

**THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT  
UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE**

**Préparée à l'UFR Science Vie Terre Environnement  
Laboratoire Biogéosciences, UMR 6282**

Ecole doctorale n°554

**Environnement - Santé**

Doctorat de Biominéralisation - Paléontologie

Par

**OUDOT Morgane**

**Biominéralisation chez les céphalopodes (Mollusca) :  
processus moléculaires et évolution**

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 26 Février 2021

Composition du Jury :

Mme, VOIGHT Janet	Conservatrice Adjointe, Fields Museum, Chicago (USA)	Rapporteur
Mr GAUTRON Joël	Directeur de Recherche, INRAE, Tours	Rapporteur
Mme TAMBUTTE Sylvie	Directrice de Recherche, Centre scientifique de Monaco	Présidente
Mme ROUGET Isabelle	Professeure, MNHN, Paris	Examinatrice
Mr CHECA Antonio	Professeur, Université de Grenade (Espagne)	Examineur
Mr BASUYAUX Olivier	Ingénieur territorial, SMEL, Normandie	Examineur
Mr NEIGE Pascal	Professeur, Université de Bourgogne, Dijon	Co-directeur
Mr MARIN Frédéric	Directeur de recherche, CNRS, Dijon	Directeur



## RESUME

Les mollusques, l'un des embranchements les plus diversifiés au sein de des métazoaires, sont reconnus pour leur capacité à élaborer une structure minéralisée : la coquille. Chez ces organismes, le processus de biominéralisation est génétiquement contrôlé et réalisé en domaine extracellulaire. Il fait intervenir une matrice organique calcifiante. Cette dernière, partiellement occluse au sein de la structure coquillière, est composée de protéines, de glycoprotéines, de lipides et de polysaccharides sécrétés par l'épithélium externe calcifiant du manteau. Cette matrice constitue la « boîte à outils moléculaires » pour la minéralisation de la coquille. Depuis sa découverte, elle a surtout fait l'objet d'études chez les bivalves et les gastéropodes, laissant dans l'ombre une autre classe de mollusques toute aussi importante, les céphalopodes.

Les céphalopodes représentent une classe majeure de mollusque, dont une partie seulement des représentants actuels possède une coquille minéralisée, interne ou externe. L'histoire macroévolutive du groupe indique, depuis les formes ancestrales jusqu'aux formes les plus dérivées, une tendance générale à la réduction de la coquille, à son internalisation, voire à sa disparition complète. Si les relations de parentés entre les formes minéralisantes du clade semblent plutôt bien établies, les mécanismes moléculaires de formation coquillière restent encore très mal connus. Il est donc opportun de se demander si les représentants à coquille du clade possèdent des « boîtes à outils moléculaire » similaires pour fabriquer leur coquille ? Ce projet propose de répondre à cette question en explorant la biominéralisation coquillière de trois céphalopodes actuels, par l'utilisation d'approches biochimiques et protéomiques de la matrice coquillière, couplée à des analyses microstructurales.

Le premier modèle étudié est la spirule *Spirula spirula* (Spirulidae), petit céphalopode pélagique dont le cycle de vie demeure encore très mal documenté. Les analyses de RMN à l'état solide et de FT-IR suggèrent que les polysaccharides constituent une part importante de la matrice organique coquillière. La protéomique, et les analyses *in silico* sur des modèles métazoaires hétérologues et sur le transcriptome récemment acquis de *S. spirula* révèlent de nombreux peptides ; la majeure partie d'entre eux ne correspondant à aucune protéine coquillière déjà identifiée au sein du clade des mollusques et/ou des céphalopodes. Ces observations suggèrent que la spirule possède un répertoire coquillier unique qui ne semble pas porter un signal phylogénétique.

Le deuxième modèle est le céphalopode *Argonauta hians* (Argonautidae), à coquille externe non-homologue de celle des autres céphalopodes/mollusques puisque sécrétée ici par la première paire de bras dorsaux de l'animal. La matrice acido-soluble apparaît comme majoritaire et semble essentiellement protéique. La faible proportion de sucre est majoritairement constituée de glycosaminoglycane sulfatés. La protéomique génère de nombreuses séquences peptidiques et identifie quelques protéines, non partagées par d'autres mollusques, ce qui suggère le recrutement d'outils moléculaires uniques chez l'argonaute pour la calcification de sa coquille.

Le troisième modèle, qui fait l'objet d'une étude toujours en cours, est la seiche commune *Sepia officinalis* (Sepiidae). Les premiers résultats montrent la prépondérance de la matrice acido-insoluble, à signature FT-IR chitineuse. L'observation microscopique d'os de seiche et de préparations histologiques montre un contact étroit entre tissus organiques et minéralisés, et suggère une minéralisation bidirectionnelle, avec pour origine la couche interne prismatique du bouclier dorsal.

Nos résultats sur les trois modèles sont discutés dans le cadre de l'évolution de la biominéralisation des céphalopodes.

**Mots clés :** biominéralisation, mollusque, céphalopode, matrice organique, protéomique, évolution

## **SUMMARY**

Molluscs constitute one of the most diversified phyla within metazoans, known for their ability to mineralize a shell. The shell biomineralization process is genetically controlled and performed extracellularly *via* a calcifying organic matrix. This latter, which remains finally occluded (at least, partially) into the shell, is a mixture of proteins, glycoproteins, lipids and polysaccharides, that are collectively secreted by the external calcifying epithelium of the mantle. Today, the shell matrix is usually considered as the ‘molecular toolbox’ for constructing the shell. Since its discovery, it has been the focus of numerous studies, but mainly on bivalves and gastropods leaving cephalopods in the shadow.

Cephalopods are an important class of molluscs, from which only part of the living representatives possess a calcified shell (internal or external). The macroevolutionary history of this clade suggests – from conserved forms to the most derived ones – a general tendency to shell reduction, internalization, up to its complete disappearance. In spite of rather well established phylogenetic relationships between living shell-bearing cephalopods, molecular mechanisms responsible for the shell formation remain almost entirely unknown. Thus, one question arises: do all of these mineralizing cephalopods share a common “molecular toolbox” to elaborate their shell? This project proposes to answer this puzzling question by exploring the shell biomineralization of three living cephalopods *via* biochemical and proteomic approaches on their organic matrices, combined to a microstructural investigation of their shells.

The first model organism is the Ram’s horn squid *Spirula spirula* (Spirulidae), a small pelagic cephalopod whose biology and life cycle remain still poorly documented. Solid-state nuclear magnetic resonance and infrared analyses suggest that polysaccharides constitute a major part of the organic matrix. Proteomics and *in silico* searches on heterologous metazoans models and on the spirule’s transcriptome revealed several peptides, many of them not matching with already known molluscan or cephalopod shell proteins. These observations suggest that the Ram’s horn squid possesses a unique set of proteins and does not contain a phylogenetic signal.

The second organism, the winged argonaut *Argonauta hians* (Argonautidae), possesses an external shell, not homologous to that of other cephalopods/molluscs since it is secreted by the female’s first dorsal arm pair. The shell matrix contains an important quantity of acid-soluble proteinaceous matrix. Sugars, which are in low proportion, appear mostly as sulphated glycosaminoglycans. Proteomics identified several peptide sequences that match with a number of proteins, not shared with other molluscs. This finding may suggest the recruitment of unique molecular tools for the shell mineralization of the winged argonaut.

The third model, the common cuttlefish *Sepia officinalis* (Sepiidae), is the subject of an ongoing research. The first results reveal the high proportion of the acid-insoluble matrix, which is predominantly chitinous. Histological investigations of fresh specimens and SEM observations of the cuttlebone microstructures plead in favour of a close contact between both organic and mineralized tissues, and suggest in addition a bi-directional process of mineralization, starting from the inner prismatic layer of the dorsal shield.

Our results on the molecular / structural aspects of the biomineralization of our three models are discussed in an evolutionary perspective.

**Key words:** biomineralization, mollusc, cephalopod, organic matrix, proteomics, evolution

## Remerciements

Nous y voilà ! Après trois années de dur labeur (et une petite rallonge, merci la Covid-19 !), et avant d'entrer dans le vif du sujet, j'aimerais prendre le temps de remercier tous ceux qui m'ont accompagnée, de près ou de loin, durant ce long périple qu'est la thèse...

Tout d'abord, je tiens à remercier **Mme Janet Voight** et **Mr Joël Gautron** pour avoir accepté de rapporter ce travail de thèse, ainsi que **Sylvie Tambutté** et **Olivier Basuyaux** pour avoir accepté d'être examinateurs. Un grand merci également à **Isabelle Rouget** et **Antonio Checa** d'une part, pour leur aide, leur bienveillance et leur soutien au cours de ces trois années en tant que membres de mon comité de thèse, et d'autre part, pour avoir accepté d'examiner ce travail. Merci Antonio pour toutes les conversations que nous avons pu partager au détour d'un congrès, et pour toutes les idées et les pistes de réflexions que tu m'as données.

Je tiens sincèrement à remercier **Frédéric** : il y a tellement de choses à dire que je ne sais même pas par où commencer ! Merci de t'être rendu disponible et à l'écoute, même lorsque tu croulais sous les responsabilités administratives et les projets. Merci pour tout ce que tu m'as appris au cours de ces trois années mais surtout, merci de m'avoir initiée à une thématique que je ne connaissais pas le moins du monde avant cela. Tu m'as transmis ta passion pour les biominéralisations et je repars aujourd'hui avec le cerveau rempli de questions et d'idées. Enfin, merci pour ton soutien, ta gentillesse et ta bienveillance !

Je remercie également **Pascal** : même si j'ai souvent voulu coller une affiche « wanted » sur la porte de ton bureau, je n'en serai probablement pas là sans toi aujourd'hui. Tu m'as suivie tout le long de mes études et encadré chacun de mes stages au sein de l'Université, pour finalement me proposer ce projet auquel je n'aurai jamais osé postuler. Merci pour ton soutien et pour t'être toujours rendu disponible, malgré un emploi du temps de ministre. Merci pour la rigueur scientifique que tu m'as inculquée au cours de ces huit longues années d'études et pour ton soutien infailible tout le long de mon parcours.

Je remercie également **Laurent Plasseraud**, **Asher Schmidt** et **Cédric Broussard** pour leur travail et leur implication dans chacun des projets de cette thèse. De même à l'intention de toute l'équipe de la plateforme Cellimap, et notamment **Audrey Geissler** et **Amandine Bataille** pour leur travail en un temps record, à quelques semaines du dépôt de ce manuscrit. Merci également à **Aline Bonnotte** pour les expériences (en cours) de cryofracture.

Un grand merci à **Olivier Basuyaux**, **Suzy Moal** et à toute l'équipe du SMEL pour leur accueil, leur gentillesse et leur bienveillance dans le cadre du projet « seiche ». Merci pour ces parties de pêches à la crevette mémorables ! Merci également à **Louis Brocheriou** de s'être occupé des seiches en mon absence.

Je remercie également toutes les personnes qui ont apporté leur pierre à l'édifice. Merci à **Emilie Steimetz** pour m'avoir accordé autant de temps, notamment durant les

dernières semaines assez chaotiques de ma thèse (et encore désolée pour mon karma légendaire avec les appareils électroniques et autres machines...). Merci à **Nelly Debrosse** d'avoir été mon binôme en laboratoire : mêmes si nos collaborations ont été rares et brèves, elles m'ont énormément soulagée dans mon emploi du temps déjà bien rempli et je t'en remercie. Merci à **Rémi Laffont** d'avoir capitulé face à ma haine profonde des statistiques sous R. Merci à **Jérôme Thomas** pour ces clichés de grande qualité obtenus en un temps record, sans demande d'une contrepartie alcoolisée !

Je tiens aussi à adresser mes remerciements les plus sincères à **Irina** pour toutes les conversations scientifiques et personnelles que nous avons partagées : merci pour ton soutien et ta bienveillance dans les moments les plus difficiles, et pour ta grande bonté d'âme.

Merci également à **Emmanuelle** pour tous ces bons moments partagés entre midi et deux, pour son écoute, ses conseils et sa bienveillance. Et merci de m'avoir laissé emprunter ton microscope à la dernière minute !

Merci à notre directeur de laboratoire, si précieux : **Emmanuel**. Merci pour ta réactivité, pour ta gentillesse et ton écoute dans toutes les étapes de cette thèse, même les plus compliquées (#covid-19).

De manière moins formelle, un grand merci à mon trio infernal. Je parle évidemment d'**Adeline**, **Justine** et **Margot** ! Grâce à vous, ces trois années m'ont presque semblé douces... Merci pour tout ce que vous avez fait et continué encore de faire pour moi. Merci pour toutes ces discussions sans queue ni tête, pour les jeux de société de la pause de midi et pour tous ces fous rires mémorables et autres moments partagés. Je ne vous cacherai pas que vos petits minois m'ont affreusement manqué au cours de ces derniers mois de thèse et j'attends avec impatience nos retrouvailles autour d'un bon plateau japonais !

*Merci Adeline d'avoir su éponger mes crises d'angoisses de dernières minutes, merci Justine pour les séries déjantées que tu m'as recommandée et qui m'ont fait un bien énorme durant les dernières semaines de rédaction et merci Margot de m'avoir permis d'agrémenter mon manuscrit de deux de tes formidables dessins : ce sont les plus belles illustrations qui existent (et qui existeront jamais) de ces organismes méconnus ! (cœur sur toi !)*

Merci également à tous mes autres camarades de thèse Morgane la « Gestapo », Paulette, Louis, Pierre, Chris, Cédric, et Ophélie pour tous ces moments nécessaires au maintien de notre santé mentale et pour nos repas de Noël démesurés. Un merci tout particulier à Marlisa : thanks again for all these hours spend together, talking and/or working (mostly talking, but eh...). It was a pleasure meeting you!

Merci à **Antony** pour avoir supporté chacune de mes sautes d'humeurs, en tant que co-bureau fidèle. Merci pour tes conseils d'une grande sagesse (pas toujours...), pour toutes nos discussions (plus ou moins censées) et pour ton humour parfois douteux dont on ne se lasse pas.

Un grand merci également à **M. Kévin Ladd** pour son soutien, depuis la terminale : merci d'avoir cru en moi, merci de m'avoir poussé dans mes études, merci de m'avoir fait

découvrir le monde formidable de la philosophie, merci pour tous ces conseils et pour toutes ces discussions autour d'un chocolat chaud.

A mes amies handballeuses, merci de m'avoir supportée durant ces deux dernières années compliquées, de m'avoir offert d'aussi bons fous rires quand j'en avais le plus besoin, et d'avoir toujours été là : **Boubi, Keke, Méline, Amé, Jadou** et **Mougnette**. Veuillez trouver ici un témoignage sincère de mon amitié et de ma reconnaissance.

Merci à **Pierre-Alexandre, Aurélie** et **Fabien** pour tous ces bons repas partagés, pour ces après-midis de jeux, de rire et de détente qui m'auront toujours permis de me ressourcer. Merci aussi d'être parvenu à me supporter depuis notre première année de licence et d'être toujours restés à mes côtés — je vous en serais toujours reconnaissante.

Un merci tout particulier à **Manon**, qui a toujours cru en moi même quand moi, je n'y croyais plus. Merci pour ton soutien dans les hauts et les bas, pour ces conversations jusqu'à pas d'heure (même par  $-4^{\circ}\text{C}$ , dans une voiture givrée, en pleine nuit alors qu'on tremble de froid). Puissent tes projets se réaliser, et ton rêve éthiopien prendre forme.

Je remercie profondément ma **famille** pour leur amour et leur soutien inconditionnel. Merci d'avoir toujours essayé de comprendre la nature de mon travail, et merci pour toutes ces heures passées en votre compagnie à blaguer sur mon quotidien d'étudiante feignante ou de prof blasée : cela a été immensément libérateur. Merci à mes **parents** de m'avoir doté, dès mon plus jeune âge, d'une curiosité à toute épreuve et d'avoir désinhibé ma capacité à demander « Pourquoi ? » (mes professeurs d'école s'en souviennent probablement encore...).

Je terminerai par un immense merci à mon binôme du quotidien, **Clément** qui a compris qu'un esprit sain passait avant tout par un estomac bien rempli ! Merci pour tous tes petits plats (maisons ou non, il faut bien avouer qu'on aura su faire fonctionner l'économie locale même durant le confinement !), pour tes attentions, ta gentillesse et ta générosité mais surtout, et avant toute autre chose, pour ton humour parfois nullissime mais tellement amusant. Merci d'avoir veillé sur moi quand j'étais trop fatiguée pour le faire moi-même et de m'avoir toujours soutenu !

## List of publications and communications

### Publications :

Crônier C., Abbache A., Khaldi A. Y., **Oudot M.**, Maillet S. & Ouali Mehadji A. 2016. Middle Devonian trilobites of the Saoura Valley, Algeria: insights into their biodiversity and Moroccan affinities. *Geological Magazine* **155**(4): 811-840.

**Oudot M.**, Crônier C., Neige P. & Holloway D. 2018. Phylogeny of some Devonian trilobites based on morphological characters and consequences to the systematics of Austerops (Phacopidae). *Journal of Systematic Palaeontology* **17**(9): 775-790.

Crônier C., **Oudot M.**, Klug C. & De Baets K. 2018. Trilobites from the Red Fauna (latest Emsian, Devonian) of Hamar Laghdad, Morocco and their biodiversity. *Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie – Abhandlungen* 290(1-2): 241-276.

**Oudot M.**, Neige P., Laffont R., Navarro N., Khaldi A. Y. & Crônier C. 2019. Functional integration for enrolment constrains evolutionary variation of phacopid trilobites despite developmental modularity. *Palaeontology* **62**(5): 805-821.

**Oudot M.**, Neige P., Ben Shir I., Schmidt A., Strugnell J.M., Plasseraud L., Broussard C., Hoffmann R., Lukeneder A. & Marin F. 2020. The shell matrix and microstructure of the Ram's Horn squid: molecular and structural characterization. *Journal of Structural Biology*, **211**(1): 107507.

**Oudot M.**, Ben Shir I., Schmidt A., Plasseraud L., Broussard C., Neige P. & Marin F. 2020. A Nature's curiosity: the argonaut « shell » and its organic content. *Crystals*, **10**(9): 839.

**Oudot M.**, Plasseraud L., Broussard C., Brocheriou, L., Moal, S., Basuyaux, O., Geissler A., Bataille A., Bonnotte A., Neige P. & Marin F. The biomineralization of the cuttlefish bone: histological, structural and molecular investigations (in preparation).

### Communications

**03/2018** – JFBTM (Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés) congress in Monaco, France. Poster presentation.

**06/2019** – Forum des Jeunes Chercheurs congress, Dijon, France. Oral presentation “Shell biomineralization within Cephalopods (Mollusca): molecular processes and evolution”.

**06/2019** – 5th International Sclerochronology Conference (ISC), Split, Croatia. Oral presentation “Biomineralization in *Spirula spirula*: first proteomic data and new microstructural inputs”.

**09/2019** – Biomin XV (15<sup>th</sup> International Symposium on Biomineralization) congress, München, Germany. Oral presentation “Biomineralization in cephalopods – first proteomic data on *Spirula spirula* and *Argonauta hians*”.

# Table des matières

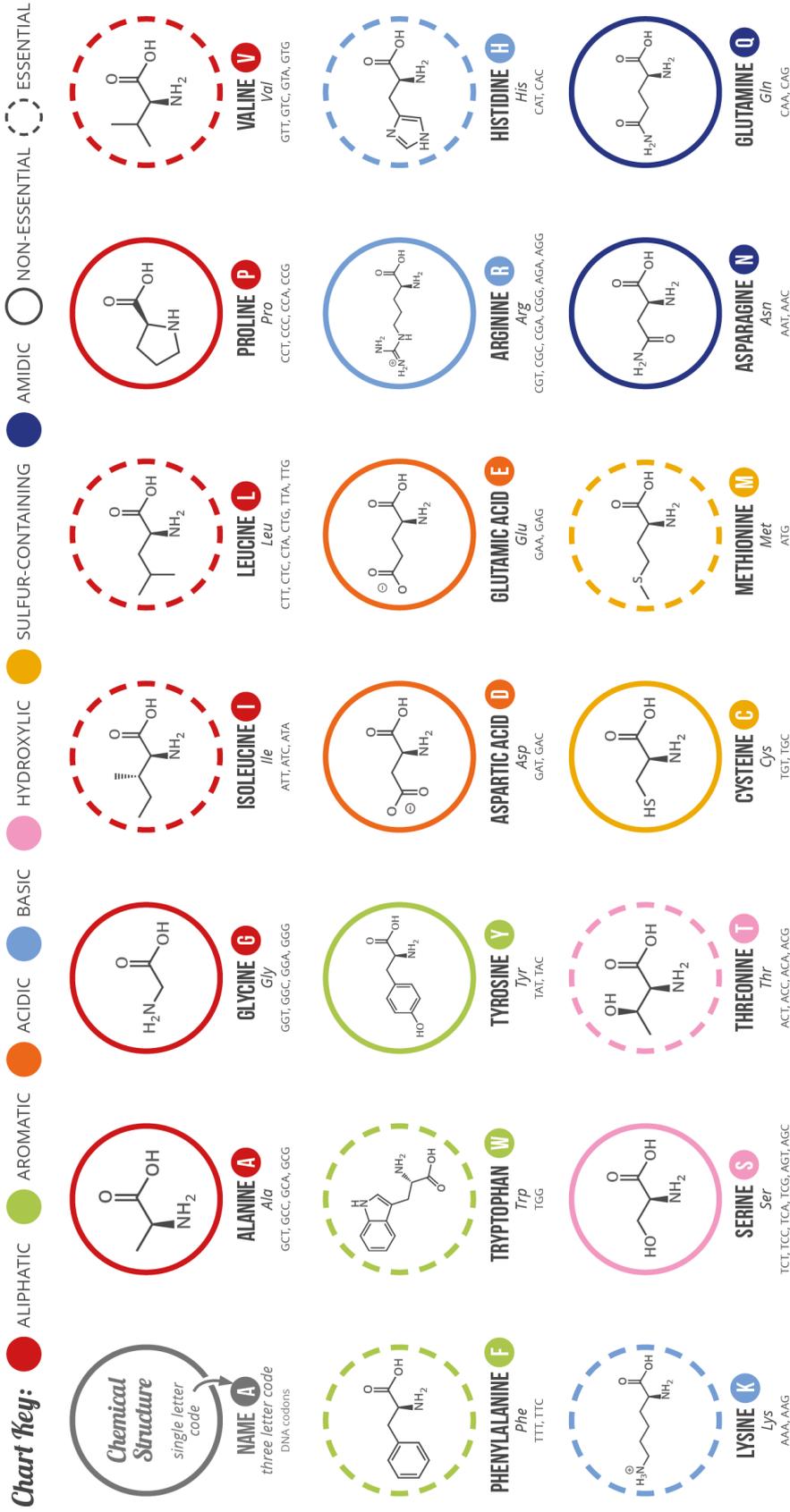
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I : REVUE DES CONNAISSANCES .....</b>	<b>9</b>
1) LA BIOMINERALISATION .....	11
1.1) Définition et généralités .....	11
1.2) Diversité des biominéraux .....	12
1.3) Diversité des fonctions biologiques .....	14
1.4) La matrice organique .....	15
1.5) Les processus de biominéralisations .....	17
a) La biominéralisation induite .....	18
b) La biominéralisation contrôlée .....	18
c) La séquence de la biominéralisation contrôlée .....	21
1.6) Origine phylogénétique de la(des) biominéralisation(s) .....	25
1.7) Interactions avec l'environnement .....	27
2) LA BIOMINERALISATION CHEZ LES MOLLUSQUES .....	27
2.1) Les mollusques : généralités .....	27
2.2) La coquille des mollusques : généralités et physiologie sécrétoire .....	28
a) Généralités .....	28
b) Physiologie de la sécrétion .....	30
2.3) La matrice organique .....	34
a) Le contenu non-protéique .....	35
b) Le contenu protéique .....	36
(i) Les protéines très acides (« unusually acidic proteins ») .....	37
(ii) Les protéines modérément acides .....	39
(iii) Les protéines basiques .....	40
(iv) L'apport des méthodes haut-débit .....	42
3) LES CEPHALOPODES .....	46
3.1) Généralités .....	46
a) Origine et registre fossile des céphalopodes .....	48
b) Phylogénie .....	50
c) Anatomie générale, biologie et cycle de vie .....	54
d) La coquille des céphalopodes .....	58
3.1) Le modèle nautilite .....	58
3.2) Le modèle seiche .....	64
4) OBJECTIF DE LA THESE .....	65
<b>CHAPITRE II : LA BIOMINERALISATION COQUILLIERE CHEZ LA SPIRULE <i>SPIRULA</i></b>	
<b><i>SPIRULA</i> .....</b>	<b>67</b>
1) DESCRIPTION, BIOLOGIE ET CYCLE DE VIE .....	69

2) TAXONOMIE ET PHYLOGENIE .....	71
3) LA COQUILLE .....	73
3.1) <i>Microstructure</i> .....	74
a) Le mur coquillier .....	74
b) Les septes .....	76
c) L'insertion des septes dans le mur coquillier.....	77
d) Le canal siphonal.....	78
3.2) <i>Un premier modèle de construction coquillière</i> .....	79
4) LA MATRICE ORGANIQUE .....	80
5) LE BUT DE NOTRE ETUDE .....	81
6) THE SHELL MATRIX AND MICROSTRUCTURE OF THE RAM'S HORN SQUID : MOLECULAR AND STRUCTURAL CHARACTERIZATION – JOURNAL OF STRUCTURAL BIOLOGY (2020), 211(1), ART. NUMBER 107507.....	83
7) RESULTATS COMPLEMENTAIRES .....	105
7.1) <i>Schéma conceptuel de la construction coquillière</i> .....	105
8) CONCLUSION .....	110
 <b>CHAPITRE III : LA BIOMINERALISATION COQUILLIERE CHEZ L'ARGONAUTE</b>	
<b>ARGONAUTA HIANIS.....</b>	<b>115</b>
1) DESCRIPTION, BIOLOGIE ET CYCLE DE VIE .....	117
2) TAXONOMIE ET PHYLOGENIE .....	120
3) LA MICROSTRUCTURE COQUILLIERE .....	122
4) LA MATRICE ORGANIQUE .....	126
5) LE BUT DE NOTRE ETUDE .....	127
6) A NATURE'S CURIOSITY: THE ARGONAUT « SHELL” AND ITS ORGANIC CONTENT – CRYSTALS, 10 (9), ART. NUMBER 839 (2020).....	129
7) RESULTATS COMPLEMENTAIRES .....	163
7.1) <i>Test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) chez quatre céphalopodes.</i> .....	163
8) CONCLUSION .....	164
 <b>CHAPITRE IV : LA BIOMINERALISATION COQUILLIERE CHEZ LA SEICHE SEPIA</b>	
<b>OFFICINALIS.....</b>	<b>169</b>
1) DESCRIPTION, BIOLOGIE ET CYCLE DE VIE .....	171
2) TAXONOMIE ET PHYLOGENIE .....	174
3) LA COQUILLE .....	175
3.1) <i>Microstructure</i> .....	176
a) Le bouclier dorsal.....	176
b) La partie ventrale cloisonnée.....	177
4) LA MATRICE ORGANIQUE .....	178
5) UN PREMIER MODELE DE CONSTRUCTION COQUILLIERE.....	180
6) LE BUT DE NOTRE ETUDE .....	183
7) THE CUTTLEFISH'S SHELL: A MICROSTRUCTURAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISATION.....	184

8) CONCLUSION .....	212
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>215</b>
1) SYNTHESES DES PRINCIPAUX RESULTATS.....	217
2) LES PERSPECTIVES « IMMEDIATES » .....	222
<i>L'importance du transcriptome</i> .....	222
<i>Les anticorps, première approche de la quantification des similitudes entre les matrices organiques calcifiantes</i> .....	224
<i>L'histologie et l'ontogénie pour mieux comprendre le mécanisme et la physionomie du processus de biominéralisation</i> ... ..	225
3) LES PERSPECTIVES A PLUS LONG TERME .....	227
<i>La chitine : preuve de l'évolution mosaïque de la matrice organique.</i> .....	227
<i>Vers l'exploration des autres structures minéralisées et non-minéralisées chez les céphalopodes</i> ...	229
<i>Quel(s) rôle(s) pour la transferrine, l'actine et les histones dans la minéralisation ?</i> .....	230
<i>Pluralité des répertoires sécrétoires versus microstructure du produit fini</i> .....	231
<i>Biomimétisme : à quand une copie parfaite de ces structures complexes ?</i> .....	232
<b>METHODES ET PROTOCOLES ANALYTIQUES .....</b>	<b>233</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>251</b>
<b>ANNEXES: SUPPLEMENTARY FIGURES TO THE ARTICLES .....</b>	<b>287</b>

# A GUIDE TO THE TWENTY COMMON AMINO ACIDS

AMINO ACIDS ARE THE BUILDING BLOCKS OF PROTEINS IN LIVING ORGANISMS. THERE ARE OVER 500 AMINO ACIDS FOUND IN NATURE - HOWEVER, THE HUMAN GENETIC CODE ONLY DIRECTLY ENCODES 20. 'ESSENTIAL' AMINO ACIDS MUST BE OBTAINED FROM THE DIET, WHILST NON-ESSENTIAL AMINO ACIDS CAN BE SYNTHESISED IN THE BODY.



