

Implications de la diversité de composition des phases organiques solubles extraites des squelettes carbonatés

YANNICKE DAUPHIN¹

Mots clés. – Matrice organique soluble, Sclérentinaires, Mollusques, Masses moléculaires, Acidité.

Résumé. – Les phases organiques solubles ont été extraites des squelettes carbonatés de mollusques et d'un sclérentinaire. Leur composition a été analysée par spectrométrie UV, HPLC avec double détection et électrophorèse 2D. Les résultats confirment les quelques données existantes sur ces matériels : non seulement les quantités de matrices solubles mais également leurs propriétés diffèrent d'un taxon à l'autre. Les proportions sucres – protéines, les masses moléculaires et l'acidité de ces produits sont caractéristiques de chaque espèce. Chaque espèce aura donc un comportement particulier pendant la fossilisation. Dans les coquilles à couches multiples, chaque microstructure subira une évolution diagénétique différente. Après la mort des organismes, l'altération de leur test provoquera plus ou moins rapidement la libération de ces composants. De ce point de vue, les coquilles les moins résistantes, donc qui ont la plus faible probabilité de se fossiliser, sont celles qui contribuent le plus à l'enrichissement du milieu en composants organiques. La composition faunique d'une zone aura alors une grande importance dans l'évolution du milieu environnant. Incorporés dans les nouveaux sédiments, ces composés solubles influent sur les précipitations carbonatées non biogéniques. Bien que non visibles sous forme de débris, ces composants solubles contribuent ainsi fortement, notamment par leur forte acidité, à remodeler la composition de l'eau de mer et des sédiments.

Implication of the compositional diversity of the soluble organic matrices of carbonate skeletons

Key words. – Soluble organic matrix, Scleractinia, Molluscs, Molecular weights, Acidity.

Abstract. – The soluble organic matrices were extracted from carbonated shells of molluscs and a Scleractinia. The composition was analysed with UV spectrometry, HPLC with a dual detection and 2D electrophoresis. Few data are available on such components. However, the obtained results confirm the previous data : quantities but also properties of the matrices are characteristic of the taxa. Proteins/sugars ratios, molecular weights and acidities differ in all the studied samples. The diagenetic changes are different for different species. In a multilayered shell, each layer has a particular diagenetic evolution. Thus, some biases are induced in the faunal statistics used in palaeoecological studies. After the death of the animal, the rates of degradation of the skeletons are different. The soluble organic matrices are more or less rapidly dispersed in sea water, depending on the resistance of the skeletons. From this point of view, fragile shells contribute largely to the organic composition changes of surrounding water. The faunal composition and the biochemical characteristics of the skeletons are important for the evolution of the marine environment. Their soluble organic matrices are dispersed in the water and sediments, and their strong acidity plays a major role in the precipitation of carbonates. Moreover, these invisible matrices are permanently recycled in sedimentary processes.

INTRODUCTION

Il est maintenant largement admis que les carbonates d'origine biogénique sont composés de deux phases : une phase minérale (calcite et aragonite le plus souvent), et une phase organique. Les caractéristiques de la phase minérale : minéralogie, composition chimique élémentaire, microstructure... sont utilisées d'une part pour la systématique et la phylogénie, d'autre part pour la reconstitution des paléoenvironnements. Cependant, le rôle et l'ampleur de la contribution des carbonates d'origine biologique dans la sédimentation carbonatée sont loin d'être clairement établis. Si les particularités de la phase minérale sont relativement bien connues chez les organismes actuels, il n'en est pas de même pour la composante organique. Quelques

grandes tendances ont pu être déterminées, telles que l'abondance de protéines et de sucres acides, mais les données détaillées restent rares. L'une des raisons de cet état de chose tient à la complexité et à la diversité des phases organiques. Or pour tenter de retrouver l'origine des composants organiques fossiles, il est non seulement nécessaire de connaître les phases organiques des représentants actuels des divers taxons, mais il convient d'utiliser les mêmes méthodes analytiques pour les fossiles. L'abondance de « la » matière organique est certes reconnue dans de nombreux sédiments et les tentatives de reconstitutions paléoenvironnementales à partir de ces informations se multiplient. Mais la plupart de ces analyses est limitée aux composés organiques insolubles figurés (palynomorphes par exemple), le plus souvent d'origine végétale. Il y a en fait une grande la-

¹ UMR 8616 (ORSAYTERRE) du CNRS, et laboratoire de micropaléontologie, case 104, Université Paris VI, 4 place Jussieu, F-75252 Paris cedex. Manuscrit déposé le 27 février 2001 ; accepté après révision le 26 février 2002.

cune en ce qui concerne les composés organiques issus des carbonates biogéniques, tant pour les références actuelles que pour les fossiles et les processus diagénétiques. Parmi ces molécules organiques, les phases solubles, moins résistantes aux altérations, sont susceptibles d'influer davantage sur la composition des sédiments que les composés insolubles, notamment ceux qui demeurent morphologiquement identifiables. La quantité et les propriétés (acidité notamment) des phases organiques solubles, en constante évolution, modifient en permanence le milieu marin et en conditionnent les paramètres physico-chimiques.

Plusieurs facteurs sont à prendre en compte. D'une part, il n'est pas certain que les fossiles figurés, c'est-à-dire ceux que l'on trouve « entiers », aient le rôle le plus important. Les fossiles réputés fragiles, facilement détruits et libérant donc rapidement leurs phases organiques, participent à la formation des sédiments à un stade précoce. Leur influence est donc importante puisque cette matière organique peut modifier les conditions géochimiques du milieu. D'autre part, l'abondance et la diversité de composition des phases organiques dépendent de la position taxonomique de l'organisme. Les abondances relatives d'organismes appartenant à des taxons différents ne sont donc pas sans conséquence. Enfin, on ignore le plus souvent quel est l'état réel de conservation d'un fossile en apparence intact, notamment du point de vue de sa composition.

Pour tenter d'appréhender la réelle diversité de ce que l'on appelle habituellement « la » phase organique, il est donc nécessaire d'analyser des squelettes appartenant à plusieurs groupes zoologiques, ayant des structures et des minéralogies différentes. Or les données demeurent actuellement très ponctuelles. Bien que fort restreinte, la sélection ci-dessous tente de répondre à ces conditions : le genre *Sepia*, rarement trouvé à l'état fossile, est abondant à l'époque actuelle. Les coquilles, très nombreuses à échouer sur les côtes, se fragmentent rapidement et constituent une fraction non négligeable du sable. Un autre type de coquille est représenté par le genre *Pinna*. Rare à l'état fossile, il peut être comparé aux inocérames par la structure et la minéralogie. Ces derniers sont généralement trouvés en fragments. Les bivalves sont fréquents et variés dans les milieux actuels, et parmi ceux que l'on trouve « en bon état », le genre *Cardium* peut servir d'exemple. Il en est de même pour les scléactiniaires, représentés par le genre *Favia*, abondant dans les zones récifales.

