrangement similar to a vertical backbone. (***Figure* 4A**).

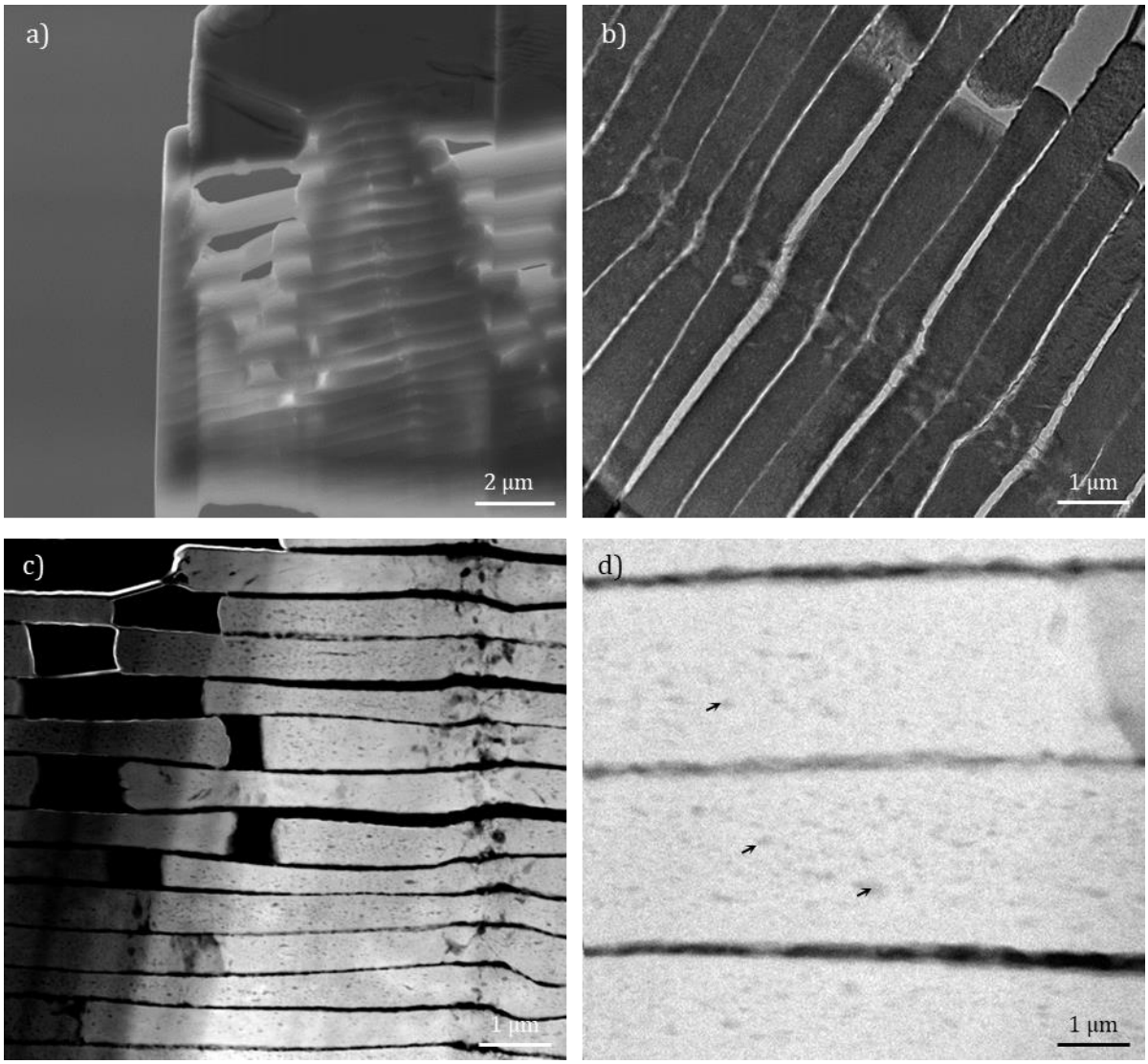


***Figure** 4: a) SEM, b) TEM and c) STEM HAADF images of the FIB section with a focus on the aligned defects. D) higher magnification of STEM HAADF images. Black arrows indicate nanometric defects or inclusions.*

TEM observations reveal that the less contrasted zones are spread all along the width of the tablets (***Figure* 4B**). Observations in STEM-HAADF mode confirms the presence of lighter elements compared to the bulk of the tablets. They appear as defects within the central region the

tablets and aligned in the c-axis direction (***Figure* 4C**). They are of irregular shape and size with the largest ones of about 200 nm. Close observations in STEM-HAADF (***Figure* 4D**) reveal also nanometric defects (10 to 50 nm) inside the core the tablets. In the opposition to the central defects, these nanodefects are homogeneously dispersed within the mineral.

The central defects remind observations done by Checa *et al.* on *Gibula umbilicalis* where large holes were evidenced at the base of aragonite tablets that the authors assigned to large central unique pores aligned in the c-axis direction (Checa et al 2008, Checa *et al.* 2011). In opposition to the observation done by Checa *et al.* the central inclusions observed in this work are not located specifically at the base of the tablets but are dispersed within the tablets. The nanometric inclusions are in agreement with the observation done by Gries *et al.* 2009 on *Haliotis laevigata* that the authors assigned to carbon rich "voids" of unknown nature.

We investigated the interlamellar region between stacked tablets at the central zone defects through high resolution through HR TEM (***Figure* 4**). The resulting micrographs reveal numerous bridges of about 100 nm long and 10-50 nm width that are linking the tablets in continuity of the central defects (***Figure* 5A and 5B**). These structures are not crystalline even if crystalline mineral protuberances are sometimes seen inside the amorphous bridges (***Figure* 5C and 5D**). The number of bridges is higher in the continuity of the central defects than outside of this zone. Consequently, this zone seems to be essential to the columnar arrangement by linking the tablets together.

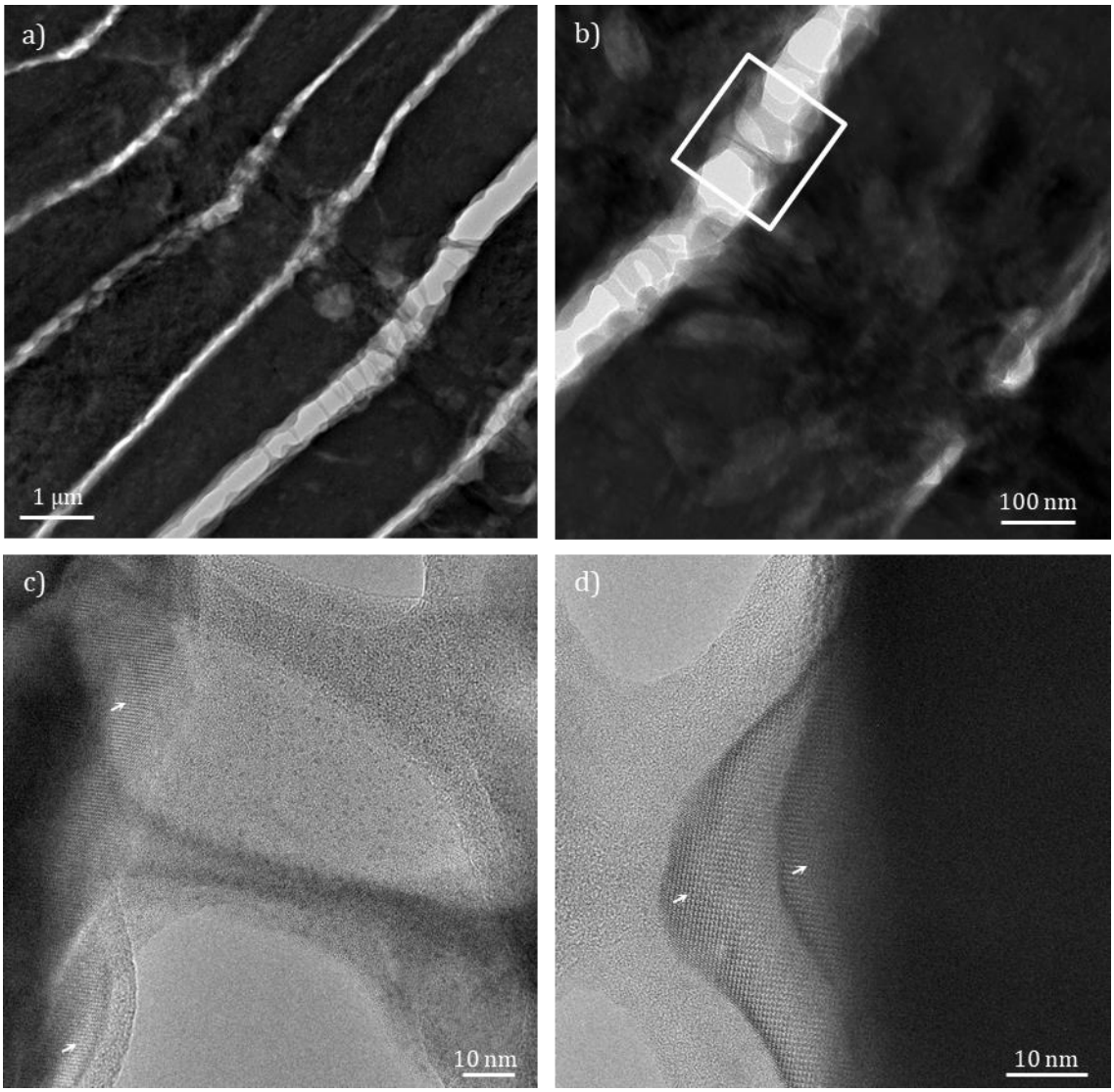


Figure 5 : *a) TEM observation of the central defects zone. B) TEM observation at higher magnification highlighting the interlamellar bridges. C) and D) HR TEM observations of the zone marked by the white rectangle. White arrows point the crystalline lattice.*

In nacre mature region, SEM observations of stripped tablets revealed residual structures (white arrows in ***Figure* 6**) in the center of each tablet. These structures arise probably from the aligned central inclusions observed in ***Figure* 4 and 5**. The ***Figure* 6B** revealed that the residual central structures are like protuberance of matter of about 1 µm in height approximately the size of a tablet in thickness. This finding strongly suggests that the central defects are not aligned holes but are rather made of dense matter that might cross though the stacked tablets.

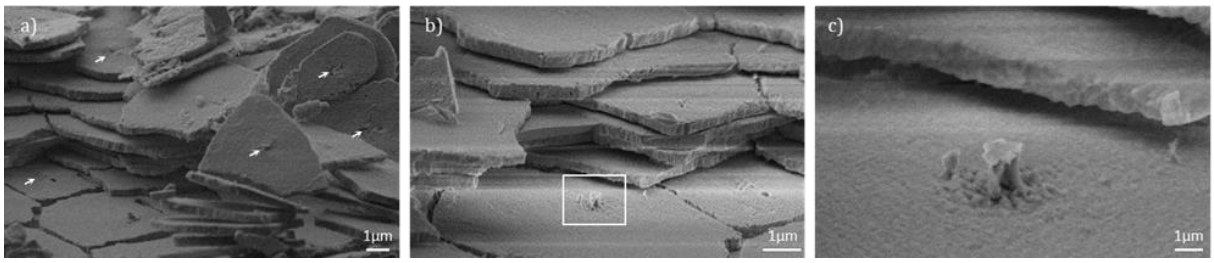


***Figure** 6. a) SEM observations of stripped nacre tablets. White arrows indicate defects or protuberance at the center of the tablets. B) and c) SEM observation of a protuberance.*

The exact nature of the central defects remains unknown at this stage as they could be composed of organic and/or mineral mater. Checa *et al.* 2011 proposed that their observed inclusions are central unique pores linking the tablets. However they do not conclude on exact the nature of these central structure. Nudelman *et al.*, 2015 identified the central nucleation proteins as rich in carboxylate and sulfate groups.

The chemical composition of the central defects identified in the columnar arrangement was analyzed by scanning transmission X-ray microscopy (STXM) of the FIB thin section. This spectromicroscopy technique provide images with a spatial resolution of about 50 nm and x-ray absorption near edge structure (XANES) spectra at the same spatial scale. XANES spectra were acquired at the carbon K-edge (280-320 eV), providing information on the speciation of carbon. In particular, inorganic (i.e. carbonates) *vs*. organic carbon could be distinguished on that basis (Cosmidis and Benzerara, 2014).

The investigated region of the FIB section was carefully chosen in order to account the central defects zone, immature tablets and organic layers (***Figure* 7a**). Two different XANES spectra were detected in the hyperspectral data obtained on this area and explained most of the spectral variability (***Figure* 7b and 7c**). One XANES spectrum (blue spectrum in ***Figure* 7c**) was associated with the nacre tablets. This XANES spectrum displayed a narrow peak at 290.3 eV corresponding to 1s $\rightarrow \pi^*$ electronic transitions in carbonate CO_3^{2-}, as well as broader peaks at 296, 300 and 301.5 eV, corresponding to 1s $\rightarrow \sigma^*$ electronic transitions in carbonate CO_3^{2-} all consistent with almost pure aragonite (Zhou *et al.*, 2008).

The second spectrum (in red in ***Figure* 7c**) was prevalent around the nacre tablets. It corresponded to areas containing some carbonates but also a significant amount of organic material. Indeed, this XANES spectrum contained the peaks attributed to aragonite but additionally showed several other peaks at lower energies: in particular at 285.1 eV, 286.7 eV and 288.4 eV that were interpreted as 1s $\rightarrow \pi^*$ electronic transition in aromatic, ketone and carboxylic acid carbons, respectively (Benzerara *et al.*, 2004). This observation is consistent with the presence of chitin and protein-rich layer surrounding aragonite tablets (Solomon *et al.*, 2009).

More importantly, we also evidence that organic-rich regions exist in the central defects region suggesting organic inclusions aligned in the c-axis direction. These organic inclusions might correspond to the organic nucleation sites described by Nudelman *et al.*, 2006. However, we demonstrate through STEM observations and STXM analysis that these organic inclusions are actually located in the whole thickness of the tablets. It seems that these organic inclusions together with the amorphous bridges seen in ***Figure* 5c and 5d** act as real backbone for the formation of the nacre columnar arrangement. However, this central zone within the tablets is not purely organic as aragonite signal (290.3 eV in ***Figure* 7e**) is detected as well suggesting a local association of the mineral and the organic phases.

A closer analysis of the blue spectra (***Figure* 7d**) shows that the lower energy pics corresponding to organic matter are also present at a lower concentration. This possibly indicates that the core of the tablets also contain some organics in addition to aragonite. This signal might result from intra-crystalline proteins, which are trapped during the mineral tablet growth and could correspond to the nanometric defects seen in ***Figure* 4d**.

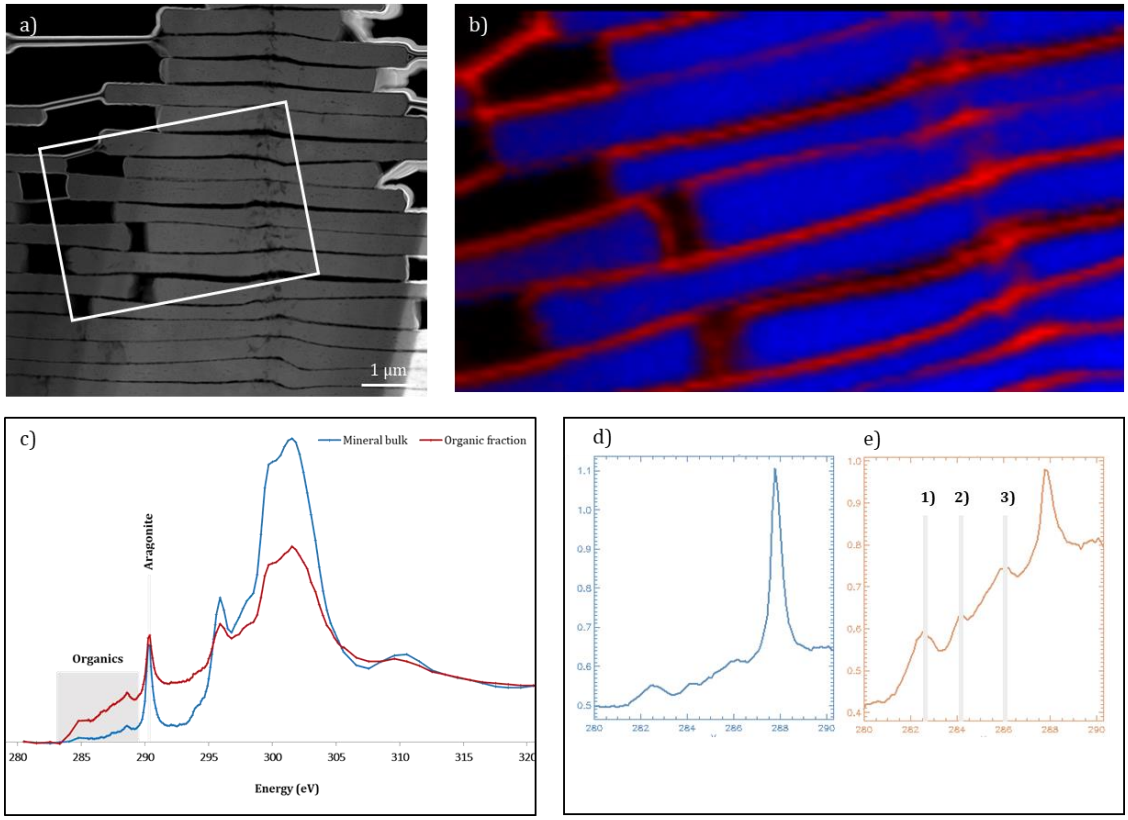


***Figure** 7. a) the STXM investigated region of the FIB section is marked with the white rectangle. b) resulting STXM map where mineral and organic regions are colored in blue and red, respectively. C) typical XANES spectra found in the mineral bulk (blue) and in the interlamelar region (red). D) and e) zoom of the two XANES spectra in the 280 – 290 eV region.*

The ***Figure* 7b** highlights that the lateral sides of immature tablets are also surrounded by an organic-rich layer. The next part concerns the study of the organo-mineral interface at the lateral growth of the tablets.

Lateral growth of aragonite tablets

HR-TEM observations have been performed on lateral aragonite tablets growing regions (zones 1, 2, and 3 in ***Figure* 8**). In such growing zone, the tablets are not laterally adjacent as space is observed in-between particles. Systematically, a non-crystalline domain is observed at the edge of the tablets in contact with the crystalline lattice of aragonite (***Figure* 8b-d**). Such a non-crystalline layer at the surface of the aragonite tablets has already been observed. However, the zone investigated was the longitudinal front of mature tablets (Ajili *et al.*, 2018, Nassif *et al.*, 2005). The ***Figure* 8b-d** reveals that the thickness of the non-crystalline domain is homogeneous and varies between 15 and 20 nm. The amorphous layer seems to be thicker in the growing lateral zones compared to the basal zone where a continuous layer of about 5 nm was observed for *Halotis laevigata* (Nassif *et al.*, 2005) and *Haliotis tuberculata* (Ajili *et al.*, 2018a). The aragonite crystalline lattice is also observed (***Figure* 8b-d**) but is found to be irregular in the growing lateral zones. On the opposite, on the basal zones the edge of the crystalline lattice is much more regular (Nassif *et al.*, 2005 ; Ajili *et al.*, 2018a).

The disordered domain at the basal surface was proposed to be mainly mineral (Ajili *et al.*, 2018a, Nassif *et al.*, 2005). However, the difference in terms of thickness and growing mechanism in these two zones (lateral vs basal) question their similarity in terms of composition.

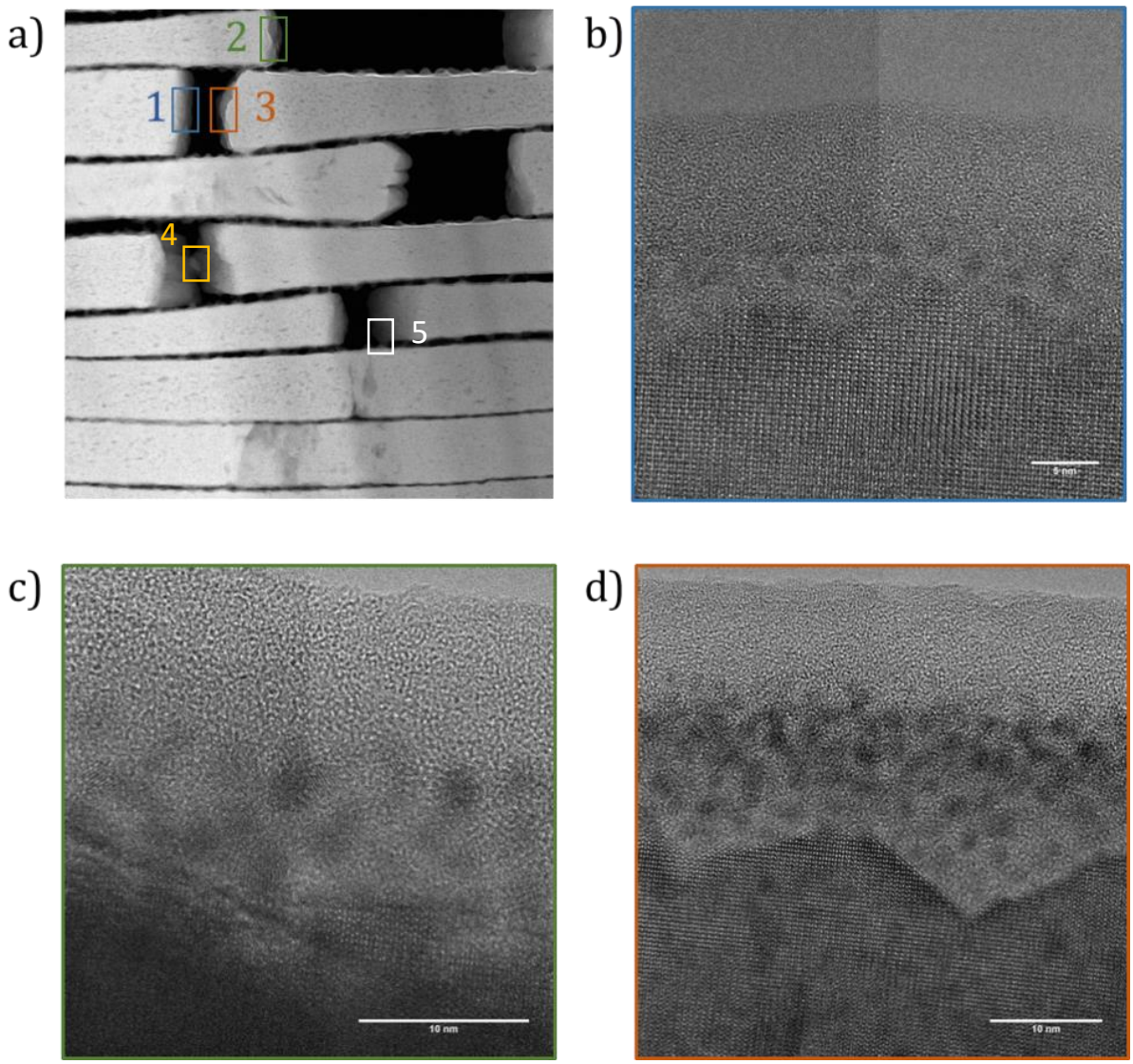


***Figure** 8. a) STEM HAADF observation of the 3 investigated zones denoted 1, 2 and 3. HR TEM observation of b) zone 1, c) zone 2 and d) zone 3. Zones 4 and 5 are additional zones studied by EELS.*

Lateral growing region 1 previously characterized by HR-TEM were analysed by EEL spectroscopy, close to the edge of the aragonite tablet where the thickness is low enough (***Figure* 8a**). A complete EEL spectrum was recorded at each position over the scan area (***Figure* 9d**) in the energy range corresponding to the phosphorus L_{23}-edge, carbon K-edge and calcium L_{23}-edge.

We note that EELS spectra are sensitive to the probe position revealing a variable composition (***Figures* 9a, 9b and 9c**). The positions A and C are the edge of the lateral region

whereas positions B and D are located *circa* 20 nm in the internal region. For the carbon edge, we distinguish two different patterns associated to the different chemical species composing the lateral region. At the positions B and D, the spectrum is dominated by the presence of a pre-peak at 290 eV (peak 2 in ***Figure* 9b**) and a peak at 301 eV. This signature is in good agreement with XANES data presented in ***Figure* 7c** and corresponds to carbonate as observed for the aragonite reference sample showed in ***Figure* 9b** (black curve). CO_3^{2-} was not distinguished from HCO_3^- on the basis of our EELS data. At the positions A and C, the spectra are characterized by the presence of a pre-peak at ~ 287 eV (peak 1 in ***Figure* 9b**) and a broad peak centered around 295 eV. In X-ray absorption measurements, the position of the peak associated to the C 1s $\rightarrow \pi^*$ transition is specific to each biomolecule (proteins, lipids, DNA, saccharides) and varies between 288 and 289 eV (Lawrence *et al.*, 2003). Compared to XANES, EELS spectra for organic compounds always exhibit modified signatures due to beam damage effect. In a recent study, the peak at 287 eV was attributed to proteins (Nitiputri *et al.*, 2016) but in our measurements, no difference was observed for the position of the carbon pre-peak between proteins and proteins associated with chitin at our energy resolution (***Figure* 9c**). A peak is also observed at 285 eV associated to amorphous carbon when the specimen is analysed on a TEM carbon grid (proteins and proteins+chitin) but it is also visible as a small shoulder for the FIB sample probably due to a partial degradation of the organic compounds under the electron beam. As a consequence, we assume here that the peaks at 285 and 287 eV are associated with organic species (proteins and/or chitin).

Interestingly, on the basis of these data, we can evidence that in the outer positions A and C, organic carbons are dominant, whereas in the inner positions B and D, carbonates are majority. The distributions of carbonate and organic species were determined by performing a multi-Gaussian fitting of the carbon pre-peaks located at 290 eV for carbonate and at 285 eV and 287 eV for the organic species. The abundancy of each specie is given by the amplitude of the Gaussian used to fit each peak across the imaged area. The two corresponding maps (carbonate and organic compounds) are depicted separately in ***Figure* 9e and 9f** and as a false-color composite image in

Figure* 9i** (carbonate in red, organic carbons in green). We observe that organic carbons are principally located in the outer region, at the edge whereas carbonates are absent from this region. The coloured map highlights the non-homogeneous distribution of these species: organic matter forms a regular outer layer of about 20 nm in thickness whereas the inner part is rich in carbonates. When we move away from the edge, the thickness of the aragonite tablet increases and EELS signals get distorted. At larger thicknesses, EELS signals disappear and it is no longer possible to map the presence of the different species. The limit from which the thresholds are too distorted to obtain reliable maps is indicated by a white line on the color maps (Figures* 9, 10 and 11**).

The energy ranges for the phosphorus L_{23}-edge (from 130 to 180 eV; ***Figure* 9a**) and calcium L_{23}-edge (from 340 to 380 eV; ***Figure* 9b**) reveal double peaks at 138 /147 eV for phosphorus and at 349/ 352 eV for calcium. Both elements show similar line shape whatever the position of the probe (at the edge – position A and C – or in the internal region – position B and D; ***Figure* 9d**). Due to the thickness, the phosphorus edge appears to be distorted in B and D compared to A and B. For calcium phosphate specimens, the exact peak pattern (number, position and intensity of small peaks) of the P and Ca L_{23}-edges is specific to each compound in X-ray absorption measurements (Kruse el., 2009). Unfortunately, in our data, this detailed information was not accessible due to the poor energy resolution in EELS (about 1 eV) even we can state that phosphorous is present as phosphate moieties.

Then, elemental maps corresponding to the phosphorus and calcium distributions were obtained from EELS data by integrating the intensity of the respective edge after background subtraction. The resulting maps reveals that phosphate (***Figure* 9g**) is present in the overall layer and seems to be more concentrated at the very edge in the organic domain. Calcium (***Figure* 9h**) is present in the whole investigated area, both in the carbonate-rich and the organic-rich regions. This last result suggests two type of calcium ions: (i) associated with carbonates as a calcium carbonate phase in the inner region and (ii) associated to organic components at the edge.

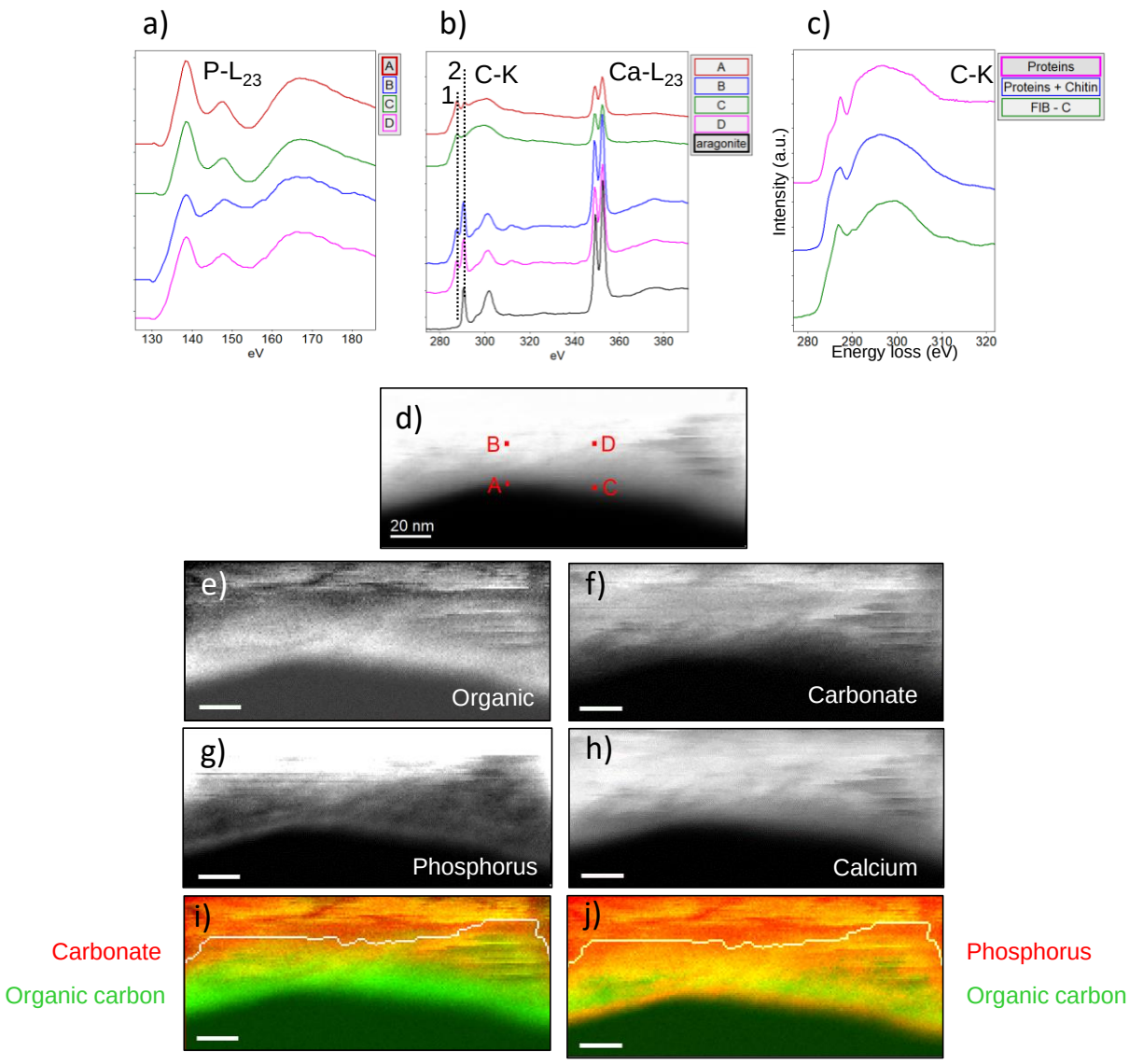


***Figure** 9: Typical EEL spectra acquired at different positions on the lateral growing region denoted 1 in **Figure** 8a for the (a) phosphorus L23-edge and (b) carbon K-edge and calcium L23-edge. On the carbon edge, two peaks were detected at 287 and 290 eV associated with the presence of organic species (peak 1) and carbonate (peak 2). (d) TEM image of the investigated region. (c) comparison of EEL spectra in position C with reference organic compounds. (e-h) EELS maps corresponding the distribution of organic species, carbonate, phosphorus and calcium deduced from their respective edge signals. Color composite images obtained from the individual maps showing the relative abundancies of: (i) organic species (in green) compared to carbonate (in red); (j) organic species (in green) compared to phosphorus (in red).*

The combination of these observations leads to the conclusion that the lateral surface layer of growing aragonite tablets is composed of two domains: an outer layer of about 20 nm mostly composed of organic matter rich in calcium and phosphate ions and no carbonate. This layer coats a calcium carbonate domain rich in phosphate.

This conclusion seems to be generalized to lateral growing regions as we investigated the position 4 and 5 from the ***Figure* 8a**. Organic rich surface layers of 20 nm are evidenced at the edge of non-adjacent tablets (***Figure* 10a and 10e**). Similarly, carbonate is absent in this domain (***Figure* 10b**). The mapping of phosphorus reveals the presence of phosphate ions in the organic rich layer and within the calcium carbonate region even if phosphate seems to more concentrated at the very edge (***Figure* 10d and 10f**).

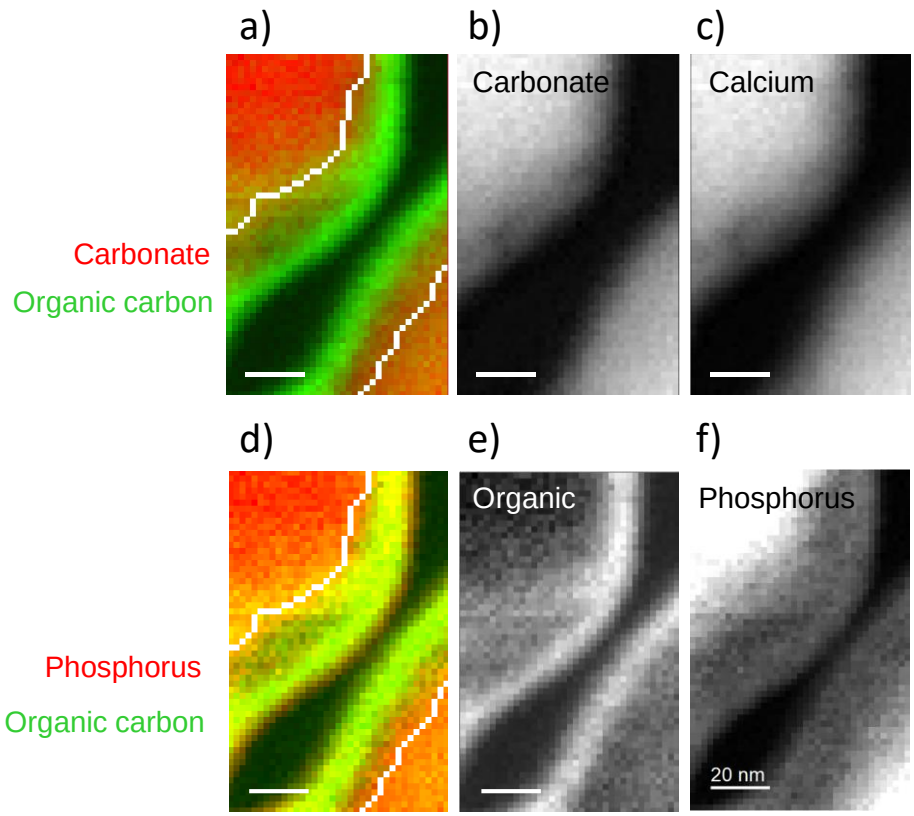


Figure 10: *EELS maps for organic species, carbonate, phosphorus and calcium on zone 4 (**Figure 8**) and color composite images showing the relative abundancies of (h) organic species (in green) compared to carbonate (in red) and (i) organic species (in green) compared to phosphorus (in red).*

Finally, the ***Figure* 11** displays the analysis of a region that includes both the lateral growing front of an aragonite tablet and the inter-lamellar organic sheet between superposed tablets (zone 5 in ***Figure* 8**). Carbon mapping (***Figure* 11a, 11B and 11e**) reveals the presence of organic matter both in the inter-lamellar region confirming the organic nature of the inter-lamellar sheets (proteins and chitin). We also note the presence of organic matter at the surface

rowing tablet zone and the absence of carbonate in this latter zone. Once again, a 20 nm thick organic layer is evidenced at the growing front of the tablets. Interestingly, we evidence the local presence of carbonate and calcium (region of about 20-30 nm) inside the organic layer that might corresponds to a mineral bridge. Phosphorus is also evidenced in the whole investigated area meaning both in the organic region (the lateral growing front and the inter-lamellar organic sheet) and in the calcium carbonate region (***Figure* 11d and 11f**).

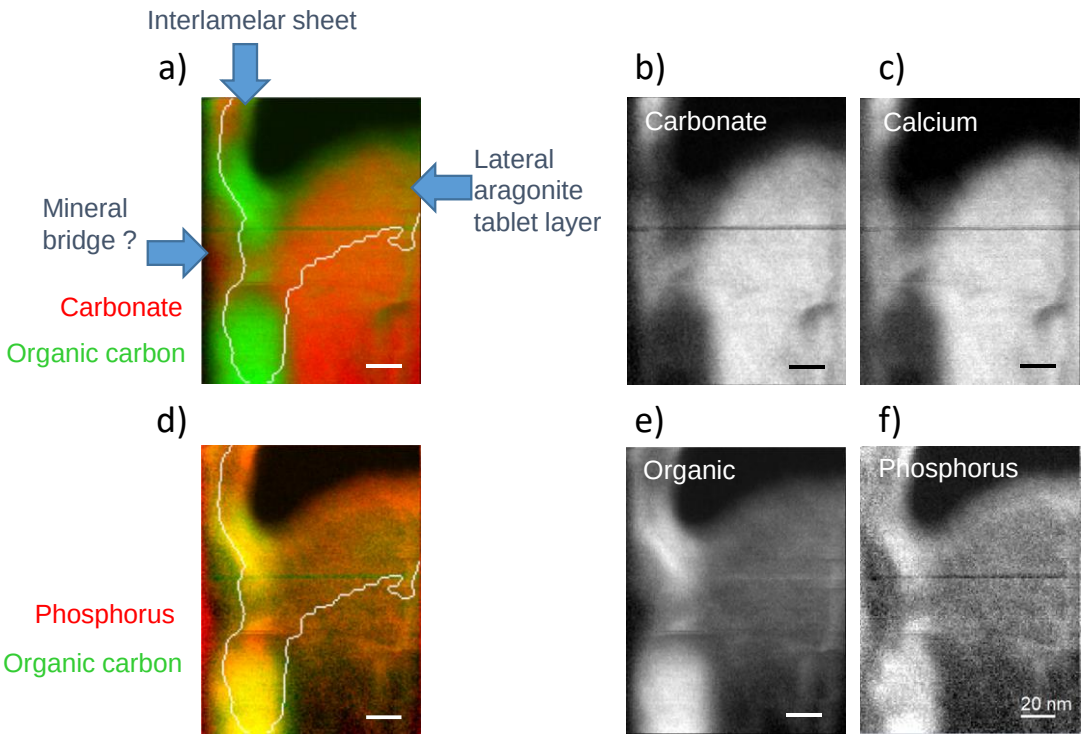


***Figure 11**: EELS maps for organic species, carbonate, phosphorus and calcium on zone 5 (**Figure 8**) and color composite images showing the relative abundancies of (h) organic species (in green) compared to carbonate (in red) and (i) organic species (in green) compared to phosphorus (in red).*

As a conclusion from the EELS analysis, we evidenced that the lateral outer layer of growing aragonite tablets in nacre is not of mineral nature but is mainly organic. Hence the composition of the lateral *vs* longitudinal disordered layers seems to be radically different. Indeed, longitudinal disordered layer of mature tablets has been identified as disordered calcium carbonate due to its

crystallization into aragonite under the electron beam during TEM observations (Nassif *et al.* 2005).