**Note:** This chart only shows those amino acids for which the human genetic code directly codes for. Selenocysteine is often referred to as the 21st amino acid, but is encoded in a special manner. In some cases, distinguishing between asparagine/aspartic acid and glutamine/glutamic acid is difficult. In these cases, the codes asx (B) and gix (Z) are respectively used.



© COMPOUND INTEREST 2014 - WWW.COMPOUNDCHEM.COM | Twitter: @compoundchem | Facebook: www.facebook.com/compoundchem  
Shared under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives licence.



## **Avertissement au lecteur**

Les illustrations présentées au début de chaque chapitre proviennent, pour la plupart, de photos collectées sur internet puis traitées à l'aide d'un filtre « aquarelle ». Voici les sources et les crédits de ces images :

### **Chapitre I – Revue des connaissances :**

Nautilé : Photographie provenant de l'ouvrage « *Nautilus – Beautiful Survivor : 500 Million years of Evolutionary History* » de Wolfgang Grulke paru aux éditions *At One Communications* en 2016.

Calmar : Photographie de Cigdem Uzun, Getty images.

Spirule : Illustration aquarelle réalisée par Margot Bernardi.

Argonaute : Photographie provenant du porte-folio du photographe Songda Cai :  
<https://songdacai.com/>

Seiche : Photographie de Richard Whitcombe, Shutterstock.

Pieuvre : Photographie de Dario Spagnolo, Getty images.

### **Chapitre II – Biominéralisation coquillière chez *Spirula spirula*.**

Illustration aquarelle réalisée par Margot Bernardi.

### **Chapitre III – Biominéralisation coquillière chez *Argonauta hians*.**

Photographie provenant du porte-folio du photographe Songda Cai.

### **Chapitre IV – Biominéralisation coquillière chez *Sepia officinalis*.**

Photographie de Pasquale Vassallo, Getty images.

### **Chapitre V – Conclusions et perspectives.**

Spirule : Photographie réalisée par l'institut Schmidt Ocean.

Argonaute : Photographie provenant du porte-folio du photographe Songda Cai.

Seiche : Photographie de Richard Whitcombe, Shutterstock.



# **Introduction générale**



## Introduction Générale

Depuis l'apparition de la vie à la surface de notre planète, les organismes vivants ont développé, à de nombreuses reprises, la capacité de convertir les ions minéraux de leur environnement en structures minérales rigides selon un processus dit de *biominéralisation*. Bien que de nombreux taxons soient dénués de cette faculté, les structures biominéralisées sont largement répandues au sein du monde vivant. On totalise près de soixante-dix types de biominéraux différents (os, gastrolithes, statolithes, coquilles...) identifiés et associés à une panoplie de fonctions diverses et variées. La formation de ces structures minéralisées fonctionnelles est le résultat de processus chimiques et biochimiques particuliers, nécessitant la mise en place de fonctionnalités adaptatives complexes, tant au niveau tissulaire que moléculaire. Ainsi, les biominéraux qui résultent de cette machinerie spécialisée possèdent plusieurs propriétés communes, l'une d'entre elle étant l'incorporation d'un matériel organique particulier : la matrice organique. Constituée d'un mélange de protéines glycoprotéines, lipides et polysaccharides, la matrice organique calcifiante est considérée comme l'agent principal du contrôle et de la régulation du phénomène de biominéralisation. On lui attribue ainsi plusieurs fonctions clés au cours de ce processus : concentrer localement les ions, fournir un support organique au dépôt minéral, catalyser ce dépôt, servir de point de nucléation pour les cristaux, contrôler leur forme, et finalement, inhiber la croissance cristalline sous certaines conditions. La matrice organique est ainsi considérée comme la véritable « boîte à outils moléculaires » permettant de synthétiser toute structure minéralisée.

À l'heure actuelle, les biominéraux carbonatés comptent parmi les plus nombreux au sein du large éventail des biominéraux identifiés. Cette prépondérance est le fait à la fois de l'importance quantitative des dépôts dans le registre sédimentaire (songeons aux formations de craie du Crétacé, presque entièrement constituées de tests de coccolithophores) et également du nombre important de taxons, minéralisant en carbonate de calcium. Parmi eux, les mollusques représentent un groupe majeur, tant par le nombre d'espèces calcifiantes, par la diversité d'organisations microstructurales de leurs exosquelettes que par la variété de polymorphes de carbonate de calcium qu'ils sont à même d'exploiter.

Depuis la découverte de la matrice organique calcifiante et l'identification de son rôle clé au cours du processus de biominéralisation, les études de caractérisations biochimiques n'ont

cessé de se multiplier, notamment au sein du phylum des mollusques. Néanmoins, si les études sont nombreuses, elles concernent pour la grande majorité d'entre elles les représentants des deux plus grandes classes actuelles de mollusques : les bivalves et les gastéropodes. Les céphalopodes, en revanche, demeurent beaucoup moins étudiés. Ils représentent néanmoins un groupe majeur au sein du phylum, avec près de 800 espèces actuelles et plus de 10000 espèces fossiles. Leur histoire évolutive – en particulier l'internalisation de la coquille – nécessite une étude approfondie des mécanismes moléculaires de biominéralisation.

Le travail présenté dans cette thèse vise à étendre nos connaissances des répertoires coquilliers responsables de la biominéralisation, dans plusieurs clades de céphalopodes. Il permet de comparer les processus et produits de la biominéralisation entre les modèles étudiés mais aussi avec des organismes plus éloignés phylogénétiquement (autres mollusques, autres métazoaires).

Depuis leur apparition au Cambrien, les céphalopodes ont connu une histoire évolutive complexe, traversant des périodes intenses d'extinctions ou de radiations évolutives majeures. Ses représentants fossiles sont particulièrement abondants dans le registre sédimentaire, notamment les formes à coquille externe (ammonites) ou interne (bélemnites et leurs fameux rostrés). Ses représentants actuels, quant à eux, se répartissent au sein de deux sous-clades : les Nautilida, possédant un plan d'organisation « conservateur » (*i.e.* considéré plutôt comme ancestral) connu depuis plusieurs centaines de millions d'années ; et les Coleoidea, comprenant des formes sans coquilles (notamment au sein du groupe des octopodes, à l'exception des argonautes) et des formes à coquille (parfois réduite) et interne telles que la seiche (*Sepia*) ou la spirule (*Spirula*). Ainsi, l'histoire macroévolutive de ce clade apparaît comme particulièrement intéressante du point de vue de la biominéralisation en démontrant une tendance à l'internalisation et à la réduction coquillière, voire à sa disparition complète chez les formes les plus dérivées. Si les relations de parentés entre ces différents organismes sont relativement bien établies, les mécanismes moléculaires à l'origine de la formation coquillière demeurent, quant à eux, très mal connus. On ne sait par exemple pas si tous les organismes à coquilles possèdent une même « boîte à outils moléculaire », c'est-à-dire un même ensemble de macromolécules (*i.e.* protéines, polysaccharides etc.), à l'origine du phénomène de biominéralisation.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à trois espèces de céphalopodes appartenant à trois groupes distincts jusqu'alors pas ou peu étudiés : la spirule *Spirula spirula* (*Ram's horn squid* en anglais, Spirulidae), l'argonaute *Argonauta hians* (Argonautidae) et la seiche commune *Sepia officinalis* (Sepiidae). Le choix de ces organismes est motivé par des considérations taxonomiques et phylogénétiques : en effet, la spirule est un céphalopode pélagique de très petite taille, dont la coquille mêle à la fois des caractères plésiomorphes (*i.e.* « ancestraux » tels qu'une coquille enroulée planispiralée et cloisonnée rappelant celle du nautilus) et des caractères apomorphes (*i.e.* « dérivés » ; à savoir une coquille en position interne). La seiche, quant à elle, présente une structure coquillière complètement différente de celle des autres céphalopodes à coquille, apparaissant ainsi particulièrement dérivée : contrairement au modèle classique de type « nautilus », la coquille est ici plane et dorsale et les cloisons « simples » sont remplacées par un jeu de « planchers », de « plafonds » et de « piliers », formant ainsi une succession de minuscules loges empilées les unes sur les autres. Enfin, l'argonaute représente un triple paradoxe puisque (i) seules les femelles minéralisent une structure coquillière, dont elles se servent pour protéger leurs œufs ; (ii) cette coquille n'est pas homologue de celle des autres céphalopodes, ou des autres mollusques de manière générale puisqu'au lieu d'être sécrétée par le manteau, elle est produite par la première paire de bras dorsaux de l'animal ; (iii) la structure habituellement en aragonite chez les autres céphalopodes est ici de nature calcitique.

Notre approche de caractérisation biochimique des matrices coquillières de chacun de ces organismes, combinée à une étude microstructurale de leur squelette calcaire, vise à mieux appréhender les mécanismes moléculaires essentiels à la formation des squelettes coquilliers au sein du clade, en déterminant si les répertoires coquilliers des trois taxons étudiés se ressemblent ou non, et s'ils sont donc conservés ou non au cours de l'évolution.

La **première partie** de ce travail présente, en guise d'introduction, les grands principes de la biominéralisation, puis fait un tour d'horizon des connaissances concernant la biominéralisation chez les mollusques et enfin, effectue le bilan de l'état actuel de nos connaissances sur les céphalopodes.

Dans la **deuxième partie**, ce mémoire aborde l'étude du modèle spirule (*Spirula spirula*), en exposant, dans un premier temps, les connaissances préalablement acquises sur cet organisme, puis les résultats obtenus dans le cadre de ce travail de thèse. Au travers d'un article de recherche (Oudot *et al.* 2020a), nous présentons la toute première caractérisation biochimique

de la matrice organique coquillière chez cet organisme, et le rôle potentiel des différentes protéines identifiées au sein de la matrice dans le processus de biominéralisation à l'aide d'une étude protéomique couplée à la transcriptomique.

La **troisième partie** traite du modèle *Argonauta hians* et présente, en premier lieu, l'état actuel de nos connaissances sur cet organisme puis, l'ensemble des travaux que nous avons pu réaliser lors de l'étude de la coquille de cette espèce. Nous montrons notamment, dans le cadre d'un article de recherche (Oudot *et al.* 2020b), une première caractérisation biochimique de la matrice de cet organisme ainsi que les résultats de notre approche protéomique et leur implication dans les mécanismes de formation coquillière chez *A. hians*.

Dans une **quatrième partie**, nous passons en revue l'état des connaissances préexistantes sur le modèle *Sepia officinalis* puis nous exposons l'ensemble des travaux, encore en cours, que nous avons pu réaliser sur cet organisme. Cette étude combine à la fois des observations physiques (microstructurales, histologie) et des caractérisations biochimiques, dans le but de mieux comprendre le phénomène de formation coquillière chez cet organisme, en discutant notamment de l'existence d'un espace dédié à la minéralisation, et en évoquant les différents mécanismes possibles de calcification.

Enfin, le lecteur trouvera dans la **cinquième partie** les conclusions générales de ce travail, ainsi qu'une discussion et une présentation des perspectives de recherches qui pourront permettre d'approfondir et de compléter les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse.

---

### Une thèse en période COVID-19

---

Pandémie mondiale oblige, certains travaux de recherche présentés dans ce manuscrit ont fortement été ralentis : à la fois par les vagues de confinement successives, et par le retard accumulé par certaines plateformes dont nous dépendons pour nos analyses (Protéomique, Cryofracture, Histologie...) durant ces périodes et au moment de la reprise des activités. Par conséquent, les résultats présentés dans le cadre de l'étude du modèle *Sepia officinalis* constituent un apport préliminaire et plusieurs analyses se poursuivent encore : notamment, l'étude protéomique de la matrice organique, l'histologie et l'étude microscopique des relations tissus organiques/os de seiche.

Le premier confinement a également mis à mal ma participation à deux congrès : l'un, français, les JFBTM (Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés) et l'autre, international, le Nanomee Symposium on Biomineralization supposé se tenir en Allemagne. Nous prévoyons de pouvoir participer aux prochaines éditions, si le contexte sanitaire mondial le permet... D'autres participations ont heureusement pu être faites avant la pandémie : JFBTM 2018 (Monaco), le forum des Jeunes Chercheurs (Dijon), le 5<sup>ème</sup> congrès international de Sclérochronologie (2019, Splitz, Croatie) et le 15<sup>ème</sup> Symposium International sur la Biominéralisation (BIOMIN XV, 2019, Munich, Allemagne).

Nous précisons, cependant, que l'Université de Bourgogne a accordé une prolongation du contrat doctoral de trois mois, me permettant de consolider plusieurs résultats (notamment concernant le modèle *Sepia officinalis*) et conduisant à un manuscrit contenant des résultats que nous jugeons relativement équilibrés entre les trois modèles.



# Chapitre I :

## Revue des connaissances





## 1) La biominéralisation

### 1.1) Définition et généralités

Le terme de *biominéralisation* fait référence au processus par lequel des organismes transforment des ions en minéraux solides (Simkiss & Wilbur 1989), appelés « biominéraux ». Les biominéraux se distinguent de leurs équivalents précipités par voie purement chimique, par la présence de molécules organiques au sein de la structure minérale — on parle également de structures organo-minérales. L'élaboration de telles structures n'est permise que par l'existence d'une activité cellulaire spécifique, responsable des changements physico-chimiques nécessaires à la minéralisation. C'est ce contrôle exercé par les organismes qui différencie la biominéralisation d'une minéralisation purement physico-chimique, ou « abiotique » (Weiner & Dove 2003).

La biominéralisation est un phénomène largement répandu dans le monde du vivant, très diversifié si l'on considère à la fois la variété des biominéraux, les relations phylogénétiques entre les organismes qui les produisent et leur abondance dans la nature. Les premières traces attestées de l'existence de biominéralisations de métazoaires datent du Précambrien terminal (en particulier avec le genre *Cloudina*, Germs 1972 ; Knoll 2003 ; Murdock & Donoghue 2011, et voir 1.6 ci-après), mais les bactéries (cyanophycées) avaient acquis la capacité de biominéraliser bien avant, autour de 3,5 milliards d'années. Les biominéralisations sont réparties au sein des trois domaines du vivant (bactéries, archées, eucaryotes) et on dénombre près de 70 types de biominéraux (gastrolithes, coquille, etc.) différents à l'heure actuelle, répartis dans une douzaine de classes chimiques (Lowenstam & Weiner 1989; Zhang *et al.* 2019). Étant donné la diversité des produits de ce phénomène, et celle de ses producteurs, la biominéralisation peut être étudiée à travers un vaste champ multidisciplinaire, depuis le monde inorganique jusqu'à celui de l'organique (Lowenstam & Weiner 1989) en impliquant la quasi-totalité des domaines de recherche des sciences de la Vie, de la Terre et de l'Environnement (biologie, physiologie, chimie, biochimie, minéralogie, environnement, physique, etc.).

Ce processus porte également le nom de la discipline qui l'étudie. La biominéralisation, en tant que domaine de recherche, fait son apparition dans les années 1960 avec l'émergence des premières études sur la genèse des biominéraux, leurs structures, leur évolution et leur impact dans les cycles biogéochimiques majeurs, comme celui du carbone (Marin 2009). Ces premières investigations ont introduit un nouveau concept, celui de matrice organique

(‘*organic matrix*’ en anglais) qui concrétise l’idée selon laquelle l’élaboration d’une structure biominéralisée est assurée par ses propres composants — notion sur laquelle nous reviendrons un peu plus loin dans ce chapitre. Dans les années 1980-90, cette discipline, jusqu’alors restreinte aux sciences fondamentales, gagne les domaines plus appliqués tels que le domaine biomédical (chirurgie osseuse, dentisterie, greffe osseuse, etc.), le domaine des biomatériaux ou l’ingénierie industrielle (avec l’essor du biomimétisme, notamment). En parallèle, la biominéralisation est envisagée sous un nouvel angle : celui des processus physiologiques, cellulaires et moléculaires. Cette nouvelle approche aboutit à l’émergence de concepts importants, utilisant une nouvelle terminologie : on distingue dès lors la biominéralisation induite de la biominéralisation contrôlée — deux notions qui seront détaillées plus tard au cours de ce chapitre.

### 1.2) *Diversité des biominéraux*

On dénombre entre soixante et soixante-dix types de biominéraux différents (Zhang *et al.* 2019), appartenant à une douzaine de familles chimiques et élaborés par 55 phylums du monde vivant (Lowenstam 1981; Lowenstam & Weiner 1989) ; cependant, la réelle diversité des biominéraux est probablement sous-estimée, étant donné que tous les organismes du vivant n’ont pas été étudiés pour leur capacité à synthétiser ces structures organo-minérales (Marin *et al.* 2016). La diversité de ces structures résulte notamment de l’abondance et de la variété des ions minéraux disponibles (magnésium, calcium, silice, phosphore, soufre, manganèse, fer), mais également de la variété des structures cristallines produites. Ces constituants ioniques sont les mêmes que ceux des minéraux abiotiques, formés par processus purement physico-chimique. Néanmoins, un grand nombre de ces minéraux biogéniques est formé par des organismes dans des conditions environnementales où leurs équivalents abiotiques ne pourraient normalement pas précipiter : leur formation représente alors un surcoût énergétique pour l’organisme (l’hypothèse la plus répandue propose que ce surcoût soit compensé par l’acquisition d’un avantage évolutif). De plus, leur forme et la manière dont ils sont ordonnés dans les systèmes biologiques diffèrent de celles des minéraux abiotiques (Lowenstam & Weiner 1989).

Parmi la vingtaine d’éléments essentiels aux organismes vivants, l’hydrogène (H), le carbone (C), l’oxygène (O), le magnésium (Mg), la silice (Si), le phosphore (P), le soufre (S), le calcium (Ca), le manganèse (Mn) et le fer (Fe) sont les constituants les plus fréquents des

biominéraux (Mann 2001). Le calcium et le phosphore occupent une place prépondérante puisqu'ils constituent respectivement 50 % et 25 % des différents biominéraux identifiés à ce jour (Lowenstam & Weiner 1989). La prépondérance du calcium au sein des biominéralisations est remarquable. Elle est probablement liée à l'acquisition très précoce au cours de l'évolution de mécanismes cellulaires utilisant ce cation (Knoll 2003; Lowenstam & Weiner 1989) : en effet, parmi ses nombreuses fonctions, l'ion calcium est impliqué dans beaucoup de phénomènes de signalisation cellulaire ; c'est, entre autres fonctions, un messenger secondaire utilisé pour la transduction de signaux vers l'intérieur de la cellule, un mécanisme apparu très tôt au cours de l'Evolution, probablement en même temps que la multicellularité (Lowenstam & Margulis 1980).

Les biominéraux les plus abondants sont les biominéraux carbonatés (carbonate de calcium), phosphatés (phosphate de calcium), siliceux (silice) et les biominéraux composés d'oxydes de fer ou de manganèse. Le carbonate de calcium prédomine chez les formes invertébrées tandis que le phosphate de calcium est majoritairement observé chez les organismes vertébrés. Les biominéraux siliceux, quant à eux, se retrouvent notamment chez les diatomées, les silicoflagellés et les radiolaires, tous connus pour leur capacité à produire, soit des tests poreux et fragiles (les frustules, dont la morphologie rappelle la dentelle) soit des micro-squelettes aux formes complexes (Mann 2001).

La diversité des biominéraux à la surface du globe s'explique également par la vaste étendue de structures cristallines produites : un même minéral (de formule chimique unique) peut cristalliser sous plusieurs habitus différents, on parle alors de polymorphisme et de variétés polymorphes. C'est notamment le cas de la calcite et de l'aragonite, deux carbonates de calcium, de même formule chimique  $\text{CaCO}_3$ , mais qui cristallisent selon deux systèmes cristallins différents, respectivement rhomboédrique et orthorhombique. Parfois, un même organisme peut sécréter plusieurs polymorphes d'un même minéral, généralement en des zones bien distinctes.

Enfin, il est important de noter qu'en plus d'être prépondérants à la surface du globe, les biominéraux en carbonate de calcium sont également les plus représentés en termes de diversité taxonomique et phylogénétique, car présents dans des taxons tels que les bactéries, les foraminifères, les coccolithophores, les éponges, les cnidaires, les bryozoaires, les brachiopodes, les annélides, les mollusques, les crustacés, les échinodermes ou les vertébrés.

### 1.3) Diversité des fonctions biologiques

Si les biominéralisations sont diversifiées en termes de composition chimique et de structure, elles le sont tout autant du point de vue des fonctions qu'elles remplissent. Le rôle le plus fréquent de ces biominéraux est d'assurer un support mécanique aux tissus mous de l'organisme, tels que le test des oursins, la coquille des mollusques ou l'exosquelette des coraux. Les biominéraux, par leur structure composite organo-minérale, possèdent des propriétés mécaniques de résistance exceptionnelle ; la nacre, par exemple, possède une résistance à la fracture dix fois supérieure à celle du béton (Katti & Katti 2006). Cette propriété confère un avantage évolutif surprenant indéniable aux espèces qui la développent.

Mais au-delà de ce rôle de support structural, les biominéraux peuvent également assurer un large éventail d'autres fonctions biologiques comme la protection face aux prédateurs (coquille des mollusques), la protection contre la dessiccation (exosquelette des balanes, coquille d'œuf des reptiles, oiseaux et monotrèmes), la préhension et la nutrition (pinces des crustacés, dents de vertébrés, radula des mollusques), la perception de la gravité et l'équilibrage de la masse corporelle (statolithes des méduses, des céphalopodes, otolithes des poissons), la reproduction (oogones de charophytes), la perception du champ magnétique (bactéries magnétotactiques) ou encore le stockage d'ions minéraux (gastrolithes des crustacés) (Lowenstam & Weiner 1989; Mann 2001; Simkiss & Wilbur 1989).

La perception de la pesanteur est un phénomène répandu parmi les organismes eucaryotes. Les mollusques — et notamment les gastéropodes, les bivalves et les céphalopodes — possèdent une paire de statolithes, souvent de nature calcitique. Chacune de ces structures millimétriques est logée au sein d'une cavité, le statocyste, dont les cellules périphériques ciliées détectent les mouvements, assurant ainsi l'équilibre de l'organisme en lui fournissant des informations sur l'orientation du champ gravitationnel (Tanzarella 2005; Williamson & Chrachri 2004, pour les céphalopodes voir Arkhipkin & Bizikov 2000; Clarke 1978; Neige *et al.* 2016). Chez les plantes, ce sont les structures racinaires qui assurent le géotropisme, tandis que chez les poissons et les amphibiens, ce sont les otolithes logés au sein des otocystes qui remplissent ce rôle. Ces structures sont homologues à l'oreille interne des vertébrés (Lowenstam & Weiner 1989).

Un autre exemple de fonction non-squelettique de la biominéralisation est celle du stockage ionique. Certains crustacés décapodes comme l'écrevisse, par exemple, forment des

structures internes de stockage de carbonate de calcium amorphe, appelées gastrolithes. Ces corps minéralisés se développent au sein de la muqueuse de l'estomac à chaque cycle de mue afin de favoriser la calcification de la nouvelle cuticule (Lowenstam & Weiner 1989).

#### 1.4) La matrice organique

Le concept de "matrice organique" émerge au cours des années cinquante et soixante, avec le développement spectaculaire de la biochimie, et notamment des techniques de séparation des protéines (chromatographie et électrophorèse) ainsi que de détermination des compositions en acides aminés de ces protéines (voir Marin 2009). À cette époque, il devient évident que les macromolécules organiques associées aux biominéraux, et sécrétées au moment de leur mise en place, ont une fonction essentielle liée au processus de minéralisation lui-même. Ces constituants, de nature chimique protéique, glycoprotéique, polysaccharidique ou lipidique, ont néanmoins été principalement étudiés au sein de tissus carbonatés et phosphatés tels que l'os, les dents, les squelettes d'échinodermes ou encore les coquilles de mollusques (Lowenstam & Weiner 1989).

Le mélange complexe de macromolécules organiques reste finalement inclus (au moins en partie) au sein de la structure biominéralisée et compte souvent pour moins de 1 % (en poids) du squelette calcifié final (Marin *et al.* 2016), en ce qui concerne la plupart des biominéralisations carbonatées (avec quelques exceptions, comme l'os de seiche ou la coquille des aplysies: pour ces dernières, la fraction organique représente environ 10-15 % (Marin, communication personnelle) de la coquille. On attribue généralement à la matrice un certain nombre de fonctions au cours de la biominéralisation, la première étant structurelle. Elle formerait un édifice tridimensionnel qui servirait de guide et de « réceptacle » à la phase minérale. D'ailleurs, son incorporation finale au sein du biominéral permettrait à la structure de gagner en solidité en empêchant, par exemple, la propagation de fractures mécaniques (Kamat *et al.* 2000). La matrice remplit également un rôle actif dans la précipitation de la phase minérale et de la microstructure de la biominéralisation : les macromolécules qui la composent contrôlent la forme des nouveaux cristaux et leur organisation en microstructures bien définies (Marin 2009; Marin *et al.* 2016). Enfin, elle serait impliquée dans la signalisation cellulaire (Westbroek & Marin 1998), mais son rôle exact dans ce mécanisme reste encore mal évalué, notamment chez les modèles non-vertébrés.

De ce fait, la matrice organique apparaît comme une architecture supramoléculaire cohérente et fonctionnelle où chaque constituant participe à l'élaboration de la structure finale, et où les propriétés du produit fini sont très différentes de celles de ses constituants pris séparément (Marin 2009). Néanmoins, la matrice a longtemps été considérée comme une « boîte noire » et c'est l'émergence de techniques telles que la protéomique (seule ou couplée à de la transcriptomique) qui a récemment permis l'accroissement considérable de nos connaissances sur la fraction protéique de cette matrice organique.