TRAVAUX ANTÉRIEURS

Parmi les quatre taxons choisis, *Sepia* est celui dont la microstructure et la composition de la phase organique soluble sont probablement les mieux connues dans l'état actuel des données. La structure des tests a été décrite à plusieurs reprises, et des homologies avec les coquilles des autres céphalopodes ont été proposées [Barskov, 1973 ; Dauphin, 1979, 1981]. Le bouclier dorsal et le bourrelet ventral, sont composés de trois couches riches en matières organiques : une couche externe prismatique sphérolitique, une couche nacréée médiane et une fine couche prismatique interne (fig. 1a-c). Ces couches ont des épaisseurs inégales dans les diverses parties du test. La coquille est aragonitique, avec les faibles teneurs en Sr et Mg caractéristiques des mollusques. Le soufre est peu abondant. La composition organo-minérale a été mise en évidence par spectro-

métrie infrarouge [Dauphin *et al.*, 1996], et les teneurs en sucres élémentaires sont connues [Dauphin et Marin, 1995 ; Okutani et Morikawa, 1978a, b]. Les composés solubles, essentiellement acides, ont une large gamme de masses moléculaires [Dauphin et Kervadec, 1994 ; Dauphin, 1996, 2001a].

La coquille de *Pinna* comporte deux couches : une couche externe prismatique calcitique, riche en Mg et S, et une couche interne nacréée qui se développe sur une surface très restreinte. Les gros prismes polygonaux de la couche calcitique ont un diamètre de 50 à 100 μm (fig. 1d) et sont entourés d'un épais fourreau organique [Grégoire, 1961 ; Cuif et Raguideau, 1982 ; Cuif *et al.*, 1983, 1987], dont la disparition favorise la dissociation en fragments. Les stries de croissance des prismes sont aisément visibles (fig. 1e). La matrice soluble des prismes contient plusieurs fractions de masses différentes [Cuif *et al.*, 1989], et les sucres acides et sulfatés y sont abondants [Marin *et al.*, 1994].

Le test de *Cardium* est aragonitique, composé de couches à structure lamellaire croisée [Boggild, 1930 ; Denis, 1972] (fig. 1g-h). Cette structure est l'une des plus abondantes chez les gastéropodes et les lamellibranches. Sauf chez le genre *Patella*, elle est aragonitique. Les teneurs en Mg, Sr et S sont faibles, et la phase organique est peu abondante. La composante protéique y semble plus importante que dans d'autres mollusques ayant une microstructure similaire [Dauphin et Denis, 2000].

Le test de *Favia stelligera* est formé de fibres aragonitiques dont les stries de croissance très régulières, reflètent vraisemblablement une alternance de niveaux plus ou moins riches en matrice organique. Les centres de calcification sont composés de microcristaux, également aragonitiques [Cuif et Dauphin, 1998] (fig. 1h-i). Comme chez la plupart des scléactiniaires, les centres sont plus riches en S (2 510 ppm) que les fibres (1 700 ppm). En milieu non dénaturant, une électrophorèse par isofocalisation de la matrice organique soluble permet de mettre en évidence les sucres, acides et probablement sulfates [Dauphin et Cuif, 1997]. Cette matrice extraite du squelette est riche en acides aminés acides et en glycine [Cuif *et al.*, 1997], en fructose et en galactose [Cuif *et al.*, 1999].

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel

Les spécimens de *Sepia* sp. (Mollusca, Cephalopoda) proviennent du littoral de Nouvelle Calédonie. Les fragments ont été prélevés dans le milieu de la coquille, et comportent donc les trois couches du bouclier dorsal ainsi que celles du bourrelet ventral. Seule la couche externe prismatique calcitique de *Pinna nobilis* (Mollusca, Bivalvia) de Port Cros a été utilisée. L'origine des coquilles de *Cardium* sp. (Mollusca, Bivalvia) n'est pas connue. Les tests de *Favia stelligera* (Cnidaria, Scleractinia) proviennent de Polynésie française.

La BSA (bovine serum albumin) sert de référence pour les protéines, et la chondroïtine sulfate (CS) pour les sucres sulfatés.