Interestingly, we evidence the presence of both phosphate and calcium ions in the whole investigated growing areas. The presence of calcium in the organic layer suggests strongly the involvement of calcium-binding acidic proteins that might concentrate locally calcium ions. This calcium might react with carbonate in a second step to form aragonite. Concerning phosphate, its precise role is still unknown but its presence in the growing zone suggests a crucial role in the mineral formation. Hence, the role of phosphorylated proteins cannot be discarded. EELS investigations has been done onto very local areas. In order to investigate its presence at higher scale in nacre we turned to solid state NMR analysis coupled to dynamic nuclear polarization (DNP).

Phosphorus species at the organo-mineral interface

To study the presence of phosphorus in nacre we use ^{31}P ssNMR coupled to dynamic nuclear polarization (DNP). DNP is recent technique (Griffin 2010) that allows the enhancement (ε) of the signal-to-noise ratio (S/N) of an NMR experiment. Theoretically, ε can reach up to 660 fold ! NMR being intrinsically poorly sensitive, such gain allows the diminution of the experimental time by a factor ε^2. This technique is based on a magnetization transfer from unpaired electron to a given nucleus under a microwave irradiation. Practically, the sample is impregnated with an aqueous solution of organic radicals and then placed in the NMR spectrometer at low temperature (~100 K). The microwave irradiation is driven by a gyrotron coupled to the NMR probe.

This technique has been successfully applied to different type nuclei of spin ½ (1H, 13C, 29Si, 31P…) or quadrupolar (in particular 27Al et 17O) (Thankamony 2017). Different kind of solid samples have been studied such as silica-based mesoporous materials, nanoparticles or proteins aggregates (Thankamony 2017). Importantly, in the case of solid sample, the transfer of magnetization is occurring from unpaired electron in the solution to nuclei at the surface of the

material through proton of the solvent. Thus, DNP allows the signal enhancement of surface species and is referred as DNP SENS (Surface Enhanced NMR Spectroscopy).

In the case of the study of phosphorous in nacre, we take advantage of both aspect of DNP : (i) the consequent S/N enhancement as the amount of phosphorous in nacre appears to be low; and (ii) the ability to edit surface phosphorous species (occluded phosphorous in aragonite tablets would not be detected through DNP).

***Figure* 12a** displays the ^{31}P DNP SENS spectrum of *Haliotis tuberculata* nacre. A broad signal centered at 4 ppm is observed. The enhancement factor cannot be determined in this case as the ^{31}P microwave off spectrum do not displays any signal. Nevertheless, as the experimental time being 10 min for both spectra, ***Figure* 12** highlights the huge S/N gain obtained through DNP. According to the ^{31}P chemical shift, the signal corresponds to phosphate species in agreement with EELS data.

Importantly, we can argue that the phosphate species observed in the ^{31}P DNP SENS spectrum corresponds to interfaced species. Indeed, the DNP SENS experiment starts with a polarization of nearby proton from the DNP solution that is then transferred through ^{1}H-^{31}P CP to solvent accessible phosphorous species. The core of the tablet being depleted in proton (as mainly composed of $CaCO_3$) we can state that putative crystal occluded phosphate species are not detected through ^{31}P DNP SENS.

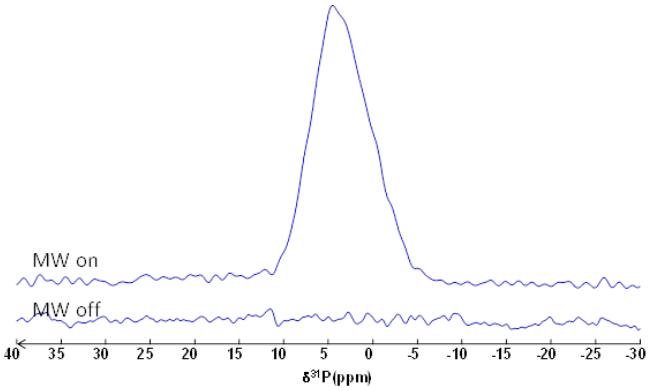


Figure 13: *^{31}P CP MAS DNP SENS spectrum of Haliotis tuberculata nacre. Top : microwave on; down : microwave off.*

As it is impossible on the sole basis of ^{31}P chemical shift to determine if phosphates belong to the organic or mineral domain, we performed a rotational-echo double-resonance (REDOR) experiment. REDOR experiment allows probing the proximities between different spins through the reintroduction of the dipolar coupling. In the case of nacre, the experiment consists of the recording of ^{13}C CP MAS echo spectrum and the recoupling of ^{31}P-^{13}C dipolar coupling through ^{31}P irradiation during the ^{13}C echo period. The ^{13}C resonances of species close to phosphorous will be of lower intensities when compared to a reference spectrum (without ^{31}P irradiation).

The ***Figure* 14** displays the ^{31}P-^{13}C CP REDOR spectra (with and without ^{31}P irradiation) recorded for *Haliotis tuberculata* nacre. Two groups of resonances are observed : (*i*) in the aliphatic region, two strong signal at 61 and 72 ppm correspond to carbon from glycerol present in the DNP solution and use as cryoprotectant; (*ii*) in the carbonyl region, two overlapped signal centered at 171 and 175 ppm that correspond to carbonate and carbonyl from nacre organic phase. The carbonate species observed in this spectrum are solvent accessible species and thus corresponds to interfacial carbonates (and not carbonates from bulk aragonite).

After ^{31}P irradiation (red spectrum in ***Figure* 14**); we observe the dephasing of both carbonate and carbonyl organic signals indicating a close proximity with phosphates. Interestingly, resonances from glycerol do not show such dephasing as there is no phosphorus in the DNP solution, hence validating our experiment. The intensity difference observed with and without ^{31}P irradiation is very weak. This indicates that the faction of carbonates and carbonyls in close proximity with phosphates are of low amount. The variation of the recoupling period allows the estimation of the ^{31}P•••^{13}C distances. The variation of the intensities and their modelization in the spin pair model[1] are displayed in ***Figure* 14d and 14e**. In the case of organic carbonyl, best agreement is obtained for a ^{31}P•••^{13}C distance of 6 Å. In the case of interfacial carbonates, the

[1] Collaboration with Philippe Bertani, Biophysique des membranes et RMN, Institut de Chimie, Université de Strasbourg.

distance estimation is made difficult due to a very weak signal dephasing. However, from these DNP SENS experiments, we evidence interfacial phosphate ions in *Haliotis tuberculata* nacre. These ions are in part close to organic carbonyl groups that might correspond to phosphorylated proteins according to the extracted ^{31}P•••^{13}C distance. Phosphate ions are also close to interfacial carbonates. These species have already been evidenced through ^{13}C NMR are assigned to carbonated in the disordered mineral layer of aragonite nacre in *Haliotis tuberculata* (Ajili *et al.* 2018a). Interestingly, this result is in agreement with the EELS data where phosphates have been detected both in the organic layer and at the mineral surface of aragonite tablets in lateral growth.

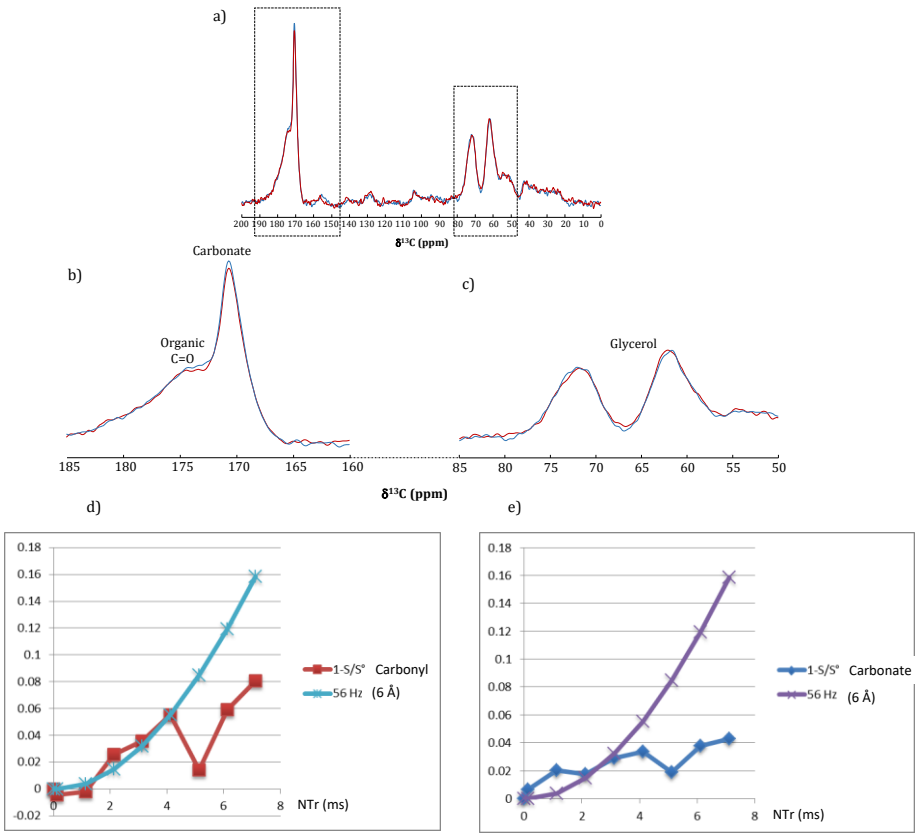


***Figure 14**: a) ^{31}P-^{13}C CP REDOR spectra of Haliotis tuberculata nacre obtained through DNP SENS. b) and c) zoom on carbonyl and aliphatic region. Blue: reference spectrum, no ^{31}P irradiation; red: REDOR spectrum, with ^{31}P irradiation. d) and e) REDOR fraction as a function of the recoupling time with numerical modelization of the ^{31}P•••^{13}C distance.*

Conclusion

In this paper we have investigated organo-mineral interface in nacre with a particular emphasis on growing regions of two types: the longitudinal growth of columnar arrangement and the lateral growth of aragonite tablets.

In the first case, we evidence large disordered organic inclusions across the center of the tablets and oriented in the c-axis direction. These organic inclusions are extended from one tablet to another through organic bridges. It seems that these organic act as an organic backbone controlling the longitudinal growth of the stacked tablets arrangement.

In the case of lateral growth, we evidence a 20 nm thick disordered layer at the surface of immature aragonite tablet. This disordered layer is mainly composed of an organic fraction. Carbonates ions are absent from this layer, however both calcium and phosphate and present within. This result suggests the presence of calcium-binding acidic and phosphorylated proteins that control the lateral growth of aragonite. This layer coats a calcium carbonate layer where phosphate ions are included. The organic layer could be a residue of the interlamellar silk fibroin gel rich in acidic soluble protein in which the tablets grow.

Chapitre V: Structure et formation de la coquille larvaire

I. Introduction

Ce dernier chapitre de thèse dédié à l'étude de la structure et de la formation de la coquille larvaire permet d'appréhender la biominéralisation de la coquille des mollusques sous l'angle du développement ontogénique. Chez les gastéropodes, la première coquille (appelée protoconque) se met en place très tôt au cours du développement post-embryonnaire et est le siège de remaniements continus jusqu'à la formation de la coquille adulte. . L'étude ontogénétique de la coquille larvaire, depuis les étapes précoces de sa mise en place, permet d'accéder aux toutes premières phases minérales déposées et au contrôle biologique précoce impliqué, permettant in fine d'apporter de nouvelles clés pour la compréhension des microstructures de la coquille adulte.

Cependant, très peu d'études sur des stades précoces du développement ont été réalisées jusqu'à présent du fait notamment de la difficulté d'accès aux stades larvaires planctoniques. Les travaux concernent principalement les bivalves, en raison de leur intérêt économique, (Carriker & Palmer, 1979 ; Waller, 1981 ; Castilho *et al.*, 1989 ; Weiss *et al.*, 2002 ; Kudo *et al.*, 2010 ; Miyazaki *et al.*, 2010). On trouve également certaines études qui traitent de la microstructure et de la minéralogie de la coquille chez les larves de gastéropodes (Eyster, 1986 ; Bielefeld *et al.*, 1992 ; Collin & Voltzow, 1998 ; Hasse *et al.*, 2000 ; Weiss *et al.*, 2002 ; Marxen *et al.*, 2003).

Chez les ormeaux, les premiers travaux initiés par Crofts (1937) et poursuivis par Iwata (1980) ont permis de caractériser les étapes précoces de la formation de la protoconque, respectivement chez *Haliotis tuberculata* et *Haliotis discus.* Plus récemment, les travaux effectués sur la formation de la coquille de l'ormeau *Haliotis tuberculata* ont apporté de nouvelles données sur la microstructure et le contrôle biologique de la mise en place de la coquille (Gaume, 2010; Auzoux-Bordenave *et al.*, 2010, Gaume *et al.* 2011). En combinant des techniques de microscopie à polarisation croisée, de MEB et de spectroscopie vibrationnelle (Infra-rouge et Raman) les auteurs ont montré que la coquille larvaire, purement organique dans les premiers stades de développement, se minéralisait dès le stade véligère d'abord sous forme de carbonate de calcium

amorphe (ACC) puis sous forme cristalline aragonitique (Auzoux-Bordenave et al, 2010). Parallèlement, des variations significatives de l'activité de l'anhydrase carbonique et de la phosphatase alcaline, ont été mises en relation avec les étapes de la formation coquillière ce qui confirme l'implication de ces enzymes dans le processus de biominéralisation (Gaume et al, 2011). Plus récemment, le pattern d'expression spatio-temporelle de la lustrine A a pu être mis en relation avec la formation des tablettes de nacre dans la coquille juvénile (Gaume et al, 2014). Ces résultats apportent de nouvelles données sur la microstructure et le contrôle biologique de formation coquillière chez l'ormeau. Toutefois, la différenciation précise des formes amorphes (ACC) et cristallisées (calcite, aragonite) du $CaCO_3$ au cours de la formation coquillière et les interactions entre composants organiques à l'interface tissu-coquille reste à préciser.

Dans ce contexte, en utilisant une approche multidisciplinaire de microscopie (MEB, MET, immunohistochimie) et de chimie des matériaux (RMN du solide) nous avons cherché à approfondir la nature des biominéraux déposés lors de la croissance coquillère et à localiser plus finement les protéines intervenant dans le contrôle biologique.

Dans une première partie, ce chapitre synthétise les données disponibles sur la mise en place de la coquille et son contrôle au cours du développement chez *Haliotis tuberculata*.

Il présente ensuite les résultats des analyses biologiques et structurales selon 3 parties :

- Une étude par Résonnance Magnétique Nucléaire (RMN) du solide permettant d'analyser finement la composition de la coquille à l'échelle atomique avec des outils mis en place dans le chapitre III lors de l'étude de la nacre par RMN.
- Une étude couplant des analyses RMN, de microscopies électroniques et des expériences de synthèses *in vitro* visant à caractériser la nature des phases minérales de nature phosphatée présentes au cours des étapes précoces de la mise en place de la protoconque.

- Une analyse exploratoire par immunolocalisation de l'expression de la Lustrine A, protéine matricielle de la nacre, afin de mieux comprendre le contrôle biologique de la mise en place précoce des biocristaux d'aragonite.

Une conclusion générale permettra de relier ces différents aspects de manière à offrir une meilleure vision sur l'ontogénèse coquillère et du contrôle biologiques associé.

I.1. Développement post-embryonnaire de l'ormeau *Haliotis tuberculata*

I.1.a. Cycle de développement chez Haliotis tuberculata

Le cycle biologique de *Haliotis tuberculata* est constitué de deux phases majeures : la phase pélagique où la larve est en mouvement dans la colonne d'eau et la phase benthique qui débute par la fixation de la larve sur le substrat marin (***Figure* 61**).

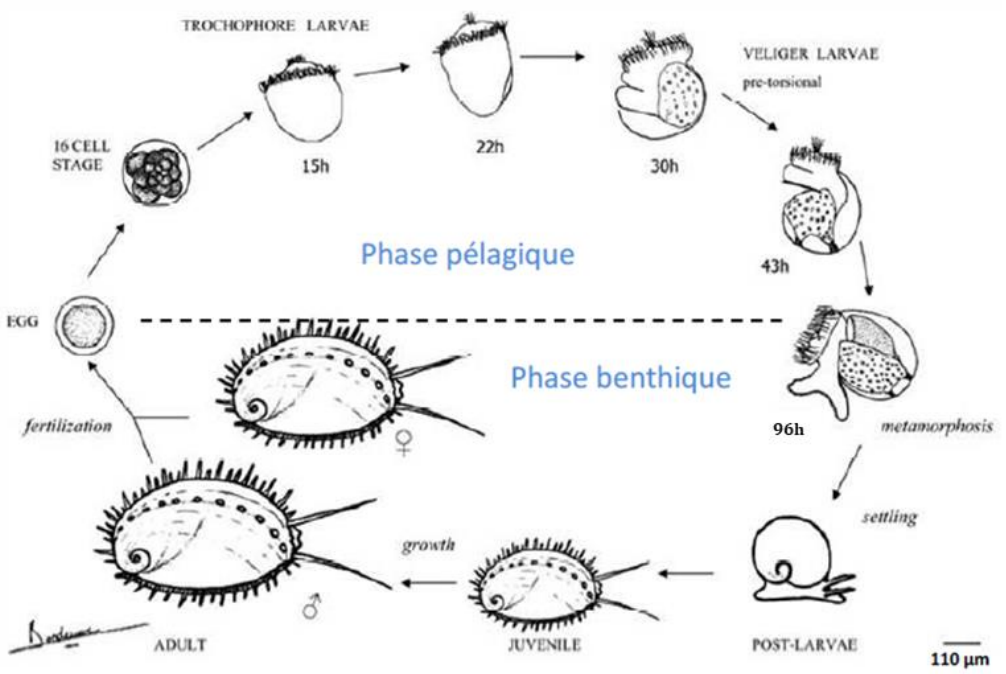


Figure 661 *: Illustration du développement post-embryonnaire chez Haliotis tuberculata –Jardillier et al. 2008*

Dans les conditions normales de température (17 ± 0.5°C), le cycle commence par le développement d'une larve trochophore nageuse qui apparait dès les premières heures post

fécondation (environ 15 hpf). La larve, en forme de toupie, et est caractérisée par une couronne ciliée pré-orale, la prototroque.

La coquille larvaire se forme à ce stade à partir d'une zone de différenciation, le champ coquillier, situé dans la partie latéro-postérieure de la larve trochophore **(*Figure* 62)**. Elle se présente sous la forme d'une délicate coquille en forme de verre de montre appelée la protoconque I.

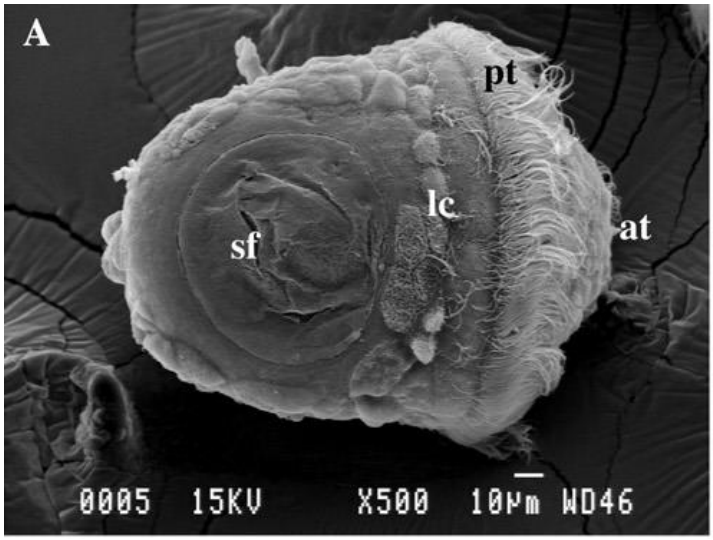


Figure 62: *Cliché MEB d'une larve trochophore d'environ 19hpf présentant une couronne ciliée pré-oral (pt), d'une touffe apicale (at), et d'un champ coquillé latéro-dorsal (sf)entouré d'un anneau constitué de larges cellules (lc) – Cliché de Gaume B. 2010*

La larve croit et évolue progressivement vers le stade véligère (20 à 30 hpf) où elle mesure 200 x 150 mm et se caractérise notamment par la différenciation du pied et du manteau. Autour de 38 à 40 hpf, la larve véligère subit une torsion à 180° de la masse viscérale qui entraine une rotation des organes internes. La ***Figure* 63** ci-après illustre cette torsion.

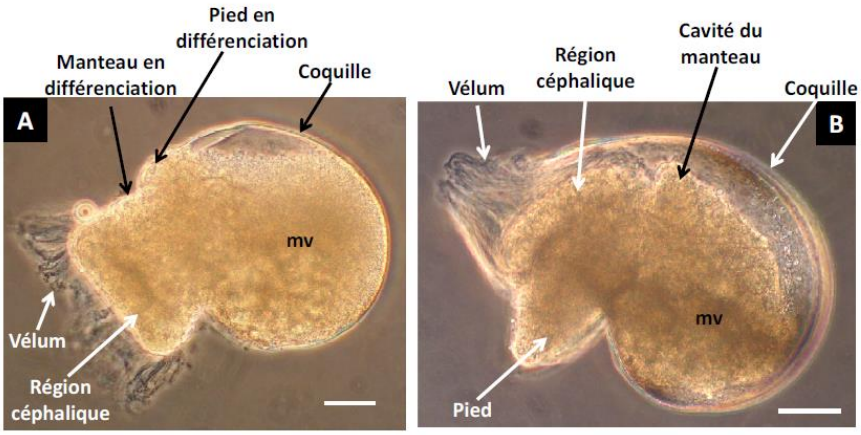


Figure 63 *: Illustration de la torsion larvaire chez Haliotis tuberculata : A 19°C, la larve subit une torsion de 180° de telle sorte que la cavité du manteau se retrouve opposée du pied. A : Larve véligère avant torsion (25hpf) où le pied et le manteau sont tous les deux situés dorsalement ; B. Larve véligère après torsion (45hpf), le pied est ventral et le manteau resté dorsal - Clichés de Gaume B. 2010*

Après 4 jours de vie pélagique, la larve perd son vélum, se fixe au substrat et commence sa métamorphose qui est un évènement majeur de son développement lui permettant de commencer sa phase benthique.

Les étapes de la mise en place de la coquille au cours du développement post- embryonnaire de l'ormeau sont décrites dans le paragraphe suivant.

I.1.b. Microstructure de la coquille au cours du développement, de la larve à la coquille adulte

Des observations fines en microscopie optique et électronique de la coquille de *Haliotis tuberculata* ont été réalisées par Auzoux-Bordenave *et al.*, 2010 et Gaume *et al.*, 2011. La ***Figure* 64** résume les différentes microstructures de la coquille en développement rencontrées de la larve à l'adulte.

	hpf	Coquille	Microstructure
Larve Trocophore	16	Périostracum	Couche externe organique toujours présente
	20	Protoconque I	Fine couche minéralisée granuleuse
	25		
TORSION		Protoconque II	Couche granuleuse plus épaisse
Larve Véligère	28		
	45	Protoconque II complète	
	51		
	55	Protoconque II mature	2 couches granuleuses
	94		
	96		1 couche granuleuse externe 1 couche prismatique interne
META-MORPHOSE			
Post-Larves	6 jours	Protoconque II Coquille juvénile ornementée	1 couche prismatique externe 1 couche granuleuse intermédiaire 1 couche prismatique interne
	10 jours		
Juvénile	2 mois	Aplatissement et enroulement de la Coquille juvénile teintée	
	1 an		Tablettes de nacre
Adulte	2 ans	Coquille adulte teintée et stries de croissance	Periostracum Couche Sphérulitique Couche nacrée

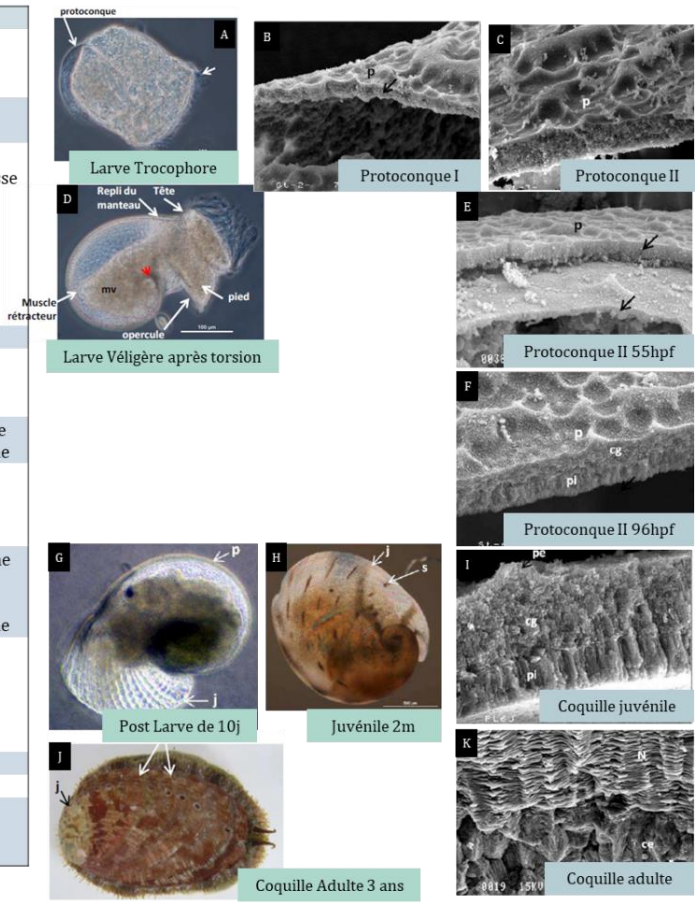


Figure 64 : *Récapitulatif des principales étapes du développement embryonnaire et microstructure de la coquille associées –* ***Figure*** *réalisée à partir des clichés et des observations réalisées par Gaume et Auzoux-Bordenave en 2010 et 2011*

- Le périostracum est la première structure de la coquille à apparaître vers 16 hpf. Il est constitué d'une fine couche purement organique.
- On observe ensuite au stade trochophore (***Figure* 64A**) la mise en place de la protoconque qui est composée du périostracum, sur sa surface externe et d'une fine couche minéralisée sur sa surface interne (**Cliché B**). La surface du périostracum est homogène et présente une structure rugueuse. La couche minéralisée est caractérisée par une structure homogène granuleuse. La protoconque I mesurant d'abord 1µm va s'épaissir.
- Au moment de la torsion (**Cliché D**), la protoconque I évolue vers une protoconque II qui est plus épaisse, environ 2µm (**Cliché C**). La protoconque est ensuite marqué à 55hpf par la mise ne place d'une deuxième couche minéralisée (**Cliché E**). La couche située juste sous le

périostracum mesure environ 2 µm d'épaisseur tandis que la couche interne est 2 fois moins épaisse. Ces deux couches sont toutes les deux granuleuses à ce stade-là et forment la protoconque II dite mature.

- Juste avant la métamorphose, au moment du recrutement benthique (96 hpf), la larve véligère pré-métamorphique, on observe un changement de la microstructure de la deuxième couche granuleuse déposée (la plus interne) dont les cristaux sont différenciés en prismes (**Cliché F**).
- Après la métamorphose, la protoconque de la post-larve (**Cliché G**) a conservé cette structure et la frontière entre la couche granuleuse et la couche prismatique est bien visible. A ce stade, la protoconque est totalement achevée, la couche granuleuse mesure 2 µm d'épaisseur et la couche prismatique 1 µm. Les prismes sont bien formés et orientés perpendiculairement à la surface de la coquille.
- Chez la post-larve de 25 jours, la protoconque possède deux couches prismatiques, une externe et une interne, entre lesquelles se situe une couche granuleuse (**Cliché I**).
- Dans la coquille juvénile de 2 mois, cette nouvelle couche prismatique sur la surface externe de la coquille devient plus fine et présente des cristaux mieux différenciés. La couche intermédiaire montre également en microstructure plus précise et des tablettes en formation commencent à être visibles. Ces tablettes sont inclinées d'environ 25° par rapport à la surface de la coquille (***Figure* 65**).

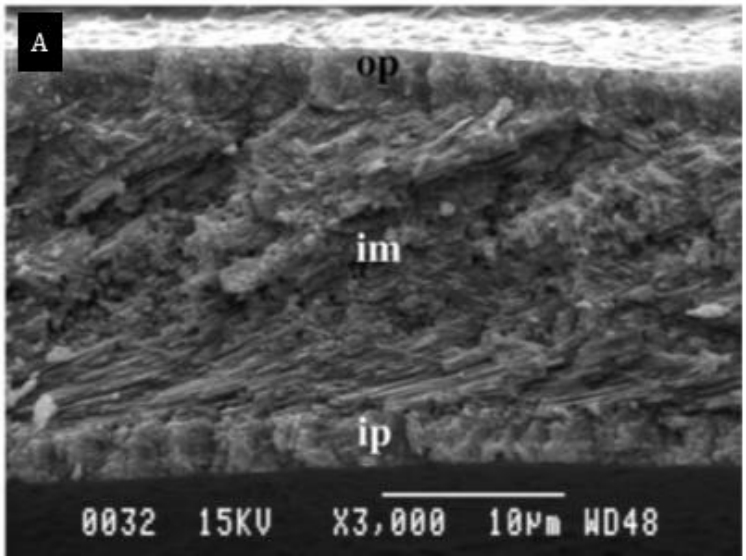


Figure 65 *: Cliché MEB d'une section dans la coquille d'un juvénile de 2 mois montrant des tablettes en formation inclinées d'environ 25° par rapport à la surface de la coquille – Cliché de Gaume B., 2010*

- A un stade juvénile plus tardif (à partir de 1 an), les tablettes de nacre sont parfaitement définies, organisées en feuillets parallèles à la surface de la coquille et reposent sur la couche sphérulithique (**Cliché K**) La surface interne de la coquille présente une texture particulière caractéristique des tablettes de nacre en croissance.

Ces différentes étapes de mise en place de la coquille et de différenciation des microstructures s'effectuent sous un contrôle biologique spécifique qui est synthétisé dans la partie suivante.

I.2. Contrôle biologique de la formation de la coquille larvaire

Un certain nombre de protéines matricielles ont été étudiées chez la coquille du genre *Haliotis* (voir paragraphe VI.4., du chapitre I état de l'art), mais peu d'études ont été réalisées spécifiquement chez *Haliotis tuberculata* et encore moins aux stades larvaires. 3 protéines matricielles ont été particulièrement étudiées chez *Haliotis tuberculata* : la nacréine, les MSI et la Lustrine A (Gaume, 2010 ; Gaume et al, 2014).

La nacréine d'abord identifiée chez *Pinctada fucata* (Miyamoto *et al.*, 1996) est une protéine matricielle qui possède deux domaines anhydrase carbonique. Une protéine possédant des motifs

communs (Anticorps hétérologues) avec la nacréine a été localisée par immunohistochimie chez *Haliotis tuberculata* au niveau de l'épithélium externe du manteau de la coquille adulte et dans le manteau larvaire à différents stades (Gaume, 2010) .

On peut également citer les protéines insolubles MSI identifiées dans la matrice coquillère de *Pinctada fucata* (Sudo *et al.*, 1997) qui participent à la formation de la couche prismatique (MSI31) et de la couche nacrée (MSI60) notamment grâce un bloc riche en poly-glycine supposés participer à la formation des feuillets b de la matrice organique et des motifs acides se complexant probablement au calcium. Des protéines possédant des motifs communs avec ces deux MSI ont été également identifiées dans le manteau chez *Haliotis tuberculata* (Jolly *et al.*, 2004) ce qui a été confirmé par B. Gaume dans ses travaux de thèse en 2010.

Plus récemment, une protéine apparentée à la lustrine A a été localisée dans le manteau larvaire et adulte (Gaume *et al.*, 2010) et l'expression temporelle du gène codant la lustrine A a été étudiée au cours des différents stades du développement. Ainsi, chez les juvéniles d'ormeau, le pattern d'expression spatio-temporelle de la lustrine A a pu être mis en relation avec la formation des tablettes de nacre (Gaume et al, 2014).

La caractérisation des molécules matricielles dans les tissus larvaires et adultes de l'ormeau a été initiée par des approches moléculaires et immuno-histochimiques. Les techniques d'immunolocalisation ont permis d'identifier des protéines apparentées à la Lustrine A et aux MSI 31 et 60 (Jolly *et al.*, 2004 ; Gaume 2010). Par la suite, un gène codant la Lustrine A, une protéine de la couche nacrée, et deux gènes codant des anhydrases carboniques ont été identifiés chez *H. tuberculata* (Le Roy et al, 2014). Une approche protéomique complémentaire a permis d'identifier dans la coquille des protéines matricielles conservées au sein du genre *Haliotis*, comme la perlwapin, et de mettre en évidence de nouvelles séquences chez *Haliotis tuberculata* (Bédouet et al, 2012 et Gaume et al, 2014) dans lesquels certaines protéines matricielles ont été reportées, dont notamment les trois précédemment citées.

Ces travaux ont permis de mettre au point des anticorps et des sondes moléculaires spécifiques qui permettent d'étudier la dynamique d'expression de ces protéines matricielles lors des étapes de mise en place de la coquille.

I.3. Evolution de la composition minéralogique de la coquille au cours du développement larvaire

L'évolution de la microstructure de la coquille larvaire pose des questions quant à la nature de la phase minérale qui se dépose au cours du développement larvaire. Les analyses des coquilles larvaires réalisées en spectroscopie infrarouge (FTIR) ont permis de déterminer la nature du polymorphe de CaCO3 présent dans les différents stades (Gaume, 2010 ; Auzoux-Bordenave *et al.* 2010).

Les spectres infra-rouge obtenus sur les coquilles larvaires (***Figure* 66)** montrent la présence de CaCO3, dès le stade trochophore précoce (16hpf) avec les pics caractéristiques des carbonates à 860-880 cm^{-1}, 1050-1080 cm^{-1} et 1450-1470 cm^{-1} A partir de 19hpf, la présence d'un doublet formé par les bandes à 700-712 cm-1 a permis de déterminer la nature aragonitique de la coquille larvaire. L'intensité de ces 2 pics augmentant au fur et à mesure du développement larvaire, suggérant une augmentation de la proportion d'aragonite dans les stades plus agés.

Au stade le plus précoce (16 hpf) les spectres indiquent la présence de carbonates , mais l'absence du doublet à 700-712 cm-1 permet de conclure qu'il n'y a pas encore d'aragonite à ce stade-là. Les auteurs avancent l'hypothèse d'une phase de carbonate calcium amorphe transitoire qui serait associée à une importante quantité de composants organiques (Auzoux-Bordenave *et al.*, 2010).

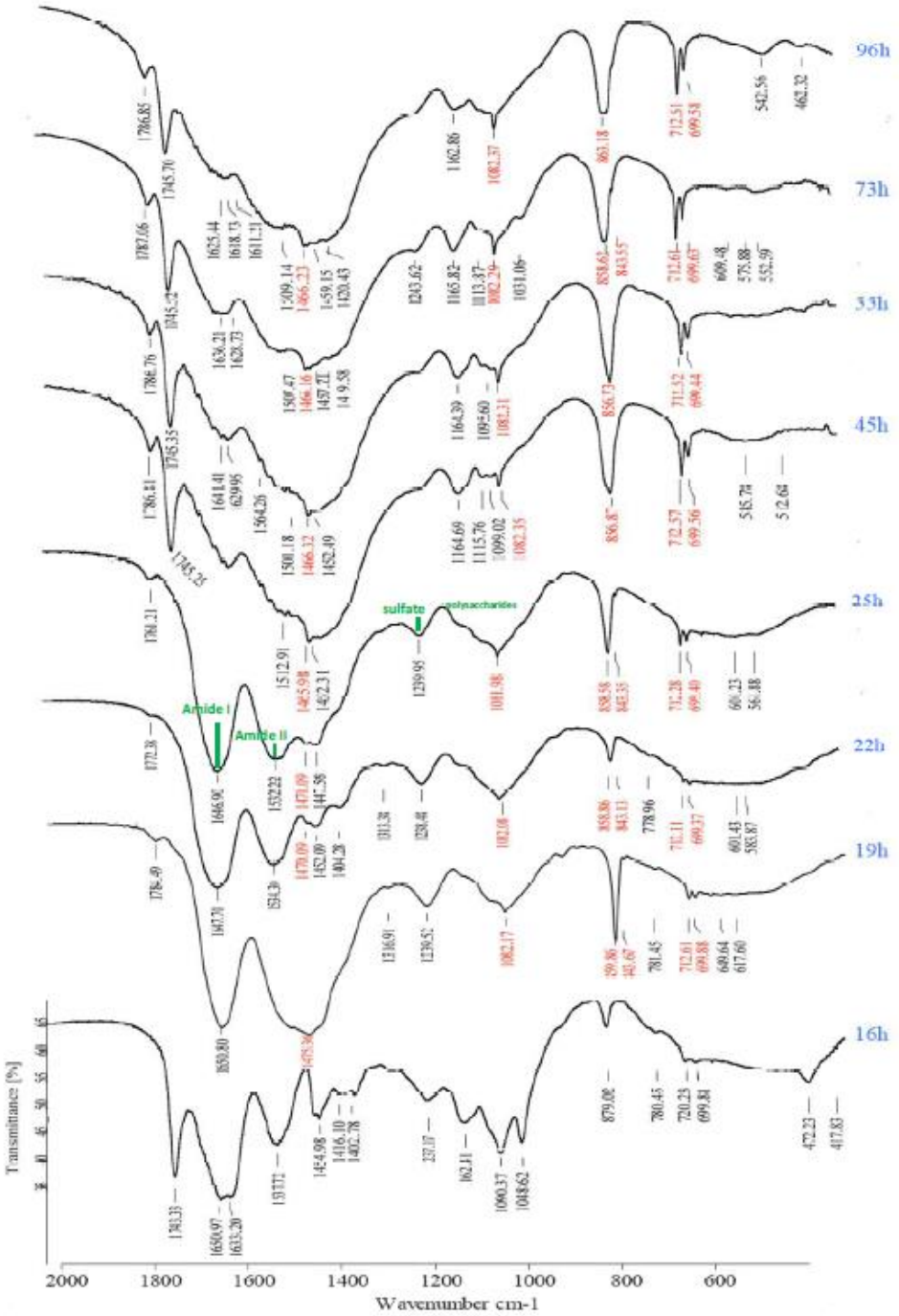


Figure 66 *: Analyse infrarouge (FTIR) des différents stades larvaires de Haliotis tuberculata. Les larves ont été analysées entières et réduites en poudre dans du Bromure de potassium pour former des pastilles. La résolution du spectrophotomètre à transformée de Fourier est de 2 cm-1. Les stades analyses sont : larves trochophores à l'éclosion (16h) et tardives (19h), larves véligère précoces, (22h) et avant la torsion, (25h), larves véligère après la torsion (45, 55 et 73h) et larves véligère en recrutement benthique (96h). Les nombres d'ondes indiques en rouge à partir de 19h correspondent aux pics spécifiques du carbonate de calcium cristallise sous forme d'aragonite – D'après Gaume et al., 2010*

Afin de préciser la nature des premières phases minérales déposées lors de l'ontogénèse chez *Haliotis tuberculata,* une étude ultrastructurale par RMN du solide a été réalisée sur différents

stades du développement larvaire. Les résultats sont présentés dans les paragraphes II et III de ce chapitre. La troisième partie (3è paragraphe) présente les résultats préliminaires de la localisation immuno-histochimique d'une protéine matricielle de la nacre, la Lustrine A,

II. Etude de la coquille larvaire de Haliotis tuberculata par résonnance magnétique nucléaire du solide

II.1. Introduction

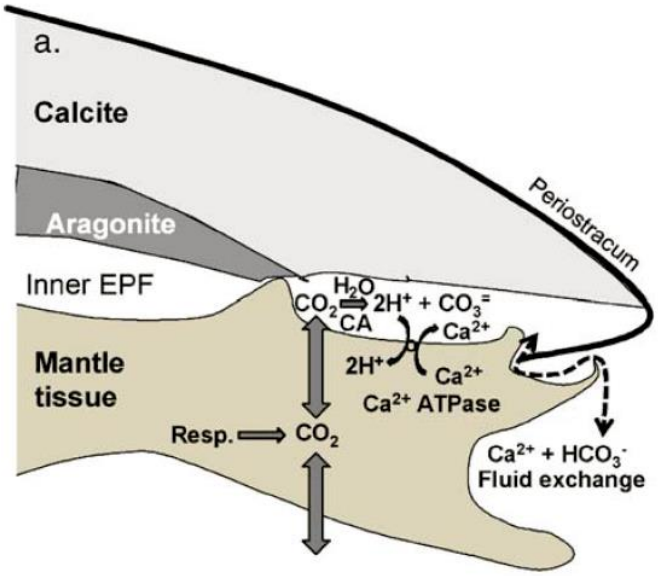


Figure 67 : *Schéma d'une coupe réalisée dans la zone de formation de la coquille d'un bivalve modèle représentant le transport des ions calcium et du carbone inorganique impliqués dans la formation du carbonate de calcium de la coquille d'après Ted A. McConnaughey & David Paul Gillikin 2008*

Dans la coquille des mollusques de manière générale, la formation du carbonate de calcium se fait selon la réaction suivante :

$Ca^{2+} + HCO_3^- \leftrightarrow CaCO_3 + H^+$

Le schéma de la ***Figure* 67** extrait de la revue de McConnaughey & David Paul Gillikin montre les échanges d'ions qui ont lieu au niveau de la zone de formation de la coquille.