Pendant plusieurs décennies, la matrice organique n'a quasiment été considérée chez les scientifiques qu'à travers ses composants les plus importants chez les métazoaires, à savoir les protéines acides (riches en acide aspartique ou glutamique). En effet, ces protéines acides tiendraient un rôle majeur dans le phénomène de biominéralisation puisqu'elles sont capables d'interagir avec les ions calcium ou bien encore avec les cristaux de carbonate de calcium (Addadi & Weiner 1985). Néanmoins, ce ne sont pas les seules actrices de la biominéralisation. De même, les protéines incluses dans le biominéral final ne sont pas les seules à participer au processus. Des études récentes (Jackson *et al.* 2006; Le Roy *et al.* 2012) suggèrent que seule une partie des protéines sécrétées par le tissu minéralisant (*i.e.* le 'sécrétome') est incorporée au sein du biominéral (*i.e.* le 'shellome'), le reste, à l'interface entre l'épithélium calcifiant et le front de minéralisation, étant probablement dégradé ou recyclé, après avoir rempli ses multiples fonctions dans le dépôt de carbonate de calcium.

Par ailleurs, on a longtemps cru que la matrice était supposée s'assembler d'elle-même à distance de l'épithélium calcifiant ('*self-assembling system*'). Néanmoins, l'analyse protéomique de la matrice organique de certains organismes, comme le corail *Acropora millepora* (Ramos-Silva *et al.* 2013), révèle l'existence de peptides associés au domaine extracellulaire de protéines transmembranaires identifiées. Ces découvertes modifient la vision « classique » d'une matrice organique purement extracellulaire, et suggère qu'un lien physique puisse subsister « jusqu'au dernier moment » entre l'épithélium et le front de minéralisation (Marin *et al.*, 2016). On peut également noter que de nombreuses analyses protéomiques de la matrice organique de différents organismes révèlent l'existence de protéines cytoplasmiques, notamment les protéines du cytosquelette (actine, myosine, etc.), mais aussi des protéines nucléaires (histones) — une autre découverte qui vient modifier la vision classique de la matrice organique (Marin *et al.* 2016; Oudot *et al.* 2020a, 2020b). Malgré un processus de nettoyage drastique (supposé éliminer les contaminants

intracellulaires et ne conserver que la fraction intracrystalline, c'est-à-dire les protéines extracellulaires intimement liées à la phase minérale et protégée du nettoyage par celle-ci), on ne peut ignorer la possibilité que ces protéines intracellulaires soient en réalité impliquées également dans le processus de biominéralisation. Ainsi, il existerait un lien moléculaire entre le cytosquelette et le processus de calcification extracellulaire (Weiss *et al.* 2006, 2013).

De ce fait, l'étude protéomique des matrices organiques coquillières révèle et démontre la grande diversité des protéines impliquées dans le phénomène de minéralisation. Et s'il ne fait aucun doute que des lois physico-chimiques « universelles » doivent s'appliquer à la calcification chez l'ensemble des métazoaires, il paraît en revanche plus compliqué d'envisager un seul modèle biologique « universel » dans l'étude des biocalcifications au sein de ce même clade (Marin *et al.* 2016). Ceci suggère alors que les squelettes calcaires sont assemblés à partir de différents répertoires sécrétoires, ainsi qu'une évolution indépendante des « boîtes à outils moléculaires » impliquées (Marin *et al.* 2016). L'approche protéomique des protéines coquillières ('shellomics' en anglais, cf. Marie *et al.* 2009a) souligne également le rôle plutôt coopératif et synergétique de chacun de ces ingrédients au sein de la matrice organique, plutôt que de leur associer une seule fonction spécifique (*e.g.* la formation d'une microstructure particulière, ou bien la sélection d'un polymorphe en particulier, etc. ; Marin *et al.* 2016; Marie *et al.* 2012). Enfin, la protéomique démontre que la stabilité des microstructures à travers les temps géologiques ne se traduit pas nécessairement par une "invariance" du *shellome* ou *squelettome* (Jackson *et al.* 2010; Marie *et al.* 2009a, 2010b, 2011b, 2013). Dans ce contexte, les microstructures coquillières apparaissent plutôt comme des propriétés émergentes, au regard de la machinerie cellulaire, contraintes par des « attracteurs » physiques (Marin 2020; Marin *et al.* 2008, 2016).

### 1.5) *Les processus de biominéralisations*

Traditionnellement, la biominéralisation est divisée en deux catégories fondamentalement différentes, basées sur le degré de contrôle biologique : la biominéralisation induite et la biominéralisation contrôlée (Lowenstam 1981; Mann 1983). Cette approche moléculaire du processus de biominéralisation se substitue à l'opposition, plus ancienne et jusqu'alors adoptée, des biominéralisations « squelettiques » et « non-squelettiques » et traduit une réalité physiologique, biochimique et évolutive (Marin 2009).

#### a) La biominéralisation induite

La minéralisation biologiquement induite résulte de l'interaction entre le métabolisme de l'organisme et son environnement, et ne nécessite aucune machinerie biologique dédiée. Il existe de nombreux environnements aqueux où une simple petite perturbation biologique peut provoquer la formation d'un minéral : le relargage de certains cations par les cellules d'un organisme, par exemple (Lowenstam & Weiner 1989). Ainsi, ce processus de fabrication organo-minérale ne résulte que du fonctionnement métabolique d'un organisme en condition physiologique, et n'entraîne donc aucun coût énergétique pour la cellule. On peut également noter qu'en l'absence de contrôle biologique, les biominéraux formés ressemblent à ceux formés de manière abiotique, c'est-à-dire de manière purement physico-chimique. En réalité, ce type de biominéral dépend à la fois de l'environnement dans lequel il précipite, et du processus biologique par lequel il est induit. De ce fait, un même organisme peut former différents biominéraux dans différents environnements (Lowenstam & Weiner 1989). Par ailleurs, il est important de souligner que ces critères ne permettent pas de définir un processus biologique ou chimique particulier, mais fournissent un large spectre hétérogène de processus physiologiques, illustrés notamment par la formation de stromatolithes par les cyanobactéries ou bien encore le dépôt de précipités calcaires intracellulaires par l'algue brune *Padina* (Lowenstam and Weiner, 1989).

#### b) La biominéralisation contrôlée

Par opposition, la biominéralisation contrôlée est un phénomène hautement régulé (Mann 2001) permettant la formation de biominéraux aux fonctions et aux structures bien spécifiques, telles que l'os, la coquille ou les dents. Cette catégorie de minéralisations biogéniques contrôlées regroupe en réalité la plupart des biominéraux non-pathologiques produits par les métazoaires, ainsi que de nombreuses minéralisations de protistes (tests calcaires des foraminifères, coccosphères, tests siliceux de radiolaires, diatomées etc. ; Marin 2009). Dans cette thèse, c'est évidemment cette catégorie de biominéralisation qui va retenir notre attention. Cette biominéralisation contrôlée se différencie de celle induite par la reconnaissance de cinq critères essentiels :

- elle requiert une machinerie cellulaire et moléculaire dédiée au sein du tissu biominéralisant, mais également à l'échelle de l'organisme tout entier. De ce fait, les

minéraux produits ne sont pas le « simple » fruit de l'activité métabolique de l'organisme, mais appartiennent bel et bien à une chaîne complexe de réactions métaboliques, avec de nombreuses régulations et boucles de rétro-contrôle (Marin 2009) ;

- la synthèse de minéraux biogéniques est un processus actif, ce qui signifie que les minéraux produits ne sont pas systématiquement en équilibre avec le milieu environnant. On peut citer, par exemple, les diatomées qui précipitent un test siliceux dans un environnement sous-saturé vis-à-vis de ce minéral. Il paraît alors évident que la mise en œuvre d'une telle activité représente un surcoût énergétique pour l'organisme, et nécessite l'établissement de transports ioniques actifs et/ou le stockage d'ions contre leur gradient de concentration ainsi que leur métabolisation (Bertucci *et al.* 2011; Fan *et al.* 2007) ;
- l'une des conséquences directes de ce processus actif est que les minéraux ne peuvent être synthétisés au contact direct de leur environnement. La biominéralisation contrôlée est réalisée dans un espace clos, délimité par l'organisme (Simkiss 1986; Wilbur 1984) : cet espace peut être intra-, inter- ou extracellulaire. Par exemple, les algues coccolithophoridés forment leurs coccolithes au sein de vésicules dérivées de l'appareil de Golgi, et les sécrètent ensuite par exocytose. Le cartilage, quant à lui, est élaboré dans des vésicules extracellulaires (Marin 2009). Chez les mollusques, cet espace est délimité entre la coquille et l'épithélium minéralisant, scellé par le périostracum, et constitue l'espace extrapalléal ;
- les minéraux formés possèdent un habitus différent de ceux précipités chimiquement (Weiner & Traub 1984) : les organismes peuvent réguler de manière très fine la forme des biominéraux qu'ils produisent. Les mollusques incarnent parfaitement cet exemple : ils sont capables de moduler la forme des cristaux de carbonate de calcium et de les assembler en diverses microstructures, mais ils peuvent également contrôler le type de polymorphe (calcite, aragonite) avec lequel ils façonnent leur coquille (Marin, 2009) ;
- enfin, la biominéralisation contrôlée est dirigée par une matrice organique, sécrétée au moment de la mise en place de la structure minéralisée, et finalement incorporée dans le biominéral produit (Weiner & Traub 1984). Cette matrice — essentiellement composée de protéines, de glycoprotéines, de polysaccharides et de lipides (Marin & Luquet 2007) — est associée à de nombreuses fonctions (nucléation, contrôle et arrêt de la croissance des cristaux, signalisation cellulaire, etc. ; cf. d) la matrice organique).

Son incorporation au sein des structures minéralisées produites leur confère une grande solidité mécanique.

Plus récemment, Dupraz et al. (2009) ont apporté des nuances aux notions de biominéralisations induites et contrôlées. Selon les auteurs, il convient de distinguer la minéralisation biologiquement induite de celle dite influencée, selon que la précipitation minérale soit active ou passive. Dans leur modèle, la minéralisation biologiquement induite résulte de l'interaction entre l'activité biologique de l'organisme et son environnement. En revanche, la minéralisation biologiquement influencée est définie comme une minéralisation passive, ce qui signifie que ce sont des paramètres externes et/ou environnementaux qui contrôlent les conditions physico-chimiques nécessaires à la précipitation minérale. Ainsi, ce mode de minéralisation influencée ne requiert pas la présence d'organismes vivants. Dupraz *et al.* invoquent néanmoins l'implication d'une matrice organique dans le phénomène de précipitation biologiquement influencée : selon eux, elle influencerait la morphologie et la composition des cristaux au travers d'interactions entre le minéral en cours de formation et la matière organique qui servirait alors de support à la précipitation. Les auteurs proposent d'utiliser le terme d'organominéralisation, terme introduit pour la première fois par Jean Trichet et Christian Défarge dans deux articles successifs (Défarge & Trichet 1995; Trichet & Défarge 1995), pour définir les organominéraux produits lors de ces deux processus, c'est-à-dire l'ensemble des minéraux formés à partir d'une matrice organique non génétiquement contrôlée. Ainsi, contrairement aux biominéraux qui représentent des preuves directes de la vie (*e.g.* fossiles d'organismes), les organominéraux en constituent des signes indirects. Il est intéressant de noter que les organominéraux, formés à partir de matière organique d'origine biologique pourrait servir de *biosignature* dans la recherche de preuves de vie dans le registre géologique archéen, ou sur des corps extraterrestres dénués de fossiles ou de bioconstructions (Défarge 2011; Westall *et al.* 2000). Néanmoins, il est important de garder en mémoire que de la matière organique d'origine abiotique peut également induire la formation d'organominéraux similaires à ceux formés de manière biologiquement induite, ou sous intervention de matière organique biotique (Défarge 2011). En effet, on peut très bien concevoir la formation de polymères organiques complexes de manière purement abiotique (*cf.* « soupe primitive »), lesquels interagiraient avec des carbonates, par exemple, pour produire des structures organominérales particulières, qui ne sont donc pas des preuves de vie.

### c) La séquence de la biominéralisation contrôlée

#### Constitution d'une solution saturée

La délimitation d'un espace clos constitue la condition *sine qua non* à la formation d'un biominéral (Lowenstam & Weiner 1989; Simkiss 1986; Wilbur 1984). Cet espace, isolé de l'environnement extérieur, est scellé par une barrière à travers laquelle les ions ne peuvent pas diffuser librement (Lowenstam and Weiner 1989). En dépit de la diversité de protéines minéralisantes et de biominéraux, les organismes n'utilisent pas une grande variété de méthodes pour délimiter le lieu de la minéralisation. Parmi elles, on compte notamment les barrières lipidiques ou formées de macromolécules insolubles dans l'eau (protéines et/ou polysaccharides) qui polymérisent sous la forme de couches imperméables, comme le périostracum des mollusques. Notons que ce dernier est issu d'un précurseur protéique soluble, la périostracine (periostracin, en anglais), laquelle polymérise dès sa sécrétion et subit un tannage quinonique (Lowenstam & Weiner 1989; Simkiss & Wilbur 1989; Waite *et al.* 1979).

La formation d'un minéral au sein de l'espace de minéralisation nécessite évidemment l'existence d'une solution de précipitation saturée, du point de vue des ions qui constitueront ce minéral (Lowenstam and Weiner 1989). La solution « mère » de précipitation est élaborée par la ou les cellule(s) responsables de la minéralisation dans son ensemble (cellules de l'épithélium ou responsables de la sécrétion de vésicules minéralisantes), équipées de pompes ioniques actives ou canaux ioniques capables de diffusion passive d'ions spécifiques. Ces pompes et voies ion-spécifiques appartiennent à la machinerie de toutes les cellules et il ne fait aucun doute qu'elles sont pleinement utilisées notamment pour déterminer l'ordre dans lequel les ions sont introduits dans l'espace de la minéralisation, mais également pour contrôler la composition ionique et le degré de saturation à atteindre (Lowenstam and Weiner, 1989). Enfin, en plus de contrôler l'accumulation des ions dans l'espace de minéralisation, ces cellules sont également chargées de la sécrétion des constituants de la matrice organique.

#### La nucléation

La première étape de formation d'un cristal est sa nucléation. Si la nucléation (et de manière générale tout processus de cristallisation biologique) a longtemps été considérée

selon un schéma de cristallisation classique, à savoir par attachement successif d'ions ou de molécules sur une particule primaire pour aboutir à la formation d'un cristal, il semblerait qu'elle puisse également emprunter d'autres chemins, regroupés sous le terme de « cristallisation non-conventionnelle » ou de « minéralisation par l'intermédiaire de particules » ("particle-mediated mineralization", en anglais ; Cölfen 2007).

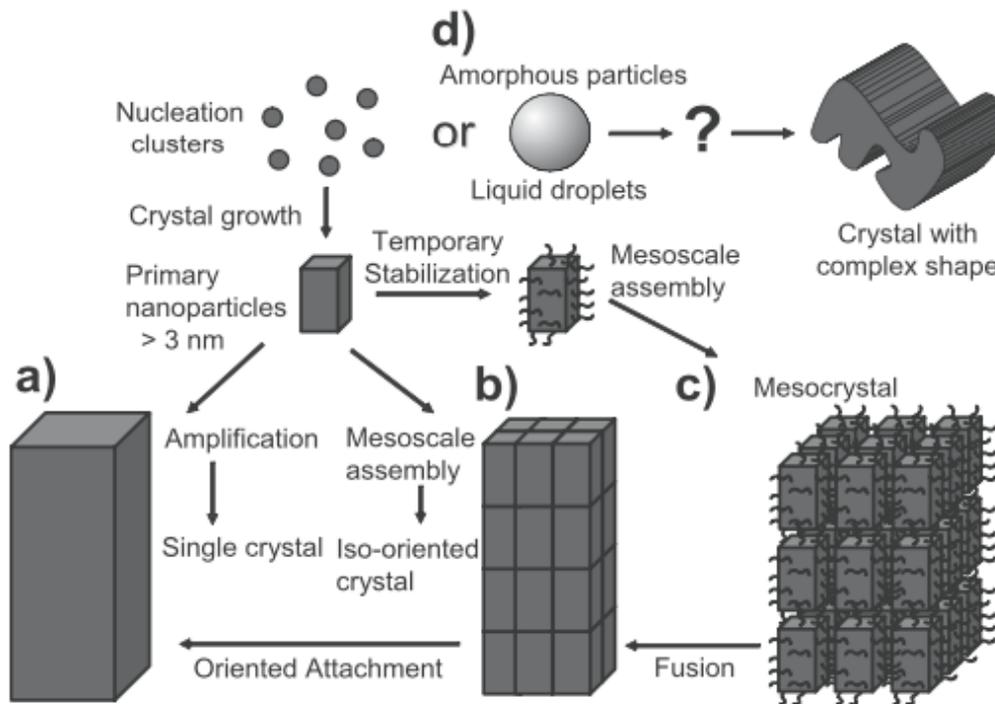


Figure I.1 : Représentation schématique des cristallisations classique et non-classique, d'après Cölfen 2007. a) cristallisation classique, où les clusters ioniques de nucléation se forment et croissent jusqu'à atteindre une taille d'un nucléus cristallin critique et forme une nanoparticule primaire, amplifiée ensuite en un cristal unique. b) les nanoparticules primaires peuvent également former un cristal iso-orienté, où les unités nanocristallines peuvent fusionner pour former un cristal unique via le processus d'attachement orienté. c) si les nanoparticules primaires sont recouvertes par un polymère ou un autre additif avant leur assemblage, elles peuvent former un mésocristal. d) des particules amorphes peuvent se former et se transformer, avant ou après leur assemblage, en une structure cristalline à la morphologie complexe.

Cölfen (2007) évoque plusieurs chemins de cristallisation non-conventionnelle (Fig. I.1) avec, pour point de départ invariable, un cluster d'ions précurseurs (tels que  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ , etc.) hydratés. Ces amas ioniques peuvent s'associer en nanoparticules minérales primaires qui, par leur interaction avec des molécules organiques, s'assemblent selon des faces cristallographiques préférentielles pour former un mésocristal : on parle d'attachement orienté des nanoparticules (soudure), résultant, après déshydratation de la structure, en un pseudo-monocristal (chemin c, Fig. I.1) qui contient des macromolécules organiques. Les amas ioniques peuvent également former des particules amorphes qui, par un mécanisme encore inconnu (« moulage » ?), cristallisent en morphologies complexes (chemin d, Fig. I.1). Dans son schéma, l'auteur évoque également d'autres chemins alternatifs, tels que l'assemblage des

nanoparticules primaires en un cristal iso-orienté sans passer par une étape de stabilisation organique (chemin b, Fig. I.1).

En 2015, De Yoreo et ses co-auteurs enrichissent l'éventail des chemins possibles de la cristallisation non-conventionnelle (De Yoreo *et al.* 2015). Selon eux, les particules impliquées dans ce phénomène sont diverses et bien plus complexes que de simples ions comme le modèle classique l'envisage. Il s'agirait d'espèces d'ordre supérieur, tels que des complexes multi-ioniques, des oligomères (ou clusters), ou encore des nanoparticules cristallines, amorphes ou liquides. Dans leur modèle, ces multiples voies de cristallisation répondent à un mécanisme directement dépendant de l'interaction entre des facteurs thermodynamiques et cinétiques. Par des phénomènes d'attachement orienté (ou presque orienté) et par l'existence de phases microscopiques transitoires instables, les auteurs proposent différents mécanismes de formation cristalline (De Yoreo 2017; De Yoreo *et al.* 2015).

En 1997, Beniash et ses co-auteurs démontrent que les larves d'oursin élaborent leurs spicules calcitiques à partir d'une phase minérale transitoire non-cristalline, appelée carbonate de calcium amorphe (ACC, en abréviation anglaise). Depuis, cette stratégie a été mise en évidence chez de nombreux autres organismes, qu'il s'agisse de structures aragonitiques ou calcitiques (Weiner *et al.* 2009). Ainsi, il ne fait plus aucun doute que ce processus est largement répandu chez les animaux qui minéralisent en carbonate de calcium. Le phénomène repose sur la stabilisation plus ou moins prolongée de la phase amorphe via ses interactions avec des molécules organiques (protéines, polysaccharides ou métabolites, tels que le citrate ou le pyrophosphate) et certaines espèces ioniques, jusqu'à sa cristallisation en calcite, par exemple (Raz *et al.* 2003).

Si le polymorphisme du carbonate de calcium est un phénomène connu depuis de nombreuses années et bien documenté, le "polyamorphisme" est quant à lui un phénomène démontré beaucoup plus récent, défini par l'existence de plusieurs variétés d'un état amorphe d'une même substance (Cartwright *et al.* 2012). Il semblerait que les "polyamorphes" héritent leur structure de celles des clusters de pré-nucléation dont ils sont issus. Cette structure serait ensuite stabilisée par des interactions moléculaires et organiques spécifiques, favorisant la sélection de l'un ou l'autre des polymorphes du carbonate de calcium (Cartwright *et al.* 2012; Fernandez-Martinez *et al.* 2017). Ainsi, il existerait un certain prédéterminisme dans la sélection du polymorphe adopté lors de la cristallisation.

### La croissance du cristal

Les cristaux ainsi néoformés croissent ensuite par addition de molécules ou d'ions, et/ou par attachement particulaire (Gal *et al.* 2015). La morphologie de ces cristaux est déterminée par leur vitesse de croissance relative dans les différentes directions de l'espace, mais est également contrôlée par les molécules organiques de la matrice (Addadi & Weiner 1985). Il a aussi été démontré à plusieurs reprises que certaines molécules semblaient favoriser la formation de certains polymorphes cristallins plus ou moins stables (Falini *et al.* 1996). Par ailleurs, certaines protéines ou glycoprotéines acides présenteraient une capacité particulière à stabiliser la formation de faces cristallines non-conventionnelles *in vitro* (Albeck *et al.* 1996). Ces molécules (protéines, glycoprotéines, polysaccharides) sont spécifiquement adsorbées à la surface de certaines faces cristallines durant la croissance cristalline, et incorporées à la structure finale. Étant donnée la taille bien supérieure de ces macromolécules à celle du réseau cristallin, leur inclusion induirait une modification des paramètres de maille de celui-ci (Pokroy *et al.* 2006, 2007) et induirait une perturbation de la structure dans son ensemble (Addadi *et al.* 2016).

### L'arrêt de la croissance

Le concept d'inhibition cristalline émerge dans les années 80, quand Wheeler et ses co-auteurs découvrent l'existence de protéines responsables de l'arrêt de la nucléation et de la croissance cristalline chez l'huître de Virginie, *Crassostrea virginica* (Wheeler *et al.* 1981). Aujourd'hui, il est clair que toutes les matrices organiques calcifiantes possèdent, à différents degrés, des propriétés inhibitrices de la cristallisation. L'idée est que les composants inhibiteurs présents en solution sont adsorbés à la surface des nucléus en croissance par interaction électrostatique. Ce faisant, ils bloquent la croissance cristalline par « empoisonnement » des surfaces (Dobberschütz *et al.* 2018).

Le contrôle de l'arrêt de la croissance cristalline détermine, au moins en partie, la forme finale de ce cristal. Les études morphologiques ont souvent suggéré que les cristaux croîtraient à l'intérieur de compartiments organiques qui, par la même occasion, agiraient finalement comme barrières physiques à leur croissance : les vésicules dans lesquelles croissent les coccolithes des coccolithophoridés en sont de parfaits exemples (Wheeler &

Sikes 1984). L'existence d'autres cristaux ou d'une matrice organique peut également constituer un obstacle à la croissance cristalline. La nacre, par exemple, est constituée d'une superposition régulière de couches de tablettes d'aragonite coalescentes, celles-ci étant enveloppées d'une fine couche de matière organique. Dans le cas de la nacre, l'extension latérale de chaque tablette est contrainte par les tablettes voisines, qui croissent en même temps. Ce faisant, en arrivant à confluence, les tablettes adjacentes provoquent la condensation du gel organique coincé entre elles, et donc sa polymérisation en une matrice interlamellaire insoluble.

### 1.6) Origine phylogénétique de la(des) biominéralisation(s)

Les biominéralisations sont synthétisées par toutes les branches majeures de l'arbre du vivant (Fig. I.2), dans une gamme étonnante de degrés d'organisation, de plans anatomiques et de fonctions. Avec l'avènement des outils moléculaires et l'apparition des premières phylogénies basées sur des données moléculaires, la phylogénie des métazoaires a connu de profonds réarrangements (Halanych 2004). Cette nouvelle approche révèle notamment qu'une grande partie des organismes dits « minéralisants » sont "intercalés", dans l'arbre du vivant, entre des taxons dénués de cette capacité (Fig. I.2 ; Murdock and Donoghue 2011). Dans un tel contexte, une question s'impose : ces lignées ont-elles développé leurs squelettes minéralisés indépendamment, ou bien cette propriété est-elle héritée d'un ancêtre commun (perdue par la suite chez certains clades) ? L'utilisation d'une approche parcimonieuse ne permet pas de privilégier une hypothèse par rapport à l'autre (Murdock and Donoghue 2011). Par ailleurs, au sein des métazoaires, si les biominéraux silicatés sont

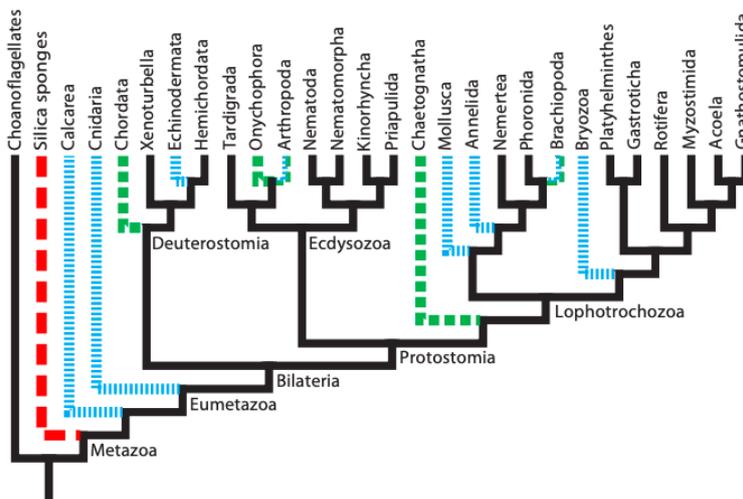


Figure I.2 : Distribution de la biominéralisation au sein d'un arbre phylogénétique à l'échelle du phylum. Les branches terminales codées en rouge représentent des tissus minéralisés siliceux, tandis que les branches codées en bleu indiquent des tissus carbonatés et les branches vertes des tissus phosphatés. D'après Murdock & Donoghue (2011).

restreints aux éponges siliceuses, les structures carbonatées sont présentes chez toutes les

divisions majeures. Des travaux récents ont pourtant démontré que, parmi les polymorphes du carbonate de calcium, une fois qu'une lignée a adopté un système particulier (par exemple, aragonitique), les changements sont rares (Porter 2010). De ce fait, il paraît difficile d'invoquer une origine unique à ces différents systèmes minéraux (*i.e.* carbonate et phosphate de calcium).