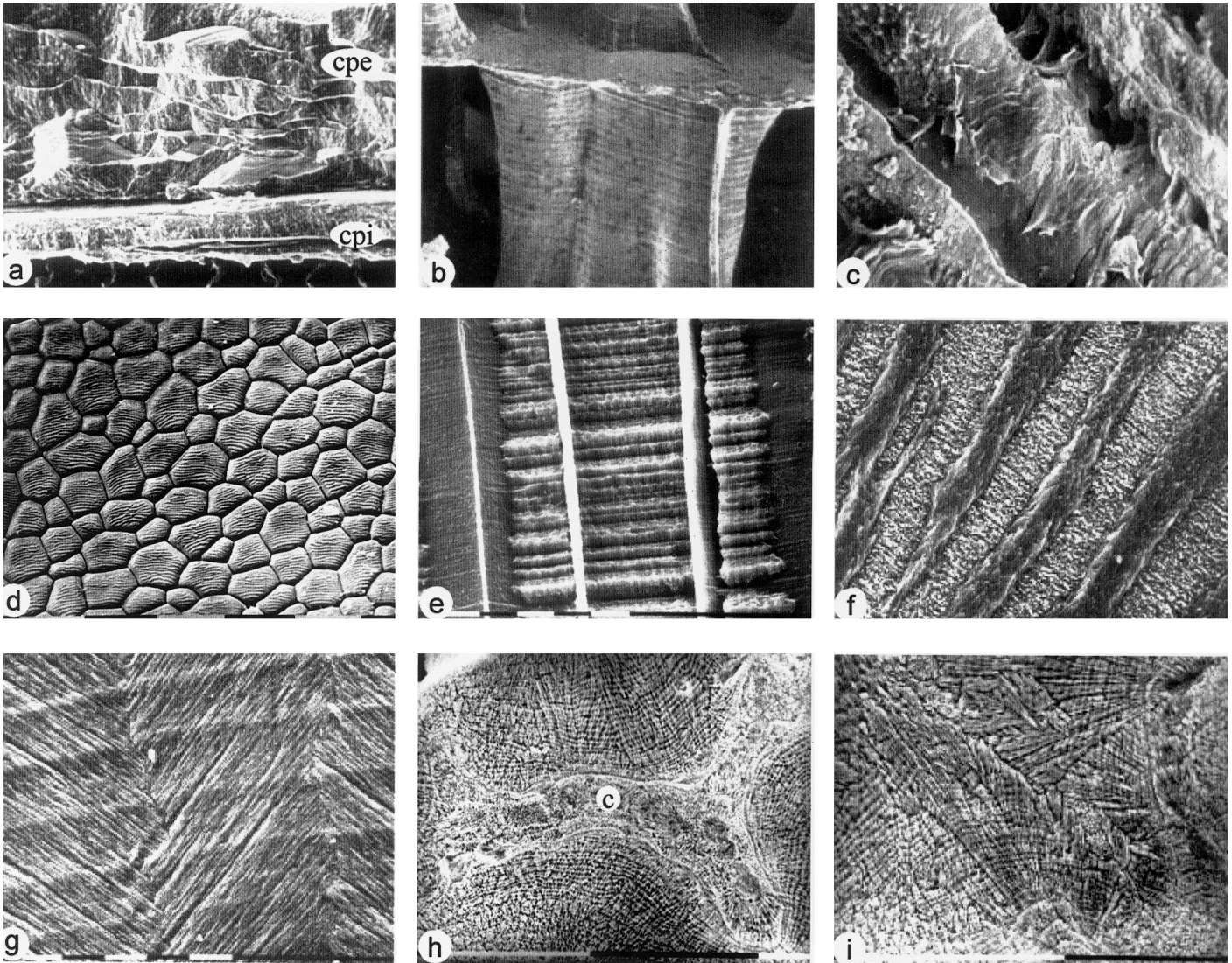


FIG. 1. – Microstructures. a- Couche prismatique externe (cpe), couches nacréée et prismatique interne (cpi) du bouclier dorsal de *Sepia* – $\times 90$. b- *Sepia* : pilier du bourrelet ventral, dont la couche prismatique externe montre des stries de croissance – $\times 255$. c- *Sepia* : repli ventral avec de nombreuses couches organiques – $\times 120$. d- *Pinna* : surface de la couche externe prismatique – $\times 105$. e- *Pinna* : coupe verticale des prismes calcitiques montrant les nombreuses stries de croissance ; surface polie attaquée et fixée dans une solution d'acide acétique (1 %) + glutaraldéhyde (12 %) + bleu alcian ethanol (0,05 %), 24 mn – $\times 535$. f- *Cardium* : lamelles de premier ordre de la structure lamellaire croisée ; surface polie traitée à HCl 5 %, 15 s – $\times 630$. g- *Cardium* : autre aspect typique de la structure lamellaire croisée ; surface polie traitée à HCl 5 %, 15 s – $\times 635$. h- *Favia* : centres de calcification (c) et fibres aragonitiques avec de nombreuses stries de croissance ; surface polie traitée à l'acide formique (0,01 %) et glutaraldéhyde (3 %), 35 s – $\times 255$. i- *Favia* : fibres aragonitiques organisées en faisceau et stries de croissance ; surface polie traitée à l'acide formique (0,01 %) et glutaraldéhyde (3 %), 35 s – $\times 320$.

FIG. 1. – Microstructures. a- Outer prismatic layer (cpe), thin nacreous layer and inner prismatic layer (cpi) of the dorsal shield of *Sepia* – $\times 90$. b- *Sepia* : pillar of the ventral part (swelling) with growth layers in the outer prismatic layer – $\times 255$. c- *Sepia* : ventral process with abundant organic layers – $\times 120$. d- *Pinna* : surface of the outer calcitic prismatic layer – $\times 105$. e- *Pinna* : vertical section in the prisms showing the growth layers ; polished and etched section : acetic acid (1 %) + glutaraldehyde (12 %) + alcian blue – ethanol (0,05 %), 24 mn – $\times 535$. f- *Cardium* : first order lamellae of the crossed lamellar structure ; polished and etched section (HCl 5 %, 15 sec) – $\times 630$. g- *Cardium* : another typical view of the crossed lamellar structure polished and etched section (HCl 5 % 15 sec) – $\times 635$. h- *Favia* : centers of calcification (c) and aragonitic fibres and growth layers ; polished and etched section : formic acid 0,1 + glutaraldehyde (3 %), 35 s – $\times 255$. i- *Favia* : aragonitic fibres arranged in bundles and showing growth layers polished and etched section : formic acid 0,1 % + glutaraldehyde (3 %), 35 s – $\times 320$.

Méthodes

Extraction et purification des composés organiques solubles

Après décontamination à l'hypochlorite de Na, les fragments de coquilles ont été rincés à l'eau Milli-Q, puis séchés à l'étuve à 38°C. Ces fragments ont été ensuite broyés, puis décalcifiés à l'acide acétique à pH 4. Les phases organiques solubles et insolubles sont séparées par centrifugation pendant 15 min à 20 000 g. Le surnageant (phase

soluble) est dessalé par ultrafiltration sur une membrane dont le seuil de coupure est de 3 kDa, contre de l'eau Milli-Q, avant d'être lyophilisé.

Spectrométrie UV

Les matrices solubles lyophilisées sont dissoutes dans de l'eau Milli-Q. Le spectrophotomètre Shimadzu UV-1601 à double faisceau optique est équipé de lampes au tungstène et au deutérium. La fente du monochromateur est de 2 nm. Avant l'acquisition des spectres, un fond continu est établi

sur de l'eau Milli-Q. Les spectres sont enregistrés entre 250 et 350 nm.

HPLC : chromatographie liquide haute pression

Une colonne TSK en polymères (GW5000) dont la gamme de tri linéaire s'étend de 1000 kDa à 40 kDa est éluée avec un tampon Tris 0,20 M ajusté à pH 7,5 avec HCl, à un débit de 1 ml/mn. Deux détecteurs sont disposés en série : un réfractomètre et un détecteur UV réglé à 226 nm. Le décalage de temps entre les deux détecteurs est de 65/100 mn.

Electrophorèse dénaturante sur gel 2D

Première dimension : les ensembles moléculaires sont séparés par isofocalisation (IEF) sur des bandes IPG (Immobiline DryStrip, 11 cm, pH 3-10, Pharmacia Amersham Biotech) sur un système Multiphor II. L'échantillon lyophilisé est directement dissous dans une solution d'urée, 2-Mercaptoethanol, Pharmalyte 3-10, Triton X100 et Bleu de Bromophenol, puis centrifugé pendant 10 min à 17 500 g. Le surnageant sert de solution de réhydratation de la bande Immobiline dans une cassette horizontale pendant 18 h. Les paramètres de l'IEF sont : 300 V pendant 6 h 30, 2 000 V pendant 11 h. La température est maintenue à 20 °C par un système thermostaté Multitemp III.

Lorsque la migration est achevée, et avant la séparation selon la seconde dimension, les bandes sont équilibrées pendant 15 min dans une solution de 50 mM Tris/HCl pH 6,8, urée 6 M, 25 % glycérol, 30 mM DTT et 0,2 % SDS. Le tampon est ensuite changé et les bandes sont mises dans une nouvelle solution de 50 mM Tris/HCl pH 6,8, urée 6 M, 25 % glycérol, 0,2 % SDS et iodoacetamide pendant 15 min.