Les ions bicarbonate sont en équilibre avec des ions carbonates dans le milieu extra palléal et sont à l'origine de la formation du carbonate de calcium en se complexant avec les ions calcium (**Ca^{2+}**) présents en sursaturation dans ce milieu confiné. Le milieu extrapalléal étant légèrement alcalin (pH autour de 7,8 mesuré chez certaines espèces de mollusques, la forme HCO_3^{2-} serait

majoritaire (Crenshaw and Neff 1969). Les ions bicarbonate et carbonate proviennent de deux sources principales : soit ils pénètrent directement dans le fluide extrapalléal par diffusion depuis le milieu extérieur, soit ils sont issus de l'hydratation du CO_2 provenant du milieu extérieur ou du métabolisme. Le CO_2 issu de la respiration cellulaire diffuse à travers les membranes cellulaires jusqu'au fluide extrapalléal pour réagir avec H_2O et HO^- pour produire des ions CO_3^{2-}.

Les mollusques seraient capables d'accélérer la réaction d'hydratation et hydroxylation du CO_2 en utilisant l'enzyme anhydrase carbonique. Miyamoto *et al.* (1996, 2005) montre la présence de la nacréine une protéine présente dans la coquille des mollusques ayant un domaine anhydrase carbonique et qui serait impliqué dans la régulation de la calcification de la coquille.

Cette description correspond à ce que l'on observe chez les individus adultes. En revanche, aucune véritable étude n'a été réalisée aux stades larvaires visant à comprendre la ou les voies empruntées lors de l'apport des ions nécessaires à l'élaboration de la coquille larvaire.

Dans ce contexte, nous avons cherché à caractériser par RMN du solide la composition de la coquille à l'échelle atomique afin de mieux comprendre la nature des éléments chimiques impliqués lors des phases précoces de l'ontogénèse. Le recours à un enrichissement de la coquille en ^{13}C permet de donner en parallèle des éléments de réponses quant à la physiologie de la formation de la coquille.

II.2. Méthodologie

II.2.a Problématique rencontrée

La Résonnance Magnétique Nucléaire est une technique très utilisée pour caractériser de nombreux systèmes allant de molécules en solution à des matériaux inorganiques. Cette technique consiste en la mesure sous l'effet d'un champ magnétique statique B_0 , de l'aimantation globale M résultant d'une différence d'état de spin nucléaire non nulle entrainant l'apparition d'un moment magnétique μ (Voir schéma de la ***Figure* 68**).

Pour un même élément, seuls les isotopes de spin nucléaire non nul pourront être mesurés par RMN. La sensibilité en RMN dépend du rapport gyromagnétique γ qui est intrinsèque à chaque noyau. Ainsi certains isotopes de faible γ (cas du ^{43}Ca, par exemple – cf. Chapitre III) seront difficile à détecter.

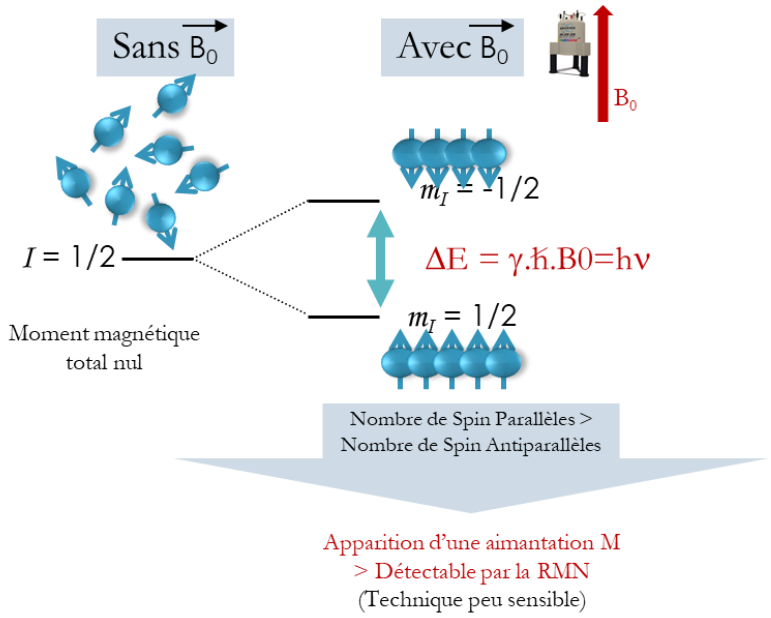


Figure 68 : *Schéma montrant le principe de la RMN*

Au-delà du γ, d'autres facteurs impactent la sensibilité en RMN. A titre d'exemple, dans le cas de l'élément carbone, le seul isotope favorable à une mesure par RMN est l'isotope ^{13}C présentant un spin ½. Le problème rencontré pour cet isotope est sa faible abondance naturelle qui est de 1,1% (contrairement au ^{12}C qui est présent à 98,9% mais qui possède un spin nucléaire nul). Une solution pour améliorer la sensibilité du noyau ^{13}C est d'enrichir le système étudié en apportant une source artificiellement riche en ^{13}C.

Dans notre cas, l'étude par RMN de la coquille carbonatée d'*Haliotis tuberculata* a été assez délicate et a nécessité de très longs temps d'acquisition à cause de ce manque de sensibilité. Malgré ces difficultés, les études par RMN de la coquille adulte exposée dans les chapitres

précédents ont tout de même été probantes du fait de l'importante fraction minérale (95% de $CaCO_3$) devant la fraction organique, rendant possible sa détection dans des temps de mesures « raisonnables ». A titre d'exemple, le spectre 2D ^{1}H-^{13}C HetCor présenté en **Figure** 5 de l'Article 1 présent au chapitre III a nécessité 3 semaines d'accumulation.

II.2.b Enrichissement de la coquille en ^{13}C

Lors des premières analyses de la coquille larvaire par RMN, nous avons rencontré un certain nombre de difficultés pour mesurer le signal ^{13}C de la coquille larvaire. En effet la coquille étant très fine à ces stades-là par rapport au reste de la larve (2-3 µm d'épaisseur avec une longueur totale de la larve égale à 250 µm), le carbonate de calcium de la coquille est présent en très faible quantité et n'est pas détectable par RMN dans des échelles de temps raisonnables. En effet le spectre résultant pour de jeunes larves (32 hpf) ne permet de visualiser que le signal des tissus mous et en particulier les pics très fins et très intenses correspondant aux lipides des réserves lipidiques (***Figure* 70**).

Ainsi nous avons dû trouver une solution pour pouvoir analyser la coquille et éventuellement nous affranchir du signal des composants organiques. Les larves de *Haliotis tuberculata* possèdent une taille d'environ égale à 200 µm, il est donc impossible de disséquer les individus de manière à isoler la coquille du reste du tissu. De plus, nous avons évité de dissoudre chimiquement les tissus mous de peur d'altérer la coquille.

Ainsi, pour remédier au problème du faible signal ^{13}C de la fraction minérale, nous avons cherché à enrichir la coquille larvaire en ^{13}C en utilisant du bicarbonate de sodium commercial enrichi en ^{13}C ($NaHC^{*}O_3$).

Le bicarbonate enrichi en ^{13}C a été ajouté dans l'eau de mer peu après l'éclosion des œufs, au stade 24hpf, à une concentration de 2 mM. Cette concentration correspond à la concentration naturelle des ions bicarbonates de l'eau de mer, ce qui entraine un doublement de la concentration en ions bicarbonates dans le milieu. Un contrôle de la température et du pH du milieu a été effectué

durant l'incubation. Après 48 heures d'incubation dans l'eau de mer enrichie en ^{13}C, nous avons prélevé les larves (âgées de 72h) que nous avons analysées directement, sans traitement, dans le spectromètre.

La ***Figure* 69** résume les différentes étapes du protocole d'enrichissement en ^{13}C par NaHC*O3 des larves âgées de 72 hpf.

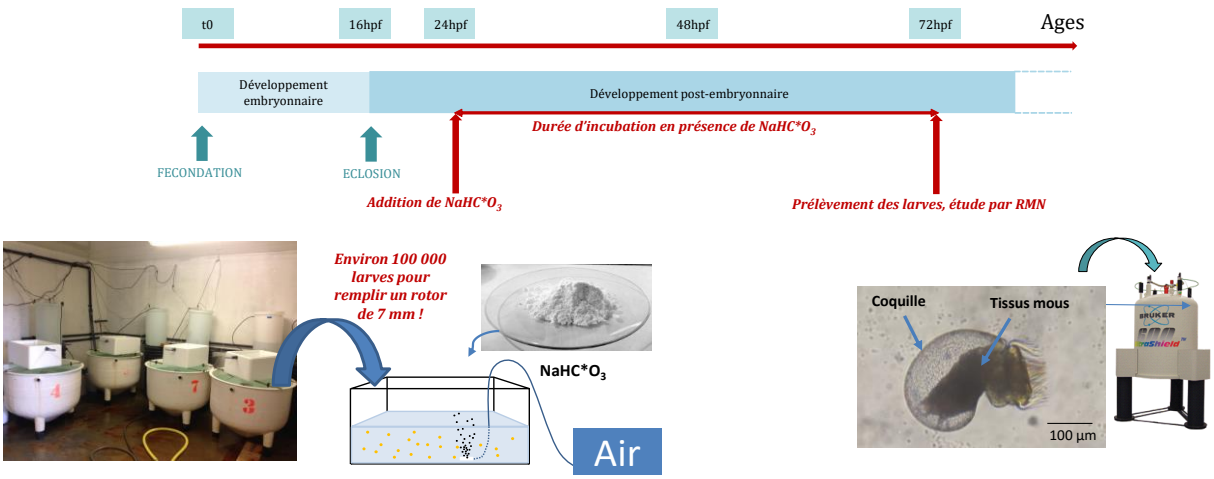


Figure 69 : *Schéma représentant le mode opératoire permettant l'obtention de larves âgées de 72hpf dont la coquille a été enrichie en ^{13}C*

II.2.c. Paramètres expérimentaux des expériences de RMN

Les analyses RMN ont été réalisées sur un spectromètre *Bruker Avance III* opérant à 7.1 T. Les fréquences de Larmor à ce champ sont 300.29 MHz pour le ^{1}H et 75.51 MHz pour le ^{13}C. Les larves fraîches, humides ont été délicatement mises dans un rotor en zircone de 7 mm de diamètre. Les larves ont légèrement été tassées dans le rotor et l'excès d'eau a été absorbée par capillarité à l'aide de papier absorbant. Le rotor a été mis en rotation à l'angle magique à une fréquence ν_{MAS} = 5 kHz.

L'acquisition directe du signal ^{13}C a été réalisée avec un délai de recyclage RD = 2000 s. Les expériences de polarisation croisées entre le ^{1}H et le ^{13}C ont été réalisées avec un délai de

recyclage RD = 10 s et un temps de contact variable. Une expérience ^{1}H-^{13}C CP MAS à deux dimensions (^{1}H-^{13}C HetCor) a été réalisée avec un temps de contact de 750 µs, un nombre de tranches dans la dimension t_1 égal à 36 et 1840 scans par tranche.

II.3. Résultats

II.3.a. Résultat de l'enrichissement

Les résultats de l'analyse RMN sur l'échantillon de larves 72hpf ont montré que l'enrichissement de la coquille en ^{13}C avait bien eu lieu, et ce de manière très significative comme l'indique la ***Figure* 70.** En effet, le spectre rouge représente le signal obtenu à partir d'un échantillon de larves témoins du même âge mais n'ayant pas été enrichies en ^{13}C : le spectre montre majoritairement des pics correspondant à de la matière organique en particulier les lipides présents à des déplacements chimiques faibles (entre 0 et 80 ppm). Le spectre bleu représente le signal correspondant aux larves enrichies en ^{13}C obtenu par acquisition directe (40 scans, RD = 10 s; 10 min d'acquisition) Grâce à l'enrichissement, le pic des carbonates est mis en évidence ; notablement, les résonances de la fraction organique ne sont pas détectées.

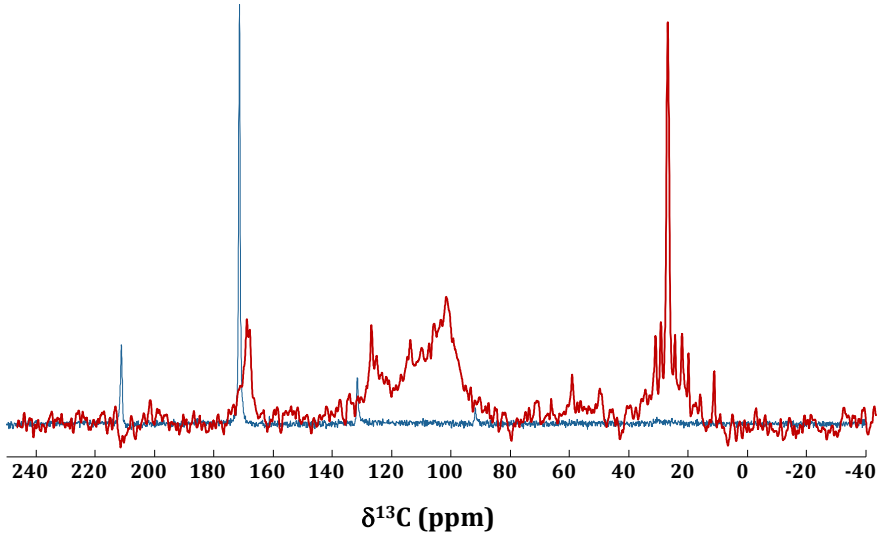


Figure 70 : *Spectres ^{13}C MAS représentant l'efficacité de l'enrichissement de la coquille en carbone 13. Rouge : larves 32hpf, Bleu : larves 72hpf enrichies*

L'efficacité de l'enrichissement est très significative et peut-être mise en relation avec le métabolisme des larves et une vitesse de croissance coquillière très importante dans les stades précoces du développement. En effet, les travaux effectués sur la dynamique de croissance coquillière chez *Haliotis tuberculata* (à partir des mesures d'épaisseur) ont permis d'estimer la vitesse de croissance à environ 1µm par jour chez les larves âgées de 24 à 96h (Auzoux-Bordenave *et al.*, 2011). D'après nos résultats, il semble que le doublement de la concentration en bicarbonate de l'eau de mer n'affecte pas la viabilité des larves (identique à celle des témoins) et se traduit par un enrichissement en ^{13}C très significatif durant les 48 heures d'incubation et de précipitation du $CaCO_3$ dans la coquille croissance.

Cet enrichissement en ^{13}C nous a permis d'analyser la composition et la structure de la coquille de larves de *Haliotis tuberculata* âgées de 72 heures post fécondation.

II.3.b. Analyse par RMN des carbonates de la coquille larvaire

Les résultats de RMN ont confirmé que la coquille à 72 hpf était majoritairement formée d'aragonite cristalline comme les précédents résultats FT-IR de Auzoux-Bordenave *et al.*, 2011 l'avaient montré. En effet comme le montre le spectre bleu clair sur la ***Figure* 71,** nous obtenons par acquisition directe un spectre présentant un unique pic fin centré à 171 ppm caractéristique de l'aragonite cristalline.

De la même manière que pour la nacre de la coquille adulte (voir chapitre III), nous avons réalisé des expériences de polarisation croisées (CP) entre le ^{1}H et le ^{13}C, de façon à avoir accès aux environnements protonés de la fraction minérale de la coquille larvaire.

Le spectre obtenu est représenté sur la **Figure** 68 (spectre rouge). Celui-ci possède une forme asymétrique et plus large que le spectre obtenu par acquisition directe. Ainsi, nous pouvons conclure que la coquille larvaire est également composée de carbonates sans doute désordonnés dans un environnement protoné.

Lorsque l'on compare le spectre ^{13}C CP MAS des larves avec le spectre ^{13}C CP MAS de la nacre de la coquille adulte, nous pouvons voir que les spectres possèdent certaines similitudes mais que le premier est bien plus large et plus distribué en particulier vers les faibles déplacements chimiques (jusque 157 ppm environ). Nous pouvons donc conclure que malgré la différence de microstructure entre la coquille larvaire et la nacre mature, il existe une certaine similitude à l'échelle atomique en termes de composition et d'environnement chimique des ions carbonates. En revanche, il semble que le désordre des carbonates interfaciaux soit supérieur au sein de la coquille larvaire, ce qui peut témoigner d'un degré de maturation des cristaux de $CaCO_3$ plus faible que pour la nacre.

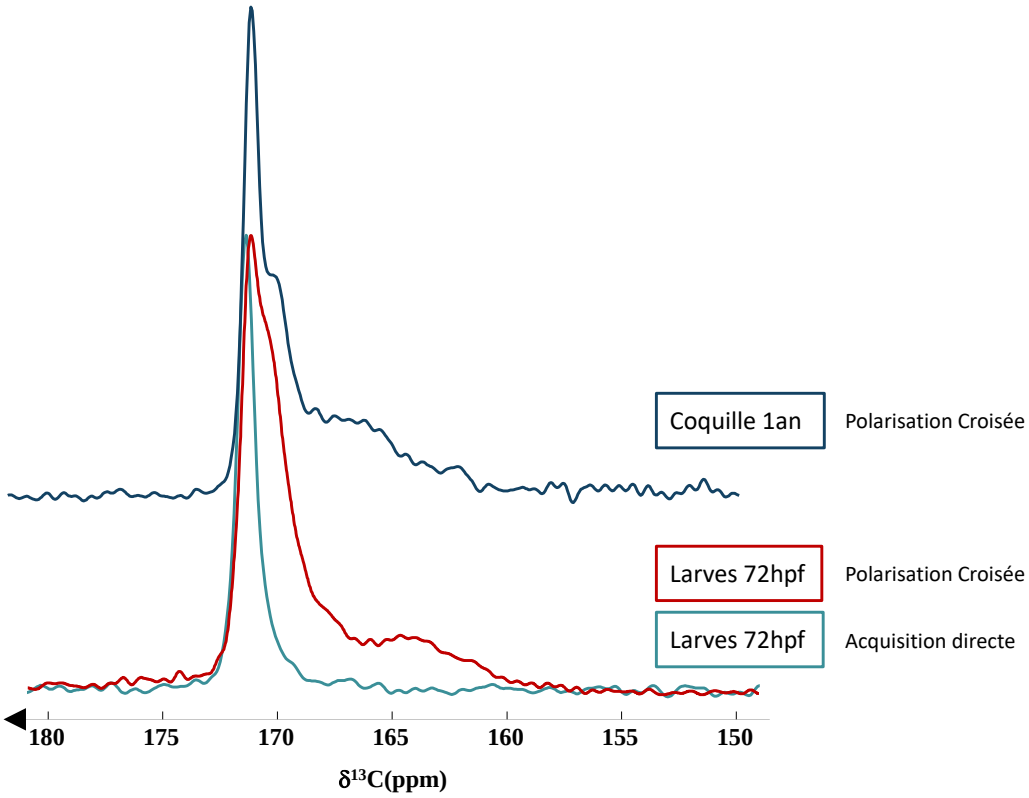


Figure 71 : *Comparaison des spectres ^{13}C obtenus chez les larves avec le spectre de la coquille adulte.*

(CP larves : RD=10s CT=750µs)

La déconvolution du spectre ^{1}H-^{13}C CP MAS des larves obtenus précédemment est présenté sur la ***Figure* 72.** La coquille larvaire possède différents environnements distincts. Dans la coquille

larvaire on peut dénombrer au moins 4 environnements distincts noté de A à D de déplacement chimique δA = 171,2 ppm, δB = 170,5 ppm, δC = 168,4 ppm et δD = 164,0 ppm. D'après le déplacement chimique et d'après les résultats obtenus sur la nacre (cf. Chapitre III), A et B semble être des carbonates et D des bicarbonates. L'attribution est plus ambiguë pour C dont le déplacement chimique est intermédiaire.

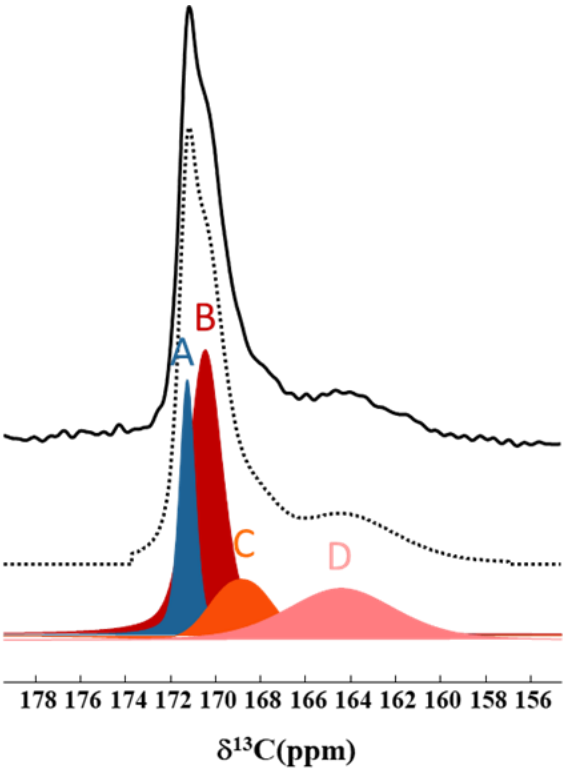


Figure 72 *: Déconvolution du spectre ^{1}H-^{13}C CP MAS obtenu sur l'échantillon de larves âgées de 72hpf (RD=10s CT=750µs)*

Une expérience 2D ^{1}H-^{13}C HETCOR a été réalisées sur ce même échantillon afin de mieux comprendre la nature de ces environnements protonés. La carte obtenue, présentée en ***Figure* 73A**, montre que ces carbonates protonés sont proches de deux sources de protons : des molécules d'eau rigide (**H**$_2$O, δ(^{1}H) ≃ 5ppm) et les protons des bicarbonates (**H**CO$_3^-$, δ(^{13}C) ≃ 15ppm).

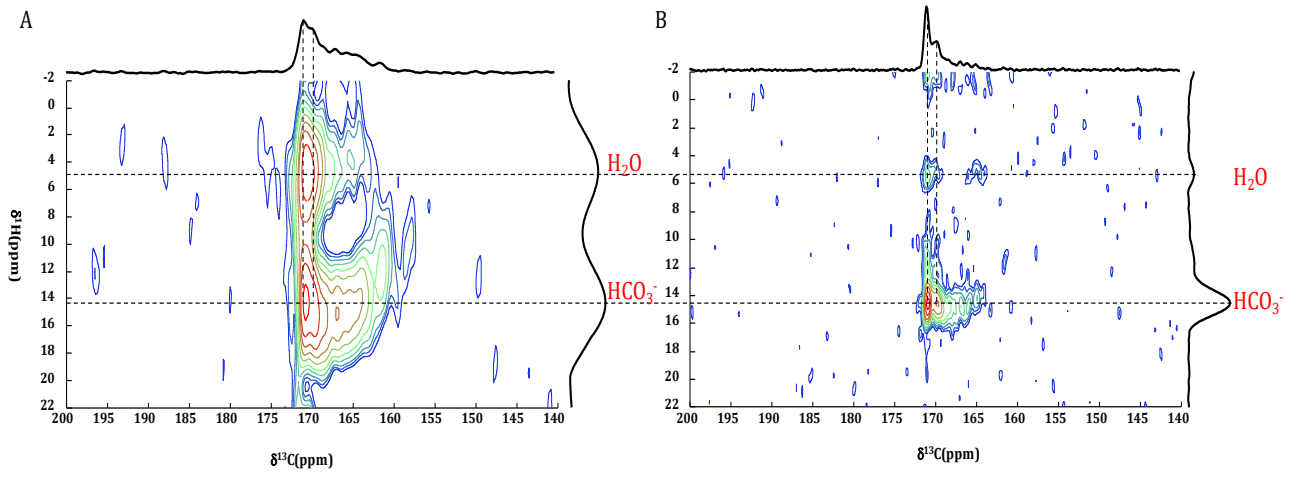


Figure 73 *: 2D ^{1}H-^{13}CP HETCOR obtenu sur A) l'échantillon de larves âgées de 72hpf (RD = 10 s t_{CP} = 750 µs) et B) l'échantillon de nacre adulte (1 an) présenté dans le chapitre III (RD = 10 s ; t_{CP} = 4 ms)*

Lorsque l'on compare avec les résultats obtenus pour la coquille adulte (***Figure* 73B**), on voit que les spectres sont ressemblants avec des taches de corrélations qui se superposent mais qui sont bien plus larges dans le cas de la coquille larvaire. Encore une fois, cela témoigne d'un désordre plus grand. En particulier, on peut noter la forme caractéristique de la tache relative aux ions HCO_3^- : la tâche n'est pas horizontale et témoigne d'une distribution de déplacement chimique à la fois pour le noyau ^{13}C (de 157 à 166 ppm) et le noyau ^{1}H (de 7 à 17 ppm). Par analogie avec ce qui a été démontrer pour l'évolution du $\delta(^{1}H)$ dans les ions HPO_4^{2-} (Pourpoint *et al.* 2007), nous pouvons proposer que l'augmentation du $\delta(^{1}H)$ témoigne d'une augmentation de la liaison hydrogène dans lequel le proton de l'ion HCO_3^- est engagé. De manière intéressante, plus la liaison-H est forte plus la distance ^{1}H•••^{13}C augmente et plus le $\delta^{13}C$ se rapproche de celui d'un ion carbonate.

Afin de pousser d'analyser les différents types de carbonates et bicarbonates nous avons, comme dans le Chapitre III, mesuré les paramètres d'anisotropie de déplacement chimique (CSA) et de polarisation croisée (^{1}H-^{13}C CP).

II.3.c. Etude de des environnements minéraux protonés

Spectre Basse Vitesse

L'anisotropie de déplacement chimique (CSA) est un paramètre RMN qui rend compte de la symétrie autour du noyau sondé. Par exemple, les paramètres CSA du noyau ^{13}C (Δ_{CSA} and η_{CSA}) dépendent de la symétrie et donc de l'état de protonation de l'espèce carbonatée (CO_3^{2-} *vs* HCO_3^-) comme cela a été montré dans le Chapitre III.

Ainsi de la même manière que pour la coquille adulte dans le chapitre III nous avons réalisé un spectre à basse fréquence de rotation (ν_{MAS} = 1150 Hz) sur l'échantillon de larves (***Figure* 74**).

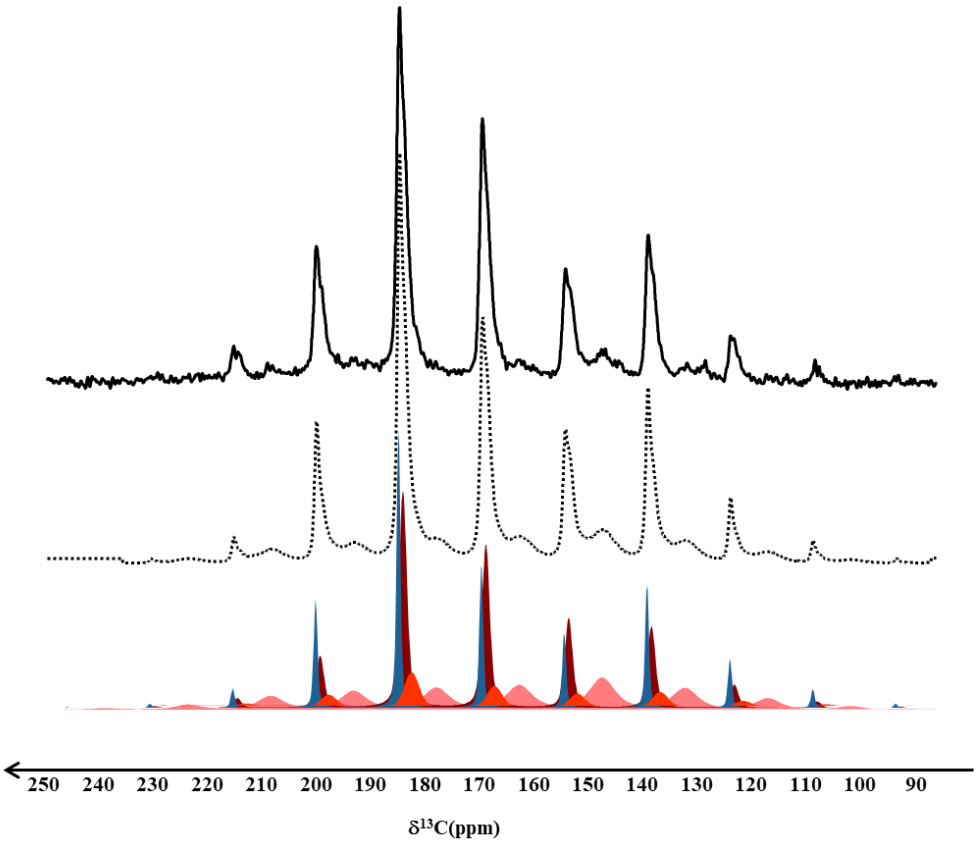


Figure 74 : *Déconvolution du spectre 1H-13C CP MAS à basse fréquence de rotation MAS réalisé sur l'échantillon de larves âgées de 72hpf (ν_{MAS} = 1150 Hz, RD=10 s, t_{CP} = 750 µs)*

La déconvolution du peigne de bande de rotation permet d'obtenir les valeurs des paramètres CSA qui sont résumées dans le **Tableau 4.**

	Raie A	Raie B	Raie C	Raie D
Δ_{CSA} ± 3 ppm	-57,5	-47,0	-53,3	+64,0
η ± 0,1	0,3	0,40	0,40	0,8

***Tableau 4** : Synthèse des paramètres CSA extraits du spectre ^{1}H-^{13}C CP MAS basse fréquence de rotation réalisé sur l'échantillon de larves âgées de 72 hpf*

Les résonnances A, B et C présentent un paramètre Δ_{CSA} négatif et de même ordre de grandeur que celui obtenu pour l'échantillon de référence de référence Na_2CO_3 (Δ_{CSA} = -51 ppm – cf. Chapitre III). A l'inverse pour la raie D, nous avons un Δ_{CSA} positif comme ce que l'on obtient pour l'échantillon de référence $NaHCO_3$ (Δ_{CSA} = +62 ppm – cf. Chapitre III).

Ainsi les résonances A, B et C correspondent à des ions carbonates contrairement à l'espèce D qui correspond à un ion hydrogénocarbonate.

De plus, la valeur du paramètre d'asymétrie η_{CSA} proche de 1 pour l'espèce D suggère une faible symétrie du nuage électronique du carbone comme on le trouve au sein d'un ion $NaHCO_3$ (η_{CSA} = 0,5 – cf. Chapitre III). Les résonnances A, B et C présentent des paramètres plus proches de 0 qui sont obtenus pour des espèces plus symétriques comme un ion carbonate (η_{CSA} = 0,3 – cf. Chapitre III).

Ceci est similaire à ce que nous avons obtenu pour la coquille adulte dans le chapitre III qui présentait également plusieurs espèces de carbonates pour les résonnances aux plus forts déplacement chimiques et un environnement d'hydrogénocarbonates pour la résonance la plus faible en déplacement chimique.

Montée de Polarisation

Afin de compléter cette analyse nous avons réalisé sur les larves une montée de polarisation visant à modéliser la dynamique de la polarisation croisée entre le ^{1}H et le ^{13}C.

Au cours de la polarisation croisée le proton transmet son aimantation au carbone-13 via le couplage dipolaire héteronucléaire ^{1}H-^{13}C. Ainsi la vitesse de montée de polarisation au temps de contact courts est directement liée à la distance ^{1}H-^{13}C (en absence de diffusion de spin ^{1}H). Dans notre cas, nous aurons pour un ion carbonate proche d'une source extérieure de proton, telle qu'une molécule d'eau ou bien un ion hydrogénocarbonate, une distance plus longue que celle qui sépare le proton et le carbone au sein d'un ion hydrogénocarbonate (***Figure* 75**). Ainsi le transfert d'aimantation sera moins efficace pour un ion carbonate qu'un ion hydrogénocarbonate.

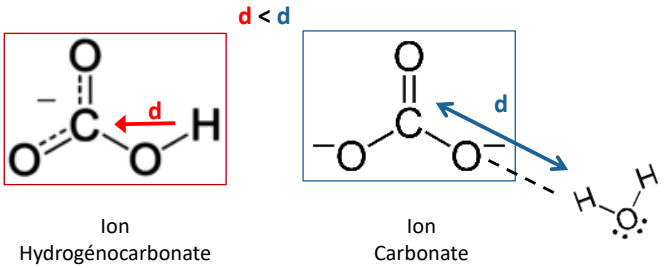


Figure 75 : *Schéma représentant la différence de distance entre le proton et le carbone-13 pour un ion hydrogénocarbonate et un ion carbonate dans un environnement protoné*

Cette différence d'efficacité se reflète par une évolution de l'aimantation 13C plus ou moins rapide que l'on peut modéliser. Pour cela nous avons fait varier le temps de contact entre le ^{1}H et le ^{13}C durant l'expérience CP en vue de mesurer l'intensité des différentes résonances observées.

Les courbes résultantes ont été représenté après normalisation sur la ***Figure* 76**. Elles ont été obtenues après simulation selon le modèle classique I-S :

$$M(t) = M_0*(1/(1 - T_{CP} / T_{1\rho}(^{1}H))) * (\exp(-t_{CP}/T_{1\rho}(^{1}H)) - \exp(-t_{CP}/T_{CH}))$$

Où M_0, t_{CP}, T_{CP}, $T_{1\rho}(^{1}H)$ sont respectivement l'intensité du CP, le temps de contact, la constante de dynamique de CP et le temps de relaxation dans le repère tournant.

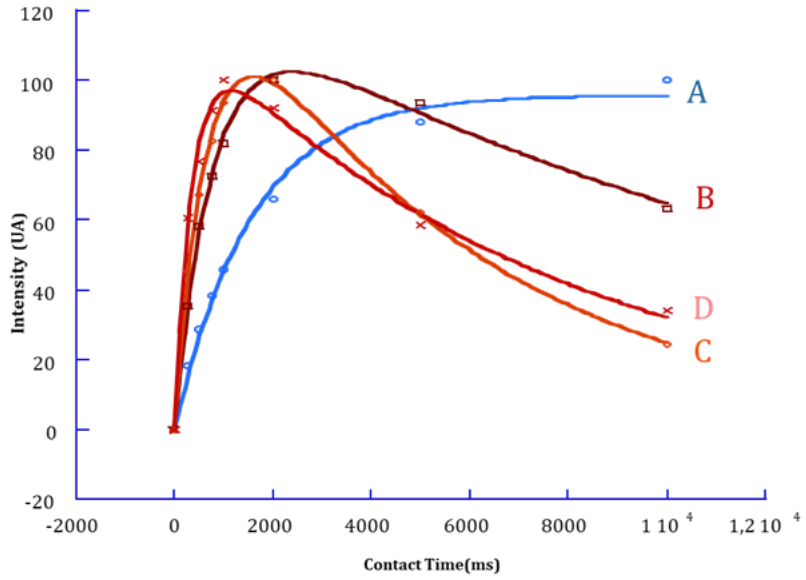


Figure 76 : *Modélisation de la dynamique de polarisation croisées des 4 résonnances A, B, C et D extraites de spectres ^{13}C CP MAS réalisé sur l'échantillon de larves âgées de 72hpf. Temps de contact: 250ms, 500ms, 750ms, 1s, 2s, 10s, 5s, 10s*

Les différents paramètres extraits de la modélisation de ces courbes sont résumés dans le **Tableau 5**.

	Raie A	Raie B	Raie C	Raie D
M_0	3,7 ± 0,5	5,7 ± 0,5	2,1 ± 0,5	2,7 ± 0,5
T_{CH}	1,6 ms ± 0,1	0,8 ms ± 0,1	0,7 ms ± 0,1	0,35 ms ± 0,05
$T_1\rho$	-	14,8 ms ± 1	5,5 ms ± 0,5	7,7 ms ± 1

Tableau 5 : *Récapitulatif des paramètres extraits de la montée de polarisation réalisée sur l'échantillon de larves âgées de 72hpf*

Plusieurs comportements émergent. L'espèce A présente une vitesse de transfert lente et un $T_{1\rho}(^1H)$ hors de la gamme de mesure et donc très long. Ce comportement est caractéristique d'un ion carbonate avec une source de proton éloignée. Ce comportement associé à son déplacement chimique implique que le carbonate A possède un caractère aragonitique fort. Les ions carbonates B et C ont des comportements similaires avec une montée très rapide de l'aimantation suivie d'un déclin dû à l'effet du $T_{1\rho}(^1H)$. Il s'agit donc de carbonates plus proches d'une source de proton (H_2O

ou HCO_3^-) Enfin, les bicarbonates D possèdent la montée la plus rapide associée un déclin dû aussi à un effet de $T_{1\rho}(^1H)$. Ce comportement est typique d'ions hydrogénocarbonates.

Bilan des attributions

Les résultats obtenus par RMN du noyau ^{13}C permettent de conclure que la carbonates A est un carbonate au caractère aragonitique marqué. Les carbonates B et C sont des carbonates plus désordonnés relativement proche d'une source de proton (H_2O ou HCO_3^-). Enfin les bicarbonates D sont les plus désordonnés. Les valeurs de $T_{1\rho}(^1H)$ relativement proches des ions B, C et D suggèrent que ces ions pourraient être présent au sein du même domaine minéral.