Au cours des dernières années, des traces minéralisées très anciennes ont été découvertes : ces premiers microfossiles biominéralisés appartiendraient au clade des protistes, et seraient datés du

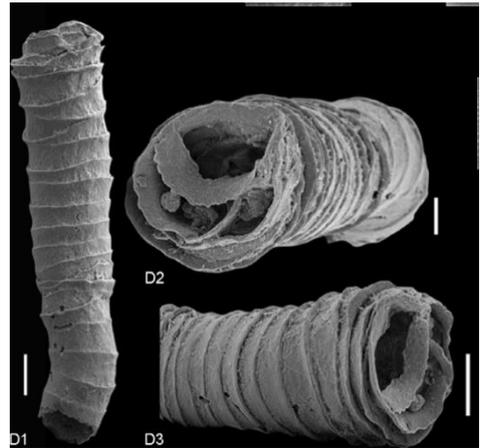


Figure I.3: Photographies d'un spécimen de *Cloudina hartmannae*, daté du début du Cambrien, d'après Yang et al. (2016)

Néoprotérozoïque (entre 700 et 800 Ma) (Cohen *et al.* 2011; Cohen & Knoll 2012; Morais *et al.* 2017; Porter *et al.* 2003). Chez les métazoaires, les premiers fossiles coquilliers apparaissent à la fin de l'Ediacarien (550 Ma), avec des spécimens faiblement minéralisés tels que *Cloudina* (Fig. I.3)(Germs 1972; Murdock and Donoghue 2011). L'explosion Cambrienne (541-515 Ma) est marquée par la radiation de la plupart des lignées de métazoaires, mais coïncide également avec la diversification importante et l'abondance des tissus minéralisés (épines, spicules, sclérites, plaques et coquilles) en carbonate ou phosphate de calcium, presque simultanément chez la majorité des clades de métazoaires (Knoll 2003). Pour autant, il apparaît clairement que la biominéralisation est postérieure à la divergence des clades majeurs de bilatériens, suggérant des inventions indépendantes de la biocalcification (Murdock and Donoghue 2011). En effet, plusieurs représentants de la « small shelly fauna » seraient en réalité les premiers membres de taxons actuels (*e.g.* brachiopodes, bivalves, etc.) plutôt que de clades de rangs supérieurs (*e.g.* Deuterostomia, Protostomia, Bilateria, Metazoa...) (Donoghue & Sansom 2002; Skovsted *et al.* 2009; Vinther *et al.* 2008; Vinther & Nielsen 2005). L'hypothèse d'inventions indépendantes n'est cependant pas incompatible avec l'utilisation d'outils moléculaires communs antérieurs aux phases de radiation.

Une approche holistique intégrant les données moléculaires, les caractéristiques développementales des organismes, la distribution phylogénétique et les premiers fossiles coquilliers suggère alors une origine indépendante du squelette coquillier entre les différents phylums. Les similarités de développement de ces structures minéralisées résulteraient alors d'une convergence ou d'une évolution parallèle. Des études récentes proposent d'ailleurs qu'un jeu de gènes orthologues (*i.e.* des gènes issus d'un ancêtre commun et non d'une

duplication génétique) serait impliqué dans le développement de ces structures calcifiées chez les bilatériens : on parle alors de « boîte à outils biominéralisante », qui pourrait être dérivée d'un ancêtre commun non-minéralisant à tous les bilatériens modernes (Jackson *et al.* 2010; Livingston *et al.* 2006).

### *1.7) Interactions avec l'environnement*

Certains biominéraux s'avèrent être produits à une telle échelle qu'ils impactent, de manière considérable, la chimie des océans et les cycles biogéochimiques globaux.

De nos jours, coccolithophores et foraminifères représentent de grands producteurs de roches carbonatées biogéniques (Marsh 2003) et jouent ainsi un rôle considérable dans la chimie des eaux océaniques. Ce sont ainsi de véritables puits à CaCO<sub>3</sub> (Marsh 2003) que la communauté scientifique envisage comme « outils » dans la lutte contre le réchauffement climatique via leur capacité à fixer les carbonates, et donc le dioxyde de carbone. Les récifs coralliens constituent également de véritables puits à CaCO<sub>3</sub> (Lowenstam & Weiner 1989).

De la même manière, d'autres organismes planctoniques impactent fortement le cycle géochimique de la silice (Yool & Tyrrell 2003). Par leur activité minéralisante importante, les diatomées, les silico-flagellés ou encore les radiolaires, induisent une sous-saturation constante en silice des eaux océaniques. Leur apparition dans le registre fossile est concomitante d'une importante diminution de la teneur en silice, ainsi que d'une augmentation de la quantité de formations rocheuses riches en silice (Lowenstam & Weiner 1989).

## *2) La biominéralisation chez les mollusques*

### *2.1) Les mollusques : généralités*

Les mollusques sont des métazoaires triploblastiques bilatériens. Ils représentent l'un des clades les plus diversifiés au sein des eucaryotes, tant par le nombre de représentants que par la variété de formes, d'anatomies et de tailles. Cependant, ces organismes possèdent un même plan d'organisation et des caractères dérivés propres (Ponder *et al.* 2019; Vinther 2015), tels que le manteau responsable de la sécrétion de formations calcaires, une structure buccale

chitineuse (la radula) et des branchies (cténidies) en forme de peigne (Lecointre & Le Guyader 2001).

Le phylum représente, après les arthropodes, le second phylum le plus important de l'arbre du vivant et compterait environ 120 000 espèces actuelles d'après les plus récentes estimations (Giribet & Edgecombe 2020; Lecointre & Le Guyader 2001), inégalement réparties au sein de huit classes. Parmi elles, cinq regroupent des organismes conchifères, c'est-à-dire à coquille (monoplacophores, gastéropodes, céphalopodes, bivalves et scaphopodes). Grâce à leur grande diversité morphologique et taxonomique, les mollusques occupent des habitats variés et ne sont absents que des déserts les plus secs et les plus glacés. Par ailleurs, ils peuvent aussi bien être les hôtes intermédiaires de divers parasites (*e.g. Schistosoma, Orientobilharzia, Dicrocoelium, Calicophoron*, etc.) (Dreyfuss & Rondelaud 2011) qu'être eux-mêmes les parasites d'autres organismes marins : par exemple, le genre *Annulobalcis* chez les crinoïdes (Dgebuadze *et al.* 2012), l'espèce *Monogamus minibulla* chez les oursins (González-Vallejo 2008).

Les mollusques apparaissent de manière certaine au Cambrien basal (Ponder *et al.* 2020a; Vinther 2015). Ils sont d'ailleurs l'un des acteurs essentiels de l'apparition de la minéralisation, avec les brachiopodes, au cours de « l'explosion Cambrienne » (env. 540 Ma). Cependant, leur origine pourrait être plus ancienne encore : le premier mollusque connu, *Purella*, apparaît dans la partie supérieure du Fortunien (542-534 Ma) mais des mollusques « présumés » existeraient depuis le Précambrien, notamment au sein de la faune d'Ediacara, avec le genre *Kimberella* (555 Ma ; Fedonkin & Waggoner 1997; Vinther 2015). Néanmoins, malgré les traces de reptation qui lui sont associées et une anatomie générale similaire à celle des mollusques actuels, l'absence d'une radula minéralisée entretient le débat sur les origines précises des mollusques.

## 2.2) La coquille des mollusques : généralités et physiologie sécrétoire

### a) Généralités

La coquille des mollusques possède une structure caractéristique multicouches, composée de deux à cinq couches calcifiées et d'une couche organique (Marin *et al.* 2012). Il est d'ailleurs important de souligner que les mollusques utilisent principalement les deux polymorphes les plus courants du carbonate de calcium à savoir la calcite, forme stable, et

l'aragonite, forme métastable ayant tendance à recristalliser en calcite lors de processus diagénétiques (Bathurst 1972; Perdikouri *et al.* 2011; Tucker & Wright 1990). Lorsque les coquilles présentent les deux polymorphes du carbonate de calcium, à de rares exceptions près (comme *Haliotis tuberculata* qui possède un mélange des deux minéralogies au sein d'une même couche, voir Mutvei *et al.* 1985; Dauphin *et al.* 1989), ceux-ci sont spatialement séparés en des couches distinctes et arborent des microstructures généralement différentes, c'est notamment le cas des bivalves nacropismatiques comme la moule ou l'huître perlière.



Figure I.4: Exemple visible de périostracum (couleur verdâtre à noire), sur la moule d'eau douce *Unio pictorum*. Notez que le périostracum peut facilement "se détacher" de la coquille (de couleur blanche sur la photographie). Photographie de Pascal Neige ; collecte dans le Canal de Bourgogne, aux environs de la Bussière-sur-Ouche.

Chez la plupart des mollusques, les couches calcifiées sont regroupées sous une couche de nature organique appelée le périostracum (Fig. I.4). Cette couche, en contact direct avec le milieu extérieur, possède de nombreuses fonctions (support physique à la construction coquillière, création d'un environnement minéralisant clos, protection contre la dissolution, etc.) qui seront abordés plus tard au cours de ce chapitre.

Les mollusques utilisent une grande variété d'habitus cristallins dans l'élaboration de leur coquille. Ces différentes microstructures coquillières ont été décrites par plusieurs auteurs, la revue la plus récente étant celle de Carter et Clarke (1985, pour des revues plus anciennes voir Bøggild 1930; Taylor *et al.* 1969, 1973). Ils distinguent une dizaine de microstructures et de nombreuses combinaisons entre elles : on peut notamment citer les microstructures prismatiques, nacrées, lamellaires-croisées, lamellaires-croisées complexes, foliées, sphérolitiques, homogènes, granulaires... Bien que les différents types de microstructures et de polymorphes cristallins caractérisent des taxons de niveau intermédiaire (famille, par exemple), certaines conditions expérimentales de culture (modification du ratio Mg/Ca de l'eau) peuvent modifier la minéralogie de ces structures, en "forçant" des bivalves à coquille préférentiellement calcitique à fabriquer du matériel coquillier en aragonite (Checa *et al.* 2007).

## b) Physiologie de la sécrétion

La formation coquillière apparaît comme un phénomène complexe, hautement régulé, avec pour élément central un tissu calcifiant particulier : le manteau (Marin *et al.* 2012). Elle est le fruit de l'expression d'une série de gènes (spécifiques et plus généralistes) régissant l'activité des cellules minéralisantes de l'épithélium externe du manteau, siège d'une activité intense aboutissant à la synthèse des composants de la matrice organique (Jackson *et al.* 2010).

Pour clarifier le processus, on peut décomposer la biominéralisation coquillière selon une série d'étapes successives, respectant les critères essentiels de la biominéralisation contrôlée (*cf.* 1.5 ci-dessus), à savoir : la délimitation de l'espace clos au sein duquel aura lieu la minéralisation, la synthèse de la matrice organique, et enfin la nucléation de cristaux et la régulation de leur croissance. C'est une vue schématique, bien pratique pour comprendre le processus ; dans la réalité, ces évènements sont liés : la synthèse de matrice, la nucléation et la régulation sont à peu près synchrones, selon l'endroit où l'on se place et l'activité de minéralisation obéit à un gradient du manteau depuis la zone du crochet (dans le cas d'un

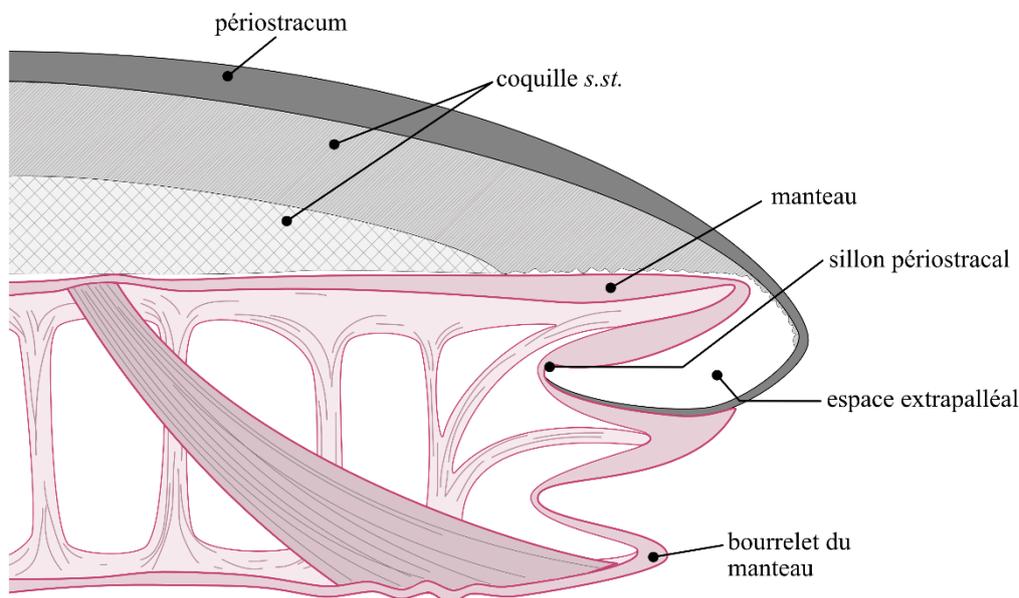


Figure I.5 : Représentation schématique d'une section à travers la coquille et le manteau d'un mollusque bivalve (modifié d'après Brusca *et al.* 2016)

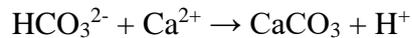
bivalve) jusque vers le bord palléal de la coquille.

Le *manteau* est un tissu polarisé comprenant, depuis l'intérieur vers l'extérieur, un épithélium interne en contact avec le milieu ambiant (par exemple, de l'eau de mer), des tissus internes (notamment les muscles palléaux, les tissus connectifs, les fibres nerveuses, etc.) et enfin, l'épithélium externe calcifiant, faisant face à la coquille et sécrétant toutes les macromolécules et les ions nécessaires à sa synthèse (Marin *et al.* 2012). L'idée selon laquelle l'épithélium externe est en contact direct avec la coquille est un point encore largement débattu à l'heure actuelle (Addadi *et al.* 2006; Nudelman *et al.* 2007). L'extrémité du manteau est marquée par plusieurs replis (deux chez les gastéropodes, trois chez les bivalves), celui situé entre les bourrelets externe et médian définissant le sillon périostracal (Fig. I.5).

L'épithélium externe calcifiant du manteau est à l'origine de la sécrétion des constituants protéiques nécessaires à la biominéralisation et incorporés à la coquille. D'un point de vue histologique, les cellules qui composent ce tissu apparaissent plutôt homogènes. Néanmoins, plusieurs études ont pu démontrer l'existence d'une zonation cellulaire subtile, corrélée à la microstructure coquillière, notamment dans le cas de bivalves à structure nacro-prismatique (Jolly *et al.* 2004; Marie *et al.* 2012; Sudo *et al.* 1997; Takeuchi & Endo 2006). Ainsi, chez ces organismes, les cellules calcifiantes de la zone ventrale de l'épithélium sont impliquées dans la synthèse de la calcite, tandis que celles de la zone dorsale sécrètent l'aragonite. Cette découverte souligne donc la pluralité des régimes sécrétoires chez un même organisme, et il est hautement probable qu'elle puisse également être transposée à d'autres mollusques, dont les coquilles présentent d'autres combinaisons texturales : en effet, 5 zones successives du manteau ont été identifiées de par leur activité sécrétoire, chez le gastéropode d'eau douce *Lymnaea stagnalis* (Herlitzke *et al.* 2018).

Notons également la présence de pompes membranaires ou des canaux afin de permettre le relargage des précurseurs inorganiques du carbonate de calcium (Marin *et al.* 2012). Si les pompes à calcium (Ca-ATPases) ont pu être mises en évidence chez l'huître perlière *Pinctada fucata* (Fan *et al.* 2007), des mécanismes équivalents pour les ions bicarbonates sont invoqués (pompes ou canaux à bicarbonate) mais non démontrés. Un processus alternatif pour les ions bicarbonate est également envisageable, notamment avec la présence d'anhydrase carbonique, catalysant l'hydratation du dioxyde de carbone en bicarbonate. Si ces aspects physiologiques sont mal décrits chez les mollusques, ils sont en revanche très bien étudiés et caractérisés chez les coraux (Le Goff *et al.* 2016; Moya *et al.* 2008). Enfin, il est important de noter que certaines cellules du manteau semblent également dotées de pompes à protons : une H<sup>+</sup>-ATPase a notamment été identifiée chez *Pinctada fucata* (données non publiées). Ces pompes

seraient responsables de la réabsorption des protons  $H^+$  produits lors de la précipitation du carbonate de calcium, selon l'équation de calcification :



L'existence de ces pompes à proton évite ainsi une acidification du milieu de minéralisation (Marin *et al.* 2012). Ce phénomène est très peu documenté, et n'a pas encore été mis en évidence.

Le *péριοstracum* est une couche chitino-protéique (Hunt & Oates 1984), sécrétée par des cellules spécialisées au niveau du sillon péριοstracal (Fig. I.5) sous la forme d'un film liquide contenant des précurseurs protéiques riches en tyrosine, polymérisant entre eux par des processus de tannage quinonique (Timmermans M. 1969; Waite 1983). Cette couche organique assure de nombreuses fonctions, les plus importantes étant la création d'un environnement clos, ainsi que la fourniture d'un support à la minéralisation (Marin *et al.* 2012). On lui attribue d'autres rôles plus secondaires, requis dans des contextes très spécifiques : par exemple, chez certains bivalves de mangroves (*e.g. Geloïna*), il limite les phénomènes de dissolution coquillière sous l'influence d'eaux acides (Isaji 1993). Le péριοstracum peut également servir de barrière efficace contre la prédation, ou bien servir de camouflage efficace en tirant profit des pigments qui le composent.

Aujourd'hui, il ne fait plus aucun doute que le péριοstracum joue un rôle essentiel dans la mise en place des différentes couches de la coquille (Checa 2000). Plusieurs études menées sur la moule d'eau douce *Amblema* ont d'ailleurs permis la modélisation du processus de formation du péριοstracum (Checa 2000; Petit *et al.* 1979), étendue par la suite à l'ensemble des bivalves à coquille nacro-prismatique (Saleuddin & Petit 1983). Étant donné sa grande insolubilité, l'approche biochimique classique ne permet pas de comprendre la chimie subtile de ce produit sécrétoire (Marin *et al.* 2012). Cependant, une protéine, la péριοstracine, a tout de même été extraite à l'acide formique, chez *Mytilus edulis* (Waite *et al.* 1979) : c'est une forme précurseur du péριοstracum mature, aux propriétés originales. En effet, il s'agit d'une protéine basique, hydrophobe et insoluble dans l'eau, dont la forme non purifiée se dégrade et polymérise instantanément. Sa composition est particulièrement enrichie en résidus tyrosine et en DOPA (dihydroxy-L-phenylalanine), la DOPA étant un acide aminé particulier, issu de l'hydroxylation de résidus tyrosine sous l'action d'une enzyme : la tyrosine hydroxylase. Lors de la sécrétion, les résidus DOPA sont oxydés en quinone par une enzyme, la tyrosinase : il s'ensuit une polymérisation par la formation de multiples liaisons covalentes

intermoléculaires, aboutissant à une insolubilisation totale du précurseur, donnant un aspect de « vieux cuir » au périostracum (Waite 1995).

Chez les mollusques, l'*espace extrapalléal* est un espace délimité entre la coquille et l'épithélium calcifiant du manteau, scellé par le périostracum (Fig. I.5). Supposé être un milieu confiné, où tous les ingrédients de la calcification s'auto-assemblent, cet espace est rempli d'un fluide, le fluide extrapalléal, sursaturé en ions calcium et carbonate (Misogianes and Chasteen 1979; Moura *et al.* 2000). Cette saturation tendrait à faire précipiter naturellement le carbonate de calcium en solution, mais la présence d'inhibiteurs organiques et minéraux de la minéralisation empêcherait ce phénomène de se produire (Wilbur 1984). Toutefois, il semblerait que le fluide extrapalléal soit hétérogène, variant d'une zone à une autre de la coquille (Lopes-Lima *et al.* 2005; Misogianes & Chasteen 1979; Moura *et al.* 2000).

L'espace extrapalléal est également une zone où la matrice organique est sécrétée par l'épithélium externe du manteau. À ce jour, la composition protéique du fluide extrapalléal reste mal connue et seules quelques protéines ont été identifiées (Hattan *et al.* 2001; Ma *et al.* 2007; Yin *et al.* 2005), probablement en raison de la difficulté technique à prélever ce type de fluide. Néanmoins, il semblerait que le contenu protéique du fluide ne représente pas nécessairement celui de la coquille et que sa diversité protéique soit inférieure à celle de la coquille (Marin *et al.* 2012).

Cette vision « classique » d'auto-assemblage « à distance » du tissu vivant, et l'existence même de l'espace extrapalléal sont aujourd'hui remises en question par certains auteurs, qui suggèrent que l'épithélium externe du manteau est en contact direct avec la coquille. Selon ce modèle alternatif, la matrice organique serait sécrétée sous la forme d'un gel (Addadi *et al.* 2006; Nudelman *et al.* 2007).

Si la biominéralisation coquillière des mollusques est communément envisagée comme un processus gouverné par une matrice organique (*i.e.* "*matrix-mediated biomineralization*"), Mount *et al.* (2004) proposent une hypothèse alternative. Selon eux, la nucléation cristalline serait intracellulaire et des cellules "cristallogéniques" seraient chargées d'apporter les "embryons" cristallins jusqu'au front de minéralisation. Dans leur article, les auteurs

rapportent l'existence d'hémocytes granulocytiques chez l'huître *Crassostrea virginica* qui pourraient être directement impliqués dans les phénomènes de réparation coquillière. Les hémocytes sont des cellules du système immunitaire de nombreux invertébrés – dont les mollusques – circulant librement dans l'hémolymphe (équivalent du sang chez ces organismes). Les hémocytes ont une activité de phagocytose et sont impliqués dans un grand nombre de fonctions, parmi lesquelles la cicatrisation, l'immunité cellulaire et la réparation coquillière (Cheng 1984). Cependant, le rôle de ces cellules n'a toujours pas été relié à des processus de calcification « normale » de la coquille en croissance. Par ailleurs, Simkiss évoquait déjà, dans plusieurs de ses travaux (Simkiss 1976, 1977, 1980; Simkiss *et al.* 1982) la possibilité d'une origine intracellulaire à la minéralisation, en associant les granules intracellulaires impliqués dans les phénomènes de détoxification cellulaire au processus de biominéralisation lui-même. D'après lui, ces granules riches en ions calcium (ainsi que magnésium, phosphate et carbonate) associés à de faibles quantités de métaux lourds (tels que l'argent, l'aluminium, le zinc, etc.) constituent une source énergiquement plus économique pour la minéralisation coquillière que l'extrusion par des pompes membranaires des ions en milieu extracellulaire, pour les concentrer en un fluide corporel sursaturé.

### 2.3) *La matrice organique*

L'existence d'une fraction organique piégée au sein de la coquille est connue depuis longtemps. Frémy (1855) fut le premier à caractériser ce matériel organique, une substance qu'il nomma "conchioline". Ce terme, aujourd'hui tombé en désuétude, constitue le point de départ de l'analyse des composants protéiques de la matrice organique. Ce n'est que bien plus tard, dans les années soixante à soixante-dix, qu'il devint évident que les constituants organiques de la coquille définissent une « matrice », c'est-à-dire un mélange de macromolécules extracellulaires secrété pour « aider » et guider la minéralisation (Marin *et al.* 2012). L'idée selon laquelle la matrice organique dirige le processus séquentiel de biominéralisation (nucléation, contrôle et arrêt de la croissance des cristaux) pour être finalement incorporée au sein de la structure coquillière, émerge peu de temps après (Weiner & Traub 1984).

La matrice organique est un ensemble de protéines, glycoprotéines, polysaccharides, chitine et lipides. De nombreuses études quantitatives indiquent que la fraction organique ne représente souvent qu'un faible pourcentage de la coquille, entre 0.01 et 5 % de son poids

(Marin *et al.* 2012). Si ces proportions semblent minimes, elles influencent drastiquement les propriétés mécaniques des biominéraux associés, en décuplant leur résistance à la fracture notamment (Kamat *et al.* 2000). Au cours des décennies, la communauté scientifique s'est principalement concentrée sur la fraction protéique, pour la simple et bonne raison qu'elle représente la majeure partie de la matrice, mais également parce qu'elle offre un accès direct à l'information génétique (Marin *et al.* 2012). Cependant, la matrice ne se résume pas qu'à son contenu en protéines et il est important de noter la présence d'autres constituants non-protéiques, à savoir les polysaccharides, les lipides, les pigments et sans doute de petits métabolites.

#### a) Le contenu non-protéique

Quantitativement, les saccharides représentent la seconde catégorie la plus importante de macromolécules, après les protéines, au sein de la coquille. On reconnaît deux grands groupes : la chitine, et les polymères acides solubles. Chez les mollusques, Frémy (1855) est le premier à identifier la chitine dans l'os de seiche et la plume de calmar. Par la suite, ce polymère est mis en évidence au sein de nombreuses autres structures minéralisées de mollusques (Goffinet & Jeuniaux 1979). Néanmoins, malgré son ubiquité au sein de ce clade, il n'est pas encore possible de vérifier si la chitine est présente dans toutes les microstructures coquillières ou si, au contraire, elle est spécifique à certaines d'entre elles (Agbaje *et al.* 2018). Au sein de la nacre, par exemple, elle participe de manière essentielle à l'architecture 3D et sa suppression (par inhibition de l'enzyme qui la catalyse, la chitine synthase) modifie drastiquement la structure de la nacre (Schönitzer & Weiss 2007). Mise à part la chitine, des polysaccharides acides solubles peuvent également être identifiés au sein de la coquille dont la caractérisation reste encore aujourd'hui très superficielle (Marin *et al.* 2012). De nombreux polysaccharides coquilliers sont liés à des protéines, formant ainsi ce qu'on appelle des glycoprotéines ou protéoglycanes (Marie *et al.* 2008). D'autres, en revanche, demeurent libres dans la matrice, mais cet aspect reste aujourd'hui encore peu étudié. Les polysaccharides sont composés de plusieurs dizaines (voire centaines) de monosaccharides neutres, aminés ou acides en proportion variable (Dauphin & Marin 1995), ce qui les différencie des oligosaccharides qui eux, ne contiennent qu'un petit nombre de monosaccharides.

Lorsqu'il est question de caractériser le contenu organique des coquilles, les lipides ne sont que très rarement étudiés, étant donné leur très faible proportion au sein de la matrice

organique, et leur rôle comme acteurs de la biominéralisation demeure encore inconnu (Cobabe & Pratt 1995; Marin *et al.* 2012; Rousseau *et al.* 2006). De la même manière, bien que présents en faible quantité, les pigments n'en sont pas moins des éléments essentiels de la coquille : ils forment des patrons colorés à la surface de celle-ci, patrons qui s'avèrent, dans de nombreux cas, être taxon-spécifiques. L'incorporation de ces pigments au sein de la coquille reste un mécanisme moléculaire encore mal connu, mais il a été démontré que l'expression d'une protéine coquillière était strictement corrélée à la pigmentation de la coquille chez *Haliotis asinina* (Jackson *et al.* 2007).