La séparation des masses moléculaires est effectuée sur des gels polyacrylamide à gradient linéaire (ExcelGel SDS, 245 × 110 × 0,5 mm : APB). La gamme des masses moléculaires pouvant être séparées s'étend de 6,5 à 300 kDa, la zone de tri linéaire étant de 14 à 170 kDa. Des standards BioRad kaleidoscope sont utilisés comme marqueurs. Les paramètres de cette phase de l'électrophorèse sont : 200 V-20 mA pendant 40 min, 600 V-35 mA pendant 105 min sur le système Multiphor II. La température est maintenue à 15 °C.

Après l'électrophorèse, les gels de *Sepia* et *Cardium* ont été lavés et fixés dans un bain contenant 40% de méthanol et 10% d'acide acétique pendant 30 min, puis dans deux bains successifs contenant méthanol et d'acide acé-

tique. Ils ont été colorés à l'argent avec le kit Biorad Silver stain pour les protéines et les glycoprotéines (faiblement glycosylées). Les gels de *Pinna* et *Favia* ont été soumis à une double coloration : ils sont lavés pendant 24 h dans une solution contenant 40 % de méthanol et 10 % d'acide acétique, afin d'éliminer le SDS inclus dans le gel et qui peut se colorer au bleu alcian. Le bleu alcian colore les mucopolysaccharides acides et sulfatés (la chondroïtine sulfate par exemple, mais pas les protéines). Après coloration au bleu alcian et décoloration, ils ont été colorés à l'argent.

RÉSULTATS

Composition globale

En spectrométrie UV (fig. 2A), la BSA montre un pic très net à 278 nm, pic « moyen caractéristique » des protéines dû aux trois acides aminés aromatiques : phénylalanine, tyrosine et tryptophane, ce dernier étant peu abondant. La chondroïtine sulfate (CS) ne présente aucun pic identifié, seulement une inflexion située vers 260 nm.

Aucun pic n'est détectable dans le spectre du *Cardium*, malgré une inflexion à 275 nm. Les trois autres spectres : *Sepia*, *Pinna* et *Favia*, ont des allures similaires et diffèrent nettement de *Cardium* (fig. 2B). Alors que celui-ci présente un profil relativement semblable à celui de la BSA : lente montée vers 275 nm, puis redescende vers des intensités plus faibles, *Sepia*, *Pinna* et *Favia* ont une pente irrégulière descendante de 250 à 350 nm (sauf une faible inflexion située vers 280 nm). Le contenu protéique des matrices squelettiques solubles est donc masqué par un autre composant.

Masses moléculaires (HPLC)

La fraction glucidique de *Sepia* est très peu importante, et le réfractomètre ne décèle qu'un faible pic correspondant à une masse moléculaire pouvant être estimée à 80-85 kDa (fig. 3A). Le signal à 226 nm est nettement plus intense, avec une montée progressive jusqu'à un pic majeur de 80-85 kDa. Une inflexion, hors de la zone de tri linéaire de la colonne, indique l'existence de masses supérieures à 1 000 kDa (fig. 3B). La bonne correspondance des profils obtenus par les deux détecteurs montre que le pic principal a une double composition, glycoprotéique.

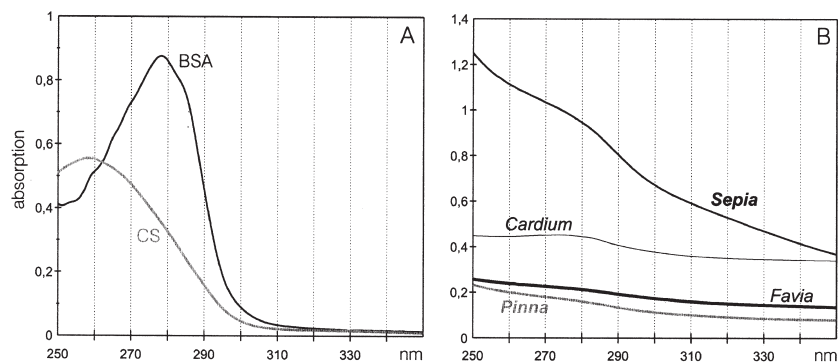


FIG. 2. – Spectres UV. A- Bovine serum albumine (BSA) et chondroïtine sulfate (CS). B- Matrices organiques solubles extraites des squelettes carbonatés.

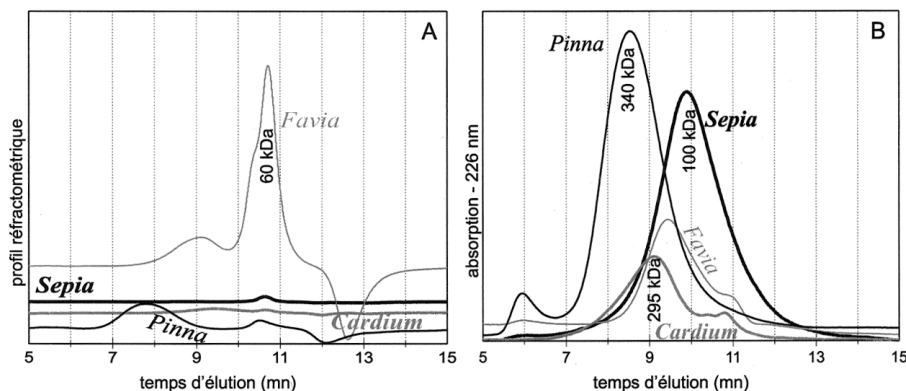


FIG. 3. – Estimation des masses moléculaires en HPLC. A- Profils réfractométriques. B- Profils UV à 226 nm.
 FIG. 3. – Estimated molecular weights in HPLC profiles. A- Refractometric profiles. B- UV 226 nm absorbance profiles.

La fraction glucidique de *Pinna* comporte une masse de l'ordre de 1 000 kDa (fig. 3A). Ce premier « pic », largement étalé, est en fait probablement composé de plusieurs pics correspondant à des molécules mal séparées. Le second pic dont la masse peut être estimée à 120 kDa est moins intense. Les pics détectés à 226 nm ne correspondent pas aux précédents (fig. 3B) : le premier étant situé en dehors de la gamme de tri linéaire de la colonne, sa masse est supérieure à 1 000 kDa. Le second pic, le plus intense a une masse estimée à 340 kDa. Les composants à dominante « sucres » et « protéines » n'ont donc pas des masses similaires chez *Pinna*.

Le profil d'éluion réfractométrique de *Cardium* est presque plat (fig. 3A). Par contre, le spectre UV montre trois pics d'inégale intensité, et une faible inflexion pour les masses supérieures à 1 000 kDa. Les masses moléculaires du premier pic visible dans la gamme de tri peuvent être estimées à 295 kDa, le dernier pic étant situé vers 40 kDa (fig. 3B).

Le profil réfractométrique de *Favia* montre deux pics d'intensité inégale, le second possédant une inflexion indiquant une mauvaise séparation des masses. Les masses les plus grandes sont de l'ordre de 150 kDa, le pic majeur vers 60 kDa. Le pic négatif situé au-delà des 40 kDa est probablement dû à un dessalage imparfait (fig. 3A). Le profil UV montre une légère inflexion pour les masses supérieures à 1 000 kDa (fig. 3B). Ainsi, les proportions sucres – protéines de chaque pic sont différentes.