II.4. Conclusion

L'étude de la coquille larvaire par Résonnance Magnétique Nucléaire chez *Haliotis tuberculata* ou plus généralement au sein des larves de mollusques n'avait jamais été réalisée auparavant. Cette étude a été permise grâce à une étape préliminaire cruciale, l'enrichissement de la coquille en ^{13}C par l'utilisation de bicarbonate de sodium enrichi en ^{13}C ajouté dans le milieu d'incubation des larves.

Ces travaux apportent de nouvelles informations quant à la voie métabolique empruntée par les éléments chimiques lors de la croissance coquillière. Ainsi, une grande partie du carbonate de calcium intégré dans la coquille proviendrait des ions calcium et des ions bicarbonates de l'eau de mer qui seraient transportés par diffusion à travers les membranes cellulaires jusqu'au site de calcification..

Les résultats obtenus sur un échantillon de larves âgées de 72 heures post fécondation dont la coquille a été enrichie pendant deux jours ont permis de confirmer que la coquille larvaire précoce était minéralisée sous forme d'aragonite cristalline comme la coquille adulte. La présence d'environnements protonés hydratés riches en carbonates et hydrogénocarbonates sont la preuve

que la coquille présente également des environnements minéraux désordonnés, mais la présence de ces différents environnements ioniques ne sont pas caractéristiques d'un simple carbonate de calcium amorphe. Ainsi il semblerait que les premiers minéraux formés à ce jeune stade au sein de la coquille larvaire ne constituent pas simplement une phase de carbonate de calcium amorphe mais présentent déjà une organisation, similaire à celle que l'on peut trouver dans les futures tablettes de la nacre adulte mais présentant un désordre bien supérieur.

Afin de poursuivre cette étude, il serait intéressant de réaliser ces mêmes mesures mais sur des stades beaucoup plus jeunes en enrichissant la coquille sur des durées très courtes afin de prélever les larves assez tôt et ne voir que les toutes premières phases minérales déposées.

Cette étude par RMN de la coquille larvaire s'inscrit au sein de la problématique générale visant à comprendre la nature des phases précurseurs impliqués lors de la biominéralisation des tissus minéralisés. Comme nous l'avons discuté dans le premier chapitre de ce manuscrit, un certain nombre de systèmes minéralisés comporte des phases précurseurs amorphes qui s'installent très tôt lors de la mise en place du tissu minéralisé. On peut citer par exemple le tissu osseux dans lequel on a, lors de la formation de la phase apatitique, d'abord un dépôt de phosphate de calcium amorphe qui cristallise ensuite (Mahamid *et al.* 2008, 2010). De la même manière, dans les systèmes à base de carbonate de calcium, la présence d'une phase amorphe a été observée dans de nombreux systèmes tels que les squelettes des oursins, des coraux des crustacés et des mollusques. Cette similarité suggère qu'il existe un consensus au sein des systèmes de tissus en particulier entre les systèmes à base de carbonate et de phosphate de calcium.

La prochaine partie est axée sur cet aspect et vise à caractériser plus finement la nature des phases minérales, amorphes ou cristallisées, présentes au cours des étapes précoces de la mise en place de la protoconque. L'étude couple des analyses RMN et des expériences de synthèses *in vitro* et les résultats sont présentés sous la forme d'un article scientifique, en préparation qui sera soumis prochainement.

III. Article 3: Intermixed calcium carbonate phosphate phase in the early stages of *Haliotis tuberculata* biomineralization shell as suspect for a common mineral precursor during evolution

Introduction

Biominerals are largely widespread on the tree of life ranging from the bacteria to the chordae including fungi, plants, cnidarian, molluscs, arthropods, echinoderms and vertebrates. Biomineralization involves composite biological materials made by an association between an organic part and a mineral phase. The organic components usually form a matrix acting as a framework. Its whole implication in the biomineralization processes is not yet fully understood but it may play the role of template to initiate the nucleation (Weiner *et al.*, 1983 ; Weiner, *1984*, Mann, 2001 ; Meyer *et al.,* 2008 ; Nudelman *et al.,* 2010) and direct the crystal growth (Ehrlich, 2010; Wang *et al.,* 2012). The main biopolymers involved in calcium and silica biomineralization in earth are chitin and collagen.

Among the calcium biominerals, the more abundant are calcium carbonate (calcite, aragonite and vaterite) associated with chitin in most exoskeletons and calcium phosphate (hydroxyapatite) with collagen, principally, in the vertebrate endoskeletons (Rudall, 1955). Such specific organic-inorganic combination in living organisms seems to emerge. It is assumed that collagen appeared after chitin in the Evolution being present only in the metazoan kingdom, while chitin is also abundant in fungi phyla. Nevertheless, collagen is found in some fungi indicating that collagen may have evolved from a common ancestor that existed before the divergence of fungi and animals (Celerin *et al.*,1996).

Interestingly, the following exceptions in such dichotomy between calcium carbonate/chitin and calcium phosphate/collagen systems suggest that such a clear-cut is difficult to achieve and that biomineralized organisms indeed share a strong link through the evolution.

Indeed, species composed of chitin and calcium phosphate are found. In the brachiopod *Lingulacea* and *Discinacea* superfamily usually considered as living fossils with a phosphorus shell, the composite is made of chitin and hydroxyapatite (Watabe and Pan 1984; Lijima and Moriwaki, 1990). Interestingly, Lijima and Moriwaki studied in 1990 the crystallographic orientation between chitin and apatite of the *Lingula* brachiopod shell and conclude that the match between chitin and apatite would be sufficient to induce an epitaxial growth of the mineral at the surface of the chitin molecules. This observation is supported by *in vitro* experiments showing the oriented precipitation of apatite crystals in β-chitin without any additive proteins (Trautz and Bachra 1963).

Additionally, other species combines chitin with both calcium carbonate (crystallized or amorphous) and phosphate (crystalized or organic).

The presence of phosphate is detected in several species of the arthropods crustacean phylum. A biphasic mineral system that consists of hydroxyapatite and a mixture of calcium phosphate and carbonate was described in the marine crustacean *Odontodactyllus scyllarus* (Weaver *et al.*, 2012). The presence of an amorphous calcium phosphate (ACP) was identified both in the crustacean lobster *Homarus americanus* cuticle, together with an amorphous calcium carbonate (ACC) (Al-Sawalmih *et al.*, 2009) and in the edible crab *Cancer pagurus* calcitic cuticle (Bosselmann *et al.*, 2007). In addition, inorganic and a bioorganic (*i.e.* metabolite) phosphate were found within the ACC enabling its stabilization in the *Cherax quadricarinatus* crayfish (Akiva-Tal *et al.*, 2011).

Organic phosphorus was reported in the protist world possibly to stabilize amorphous calcium carbonate phase**.** In *Coleps hirtus* phosphorus and calcium colocalize but is correlated with the organic part of the alveolar plates (Lemloh *et al.,* 2013). In the same manner,

polyphosphates was described within a pool of intracellular calcium in the calcified *E. huxleyi* coccolithophorid algae (Sviden *et al.*, 2016). Noticeably, inorganic phosphate anions could also be incorporated into the calcite without disrupting the structure (Gertman *et al.*, 2008).

Hence, phosphorus appears mostly described as a stabilizing agent for ACC, like magnesium ion but rather in organic components such as phosphorylated proteins, metabolite (Phosphoenolpyruvite) and polyphosphate than in its inorganic ionic form. *In vitro* experiments tend to strengthen its effect by reducing significantly the particle size of ACC (Zou *et al.*, 2017). Nevertheless, its role remains unclear so far.

Significantly, the most significant substitution in bone apatite is carbonate; type I collagen being the main component of the organic matrix. Based on the characterization of calcareous sponges, a non-conventional mineralization process for vertebrate was proposed based on transient amorphous Ca-carbonate bio-seeds (Müller *et al.*, 2017). Regardless of whether it occurs, it is worth mentioning that otoliths consisting in calcium carbonate are found in the vestibular labyrinth of the vertebrate ear (Mann *et al.*, 1983).

From a physico-chemical point of view, Ca/P/C can coexist in a well-defined range of concentration as shown in the ternary diagram by Meic *et al.* in 2017. When one of the phosphate or the carbonate becomes a little more abundant, the resulting excusive phase is favored. Furthermore, *in vitro* amorphous calcium carbonate cristallizes into vaterite, aragonite or calcite depending on the phosphate concentration (Müller *et al.*, 2015) while its addition on the preformed polymorphs leads to the dissolution of specific crystals face (Jiang *et al.*, 2017) or surface (Kababya *et al.*, 2015).

Overall, these *in vitro* experiments and more specifically the co-localization of calcium carbonate and phosphorus in various species opens question on their coexistence during the evolution.

Here, we investigated the larval shell from the abalone *Haliotis tuberculata* to characterize the mineral phase along the growing shell formation and discriminate amorphous vs cristallized phases. We show the existence of an amorphous calcium carbonate (inorganic) phosphate phase (ACCP) by studying larval shell from *Haliotis tuberculata* at different early stages of growth. This phase possesses a ssNMR spectroscopic signature close to that found in the surface layer of bone apatite tablets. Noticeably, upon light vacuum drying of the larvae, this phase precipitates into carbonated hydroxyapatite according to the phosphorus chemical shift. Scanning Electron Microscopy coupled with Energy Dispersive X-ray strengthens this result with the characterization of typical apatitic spherulites in the shell. In addition, we show that the phosphate species are close to interfacial carbonate and bicarbonate of the shell larvae.

Interestingly, phosphate ions were also detected in urchin spines and aragonitic corals from *Paracentrotus lividus* and *Stylophora pistillata* species, respectively with a similar chemical shift.

Since 1967 (Towe and Lowenstam, 1967), there is a steadily growing list of biominerals, which form *via* amorphous precursor particles. The description of amorphous precursors in different biomineralization systems seems to become a consensus (Weiner *et al.*, 2009 Addadi *et al.*, 2003) since this strategy appears to be widespread in numerous phyla. In light of these widespread observations, the possibility of a unique precursor between carbonate and phosphate appears conceivable. Nevertheless, amorphous precursors are generally considered as inherently unstable in aqueous environment and rapidly transforms into crystalline form. The mechanisms by which they initially formed, how they are temporarily stabilized and they further transform are still a matter of study.

To go further, we performed a systematic study using a concentration range of Ca/P/C ionic precursor *in vitro*. The syntheses were performed using the "vapour diffusion method" since it was shown to be a versatile process to precipitate either calcium carbonate (Addadi *et al.*, 1987

; Becker *et al.*, 2003 ; Tauer *et al.*, 2005) or phosphate (Nassif *et al.*, 2010 ; Lafisco *et al.*, 2010). By doing so, we unexpectedly show the switch in phase from hydroxyapatite to calcite only through a slow variation of pH. This observation suggests the putative existence of a conservative precursor combining calcium, phosphate and carbonate. This phase may transform into either calcium carbonate or phosphate controlled by the organic components alone, *i.e*. tissue-specific proteins selected during evolution, as described many years ago (Belcher *et al.*, 1996 ; Falini *et al.,* 1996).

Materials and Methods

Biological and synthetic materials:

Haliotis larva shell

Fresh living *Haliotis tuberculata* larva were provided by France Haliotis hatchery (S. Huchette, Plouguerneau, France) after a fine controlled fertilization process at a water temperature of 17 ± 0,5 °C. The larvae were collected after filtration on a 40 µm membrane.

ACP synthesis and dry-bone sample:

The synthesis of ACP and preparation of bone samples (from ewe) were performed by Stanislas Von Euw as described in *Wang, Von Euw et al. Nat. Mater 2013:*

"ACP was synthesized according to the Heughebaert method (Somrani *et al.*, 2005). Technically, 46.3 g of $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ and 27.2 g of $(NH_4)_2HPO_4$ were dissolved in 0.55 L aqueous solution of ammonia of approximately 1.1 M and 1.3 L aqueous solution of ammonia of approximately 0.5 M respectively. The calcium solution was then poured into the orthophosphate solution forming a precipitate which was immediately filtered through a Büchner funnel. The recovered precipitate was firstly washed with an aqueous solution of ammonia of approximately 0.08 M, frozen in liquid N_2 and lyophilized for a period of 72 h, and lastly, stored at -20°C. A 4 mm NMR rotor was filled with powder (50 mg approximatively) then soaked with 10 µL of double distilled H_2O.

Bone Sample was harvested from two-year-old healthy French ewes. Bone was extracted from the proximal part of the diaphysis and distal epiphysis of humerus and femur. The work plan was reviewed and approved by the IMM Recherche's Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) prior to the initiation of this study. The animal research center (IMM-Recherche) received an agreement (n°75-14-01) on September 08th, 2008 for a period of 5 years by the "Sous-Direction de la Protection Sanitaire" of the French Authorities. The extracted untreated bone was dried for 24

hours under sterile conditions, i.e. under laminar flow hood, at ambient temperature. The intact sample was introduced to a 4 mm NMR rotor for further analysis.

Solid-State Nuclear Magnetic Resonnance (ssNMR):

Three different *Haliotis tuberculata* samples were used for the NMR experiments, summarized in **table 1** and described below:

SAMPLES	AGES	STATE	NMR EXPERIMENT	NMR PARAMETERS
1A **1B**	48 hpf 96 hpf	Fresh, hydrated	2D ^{1}H-^{31}P CP MAS	t_{cp} = 1 ms RD = 2 s NS = 400 t_1 increments = 100 ν_{MAS} = 11 kHz
2	72 hpf	Fresh, ^{13}C-enriched	^{1}H-^{13}C CP MAS {^{1}H}-^{13}C-{^{31}P} CP Rotational-Echo, Double-Resonance (CP-REDOR)	t_{cp} = 750 µs RD = 10 s Recoupling time = 36 ms ν_{MAS} = 5 kHz
3	72 hpf	Dry (4h vacuum oven)	2D ^{1}H-^{31}P CP MAS	t_{cp} = 10 ms RD = 3 s NS = 152 t_1 increments = 160 ν_{MAS} = 14 kHz

Table 1 *: Summary of the different Haliotis tuberculata larva samples used for the NMR analyses*

48, 72 and 96 hours post-fertilization (hpf) aged fresh larva, were collected in 15 mL tubes filled of sea water. Around 100 000 larva were collected for each age, in Plouguerneau, Brittany, France. After a 5 h train transport, 4 mm diameter zirconia rotor were immediately filled with 48 and 96 hpf fresh larvae and analyzed by solid state Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (ssNMR). When filling, the larvae were packed in the rotor and the excess of seawater was slightly removed by capillarity with a filter paper. The experiments were conducted without any other treatment.

Samples 1a) and b):

^{31}P solid state NMR spectroscopy experiments were performed on a *Bruker Advance III* spectrometer operating at a magnetic field of 11,7 T. The corresponding Larmor frequencies are 500MHz for ^{1}H and 201 MHz for ^{31}P.

The experimental parameters of one and two-dimensional ^{1}H-^{31}P CP MAS experiment are summarized in Table 1. The set-up of the Hartmann-Hahn condition was performed directly on the samples in order to maximize the sensitivity.

Sample 2:

Larvae are principally composed of organic tissues as the shell is still very thin (5 µm) at this stage (***Figure* 1**). In order to analyze calcium carbonate from the shell we proceed to a ^{13}C enrichment of the 72 hpf larvae as follow:

First, 24 hpf larvae were incubated 48 hours in sea water enriched with ^{13}C-labelled $NaHCO_3$ ($NaHC^*O_3$). NaHC*O3 was added at the concentration of 2 mM (bicarbonates ions concentration in see water) in order to double the natural concentration of bicarbonate in see water. The whole process is summarized in ***Figure* 1**.

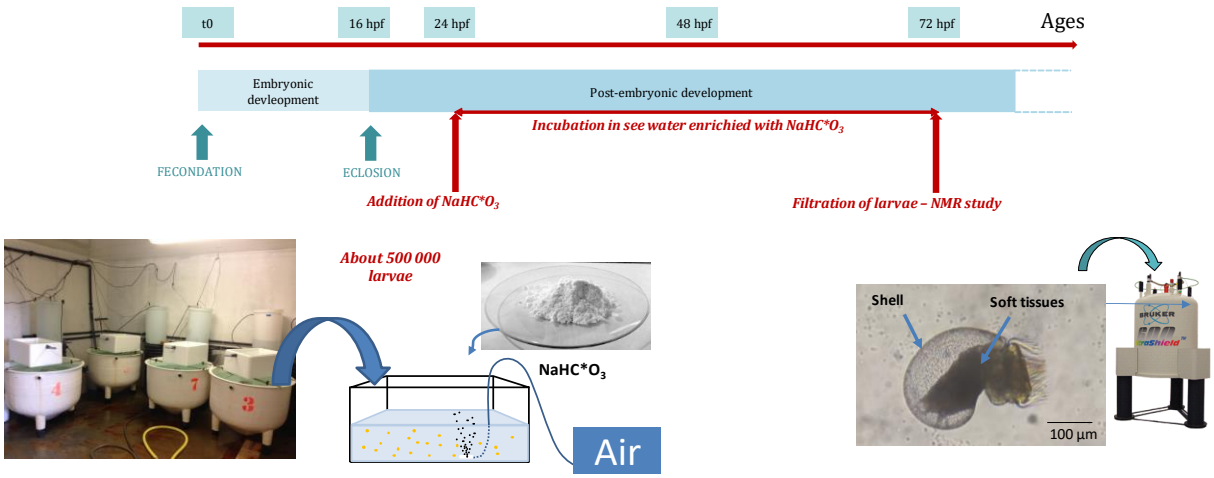


***Figure** 1: summary of the Haliotis tuberculata larvae ^{13}C-labelling process*

The experimental parameters of ^{1}H-^{13}C CP MAS and $\{^{1}H\}^{13}C\{^{31}P\}$ cross-polarization rotational-echo double-resonance (CP-REDOR) experiments are summarized in Table 1. The $\{1H\}^{13}C\{^{31}P\}$ CP-REDOR experiment (***Figure*** 7) allows the investigation ^{31}P•••^{13}C spatial proximities. In this sequence, the ^{13}C magnetization is generated by a standard CP step, and then a rotor-synchronized refocusing π pulse is applied on ^{13}C channel. To allow the re-introduction of the ^{31}P-^{13}C dipolar coupling, dephasing ^{31}P π pulses were applied at each rotor period during the ^{13}C evolution. Data acquisition was done through an interleaved mode where a single S_0 (without ^{31}P irradiation) and a single S (with ^{31}P irradiation) transients were collected alternatively in order to minimize the spectrometer instabilities. REDOR difference $\Delta S = S_0 - S$ exhibits the ^{13}C resonances dipolarily coupled to ^{31}P, consequence of a spatial proximity between the two nuclei.

Experiments have been performed on a *Bruker Avance III* spectrometer operating at a magnetic field of 7.1 T. The corresponding Larmor frequencies are $\nu(^{1}H)$ = 300 MHz for ^{1}H, $\nu(^{31}P)$ = 121 MHz for ^{31}P and $\nu(^{13}C)$ = 75 MHz for ^{13}C.

Sample 3:

In parallel, some of these 72 hpf ^{13}C-enriched larvae have been placed 4 hours under a light vacuum (10 mbar) at room temperature then analyzed by ssNMR.

Experimental parameters of two-dimensional ^{1}H-^{31}P CP MAS experiments are summarized in Table 1. Experiments were done on a *Bruker Advance III* spectrometer operating at a magnetic field of 7.1 T. The corresponding Larmor frequencies are 300.29 MHz for ^{1}H and 121.50 MHz for ^{31}P.

Transmission Electron Microscopy (TEM):

In parallel, fresh 32 hpf larva were prepared for TEM investigations in France Haliotis immediately after collecting. They were chemically fixed with 2% Glutaraldehyde, 2% Paraformaldehyde, 1% Picric Acid in 0,09 M Sorensen buffer (Na_2HPO_4 – pH 7,5) during 2 hours

at room temperature and one nght at 4°C. The sample was rinced by Sorensen buffer by two bath oh 1 hour each. The larvae were stored at 4°C and then dehydrated through a graded series of ethanol and included in acrylic resin. Ultrathin sections were performed using an ultramicrotom equipped with a diamond knife. The ultrathin sections (60 nm thick) were deposited on a cupper grids coated with a carbon film to stabilize the ultrathin section during the observation. After being contrasted by uranyl acetate, they were observed using a TEM (HITACHI H-7100). Observation at 70 keV and the use of a diaphragm 3 were chosen in order to preserve the organics components from degradation.

Scanning Transmission Electron Microscopy Energy-dispersive X-ray spectroscopy (STEM-EDX):

STEM observation was performed on the same sample by using thicker ultrathinsection (80 nm thick) deposited on naked grids. We used EDX to analyse the chemical composition of the larva shell. Analyses were performed at 80 kV with all the diaphragms open.

In vitro synthesis:

Calcium carbonate was synthesized using the "vapor diffusion method". The synthesis is based on the decomposition of ammonium carbonate at room temperature in a close chamber Addadi *et al.*, 1987). The solubilization of ammonia into the acidic solution containing the ion mineral precursors leads to an increase of pH favoring the solubilization of the CO_2 and subsequently the mineral precipitation. The set-up used here follow the protocol described by Gehrke *et al.*, 2005.

***Figure* 2** shows the experimental set-up in a close chamber. Flask (a) is filled with 2 g of solid ammonium carbonate, and b) a solution of $CaCl_2$ (20 mL; 0.01M). The $NH_{3(g)}$ and $CO_{2(g)}$ formed by the decomposition of ammonium carbonate (step 1) are progressively solubilized (step 2) into the flask b) forming a vertical pH gradient then the precipitation of calcium carbonate polymorphs (step 3).

To study the influence of phosphate on calcium carbonate precipitation, the third flask c) was containing a solution of $CaCl_2$ (20mL; 0.01M) and K_3PO_4 at different concentrations (***Figure* 2**). The concentrations of K_3PO_4 were fixed to reach the final Ca/P concentration ratio: 0.3, 0.5, 0.8, 1, 2, 3, 4, 5 and 6. All the experimental conditions are summarized in **table Si 1** (in the SI section).

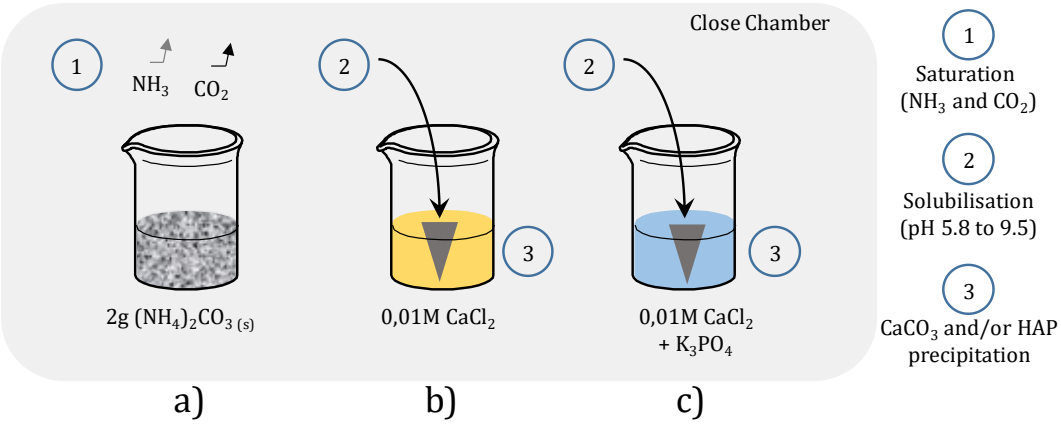


***Figure** 62: Schema of the technique*

The experiments were stopped after 1, 2, 3, 6, 12 days. Hence, syntheses were performed 5 times for each condition.

At the bottom of the b) and c) flasks, glass slides were placed for further analysis, especially microscopy, to not damage the crystals when collected. At the end of the synthesis, the glass sides were removed from the flasks, carefully rinsed with ultrapure water (MillQ.) and absolute ethanol to remove the non-precipitated salts and stop the reactions.

All the syntheses were carried out at room temperature (T = 19°C ± 1).

Light Microscopy:

Light microscopy was performed on the glass slides by using a transmission Zeiss AxioImager A2 POL, equipped with crossed polarizers and an AxioCam CCD camera.

Scanning Electron Microscopy (SEM):

Glass slides were covered by a 10 nm layer of gold and observed by SEM using a Hitachi model S-3400N at an accelerating voltage of 8 kV.

Infra-red spectroscopy (FT-IR) :

Some of the powder have been scraped from the glass slides by using a spatula and then analysed by classic FT-IR (Brïcker-Vestor 22) in the range of 4000-500 cm^{-1}.

Results and Discussion

NMR analysis of phosphorus species in Haliotis tuberculata larvae

Fresh hydrated Haliotis tuberculata larvae

Fresh larvae (48 hpf and 96 hpf) were analyzed by solid state NMR without any chemical or thermic treatment. Two-dimensional (2D) ^{1}H-^{31}P Cross Polarization MAS heteronuclear correlation (HetCor) experiments were recorded. This sequence allows a selective edition of phosphorus species in close proximity with protonated species.

For both samples (48 and 96 hpf), the 2D ^{1}H-^{31}P HetCor spectra displays a strong and broad (LW = 7.5 ppm) correlation resonance centered at $\delta(^{31}P)$ = 2 ppm and $\delta^{1}H$= 5 ppm (***Figure* 3a and b**). According to both ^{31}P and ^{1}H chemical shifts, the phosphorous species involved correspond to phosphate species in close proximity with water molecules (free inorganic phosphate ions are not detected through CP due to their mobility). According to the ^{31}P chemical shift, the detected signal might be due to phosphate ions associated with calcium ions as the $\delta(^{31}P)$ range from 5 to 0 ppm corresponds mineral phases such as calcium phosphate. Moreover, the broad line width suggests highly disordered species. As a consequence, taking also into account the strong correlation with water molecules, the correlation signal reminds similar experiments conducted on hydrated disordered calcium phosphate phase (Wang *et al.*, 2013).

2D ^{1}H-^{31}P HetCor experiment investigated on a synthetic hydrated amorphous calcium phosphate (ACP) presents a similar profile (***Figure* 3c**). However, the fine comparison between the extracted ^{31}P rows of biological and synthetic samples (***Figure* 3d**) shows that while the chemical shift are similar, the line width is broader (LW = 7.5 ppm) for the larvae samples compared to hydrated ACP (LW = 5.1 ppm). ^{31}P resonance of larvae should not only be inorganic since the ^{31}P signals at 0 ppm and below observed for biological samples might corresponds to phospholipids.

These observations evidence a large amount of phosphorus on *Haliotis tuberculata* larvae under the form of "rigid" phosphate ions. Surprisingly, comparison with the synthetic sample suggests the presence of an ACP-like phase.

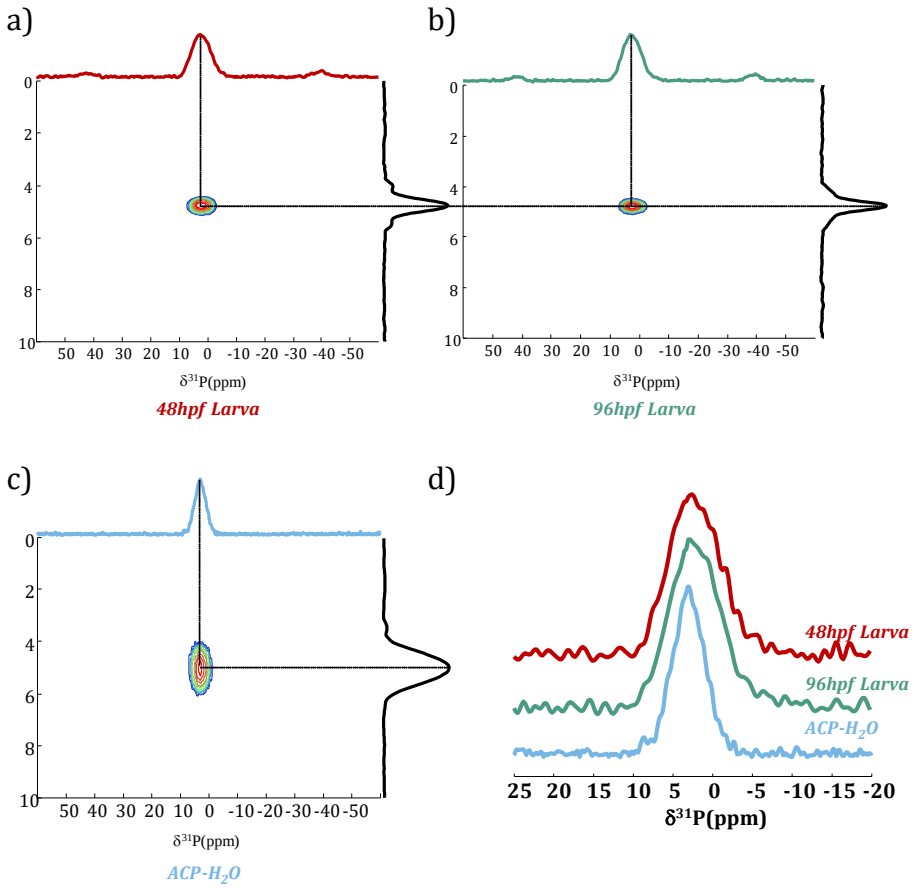


***Figure 3**: ^{1}H-^{31}P HetCor spectra of fresh Haliotis tuberculata larvae at a) 48 hpf and b) 96 hpf and c) hydrated synthetic ACP. d) Comparison of the respective extracted ^{31}P rows of the biological and synthetic samples*

Dry *Haliotis tuberculata* larvae

To further investigate the presence of an ACP-like phase in *Haliotis tuberculata* larvae, we studied dry biological sample (72 hpf larvae after 4 hours in vacuum oven at room temperature, see the materials & Methods section).

The resulting ^{1}H-^{31}P HetCor spectrum is displayed in ***Figure* 4.** We evidence a strong evolution of the NMR spectrum compared to fresh samples. Indeed, two distinct ^{31}P signals of similar

chemical shift ($\delta^{31}P$ = 3,2 ppm) are observed and correlate with two distinct source of protons. The first correlate with a sharp peak at $\delta(^1H)$ = 0 ppm and the second with a weaker resonance spanning from 5 to 15 ppm. The first correlation peak clearly evidence the presence of hydroxyapatite; the $\delta(^1H)$ = 0 ppm corresponding to hydroxyl anions. The second resonance from $\delta(^1H)$ = 5 to 15 ppm corresponds to HPO_4^{2-} ions and residual water (Wang *et al.*, 2013).

Comparison with similar experiments conducted on dried bone confirm the previous assignment as we observe similar signals related to bone mineral: *(i)* the crystalline hydroxyapatite core ($\delta(^1H)$ = 0 ppm) and *(ii)* the disordered mineral surface composed of HPO_4^{2-} ions and residual water. The ^{31}P chemical shift at 3.2 ppm is a strong indication of the formation of carbonated substituted hydroxyapatite as found in bone mineral.

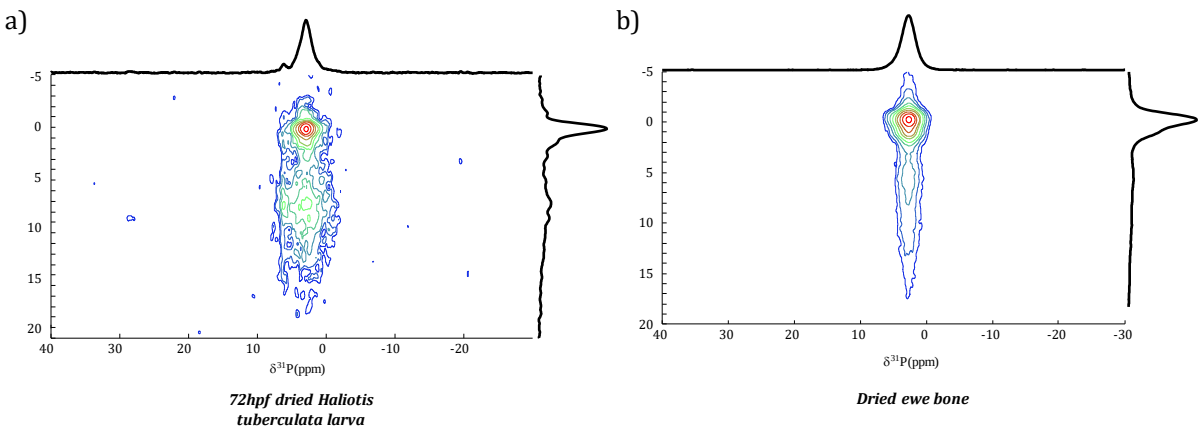


Figure 4: *^1H-^{31}P HetCor spectra recorded for a) dried 72 hpf Haliotis tuberculata larvae and b) Dried ewe bone. For both samples t_{cp} = 10 ms and RD = 3 s.*

Surprisingly, we evidence crystalline carbonated hydroxyapatite in *Haliotis tuberculata* larvae after drying. The formation of such a phase upon drying strongly indicates the association of phosphate with calcium ions in living larvae under a hydrated amorphous form that turns into crystalline phase through dehydration. The broad signal corresponding to a disordered calcium phosphate may correspond to residual biological ACP-like phase and/or amorphous surface of the apatite crystals generated by dehydration. Phosphate of organic origin seems to be absent from

the ^{1}H-^{31}P HetCor spectrum of dried larvae, except a thin weak resonance at 6.4 ppm of unknown origin.

Localization of the ACP-like phase in *Haliotis tuberculata* larvae

These results strongly suggest the presence of phosphate ions within a mineral phase *i.e.* the shell of *Haliotis tuberculata* larvae. To localize this possible ACP-like phase, we performed {^{1}H}-^{13}C-{^{31}P} CP REDOR experiments on a fresh 72 hpf larvae sample and probed the spatial proximities between phosphate and carbonate ions from the larval shell. To edit specifically ^{13}C signals from the mineral, we needed to develop a method to enrich the larval shell in ^{13}C (see Materials and Methods section).

The efficiency of ^{13}C enrichment method is highlighted in ***Figure* 5** that displays the ^{13}C CP MAS NMR spectra of unlabeled (red) and ^{13}C-labeled (blue) 72 hpf larvae. The ^{13}C CP MAS NMR spectrum of unlabeled larvae displays strong signals principally coming from lipids. The ^{13}C MAS NMR spectrum of ^{13}C-labeled larvae displays a strong carbonate signal. We note that signal from the organic tissues are absent in these conditions. As the mineral fraction is very low compared to the organic tissues, this experiment suggests that only the carbonates from the mineral fraction where enriched using this method.

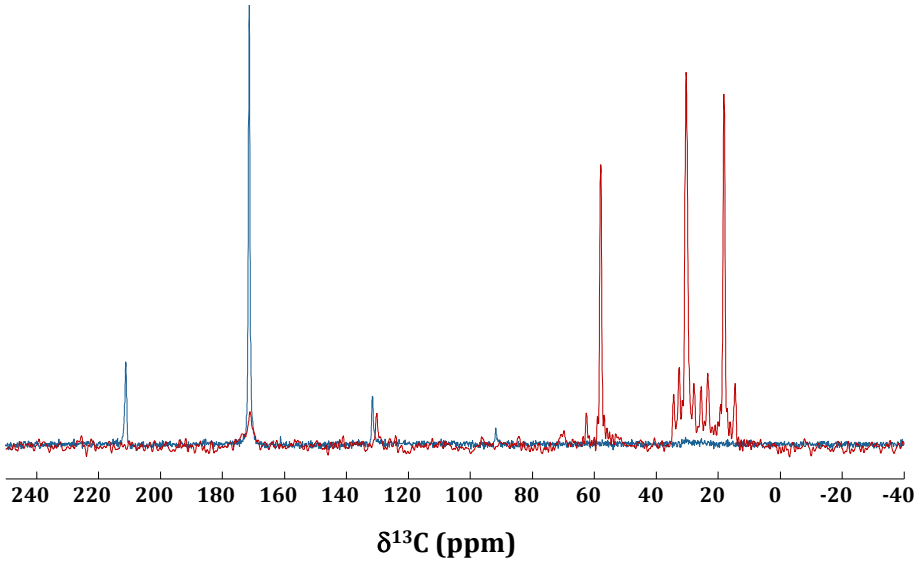


***Figure 5**: 13C MAS spectra of a) unlabeled (CP MAS; red) and b) 13C-labbelled (quantitative spectrum; blue) 72 hpf larvae*

***Figure* 6** displays a close up on the carbonate region of the ^{13}C MAS NMR spectrum of ^{13}C-labelled 72 hpf larvae (blue spectra). A unique resonance centered at 171 ppm is observed and corresponds to crystalline aragonite. ***Figure* 6** displays the ^{1}H-^{13}C CP MAS NMR spectrum of ^{13}C-labbelled 72 hpf larvae (red spectra). A complex spectrum is observed where two types of signals are observed according to their chemical shifts: carbonates from 172 to 167 ppm and bicarbonates from 167 to 160 ppm. Thus, the larval shell seems to be formed of crystalline aragonite together with a large amount of disordered carbonates and bicarbonates in protonated environment.

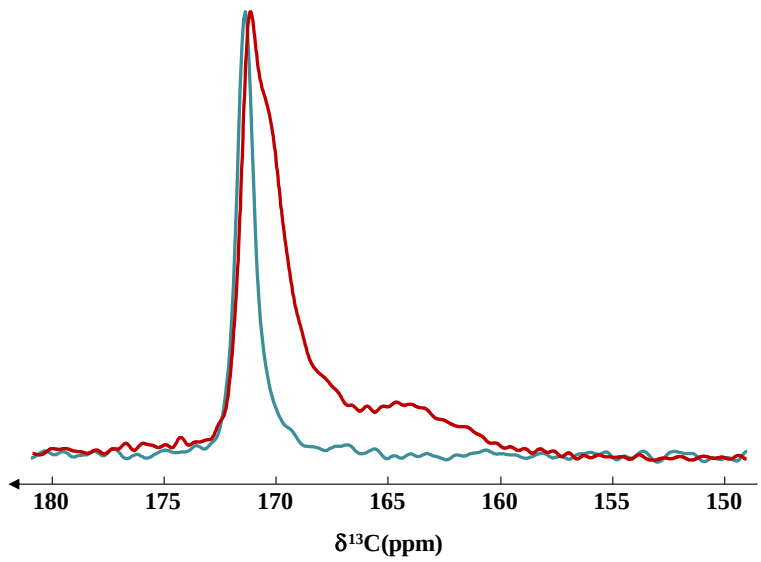


Figure 6: *^{13}C MAS NMR (blue) and ^{1}H-^{13}C CP MAS NMR spectrum (red) of ^{13}C-labelled 72 hpf larvae*

According to previous studies on mature nacre (Ajili *et al.*, 2018a; BenShir *et al.*, 2013), protonated carbonate species are proposed to be interfacial species in calcium carbonates shells. Moreover, phosphate species were identified in the interfacial region of growing aragonite tablets (Ajili et al 2018b). Thus, we performed {^{1}H}-^{13}C-{^{31}P} CP REDOR experiments on a ^{13}C-labelled 72 hpf larvae in order to probe the spatial proximities between phosphate and interfacial carbonates.

{^{1}H}-^{13}C-{^{31}P} CP REDOR based on to ^{13}C-^{31}P dipolar recoupling that enable a selective identification of protonated calcium carbonate adjacent to phosphorus species. The REDOR experiment is performed in two steps. First, a reference ^{1}H-^{13}C CP spectrum without dipolar recoupling is recorded (^{31}P irradiation OFF; blue in ***Figure* 7**) then the reintroduction of the ^{31}P-^{13}C dipolar coupling is achieved (^{31}P irradiation ON; red in ***Figure* 7**). The ^{13}C resonances presenting an attenuation of intensity corresponds to carbon close to phosphorus species. The OFF-ON difference (yellow in ***Figure* 7**) shows a general attenuation for interfacial carbonate and bicarbonates species.