#### b) Le contenu protéique

Comme j'ai pu le souligner plus tôt dans ce chapitre, les protéines représentent la majeure partie des constituants organiques de la coquille et ont été le sujet de plusieurs centaines d'études (Grégoire 1972; Marin *et al.* 2008). Leur analyse, et notamment la détermination de leur composition chimique, est le plus souvent réalisée par voie biochimique en procédant à leur extraction de la matrice coquillière. Celle-ci s'effectue au moyen d'une décalcification à l'EDTA, ou bien à l'aide d'acides faibles comme l'acide acétique. Ce protocole permet l'identification de deux fractions distinctes, en fonction de leur solubilité dans l'acide : une phase soluble dans l'acide (ASM pour 'acid soluble matrix') et une phase insoluble (AIM pour 'acid insoluble matrix'). Dans certains cas, la fraction insoluble peut être dissoute (au moins partiellement) à l'aide de dénaturants puissants, tels que l'urée, le thiocyanate de guanidinium ou le tampon de Laemmli. La phase soluble, quant à elle, peut être purifiée par dialyse ou ultrafiltration, avant d'être fractionnée selon les propriétés physico-chimiques de ses constituants via des méthodes de biochimie classique, comme l'électrophorèse ou la chromatographie. Néanmoins, certaines protéines présentent un comportement anormal, en raison de propriétés particulières (acidité élevée, modifications post-traductionnelles, etc.), que les méthodes de séparation classiques ne parviennent pas à résoudre (Marin *et al.* 2008). Ces obstacles techniques expliquent en grande partie la publication tardive de la première séquence partielle (Rusenko *et al.* 1991) de protéine coquillière, puis de la première séquence complète (Miyamoto *et al.* 1996).

Aujourd'hui, des centaines de protéines coquillières ont été identifiées. Celles-ci apparaissent comme constitutives de la coquille, ou bien comme étant exprimées par les tissus calcifiants. Néanmoins, leur rôle dans la biominéralisation reste le plus souvent hypothétique,

basé sur l'analyse des séquences et l'identification de domaines fonctionnels déjà connus, sur des tests *in vitro* ou bien sur la localisation de l'expression de gènes au sein du manteau ou de protéines au sein des différents types de polymorphes de la coquille (Marie *et al.* 2009a; Takeuchi & Endo 2006). Étant donnée la diversité des séquences primaires identifiées, Marin *et al.* (2008) ont pris le parti de regrouper les protéines en fonction de leur point isoélectrique ( $pI$ ) théorique selon trois catégories, que nous utiliserons ici également : les protéines très acides ( $pI < 4,5$ ), les protéines modérément acides ( $4,5 < pI < 7$ ) et les protéines basiques ( $pI > 7$ ). Il est important de noter, néanmoins, que cette classification des protéines selon leur  $pI$  est intervenue alors qu'une cinquantaine de protéines coquillières de mollusques seulement était identifiée, principalement par des méthodes de biologie moléculaire. Aujourd'hui, l'apport de techniques haut-débit (détaillées plus tard dans ce chapitre) a considérablement augmenté ce nombre. Il conviendrait alors de classer toutes ces nouvelles protéines (plusieurs centaines) selon leurs domaines fonctionnels, ce qui représente un travail considérable.

(i) Les protéines très acides (« unusually acidic proteins »)

Dans le monde vivant, la plupart des protéines possèdent un point isoélectrique ( $pI$ ) neutre ou légèrement acide (Marin & Luquet 2007). Le point isoélectrique d'une protéine définit la valeur du pH à laquelle la protéine atteint une neutralité électrique, c'est-à-dire que ses charges positives portées par les acides aminés à radicaux basiques (arginine, lysine, et dans une moindre mesure, histidine) sont compensées par celles, négatives, portées par les acides aminés à radicaux acides (acide aspartique et glutamique). Si les protéines arborent généralement un  $pI$  compris entre 4 et 7, les protéines présentant une valeur inférieure à 4,5 peuvent alors être considérée comme anormalement très acides. Notons néanmoins que cette définition est finalement très restrictive, car une protéine au  $pI$  proche de la neutralité peut tout aussi bien présenter des domaines fonctionnels acides compensés par des domaines basiques (Marin & Luquet 2007). À l'inverse, une protéine peut avoir un  $pI$  bas, non pas parce qu'elle est anormalement enrichie en résidus acides mais parce qu'elle ne comporte aucun résidu basique.

Selon Marin et Luquet (2007), deux mécanismes moléculaires possibles confèrent à une protéine une extrême acidité. Le premier est lié à une abondance relativement plus élevée d'acides aminés acides (acides aspartique et glutamique) au sein de la structure primaire de la protéine par rapport à celle des acides aminés basiques (histidine, lysine et arginine). Le

second mécanisme passe par des modifications post-traductionnelles classiques que sont la glycosylation ou la phosphorylation qui ont pour effet d'apporter des charges négatives additionnelles au corps peptidique. D'autres modifications post-traductionnelles, très peu documentées en biominéralisation, telles que la sulfation des résidus tyrosine ou la carboxylation de l'acide glutamique ont des effets analogues, à savoir la diminution du *pI*.

Connues depuis de nombreuses années chez les mollusques (Weiner & Hood 1975), les protéines « anormalement » acides s'avèrent difficiles à étudier par leurs propriétés physico-chimiques particulières. De ce fait, les premières séquences protéiques complètes arrivent assez tardivement après leur découverte : il s'agit de MSI31 chez *P. fucata* (Sudo *et al.* 1997) et MSP-1 chez *Patinopecten yessoensis* (Sarashina & Endo 2001). Par la suite, d'autres protéines ont été identifiées, parmi lesquelles l'Aspéine chez l'huître perlière *P. fuctata* (Tsukamoto *et al.* 2004), la prismaline-14 (Suzuki *et al.* 2004) chez l'huître perlière également, ainsi que les protéines de la famille Asprich chez *Atrina rigida* (Gotliv *et al.* 2005). Du fait de leur teneur élevée en acide aspartique, ces protéines présentent toutes une propension à lier beaucoup d'ions calcium, de manière labile ; notamment, MSP-1 arbore plusieurs domaines suspectés d'interagir avec les ions calcium ou avec les cristaux calcitiques. Les protéines de la famille Asprich, par leur grande similitude avec les calséquestrines, protéines de muscles cardiaques et squelettiques – ces deux familles possèdent en effet un domaine riche en acide aspartique - semblent également posséder une capacité à lier le calcium (Marin *et al.* 2008). Notons également que la protéine Aspéine est probablement la protéine la plus acide connue à ce jour : avec une majorité de résidus d'acide aspartique (60,4 %), son *pI* théorique est de 1,67, tandis que sa structure primaire suggère une forte capacité, mais une faible affinité à lier les ions calcium (Marin *et al.* 2008). La prismaline-14 (Suzuki *et al.* 2004) est associée à l'inhibition, *in vitro*, du carbonate de calcium et induit des changements morphologiques des cristaux de calcite.

L'ensemble de ces protéines anormalement acides partagent plusieurs points communs, le premier étant une tendance à être associées aux biominéraux calcitiques plutôt qu'aragonitiques (Marin *et al.* 2008). Un autre caractère commun est leur richesse en acide aspartique plutôt qu'en acide glutamique : cette sélection d'un acide aminé plutôt qu'un autre, aux propriétés très voisines, est tout à fait fondamentale, mais pourrait en partie s'expliquer par des impératifs stéréochimiques, le radical de l'acide aspartique ayant une chaîne plus courte que celle du radical de l'acide glutamique. Étant donné leurs caractéristiques, ces protéines très acides présentent un grand potentiel d'interaction avec le carbonate de calcium.

Ces protéines possèdent notamment la capacité de lier les ions calcium par interactions électrostatiques avec leurs groupements anioniques, et peuvent ainsi servir de support à la nucléation (Marxen & Becker 2000; Miyashita *et al.* 2000). Dans leur article fondateur, Weiner et Hood (1975) démontrent le potentiel rôle "nucléateur" de ce genre de protéines. Ils remarquent également que la distance atomique entre deux ions calcium au sein de cristaux de carbonate de calcium correspond à la distance entre deux charges négatives de résidus acide aspartique consécutifs au sein de la séquence primaire d'une protéine. Plus tard, Wheeler *et al.* (1981) observent la capacité de ces protéines à retarder la précipitation *in-vitro* du carbonate de calcium ; ce phénomène dose-dépendant suggère alors un potentiel rôle inhibiteur pour ces protéines. Ainsi, les travaux successifs de Weiner et Hood (1975) et de Wheeler *et al.* (1981) font émerger l'idée selon laquelle les protéines acides joueraient deux rôles antagonistes dans la biominéralisation.

#### (ii) Les protéines modérément acides

Avec un pI compris entre 4,5 et 7, les protéines modérément acides forment un groupe très disparate. Chez les mollusques, la famille de protéines la plus étudiée et la première à avoir été identifiée est la nacréine du bivalve *P. fucata* (Miyamoto *et al.*, 2003, 1996). Cette protéine, ubiquitaire au sein de l'épithélium calcifiant du manteau (Miyamoto *et al.* 2005; Takeuchi & Endo 2006), se compose d'une répétition de plusieurs GXN (où X est fréquemment D, N, ou E) encadré de deux sous-domaines de type anhydrase carbonique. Le domaine répété confère à la protéine la capacité d'inhiber la précipitation de carbonate de calcium *in-vitro* (Marin *et al.* 2008). Depuis sa découverte, la nacréine a également été mise en évidence chez *Pinctada maxima* (Kono *et al.* 2000) et chez le gastéropode *Turbo marmoratus* (Miyamoto *et al.* 2003). Les protéines de la famille N14/N16/perline représentent également un groupe majeur de protéines, dont les membres diffèrent de quelques acides aminés seulement. Ces protéines seraient toutes capables de lier le calcium, et semblent induire la formation d'aragonite (Matsushiro *et al.* 2003).

La mucoperline constitue également une protéine d'intérêt, mais d'une famille totalement différente. Mise en évidence chez *Pinna nobilis* (Marin *et al.* 2000), cette protéine se compose de trois domaines : un N-terminus court, une région centrale de 13 tandems répétés de 31 acides aminés chacun, et un C-terminus enrichi en sérine. L'ensemble de ces caractéristiques (glycosylation, richesse en proline et sérine dans les domaines répétés,

nombreux sites potentiels de O-glycosylation, etc.) la rapproche de la famille des mucines, protéines ubiquitaires associées aux tissus épithéliaux. Les mucines remplissent plusieurs fonctions en lien avec leur capacité à polymériser et former des gels : elles sont notamment impliquées dans la lubrification épithéliale, jouent un rôle de barrière efficace contre les agressions chimiques et peuvent également intervenir dans les processus de signalisation cellulaire. De ce fait, la mucoperline pourrait être un constituant de la matrice « *gel-like* » décrite par Addadi et al. (2006) que les tablettes de nacre "compriment" de par leur croissance latérale, lorsqu'elles entrent en confluence (Marie *et al.* 2011b; Marin *et al.* 2000).

Dans un autre registre, la tyrosinase identifiée chez *P. fucata* et nommée Pfty1 (Nagai *et al.* 2007) est une enzyme impliquée dans l'oxydation des groupes phénol des résidus tyrosine pour former la mélanine. Ainsi, cette protéine pourrait être impliquée dans la pigmentation de la couche prismatique au sein de laquelle elle a pu être observée et y resterait piégée par la suite. Pfty1 pourrait également jouer un rôle dans la défense de l'huître perlière contre le parasitisme. En effet, lors de la mélanisation, de la mélanine serait déposée à la surface du parasite et jouerait ainsi un rôle clé dans la cicatrisation des plaies et la défense contre les infections pathogènes dans le système de défense des invertébrés (Takgi & Miyashita 2014).

Enfin, la dermatopontine, identifiée chez un gastéropode moderne (Marxen *et al.* 2003) présente une grande homologie avec les dermatopontines de vertébrés et d'invertébrés ; suggérant ainsi qu'elle pourrait jouer un rôle dans l'organisation spatiale de la matrice. C'est une protéine glycosylée, et à ce jour, la seule pour laquelle on connaît la séquence de l'oligosaccharide qui lui est attaché.

Notons que quasiment toutes ces protéines sont exclusivement associées à l'aragonite et notamment à la couche nacrée, sauf MSI7, la tyrosinase-like et la Prsmin qui seraient, quant à elles, liées à la couche prismatique.

### (iii) Les protéines basiques

Chez les mollusques, la découverte de protéines au *pI* basique fut plus surprenante que celle de protéines acides, bien que prévisible compte tenu des nombreuses protéines basiques caractérisées au sein des spicules d'oursin (Killian & Wilt 1996; Wilt *et al.* 2003). La première protéine basique identifiée, et également la plus complexe en termes de structure

primaire, est la lustrine A (Shen *et al.* 1997). Cette protéine supposée insoluble, extraite de la couche nacrée de l'orveau *Halitis rufescens*, est riche en acides aminés serine (16 %), proline (14 %), glycine (13 %) et cystéine (9 %). Les propriétés élastomères de sa structure primaire permettent, pour la première fois, d'établir un lien direct avec l'ensemble des caractéristiques mécaniques de la nacre. De plus, sa structure modulaire suggère que cette protéine est multifonctionnelle et serait impliquée dans des interactions avec d'autres macromolécules et biominéraux.

Chez les bivalves, et notamment chez *Pinctada fucata*, plusieurs autres protéines ont été identifiées par la biologie moléculaire, à partir de tissus du manteau. Avec des *pI*s systématiquement supérieurs à 9 (sauf une exception), ce sont les protéines les plus basiques connues à ce jour en association avec la coquille. Elles se répartissent notamment en deux familles : les "lysine rich matrix proteins" (KRMPs ;Zhang *et al.* 2006b) et les shematrins (Yano *et al.* 2006). Les KRMPs forment une famille de protéines composées de domaines riches en lysine, et de domaines riches en glycine et tyrosine, susceptibles d'interagir avec des ions ou des résidus chargés négativement, tels que les bicarbonates ou les protéines acides. Les shematrines forment une famille d'au moins huit groupes orthologues de protéines constituées de domaines similaires, riches en glycine. Certains membres présentent des homologies avec MSI31 ou la partie C-terminale des KRMPs, tandis que la shematine 5 (seule protéine présentant un domaine acide et un *pI* de 7.7) ressemble à l'Aspéine. Les KRMPs et les shematrines présentent également des domaines de faible complexité ("repetitive low-complexity domains", encore appelés RLCDs) qui, pour les représentants de la famille des shematrines, semblent similaires à ceux trouvés dans la soie d'araignée (Yano *et al.* 2006). Ces caractéristiques font de ces protéines de parfaits candidats comme constituants de la matrice "gel-like" décrite par Addadi *et al.* en 2006 (McDougall *et al.* 2013). Si les KRMPs et les shematrines ont initialement été spécifiquement associées à la couche prismatique de la coquille, l'expression de membres de chacune de ces deux familles dans le manteau palléal ainsi que dans le repli externe du manteau suggère que ces protéines possèdent également un rôle dans la formation de la couche nacrée et du périostracum (Gardner *et al.* 2011).

Chez le gastéropode *Haliotis laevigata* (orveau), quatre protéines différentes ont pu être purifiées et séquencées à partir de la couche nacrée de la coquille : la perlustrine (Weiss *et al.* 2000, 2001), la perlucine (Mann *et al.* 2000; Weiss *et al.* 2000), la perlwapine (Treccani *et al.* 2006), et la perlinhibine (Mann *et al.* 2007). La perlustrine est une protéine de petite

taille, dont la séquence présente des homologies avec des protéines de liaison à l'insuline ("*insulin-like growth factor binding protein*" ou IGF-BP) contenues dans les os de vertébrés. La perlucine, quant à elle, présente des homologies avec les lectines de type C, c'est-à-dire dépendantes au calcium ("*calcium-dependent*"). Des analyses *in vitro* ont démontré la capacité de la perlucine à provoquer la nucléation de cristaux de carbonate de calcium en solution. Des études plus poussées d'analyse par microscopie de force atomique (AFM) ont confirmé ces observations en démontrant que cette protéine induisait une accélération de la nucléation de cristaux à la surface des prismes de calcite (Blank *et al.* 2003). La perlwapine présente des similarités avec la partie C-terminale de la séquence de la lustrine A, et contient trois domaines WAP ("*whey acidic protein*", famille de protéines caractérisée par un patron de 8 résidus cystéine conservés, impliqués notamment dans les ponts disulfures). Des analyses AFM suggèrent que la perlwapine est un inhibiteur potentiel de précipitation du carbonate de calcium, en se liant avec les cristaux selon certains plans spécifiques. Enfin, la quatrième et dernière protéine, la perlinhibine est responsable de l'inhibition de la croissance de la calcite au profit de la formation d'aragonite *in vitro* (Mann *et al.* 2007).

#### (iv) L'apport des méthodes haut-débit

Depuis le milieu des années 2000, l'émergence de techniques ou méthodes "haut-débit" appliquées aux matrices organiques coquillières a largement accru nos connaissances sur la fraction protéique de celles-ci. Ces méthodes se sont substituées aux approches "une à une", consistant à aller "pêcher" un gène codant une protéine coquillière en amplifiant ce gène par PCR à l'aide d'amorces nucléotidiques dégénérées ou en criblant une banque d'ADN complémentaire par amorces nucléotidiques ou anticorps (Marin 2020). Les méthodes haut-débit permettent d'obtenir des répertoires sécrétoires partiels ou complets de la matrice coquillière chez de nombreux organismes (modèles, ou non), aussi appelés squelettome ("*skeletal proteome*" ou "*skeletome*" en anglais ; "*shellome*" pour les métazoaires à coquilles). Ces techniques sont essentiellement des méthodes protéomiques couplées, ou non, à des méthodes transcriptomiques. D'un côté, la protéomique consiste à extraire la matrice coquillière, puis à la fragmenter en de très nombreux peptides par une enzyme (en général, la trypsine qui coupe les liaisons peptidiques au niveau des résidus lysine et arginine), puis à analyser ces peptides par spectrométrie de masse en tandem (*i.e.* deux analyseurs de masse associés). On obtient ainsi de très nombreuses courtes séquences peptidiques (5 à 20-25

résidus), que l'on compare aux bases de données existantes. De l'autre, la transcriptomique consiste à extraire les ARN messagers d'un tissu – disons un tissu calcifiant – puis, après un certain nombre d'opérations (conversion en ADNc, etc.) à séquencer massivement ces brins, puis à les associer afin d'obtenir les séquences nucléotidiques les plus complètes possibles. La transcriptomique nous donne ainsi tous les ARN messagers exprimés par un tissu, en général plusieurs dizaines de milliers d'ARN différents. Les données peuvent ensuite être filtrées et par exemple, réduites aux ARN codant des protéines sécrétées ; on obtient alors un sécrétome ("secretome" en anglais). Il s'agit de l'ensemble des protéines sécrétées par le tissu calcifiant. En revanche, si l'on combine la transcriptomique à partir d'un tissu calcifiant (*i.e.* le manteau chez les mollusques) et la protéomique à partir d'extraits organiques de coquilles, on peut alors obtenir le contenu protéique de la coquille, le squelettome correspondant à l'ensemble des protéines contenues ou piégées dans la coquille. Celui-ci est généralement composé de nombreuses protéines très différentes, comportant des domaines de nature et de propriétés chimiques différentes, souvent arrangés en tandem (Marin *et al.* 2016). Ainsi, le sécrétome et le squelettome constituent deux jeux de données complémentaires, l'un (le sécrétome) supposé contenir l'autre (le squelettome) : le premier informe sur toutes les macromolécules sécrétées par le tissu, le second celles strictement incluses dans le tissu minéralisé.

Parmi la liste étendue de domaines fonctionnels identifiés au sein des protéines coquillières de mollusques, les domaines de faible complexité (*Low-Complexity Domains*, LCDs) ou la répétition de motifs de faible complexité (*Repetitive Low-Complexity Domains*, RLCs) sont largement répandus (Kocot *et al.* 2016a, 2016b; Marie *et al.* 2010a, 2012). Les motifs sont généralement courts, avec une dizaine d'acides aminés environ par unité répétée, mais quelques-uns peuvent comporter jusqu'à 200 acides aminés (Sarashina & Endo 2006; Yano *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2006b). Tous ces domaines (LCDs et RLCs) présentent une composition en acides aminés dite « biaisée », car dominée par un, deux, ou trois résidus uniquement. Sauf exceptions (comme par exemple les domaines riches en proline), les domaines LCD ou RLC sont désordonnés, c'est-à-dire qu'ils n'ont pas de structure tertiaire bien définie. Ce désordre structurel est source de flexibilité fonctionnelle (Arivalagan *et al.* 2017) pour les protéines coquillières, et semble également être une caractéristique commune à l'ensemble des métazoaires calcifiants ; il est donc tout à fait curieux de remarquer que c'est précisément l'interaction entre ces domaines désordonnés qui génère l'ordre cristallin (Kalmar *et al.* 2012). Différentes fonctions ont été attribuées à ces domaines, et aux protéines qui les comportent (Kocot *et al.* 2016a), notamment une capacité à lier les ions calcium et à

interagir avec les nanoparticules de carbonate de calcium lorsqu'il s'agit de domaines acides, et plus particulièrement, ceux enrichis en acide aspartique (Kocot *et al.* 2016a; Marin *et al.* 2016). Les domaines hydrophobes (enrichis en glycine, alanine et/ou proline) seraient, quant à eux, plutôt associés à l'expulsion locale des molécules d'eau, permettant ainsi la transition d'une phase amorphe vers une phase cristalline (Marin *et al.* 2016). Il semblerait que les protéines associées à ces domaines favorisent ou, au contraire, inhibent la cristallisation de la calcite ou de l'aragonite, et modulent la morphologie des structures produites (Evans 2012; Kim *et al.* 2006; Kocot *et al.* 2016a).

En dehors des LCDs et RLCDs, les protéines matricielles de la coquille peuvent également contenir des domaines caractéristiques de matrice extracellulaire (ECM pour "*extracellular matrix*" en anglais). Parmi les plus connus, on retrouve notamment les domaines de type EGF (*epidermal growth factor*), capables de lier les ions calcium, et les domaines vWF (*von Willebrand factor*), qui seraient impliqués dans des fonctions immunes. Les domaines de type EGF sont communément observés au sein de la matrice extracellulaire de nombreux métazoaires, et associés, ou non, au processus de calcification (Inoue *et al.* 1995; Jackson *et al.* 2010; Mann *et al.* 2010). Ils présentent notamment six résidus cystéines conservés, liés à un pattern caractéristique de trois ponts disulfures. Ces domaines sont impliqués dans un grand nombre de fonctions, telles que la reconnaissance protéine/protéine, l'agrégation de protéines, la signalisation moléculaire ou la capacité à lier les ions calcium (Maurer & Hohenester 1997; Stenflo *et al.* 2000).

Des domaines enzymatiques ont également été mis en évidence chez les mollusques, incluant notamment la tyrosinase et l'anhydrase carbonique (CA, "*carbonic anhydrase*" en anglais). La tyrosinase est une enzyme responsable de l'hydroxylation d'un monophénol en *o*-diphénol, puis son oxydation en *o*-quinones pour aboutir à la formation de mélanine (Rodriguez-Lopez *et al.* 1992). Cette enzyme apparaît donc comme un acteur clé des processus de pigmentation, mais aussi d'immunité naturelle et de formation d'un maillage protéique insoluble. Chez les mollusques, cette enzyme est considérée comme étant impliquée à la fois dans la pigmentation et dans la biominéralisation coquillière : chez les céphalopodes, son expression au sein de la poche à encre suggère une activité importante dans la production de mélanine (Naraoka *et al.* 2003), tandis que chez les bivalves elle semble jouer un rôle dans l'élaboration de la coquille, dans sa pigmentation et dans la formation du périostracum (Huan *et al.* 2013; Miglioli *et al.* 2019; Yang *et al.* 2017; Yu *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2006a). L'anhydrase carbonique (symbolisée CA chez les anglo-saxons) appartient à la famille de

métallo-enzymes, responsable de l'hydratation du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) en bicarbonate (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), apparaissant alors comme une enzyme importante de la biominéralisation. Les CAs se décomposent en cinq grandes familles, distribuées dans les trois règnes du vivant (Eubacteria, Archaea et Eukaryota) et dont la phylogénie est très complexe (Le Roy *et al.* 2014). Parmi les différentes formes de CA sécrétées, une grande partie présente une structure primaire « altérée », caractérisée par l'insertion d'un, ou plusieurs, domaine(s) supplémentaire(s) (souvent du type LCD) susceptible(s) alors d'augmenter l'affinité de cette enzyme pour le carbonate de calcium (Le Roy *et al.* 2014).

Enfin, d'autres domaines peuvent aussi être identifiés au sein des protéines de matrices squelettiques, à savoir les domaines inhibiteurs de protéase (*protease inhibitor domains*, en anglais). Ces domaines sont censés assurer la protection de la matrice organique contre la dégradation par l'activité de protéases extracellulaires (Arivalagan *et al.* 2017; Marin *et al.* 2016). Il est également intéressant de noter la découverte de domaines impliqués dans les processus immunitaires, tels que les immunoglobulines (IgG) ou les macroglobulines (A2M) dont on ne soupçonnait pas l'existence au sein de la matrice calcifiante (Arivalagan *et al.* 2017; Feng *et al.* 2017). Néanmoins, le rôle de ces domaines et l'aspect « immunitaire » qui leur est associé demeure, à ce jour, encore mal documentés du point de vue de la biominéralisation.

Des motifs, composés de courtes séquences très conservées longues de quelques acides aminés (5-6 à plusieurs dizaines, versus quelques centaines voire milliers d'acides aminés pour les domaines fonctionnels), peuvent également être mis en évidence au sein des protéines de la matrice coquillière. Parmi eux, on peut notamment citer les motifs de fixation d'ions calcium ("calcium-binding") ou de fixation de la chitine ("chitin-binding"), qui sont les plus fréquents. Parmi les premiers, les motifs EF-hand sont les mieux connus (Huang *et al.* 2007; Marie *et al.* 2011a; Yu *et al.* 2017): ils consistent en deux hélices  $\alpha$ , séparées l'une de l'autre par une boucle d'une douzaine d'acides aminés responsable de la fixation avec une forte affinité d'un cation calcium. Les protéines qui comprennent de tels motifs jouent souvent un rôle dans la signalisation cellulaire. Les motifs de fixation de la chitine sont également largement répandus dans les matrices coquillières de mollusques (Kocot *et al.* 2016b; Marie *et al.* 2010a, 2012; Suetake *et al.* 2000; Suzuki *et al.* 2013). De tels motifs confèrent aux protéines la capacité d'interaction avec la chitine et le minéral : c'est le cas, par exemple, de la protéine Pif dont les motifs "chitin-binding" semblent participer à la fois à la

combinaison de la phase inorganique et des polysaccharides, et à la régulation de la nucléation de la phase minérale initiale (Bahn *et al.* 2015).

### 3) Les céphalopodes

Chez les mollusques, si les bivalves et les gastéropodes constituent deux clades fréquemment étudiés du point de vue de la biominéralisation, les céphalopodes eux le sont beaucoup moins. En réalité, seuls les organismes les plus connus, mais également les plus communs et connus ont déjà été étudiés : le nautilus et la seiche. Néanmoins, même pour ces « modèles » de céphalopodes, les connaissances restent très éparses quant au phénomène de biominéralisation responsable de l'élaboration coquillière.