La gamme de tri linéaire de la colonne utilisée est relativement restreinte, mais permet de constater que des masses moléculaires supérieures à 1 000 kDa sont présentes. Pour un genre donné, les profils « glucidique » et « protéique » peuvent être similaires (*Sepia*) ou clairement différents (*Favia*). De plus, les profils « glucidiques » diffèrent entre les quatre genres, et il en est de même si l'on compare leurs profils « protéiques ».

Points isoélectriques et masses moléculaires (électrophorèse 2D) (fig. 4)

L'examen des bandes de la première dimension (pI) de *Sepia* montrent que les masses dominantes sont acides. Le gel de la seconde dimension (masses moléculaires) confirme l'abondance des produits acides. Ces molécules sont très bien séparées selon les pI (nombreuses fines bandes verticales), mais mal séparées selon les masses (absence de bandes horizontales). La grande majorité des masses moléculaires a des pI compris entre 3 et 5,5. Toutes les masses

couvertes par la gamme du gel sont présentes dans cette zone, et sont nettement séparées par les pI. Des petites masses (inférieures à 70 kDa environ) sont également bien séparées selon leurs pI dans une zone comprise entre 5,5 et 7 environ. Dans la zone basique, très peu colorée, quelques masses sont visibles dans le domaine des masses comprises entre 200 et 300 kDa. La zone non colorée (pI acides, faibles masses moléculaires) est présente dans les différents gels réalisés dans des conditions identiques.

Malgré la double coloration (bleu alcian et argent), la couleur dominante de la bande de la première dimension des prismes de *Pinna* est due au bleu alcian, indiquant l'importance des sucres acides et sulfatés. Cette coloration intense ne se retrouve pas dans le gel de la seconde dimension. Il est vraisemblable qu'une partie des masses est trop élevée et ne peut pénétrer dans ce gel. Seule la partie acide des petites molécules est colorée. La coloration à l'argent (protéines) n'est visible que sur une fine bande dans la zone la moins acide de la partie colorée.

La partie acide de la bande IEF de *Cardium* a une coloration intense, la zone des pI basiques et moyens est pratiquement exempte de toute coloration. La zone la plus acide possède de nombreuses bandes séparées selon les pI, continues des masses les plus élevées jusqu'aux plus faibles. La zone moyennement acide est surtout représentée par des masses faibles (< 35 kDa). La zone acide des petites masses moléculaires montre une « lacune » en forme de poire.

Sur la première coloration au bleu alcian, la bande IEF de *Favia* est colorée principalement dans sa moitié acide. Le gel en 2D est peu coloré, sauf dans la zone acide des faibles poids moléculaires (données non figurées). La plus grande partie de ces molécules doit donc avoir des masses supérieures à 300 kDa. La coloration à l'argent est beaucoup plus intense dans le gel en 2D. La zone des masses entre 300 et 200 kDa n'est pratiquement pas colorée, de même que la zone basique des faibles molécules. Les limites intermédiaires ondulent, les bandes selon les pI étant mieux séparées. Là encore, une lacune apparaît dans les zones acides des petites masses.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les quatre exemples examinés ne représentent qu'une infime fraction d'organismes à test carbonaté. Cependant, ils permettent déjà de mettre en évidence un certain nombre de faits.

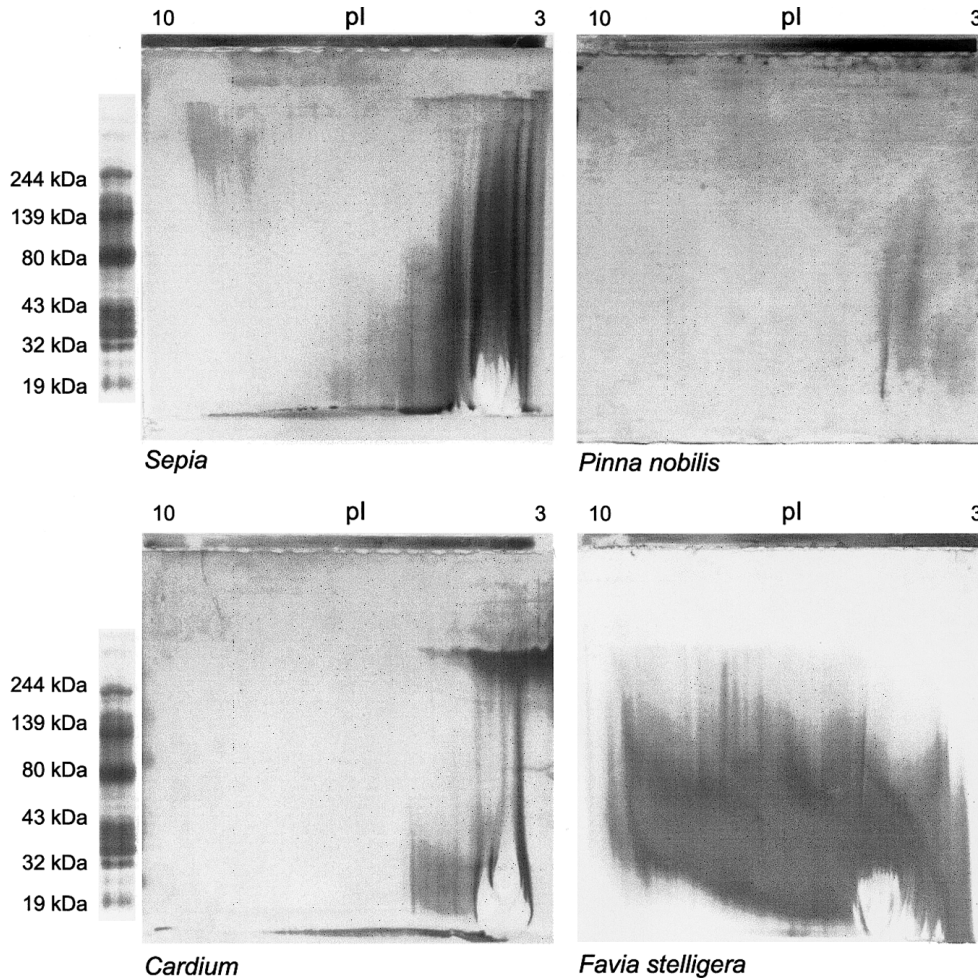


FIG. 4. – Electrophorèse en 2D sur gels en acrylamide. *Sepia* et *Cardium* : coloration à l'argent pour les protéines faiblement glycosylées. *Pinna* et *Favia* : coloration au bleu alcian pour les sucres acides et sulfatés, puis à l'argent. La séparation selon les points isoélectriques (pI) est bonne (fines bandes verticales), alors que la séparation selon les poids moléculaires est très médiocre (pas de bandes horizontales nettement marquées).