Thus, from the NMR analysis we conclude that the ACP-like phase detected in the larva is located in the shell in the surrounding of the interfacial carbonates.

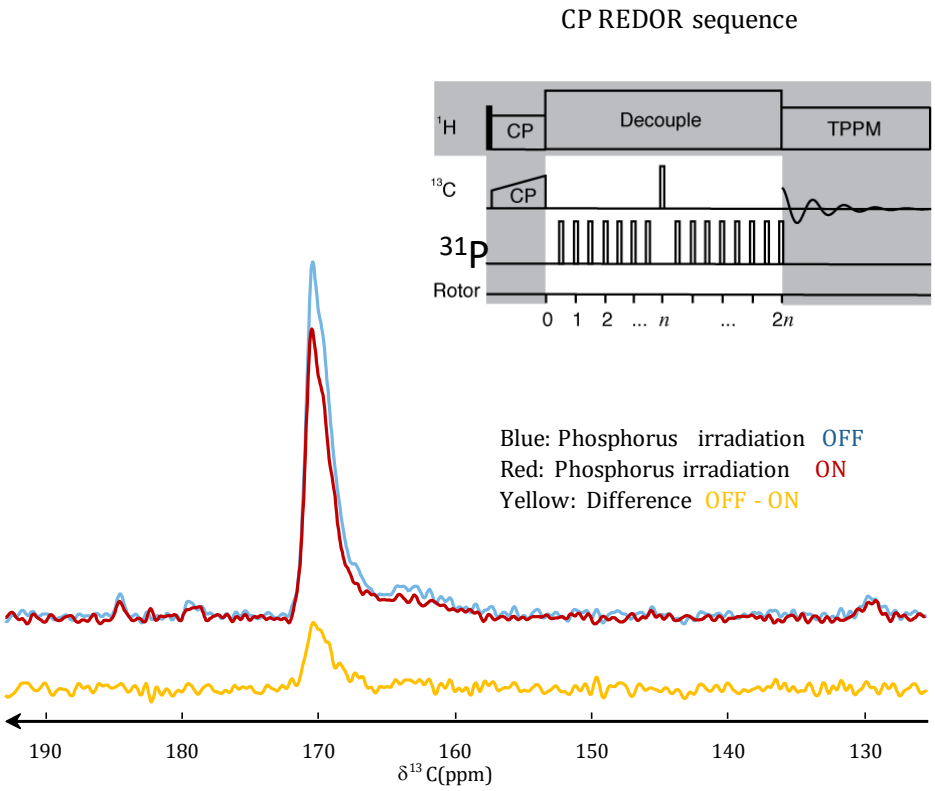


Figure 7: *{¹H}-¹³C-{³¹P} CP REDOR* experiment of 13C-labelled 72 hpf Haliotis tuberculata larvae (recoupling time = 36 ms)

Transmission Electronic Microscopy of 32 hpf Haliotis tuberculata larva

According to our knowledge, transmission electronic microscopy investigations were never performed on HT larva shell samples.

TEM was performed on ultrathin sections of 32 hpf *Haliotis tuberculata* larva to observe the shell ultrastructure (***Figure* 8**). In ***Figure* 8a**, a larva shell is partly observed in cross-section with the associated soft tissues. The soft tissue is mainly composed of lipid vesicles (grey contrasted globules). The shell is about 7 µm thick where three layers are observed, *i.e.* a more contrasted central layer surrounded by two lighter layers. They appear homogeneous in size (≃ 2 µm). Surprisingly, this observation does not confirm previous work in the literature where only one granular layer was described thanks to scanning electron microscopy investigations (***Figure* SI 1**)

performed on fractured shells at the same stage (Auzoux-Bordenave *et al.*, 2010). Observations at higher magnification (***Figures* 8b and c**) confirms the absence of the former described granular aspect but instead reveals the presence of thin radial oriented particles reminding *in vitro* apatitic spherulites (Nassif *et al.*, 2010).

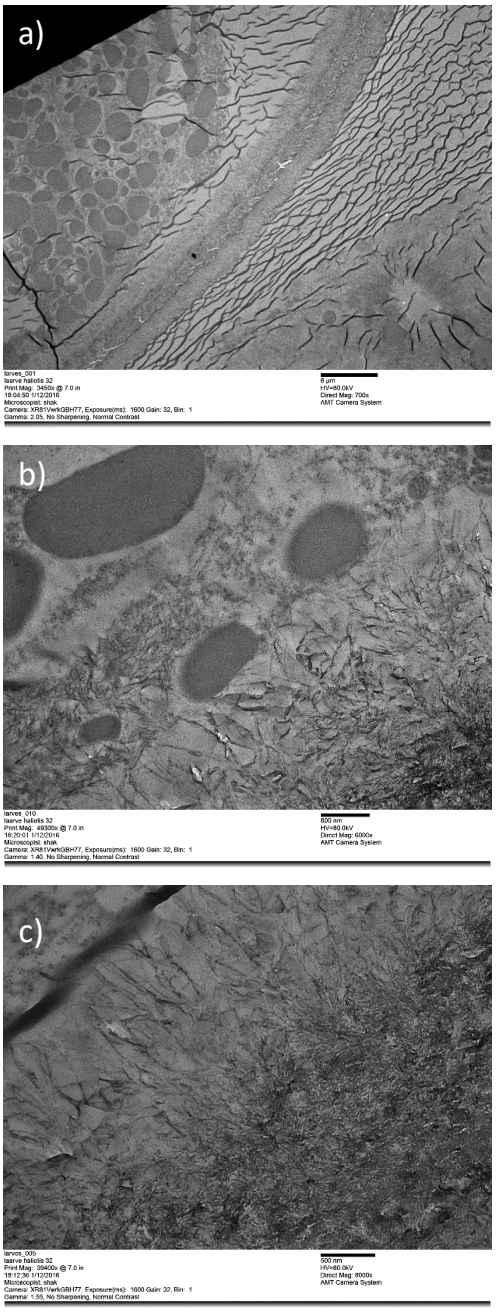


Figure 8 : *Transmission electronic micrographs of 47 hpf Haliotis tuberculata larva showing the shell measuring around 7 mm at A) low magnification showing three layers, a more contrasted central layer surrounded by two lighter layers ; and B) and C) higher magnification showing the presence of thin radial oriented particles reminding in vitro apatitic spherulites*

Hence, to go further, the *in vitro* spherulitic apatite were embedded and ultrathin sections were performed for TEM observations. Their similar appearance in cross-section (***Figure* 9**) suggests the presence of spherulitic apatite crystals in the larva shell at this stage.

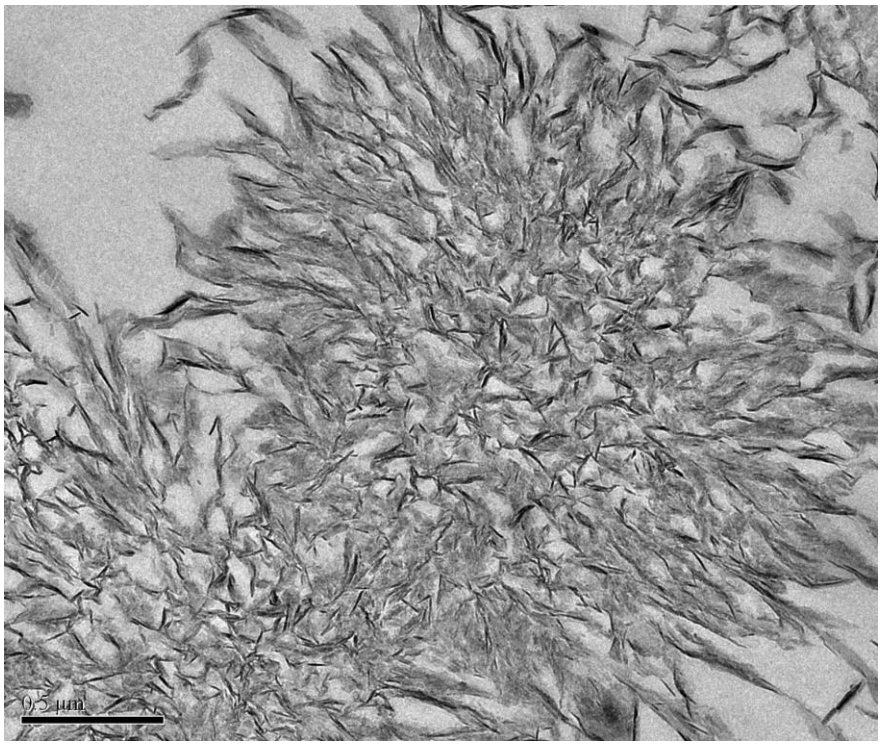


Figure 9 : *TEM micrograph of an in vitro spherulitic apatite cross-section*

EDX analyses (***Figure* 10**) were performed on sections of 47 hpf HT samples and show the presence of phosphorus colocalized with calcium in the larva shell.

It remains unclear whether the artefactual presence of such apatitic spherulites results from either the sample TEM preparation or the vacuum in the TEM column since both may direct the crystallization of the amorphous mineral phase. This emphasizes the difficulty in working with early stages of abalone. Nevertheless, this observation is in agreement with the NMR analyses showing that hydroxyapatite may precipitate inside the shell at the early stage of larva upon drying indicating a Ca/P/C ratio coherent with the precipitation of both calcium carbonate and phosphate.

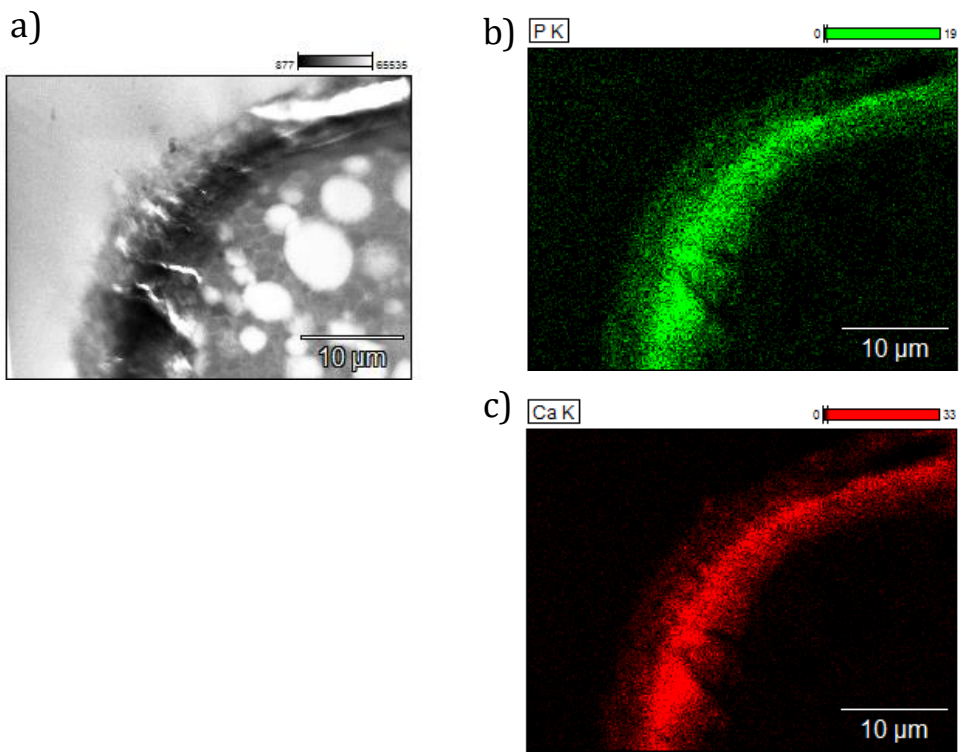


Figure 10 : *STEM-EDX analysis performed on the Haliotis tuberculata 47 hpf cross section showing in a) the STEM micrograph of the analyzed region ; b) the chemical analysis performed in this region revealed the presence of calcium and phosphate*

Moreover, it is difficult to exclude that phosphorous is not the consequence of the chemical fixation (Sörensen Buffer). However, since hydroxyapatite phase was revealed by NMR experiments performed on fresh larvae sample without any treatment, the Sorensen's phosphate buffer seems to not interact with the mineral phase. In addition, the hypothesis of a calcium carbonate/phosphate amorphous phase stabilized by proteins was previously proposed in Lobster Cuticle *Homarus americanus* based on the precipitation of both hydroxyapatite and calcite (Ali Al-Sawalmih *et al.*, 2009).

Overall, these results support the same conclusion meaning the presence of an unexpected calcium carbonate phosphate phase in abalone larva shell.

In vitro synthesis

For a deeper understanding, we performed *in vitro* calcium carbonate syntheses with or without inorganic phosphates. For this purpose, we used the vapor diffusion synthesis set up by Addadi *et al.* in 1987 (see material and methods section). The identification of the phases was carried out by FT-IR on grinded powders (***Figure* 12 and 14**). On one hand, the use of X-ray was not preferred here due to a loss of powder left on the glass slide for the SEM observations. On the other hand, since the crystals faces are oriented on the glass slide, the resulting intensities are not representative. Without additives, the morphology of the carbonate crystals allows easily the identification of the crystalline phase. In the described condition ($CaCl_2$ and CO_2 diffusion), the synthesis leads to the formation of the three polymorphs *i.e.* calcite, aragonite and vaterite after 1 day of experiment (***Figure* 11a**). The metastable vaterite is not observed after 9 days of precipitation. Only typical rhomboedral calcite and small aragonite needles are observed at this stage (**Figure** 11b). This is confirmed by FT-IR analyse (***Figure* 12**) that shows the desperation of the vaterite typical band (≃744 cm^{-1}), after 3 days of precipitation when calcite (≃1430 cm^{-1}) and aragonite (711-399 doublet and 1082 cm^{-1} band) are present even after 9 days.

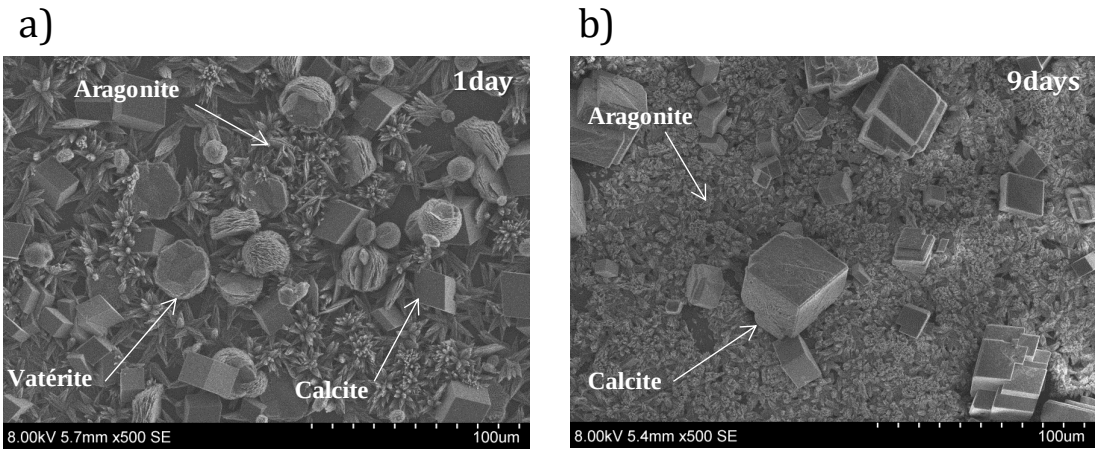


Figure 11 : *Synthesis of calcium carbonate phase by vapor diffusion method using a solution of 0,01M $CaCl_2$ and 2 g of ammonium carbonate. a) After one day of precipitation, we obtain aragonite, vaterite and calcite; b) After 9 days we only have calcite and small needles of aragonite.*

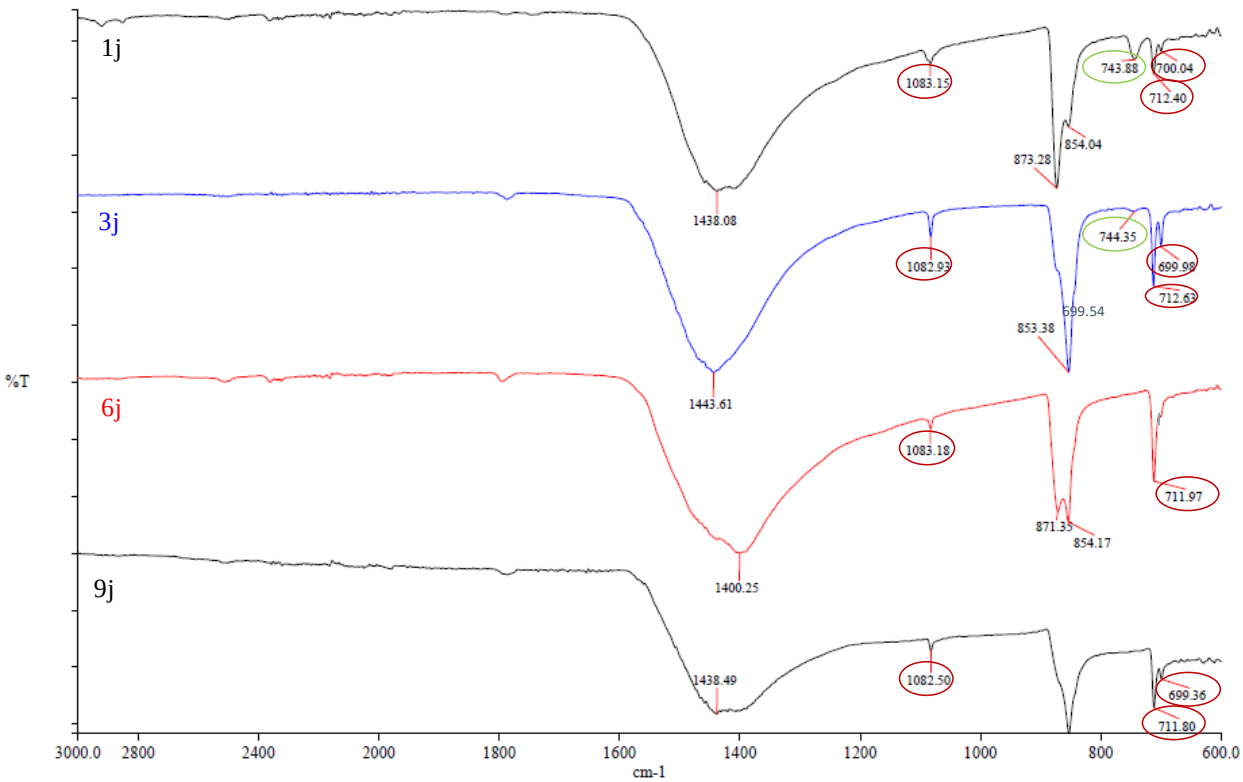


Figure 12 : *FT-IR analysis of the evolution of the calcium carbonate phases after 1 day to 9 days of precipitation – We observe a desperation of the vaterite typical band around 744 cm^{-1}, after 3 days of precipitation when calcite (around 1430 cm^{-1} band) and aragonite (711-399 doublet and 1082 cm^{-1} band) are present even after 9 days.*

The source of phosphate was provided by adding potassium phosphate into the calcium chloride solution. A range of different Ca/P ratio was set by varying the initial amount of the phosphate salts. The results obtained for the ratio Ca/P = 3 are presented in ***Figure* 13**. The observations were performed by SEM. After one day of precipitation (***Figure* 13a**), spherulitic hydroxyapatite is spreading on the glass surface with few calcite crystals are observed. ***Figure* 13f** shows a hydroxyapatite crystal at higher magnification. After three days (***Figure* 13b**), hydroxyapatite seems less abundant since the crystals do not spread homogeneously on the glass surface. The fact that calcite crystals are bigger in size suggests that more ions were driven to the precipitation of calcium carbonate *versus* phosphate. This is further confirmed by the observations after 6 and 9 days (***Figure* 13c, d and e**). Hydroxyapatite crystals tend to disappear completely and only bigger crystals of calcite are seen. After 12 days (***Figure* 13e**), we observe distinctively that the calcite crystals present an eroded surface (***Figure* 6g**). As mentioned above,

this observation is in agreement with previous works where it was shown that phosphate may interact on crystals faces of calcite (Mann *et al.*, 1993).

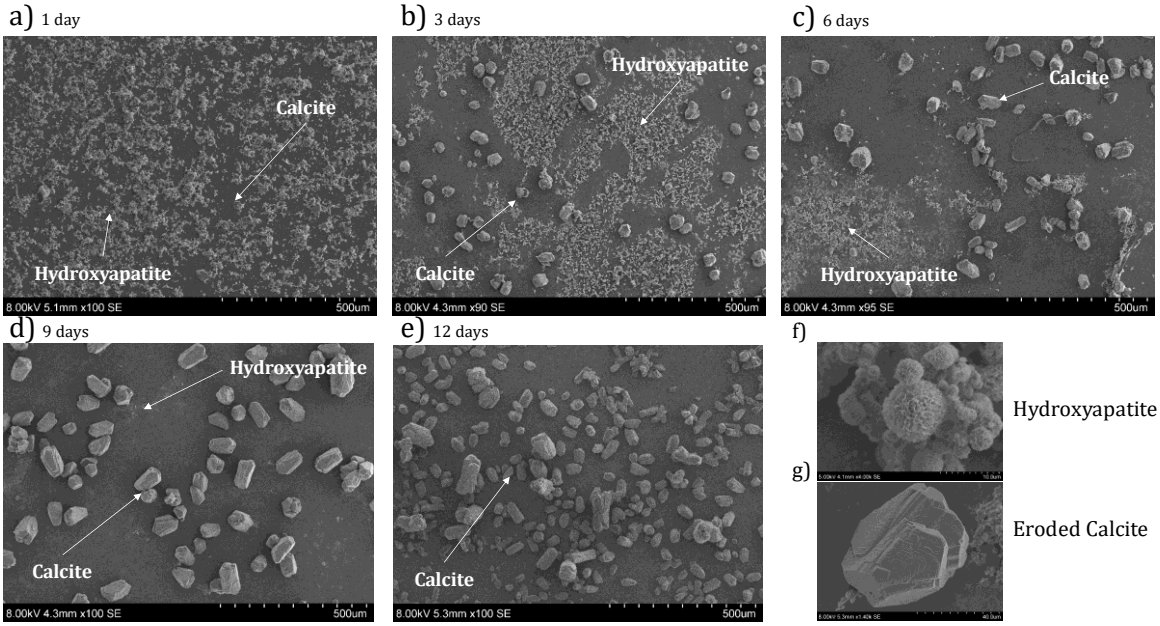


Figure 13 : *SEM micrographs showing the evolution of the mineral phases formed at the bottom of the flask after different days of precipitation with an initial ration Ca/P = 3. a) to e) At 1 day of precipitation we see in majority Hydroxyapatite crystals tend to disappear from 3 days to 12 days of precipitation leaving only bigger eroded crystals of calcite. f) shows at higher magnification the hydroxyapatite crystals and g) the eroded calcite crystal*

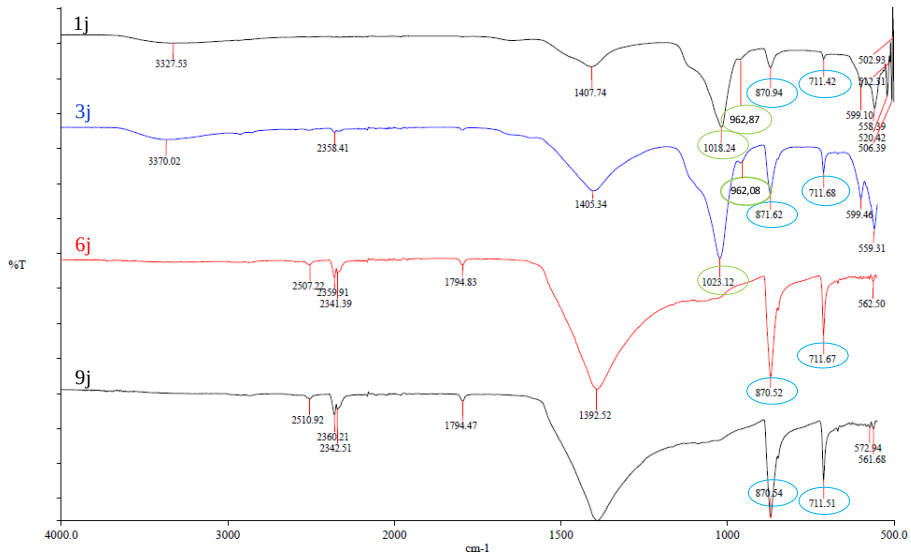


***Figure** 14 : FT-IR analysis of the evolution of the mineral phases after 1 day to 9 days of precipitation – We observe a disappearance of the calcium phosphate phases (bands marked in green around 1020 and 962 cm^{-1}) in favor of calcite (bands marked in blue around 871 and 711 cm^{-1})*

The switch in phase from hydroxyapatite to calcite may occur only trough a slow variation of pH. The amount of CO_2 is also increasing favouring the precipitation of calcium carbonate *versus* phosphate. Phosphate ions are usually describe to play a role in the stabilization of amorphous calcium carbonate phase through substitution with the carbonate and the formation of complexes with calcium (Gal et al, 2014 ; Kabbabya *et al.* 2014 ; Zou *et al.*, 2017).

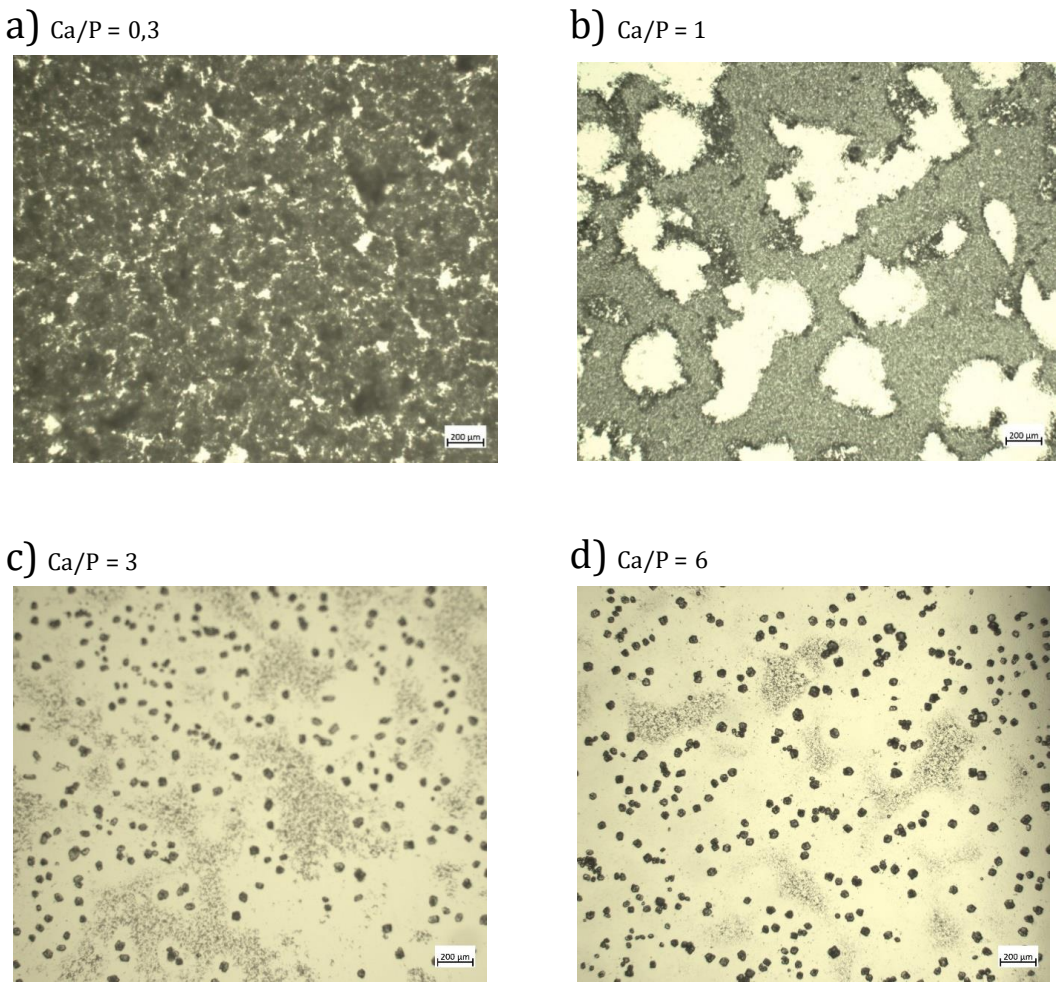


Figure 15 *: Optical microscopy showing the influence of the Ca/P ratio on the precipitation of the mineral phases after 3 days of synthesis ; a) Ca/P = 0.3 ; b) Ca/P = 1 ; c) Ca/P = 3 , d) Ca/P = 6*

Similarly, a switch between hydroxyapatite and calcite is observed for other Ca/P ratio used here as shown by optical light microscopy (***Figure* 9**). The influence of the initial phosphate amount Ca/P ratio (*i.e.* 0.3, 1, 3 and 6) was studied by comparing the crystals morphology after the same time of reaction (t = 3 days). It was found that increasing the phosphate amount leads to

delay the precipitation of calcite suggesting a competition between these two different phases. The effect of pCO_2 on the dissolution of HAP crystals might also interfered as previously shown (Pan *et al.*, 2009).

Corals and Sea urchins

To go further, we investigated the presence of such phase in other species where the presence of ACC is widely described to form the crystalline structure at all stages of development. First, we performed ^{1}H-^{31}P HetCor experiment on a dried *Stylophora pistillata* coral skeleton sample (***Figure* 16**). The presence of hydroxyapatite was also detected. The sample was extracted from the central region of the skeleton rich of amorphous calcium carbonate particles surrounded by organics where the growth of the skeleton is described to be driven (Von Euw *et al.*, 2017). Then, ^{1}H-^{13}C CP MAS experiments were performed using see urchin (*Paracentrotus lividus*) showed in ***Figure* 17**. The presence of Phosphorus species was also detected in spines that may be under the form of a mineral phase. Further investigations (^{1}H-^{31}P HetCor) are needed to confirm the presence of mineral phosphate phase in sea urchin spines.

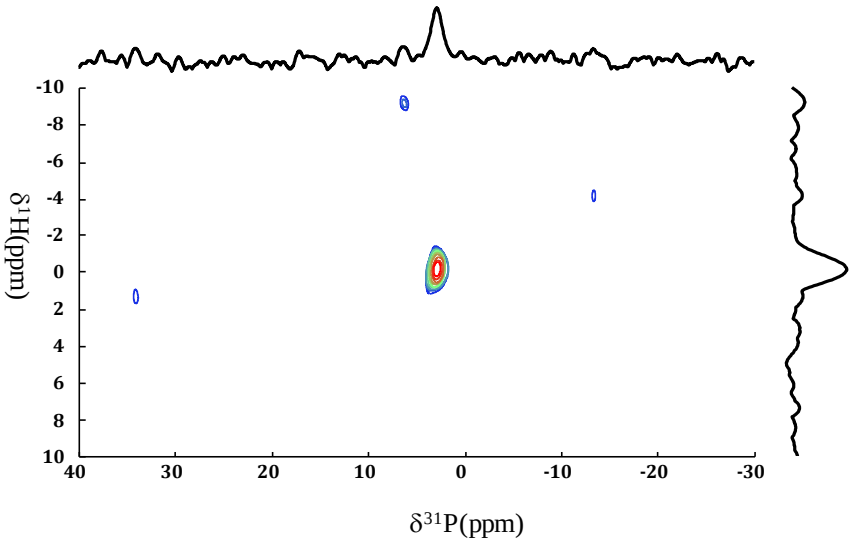


Figure 16 *: ^{1}H-^{31}P HetCor spectra recorded for a dried Stylophora pistillata coral skeleton sample recorded with t_{cp} = 10 ms and RD = 3 s.*

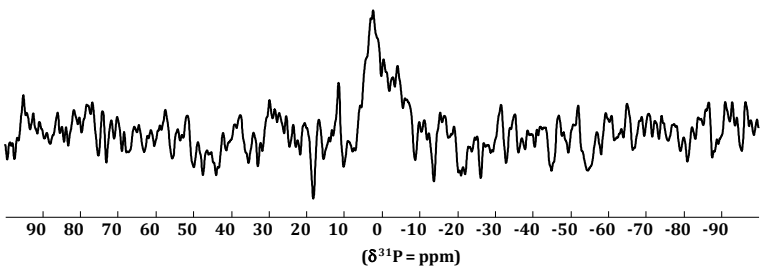


Figure 17 : *^{1}H-^{13}C CP MAS experiments performed on see urchin (Paracentrotus lividus) sample (RD = 3,5 s, t_{cp} = 10 ms)*

The presence of phosphate phases in carbonate species are quite unexpected; sea water being very depleted in phosphates. These observations remind that of other species such as crustacean where ACP was also described in their cuticle (Dillaman *et al.*, 2005 ; Boßelman *et al.*, 2007) and some protist species like the coccolithophorid. It is also worth mentioning the hybrid hydroxyapatite/chitin shell of the brachiopods in which Watabe and Pan (1984) observed some aggregates of apatite in the form of spherulites in the mineralized layer, presenting high similarity with our TEM observations.

The presence of this intermixed amorphous calcium carbonate phosphate phase (ACCP) in the *Haliotis tuberculata* larva shell can be related to the alkaline phosphatase which was detected in the mantle region of some bivalves and gastropods mollusks (Bevelander and Benzer, 1948 ; Timmermans, 1969 ; Blasco *et al.*, 1993 ; Duvail and Fouchereau-Peron, 2001 ; Marxen *et al.*, 2003) and also in the nacre of *Pinctada maxima* (Le Faou, 1996). In *Haliotis tuberculata* shell, an increase of the enzyme activity was reported and correlated with the strong shell growth phases (Duvail and Fouchereau-Peron, 2001). The role of this enzyme is not clearly understood yet. In mammalians, this enzyme plays a role in the local inorganic phosphate species concentration enhancing the calcium phosphate precipitation (Herbert *et al.*, 1997). In the same way, we can speculate that the ACCP concentration in the *Haliotis tuberculata* shell might be regulated by an alkaline phosphatase activity.

In view of these different elements, from our point of view, the link between calcium carbonate/phosphate species seems too strong to be only a coincidence. The presence of ACP close to the calcium carbonate in various shell species suggest that we have an intermixed amorphous precursor phase at the beginning of the biomineralization shell processes as speculated earlier for the lobster cuticle (Ali Al-Sawalmih *et al.*, 2009). According to the *in vitro* study, the presence of structurally different ratios between calcium, phosphate and carbonate in the biogenic ACCP, cannot be excluded as it is presumed for ACC (Levi-Kalisman *et al.*, 2002; Cartwright *et al.*, 2012).

The selection of the resulting aragonite phase might be governed by organic components (*e.g.* tissue-specific proteins selected during evolution) as described many years ago (Belcher *et al.*, 1996; Falini *et al.*, 1996). Nevertheless, the results from the *in vitro* analysis also suggest that the pH of the local environment might play a direct role in the selection of the resulting mineral phase.

Conclusion

This work shows the presence of an ACCP phase in the *Haliotis tuberculata* larva shell. The evidences brought from ssNMR analyses indicate that this amorphous phase is very similar to the bone-ACP precursor phase. This conclusion is strongly strengthened by the microcopy observations and analyses. The presence of phosphate in a carbonated shell remains quite surprising and opens question about it potential role in the shell biomineralization.

Nevertheless, the presence of an amorphous precursor of biomineralization concerns a large part of the phylogeny, in echinoderms, mollusks, arthropods, annelids, and vertebrates in particular. This emphasizes the possibility of the existence of a common ancestor who developed the strategy of the amorphous precursor at the base of all bilateral symmetry metazoans (Weiner *et al.*, 2009). Our observations strongly support this theory by going further, suggesting that there is an intermixed mineral precursor common to all the bilateral symmetry biomineralized species that might been formed and oriented to either calcium carbonate or calcium phosphate final mineral phase under the action of the organic components.