Dans cette section, je propose au lecteur de découvrir le clade des céphalopodes dans son ensemble en abordant quelques généralités, du point de vue de la phylogénie, de l'anatomie, de la biologie, et du rôle de la coquille chez les organismes qui la possèdent encore. A la suite de cette présentation, je vais explorer une brève revue des résultats et connaissances déjà acquis chez les organismes modèles du clade, à savoir le nautilus et la seiche. Les chapitres suivants reprendront en détail les caractéristiques microstructurales et biochimiques propres à chaque organisme étudié au cours de cette thèse.

#### 3.1) *Généralités*

Les céphalopodes sont des mollusques exclusivement marins, parmi lesquels le nautilus, la pieuvre, la seiche ou le calmar. Ils représentent d'ailleurs la troisième classe la plus importante chez les mollusques (après les bivalves et les gastéropodes), comprenant plus de 800 espèces marines actuelles aux écosystèmes et modes de vie variés, et plus de 10 000 espèces fossiles (<http://cephbase.eol.org/>; Barord & Boyle 2019; Nishiguchi & Mapes 2008). Les représentants actuels de ce clade se divisent en deux sous-classes : les Nautiloidea (comprenant les genres *Nautilus* et *Allonautilus*), derniers représentants à coquille externe, et les Coleoidea (regroupant tous les autres organismes). Bien que très différents des bivalves ou des gastéropodes, les céphalopodes partagent certaines des caractéristiques morphologiques fondamentales du phylum Mollusca (Boyle & Rodhouse 2008) : ils possèdent notamment une radula ("langue râpeuse" constituée de nombreuses dents chitineuses), un caractère unique et propre aux mollusques (Boyle 1999). On peut également citer, comme caractéristiques

communes, l'existence d'un corps non segmenté et mou, fondamentalement composé d'une masse viscérale, d'un pied et d'une tête ainsi que l'existence d'un manteau capable de sécréter une coquille.

Néanmoins, les céphalopodes se distinguent des autres représentants du phylum par de nombreux aspects morphologiques. Leur corps est allongé selon l'axe dorso-ventral, si bien que la surface initialement antérieure des mollusques est ici en position dorsale, tandis que la surface initialement postérieure se trouve en position ventrale (Ponder *et al.* 2020b). Les céphalopodes sont également dotés de tout l'équipement anatomique et morphologique nécessaire à une prédation active : chez ces organismes, la partie antérieure du pied est annexée à la région céphalique et forme un nombre variable de tentacules autour de la bouche, celle-ci étant munie de mâchoires en forme de bec d'oiseau (Lecointre & Le Guyader 2001; Nishiguchi & Mapes 2008; Ponder *et al.* 2020b). Ils possèdent des organes sensoriels très sophistiqués et notamment, des yeux et un système nerveux centralisé (avec un cerveau) très développés qui font de ces invertébrés des organismes très intelligents. Contrairement aux autres mollusques, les céphalopodes ne présentent pas de stades larvaires (trochophore ou

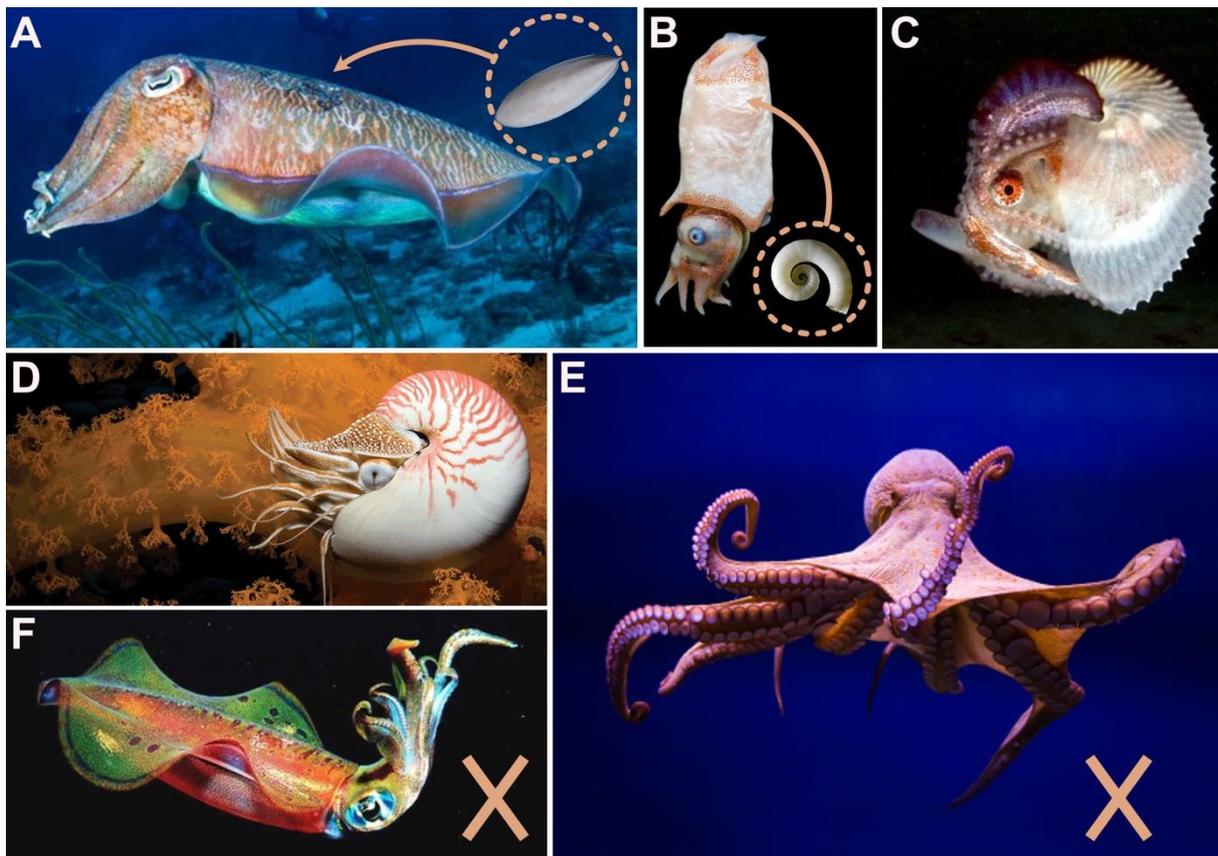


Figure I.6 : Photographies de céphalopodes actuels (source Google images). A) La seiche et sa coquille interne ; B) La spirule et sa coquille interne ; C) L'argonaute et sa coquille externe, transparente ; D) Le nautilus et sa coquille externe, aux teintes orangées ; E) La pieuvre ; F) Le calmar. Les coquilles internes de la seiche et de la spirule sont également figurées : elles sont encadrées d'un trait pointillé et la flèche indique leur position au sein de l'animal. Les croix indiquent l'absence de structure coquillière minéralisée chez l'organisme concerné, le calmar n'ayant qu'une plume organique chitineuse.

véligère) et suivent donc un développement direct (Nishiguchi & Mapes 2008) même si chez certaines espèces, les stades les plus jeunes peuvent être planctoniques. Tous les céphalopodes (actuels et fossiles) ne possèdent pas nécessairement de coquille (Fig. I.6). En effet, si certains sont particulièrement connus pour leur coquille externe bien développée, comme les Nautiloïdes (fossiles et actuels) ou encore les formes exclusivement fossiles d'Ammonoïdes, nombre d'entre eux ne présentent qu'une coquille interne (par exemple, les bélemnites ou les spirules) et/ou réduite voire complètement absente (Barord & Boyle 2019; Boyle & Rodhouse 2008; Nishiguchi & Mapes 2008; Ponder *et al.* 2020b). Un cas particulier notable au sein des coléoides est celui de l'argonaute qui possède une coquille externe non reconnue comme une « vraie » coquille, abordé plus tard au cours de cette thèse.

#### a) Origine et registre fossile des céphalopodes

Les céphalopodes possèdent un registre fossile très riche : néanmoins, en dehors des sites de préservation exceptionnelle (Lagerstätten), seule leur coquille cloisonnée (phragmocône) et parfois la loge d'habitation sont préservées. Quelques données éparses, comme des statolithes (Neige *et al.* 2016) complètent ce registre fossile. Par conséquent, les restes fossiles des Nautiloidea, des Ammonoidea et des Belemnoidea (à phragmocône interne) sont très abondants dans le registre sédimentaire. La tendance générale des céphalopodes à l'internalisation de la coquille chez les coléoides, voire à sa disparition totale chez certains taxons, a pour conséquence de rendre le registre fossile particulièrement fragmentaire pour ces derniers. Ainsi, pour retracer l'histoire évolutive de ce clade, il est nécessaire de combiner deux approches phylogénétiques complémentaires : la première est basée sur les données morphologiques (fossiles) tandis que la seconde est basée sur les données moléculaires (ARN ribosomique, ADN mitochondrial, etc.).

L'étude morphologique d'embryons de céphalopodes actuels (nautilé et coléoides) est source d'information quant à leur plan d'organisation corporelle, permettant ainsi de combler le fossé qui sépare ces formes complexes et hautement dérivées des autres mollusques (Kröger *et al.* 2011). Des études embryologiques ont notamment confirmé que le nautilé et les coléoides actuels possédaient un patron d'organisation similaire à celui des gastéropodes (Shigeno *et al.* 2008, 2010) : les organes embryonnaires sont arrangés de manière

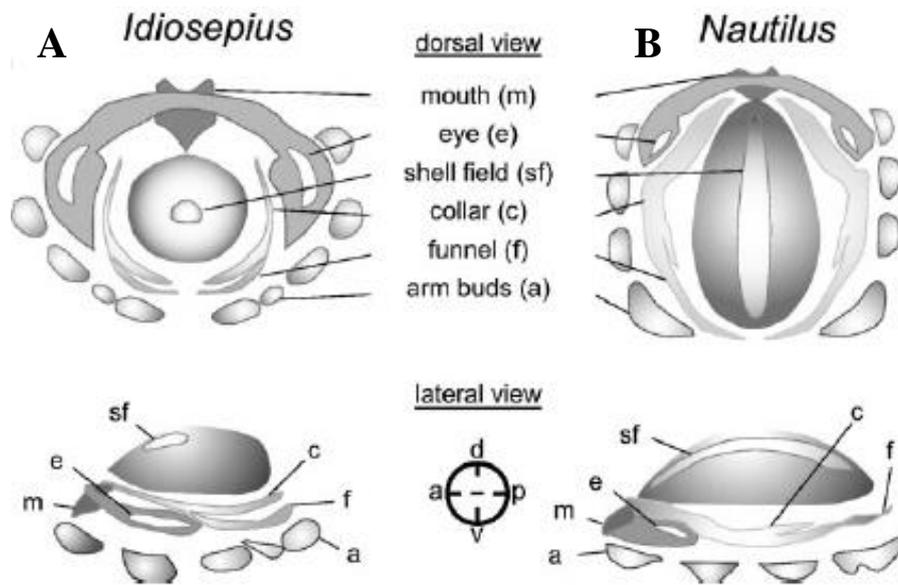


Figure I.7 : Schéma illustrant le plan d'organisation de deux céphalopodes actuels, au stade embryonnaire. A. *Idiosepius*, B. *Nautilus* ; d'après Kröger *et al.* 2011

concentrique autour de l'axe dorso-ventral du corps de ces organismes. Il apparaît également qu'un domaine coquillier externe existe dans la partie dorsale centrale de tous ces organismes (Fig. I.7), même chez les coléoides qui présentent une coquille fortement réduite à l'état adulte (*e.g.* les calmars du genre *Idiosepius*). Ces observations démontrent que les coléoides possèdent un ancêtre à coquille externe. Chez le nautilus, des études révèlent que sa forme embryonnaire présente seulement cinq paires de bras. Ceci signifie donc que les multiples tentacules qu'arbore cet organisme à l'âge adulte sont en réalité un caractère dérivé et non pas un état ancestral chez les céphalopodes, comme on l'a longtemps supposé (Boletzky 2003; Shigeno *et al.* 2010). Enfin, le développement embryonnaire des céphalopodes actuels démontre à la fois comment leur corps s'est réorienté de manière antéro-postérieure, et comment la coquille est devenue secondairement internalisée. Ces trajectoires développementales sont cohérentes avec les observations morphologiques à partir d'organismes fossiles, suggérant ainsi que les céphalopodes ont évolué à partir d'un ancêtre mollusque de type monoplacophore (Shigeno *et al.* 2010).

Si les données moléculaires et fossiles démontrent que les différentes classes de mollusques ont divergé les unes des autres au début du Cambrien, le plus vieux céphalopode connu à ce jour est *Plectronoceras cambria* (Fig. I.8), daté de la fin du Cambrien (Furongien, ~500 Ma) (Kröger *et al.* 2011; Ponder *et al.* 2020b; Uribe & Zardoya 2017; Vinther 2015). Des céphalopodes fossiles légèrement plus « récents » et très variés sont largement répandus

dans le registre paléontologique, suggérant alors que les céphalopodes ont commencé à se diversifier dès la fin du Cambrien, en l'espace de quelques millions d'années seulement. D'après l'étude morphologique de la coquille de ces formes primitives, il semblerait qu'un système de régulation de la flottabilité similaire à celui du Nautilé ait déjà existé chez *Plectronoceras*. Si plusieurs hypothèses se sont succédées au cours du temps concernant l'origine des céphalopodes, le consensus actuel propose qu'ils descendent d'un mollusque morphologiquement proche des monoplacophores (un groupe de mollusque considéré comme très primitif), à la coquille néanmoins cloisonnée comme les représentants du genre *Tannuella*

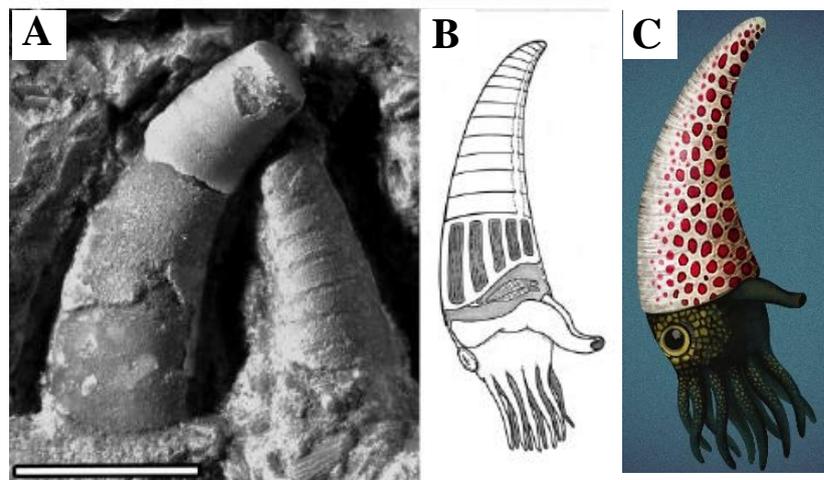


Figure I.8: Illustration du plus vieux céphalopode connu à ce jour, d'après Kröger *et al.* 2011. A. Deux spécimens de *Plectronoceras* ; B. Reconstitution schématique d'un spécimen ; C. Reconstitution d'un autre individu, en couleur, par Franz Anthony, Studio 252MYA

(Kröger *et al.* 2011; Ponder *et al.* 2020b).

## b) Phylogénie

Les céphalopodes actuels sont divisés en deux sous-classes : les Nautiloidea, derniers représentants à coquille externe répartis au sein de deux genres (*Nautilus* et *Allonautilus*) et les Coleoidea. Cette sous-classe est elle-même scindée en deux superordres : les Octobrachia dont les représentants possèdent huit bras (argonautes et pieuvres) et les Decabrachia, à dix bras dont deux modifiés en tentacules (calmars et seiches). La position phylogénétique du genre *Vampyroteuthis* (vampire des abysses ou calamar vampire) a longtemps été controversée, et il a même été proposé d'en faire un ordre à lui tout seul nommé Vampyromorpha (Pickford 1939). Cependant, des études phylogénétiques récentes basées sur

des données moléculaires rapprochent les vampyromorphes d'autres représentants du superordre Octobranchia (Lindgren *et al.* 2004; Tanner *et al.* 2017; Uribe & Zardoya 2017). De ce fait, les Octobranchia se divisent en deux ordres : celui des Vampyromorpha d'un côté et celui des Octopoda de l'autre. Enfin, chez les octopodes, deux sous-ordres sont reconnus : les Cirrata et les Incirrata qui, respectivement, possèdent ou ne possèdent pas de cirres (*i.e.* rangées d'épines charnues).

Les Decabrachia regroupent cinq ordres bien distincts : les Spirulida (représenté par un seul genre et une seule espèce : *Spirula spirula*), les Sepiida (seiches), les Sepiolida (sépioles et calmars pygmées), les Myopsida et les Oegopsida, ces deux-derniers étant distingués l'un

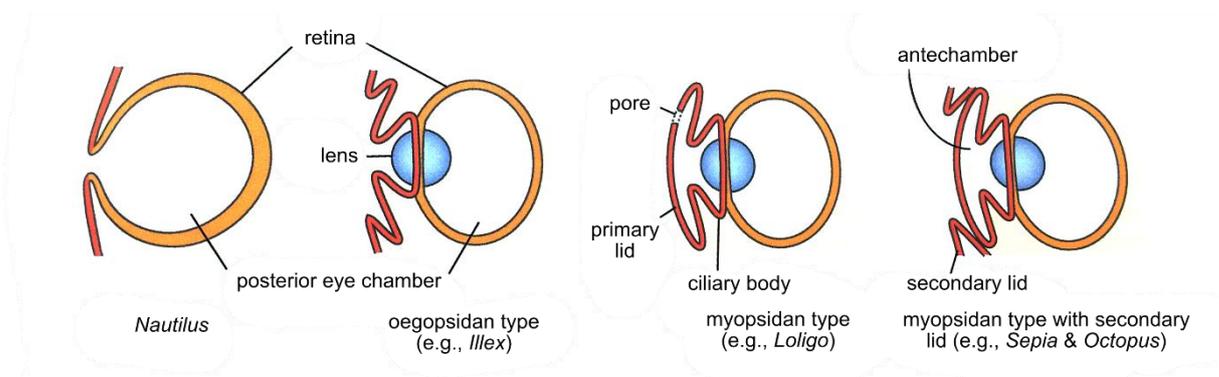


Figure I.9: Schéma illustrant les différents types d'œil chez les céphalopodes actuels, d'après Ponder *et al.* 2020.

de l'autre par la présence, respectivement, d'un œil fermé ou ouvert (Fig. I.9). Chez les Octopodes Cirrata, on identifie une quarantaine d'espèces relativement mal documentées et très peu étudiées. Chez les Incirrata, on reconnaît deux super-familles : les Argonautoida d'une part, avec quatre familles pélagiques et les Octopodoidea d'autre part, avec six familles.

Si les relations phylogénétiques entre céphalopodes sont plutôt bien établies jusqu'au niveau du super-ordre ainsi qu'à l'échelle des familles, le raccord entre ces deux niveaux taxonomiques demeure encore très controversé (Fig. I.10). Ainsi, d'une étude phylogénétique à une autre, les différents ordres reconnus classiquement chez les céphalopodes ne sont pas regroupés selon les mêmes relations de parenté.

Par exemple, l'analyse purement morphologique de Lindgren *et al.* (2004) suggère que les Oegopsida d'une part, et les Sepiolida d'autre part, ne constituent pas des groupes monophylétiques. Dans cette étude, les octopodes Cirrata et Incirrata apparaissent tous deux monophylétiques et posséderaient, comme groupe frère, les Vampyromorpha. De même,

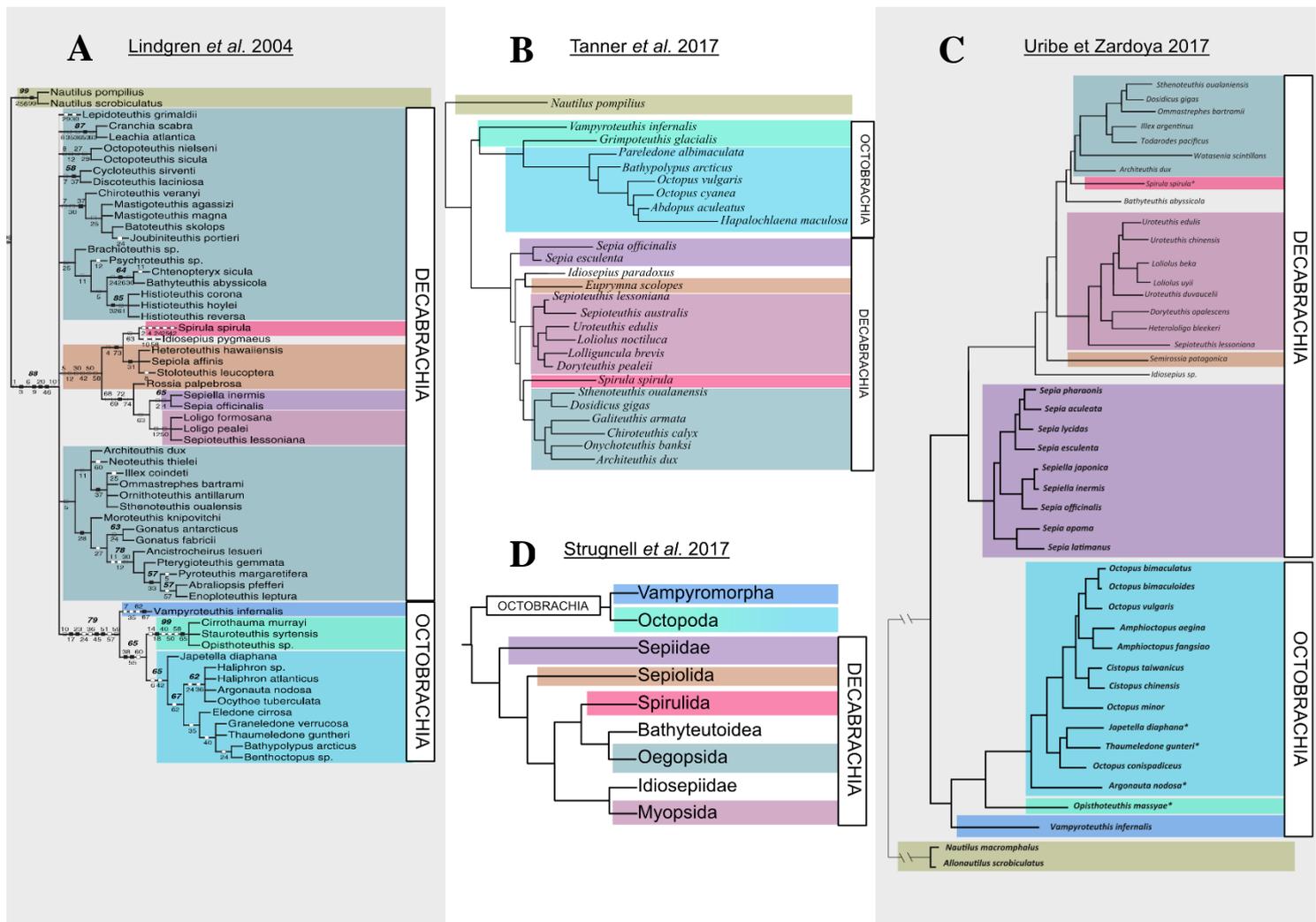


Figure I.10: Résumé des principales relations phylogénétiques entre les grands groupes de céphalopodes actuels, tels que présentés dans la littérature. A. d'après Lindgren *et al.* 2004 ; B. d'après Tanner *et al.* 2017 ; C. d'après Uribe & Zardoya 2017 ; D. d'après Strugnell *et al.* 2017.

l'analyse des caractères anatomiques par parcimonie proposée par Voight et ses co-auteurs (1997) soutient également ces relations au sein du clade des octopodes. En revanche, les octopodes Cirrata et Incirrata, apparaissent tous deux monophylétiques et auraient les Vampyromorpha comme groupe frère. Dans une analyse alternative, combinant les données morphologiques et moléculaires, Lindgren *et al.* (2004) proposent une phylogénie très différente (non présentée en Fig. I.10) où les Decabrachia apparaissent dérivés des Octobrachia tandis que les Oegopsida demeurent un groupe paraphylétique.

En revanche, d'autres analyses phylogénétiques basées sur des données moléculaires proposent des scénarios très différents : pour Tanner *et al.* (2017), les Octobrachia constituent un groupe monophylétique où les Vampyromorpha sont inclus au sein des octopodes Cirrata, et constituent le groupe frère des Incirrata. Le groupe des Decabrachia apparaît également monophylétique, ainsi que tous les ordres classiquement reconnus en son sein. D'après cette reconstruction, le groupe des Sepiida apparaît comme basal par rapport aux autres ordres de céphalopodes. L'analyse penche en faveur d'un rapprochement entre les Sepiolida et les

Idiosepiidae, tandis que les groupes-frères Spirulida et Oegopsida apparaissent dérivés des Myopsida. Pour Uribe & Zardoya (2017), la reconstruction phylogénétique est sensiblement identique, à l'exception des Vampyromorpha considérés ici comme groupe-frère des Cirrata, eux-mêmes placés comme groupe-frère des Incirrata. Enfin, selon Strugnell *et al.* (2017), l'arbre phylogénétique reste très similaire, si ce n'est que les Myopsida sont rapprochés des Idiosepiidae et les Oegopsida, des Bathyteuthoidea. Il est important de noter ici que les Idiosepiidae et les Bathyteuthoidea constituent une famille et une super-famille de céphalopodes dont l'ordre demeure incertain. Il est néanmoins important de souligner que de telles analyses moléculaires n'incluent que les taxons les plus fréquemment collectés, laissant de côté une part considérable de la diversité taxonomique des clades étudiés, contrairement à

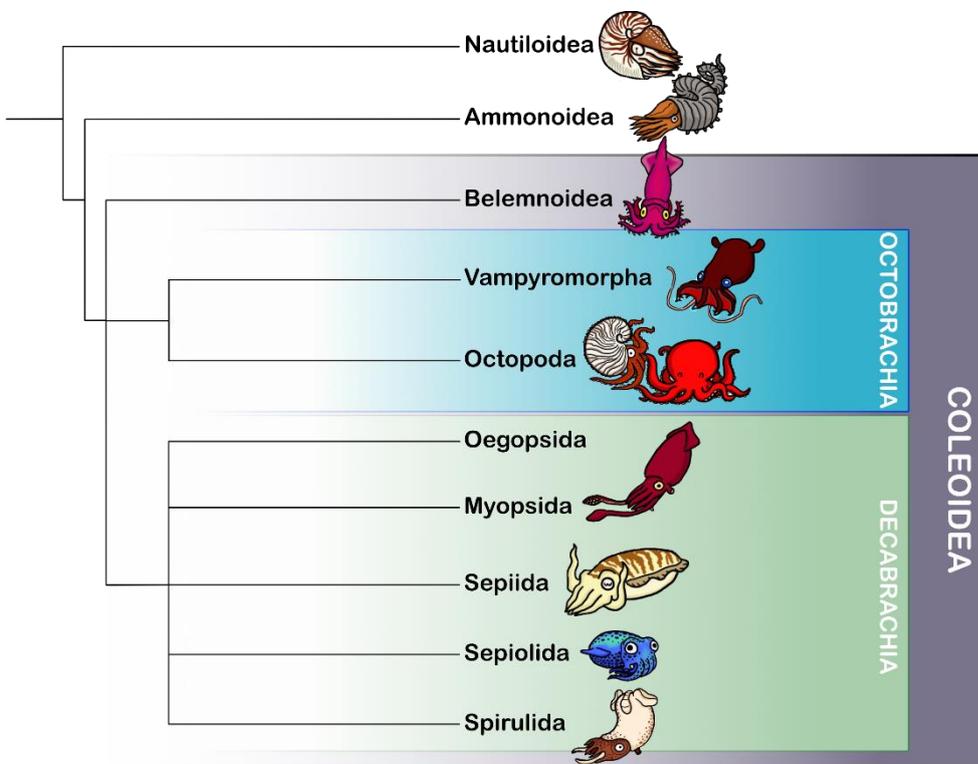


Figure I.11: Arbre phylogénétique consensuel des céphalopodes, à haut niveau taxonomique, d'après les études phylogénétiques de Kanold *et al.* 2011, Tanner *et al.* 2017, Uribe et Zardoya 2017, Lindgren *et al.* 2004 et Sanchez *et al.* 2018. Dessins de Ketrina Yim.

l'approche purement morphologique.