FIG. 4. – 2D electrophoresis on acrylamide gels. *Sepia* and *Cardium* : Ag stain for weakly glycosylated proteins. *Pinna* and *Favia* : alcian blue stain for acidic and sulfated mucopolysaccharides, followed by a Ag stain. The separation according to the isoelectric points (pI) is good (thin vertical bands), whereas the separation according to the molecular weights is poor (no clear horizontal bands).

Différences de composition

Une simple analyse en spectrométrie UV montre la complexité de la composition mais aussi les différences existant entre les quatre taxons. L'une des caractéristiques les plus évidentes des spectres est que la partie protéique n'apparaît pas sous forme de pic. Deux raisons peuvent être invoquées : l'absence dans les protéines des acides aminés responsables de ce pic, ou bien le « masquage » des protéines par un autre composant. Ces deux causes ne sont d'ailleurs pas exclusives.

Les analyses d'acides aminés ne fournissent pas une réponse claire à ce problème, car le tryptophane, principal responsable du pic à 278 nm, est détruit lors de l'hydrolyse. La spectrométrie infrarouge apporte des indications plus précises : dans le cas de *Sepia* par exemple, des bandes apparaissent dans la zone des sucres. En outre, les analyses des monosaccharides et les colorations de gels d'électrophorèse en une dimension confirment cette double composition : protéines et sucres [Dauphin et Marin, 1995 ; Dauphin, 2001a]. En milieu non dénaturant, ces gels sont

facilement colorés par le bleu de Coomassie ou l'argent, ce qui indique que les protéines sont peu ou pas glycosylées.

Par contre, les électrophorèses en 1D ont montré que la composante la plus immédiatement visible de *Pinna* correspondait aux sucres acides sulfatés [Marin *et al.*, 1994], soufre dont l'abondance est connue par les analyses à la microsonde électronique [Masuda et Hirano, 1980 ; Marin *et al.*, 1994]. La phase protéique des prismes de *Pinna* est également acide, ainsi qu'en témoignent les analyses d'acides aminés montrant leurs très fortes teneurs en acides aspartique et glutamique [Nakahara *et al.*, 1980 ; Cuif *et al.*, 1987].

La composition en acides aminés de *Cardium* ne semble pas avoir été encore établie, et d'après une chromatographie en échanges d'ions, sa matrice soluble semble moins acide que celle des autres structures de type lamellaire croisée [Dauphin et Denis, 2000].

La composition protéines + sucres semble également être celle de la phase organique soluble extraite de la plupart des sclérectiniaires dont *Favia stelligera* est ici l'exemple [Dauphin, 2001b]. L'acidité de la matrice soluble

est montrée d'une part par la composition en acides aminés : les acides aspartique et glutamique représentent près de 48 % [Cuif *et al.*, 1999], mais aussi par l'électrophorèse (IEF) en 1D [Dauphin et Cuif, 1997].

Les différences de composition détectées par les méthodes de caractérisation globale ne sont pas les seules. L'électrophorèse en 2 dimensions montre en outre que les proportions sucres – protéines sont très variables entre les quatre genres. De plus, les acidités et les masses moléculaires ne sont pas identiques. Cette méthode de séparation, courante pour les matrices organiques des tissus mous, n'a pratiquement pas été utilisée sur des extraits de squelettes carbonatés. Dans l'ensemble, la bonne séparation selon les pI confirme ce qui a été obtenu par IEF en milieu non dénaturant [Dauphin et Cuif, 1997], alors que la mauvaise séparation selon les masses moléculaires confirme les résultats obtenus par chromatographie liquide [Dauphin, 2001a et b] ou par l'électrophorèse en 1D [Weiner et Lowenstam, 1977] sur d'autres taxons.

Les résultats des diverses méthodes d'analyses convergent donc pour montrer qu'en dépit de caractéristiques communes (présence de protéines et de sucres), les matrices solubles des quatre taxons étudiés diffèrent nettement. Non seulement elles diffèrent par leur abondance, mais aussi par leur composition et leur structure, ainsi que cela a été démontré dans d'autres exemples de scléactiniaires et de mollusques [Dauphin, 2001b].

Les méthodes d'analyse

Bien que l'HPLC et l'électrophorèse 2D servent toutes deux à estimer les masses moléculaires, leur utilisation conjointe sur un même produit n'est pas redondante. En effet, l'utilisation de colonnes avec des compositions et des gammes de tri différentes, associées à divers détecteurs, est une méthode rapide. En outre, il est possible de monter en série des colonnes, ce qui permet d'étendre cette gamme de tri en une seule chromatographie [Dauphin, 2001a et b]. Les masses moléculaires triées par la colonne choisie atteignent 1000 kDa, ce qui est largement supérieur à ce qui est permis sur les gels d'électrophorèse en polyacrylamide. Pour obtenir une gamme comparable, deux gels différents sont nécessaires (polyacrylamide et agarose), ce qui nécessite plus de matrice soluble. Or certains tests actuels sont peu riches en cette fraction (*Cardium* par exemple) ; cet inconvénient est rencontré chez les fossiles. Les gels d'électrophorèse présentent cependant l'avantage de pouvoir être colorés plusieurs fois, avec ou sans décoloration intermédiaire, afin de déterminer la présence de sucres acides ou neutres, sulfatés ou non, de protéines, etc. La composition de chaque point du gel (donc de chaque pI et de chaque masse) est ainsi visible.

Ainsi que cela a été constaté sur d'autres matrices extraites de squelettes carbonatés, les séparations selon les pI sont très bonnes, alors que celles selon les masses sont médiocres [Dauphin, 2001b]. Dès 1976, Krampitz *et al.* signalait d'ailleurs le « comportement anormal » de tels extraits. Des « smears » (ou taches aux contours imprécis) ont été également décrits par Weiner et Lowenstam [1977], et Marxen et Becker (1997) ; quant à Samata [1990], il reconnaît n'avoir aucune bande dans ces gels. L'éluant utilisé en HPLC (Tris – HCl) n'est pas très dissociant, ce qui pourrait a priori expliquer la mauvaise séparation des masses. Ce-

pendant, les tampons de l'électrophorèse 2D (contenant de l'urée et des détergents) sont habituellement considérés comme très dissociants. Or les résultats ne sont pas réellement améliorés.

Plusieurs raisons peuvent être invoquées. L'une d'elles concerne la structure des protéines. Les protéines standard fournies pour étalonner les colonnes ou les gels sont globulaires, et dans ces conditions, les séparations sont toujours excellentes. Il est donc vraisemblable que les matrices squelettiques calcaires ont une structure fibreuse : selon leur orientation par rapport aux pores des colonnes ou aux mailles des gels, les protéines sont transportées avec des vitesses apparemment différentes, ce qui provoque un étalement des pics et des bandes. Une autre cause de la mauvaise séparation en masses moléculaires est la composition de ces produits. Il ne s'agit que rarement de protéines pures ou faiblement glycosylées. Dans la plupart des cas, elles sont fortement glycosylées, ce qui modifie leur masse apparente et donc leur comportement pendant les tris. Pour estimer la masse réelle de la phase protéique, l'élimination des sucres associés est nécessaire.