Supporting Information

Time	Ca/P Ratio	$CaCl_2$			$CaCl_2 + K_3PO_4$			
		$mCaCl_2$	Initial pH	Final pH	mK_3PO_4	$mCaCl_2$	Initial pH	Final pH
1 day	0.3	29.8	6	14	95.3	29.9	4	14
2 days	0.3	29.6	6	10	90.4	29.4	4	10
3 days	0.3	29.5	6	9	91.0	29.4	5	9
6 days	0.3	29.4	6	9	90.7	29.4	5	10
9 days	0.3	29.8	6	9	90.6	30.3	5	10
1 day	0.5	29.7	4	14	56.0	29.9	4	14
2 days	0.5	29.2	5	10	54.0	29.9	4	10
3 days	0.5	29.4	6	8	55.4	29.4	5	7
1 day	0.8	29.9	5	14	33.4	29.9	5	14
2 days	0.8	30.1	5	10	34.4	29.3	4	10
1 day	1	29.8	5	10	27.5	29.2	5	10
2 days	1	29.3	5	10	27.4	29.3	4	10
3 days	1	29.8	6	9	27.4	29.5	5	9
6 days	1	29.4	6	9	27.2	29.4	5	10
9 days	1	29.4	6	9	27.2	29.6	5	9
12 days	1	30.0	6	10	27.4	29.9	6	10
1 day	2	29.8	6	10	13.6	29.7	5	10
2 days	2	29.6	5	10	13.5	29.8	4	10
1 day	3	29.2	6	10	9.2	29.7	5	10
2 days	3	29.2	5	10	9.3	29.5	5	10
3 days	3	30.0	6	9	9.0	30.0	6	9
6 days	3	29.4	6	9	9.1	29.4	5	10
9 days	3	29.3	6	9	9.2	29.4	5	9
12 days	3	29.8	6	10	9.1	30.0	6	10
1 day	4	29.6	6	9	6.8	29.6	6	9
1 day	5	29.3	6	9	5.6	30.0	6	9
1 day	6	29.3	6	9	4.6	29.8	6	9

Table SI 1 *: Summary of the experimental conditions used for the vapor diffusion calcium carbonate synthesis in presence or not of phosphate ions for different ration Ca/P and time of precipitation*

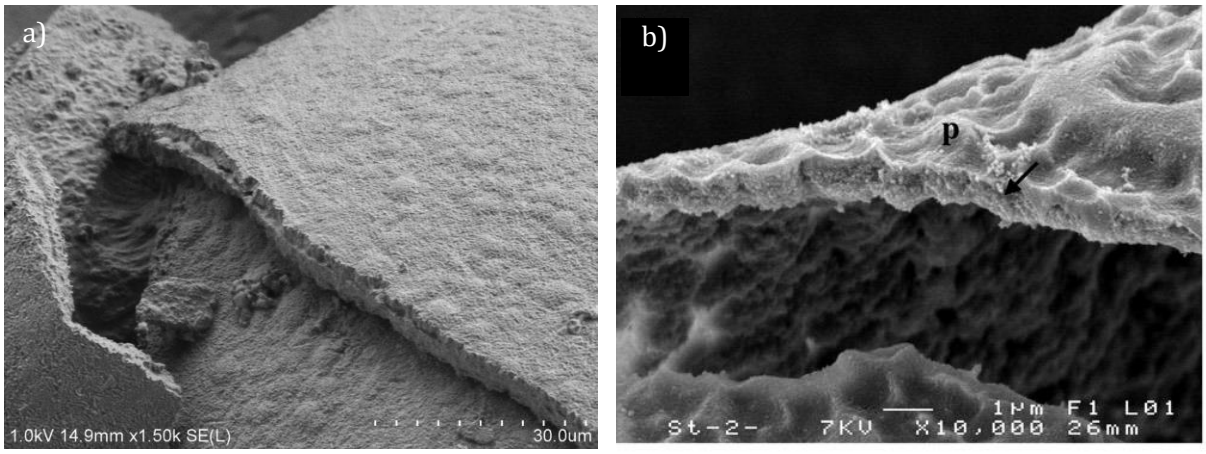
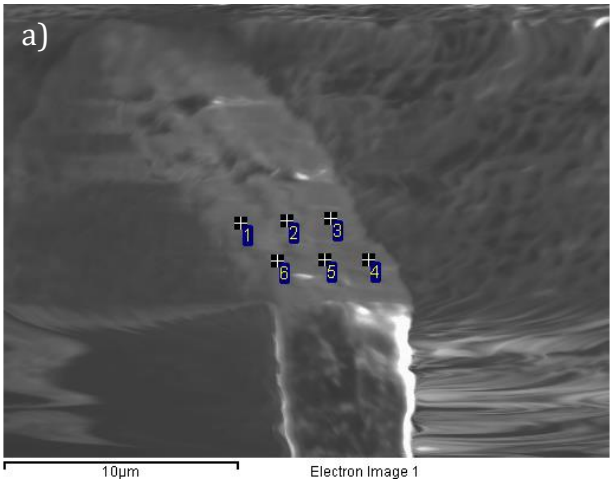


***Figure SI 1**: a) SEM-FEG micrograph of a chemically fixed 32 hpf Haliotis tuberculata shell fracture showing the presence of different superposed mineral layers ; b) SEM micrograph of H. tuberculata 30 hpf larval shell cross-sections showing a thin mineralized layer about 1 µm in thickness (arrow) just below the external periostracum (p) (reproduced from Auzoux-Bodenave et al., 2011)*

a)



b)

Shell Layers	Analysed Spot	Ca/P ratio
Outer	Point 1	0,75
	Point 6	0,66
Middle	Point 2	0,70
	Point 5	0,77
Inner	Point 3	0,77
	Point 4	0,77

***Figure SI 2**: a) SEM micrograph of a chemically fixed 32 hpf Haliotis tuberculata shell fracture showing the presence of different superposed mineral layers where 6 spots are annotating; b) table indicating the Ca/P element ratio calculated from the EDX analyses performed on the 6 spots.*

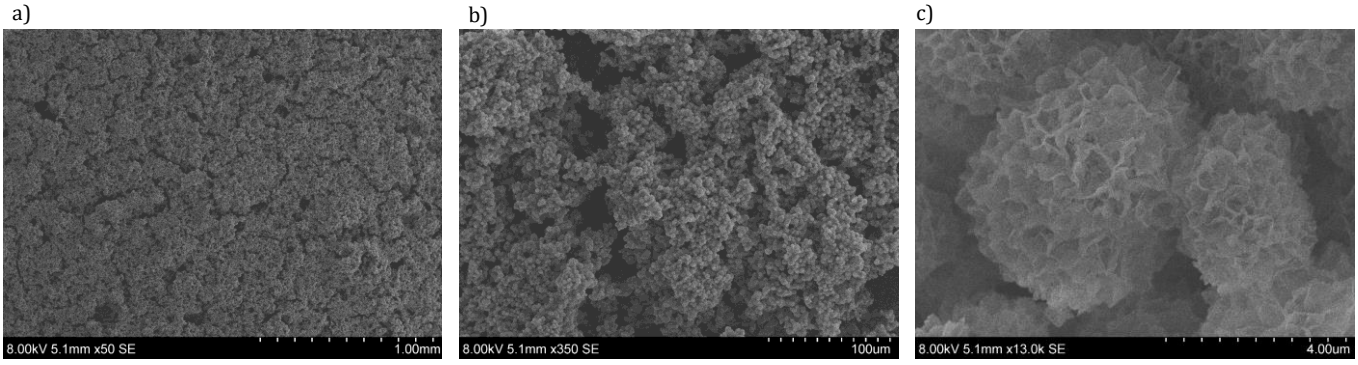


Figure SI 3: *SEM micrographs of the glass slide extracted from a flask after 2 days of precipitation with an initial ratio Ca/P = 0,3 showing the presence of hydroxyapatite at a) low magnification and b) and c) higher magnification*

IV. Immunolocalisation de la lustrine A dans la coquille larvaire de l'ormeau Européen *Haliotis tuberculata*

IV.1. Introduction

L'étude des protéines matricielles impliquées dans la formation de la coquille de l'ormeau a été initiée par des approches d'immunohistochimies utilisant des anticorps hétérologues (Jolly *et al.*, 2004 ; Gaume 2010). Ces travaux ont permis de localiser des protéines partageant des motifs communs avec la Lustrine A et aux MSI 31 et 60 dans le manteau de la larve et des adultes de *Haliotis tuberculata.* Plus récemment, l'expression temporelle du gène codant la lustrine A a été étudiée au cours du développement et a été mis en relation avec la formation des tablettes de nacre chez les juvéniles (Gaume et al, 2014). Ces travaux ont conduit à la mise au point de différentes sondes (immunologiques et moléculaires) qui permettent d'étudier la dynamique d'expression de ces protéines matricielles lors des étapes de mise en place de la coquille.

Dans le but de mieux comprendre les étapes précoces de la formation de la nacre, nous nous sommes focalisés dans ce chapitre sur la localisation de la Lustrine A, une protéine de structure identifiée dans la couche nacrée de l'ormeau *Haliotis rufescens* (Shen *et al.* 1997).Nous avons donc cherché, en couplant des techniques d'immunohistochimie et de MEB-BSE à préciser la localisation de cette protéine au sein de la coquille larvaire de l'ormeau en vue de mieux comprendre son rôle dans la formation coquillère.

IV.2. Méthodologie

IV.2.a. Prélèvement des larves et préparation des échantillons

Notre collaboration avec l'écloserie *France Haliotis* (Plouguerneau, Finistère) nous permet d'avoir accès à tous les stades larvaires de l'ormeau européen *Haliotis tuberculata* en conditions contrôlées. Les larves ont été prélevées en juillet 2015 et se sont développées dans une eau de mer à 19°C +/- 0,5°C dans des bassins de 350 L.

Les analyses ci-après ont été réalisées sur larves âgées de 24 hpf et de 48 hpf environ. A chaque prélèvement, un échantillon de larves a été observé à la loupe binoculaire afin de vérifier la qualité des larves et le stade de développement.

Les larves ont ensuite été filtrées sur des tamis de 40 µm puis immédiatement fixées. La solution de fixation utilisée, adapté aux organismes marins, a été préparée selon le protocole résumé dans le **Tableau 6**.

	Concentration (moles par litre)	**Osmolarité (mosmoles)**
Tampon Sörensen	0,09	200
Sucrose	0,6	600
Glutaraldéhyde	0,05	50
Paraformaldéhyde	0,22	220
Acide Picrique	0.02	10
NaCl	0.005	500
	Osmolarité finale : 1500 - 1600	

Tableau 6 : *Détails de la composition de la solution de fixation utilisée pour fixer chimiquement les larves d'ormeau. La solution finale a une osmolarité adaptée à la fixation des organismes marins, autour de 1500-1600 mosmoles*

La solution a été réalisée à partir de tampon Sörensen à 0.18M, un tampon adapté aux organismes marins constitué de sels de phosphate de sodium (Na_2HPO_4) avec un pH de 7,5. La solution a été préparée de telle sorte à avoir une osmolarité finale de 1500-1600 mosmoles pour une préservation maximale des tissus organiques. En effet, l'osmolarité du milieu interne des organismes marins est de 1100 mosmoles mais afin de compenser la perte d'eau par les tissus lors de la fixation, nous avons fixé les échantillons en légère hyper-osmolarité grâce à l'ajout de NaCl.

Aucune post-fixation à l'acide osmique n'a été réalisée sur les échantillons pour ne pas empêcher l'hybridation des anticorps lors de l'immunolocalisation.

A l'issue de la fixation, les échantillons ont été déshydratés par des bains successifs (2x30 minutes pour chaque bain, sous agitation) en concentration croissante d'alcool (30%, 50%, 70%, 90%, 100%).

Les échantillons ont ensuite été inclus en résine acrylique en vue de l'ultramicrotomie et de la microscopie photonique et électronique. La résine utilisée est la LR-White, adaptée pour l'immunolocalisation. Un premier bain d'imprégnation (50% alcool/50% résine pendant 1heure à température ambiante) puis un bain de substitution (100% résine 2x1h) ont été réalisés.

Des coupes semi-fines (0.5-1µm) ont été réalisées et déposées sur des lamelles de verre rondes adaptées aux porte-objets utilisés en microscopie électronique à balayage.

IV.2.b. Production d'un anticorps homologue anti-Lustrine A

La lustrine A présente un domaine riche en cystéines et un domaine riche en proline répétés huit fois chacun (***Figure* 77**).

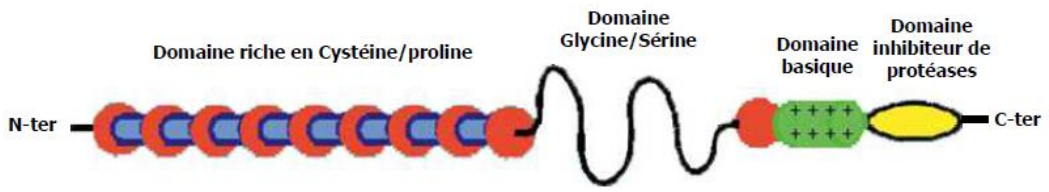


Figure 77 : *Structure moléculaire de la Lustrine A. Cette protéine matricielle a été identifié dans la couche nacrée de Haliotis rufescens (Shen et al., 1997)*

Il est suggéré que ce domaine serait un lien entre le minéral et les protéines et/ou la chitine au sein des feuillets interlamellaires (Smith *et al.*, 1999). L'épitope a été choisi dans le domaine basique, supposé être implique dans l'interaction avec des molécules polyanioniques tel que les ions carbonates (CO_3^{2-}). La 1ère séquence peptidique élaborée par Gaume. *et al.* (2010) à partir de

la séquence de la Lustrine A de *Haliotis rufescens* était composée de 13 acides aminés (LKQGRSGKRLQKP). Par la suite, l'obtention de la séquence partielle de la Lustrine A chez *Haliotis tuberculata* (Gaume, 2010) a permis de produire un anticorps spécifique contre la Lustrine d'*H. tuberculata*. Deux peptides de 16 acides aminés chacun ont été choisis pour le protocole d'immunisation : CYRGPKADRRSFRYWR et LKRGPSGKRIGKPGSC. L'immunolocalisation de la Lustrine A été réalisée par le biais d'un anticorps secondaire marqué complémentaire d'un anticorps primaire reconnaissant un épitope de la protéine d'intérêt Lustrine A, selon le schéma de la **Figure 78**.

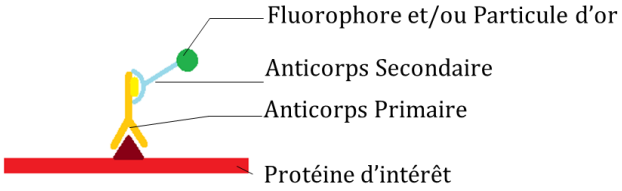


Figure 78 : *Représentation schématique du principe de l'immunolocalisation*

L'anticorps secondaire peut être couplé à un fluorochrome (visible en microscopie photonique) ou une particule d'or (détectable en microscopie électronique après activation des particules par des sels d'argent). Ici, nous avons utilisé dans un premier temps des anticorps secondaires couplés à un fluorochrome vert (longueur d'onde d'émission = 488 nm) pour vérifier en microscopie photonique la présence ou non d'un marquage spécifique.

Dans un deuxième temps nous avons utilisé des anticorps secondaires Fluoronanogold couplé à la fois à une particule d'or et à une particule fluorescente (longueur d'onde d'émission = 594 nm) permettant à l'échantillon d'être observé à la fois en microscopie à fluorescence et en microscopie électronique en vue de réaliser de la microscopie corrélative (Correlative Light and Electronic Microscopy, CLEM), technique qui sera décrite par la suite.

Afin de vérifier la validité du marquage un contrôle de la spécificité de l'anticorps secondaire a été systématiquement réalisé en parallèle. Pour cela les échantillons ont subi exactement les mêmes étapes à l'exception de l'incubation avec l'anticorps primaire anti-Lustrine A. Ainsi l'anticorps secondaire marqué étant complémentaire de l'anticorps primaire, l'absence de marquage spécifique chez le contrôle, montre que l'anticorps secondaire reconnait spécifiquement l'anticorps primaire et donc la protéine recherchée.

IV.2.c. Correlative Light and Electronic Microscopy

L'observation en fluorescence ou en microscopie électronique présente toutes le deux des avantages. En effet le microscope photonique en fluorescence permet d'avoir une vision globale de l'échantillon entier et l'observation en microscopie électronique nous permet d'avoir les détails ultra-structuraux en vue de préciser la localisation de la protéine d'intérêt.

Ainsi la combinaison de ces deux techniques dans le cadre de la Correlative Light and Electronic Microscopy (CLEM) est le moyen d'obtenir des images qualitatives de l'ensemble de notre échantillon. La CLEM consiste en la réalisation de superpositions précises d'images réalisées sur le même échantillon en microscopie photonique et électronique. Cette superposition est digitalisée par des logiciels spécialisés comme le logiciel *Icy*.

Dans notre cas, nous avons utilisé les anticorps fluoronanogold précédemment décrits pour réaliser un marquage visible en fluorescence et en microscopie électronique à balayage de la Lustrine A sur des coupes de larves. Nous avons ensuite superposé les clichés obtenus en fluorescence avec les clichés obtenus en microscopie électronique à balayage en vue d'obtenir une imagerie complète du marquage fluorescent mais avec les détails obtenus par la microscopie électronique.

La microcopie électronique à balayage a été réalisée en mode BSE (Back-Scattered Electrons). Ce mode de détection utilise les électrons rétrodiffusés qui sont les électrons résultants de l'interaction élastique des électrons du faisceau primaire avec les noyaux des atomes de

l'échantillon. Les électrons son réémis dans une direction proche de leur direction d'origine avec une faible perte d'énergie. Les électrons récupérés ont ainsi une énergie relativement élevée, allant jusque 30 keV, beaucoup plus importante que les électrons secondaires (impliqués dans le mode classique) permettant ainsi d'optimiser les observations.

De plus, ces électrons sont sensibles au numéro atomique des atomes constituant l'échantillon. Les atomes les plus lourds réémettront plus d'électrons que les atomes plus légers. Les zones formées d'atomes avec un nombre atomique élevé apparaîtront plus brillantes que d'autres, c'est le contraste de phase. Cette méthode permettra de mesurer l'homogénéité chimique d'un échantillon et permettra une analyse qualitative (Goldstein *et al.*, 2003).

L'instrument utilisé est le microscope électronique Hitachi SU 3500 qui permet une résolution de 10 nm.

IV.3. Résultats

IV.3.a. Localisation de Lustrine A dans les larves de 48h

- **Détection par immunofluorescence**

Afin d'avoir une vision globale de la localisation de la protéine Lustrine A au sein de la larve, nous avons réalisé une première étude par immunofluorescence.

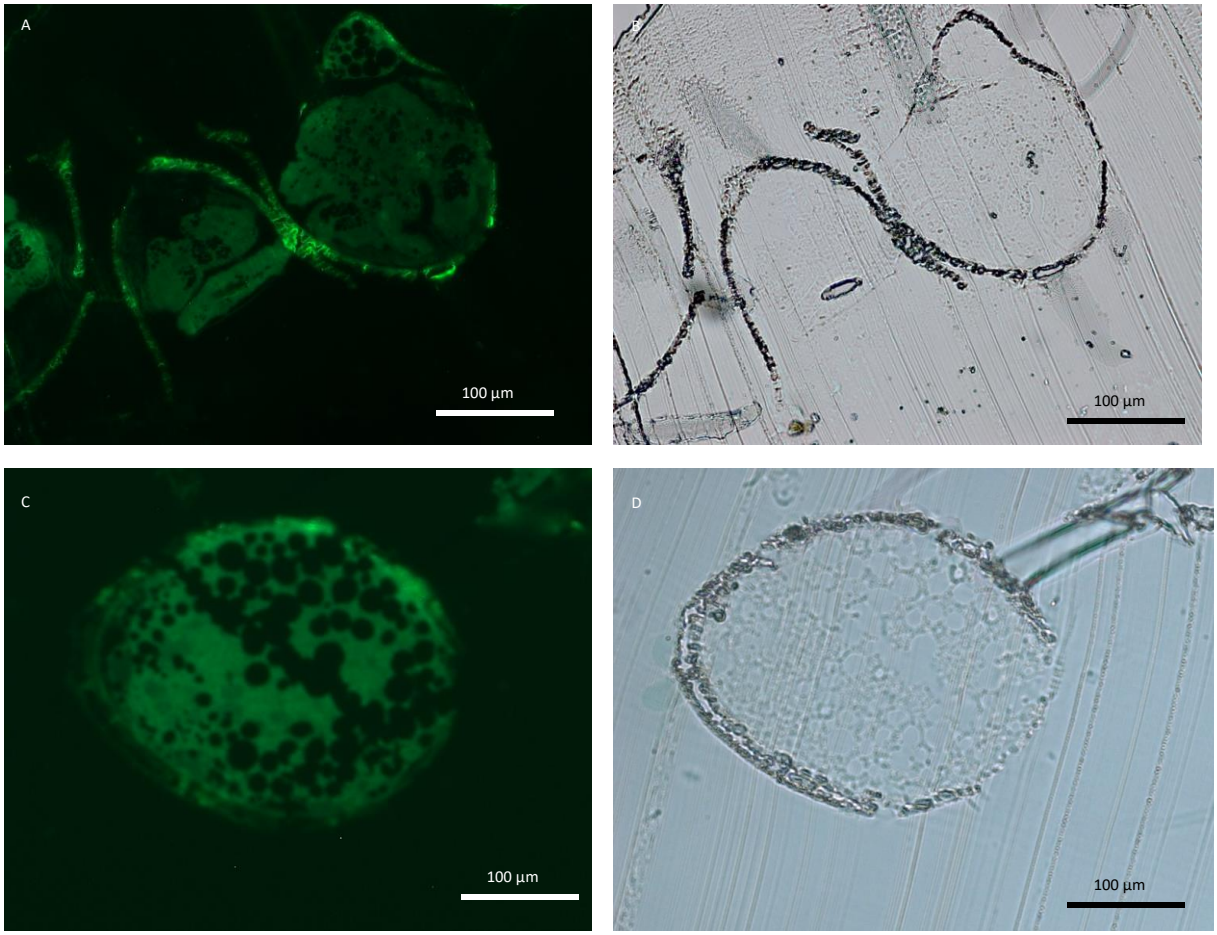


Figure 79 : *Cliché en microscopie photonique de coupes de larves âgées de 48hpf. A et B : Coupes de larves immunomarquées (Anticorps primaire anti-Lustrine A + Anticorps secondaire fluorescent), A cliché en mode fluorescence et B cliché en mode champ clair Bright-Field de la même zone ; C et D : contrôle négatif (Anticorps secondaire fluorescent seul), C cliché en fluorescence et D cliché en mode Bright-Field de la même zone.*

Les clichés A et B de la **Figure 79** montrent qu'il y a un marquage fluorescent spécifique au niveau de la coquille larvaire. L'agrandissement effectué sur une région de la coquille permet de voir que le marquage forme un liseré (***Figure* 80**).

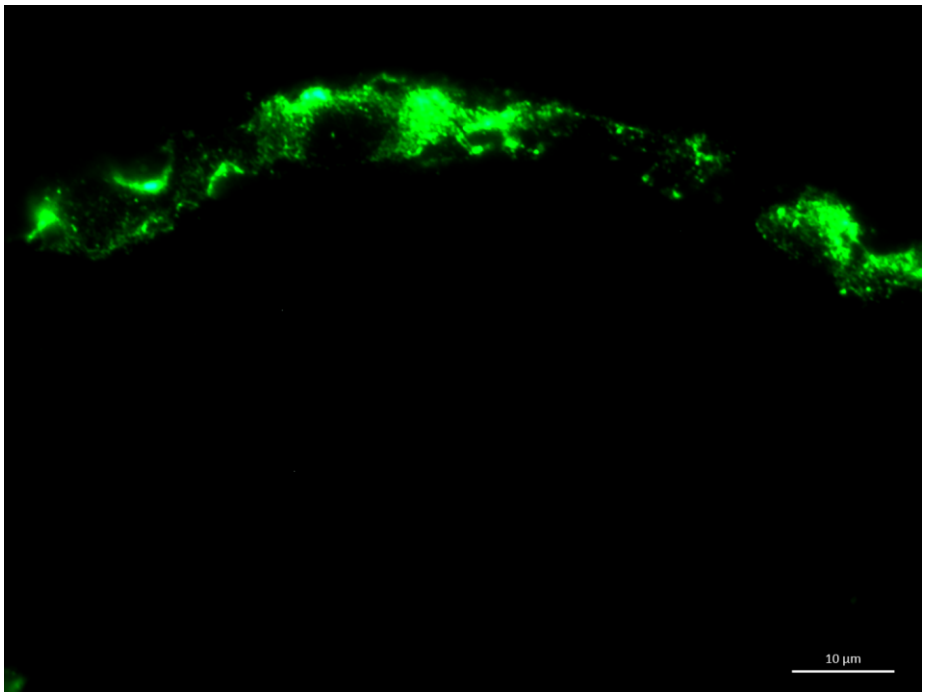


Figure 80 *: Cliché en microscopie photonique en mode fluorescence d'un sur la coquille d'une larve âgée de 48hpf immunomarquées (Anticorps primaire anti-Lustrine A + Anticorps secondaire fluorescent)*

Le contrôle négatif présenté sur la ***Figure* 79 C** montre un marquage homogène, de moindre intensité, et localisé au niveau des tissus mous et qui est probablement lié à l'auto-fluorescence des tissus. La coquille en revanche ne présente pas de marquage spécifique d'intensité supérieure au bruit de fond. Ainsi le marquage du cliché A spécifiquement localisé dans la coquille correspond bien à la reconnaissance spécifique de l'antigène par l'anticorps fluorescent.

- **Correlative light and Electronic Microscopy**

De manière à mieux localiser ce marquage, nous avons eu recours à la CLEM en superposant le cliché en fluorescence d'une larve entière du même âge que précédemment, avec le cliché en MEB-BSE de la même larve (***Figure* 81**).

L'image résultante permet de voir que le marquage est présent non seulement dans la coquille mais semble aussi être présent dans la région sous coquillère au sein du tissu.

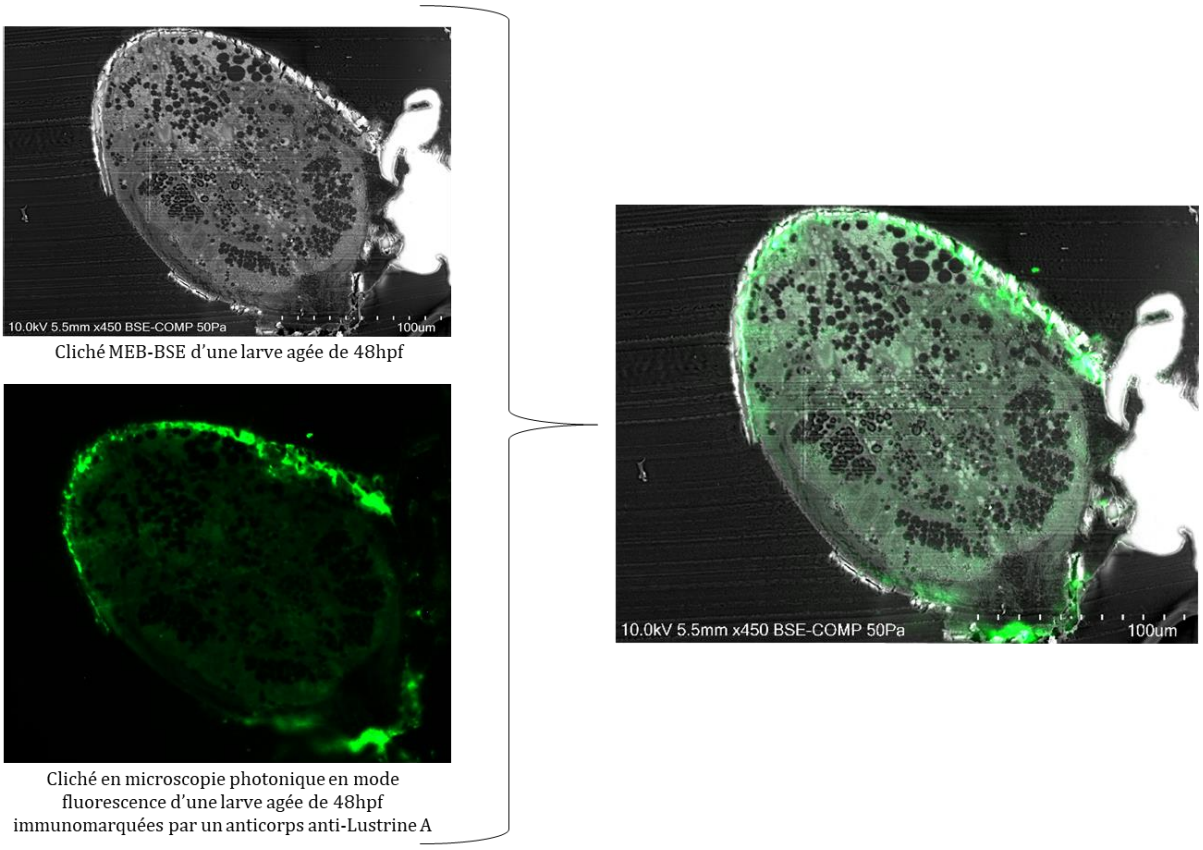


Figure 81 *: Correlative Light and Electronic Microscopy (CLEM) – Superposition de clichés MEB-BSE et Microscopie photonique à fluorescence de coupes de larves âgées de 48hpf*

IV.3.b. Localisation de la Lustrine A dans les larves de 72h

Afin de suivre l'évolution de l'expression de la Lustrine A au cours du développement post-embryonnaire de la larve de l'ormeau européen, nous avons réalisé la même expérience sur des larves plus âgées, environ 72 hpf, mais en utilisant des anticorps secondaires fluoronanogold couplés à la fois à une particule d'or et aussi à un fluorochrome. Nous obtenons ainsi deux marquage, l'un visible en microscopie photonique à fluorescence et l'autre en microscopie électronique.

Les clichés de CLEM résultants sont présentés sur la ***Figure* 82**. La superposition des clichés en fluorescence et en microscopie électronique à balayage permet de voir que le marquage anti-Lustrine A par le fluorochrome et les billes d'or, est localisé au niveau de la coquille. De plus, le marquage est présent au niveau de vésicules bien visibles dans la région de la coquille. Ces vésicules sphériques ont une taille moyenne d'environ 2 µm de diamètre.

Ces observations ont été réalisées sur plusieurs larves du même stade présentes sur la même coupe. Etonnamment ces vésicules de sécrétion semblent se trouver davantage dans la région externe de la coquille en contact avec le milieu extérieur.

Ces vésicules ont été observées uniquement à ce stade montrant sans doute le caractère ponctuel de sécrétion de la Lustrine A se faisant très certainement par séquences de sécrétion. La Lustrine A après sécrétion par les vésicules serait intégrée dans la coquille en jouant son rôle dans la biominéralisation.

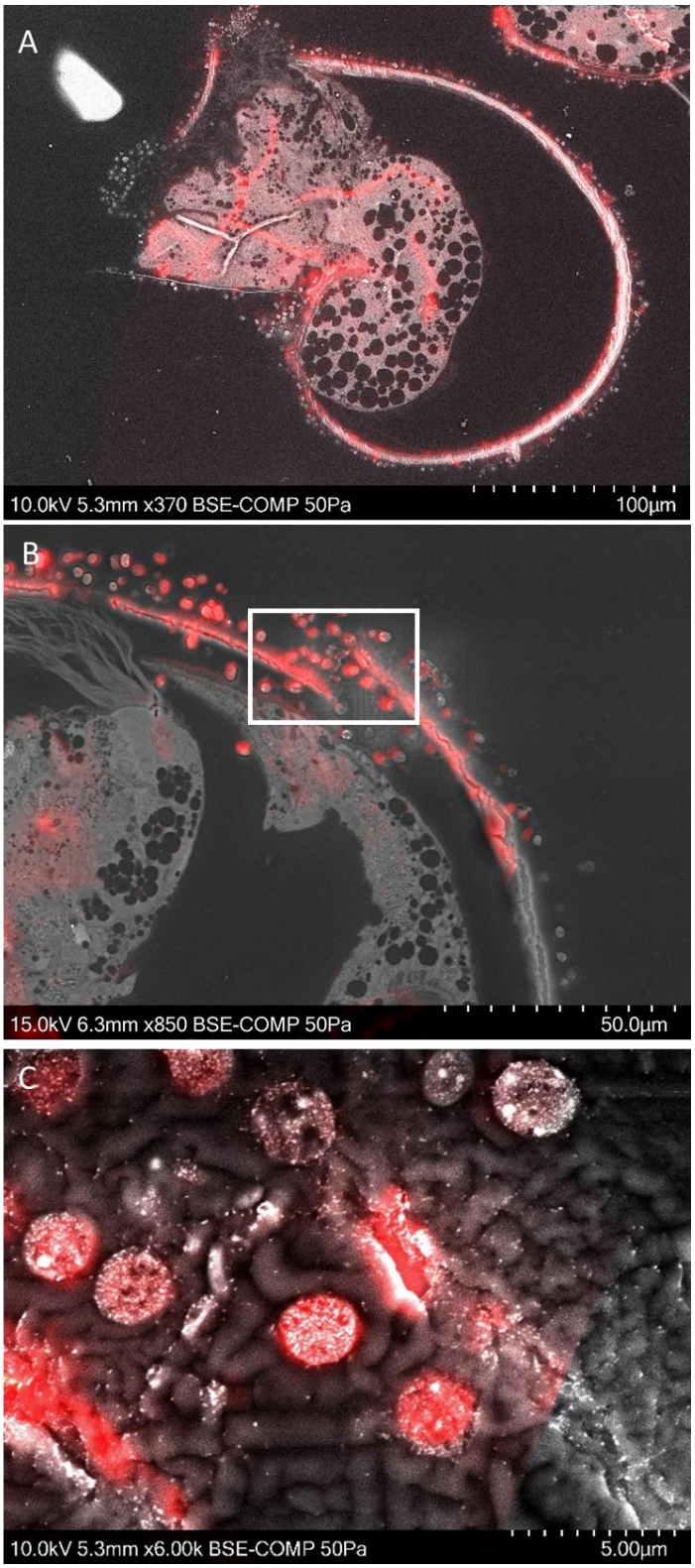


Figure 82 *: Correlative Light and Electronic Microscopy – Superposition de clichés MEB-BSE et Microscopie photonique à fluorescence de coupes de larves âgées de 72 hpf ; A) à faible grandissement, on voit un marquage fluorescent dans toute la coquille larvaire ; B) Plus fort grandissement d'une région montrant une discontinuité de la coquille et de vésicules marquées autour ; C) très fort grandissement montrant l'aspect des vésicules sphériques de taille environ égale à 2 µm marquées à la lustrine A par fluorescence et particules d'or*

IV.4. Discussion et conclusion

Les premiers résultats de cette analyse préliminaire par immunohistochimie de la Lustrine A ont permis de mettre en place des outils d'analyse et de détection immunohistochimique des protéines matricielles dans les tissus larvaires de *Haliotis tuberculata* . Cette étude prenant la suite des travaux réalisés par Gaume *et al.*, en 2010 a permis de vérifier la validité et la spécificité des anticorps homologues dirigés vers une séquence propre de la Lustrine A de *Haliotis tuberculata.*

Les observations ont montré que la Lustrine A était bien présente dès les jeunes stades larvaires. La détection d'un marquage spécifique à la fois dans le champ coquillier et au niveau du tissus sous-jacent, potentiellement au niveau du futur manteau, a permis de préciser la localisation de la Lustrine A. Cette localisation précise nous a été permise par l'utilisation de la microscopie corrélative qui permet d'avoir à la fois un marquage global apporté par la fluorescence alliée à la précision des détails ultrastructuraux apportés par la microscopie électronique.

Cette observation fait écho à celles réalisées par Gaume *et al.*, 2014 qui ont détecté l'expression génique de la Lustrine A dans différents stades et notamment dans le manteau de post-larves en développement (à partir de 7 jours de formation). La localisation de la protéine a ainsi permis d'aller plus loin que cette étude de l'expression génique et de voir que la Lustrine A est non seulement déjà synthétisée par les cellules des tissus sous-jacents mais est également déjà intégrée en partie dans la coquille larvaire.

La présence de la Lustrine A à la fois dans la coquille et dans les tissus larvaires suggère que cette protéine joue un rôle dans le développement précoce de la coquille chez *Haliotis tuberculata.* Cette protéine décrite comme étant une protéine matricielle de la nacre est appelée par Shen *et al.*, « molecular shock absorbing CaCO3-adhesive » car posséderait un rôle dans l'adhésion du carbonate de calcium et dans l'élasticité de la nacre. Son rôle dans la coquille larvaire est difficile

à entrevoir bien qu'il soit courant qu'une protéine peut jouer de rôles variable en fonction du stade où elle est exprimée.

Les observations en microscopie corrélative des larves âgées de 72hpf, ont permis de mettre en évidence la présence de vésicules contenant de la Lustrine A dans la région de la coquille. L'observation de vésicules contenant de la Lustrine A n'avait jamais été réalisée auparavant mais fait néanmoins écho aux travaux de Iwata qui décrit la présence de sphères qu'il nomme des "rounded organic bodies" ou des "organic spherules" d'un diamètre de 0,5 à 2µm localisées dans ou à la surface de la protoconque chez *Haliotis discus hannai* (Iwata, 1980). L'auteur décrit une augmentation de la taille de ces sphérules au fur et à mesure de la croissance (jusqu'à 2 µm) puis un dépôt de CaCO3 à l'intérieur des vésicules et enfin leur agrégation pour former la première couche minéralisée de la protoconque. En effet suite à l'observation de particules brillantes il interprète la présence de dépôts cristallins au sein de ces objets. Toutefois, aucune caractérisation microstructurale détaillée de ces sphérules n'a été réalisée.

Afin de déterminer la nature et le rôle des vésicules observées chez les larves de *Haliotis tuberculata*, il serait intéressant d'analyser la composition chimique de ces vésicules contenant la Lustrine A en vue de détecter la présence ou non de précurseur minéraux.

Il est toutefois étonnant de noter que cette présence de vésicule ne soit pas systématique malgré l'étude à d'autres stades. Ceci peut être peut-être la conséquence d'une sécrétion discontinue de la Lustrine A au stade larvaire, avec des épisodes brefs de sécrétion de vésicules. La visualisation de ces vésicules peut aussi être fortement dépendante du plan de coupe des larves lors de la préparation des coupes fines, rendant difficile leur observation.

Cette étude préliminaire a ainsi pu poser les bases pour de futures investigations qui viendraient compléter ces premières observations. En effet, il est nécessaire de reproduire ces expériences d'immunolocalisation en vue de vérifier la présence de ces vésicules contenant la Lustrine A, notamment à d'autres stades de développement. De plus une analyse chimique fine,

par EDX ou EELS par exemple, de ces vésicules serait un excellent moyen de détecter la présence éventuelle de carbonate de calcium au sein de ces vésicules. Une telle observation apporterait un œil nouveau à la compréhension des mécanismes de formation de la coquille pour lesquels il n'est toujours pas établi si des vésicules de sécrétion contenant du carbonate de calcium (amorphe ou non) interviennent lors de l'ontogénèse coquillière.

V. Conclusion du chapitre

Ce chapitre dédié à l'étude de la coquille larvaire chez *Haliotis tuberculata* a permis d'apporter de nouvelles connaissances sur la composition minérale de la coquille larvaire mais aussi concernant le contrôle biologique qui a lieu aux premiers stades de développement.

Ces différents travaux ont permis de mettre en place de nouveaux outils méthodologiques adaptés à un matériel non conventionnel, pour la caractérisation structurale par RMN et la localisation immunohistochimique des protéines dans la larve en croissance. Dans un premier temps la méthode d'enrichissement de la coquille larvaire que nous avons développée, nécessaire à l'étude fine de la coquille larvaire par RMN du solide, ouvre de nombreuses perspectives pour affiner son étude. Nous avons pu grâce à cet outil caractériser en détail la composition de la coquille de larves âgées de 72 hpf qui montre une organisation cristalline déjà très mature ressemblant à l'échelle atomique à ce qui a été observé dans la nacre de la coquille juvénile et adulte. Cependant les signaux présentent une bien plus grande largeur de raie et une plus grande distribution de déplacements chimiques signant la présence d'un plus grand désordre au niveau de la phase minérale, indiquant probablement un moindre degré de cristallinité du carbonate de calcium de la coquille larvaire. Ces travaux montrent que l'organisation cristalline à l'échelle d'une tablette de la nacre est déjà présente au sein des cristaux de la coquille larvaire bien qu'il n'y ait pas encore de tablettes de nacre formée à ces jeunes stades.

L'étude par RMN a également révélé la présence de phases de phosphate de calcium sous forme de phosphate de calcium amorphe (ACP) en forte proximité avec les carbonates de la coquille larvaire. Cette observation semble être confirmée par des analyses EDX effectuée sur la coquille larvaire à plusieurs stades montrant la présence d'un signal phosphore co-localisé avec celui du calcium semblant confirmer la présence de phosphate de calcium. La présence de cette phase mixte de carbonate/phosphate de calcium fait écho à des observations réalisées dans d'autres phyla (crustacés, protistes, brachiopodes) suggérant la possibilité d'un précurseur

minéral commun entre les espèces à base de carbonate et de phosphate de calcium. Afin de confirmer cette hypothèse, il serait intéressant de poursuivre cette étude sur d'autres espèces (coraux, échinodermes…) afin de voir si la présence d'ACP associé au carbonate de calcium est détectée.

Enfin, le développement de la technique de microscopie corrélative couplant les techniques d'immunohistochimie et la microscopie électronique a permis de confirmer la localisation d'une protéine de la nacre, la Lustrine A, dans les stades précoces du développement larvaire. Ces travaux confirment l'implication de la Lustrine A dans la mise en place des biocristaux d'aragonite, bien avant la mise en place des tablettes de nacre qui débute aux alentours de 2 mois. Ces techniques innovantes de microscopie corrélative pourront être adaptées à la localisation d'autres protéines matricielles en vue de préciser le contrôle biologique de la formation de la coquille larvaire.

Bien que préliminaires, ces premiers résultats offrent tout de même de nouvelles perspectives d'étude de la dynamique de synthèse de la Lustrine A pour la compréhension de son rôle dans l'ontogénèse chez Haliotis tuberculata. Pour aller plus loin, il serait intéressant de développer d'autres méthodologies notamment par le biais de synthèse *in vitro* en présence ou non de Lustrine A en vue de comprendre son rôle potentiel dans la nucléation et l'évolution des phases minérales de carbonate et de phosphate de calcium.

Conclusion générale et perspectives

L'étude entreprise pendant ces trois années de thèse a eu la volonté de préciser d'avantage le savoir autour de la coquille de l'ormeau Européen *Haliotis tuberculata* en vue de mieux comprendre son ultrastructure et ses mécanismes de formation. Cette étude permet ainsi d'apporter un nouveau regard sur les processus de biominéralisation des mollusques de manière générale.

Lors de cette étude, nous avons axé nos recherches dans trois directions : la **description structurale et la composition** de la phase minérale de la coquille adulte, **l'interface organo-minérale et le contrôle biologique** de la biominéralisation et enfin la compréhension des **mécanismes de formation** de la coquille adulte et larvaire.