Les différences notables qui existent entre les reconstructions phylogénétiques moléculaires et morphologiques, ainsi que la variabilité de ces reconstructions d'une méthode à une autre, ou d'une étude à une autre, ne permettent pas d'établir avec certitude les relations phylogénétiques qui lient les différents ordres de céphalopodes. Par conséquent, l'arbre phylogénétique consensuel (Fig. I.11) ne permet pas de résoudre l'ensemble des relations de parenté qui existent entre ces organismes.

### c) Anatomie générale, biologie et cycle de vie

Le plan d'organisation des céphalopodes inclut deux yeux, un manteau, un entonnoir (ou siphon) et au moins huit bras. Certains organismes possèdent une structure interne solide, comme l'os de seiche chez *Sepia*, dérivée de la coquille externe de leurs ancêtres, mais beaucoup de coléoides en sont dénués. Chez les céphalopodes actuels, seul le nautilite possède encore une coquille externe. La terminologie des caractéristiques externes des céphalopodes, ainsi que l'anatomie interne de trois organismes actuels sont détaillées dans la figure I.12 avec, d'une part, le nautilite et d'autre part, trois coléoides : la pieuvre, la seiche et le calmar. Chez les céphalopodes, le pied est grandement modifié et est divisé en plusieurs appendices, capables de manipuler et capturer des proies, ou bien être utilisés dans le cadre de la reproduction (Nishiguchi & Mapes 2008). La principale différence entre les Decabrachia et les Octobrachia réside dans le nombre de bras : chez les calmars et les seiches, il y en a dix, dont deux sont modifiés en tentacules rétractables, tandis que les pieuvres ne possèdent que huit bras. Pour différencier un bras d'un tentacule, il existe plusieurs critères morphologiques. Les tentacules sont des organes longs et flexibles, utiles dans les fonctions de nutrition, de préhension et de sensation tactile. Ils sont plus longs que les bras, sont rétractables et possèdent une extrémité aplatie qui comporte des ventouses, ou non. Les bras, quant à eux, sont entièrement couverts de ventouses. Ils permettent notamment à l'organisme de se maintenir accroché à une surface, alors qu'il se repose. Ainsi, les coléoides actuels (Decabrachia et Octobrachia) se différencient des nautiloïdes qui possèdent de nombreux tentacules (60 à 90) mais aucun bras.

La réduction de la coquille chez les coléoides, voire sa disparition, permet l'émergence d'un mode de vie "actif", beaucoup plus mobile (Barord & Boyle 2019). Seuls *Sepia* et *Spirula* possèdent encore une coquille interne dont le fonctionnement est similaire à celui de la coquille externe de leurs ancêtres, assurant ainsi leur flottabilité. Comme chez les Nautiloidea, la distribution de gaz et de fluide au travers des loges de la coquille est contrôlée de manière osmotique et permet d'atteindre une flottabilité neutre. Ceci leur permet d'effectuer des mouvements verticaux au sein de la tranche d'eau, un mécanisme de flottabilité ancestral, supposé être commun aux nautiloïdes et ammonoïdes fossiles. Les calmars et les pieuvres ont complètement perdu cette fonction, et la plupart d'entre eux présentent une flottabilité négative. Les formes mésopélagiques, néanmoins, sont capable de

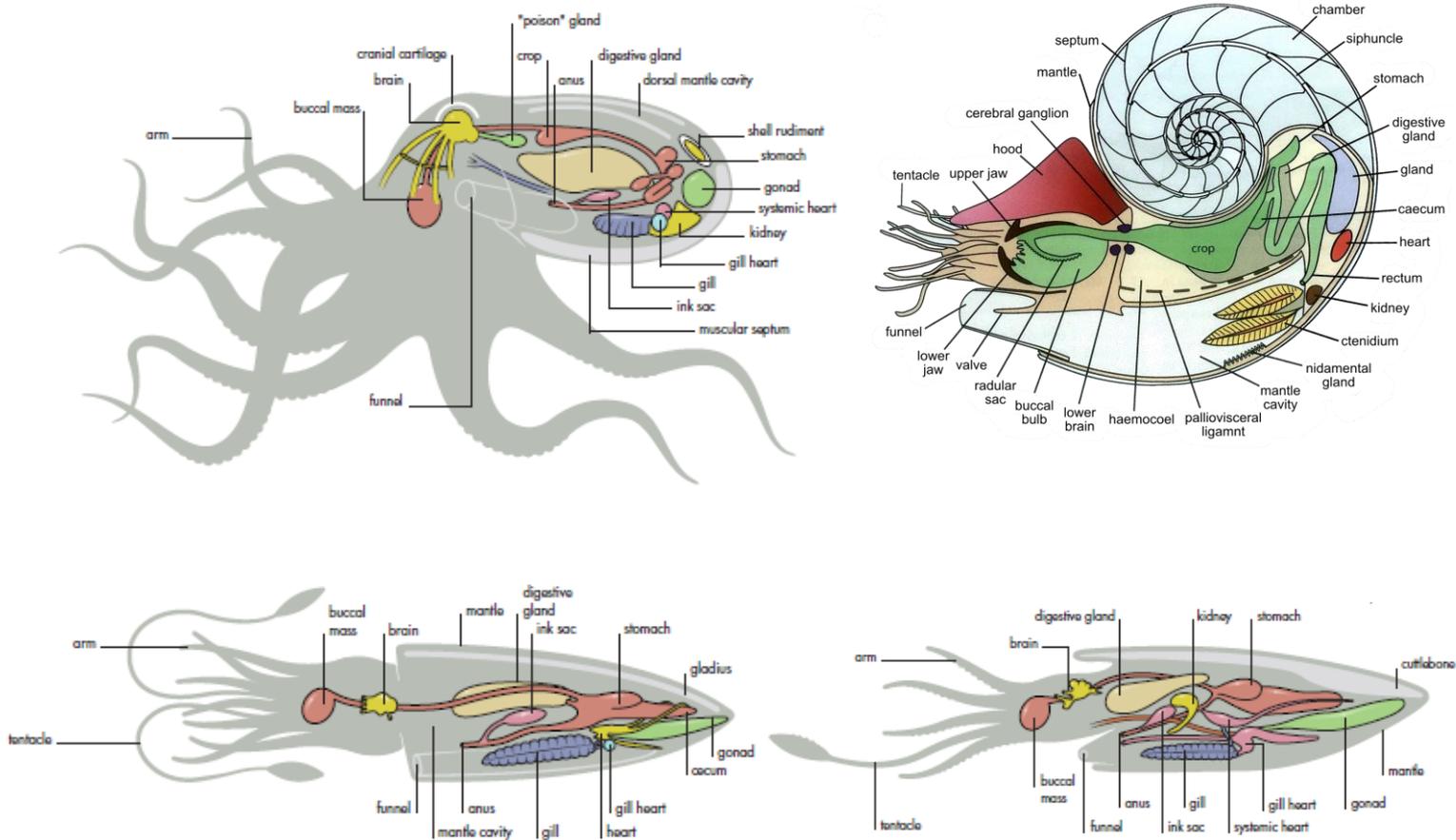


Figure I.12 : Anatomie générale d'une pieuvre (en haut, à gauche), d'un calmar (en bas, à gauche), d'une seiche (en bas, à droite) d'après Hanlon *et al.* 2018, et d'un nautilé (en haut, à droite) d'après Ponder *et al.* 2020.

réduire leur densité via des procédés chimiques, consistant notamment à stocker des ions ammonium au sein de vacuoles dans les tissus corporels de l'organisme (muscles du manteau, par exemple) et/ou à réduire le contenu protéique de leurs tissus (Barord & Boyle 2019; Boyle & Rodhouse 2008; Ponder *et al.* 2020a).

La locomotion active des coléoides pélagiques, et des nautiloides, est obtenue par la propulsion d'un jet d'eau depuis la cavité du manteau via l'entonnoir ventral, ou hyponome chez les nautiloides (Fig. I.12). Le forçage spasmodique régulier de l'eau à travers l'entonnoir peut être dirigé dans la quasi-totalité des directions, assurant ainsi une grande maniabilité. Les paires de nageoires que beaucoup de coléoides possèdent, contribuent au contrôle directionnel et leurs ondulations servent à flotter et ralentir le mouvement. La pieuvre commune est un organisme côtier essentiellement benthique : elle utilise alors ses bras à ventouses pour se mouvoir sur le fond de l'océan, et la propulsion par jet d'eau pour attaquer ou s'échapper rapidement (Barord & Boyle 2019).

La plupart des céphalopodes sont carnivores et se nourrissent principalement de poissons, de crustacés et de mollusques, bien que quelques espèces dérivées se nourrissent de phytoplancton et de zooplancton (Mangold & Bidder 1989).

Les coléoides sont majoritairement des carnivores actifs qui capturent leurs proies à l'aide de leurs bras, bien que certains d'entre eux soient microphages comme *Spirula* (Ponder *et al.* 2020a). Le calmar et la seiche mordent immédiatement les tissus de leur proie après l'avoir attrapée, en utilisant leur bec chitineux très puissant. La pieuvre a développé, quant à elle, une méthode élaborée particulièrement efficace sur les crustacés impliquant des toxines externes et des enzymes servant à extraire la chair de la carapace (Barord & Boyle 2019).

Le nautilé, étant donné sa vision réduite, utilise ses nombreux tentacules pour fouiller le sol océanique à la recherche de proies, essentiellement des petits poissons et des crustacés (Ponder *et al.* 2020b). Bien qu'on ne sache toujours pas si le nautilé est un prédateur actif ou bien un charognard, il a été démontré par des études en laboratoire que cet organisme utilisait essentiellement son olfaction pour localiser des proies déjà mortes (Barord & Boyle 2019). Les céphalopodes fossiles (nautiloïdes fossiles, bélemnites et au moins quelques ammonites) étaient probablement majoritairement carnivores. Les premiers nautiloïdes se nourrissaient probablement de petits invertébrés (trilobites et autres nautiloïdes), tandis que les bélemnites semblent avoir été les prédateurs de proies plus actives, comme les poissons ou les autres céphalopodes (Ponder *et al.* 2020b).

Les céphalopodes peuplent tous les océans du monde, depuis le littoral jusqu'aux profondeurs abyssales, depuis des habitats pélagiques à ceux benthiques. Quelques espèces du genre *Idiosepius* et quelques sépioles, peuvent tolérer des eaux saumâtres. Chez les formes actuelles de céphalopodes, environ 35 % sont planctoniques, 16 % benthiques, 19 % nectobenthiques, 5 % benthopélagiques et 25 % nectoniques (Barskov *et al.* 2008). Parmi ces organismes, de nombreuses espèces opèrent des migrations diurnes dans la colonne d'eau, rejoignant les profondeurs durant le jour et regagnant des eaux peu profondes durant la nuit (Ponder *et al.* 2020b). De nombreux calmars, la majorité des seiches et plusieurs pieuvres vivent dans la zone photique (eaux de surface) ; ces organismes sont notamment capables de changer de couleur et de camouflage (crypsis) pour rester invisibles aux yeux de leurs prédateurs naturels (requins, phoques, etc.). Certaines pieuvres s'enfouissent dans le sédiment et d'autres encore, vivent dans des conditions extrêmes : eaux profondes, courants

hydrothermaux, eaux froides... Plusieurs autres coléoides sont également capables de vivre dans des eaux profondes très froides (Boyle 1999; Boyle & Rodhouse 2008).

Chez les céphalopodes, les sexes sont séparés (Barord & Boyle 2019) et à ce jour, seulement deux exemples d'individus hermaphrodites ont été décrits, chez *Octopus vulgaris* (Pickford 1947) et *Enteroctopus megalocyathus* (Ortiz & Ré 2006). De manière générale, les céphalopodes ne possèdent qu'une seule gonade, et les mâles transfèrent les spermatophores aux femelles, lors d'un accouplement parfois accompagné d'une parade amoureuse élaborée (Ponder *et al.* 2020b). Le transfert des spermatophores mature du mâle dans la cavité palléale de la femelle se fait à l'aide d'un bras modifié, nommé hectocotyle ou par un organe terminal. Les nautiloïdes (Nautiloidea), les calmars côtiers (Loliginidae), quelques octopodes (Octopodidae) et toutes les seiches (Sepioidea) encapsulent leurs œufs qu'ils attachent à un substrat (corail, éponges, algues, etc.) soit individuellement, soit en groupe ou en série. Chez la plupart des octopodes incirattes (comme *Octopus vulgaris* ou les différentes espèces du genre *Argonauta*), les œufs sont gardés par la femelle, en les couvant ou en restant près d'eux pour les protéger des prédateurs. Enfin, la plupart des familles de calmars océaniques (Oegopsida) pondent leurs œufs sous la forme d'une masse fragile, dans des eaux intermédiaires, mais les modes d'accouplement et de ponte demeurent encore mal documentés pour ces organismes. Il n'existe pas de stades larvaires (impliquant une métamorphose complète) malgré l'existence d'une phase planctonique dans le développement de certaines espèces. Du fait d'un développement direct, il s'ensuit que le juvénile fraîchement éclos de son œuf ressemble déjà à l'adulte, il n'en est qu'une version miniature (Boletzky 1974). Puisque ceux-ci peuvent présenter un habitat et une niche écologique différents de l'adulte, on parle généralement de « paralarve » (Barord & Boyle 2019; Ponder *et al.* 2020b). Chez les coléoides, la reproduction est qualifiée de sémelpare : les gonades des adultes ne sont pas à même de se régénérer pour la période de reproduction suivante. Par conséquent, ces organismes ne connaissent qu'une seule saison de reproduction durant leur vie, et mâles comme femelles ne tardent pas à mourir après la ponte des œufs. Chez les octopodes, les femelles ayant tendance à garder leurs œufs, elles épuisent leurs ressources énergétiques et meurent généralement aux alentours de l'éclosion des œufs. En laboratoire, les mâles possèdent une espérance de vie similaire et l'idée selon laquelle ils meurent peu de temps après l'accouplement, bien qu'encrée dans la littérature, n'est pas franchement démontrée. Chez le nautilé, en revanche, la reproduction semble illimitée : d'après l'élevage

d'organismes en captivité, cet organisme est capable de se reproduire et de pondre tout au long de son existence, dès que la maturité sexuelle est atteinte : on parle alors de reproduction itéropare (Barord & Boyle 2019; Ponder *et al.* 2020b).

#### d) La coquille des céphalopodes

La coquille des céphalopodes, au sens propre du terme, est constituée d'aragonite en association avec une matrice organique et est sécrétée par l'épithélium externe calcifiant du manteau comme chez les autres mollusques. Plusieurs formes fossiles éteintes présentent une coquille externe, mais de nos jours seuls les représentants du genre *Nautilus* la possèdent encore. Quelques coléoides développent une coquille interne aragonitique, c'est le cas notamment du phragmocône (partie cloisonnée) des bélemnites, de l'os de seiche chez *Sepia* et de la coquille de *Spirula*. Les autres céphalopodes arborent des structures dérivées de cette coquille : chez *Argonauta* par exemple, les femelles élaborent une pseudo-coquille fragile principalement pour y stocker leurs œufs. Cette structure n'est pas homologue de la coquille originelle, puisqu'elle est sécrétée par une paire de bras modifiés plutôt que par le manteau (Finn 2018; Finn & Norman 2010; Kniprath 1981). Des vestiges chitineux et allongés de la coquille originelle des céphalopodes persistent chez les calmars et *Vampyroteuthis* : on parle de plume ou de gladius.

Les coquilles cloisonnées des céphalopodes actuels et fossiles arborent une grande diversité de forme et de taille, mais possèdent une seule et même terminologie pour les décrire (Fig. I.13).

##### 3.1) Le modèle nautilus

La coquille de *Nautilus*, comme celle de nombreux céphalopodes actuels et fossiles est entièrement aragonitique et est composée de deux couches minéralisées : la couche externe est prismatique tandis que la couche interne est nacréée. Cette couche nacréée est

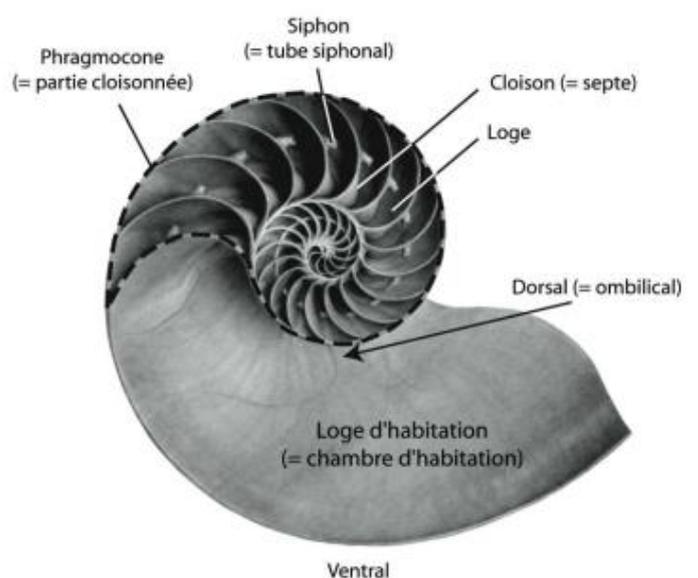


Figure I.13 : Illustration de la terminologie communément employée pour décrire la coquille des céphalopodes, ici chez un nautilus.

limitée, dans sa partie la plus interne, par une couche prismatique généralement qualifiée de couche interne prismatique dans la littérature la plus récente (Grégoire 2010). L'ensemble de ces couches (couche externe et interne) est recouvert par le périostracum, qui sert alors de support à la croissance de la phase minérale lors de la biominéralisation. La nacre consiste en de nombreuses lamelles minéralisées, parallèles à la surface interne de la paroi coquillière et superposée horizontalement. Chaque lamelle est composée d'une seule couche de tablettes aragonitiques, dont l'axe-c est faiblement développé et perpendiculaire à la surface de croissance cristalline (Crenshaw & Ristedt 1976; Grégoire 2010; Meenakshi *et al.* 1974; Mutvei 1964; Nudelman *et al.* 2006). Chez *Nautilus*, la nacre est qualifiée de « colonnaire » (ou columnaire) : les tablettes d'aragonite croissent les unes sur les autres, formant ainsi des piles de cristaux. Dans une colonne, les tablettes ne sont pas parfaitement alignées ; il existe un léger décalage latéral permettant ainsi une interpénétration et une association plus étroite avec la colonne voisine. Chaque tablette d'aragonite est enveloppée dans une matrice organique (« un ciment ») qualifiée d'intercristalline. La matrice intercristalline n'est pas homogène : on différencie la matrice interlamellaire, séparant deux lamelles successives, et la matrice intertabulaire qui sépare deux tablettes de nacres voisines sur le plan horizontal (Marin *et al.* 2012). A l'intérieur des tablettes de nacre, on trouve en plus une matrice dite intracristalline.

La nacre du nautilé a fait l'objet de nombreuses investigations biochimiques de la matrice coquillière dans son ensemble (Dauphin & Marin 1995; Goffinet & Jeuniaux 1979; Grégoire 1972; Weiner 1979). Grégoire (1962) est le premier à observer la matrice organique située autour des tablettes de nacre et par la suite, plusieurs études sont venues compléter ses observations. Notamment, Goffinet (1969) introduit l'importance de la chitine dans les propriétés mécaniques de la nacre tandis que Degens *et al.* (1967) présentent la composition en acides aminés de l'ensemble de la coquille de *Nautilus*, révélant ainsi une certaine richesse en glycine et alanine, deux acides aminés non-polarisés, plutôt hydrophobes. La matrice organique représente 4-5 % du poids total du biominéral et est composée de protéines, de glycoprotéines (Crenshaw & Ristedt 1976; Dauphin 2006; Keith *et al.* 1993; Weiner & Hood 1975) et d'une fraction importante de chitine (Dauphin & Marin 1995; Goffinet & Jeuniaux 1979; Weiner & Traub 1980). De nos jours, seulement trois séquences N-terminales sont disponibles (Zhao *et al.* 2003) et seules quelques études ont caractérisé, de manière détaillée, le contenu protéique de la matrice coquillière (Marie *et al.* 2009b, 2009a, 2011b). De ces études, il transparait que la matrice acido-insoluble (AIM) est essentiellement constituée de

protéines hydrophobes et de chitine, tandis que la matrice acido-soluble (ASM) est majoritairement constituée de protéines et de glycoprotéines discrètes, capables d'interagir avec la formation de cristaux calcitiques, ainsi que de polysaccharides acides. Parmi ces protéines, la Nautiline-63 apparaît comme l'une des plus importantes au sein de la fraction ASM de la matrice coquillière (Marie *et al.* 2009b, 2011b). Après purification, cette protéine s'avère être riche en résidus glycine et acide aspartique et fortement glycosylée ; elle possède également une fraction saccharidique acide, et semble capable de lier la chitine *in vitro*. De même, la Nautiline-63 influence énormément la morphologie des cristaux calcitiques précipités, mais ne semble pas capable (ou alors très faiblement) d'inhiber leur formation.

Enfin, l'immunolocalisation de cette protéine, grâce à un anticorps spécialement synthétisé contre cette protéine purifiée, révèle qu'elle est principalement située dans la matrice intertabulaire de la nacre, c'est-à-dire entre les tablettes plutôt qu'au sein de celles-ci. Les études protéomiques réalisées sur la matrice coquillière de *Nautilus* ne révèlent pas d'homologies de séquences avec la nacre de gastéropodes comme *Haliotis* et très peu de ressemblance avec des protéines de bivalves, suggérant ainsi un jeu complètement différent de protéines pour construire la couche nacrée de la coquille (Marie *et al.* 2009b).

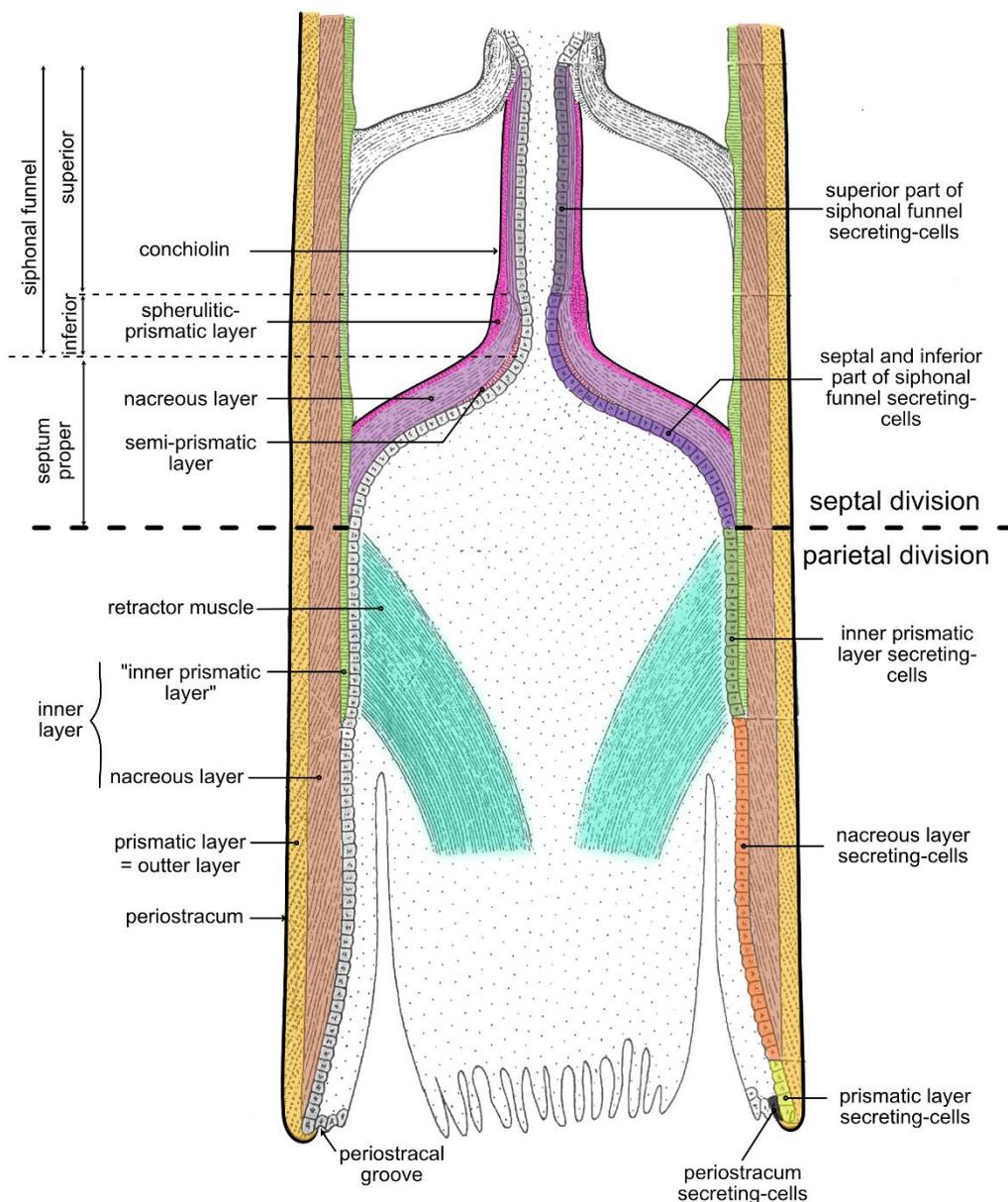


Figure I.14: Diagramme vertical de la section dorso-ventrale de la portion ventrale de *Nautilus*, montrant les divisions de l'épithélium calcifiant externe du manteau (modifié d'après Mutvei, 1964).

Sur la base de données structurales sur le nautilus, Mutvei (1964) propose une formation coquillière selon deux divisions bien distinctes de l'épithélium calcifiant du manteau : une division pariétale et une division septale (Fig. I.14). Dans son hypothèse, la division pariétale produit le mur coquillier dans son ensemble et concerne plusieurs tissus différents : l'extrémité du manteau est responsable de la formation du périostracum (au niveau du sillon périostracal), la face externe du manteau sécrète, selon deux régions distinctes, la couche externe et la nacre du mur coquillier, et finalement, les tissus myoadhésifs dorsaux du manteau produisent la couche prismatique interne du mur coquillier. La division septale, quant à elle, assure la formation des septes et du tube siphonal également selon deux régions cellulaires distinctes : l'une, chargée de la sécrétion du septes et d'une partie du tube siphonal et l'autre, responsable du reste du canal siphonal.