Implications

La majorité des études taphonomiques tente d'élucider les mécanismes de la fossilisation par l'analyse des conditions du milieu de sédimentation ; par exemple, il est bien connu que la turbulence facilite la séparation des coquilles de bivalves et leur morcellement. Mais le phénomène inverse, c'est à dire la modification permanente du milieu sous l'influence de la désintégration des organismes qui y meurent, n'est généralement pas prise en compte. Or les phases organiques présentes dans les coquilles, par leur composition et les propriétés qui en découlent (acidité, poids moléculaires...), sont bien évidemment susceptibles d'influencer l'environnement dans lequel les squelettes carbonatés se dégradent au cours des processus de fossilisation.

Le rôle de ces différences de composition dans les phases organiques est visible alors même que les organismes sont encore vivants. Ainsi, chez les scléactiniaires, une différence de composition a été mise en évidence entre les centres de calcification et les fibres adjacentes [Cuif et Dauphin, 1998 Gautret *et al.*, 2000]. Or les centres de calcification sont une zone privilégiée d'infestation de parasites perforants, qui contribuent à fragiliser l'édifice carbonaté et à favoriser sa diagenèse précoce alors qu'il est en cours de construction. Chez les Mollusques, les épaisses gaines organiques qui entourent les prismes calcitiques de *Pinna* et *Pinctada* par exemple, sont les premières zones à être attaquées par les perforants, ce qui contribue à leur dissociation rapide.

La variété de ces phases organiques est très largement supérieure à celle des minéraux auxquels elles sont associées. Ainsi les matrices organiques solubles de cinq autres scléactiniaires aragonitiques (*Madracis*, *Enallopsammia*, *Tubastrea*, *Merulina* et *Cyphastrea*) ont des compositions différentes entre elles et différentes de celle de *Favia stelligera* [Dauphin, 2001b]. Si les taxons de rang supérieur semblent montrer des caractéristiques communes, chaque espèce, et même chaque couche d'une coquille possède une composition qui lui est propre. Par exemple, la nacre de la coquille de *Pinna* diffère de la couche prismatique du même individu ; ces deux couches sont également différen-

tes dans les *Pinctada*. De plus, les composantes organiques des couches prismatiques d'une part, et des couches nacrées d'autre part, ne sont pas identiques dans ces deux genres [Marin *et al.*, 1994].

Deux conséquences majeures découlent de ces caractéristiques, l'une concerne la fossilisation des coquilles, la seconde l'influence de la présence de cette matière organique dans les sédiments.

La diversité et la complexité des phases organiques solubles s'avèrent donc très largement supérieures à celles des phases minérales auxquelles elles sont incorporées, même si le nombre d'échantillons étudiés est jusqu'ici réduit. Non seulement l'abondance, mais aussi la composition de ces phases organiques, auront un rôle essentiel, bien qu'encore peu connu, sur la fossilisation des tests carbonatés. La résistance mécanique n'est pas le seul critère qui doit être pris en compte. Chaque espèce, voire chaque couche coquillière dans un spécimen donné, aura un comportement qui lui est propre et qui en outre changera selon les conditions de milieu. Ceci correspond tout à fait aux nombreux cas de conservation différentielle, l'exemple des prismes d'inocérames conservés, alors que la couche nacrée est fort rare, est peut être le plus connu. Mais la conservation différentielle peut également se faire au niveau des espèces, ce qui introduit des biais supplémentaires dans les bilans de faunes et les interprétations paléocéologiques qui en découlent.

Sur le plan sédimentologique, le rôle de ces phases organiques non « figurées » est encore peu étudié. Cependant, chaque type microstructural d'une espèce libérera dans le milieu des molécules spécifiques. Les compositions fauniques et les proportions des divers taxons présents ont donc un rôle important dans l'évolution des paramètres physico-chimiques de l'eau de mer dans une zone donnée. L'influence de ces molécules libérées sur la précipitation de calcite ou d'aragonite, ou sur la morphologie des minéraux précipités, est encore peu connue. Dans les années 1960, des expériences *in vitro* ont montré que la présence de chondroïtine sulfate favorisait la formation de calcite. Or un produit proche semble abondant chez les Scléactiniaires. Par contre, des acides aminés abondants dans les squelettes carbonatés, comme la glycine, ne semblent avoir aucune influence [Kitano et Hood, 1965 ; Kitano *et al.*, 1969]. Plus récemment, le rôle des phases organiques (polysaccharides sulfatés) dans la nucléation de la calcite *in vitro* a été confirmé par Addadi *et al.* [1987], et Albeck *et al.* [1996]. Non seulement la matière organique influe sur la précipitation des carbonates, mais elle est incorporée dans les minéraux formés. Par exemple, l'aragonite botryodiale contient une phase organique relativement abondante [Dauphin et Perrin, 1992]. Ces matériaux, bien qu'invisibles et dont l'étude est la plupart du temps négligée, sont donc en permanence présents, remaniés et réutilisés dans les cycles sédimentaires.