- Dans un premier temps nous avons réalisé une **étude ultrastructurale de la phase minérale** de la coquille adulte dans son ensemble en allant de l'échelle micrométrique à l'échelle atomique afin d'explorer finement l'organisation et la composition de ce matériau biologique grâce à l'utilisation de techniques d'observation et d'analyse à haute résolution. Nous avons ainsi réalisé une l'étude de la phase minérale dans la nacre en général puis en nous focalisant sur les environnements minéraux désordonnés en particulier à la surface des tablettes d'aragonite. Nous avons proposé un modèle original de structuration de la couche de surface des tablettes qui semble être organisée sous forme d'un gradient de désordre, d'hydratation et de protonation.

- Dans un deuxième temps nous nous sommes intéressé à l'**interface organo-minérale** à la fois dans la nacre mature mais également dans la coquille larvaire. Dans la nacre, nous nous sommes focalisé sur deux zones, la région centrale de l'empilement des tablettes d'aragonite de la nacre et le bord latéral en croissance. Cette étude semble mettre en évidence une forte implication de composants organiques au niveau de centres de nucléation centraux qui permettrait la nucléation des tablettes empilées et orienterait la croissance en colonne de la nacre de l'ormeau en formant un axe central traversant tout l'empilement. De plus le bord des tablettes d'aragonite semble être en contact avec une couche de composants organiques en présence de calcium et de

phosphore laissant entrevoir la possibilité d'une présence de protéines phosphorylées et de calcium libre impliqués en interaction avec la fraction minérale en croissance. Dans la coquille larvaire la présence d'une protéine matricielle de la nacre, la Lustrine A, a été détectée dans le champ coquillier et dans le tissus sous-jacent en forte interaction avec la phase minérale. L'observation de vésicules contenant cette protéine permet d'appréhender les mécanismes par lesquels l'animal sécrète les composants organiques de sa coquille.

- Enfin dans un troisième temps nous nous sommes intéressés aux **processus de formation de la coquille**. Pour cela, nous avons réalisé des observations fines de la région stratégique de la zone de croissance de la coquille adulte. Nous avons pu apporter une vision globale de l'organisation de cette région permettant de mieux comprendre les mécanismes de formation de la coquille chez *Haliotis tuberculata*. Nous avons ainsi proposé un modèle novateur permettant de comprendre la mise en place de la nacre à la jonction entre la couche sphérulitique et la couche nacrée. En parallèle, nous avons cherché étudier les mécanismes de la biominéralisation chez *Haliotis tuberculata* en analysant la coquille larvaire à différents stades de développement. Pour cela, nous avons réalisé une étude de la composition chimique de la coquille larvaire permettant de montrer qu'aux très jeunes stades de développement, la coquille était déjà minéralisée et présentait une organisation cristalline bien définie similaire à celle observée dans la nacre mature mais avec un degré de désordre bien supérieur. Nous avons également pu mettre en évidence la présence de phosphate de calcium amorphe dans la coquille larvaire, de composition et de structure équivalentes au précurseur d'une phase apatite. La présence de ce phosphate de calcium amorphe dans une coquille carbonatée suggère une connexion phylogénétique entre les vertébrés à l'endosquelette de phosphate de calcium et les espèces présentant un exosquelette de carbonate de calcium.

L'ensemble de ces résultats a permis d'apporter un nouveau regard sur la biominéralisation de la coquille de *Haliotis tuberculata* permettant d'alimenter certaines théories développées par

la communauté scientifique du domaine. Quatre aspects de ces travaux peuvent être cités en particulier.

Tout d'abord l'apport de l'étude de l'axe central de la colonne de tablettes de la nacre permettant d'appuyer la théorie d'une croissance initiée au centre grâce à des centres de nucléation centraux uniques alignés verticalement dans la nacre en colonne des gastéropodes.

D'autre part, l'observation d'une couche organique et non d'une couche de minéral amorphe à la surface des bords latéraux des tablettes de croissance suggère que la croissance de la nacre ne s'opère pas par l'intermédiaire d'ACC mais serait plutôt permise par des mécanismes d'épitaxie avec un fort contrôle de la fraction organique. Ces composants organiques seraient potentiellement impliqués dans la mise à disposition des ions minéraux et ainsi dans l'orientation de la phase minérale en croissance. Ainsi la présence d'une couche amorphe résiduelle à la surface des tablettes de nacre mature ne serait pas liée à la présence d'un précurseur de carbonate de calcium amorphe mais seulement une couche résiduelle de minéral qui n'aurait pu cristalliser du fait d'une présence trop importante de composants organiques en son sein.

De plus, nos résultats obtenus sur la coquille larvaire ne semblent pas montrer la présence d'ACC usuel aux jeunes stades de développement comme il a pu être observé chez d'autres espèces de mollusques (Hasse *et al.*, 2000 ; Marxen *et al.*, 2003 ; Weiss *et al.*, 2002). Les techniques utilisées dans le cadre de ces études (diffraction des rayons X, Spectrométrie IR et Raman et Microscopie électronique à balayage) ne permettent peut-être pas de caractériser aussi finement l'organisation à l'échelle atomique que la RMN du solide.

Enfin, la détection d'un précurseur de l'hydroxyapatite (ACP), dans la coquille carbonatée de l'ormeau vient bousculer la vision classique de mécanismes distincts de biominéralisation entre vertébrés et non-vertébrés. Ainsi nos travaux posent l'hypothèse d'un précurseur commun mixte calcium/carbonate/phosphate à l'origine des phases de carbonate/phosphate de calcium dont l'évolution vers tel ou tel système se ferait sous l'action du contrôle biologique. La

biominéralisation en phosphate de calcium de l'exosquelette des Brachiopodes marquerait une sorte de transition entre ces deux systèmes.

Néanmoins, si ces différents résultats permettent de préciser d'avantage les connaissances autour de la nacre et plus généralement de la coquille des mollusques, ils posent encore de nombreuses questions sur les mécanismes de la morphogenèse coquillière et les interactions entre phase organique et minérale, notamment durant les phases précoces du développement.

Pour clarifier ces mécanismes il faudrait dans un premier temps réaliser une étude plus complète des différents stades de développement en utilisant la méthodologie et les outils mis en place que ce soit en RMN mais aussi en immunolocalisation afin de réaliser une véritable étude temporelle de la biominéralisation et de son contrôle biologique lors du développement larvaire.

De plus, il serait intéressant de modéliser l'organisation de la couche amorphe des tablettes d'aragonite de la nacre en vue de préciser encore plus finement les interactions potentielles entre ses différents composants.

La sélection du polymorphe aragonitique de la nacre est un aspect qui n'est toujours pas compris. L'étude du rôle du phosphore dans la biominéralisation de la coquille carbonatée des mollusques par le biais de synthèses *in vitro* de phases de carbone de calcium en présence ou non de phosphore apporte des éléments de réponse à la compréhension de l'évolution d'un système ternaire Carbonate/Phosphate/Calcium en montrant que le système avait tendance à évoluer vers un système calcitique. Il serait intéressant de compléter ces études *in vitro* en ajoutant en plus de ces précurseurs minéraux des composants organiques. Dans le cadre d'une étude préliminaire, nous avons cherché à ajouter de la chitine dans le système. Il serait intéressant d'approfondir cet aspect en ajoutant dans un deuxième temps des extraits de protéines de type Lustrine A afin d'observer la phase minérale résultante.

Enfin, une approche comparative de la formation de la nacre chez différentes espèces de mollusques (Céphalopodes Bivalves, Gastéropodes) permettrait de préciser les mécanismes ayant conduit à l'évolution indépendante de la microstructure nacrée au sein de ces différents groupes.

Références bibliographiques

A

Achal, V.; Mukherjee, A.; Kumari, D.; Zhang, Q. Biomineralization for Sustainable Construction – A Review of Processes and Applications. *Earth-Science Reviews* **2015**, *148*, 1–17.

Addadi, L.; Moradian, J.; Shay, E.; Maroudas, N. G.; Weiner, S. A Chemical Model for the Cooperation of Sulfates and Carboxylates in Calcite Crystal Nucleation: Relevance to Biomineralization. *PNAS* **1987**, *84* (9), 2732–2736.

Addadi, L.; Weiner, S. Biomineralization: A Pavement of Pearl. *Nature* **1997**, *389* (6654), 912.

Addadi, L.; Joester, D.; Nudelman, F.; Weiner, S. Mollusk Shell Formation: A Source of New Concepts for Understanding Biomineralization Processes. *Chemistry–A European Journal* **2006**, *12* (4), 980–987.

Addadi, L.; Raz, S.; Weiner, S. Taking Advantage of Disorder: Amorphous Calcium Carbonate and Its Roles in Biomineralization. *Advanced Materials* **2003**, *15* (12), 959–970.

Ajili, W.; Auzoux-Bordenave, S.; Azaïs, T.; Nassif, N. Intermixed Calcium Carbonate Phosphate Phase in the Early Stages of Haliotis Tuberculata Biomineralization Shell as Suspect for a Common Mineral Precursor during Evolution. To be submitted. 2018c.

Ajili, W.; Laurent, G.; Menguy, N.; Benzerara, K.; De Frutos, M.; Gajan, D.; Lesage, A.; Auzoux-Bordenave, S.; Nassif, N.; Azaïs, T. Towards a Better Understanding of the Organo-Mineral Interface in Growing Abalone Nacre. To be submitted. 2018b.

Ajili, W.; Nassif, N.; Auzoux-Bordenave, S.; Menguy, N.; Gansmuller, A.; Huchette, S.; Laurent, G. Heterogeneities within the Disordered Mineral Layer of Aragonite Platelets in Abalone Nacre. Submitted to. 2018a.

Akiva-Tal, A.; Kababya, S.; Balazs, Y. S.; Glazer, L.; Berman, A.; Sagi, A.; Schmidt, A. In Situ Molecular NMR Picture of Bioavailable Calcium Stabilized as Amorphous CaCO3 Biomineral in Crayfish Gastroliths. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2011**.

Al-Sawalmih, A.; Li, C.; Siegel, S.; Fratzl, P.; Paris, O. On the Stability of Amorphous Minerals in Lobster Cuticle. *Advanced materials* **2009**, *21* (40), 4011–4015.

Alberic, M.; Caspi, E. N.; Bennet, M.; Ajili, W.; Nassif, N.; Azaïs, T.; Berner, A.; Fratzl, P.; Zolotoyabko, E.; Bertinetti, L. Interplay between Calcite, Amorphous Calcium Carbonate, and Intracrystalline Organics in Sea Urchin Skeletal Elements. *Crystal Growth & Design* **2018**, *18* (4), 2189–2201.

Almeida, M. J.; Pereira, L.; Milet, C.; Haigle, J.; Barbosa, M.; Lopez, E. Comparative Effects of Nacre Water-Soluble Matrix and Dexamethasone on the Alkaline Phosphatase Activity of MRC-5 Fibroblasts. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials* **2001**, *57* (2), 306–312.

Alverson, A. J. Timing marine–freshwater transitions in the diatom order Thalassiosirales. *Paleobiology* **2014**, *40* (1), 91–101.

Ansenne, A.; Compère, P.; Goffinet, G. *Ultrastructural Organization and Chemical Composition of the Mineralized Cuticle of Glomeris Marginata (Myriapoda, Diplopoda)*; Brill Academic Publishers, 1990.

Atlan, G.; Balmain, N.; Berland, S.; Vidal, B.; Lopez, É. Reconstruction of Human Maxillary Defects with Nacre Powder: Histological Evidence for Bone Regeneration. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie* **1997**, *320* (3), 253–258.

Auzoux-Bordenave, S.; Badou, A.; Gaume, B.; Berland, S.; Helléouet, M.-N.; Milet, C.; Huchette, S. Ultrastructure, Chemistry and Mineralogy of the Growing Shell of the European Abalone Haliotis Tuberculata. *Journal of Structural biology* **2010**, *171* (3), 277–290.

B

Barnes, D. J. Coral Skeletons: An Explanation of Their Growth and Structure. *Science* **1970**, *170* (3964), 1305–1308.

Bazin, D.; Letavernier, E.; Haymann, J.-P. Biomineralization versus Microcrystalline Pathologies: Beauty and the Beast. *Comptes Rendus Chimie* **2016**, *19* (11), 1395–1403.

Becker, A.; Becker, W.; Marxen, J. C.; Epple, M. In-Vitro Crystallization of Calcium Carbonate in the Presence of Biological Additives — Comparison of the Ammonium Carbonate Method with Double-Diffusion Techniques. *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie* **2003**, *629* (12–13), 2305–2311.

Belamie, E.; Davidson, P.; Giraud-Guille, M. M. Structure and Chirality of the Nematic Phase in α-Chitin Suspensions. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108* (39), 14991–15000.

Belcher, A. M.; Wu, X. H.; Christensen, R. J.; Hansma, P. K.; Stucky, G. D.; Morse, D. E. Control of Crystal Phase Switching and Orientation by Soluble Mollusc-Shell Proteins. *Nature* **1996**, *381* (6577), 56.

Belkhou, R.; Stanescu, S.; Swaraj, S.; Besson, A.; Ledoux, M.; Hajlaoui, M.; Dalle, D. HERMES: A Soft X-Ray Beamline Dedicated to X-Ray Microscopy. *Journal of synchrotron radiation* **2015**, *22* (4), 968–979.

Ben Shir, I.; Kababya, S.; Katz, I.; Pokroy, B.; Schmidt, A. Exposed and Buried Biomineral Interfaces in the Aragonitic Shell of Perna Canaliculus Revealed by Solid-State NMR. *Chemistry of Materials* **2013**, *25* (22), 4595–4602.

Beniash, E.; Aizenberg, J.; Addadi, L.; Weiner, S. Amorphous Calcium Carbonate Transforms into Calcite during Sea Urchin Larval Spicule Growth. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **1997**, *264* (1380), 461–465.

Benzerara, K.; Yoon, T. H.; Tyliszczak, T.; Constantz, B.; Spormann, A. M.; Brown Jr, G. E. Scanning Transmission X-Ray Microscopy Study of Microbial Calcification. *Geobiology* **2004**, *2* (4), 249–259.

Bernet, K. H.; Eberli, G. P.; Gilli, A. Turbidite Frequency and Composition in the Distal Part of the Bahamas Transect. *Proceedings fo the Ocean Drilling Program: Scientific Results* **2000**, *166*, 45–60.

Bers, A. V.; Prendergast, G. S.; Zürn, C. M.; Hansson, L.; Head, R. M.; Thomason, J. C. A Comparative Study of the Anti-Settlement Properties of Mytilid Shells. *Biology Letters* **2006**, *2* (1), 88–91.

Bevelander, G. *Abalone: Gross and Fine Structure*; Boxwood Press Pacific Grove, CA, 1988.

Bevelander, G.; Benzer, P. Calcification in Marine Molluscs. *The Biological Bulletin* **1948**, *94* (3

Bevelander, G.; Nakahara, H. An Electron Microscope Study of the Formation of the Nacreous Layer in the Shell of Certain Bivalve Molluscs. *Calcified tissue research* **1969**, *3* (1), 84–92.

Bezares, J.; Asaro, R. J.; Hawley, M. Macromolecular Structure of the Organic Framework of Nacre in Haliotis Rufescens: Implications for Growth and Mechanical Behavior. *Journal of structural biology* **2008**, *163* (1), 61–75.

Bielefeld, U.; Zierold, K.; Körtje, K. H.; Becker, W. Calcium Localization in the Shell-Forming Tissue of the Freshwater Snail, Biomphalaria Glabrata: A Comparative Study of Various Methods for Localizing Calcium. *The Histochemical Journal* **1992**, *24* (12), 927–938.

Blank, S.; Arnoldi, M.; Khoshnavaz, S.; Treccani, L.; Kuntz, M.; Mann, K.; Grathwohl, G.; Fritz, M. The Nacre Protein Perlucin Nucleates Growth of Calcium Carbonate Crystals. *Journal of microscopy* **2003**, *212* (3), 280–291.

Blasco, J.; Puppo, J.; Sarasquete, M. C. Acid and Alkaline Phosphatase Activities in the Clam Ruditapes Philippinarum. *Marine Biology* **1993**, *115* (1), 113–118.

Borbas, J. E.; Wheeler, A. P.; Sikes, C. S. Molluscan Shell Matrix Phosphoproteins: Correlation of Degree of Phosphorylation to Shell Mineral Microstructure and to in Vitro Regulation of Mineralization. *Journal of Experimental Zoology* **1991**, *258* (1), 1–13.

Boßelmann, F.; Romano, P.; Fabritius, H.; Raabe, D.; Epple, M. The Composition of the Exoskeleton of Two Crustacea: The American Lobster Homarus Americanus and the Edible Crab Cancer Pagurus. *Thermochimica Acta* **2007**, *463* (1), 65–68.

Bouligand, Y. Twisted Fibrous Arrangements in Biological Materials and Cholesteric Mesophases. *Tissue and Cell* **1972**, *4* (2), 189–217.

Brečević, L.; Füredi-Milhofer, H. Precipitation of Calcium Phosphates from Electrolyte Solutions. *Calcified tissue research* **1972**, *10* (1), 82–90.

Brečević, L.; Nielsen, A. E. Solubility of Amorphous Calcium Carbonate. *Journal of Crystal Growth* **1989**, *98* (3), 504–510.

Brown, W. E.; Chow, L. C. Chemical Properties of Bone Mineral. *Annual Review of Materials Science* **1976**, *6* (1), 213–236.

C

Campbell, J. W.; JUN, K. S. Ammonia and Biological Deposition of Calcium Carbonate. *Nature* **1969**, *224* (5220), 725.

Carpenter. Report on the Microscopic Structure of Shells. Part II. Rep. Br. Assoc. Adv. Sci. 17 th Meeting, 93–134. 1848.

Carriker, M. R.; Palmer, R. E. A New Mineralized Layer in the Hinge of the Oyster. *Science* **1979**, *206* (4419), 691–693.

Carter, J. G.; Clark, G. R. Classification and Phylogenetic Significance of Molluscan Shell Microstructure. *Studies in Geology, Notes for a Short Course* **1985**, *13*, 50–71.

Cartwright, J. H.; Checa, A. G.; Gale, J. D.; Gebauer, D.; Sainz-Díaz, C. I. Calcium Carbonate Polyamorphism and Its Role in Biomineralization: How Many Amorphous Calcium Carbonates Are There? *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51* (48), 11960–11970.

Castilho, F.; Machado, J.; Reis, M. L.; Sa, C. Ultrastructural Study of the Embryonic and Larval Shell of Anodonta Cygnea. *Canadian journal of zoology* **1989**, *67* (7), 1659–1664.

Celerin, M.; Ray, J. M.; Schisler, N. J.; Day, A. W.; Stetler-Stevenson, W. G.; Laudenbach, D. E. Fungal Fimbriae Are Composed of Collagen. *The EMBO Journal* **1996**, *15* (17), 4445–4453.

Checa, A. G.; Cartwright, J. H.; Willinger, M.-G. Mineral Bridges in Nacre. *Journal of structural biology* **2011**, *176* (3), 330–339.

Checa, A. G.; Okamoto, T.; Ramírez, J. Organization Pattern of Nacre in Pteriidae (Bivalvia: Mollusca) Explained by Crystal Competition. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **2006**, *273* (1592), 1329–1337.

Checa, A. G.; Rodríguez-Navarro, A. Geometrical and Crystallographic Constraints Determine the Self-Organization of Shell Microstructures in Unionidae (Bivalvia: Mollusca). *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **2001**, *268* (1468), 771–778.

Clarkson, J. R.; Price, T. J.; Adams, C. J. Role of Metastable Phases in the Spontaneous Precipitation of Calcium Carbonate. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* **1992**, *88* (2), 243–249.

Coimbra, J.; Machado, J.; Fernandes, P. L.; Ferreira, H. G.; Ferreira, K. G. Electrophysiology of the Mantle of Anodonta Cygnea. *Journal of experimental biology* **1988**, *140* (1), 65–88.

Collin, R.; Voltzow, J. Initiation, Calcification, and Form of Larval "Archaeogastropod" Shells. *Journal of morphology* **1998**, *235* (1), 77–89.

Cosmidis, J.; Benzerara, K. Soft X-Ray Scanning Transmission Spectromicroscopy. *Biomineralization Sourcebook: characterization of biominerals and biomimetic materials* **2014**, 115–133.

Cosmidis, J.; Benzerara, K.; Nassif, N.; Tyliszczak, T.; Bourdelle, F. Characterization of Ca-Phosphate Biological Materials by Scanning Transmission x-Ray Microscopy (STXM) at the Ca L 2, 3-, PL 2, 3-and C K-Edges. *Acta biomaterialia* **2015**, *12*, 260–269.

Crane, N. J.; Popescu, V.; Morris, M. D.; Steenhuis, P.; Ignelzi Jr, M. A. Raman Spectroscopic Evidence for Octacalcium Phosphate and Other Transient Mineral Species Deposited during Intramembranous Mineralization. *Bone* **2006**, *39* (3), 434–442.

Crenshaw, M. A. The Histochemical Localization of Reactive Groups in Septal Nacre from Nautilus Pompilius L. *The mechanisms of mineralization in the invertebrates and plants* **1976**, 355–367.

Crenshaw, M. A.; Neff, J. M. Decalcification at the Mantle-Shell Interface in Molluscs. *American Zoologist* **1969**, *9* (3), 881–885.

Crenshaw, M. A.; Neff, J. M. Decalcification at the Mantle-Shell Interface in Molluscs. *American Zoologist* **1969**, *9* (3), 881–885.

Crofts, D. Haliotis. *LMBC Memoirs* **1929**, *29*, 1–174.

Crofts, D. R. V-The Development of Haliotis Tuberculata, with Special Reference to Organogenesis during Torsion. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **1937**, *228* (552), 219–268.

Cuif, J. P.; Dauphin, Y.; Denis, A.; Gaspard, D.; Keller, J. P. Etude Des Caractéristiques de La Phase Minérale Dans Les Structures Prismatiques Du Test de Quelques Mollusques. *Bull. Mus. Natl. Hist. Nat* **1983**, *5*, 679–717.

Currey, J. D. Mechanical Properties of Mother of Pearl in Tension. *Proc. R. Soc. Lond. B* **1977**, *196* (1125), 443–463.

D

Degens, E. T. Molecular Mechanisms on Carbonate, Phosphate, and Silica Deposition in the Living Cell. In *Topics in current chemistry*; Springer, 1976; pp 1–112.

Deville, S.; Saiz, E.; Nalla, R. K.; Tomsia, A. P. Freezing as a Path to Build Complex Composites. *Science* **2006**, *311* (5760), 515–518.

DeVol, R. T.; Sun, C.-Y.; Marcus, M. A.; Coppersmith, S. N.; Myneni, S. C. B.; Gilbert, P. U. P. A. Nanoscale Transforming Mineral Phases in Fresh Nacre. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (41), 13325–13333.

Dillaman, R.; Hequembourg, S.; Gay, M. Early Pattern of Calcification in the Dorsal Carapace of the Blue Crab, Callinectes Sapidus. *Journal of Morphology* **2005**, *263* (3), 356–374.

Dimasi, E.; Sarikaya, M. Synchrotron X-Ray Microbeam Diffraction from Abalone Shell. *Journal of Materials Research* **2004**, *19* (5), 1471–1476.

Drake, J. L.; Mass, T.; Haramaty, L.; Zelzion, E.; Bhattacharya, D.; Falkowski, P. G. Proteomic Analysis of Skeletal Organic Matrix from the Stony Coral Stylophora Pistillata. *PNAS* **2013**, 201301419.

Duvail, L.; Fouchereau-Peron, M. Calcium Metabolism Related Markers during the Growth of Haliotis Tuberculata. *Invertebrate reproduction & development* **2001**, *40* (2–3), 209–216.

E

Ehrlich, H. Chitin and Collagen as Universal and Alternative Templates in Biomineralization. *International Geology Review* **2010**, *52* (7–8), 661–699.

Euw, S. V.; Zhang, Q.; Manichev, V.; Murali, N.; Gross, J.; Feldman, L. C.; Gustafsson, T.; Flach, C.; Mendelsohn, R.; Falkowski, P. G. Biological Control of Aragonite Formation in Stony Corals. *Science* **2017**, *356* (6341), 933–938.

Eyster, L. S. Shell Inorganic Composition and Onset of Shell Mineralization during Bivalve and Gastropod Embryogenesis. *The Biological Bulletin* **1986**, *170* (2), 211–231.

F

Faivre, D.; Schüler, D. Magnetotactic Bacteria and Magnetosomes. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (11), 4875–4898.

Falini, G.; Albeck, S.; Weiner, S.; Addadi, L. Control of Aragonite or Calcite Polymorphism by Mollusk Shell Macromolecules. *Science* **1996**, *271* (5245), 67–69.

Falini, G.; Albeck, S.; Weiner, S.; Addadi, L. Control of Aragonite or Calcite Polymorphism by Mollusk Shell Macromolecules. *Science* **1996**, *271* (5245), 67–69.

Falini, G.; Fermani, S.; Goffredo, S. Coral Biomineralization: A Focus on Intra-Skeletal Organic Matrix and Calcification. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **2015**, *46*, 17–26.

Falkowski, P.; Scholes, R. J.; Boyle, E.; Canadell, J.; Canfield, D.; Elser, J.; Gruber, N.; Hibbard, K.; Högberg, P.; Linder, S.; et al. The Global Carbon Cycle: A Test of Our Knowledge of Earth as a System. *Science* **2000**, *290* (5490), 291–296.

(79)

Fang, D.; Xu, G.; Hu, Y.; Pan, C.; Xie, L.; Zhang, R. Identification of Genes Directly Involved in Shell Formation and Their Functions in Pearl Oyster, Pinctada Fucata. *PLoS One* **2011**, *6* (7), e21860.

Fantazzini, P.; Mengoli, S.; Pasquini, L.; Bortolotti, V.; Brizi, L.; Mariani, M.; Giosia, M. D.; Fermani, S.; Capaccioni, B.; Caroselli, E.; et al. Gains and Losses of Coral Skeletal Porosity Changes with Ocean Acidification Acclimation. *Nature Communications* **2015**, *6*, 7785.

Feng, Q. L.; Cui, F. Z.; Pu, G.; Wang, R. Z.; Li, H. D. Crystal Orientation, Toughening Mechanisms and a Mimic of Nacre. *Materials Science and Engineering: C* **2000**, *11* (1), 19–25.

Field, C. B.; Barros, V. R.; Mastrandrea, M. D.; Mach, K. J.; Abdrabo, M. A.-K.; Adger, N.; Anokhin, Y. A.; Anisimov, O. A.; Arent, D. J.; Barnett, J.; et al. Summary for Policymakers (accessed Oct 2, 2018).

Fischer, A.; Schmitz, M.; Aichmayer, B.; Fratzl, P.; Faivre, D. Structural Purity of Magnetite Nanoparticles in Magnetotactic Bacteria. *Journal of The Royal Society Interface* **2011**, *8* (60), 1011–1018.

Fleury, C.; Marin, F.; Marie, B.; Luquet, G.; Thomas, J.; Josse, C.; Serpentini, A.; Lebel, J.-M. Shell Repair Process in the Green Ormer Haliotis Tuberculata: A Histological and Microstructural Study. *Tissue and cell* **2008**, *40* (3), 207–218.

Fremy, E. Recherches Chimiques Sur Les Os. *Ann Chim Phys* **1855**.

Fritz, M.; Belcher, A. M.; Radmacher, M.; Walters, D. A.; Hansma, P. K.; Stucky, G. D.; Morse, D. E.; Mann, S. Flat Pearls from Biofabrication of Organized Composites on Inorganic Substrates. *Nature* **1994**, *371* (6492), 49.

Fritz, M.; Morse, D. E. The Formation of Highly Organized Biogenic Polymer/Ceramic Composite Materials: The High-Performance Microaluminate of Molluscan Nacre. *Current opinion in colloid & interface science* **1998**, *3* (1), 55–62.

Furuhashi, T.; Schwarzinger, C.; Miksik, I.; Smrz, M.; Beran, A. Molluscan Shell Evolution with Review of Shell Calcification Hypothesis. *Comparative biochemistry and physiology Part B: Biochemistry and molecular biology* **2009**, *154* (3), 351–371.

G

Gago-Duport, L.; Briones, M. J. I.; Rodríguez, J. B.; Covelo, B. Amorphous Calcium Carbonate Biomineralization in the Earthworm's Calciferous Gland: Pathways to the Formation of Crystalline Phases. *Journal of structural biology* **2008**, *162* (3), 422–435.

Gal, A.; Kahil, K.; Vidavsky, N.; DeVol, R. T.; Gilbert, P. U.; Fratzl, P.; Weiner, S.; Addadi, L. Particle Accretion Mechanism Underlies Biological Crystal Growth from an Amorphous Precursor Phase. *Advanced Functional Materials* **2014**, *24* (34), 5420–5426.

Gaume, B.; Denis, F.; Van Wormhoudt, A.; Huchette, S.; Jackson, D. J.; Avignon, S.; Auzoux-Bordenave, S. Characterisation and Expression of the Biomineralising Gene Lustrin A during Shell Formation of the European Abalone Haliotis Tuberculata. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **2014**, *169*, 1–8.

Gaume, B. Etude Intégrative de La Formation Coquillière Au Cours Du Développement de l'ormeau Haliotis Tubercula: Approches Structurales, Biochimiques et Moléculaires. PhD Thesis, Paris, Muséum national d'histoire naturelle, 2010.

Gaume, B.; Fouchereau-Peron, M.; Badou, A.; Helléouet, M.-N.; Huchette, S.; Auzoux-Bordenave, S. Biomineralization Markers during Early Shell Formation in the European Abalone Haliotis Tuberculata, Linnaeus. *Marine biology* **2011**, *158* (2), 341–353.

Geiger, D. L.; Martin, J. W. The Pea Crab Orthotheres Haliotidis New Species (Decapoda: Brachyura: Pinnotheridae) in the Australian Abalone Haliotis Asinina Linnaeus, 1758 and Haliotis Squamata Reeve, 1846 (Gastropoda: Vetigastropoda: Haliotidae). *Bulletin of Marine Science* **1999**, *64* (2), 269–280.

George, A.; Veis, A. Phosphorylated Proteins and Control over Apatite Nucleation, Crystal Growth, and Inhibition. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (11), 4670–4693.

Gertman, R.; Ben Shir, I.; Kababya, S.; Schmidt, A. In Situ Observation of the Internal Structure and Composition of Biomineralized Emiliania Huxleyi Calcite by Solid-State NMR Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130* (40), 13425–13432.

Gilbert, P. U. P. A.; Metzler, R. A.; Zhou, D.; Scholl, A.; Doran, A.; Young, A.; Kunz, M.; Tamura, N.; Coppersmith, S. N. Gradual Ordering in Red Abalone Nacre. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (51), 17519–17527.

Goldstein, J.; Newbury, D. E.; Joy, D. C.; Lyman, C. E.; Echlin, P.; Lifshin, E.; Sawyer, L.; Michael, J. R. *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis: Third Edition*, 3rd ed.; Springer US, 2003.

Golubic, S.; Campbell, S. E. Biogenically Formed Aragonite Concretions in Marine Rivularia. In *Phanerozoic Stromatolites*; Monty, C., Ed.; Springer Berlin Heidelberg, 1981; pp 209–229.

Gotliv, B.-A.; Addadi, L.; Weiner, S. Mollusk Shell Acidic Proteins: In Search of Individual Functions. *ChemBioChem* **2003**, *4* (6), 522–529.

Greenaway, P. Calcium Balance and Moulting in the Crustacea. *Biological Reviews* **1985**, *60* (3), 425–454.

Grégoire, C. Structure of the Molluscan Shell. *Chemical zoology* **1972**, *7*, 45–102.

Gries, K.; Kröger, R.; Kübel, C.; Fritz, M.; Rosenauer, A. Investigations of Voids in the Aragonite Platelets of Nacre. *Acta biomaterialia* **2009**, *5* (8), 3038–3044.

Griesshaber, E.; Kelm, K.; Sehrbrock, A.; Mader, W.; Mutterlose, J.; Brand, U.; Schmahl, W. W. Amorphous Calcium Carbonate in the Shell Material of the Brachiopod Megerlia Truncata. *European Journal of Mineralogy* **2009**, *21* (4), 715–723.

Griffin, R. G. Spectroscopy: Clear Signals from Surfaces. *Nature* **2010**, *468* (7322), 381.

Gutknecht, J.; Bisson, M. A.; Tosteson, F. C. Diffusion of Carbon Dioxide through Lipid Bilayer Membranes. Effects of Carbonic Anhydrase, Bicarbonate, and Unstirred Layers. *The Journal of general physiology* **1977**, *69* (6), 779.

H

Hallberg, R. O. Iron and Zinc Sulfides Formed in a Continuous Culture of Sulfate-Reducing Bacteria. *Neues Jahrbuch fur Mineralogie-Monatshefte* **1972**, 481–500.

Hasse, B.; Ehrenberg, H.; Marxen, J. C.; Becker, W.; Epple, M. Calcium Carbonate Modifications in the Mineralized Shell of the Freshwater Snail Biomphalaria Glabrata. *Chemistry–A European Journal* **2000**, *6* (20), 3679–3685.

Heinemann, F.; Launspach, M.; Gries, K.; Fritz, M. Gastropod Nacre: Structure, Properties and Growth—Biological, Chemical and Physical Basics. *Biophysical chemistry* **2011**, *153* (2–3), 126–153.

Henry, R. P. Multiple Roles of Carbonic Anhydrase in Cellular Transport and Metabolism. *Annual review of physiology* **1996**, *58* (1), 523–538.

Herbert, B.; Lecouturier, A.; Masquelier, D.; Hauser, N.; Remacle, C. Ultrastructure and Cytochemical Detection of Alkaline Phosphatase in Long-Term Cultures of Osteoblast-like Cells from Rat Calvaria. *Calcified tissue international* **1997**, *60* (2), 216–223.

I

Iafisco, M.; Morales, J. G.; Hernández-Hernández, M. A.; García-Ruiz, J. M.; Roveri, N. Biomimetic Carbonate–Hydroxyapatite Nanocrystals Prepared by Vapor Diffusion. *Advanced Engineering Materials* **2010**, *12* (7), B218–B223.

Iijima, M.; Moriwaki, Y. Orientation of Apatite and Organic Matrix InLingula Unguis Shell. *Calcif Tissue Int* **1990**, *47* (4), 237–242.

Inoue, H.; Ozaki, N.; Nagasawa, H. Purification and Structural Determination of a Phosphorylated Peptide with Anti-Calcification and Chitin-Binding Activities in the Exoskeleton of the Crayfish, Procambarus Clarkii. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **2001**, *65* (8), 1840–1848.

Isaji, S. Formation of Organic Sheets in the Inner Shell Layer of Geloina (Bivalvia: Corbiculidae): An Adaptive Response to Shell Dissolution. *VELIGER-BERKELEY-* **1993**, *36*, 166–166.

Iwata, K. Mineralization and Architecture of the Larval Shell of Haliotis Discus Hannai Ino,(Archaeogastropoda). *北海道大学理学部紀要= Journal of the Faculty of Science, Hokkaido University. Series 4, Geology and mineralogy* **1980**, *19* (3), 305–320.

J

Jackson, A. P.; Vincent, J. F. V.; Turner, R. M. A Physical Model of Nacre. *Composites Science and Technology* **1989**, *36* (3), 255–266.

Jackson, A. P.; Vincent, J. F. V.; Turner, R. M. The Mechanical Design of Nacre. *Proc. R. Soc. Lond. B* **1988**, *234* (1277), 415–440.

Jardillier, E.; Rousseau, M.; Gendron-Badou, A.; Fröhlich, F.; Smith, D. C.; Martin, M.; Helléouet, M.-N.; Huchette, S.; Doumenc, D.; Auzoux-Bordenave, S. A Morphological and Structural Study of the Larval Shell from the Abalone Haliotis Tuberculata. *Marine Biology* **2008**, *154* (4), 735–744.

Jeanguillaume, C.; Colliex, C.; Ballongue, P.; Tenee, M. New STEM Multisignal Imaging Modes, Made Accessible through the Evaluation of Detection Efficiencies. *Ultramicroscopy* **1992**, *45* (2), 205–217.

Jiang, W.; Pacella, M. S.; Athanasiadou, D.; Nelea, V.; Vali, H.; Hazen, R. M.; Gray, J. J.; McKee, M. D. Chiral Acidic Amino Acids Induce Chiral Hierarchical Structure in Calcium Carbonate. *Nature communications* **2017**, *8*, 15066.

John D. Currey. Role of Collagen and Other Organics in the Mechanical Properties of Bone. *Osteoporos Int* **2003**, *14* (5), 29–36.

Jolly, C.; Berland, S.; Milet, C.; Borzeix, S.; Lopez, E.; Doumenc, D. Zona Localization of Shell Matrix Proteins in Mantle of Haliotis Tuberculata (Mollusca, Gastropoda). *Mar Biotechnol* **2004**, *6* (6), 541–551.

K

Kababya, S.; Gal, A.; Kahil, K.; Weiner, S.; Addadi, L.; Schmidt, A. Phosphate–Water Interplay Tunes Amorphous Calcium Carbonate Metastability: Spontaneous Phase Separation and Crystallization vs Stabilization Viewed by Solid State NMR. *Journal of the American Chemical Society* **2015**, *137* (2), 990–998.

Kamat, S.; Su, X.; Ballarini, R.; Heuer, A. H. Structural Basis for the Fracture Toughness of the Shell of the Conch Strombus Gigas. *Nature* **2000**, *405* (6790), 1036.

Kane, R.; Ma, P. X. Mimicking the Nanostructure of Bone Matrix to Regenerate Bone. *Materials Today* **2013**, *16* (11), 418–423.

Katti, K. S.; Katti, D. R. Why Is Nacre so Tough and Strong? *Materials Science and Engineering: C* **2006**, *26* (8), 1317–1324.

Kim, Y.-Y.; Ganesan, K.; Yang, P.; Kulak, A. N.; Borukhin, S.; Pechook, S.; Ribeiro, L.; Kröger, R.; Eichhorn, S. J.; Armes, S. P.; et al. An Artificial Biomineral Formed by Incorporation of Copolymer Micelles in Calcite Crystals. *Nature Materials* **2011**, *10* (11), 890–896.

Kniprath, E. Ontogeny of the Molluscan Shell Field: A Review. *Zoologica Scripta* **1981**, *10* (1), 61–79.

Knoll, A. H. Biomineralization and Evolutionary History. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* **2003**, *54* (1), 329–356.

Kocot, K. M.; Aguilera, F.; McDougall, C.; Jackson, D. J.; Degnan, B. M. Sea Shell Diversity and Rapidly Evolving Secretomes: Insights into the Evolution of Biomineralization. *Frontiers in Zoology* **2016**, *13* (1), 23.

Kroeker, K. J.; Kordas, R. L.; Crim, R.; Hendriks, I. E.; Ramajo, L.; Singh, G. S.; Duarte, C. M.; Gattuso, J.-P. Impacts of Ocean Acidification on Marine Organisms: Quantifying Sensitivities and Interaction with Warming. *Global Change Biology* **2013**, *19* (6), 1884–1896.

Kröger, N.; Lorenz, S.; Brunner, E.; Sumper, M. Self-Assembly of Highly Phosphorylated Silaffins and Their Function in Biosilica Morphogenesis. *Science* **2002**, *298* (5593), 584–586.

Kruse, J.; Leinweber, P.; Eckhardt, K.-U.; Godlinski, F.; Hu, Y.; Zuin, L. Phosphorus L2, 3-Edge XANES: Overview of Reference Compounds. *Journal of synchrotron radiation* **2009**, *16* (2), 247–259.

Kudo, M.; Kameda, J.; Saruwatari, K.; Ozaki, N.; Okano, K.; Nagasawa, H.; Kogure, T. Microtexture of Larval Shell of Oyster, Crassostrea Nippona: A FIB-TEM Study. *Journal of structural biology* **2010**, *169* (1), 1–5.

L

Lau, K. H.; Farley, J. R.; Baylink, D. J. Phosphotyrosyl Protein Phosphatases. *Biochemical Journal* **1989**, *257* (1), 23.

Lawrence, J. R.; Swerhone, G. D. W.; Leppard, G. G.; Araki, T.; Zhang, X.; West, M. M.; Hitchcock, A. P. Scanning Transmission X-Ray, Laser Scanning, and Transmission Electron Microscopy

Mapping of the Exopolymeric Matrix of Microbial Biofilms. *Applied and environmental microbiology* **2003**, *69* (9), 5543–5554.

Le Faou, A. Processus d'ostéoconduction Généré Par La Nacre: Mise En Évidence et Régulation in Vivo. PhD Thesis, Paris, Muséum national d'histoire naturelle, 1996.

Le Roy, N.; Jackson, D. J.; Marie, B.; Ramos-Silva, P.; Marin, F. The Evolution of Metazoan α-Carbonic Anhydrases and Their Roles in Calcium Carbonate Biomineralization. *Frontiers in zoology* **2014**, *11* (1), 75.

Lecointre, G.; Le Guyader, H.; Visset, D. *Classification Phylogénétique Du Vivant*; Belin Paris, 2001; Vol. 2.

Lee, M. R.; Hodson, M. E.; Langworthy, G. N. Crystallization of Calcite from Amorphous Calcium Carbonate: Earthworms Show the Way. *Mineralogical Magazine* **2008**, *72* (1), 257–261.

Lemloh, M.-L.; Marin, F.; Herbst, F.; Plasseraud, L.; Schweikert, M.; Baier, J.; Bill, J.; Brümmer, F. Genesis of Amorphous Calcium Carbonate Containing Alveolar Plates in the Ciliate Coleps Hirtus (Ciliophora, Prostomatea). *Journal of structural biology* **2013**, *181* (2), 155–161.

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. *Journal of structural biology* **2001**, *135* (1), 8–17.

Levi-Kalisman, Y.; Raz, S.; Weiner, S.; Addadi, L.; Sagi, I. Structural Differences between Biogenic Amorphous Calcium Carbonate Phases Using X-Ray Absorption Spectroscopy. *Advanced*

Lin, A.; Meyers, M. A. Growth and Structure in Abalone Shell. *Materials Science and Engineering: A* **2005**, *390* (1), 27–41.

Linnaeus, 1758.

Linton, J. L.; Sohn, B.-W.; Yook, J.-I.; Le Geros, R. Z. Effects of Calcium Phosphate Ceramic Bone Graft Materials on Permanent Teeth Eruption in Beagles. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal* **2002**, *39* (2), 197–207.

Lopes-Lima, M.; Ribeiro, I.; Pinto, R. A.; Machado, J. Isolation, Purification and Characterization of Glycosaminoglycans in the Fluids of the Mollusc Anodonta Cygnea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **2005**, *141* (3), 319–326.

Lopez, E.; Vidal, B.; Berland, S.; Camprasse, S.; Camprasse, G.; Silve, C. Demonstration of the Capacity of Nacre to Induce Bone Formation by Human Osteoblasts Maintained in Vitro. *Tissue and Cell* **1992**, *24* (5), 667–679.

Lowenstam, H. A.; Lowenstam, P. E. D. of G. and P. S. H. a; Weiner, S.; Weiner, A. P. I. D. S. *On Biomineralization*; Oxford University Press, 1989.

Lucas, F.; Shaw, J. T. B.; Smith, S. G. Comparative Studies of Fibroins: I. the Amino Acid Composition of Various Fibroins and Its Significance in Relation to Their Crystal Structure and Taxonomy. *Journal of molecular biology* **1960**, *2* (6), 339–349.

Luquet, G. Biomineralizations: Insights and Prospects from Crustaceans. *Zookeys* **2012**, No. 176, 103.

Lydie, M. A. O.; GOLUBIC, S.; LE CAMPION-ALSUMARD, T.; PAYRI, C. Developmental Aspects of Biomineralisation in the Polynesian Pearl Oyster Pinctada Margaritifera Var. Cumingii. *Oceanologica acta* **2001**, *24*, 37–49.

M

Ma, Z.; Huang, J.; Sun, J.; Wang, G.; Li, C.; Xie, L.; Zhang, R. A Novel Extrapallial Fluid Protein Controls the Morphology of Nacre Lamellae in the Pearl Oyster, Pinctada Fucata. *Journal of Biological Chemistry* **2007**.

Mahamid, J.; Addadi, L.; Weiner, S. Crystallization Pathways in Bone. *Cells tissues organs* **2011**, *194* (2–4), 92–97.

Mahamid, J.; Aichmayer, B.; Shimoni, E.; Ziblat, R.; Li, C.; Siegel, S.; Paris, O.; Fratzl, P.; Weiner, S.; Addadi, L. Mapping Amorphous Calcium Phosphate Transformation into Crystalline Mineral from the Cell to the Bone in Zebrafish Fin Rays. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010**, *107* (14), 6316–6321.

Mahamid, J.; Sharir, A.; Addadi, L.; Weiner, S. Amorphous Calcium Phosphate Is a Major Component of the Forming Fin Bones of Zebrafish: Indications for an Amorphous Precursor Phase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**.

Manigault, P. Recherches Sur Le Calcaire Chez Les Mollusques: Phosphatase et Précipitation Calcique. Histochimie Du Calcium. PhD Thesis, 1939.

Mann, K.; Siedler, F.; Treccani, L.; Heinemann, F.; Fritz, M. Perlinhibin, a Cysteine-, Histidine-, and Arginine-Rich Miniprotein from Abalone (Haliotis Laevigata) Nacre, Inhibits in Vitro Calcium Carbonate Crystallization. *Biophysical journal* **2007**, *93* (4), 1246–1254.

Mann, S. Mineralization in Biological Systems. In *Inorganic Elements in Biochemistry*; Connett, P. H., Folłmann, H., Lammers, M., Mann, S., Odom, J. D., Wetterhahn, K. E., Eds.; Structure and Bonding; Springer Berlin Heidelberg, 1983; pp 125–174.

Mann, S. Structure, Morphology, and Crystal Growth of Bacterial Magnetite. In *Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organisms*; Springer, 1985; pp 311–332.

Mann, S. *Biomineralization: Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry*; Oxford University Press, 2001.

Mann, S.; Archibald, D. D.; Didymus, J. M.; Douglas, T.; Heywood, B. R.; Meldrum, F. C.; Reeves, N. J. Crystallization at Inorganic-Organic Interfaces: Biominerals and Biomimetic Synthesis. *Science* **1993**, *261* (5126), 1286–1292.

Mann, S.; Heywood, B. R.; Rajam, S.; Birchall, J. D. Controlled Crystallization of CaCO3 under Stearic Acid Monolayers. *Nature* **1988**, *334* (6184), 692.

Mann, S.; Parker, S. B.; Ross, M. D.; Skarnulis, A. J.; Williams, R. J. P. The Ultrastructure of the Calcium Carbonate Balance Organs of the Inner Ear: An Ultra-High Resolution Electron Microscopy Study. *Proc. R. Soc. Lond. B* **1983**, *218* (1213), 415–424.

Marie, B.; Luquet, G.; Bédouet, L.; Milet, C.; Guichard, N.; Medakovic, D.; Marin, F. Nacre Calcification in the Freshwater Mussel Unio Pictorum: Carbonic Anhydrase Activity and Purification of a 95 KDa Calcium-Binding Glycoprotein. *ChemBioChem* **2008**, *9* (15), 2515–2523.

Marin, F.; Luquet, G.; Marie, B.; Medakovic, D. Molluscan Shell Proteins: Primary Structure, Origin, and Evolution. In *Current Topics in Developmental Biology, Vol 80*; Schatten, G. P., Ed.; Elsevier Academic Press Inc: San Diego, 2008; Vol. 80, pp 209–276.

Marin, F.; Le Roy, N.; Marie, B. The Formation and Mineralization of Mollusk Shell. *Front Biosci* **2012**, *4* (1099), 125.

Marin, F.; Luquet, G. Molluscan Biomineralization: The Proteinaceous Shell Constituents of Pinna Nobilis L. *Materials Science and Engineering: C* **2005**, *25* (2), 105–111.

Marxen, J. C.; Becker, W.; Finke, D.; Hasse, B.; Epple, M. Early Mineralization in Biomphalaria Glabrata: Microscopic and Structural Results. *Journal of Molluscan Studies* **2003**, *69* (2), 113–121.

Marxen, J. C.; Nimtz, M.; Becker, W.; Mann, K. The Major Soluble 19.6 KDa Protein of the Organic Shell Matrix of the Freshwater Snail Biomphalaria Glabrata Is an N-Glycosylated Dermatopontin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* **2003**, *1650* (1–2), 92–98.

Marxen, J. C.; Witten, P. E.; Finke, D.; Reelsen, O.; Rezgaoui, M.; Becker, W. A Light-and Electron-Microscopic Study of Enzymes in the Embryonic Shell-Forming Tissue of the Freshwater Snail, Biomphalaria Glabrata. *Invertebrate Biology* **2003**, *122* (4), 313–325.

McConnaughey, T. A.; Gillikin, D. P. Carbon Isotopes in Mollusk Shell Carbonates. *Geo-Mar Lett* **2008**, *28* (5), 287–299.

Medaković, D. Carbonic Anhydrase Activity and Biomineralization Process in Embryos, Larvae and Adult Blue Mussels Mytilus Edulis L. *Helgoland Marine Research* **2000**, *54* (1), 1.

Medaković, D. Carbonic Anhydrase Activity and Biomineralization Process in Embryos, Larvae and Adult Blue Mussels Mytilus Edulis L. *Helgoland Marine Research* **2000**, *54* (1), 1.

Medaković, D.; Popović, S.; Gržeta, B.; Plazonić, M.; Hrs-Brenko, M. X-Ray Diffraction Study of Calcification Processes in Embryos and Larvae of the Brooding Oyster Ostrea Edulis. *Marine*

Meldrum, N. U.; Roughton, F. J. W. Carbonic Anhydrase. Its Preparation and Properties. *The Journal of physiology* **1933**, *80* (2), 113–142.

Mergner, T.; Glasauer, S. A Simple Model of Vestibular Canal-Otolith Signal Fusion. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1999**, *871* (1), 430–434.

Meyers, M. A.; Chen, P.-Y.; Lin, A. Y.-M.; Seki, Y. Biological Materials: Structure and Mechanical Properties. *Progress in Materials Science* **2008**, *53* (1), 1–206.

Meyran, J.-C.; Graf, F.; Nicaise, G. Calcium Pathway through a Mineralizing Epithelium in the Crustacean Orchestia in Pre-Molt: Ultrastructural Cytochemistry and X-Ray Microanalysis. *Tissue and Cell* **1984**, *16* (2), 269–286.

Michenfelder, M.; Fu, G.; Lawrence, C.; Weaver, J. C.; Wustman, B. A.; Taranto, L.; Evans, J. S.; Morse, D. E. Characterization of Two Molluscan Crystal-Modulating Biomineralization Proteins and Identification of Putative Mineral Binding Domains. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules* **2003**, *70* (4), 522–533.

Misogianes, M. J.; Chasteen, N. D. A Chemical and Spectral Characterization of the Extrapallial Fluid of Mytilus Edulis. *Analytical biochemistry* **1979**, *100* (2), 324–334.

Miyamoto, H.; Miyashita, T.; Okushima, M.; Nakano, S.; Morita, T.; Matsushiro, A. A Carbonic Anhydrase from the Nacreous Layer in Oyster Pearls. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1996**, *93* (18), 9657–9660.

Miyamoto, H.; Miyoshi, F.; Kohno, J. The Carbonic Anhydrase Domain Protein Nacrein Is Expressed in the Epithelial Cells of the Mantle and Acts as a Negative Regulator in Calcification in the Mollusc Pinctada Fucata. *Zoological science* **2005**, *22* (3), 311–315.

Miyazaki, Y.; Nishida, T.; Aoki, H.; Samata, T. Expression of Genes Responsible for Biomineralization of Pinctada Fucata during Development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **2010**, *155* (3), 241–248.

Moura, G.; Vilarinho, L.; Santos, A. C.; Machado, J. Organic Compounds in the Extrapalial Fluid and Haemolymph of Anodonta Cygnea (L.) with Emphasis on the Seasonal Biomineralization Process. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **2000**, *125* (3), 293–306.

Müller, W. E.; Neufurth, M.; Huang, J.; Wang, K.; Feng, Q.; Schröder, H. C.; Diehl-Seifert, B.; Muñoz-Espí, R.; Wang, X. Nonenzymatic Transformation of Amorphous CaCO3 into Calcium Phosphate Mineral after Exposure to Sodium Phosphate in Vitro: Implications for in Vivo Hydroxyapatite Bone Formation. *ChemBioChem* **2015**, *16* (9), 1323–1332.

Müller, W. E.; Schröder, H. C.; Wang, X. The Understanding of the Metazoan Skeletal System, Based on the Initial Discoveries with Siliceous and Calcareous Sponges. *Marine drugs* **2017**, *15* (6), 172.

Mutvei, H. Ultrastructural Characteristics of the Nacre in Some Gastropods. *Zoologica scripta* **1978**, *7* (1–4), 287–296.

Mutvei, H. On the Internal Structures of the Nacreous Tablets in Molluscan Shells. *Scan Electron Microscopy* **1979**, *1979* (2), 457–462.

N

Nakahara, H. Nacre Formation in Bivalve and Gastropod Molluscs. In *Mechanisms and phylogeny of mineralization in biological systems*; Springer, 1991; pp 343–350.

Nakahara, H.; Bevelander, G.; Kakei, M. Electron Microscopic and Amino Acid Studies on the Outer and Inner Shell Layers of Haliotis Rufescens. *Venus (Japanese Journal of Malacology)* **1982**, *41* (1), 33–46.

Nassif, N.; Martineau, F.; Syzgantseva, O.; Gobeaux, F.; Willinger, M.; Coradin, T.; Cassaignon, S.; Azaïs, T.; Giraud-Guille, M.-M. In Vivo Inspired Conditions to Synthesize Biomimetic Hydroxyapatite. *Chemistry of Materials* **2010**, *22* (12), 3653–3663.

Nassif, N.; Gehrke, N.; Pinna, N.; Shirshova, N.; Tauer, K.; Antonietti, M.; Cölfen, H. Synthesis of Stable Aragonite Superstructures by a Biomimetic Crystallization Pathway. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44* (37), 6004–6009.

Nelson, D. G. A.; Salimi, H.; Nancollas, G. H. Octacalcium Phosphate and Apatite Overgrowths: A Crystallographic and Kinetic Study. *Journal of colloid and interface science* **1986**, *110* (1), 32–39.

Nitiputri, K.; Ramasse, Q. M.; Autefage, H.; McGilvery, C. M.; Boonrungsiman, S.; Evans, N. D.; Stevens, M. M.; Porter, A. E. Nanoanalytical Electron Microscopy Reveals a Sequential Mineralization Process Involving Carbonate-Containing Amorphous Precursors. *ACS nano* **2016**, *10* (7), 6826–6835.

Nudelman, F. Nacre Biomineralisation: A Review on the Mechanisms of Crystal Nucleation. In *Seminars in cell & developmental biology*; Elsevier, 2015; Vol. 46, pp 2–10.

Nudelman, F.; Gotliv, B. A.; Addadi, L.; Weiner, S. Mollusk Shell Formation: Mapping the Distribution of Organic Matrix Components Underlying a Single Aragonitic Tablet in Nacre. *Journal of structural biology* **2006**, *153* (2), 176–187.

Nudelman, F.; Pieterse, K.; George, A.; Bomans, P. H.; Friedrich, H.; Brylka, L. J.; Hilbers, P. A.; de With, G.; Sommerdijk, N. A. The Role of Collagen in Bone Apatite Formation in the Presence of Hydroxyapatite Nucleation Inhibitors. *Nature materials* **2010**, *9* (12), 1004.

O

Olson, I. C.; Blonsky, A. Z.; Tamura, N.; Kunz, M.; Pokroy, B.; Romao, C. P.; White, M. A.; Gilbert, P. U. P. A. Crystal Nucleation and Near-Epitaxial Growth in Nacre. *Journal of Structural Biology* **2013**, *184* (3), 454–463.

Olson, I. C.; Kozdon, R.; Valley, J. W.; Gilbert, P. U. P. A. Mollusk Shell Nacre Ultrastructure Correlates with Environmental Temperature and Pressure. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (17), 7351–7358.

P

Paasche, E. A Review of the Coccolithophorid Emiliania Huxleyi (Prymnesiophyceae), with Particular Reference to Growth, Coccolith Formation, and Calcification-Photosynthesis Interactions. *Phycologia* **2001**, *40* (6), 503–529.

Plummer, L. N.; Busenberg, E. The Solubilities of Calcite, Aragonite and Vaterite in CO2-H2O Solutions between 0 and 90°C, and an Evaluation of the Aqueous Model for the System CaCO3-CO2-H2O. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **1982**, *46* (6), 1011–1040.

Pokroy, B.; Fieramosca, J. S.; Von Dreele, R. B.; Fitch, A. N.; Caspi, E. N.; Zolotoyabko, E. Atomic Structure of Biogenic Aragonite. *Chemistry of Materials* **2007**, *19* (13), 3244–3251.

Pokroy, B.; Zolotoyabko, E. Microstructure of Natural Plywood-like Ceramics: A Study by High-Resolution Electron Microscopy and Energy-Variable X-Ray Diffraction. *Journal of Materials Chemistry* **2003**, *13* (4), 682–688.

Politi, Y.; Arad, T.; Klein, E.; Weiner, S.; Addadi, L. Sea Urchin Spine Calcite Forms via a Transient Amorphous Calcium Carbonate Phase. *Science* **2004**, *306* (5699), 1161–1164.

Politi, Y.; Levi-Kalisman, Y.; Raz, S.; Wilt, F.; Addadi, L.; Weiner, S.; Sagi, I. Structural Characterization of the Transient Amorphous Calcium Carbonate Precursor Phase in Sea Urchin Embryos. *Advanced Functional Materials* **2006**, *16* (10), 1289–1298.

Politi, Y.; Metzler, R. A.; Abrecht, M.; Gilbert, B.; Wilt, F. H.; Sagi, I.; Addadi, L.; Weiner, S.; Gilbert, P. Transformation Mechanism of Amorphous Calcium Carbonate into Calcite in the Sea Urchin Larval Spicule. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, *105* (45), 17362–17366.

Popov, S. V. Shell Microstructure of Some Groups of Bivalve Mollusks. *Tr. Paleontol. Inst. Ross. Akad. Nauk* **1992**, *245*, 1–46.

Pourpoint, F.; Gervais, C.; Bonhomme-Coury, L.; Azaïs, T.; Coelho, C.; Mauri, F.; Alonso, B.; Babonneau, F.; Bonhomme, C. Calcium Phosphates and Hydroxyapatite: Solid-State NMR Experiments and First-Principles Calculations. *Appl Magn Reson* **2007**, *32* (4), 435–457.

R

Reimann, B. E. F.; Leivin, J. C.; Volcani, B. E. Studies on the Biochemistry and Fine Structure of Silica Shell Formation in Diatoms. Ii. the Structure of the Cell Wall of Navicula Pelliculosa (Bréb.) Hilse. *Journal of Phycology* **1966**, *2* (2), 74–84.

Rousseau, M.; Lopez, E.; Stempflé, P.; Brendlé, M.; Franke, L.; Guette, A.; Naslain, R.; Bourrat, X. Multiscale Structure of Sheet Nacre. *Biomaterials* **2005**, *26* (31), 6254–6262.

Rudall, K. M. The Distribution of Collagen and Chitin. In *Symp. Soc. Exp. Biol*; 1955; Vol. 9, pp 49–71.

Runnegar, B. Shell Microstructures of Cambrian Molluscs Replicated by Phosphate. *Alcheringa: An Australasian Journal of Palaeontology* **1985**, *9* (4), 245–257.

Russell, R. G. G.; Monod, A.; Bonjour, J.-P.; Fleisch, H. Relation between Alkaline Phosphatase and Ca 2+-ATPase in Calcium Transport. *Nature New Biology* **1972**, *240* (99), 126.

S

Saha, A.; Mukhopadhyay, S. K.; Jana, T. K. Physico-Chemical Characterisation of the Extrapallial Fluid of a Common Tellinid Bivalve Macoma b Irmanica (Philippi) in the Mudflats of Sundarbans Mangrove, Bay of Bengal. **2000**.

Saleuddin, A. S. M.; Petit, H. P. The Mode of Formation and the Structure of the Periostracum. In *The Mollusca, Volume 4*; Elsevier, 1983; pp 199–234.

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. Does Abalone Nacre Form by Heteroepitaxial Nucleation or by Growth through Mineral Bridges? *Chemistry of Materials* **1997**, *9* (8), 1731–1740.

Schönitzer, V.; Weiss, I. M. The Structure of Mollusc Larval Shells Formed in the Presence of the Chitin Synthase Inhibitor Nikkomycin Z. *BMC structural biology* **2007**, *7* (1), 71.

Seto, J.; Ma, Y.; Davis, S. A.; Meldrum, F.; Gourrier, A.; Kim, Y.-Y.; Schilde, U.; Sztucki, M.; Burghammer, M.; Maltsev, S.; et al. Structure-Property Relationships of a Biological Mesocrystal in the Adult Sea Urchin Spine. *PNAS* **2012**, *109* (10), 3699–3704.

Setoguchi, H.; Okazaki, M.; Suga, S. Calcification in Higher Plants with Special Reference to Cystoliths. In *Origin, Evolution, and Modern Aspects of Biomineralization in Plants and Animals*; Crick, R. E., Ed.; Springer US: Boston, MA, 1989; pp 409–418.

Shen, X.; Belcher, A. M.; Hansma, P. K.; Stucky, G. D.; Morse, D. E. Molecular Cloning and Characterization of Lustrin A, a Matrix Protein from Shell and Pearl Nacre of Haliotis Rufescens. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272* (51), 32472–32481.

Shimamoto, M. Shell Microstructure of the Veneridae (Bivalvia) and Its Phylogenetic Implications. *The science reports of the Tohoku University. Second series, Geology* **1986**, *56* (1), 1–A40.

Sigel, A.; Sigel, H.; Sigel, R. K. O. *Biomineralization: From Nature to Application*; John Wiley & Sons, 2008.

Simkiss, K. Intracellular and Extracellular Routes in Biomineralization. In *Symp Soc Exp Biol*; 1976; Vol. 30, pp 423–444.

Simkiss, K.; Wilbur, K. M. The Molluscan Epidermis and Its Secretions. *Symposia of the Zoological Society of London. 39: 35-76*. 1977.

Simkiss, K.; Wilbur, K. M. Biomineralization: Mollusks, Epithelial Control of Matrix and Minerals. *Academic, San Diego* **1989**, 230–232.

Smith, B. L.; Schäffer, T. E.; Viani, M.; Thompson, J. B.; Frederick, N. A.; Kindt, J.; Belcher, A.; Stucky, G. D.; Morse, D. E.; Hansma, P. K. Molecular Mechanistic Origin of the Toughness of Natural Adhesives, Fibres and Composites. *Nature* **1999**, *399* (6738), 761.

Solomon, D.; Lehmann, J.; Harden, J.; Wang, J.; Kinyangi, J.; Heymann, K.; Karunakaran, C.; Lu, Y.; Wirick, S.; Jacobsen, C. Micro- and Nano-Environments of Carbon Sequestration: Multi-Element

STXM–NEXAFS Spectromicroscopy Assessment of Microbial Carbon and Mineral Associations. *Chemical Geology* **2012**, *329*, 53–73.

Somrani, S.; Banu, M.; Jemal, M.; Rey, C. Physico-Chemical and Thermochemical Studies of the Hydrolytic Conversion of Amorphous Tricalcium Phosphate into Apatite. *Journal of Solid State Chemistry* **2005**, *178* (5), 1337–1348.

Song, F.; Soh, A. K.; Bai, Y. L. Structural and Mechanical Properties of the Organic Matrix Layers of Nacre. *Biomaterials* **2003**, *24* (20), 3623–3631.

Stoermer, E. F.; Pankratz, H. S.; Bowen, C. C. Fine Structure of the Diatom Amphipleura Pellucida. Ii. Cytoplasmic Fine Structure and Frustule Formation. *American Journal of Botany* **1965**, *52* (10), 1067–1078.

Su, X.; Kamat, S.; Heuer, A. H. The Structure of Sea Urchin Spines, Large Biogenic Single Crystals of Calcite. *Journal of Materials Science* **2000**, *35* (22), 5545–5551.

Sudo, S.; Fujikawa, T.; Nagakura, T.; Ohkubo, T.; Sakaguchi, K.; Tanaka, M.; Nakashima, K.; Takahashi, T. Structures of Mollusc Shell Framework Proteins. *Nature* **1997**, *387* (6633), 563.

Sumper, M.; Brunner, E. Silica Biomineralisation in Diatoms: The Model Organism Thalassiosira Pseudonana. *ChemBioChem* **2008**, *9* (8), 1187–1194.

Sun, J.; Bhushan, B. Hierarchical Structure and Mechanical Properties of Nacre: A Review. *Rsc Advances* **2012**, *2* (20), 7617–7632.

Sviben, S.; Gal, A.; Hood, M. A.; Bertinetti, L.; Politi, Y.; Bennet, M.; Krishnamoorthy, P.; Schertel, A.; Wirth, R.; Sorrentino, A.; et al. A Vacuole-like Compartment Concentrates a Disordered Calcium Phase in a Key Coccolithophorid Alga. *Nature Communications* **2016**, *7*, 11228.

Swart, P. K.; Coleman, M. L. Isotopic Data for Scleractinian Corals Explain Their Palaeotemperature Uncertainties. *Nature* **1980**, *283* (5747), 557–559.

T

Tanner, K. E. Small But Extremely Tough. *Science* **2012**, *336* (6086), 1237–1238.

Tauer, K.; Khrenov, V.; Shirshova, N.; Nassif, N. Preparation and Application of Double Hydrophilic Block Copolymer Particles. *Macromolecular Symposia* **2005**, *226* (1), 187–202.

Taylor, J. D.; Layman, M. The Mechanical Properties of Bivalve (Mollusca) Shell Structures. *Palaeontology* **1972**, *15* (1), 73–87.

Thankamony, A. S. L.; Wittmann, J. J.; Kaushik, M.; Corzilius, B. Dynamic Nuclear Polarization for Sensitivity Enhancement in Modern Solid-State NMR. *Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy* **2017**, *102*, 120–195.

Timmermans, L. P. Studies on Shell Formation in Molluscs. *Netherlands Journal of Zoology* **1968**, *19* (4), 413–523.

Towe, K. M.; Lowenstam, H. A. Ultrastructure and Development of Iron Mineralization in the Radular Teeth of Cryptochiton Stelleri (Mollusca). *Journal of ultrastructure research* **1967**, *17* (1–2), 1–13.

Trautz, O. R.; Bachra, B. N. Oriented Precipitation of Inorganic Crystals in Fibrous Matrices. *Archives of oral biology* **1963**, *8* (5), 601–613.

Treccani, L.; Mann, K.; Heinemann, F.; Fritz, M. Perlwapin, an Abalone Nacre Protein with Three Four-Disulfide Core (Whey Acidic Protein) Domains, Inhibits the Growth of Calcium Carbonate Crystals. *Biophysical journal* **2006**, *91* (7), 2601–2608.

Trinkler, N.; Guichard, N.; Labonne, M.; Plasseraud, L.; Paillard, C.; Marin, F. Variability of Shell Repair in the Manila Clam Ruditapes Philippinarum Affected by the Brown Ring Disease: A Microstructural and Biochemical Study. *Journal of Invertebrate Pathology* **2011**, *106* (3), 407–417.

Tsujii, T. An Electron Microscopic Study of the Mantle Epithelial Cells of Anodonta Sp. during Shell Regeneration. *The mechanisms of mineralization in the invertebrates and plants. N. Watabe, KM Wilbur eds. Univ. South Carolina Press, Colurnbia* **1976**, 339–353.

V

Veis, A.; Sfeir, C.; Wu, C. B. Phosphorylation of the Proteins of the Extracellular Matrix of Mineralized Tissues by Casein Kinase-like Activity. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* **1997**, *8* (4), 360–379.

Von Euw, S.; Zhang, Q.; Manichev, V.; Murali, N.; Gross, J.; Feldman, L. C.; Gustafsson, T.; Flach, C.; Mendelsohn, R.; Falkowski, P. G. Biological Control of Aragonite Formation in Stony Corals. *Science* **2017**, *356* (6341), 933–938.

W

Wada, K. Nucleation and Growth of Aragonite Crystals in the Nacre of Bivalve Molluscs. *Biomineralization* **1972**, *6*, 141–159.

Waller, T. R. Functional Morphology and Development of Veliger Larvae of the European Oyster, Ostrea Edulis Linné. **1981**.

Wang, T.; Cölfen, H.; Antonietti, M. Nonclassical Crystallization: Mesocrystals and Morphology Change of CaCO3 Crystals in the Presence of a Polyelectrolyte Additive. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (10), 3246–3247.

Wang, Y.; Azaïs, T.; Robin, M.; Vallée, A.; Catania, C.; Legriel, P.; Pehau-Arnaudet, G.; Babonneau, F.; Giraud-Guille, M.-M.; Nassif, N. The Predominant Role of Collagen in the Nucleation, Growth, Structure and Orientation of Bone Apatite. *Nature materials* **2012**, *11* (8), 724.

Wang, Y.; Von Euw, S.; Fernandes, F. M.; Cassaignon, S.; Selmane, M.; Laurent, G.; Pehau-Arnaudet, G.; Coelho, C.; Bonhomme-Coury, L.; Giraud-Guille, M.-M. Water-Mediated Structuring of Bone Apatite. *Nature materials* **2013**, *12* (12), 1144.

Wang, Y.; Von Euw, S.; Fernandes, F. M.; Cassaignon, S.; Selmane, M.; Laurent, G.; Pehau-Arnaudet, G.; Coelho, C.; Bonhomme-Coury, L.; Giraud-Guille, M.-M. Water-Mediated Structuring of Bone Apatite. *Nature materials* **2013**, *12* (12), 1144.

Watabe, N.; Pan, C.-M. Phosphatic Shell Formation in Atremate Brachiopods. *Integr Comp Biol* **1984**, *24* (4), 977–985.

Watabe, N.; Wilbur, K. M. Influence of the Organic Matrix on Crystal Type in Molluscs. *Nature* **1960**, *188* (4747), 334.

Weaver, J. C.; Milliron, G. W.; Miserez, A.; Evans-Lutterodt, K.; Herrera, S.; Gallana, I.; Mershon, W. J.; Swanson, B.; Zavattieri, P.; DiMasi, E. The Stomatopod Dactyl Club: A Formidable Damage-Tolerant Biological Hammer. *Science* **2012**, *336* (6086), 1275–1280.

Weber, J.; Greer, R.; Voight, B.; White, E.; Roy, R. Unusual Strength Properties of Echinoderm Calcite Related to Structure. *Journal of Ultrastructure Research* **1969**, *26* (5), 355–366.

Weiner, S.; Traub, W. Macromolecules in Mollusc Shells and Their Functions in Biomineralization. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **1984**, *304* (1121), 425–434.

Weiner, S.; Wagner, H. D. THE MATERIAL BONE: Structure-Mechanical Function Relations. *Annual Review of Materials Science* **1998**, *28* (1), 271–298.

Weiner, S. Mollusk Shell Formation: Isolation of Two Organic Matrix Proteins Associated with Calcite Deposition in the Bivalve Mytilus Californianus. *Biochemistry* **1983**, *22* (17), 4139–4145.

Weiner, S. Organization of Organic Matrix Components in Mineralized Tissues. *American zoologist* **1984**, *24* (4), 945–951.

Weiner, S. Biomineralization: A Structural Perspective. *Journal of Structural Biology* **2008**, *163* (3), 229–234.

Weiner, S.; Hood, L. Soluble Protein of the Organic Matrix of Mollusk Shells: A Potential Template for Shell Formation. *Science* **1975**, *190* (4218), 987–989.

Weiner, S.; Lowenstam, H. Organization of Extracellularly Mineralized Tissues: A Comparative Study of Biological Crystal Growt. *Critical Reviews in Biochemistry* **1986**, *20* (4), 365–408.

Weiner, S.; Traub, W. X-Ray Diffraction Study of the Insoluble Organic Matrix of Mollusk Shells. *FEBS letters* **1980**, *111* (2), 311–316.

Weiner, S.; Dove, P. M. An Overview of Biomineralization Processes and the Problem of the Vital Effect. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* **2003**, *54* (1), 1–29.

Weiner, S.; Mahamid, J.; Politi, Y.; Ma, Y.; Addadi, L. Overview of the Amorphous Precursor Phase Strategy in Biomineralization. *Front. Mater. Sci. China* **2009**, *3* (2), 104.

Weiner, S.; Mahamid, J.; Politi, Y.; Ma, Y.; Addadi, L. Overview of the Amorphous Precursor Phase Strategy in Biomineralization. *Frontiers of Materials Science in China* **2009**, *3* (2), 104.

Weiss, I. M.; Göhring, W.; Fritz, M.; Mann, K. Perlustrin, a Haliotis Laevigata (Abalone) Nacre Protein, Is Homologous to the Insulin-like Growth Factor Binding Protein N-Terminal Module of Vertebrates. *Biochemical and biophysical research communications* **2001**, *285* (2), 244–249.

Weiss, I. M.; Schönitzer, V. The Distribution of Chitin in Larval Shells of the Bivalve Mollusk Mytilus Galloprovincialis. *Journal of structural biology* **2006**, *153* (3), 264–277.

Weiss, I. M.; Schönitzer, V.; Eichner, N.; Sumper, M. The Chitin Synthase Involved in Marine Bivalve Mollusk Shell Formation Contains a Myosin Domain. *FEBS letters* **2006**, *580* (7), 1846–1852.

Weiss, I. M.; Tuross, N.; Addadi, L.; Weiner, S. Mollusc Larval Shell Formation: Amorphous Calcium Carbonate Is a Precursor Phase for Aragonite. *Journal of Experimental Zoology* **2002**, *293* (5), 478–491.

Wenzl, S.; Hett, R.; Richthammer, P.; Sumper, M. Silacidins: Highly Acidic Phosphopeptides from Diatom Shells Assist in Silica Precipitation In Vitro. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47* (9), 1729–1732.

Westbroek, P.; Marin, F. A Marriage of Bone and Nacre. *Nature* **1998**, *392* (6679), 861.

Wilbur, K. M.; Jodrey, L. H. Studies on Shell Formation. The Inhibition of Shell Formation by Carbonic Anhydrase Inhibitors. *The biological Bulletin .108: 359-365*. 1956.

Y

Yin, Y.; Huang, J.; Paine, M. L.; Reinhold, V. N.; Chasteen, N. D. Structural Characterization of the Major Extrapallial Fluid Protein of the Mollusc Mytilus Edulis: Implications for Function. *Biochemistry* **2005**, *44* (31), 10720–10731.

Z

Zhang, G.; Xu, J. From Colloidal Nanoparticles to a Single Crystal: New Insights into the Formation of Nacre's Aragonite Tablets. *J. Struct. Biol.* **2013**, *182* (1), 36–43.

Zhou, D.; Metzler, R. A.; Tyliszczak, T.; Guo, J.; Abrecht, M.; Coppersmith, S. N.; Gilbert, P. Assignment of Polarization-Dependent Peaks in Carbon K-Edge Spectra from Biogenic and Geologic Aragonite. *The Journal of Physical Chemistry B* **2008**, *112* (41), 13128–13135.

Zou, Z.; Bertinetti, L.; Politi, Y.; Fratzl, P.; Habraken, W. J. E. M. Control of Polymorph Selection in Amorphous Calcium Carbonate Crystallization by Poly(Aspartic Acid): Two Different Mechanisms. *Small* **2017**, *13* (21), 1603100.

Liste des abréviations

	SIGNIFICATION EN ANGLAIS	EQUIVALENT EN FRANÇAIS
AC	Anti-body	Anticorps
ACC	Amorphous Calcium Carbonate	Carbonate de Calcium Amorphe
ACP	Amorphous Calcium Phosphate	Phosphate de Calicum Amorphe
AFM	Atomic Force Microscopy	Microcopie à force atomique
CLEM	Correlative Light and Electronic Microscopy	Microscopie optique et électronique corrélative
CP	Cross-Polarization	Polarisation Croisée
CRYO-SEM	Cryogenique Scanning electronic Microscopy	Microscopie Electronique à Balayage Cryogénique
CSA	Chemical Shift Anisotropy	Anisotropie de Déplacement Chimique
DFS	Dual Frequency Sweep	
DFT	Density Functional Theory	
DNP	dynamic nuclear polarisation	Polarisation dynamique nucléaire
EDX	Energy Dispersive X-ray Spectroscopy	Analyse Dispersive en Energie
EELS	Electron energy loss spectroscopy	Spectroscopie des pertes d'énergie
EXAFS	Extended X-Ray Absorption Fine Structure	
FESEM	Field Emission Scanning Electron Microscopy	Microscopie Electronique à Balayage à Emission de Champ
FETEM	Field Emission Transmission Electron Microscopy	Microscopie Electronique à Transmission à Emission de Champ
FIB	Foccus Ion Beam	Faisceau d'Ions Foccalisé
FT-IR	Fourier Transform InfraRed spectroscopy	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
HAADF	High-Angle Annular Dark-Field	
HAP	Hydroxyapatite or hydroxylapatite	Hydroxyapatite
HETCOR	Heteronuclear Correlation	
HIM	Helium Ion Microscopy	Microscopie à Ions d'Helium
HPF	hours post fertilization	heure post fécondation
HR-TEM	High Résolution Electronic Microscopy	Microscopie électronique à transmission à haute résolution
HT	Haliotis tuberculata	Haliotis tuberculata
LW	Line Width	Largeur de raie
MAS	Magic Angle Spinning	Rotation à l'Angle Magique
SEM/MEB	Scanning Electronic Microscopy	Microscopie Elctronique à Balayage
TEM/MET	Transmission Electronic Microscopy	Microscopie Elctronique à Transmission
MO	Optical Microscopy	Microscope optique
NS	Scan Number	Nombre de scans

OCP	Octacalcium phosphate	Phosphate octocalcique
PAF	Paraformaldehyde	Paraformaldéhyde
RD	Recycle Delay	Temps de Recyclage
REDOR	Rotational-Echo Double-Resonance	
SEM-FEG	Field Emission Gun Scanning Electronic Microscopy	Microscope électronique à balayage à effet de champ
SSNMR	Solid-State Nuclear Magnetic Resonance	Résonanace Magnétique Nucléaire à l'Etat Solide
STEM	Scanning Transmission Electronic Microscopy	Microscopie electronique à transmission à Balayage
STXM	Scanning Transmission X-ray Microscopy	Microscopie en transmission à balayage de rayons X
T_{CP}	Contact Time	Temps de contact lors de la polarisation croisée
TRAPDOR	TRAnsfer of Population in DOuble Resonance	
XANES	X-ray Absorption Near Edge Structure	Spectroscopie de structure près du front d'absorption de rayons X
XRD	X-ray diffraction	diffractométrie de rayons X