Références

- ADDADI L., MORADIAN J., SHAY E., MAROUDAS N.G. & WEINER S. (1987). – A chemical model for the cooperation of sulfates and carboxylates in calcite crystal nucleation : relevance to biomineralization. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 2732-2736.
- ALBECK S., WEINER S. & ADDADI L. (1996). – Polysaccharides of intracrystalline glycoproteins modulate calcite crystal growth *in vitro*. – *Chem. Eur. J.*, **2/3**, 278-284.
- BARSKOV I.S. (1973). – Microstructure of the skeletal layers of *Sepia* and *Spirula* compared with the shell layers of other molluscs. – *Palaent. J.*, **3**, 285-294.
- BOGGILD O.B. (1930). – The shell structure of the Mollusks. – *D. Kgl. Danske Vidensk. Selsk. Skr., Nat. Mat. Afd.*, **9**, II, 2, 230-326.
- CUIF J.P. & DAUPHIN Y. (1998). – Microstructural and physico-chemical characterizations of the « centers of calcification » in the septa of some recent Scleractinian corals. – *Paleont. Zeit.*, **72**, 3/4, 257-270.
- CUIF J.P., DAUPHIN Y., GAUTRET P. & RAGUIDEAU A. (1989). – Intérêts d'une procédure d'extraction et de fractionnement chromatographique de la composante organique des tests carbonatés actuels et fossiles. – *Bull. Soc. géol. Fr.*, **8**, V, 3, 569-575.
- CUIF J.P., DAUPHIN Y., FREIWALD A., GAUTRET P. & ZIBROWIUS H. (1999). – Biochemical markers of zooxanthellae symbiosis in soluble matrices of skeleton of 24 Scleractinia species. – *Comp. Biochem. Physiol.*, **A 123**, 3, 269-278.
- CUIF J.P., DAUPHIN Y. & GAUTRET P. (1997). – Biomineralization features in scleractinian coral skeletons : source of new taxonomic criteria. – *Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat. (sect. Geol.)*, **92**, 1/4, 129-141.
- CUIF J.P., DENIS A. & RAGUIDEAU A. (1983). – Observations sur les modalités de mise en place de la couche prismatique du test de *Pinna nobilis* L. par l'étude des caractéristiques de la phase minérale. – *Haliotis*, **13**, 131-141.
- CUIF J.P., FLAMAND D., FRÉROTTE B., CHABIN A. & RAGUIDEAU A. (1987). – Fractionnement de la matrice protéique intraprismatique chez *Pinna nobilis* L. et composition en acides aminés des différentes phases. – *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **304**, II, 9, 475-478.
- CUIF J.P. & RAGUIDEAU A. (1982). – Observations sur l'origine de l'individualité cristallographique des prismes de *Pinna nobilis* L. – *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **295**, sér. II, 415-418.
- DAUPHIN Y. (1979). – Organisation microstructurale de l'os de seiche (Cephalopoda – Dibranchiata). – *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **288**, sér. D, 619-622.
- DAUPHIN Y. (1981). – Microstructures des coquilles de Céphalopodes. II-La seiche (Dibranchiata, Decapoda). – *Palaentogr.*, **A 176**, 35-51.
- DAUPHIN Y. (1996). – The organic matrix of coleoid cephalopod shells : molecular weights and isoelectric properties of the soluble matrix in relation to biomineralization processes. – *Mar. Biol.*, **125**, (3), 525-529.
- DAUPHIN Y. (2001a). – Caractéristiques de la phase organique soluble des tests aragonitiques des trois genres de Céphalopodes actuels. – *N. Jb. Geol. Palönt. Mh.*, **2**, 103-123.
- DAUPHIN Y. (2001b). – Comparative studies of skeletal soluble matrices from some Scleractinian corals and Molluscs. – *Int. J. Biol. Macromol.*, **28**, 293-304.
- DAUPHIN Y. & CUIF J.P. (1997). – Isoelectric properties of the soluble matrices in relation to the chemical composition of some scleractinian skeletons. – *Electrophoresis*, **18**, 1180-1183.
- DAUPHIN Y. & CUIF J.P. (1999). – Relation entre les teneurs en soufre des biominéraux calcaires et leurs caractéristiques minéralogiques. – *Ann. Sci. Nat.*, **2**, 73-85.
- DAUPHIN Y., GAUTRET P. & CUIF J.P. (1996). – Evolution diagénétique de la composition chimique des aragonites biogéniques chez les spongiaires, coraux et céphalopodes triasiques du Taurus lycien (Turquie). – *Bull. Soc. géol. Fr.*, **167**, 2, 247-256.
- DAUPHIN Y. & DENIS A. (2000). – Structure and composition of the aragonitic crossed lamellar layers in six species of Bivalvia and Gastropoda. – *Comp. Biochem. Physiol. A*, **126**, 367-377.
- DAUPHIN Y. & KERVADEC G. (1994). – Comparaison des diagenèses subies par les phases minérale et protéique soluble des tests de mollus-

- ques céphalopodes coléoides. – *Palaeontogr.*, A **232**, 4-6, 85-98.
- DAUPHIN Y. & MARIN F. (1995). – The compositional analysis of recent cephalopod shell carbohydrates by Fourier transform infra red spectrometry and high performance anion exchange-pulsed amperometric detection. – *Experientia*, **51**, 278-283.
- DAUPHIN Y. & PERRIN C. (1992). – Mise en évidence de la présence de matière organique dans un ciment d'aragonite botryoidale par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). – *N. Jb. Geol. Palaont. Abh.*, **186**, 3, 301-319.
- DENIS A. (1972). – Essai sur la microstructure du test de lamellibranches. – Trav. Lab. Paléont., Université de Paris, Orsay, 1-89.
- GAUTRET P., CUIF J.P. & STOLARSKI J. (2000). – Organic components of the skeleton of scleractinian corals – evidence from in situ acridine orange staining. – *Acta Palaeont. Pol.*, **45**, 2, 107-118.
- GRÉGOIRE C. (1961). – Sur la structure submicroscopique de la conchyoline associée aux prismes des coquilles de mollusques. – *Bull. Inst. r. Sci. nat. Belg.*, **37**, 3, 1-34.
- KITANO Y. & HOOD D.W. (1965). – The influence of organic material on the polymorphic crystallization of calcium carbonate. – *Geochim. Cosmochim. Acta*, **39**, 29-41.
- KITANO Y., KANAMORI N. & TOKUYAMA A. (1969). – Effects of organic matter on solubilities and crystal form of carbonates. – *Am. Zoologist*, **9**, 681-688.
- KRAMPITZ G., ENGELS J. & CAZAUX C. (1976). – Biochemical studies on water-soluble proteins and related components of gastropod shells: In : N. WATABE & K.M. WILBUR, Eds., The mechanisms of mineralization in the invertebrates and plants. – Univ. South Carolina, 155-173.
- MARIN F., MUYZER G. & DAUPHIN Y. (1994). – Caractérisations électrophorétique et immunologique des matrices organiques solubles des tests de deux bivalves pétriomorphes actuels, *Pinna nobilis* L. et *Pinctada margaritifera* (L.). – *C. R. Acad. Sci.*, Paris, II, **318**, 1653-1659.
- MARXEN J.C. & BECKER W. (1997). – The organic matrix of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. – *Comp. Biochem. Physiol. B*, **118**, 23-33.
- MASUDA F. & HIRANO M. (1980). – Chemical composition of some modern marine pelecypod shells. – *Sci. Rept. Inst. Geosc.*, Univ. Tsukuba, sect. B, 1, 163-77.
- NAKAHARA H., KAKEI M. & BEVELANDER G. (1980). – Fine structure and amino-acid composition of the organic « envelope » in the prismatic layer of some bivalve shells. – *Venus*, **39**, 3, 167-77.
- OKUTANI K. & MORIKAWA N. (1978a). – Gel-filtration and sugar constituent of the polysaccharide extracted from the internal shell of squid. – *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **44**, 4, 369-72.
- OKUTANI K. & MORIKAWA N. (1978b). – Purification and characterization of the polysaccharide obtained from squid internal shell. – *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **44**, 7, 749-53.
- SAMATA T. (1990). – Ca-Binding glycoproteins in Molluscan shells with different types of ultrastructure. – *Veliger*, **33**, 2, 190-201.
- WEINER S. & LOWENSTAM H.A. (1977). – Discrete molecular weight components of the organic matrices of molluscan shells. – *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, **30**, 45-51.