Sur la base de données morphologiques, et notamment sur les empreintes d'attachement musculaire, Klug *et al.* (2008) proposent un schéma conceptuel décrivant le processus de formation septale chez *Nautilus* (Fig. I.15). Selon leur modèle, le processus se déroule selon les étapes suivantes :

- La formation d'un nouveau septes débute par la sécrétion d'une arête murale ("*mural ridge*") en face du septes précédent, tandis qu'un nouveau matériel coquillier est déposé à l'extrémité aperturale de la coquille.
- La partie postérieure du corps de l'animal se détache de l'ancien septes et se déplace en avant, créant ainsi un espace vide qui se remplit de liquide. Ce mouvement est permis par la contraction de petits muscles radiaux (Fig. I.15A). Les fibres musculaires transverses détachent la partie septale du manteau des marges de l'ancien septes (Fig. I.15B, cf. encart).
- Les fibres musculaires attachées à la coquille ("*myoadhesive band*" et « *myoadhesive ligament*») se contractent et tirent la partie septale du manteau en avant (Fig. I.15C).
- La zone d'attachement des muscles rétracteurs céphaliques se déplace également en avant, avec l'aide de la contraction des muscles longitudinaux du manteau (Fig. I.15D).

- La partie postérieure du manteau est ensuite attachée à une arrête murale nouvellement formée, à l'endroit où un nouveau septe s'apprête à être formé. Cette étape est suivie par la formation d'une membrane de « conchioline », qui sera finalement recouvert d'une couche minérale coquillière pour former le nouveau septe (Fig. I.15E).

À ce jour, et à notre connaissance, aucun autre schéma conceptuel visant à retracer les principales étapes de la formation coquillière dans son ensemble chez *Nautilus* n'a été proposé. S'il semble exister un relatif consensus autour du processus de biominéralisation

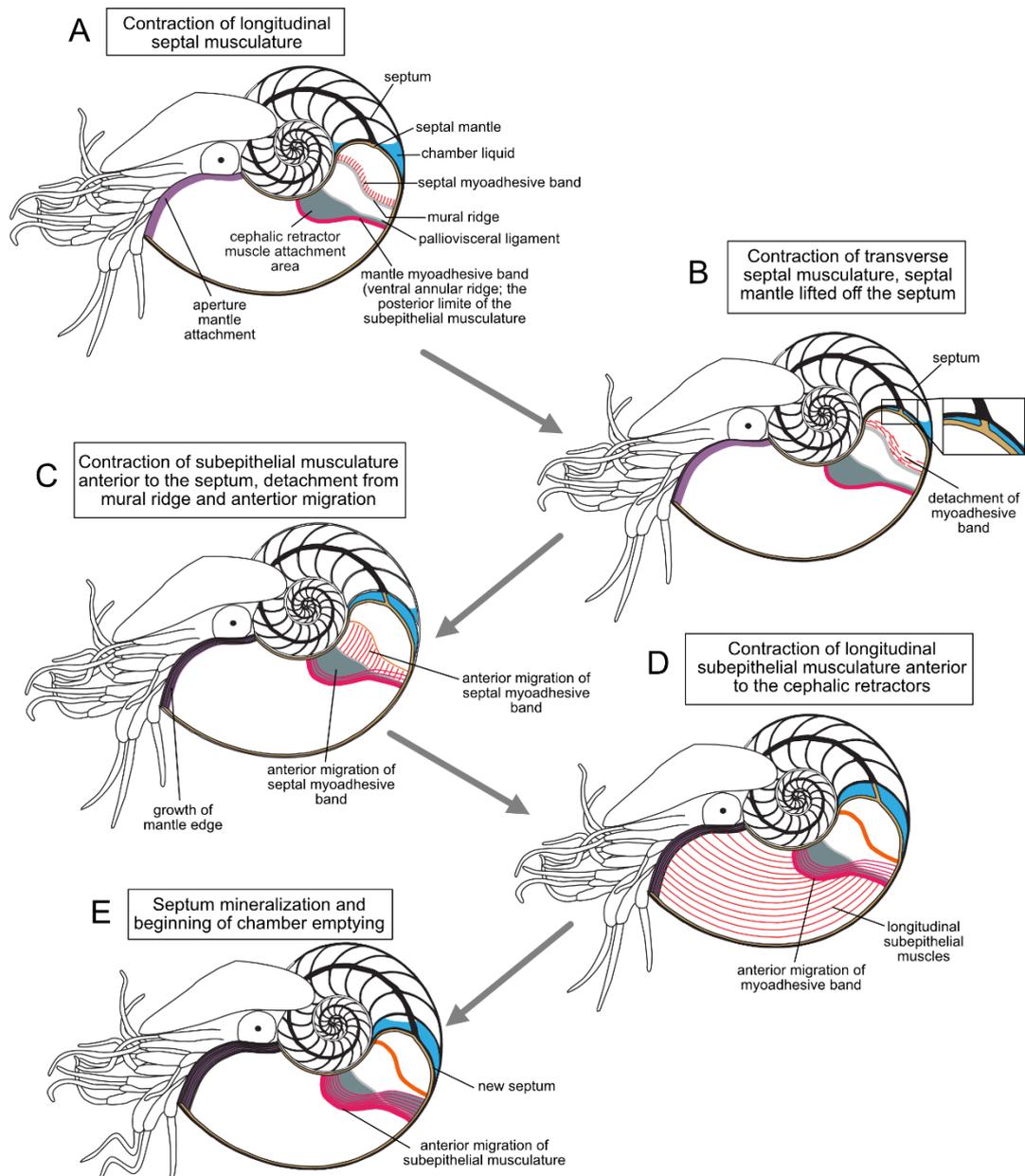


Figure I.15: Processus de formation septale chez *Nautilus*, modifié d'après Klug *et al.* (2008). Ce schéma décrit les mouvements du manteau et l'implication de sa musculature dans le mécanisme de formation septale.

général qui aboutit à la formation de la coquille chez cet organisme (Addadi *et al.* 2006; Crick & Mann 2010), il n'existe pas d'autres propositions alternatives, concernant les mouvements du manteau.

### 3.2) Le modèle seiche

Chez la seiche, la coquille est située en position dorsale, à l'intérieur du manteau de l'organisme : on parle alors de coquille interne. Celle-ci est essentiellement constituée d'aragonite et sert à la fois de protection et de support physique aux tissus mous de l'organisme, mais également de système de régulation de la flottaison, comme chez d'autres céphalopodes à coquille comme *Nautilus* ou *Spirula*. Néanmoins, l'os de seiche possède une organisation structurale qui lui est propre : il consiste en deux régions bien distinctes avec, d'une part le bouclier dorsal et d'autre part, la zone ventrale cloisonnée (Fig. I.16).

Étant donné son grand intérêt économique, la seiche compte parmi les céphalopodes les plus étudiés à l'heure actuelle. De ce fait, l'os de seiche a déjà fait l'objet de plusieurs études biochimiques de la matrice organique coquillière, mais également de plusieurs analyses microstructurales, ayant notamment pour but de mieux comprendre le mécanisme de biominéralisation à l'origine de la construction coquillière chez cet organisme. Ainsi, Checa *et al.* (2015) proposent un cycle de formation des chambres chez *Sepia*, selon la chronologie suivante : (1) genèse d'une chambre par la sécrétion simultanée du toit du septe (*i.e.* chambre) et d'une série de lamines organiques ; (2) achèvement de la chambre par sécrétion du plancher du septe, terminant ainsi la croissance en hauteur de la chambre ; (3) minéralisation de la chambre et (4) dessiccation par drainage de la chambre. La même année, Čadež *et al.* (2017) mettent en évidence une différence de composition protéique entre le bouclier dorsal et la partie ventrale cloisonnée de l'os de seiche, suggérant alors l'existence de deux processus de minéralisation distincts.



Figure I.16: Photographies d'un os de seiche en vue dorsale (gauche) et ventrale (droite), Photographies personnelle.

#### 4) Objectif de la thèse

Dans ce chapitre, consacré à une revue des connaissances, nous nous sommes intéressés au phénomène de biominéralisation coquillière chez les céphalopodes.

Les céphalopodes constituent une classe majeure de mollusques, dont une partie seulement des représentants actuels possèdent une coquille. En effet, l'histoire macroévolutive de ce clade témoigne d'une tendance générale à l'internalisation de la coquille et à sa réduction, voire à sa complète disparition, depuis des formes basales comme le nautilus jusqu'aux formes les plus dérivées comme la seiche (persistance d'une coquille, en position interne) ou la pieuvre (perte de la coquille). Si les relations de parenté entre les différents représentants sont plutôt bien établies, les mécanismes moléculaires à l'origine du phénomène de biominéralisation coquillière demeurent encore faiblement documentés.

Il apparaît donc intéressant de se demander si l'ensemble de ces organismes possèdent une même « boîte à outils moléculaires », c'est-à-dire un même jeu de macromolécules, pour élaborer leur coquille.

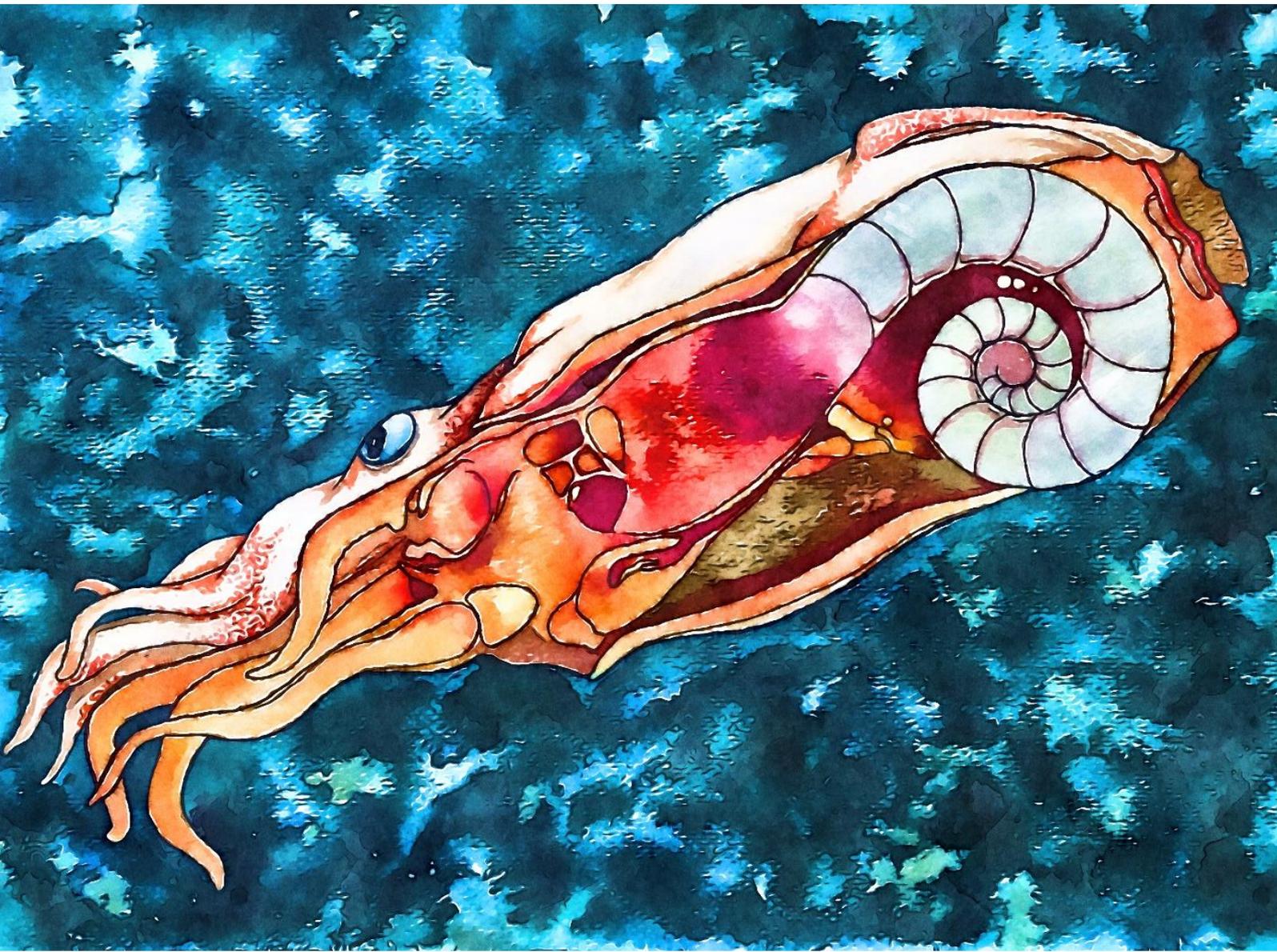
Dans ce contexte, nous étudierons et caractériserons les microstructures coquillières et la matrice organique associées à la coquille de trois représentants actuels, encore peu étudiés à ce jour, la spirule *Spirula spirula*, l'argonaute *Argonauta hians* et la seiche *Sepia officinalis*. Chaque chapitre de ce manuscrit sera dédiée à l'étude de chacun des trois organismes : au sein de chaque chapitre, le lecteur trouvera l'ensemble des informations déjà disponibles dans la littérature sur le modèle d'étude, ainsi que les résultats acquis dans le cadre de la caractérisation physique et biochimique de la coquille de celui-ci. À travers chacune de ces études, nous essaierons également d'élucider le mécanisme de biominéralisation coquillière en proposant notamment une chronologie potentielle des évènements sécrétoires.

Enfin, dans un but comparatif et évolutionniste, la dernière partie de ce manuscrit sera consacré à la confrontation des résultats obtenus sur chaque modèle d'étude. Plusieurs pistes de recherches ultérieures, dans la continuité de ce travail, seront également proposées.



## Chapitre II :

### La biominéralisation coquillière chez la spirule *Spirula spirula*





### 1) Description, biologie et cycle de vie

La spirule ("ram's horn squid", en anglais) est un céphalopode mésopélagique de petite taille (Fig. II.1) peuplant les eaux de la partie ouest de la région Indo-Pacifique ainsi que les eaux tropicales de l'océan Atlantique (Ohkouchi *et al.* 2013; Schmidt 1922). Bien que des coquilles vides soient fréquemment retrouvées le long des plages des océans Atlantique, Indien et ouest Pacifique (Bruun 1943; Clarke 1966), les spécimens vivants sont quant à eux, rarement observés. Par conséquent,

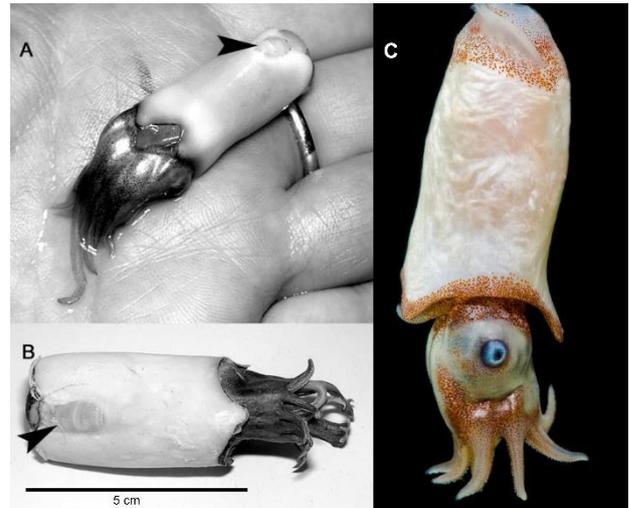


Figure II.1 : Photographies de plusieurs spécimens de *Spirula spirula*. A-B, d'après Warnke & Keupp 2005 ; C. Photographie réalisé par Dante Fenolio, crédits : Science Photo Library.

l'écologie de cette espèce demeure incertaine, et aucun organisme n'a été observé ou filmé dans son habitat naturel jusqu'à très récemment. Néanmoins, la spirule est connue pour ses migrations verticales quotidiennes au sein de la tranche d'eau, évoluant à des profondeurs comprises entre 1000 et 500 m de profondeur la journée, et remontant à des profondeurs inférieures à 300 m durant la nuit (Clarke 1969).

Comme tous les membres du super-ordre des Decabrachia, cet animal possède dix appendices péri-oraux à ventouses : huit bras et deux tentacules plus longs (Fig. II.2). Son apparence générale est proche de celle des calamars, et les individus possèdent la capacité de rétracter leur partie céphalique dans leur manteau. Si les juvéniles peuvent complètement dissimuler leur tête et extrémités dans leur manteau, et replier les protubérances dorsales et ventrales de celui-ci pour s'y "enfermer" de manière parfaite, les adultes, eux, ne peuvent rétracter que la moitié de la région céphalique (Nesis 1987). La « peau » de l'animal est de couleur rouge-maronnée, lisse et d'aspect irisé tandis que le manteau conserve un aspect laiteux. À l'extrémité postérieur du manteau, la spirule présente un organe bioluminescent, entouré de deux petits ailerons arrondis (Fig. II.2 ; Herring *et al.* 1981; Nesis 1987). Ce photophore peut rester illuminé pendant plusieurs heures, mais sa fonction demeure encore inconnue. En effet, contrairement à la plupart des animaux marins qui produisent de la lumière par le bas afin de dissimuler leur silhouette, l'organe lumineux de la spirule est quant à lui orienté vers la surface, ce qui paraît inhabituel (Norman 2000). Dans la tranche d'eau, la spirule nage verticalement, la tête et les bras en direction du fond océanique. Cette position de

vie est notamment due à son mécanisme de flottaison, mais également au mouvement de ses ailerons postérieurs durant la nage. La flottabilité de l'organisme est assurée par sa coquille interne (Fig. II.2), dont les différentes loges sont remplies d'un gaz enrichi en azote, que l'organisme extrait de son sang à partir du canal siphonal qui parcourt l'ensemble de sa coquille, lui assurant ainsi une flottabilité neutre (Denton *et al.* 1967). Pour son orientation, la spirule possède deux statolithes qui sont, hormis la coquille, les deux seules autres pièces minéralisées de l'organisme. Chacune de ces structures est logée dans une cavité remplie de liquide, appelée le statocyste, proche du cerveau de l'animal (Clarke 1978).

Très récemment, les premières images d'un spécimen vivant (Lindsay *et al.* 2020), réalisées en milieu naturel, semblent indiquer que la spirule vit la tête vers le haut et la coquille vers le bas. Ces observations sont donc en cohérence avec le rôle supposé de l'organe lumineux, mais semblent anéantir l'interprétation que nous nous faisons de la coquille chez cet organisme.

Bien que la biologie et le cycle de vie de cet organisme demeurent, aujourd'hui encore, assez mal documentés, il semblerait que sa reproduction soit similaire à celle des autres céphalopodes. En effet, la modification des deux tentacules du mâle en organes reproducteurs, appelés hectocotyles, permet d'implanter le spermatophore dans le réceptacle séminal de la femelle, la spermathèque, logée dans la membrane buccale du manteau de la femelle (Norman 2000). Les femelles déposeraient ensuite leurs œufs sur le fond océanique (Nesis 1987), étant donné qu'aucun œuf pélagique n'a pour l'instant été identifié et que les individus juvéniles de cette espèce sont retrouvés à des profondeurs comprises entre 1000 et 1750 mètres (Norman & Reid 2000). Après avoir éclos, les juvéniles habiteraient les eaux

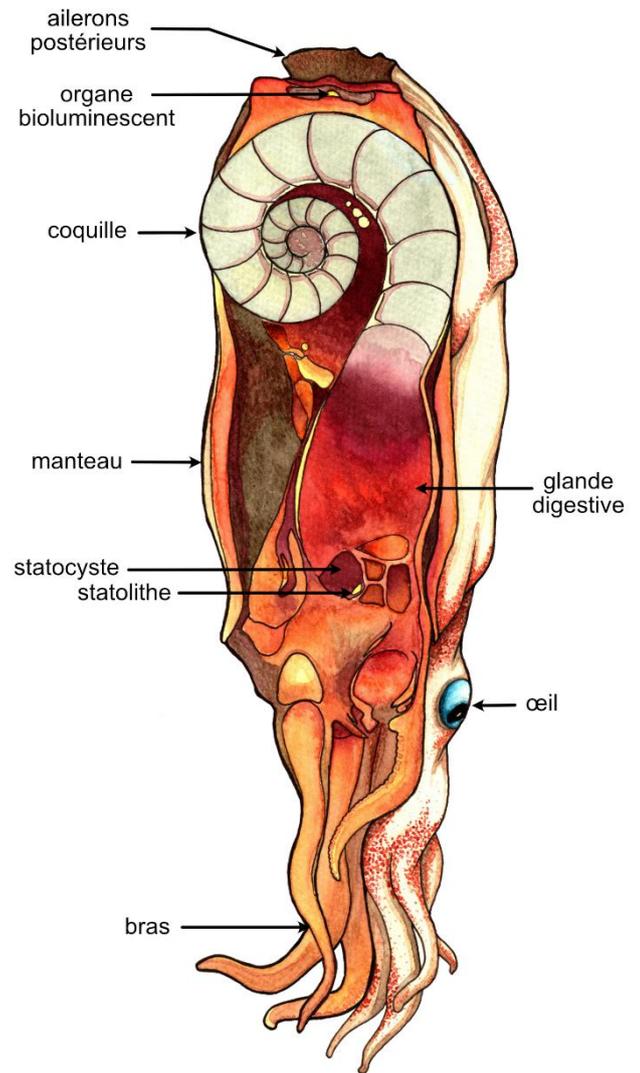


Figure II.2 : Vue en coupe d'un spécimen de *Spirula spirula*, illustrant l'anatomie interne de cet animal. Illustration à l'aquarelle, réalisée par Margot Bernardi.

froides (4 à 6 °C) et profondes durant les premiers stades de leur développement ontogénétique, avant de passer à des eaux plus chaudes (entre 12 et 14 °C) durant leur croissance puis, de retourner à des eaux plus froides et profondes au stade adulte (Lukeneder *et al.* 2010; Lukeneder 2016; Price *et al.* 2009). Les juvéniles mesurent environ 2 mm après éclosion et sont parfaitement indépendants : les études menées sur le développement de cet organisme ne permettent pas de mettre en évidence de stade larvaire (Boletzky 1974; Clarke 1970), une constante chez les céphalopodes qui, à l'inverse des autres mollusques, ont un développement direct. Sur la base de la distribution de taille au sein d'une population, Clarke (1970) et Nesis (1987) suggèrent une espérance de vie d'une vingtaine de mois après éclosion, comme la majorité des coléoides (Lukeneder 2016) avec une maturité sexuelle probablement atteinte entre le douzième et le quinzième mois (Clarke 1970). Néanmoins, l'essentiel des études à ce sujet sont plutôt anciennes et la question mériterait d'être revisitée afin de mieux évaluer l'espérance de vie de cet organisme. L'analyse des isotopes de l'azote chez la spirule semble indiquer que l'animal est détritivore et microphage (zooplancton) (Ohkouchi *et al.* 2013). En revanche, la saison de reproduction, la structure sociale et l'existence d'une parade amoureuse ainsi que le comportement parental demeurent inconnus.

## 2) Taxonomie et phylogénie

*Spirula spirula* (Linné 1758) est aujourd'hui considéré comme le seul représentant du genre, mais également de la famille Spirulidae. Ce statut monospécifique résulte à la fois d'analyses anatomiques (Naef 1923), d'observations morphologiques de la coquille et de séquences moléculaires. L'exploration morphométrique de la coquille ne permet pas de mettre en évidence l'existence de deux (ou plus) espèces distinctes au sein du genre (Neige & Warnke 2010). En parallèle, les données mitochondriales basées sur l'analyse de trois gènes mitochondriaux et une large analyse géographique (Haring *et al.* 2012) démontrent que les distances génétiques entre les populations de l'Atlantique et du Pacifique sont extrêmement faibles, suggérant donc une absence de spéciation. De ce fait, les nombreuses espèces nominales trouvées dans la littérature sont aujourd'hui considérées comme synonymes de l'espèce *Spirula spirula* avec pour systématique (d'après Sweeney & Roper 1998) :

Embranchement Mollusca Cuvier 1795

Classe Cephalopoda Cuvier 1797

Sous-classe Coleoidea Bather 1888

Super-ordre Decabrachia Haeckel 1866

Ordre Spirulida Stolley 1919

Famille Spirulidae Owen 1836

Genre *Spirula* Lamarck 1799

*S. spirula* (Linnae 1758)

En observant l'organisation du cerveau et des statocystes, Engeser and Bandel (1988) considéraient *Spirula* comme la forme la plus ancestrale du clade actuel des décabranchiaux. Cependant, aujourd'hui encore, la position phylogénétique de *Spirula* demeure assez controversée (Allcock *et al.* 2015; Lindgren & Anderson 2018). À l'échelle de la classe des céphalopodes, la présence d'une coquille interne divisée en septes plaide en faveur d'un rapprochement avec la famille des Sepiidae (seiches, etc.). Néanmoins, la présence d'un œil œgopside (*i.e.* œil ouvert ; Donovan 1977) remet cette supposition en question. De plus, l'internalisation du phragmocône (partie cloisonnée de la coquille) apparaît comme un caractère plésiomorphe (*i.e.* ancestral) au sein du clade, remontant probablement à la fin du Paléozoïque, tandis que les premiers représentants des Coléoides apparaissent au début du Mésozoïque (Kröger *et al.* 2011). D'autres auteurs proposent également de faire de *Spirula* un ordre à part, nommé Spirulida (Boletzky 1999).

Les premières études phylogénétiques, basées sur un petit nombre de gènes, plaçaient *Spirula* en position basale par rapport aux autres Decabrachia (Allcock *et al.* 2011; Warnke *et al.* 2003) ou bien, comme groupe-frère des Sepiidae (Bonnaud *et al.* 1997; Strugnell *et al.* 2005). Ces hypothèses étaient cohérentes avec certains caractères morphologiques, tel qu'un phragmocône bien développé. En revanche, des études plus récentes, basées sur des bases de données moléculaires plus conséquentes, suggèrent que le clade des Spirulida et celui regroupant les Oegopsida (les calmars à "yeux ouverts") et les Bathyteuthoidea (calmars mésopélagiques à bathopélagiques) sont deux groupes frères (Lindgren *et al.* 2012; Strugnell *et al.* 2017). De la même manière, Tanner *et al.* (2017) reportent un lien de parenté étroit entre

les Spirulida et les Oegopsida. Même si leur étude n'inclut pas les Bathyteuthoidea, plusieurs études ont déjà démontré l'étroite relation phylogénétique entre ce clade et celui des Oegopsida (Lindgren *et al.* 2012; Strugnell *et al.* 2005). Des estimations récentes, basées à la fois sur des données moléculaires et fossiles, suggèrent un temps de divergence aux alentours de 128 Ma (Barrémien, Crétacé Inférieur) entre spirulidés et oegopsidés (Tanner *et al.* 2017), estimation cohérente avec l'apparition du groupe couronne des spirulidés à la fin du Crétacé (~66-72 Ma) (Fuchs *et al.* 2012).

À notre connaissance, la seule coquille de spirule citée dans le registre fossile date du Miocène inférieur (Burdigalien, 20-16 Ma) de Nouvelle-Zélande (Hayward 1976). Cependant, un certain nombre de formes fossiles peuvent être liées à *Spirula*. Les représentants du Cénozoïque possèdent, notamment, de fortes affinités morphologiques avec l'espèce actuelle (Fuchs & Lukeneder 2014) : c'est le cas de *Beloptera*, *Belopterina*, *Spirulirostridium* et *Spirulirostra*. Les restes du Crétacé demeurent, quant à eux, assez controversés mais Fuchs *et al.* (2012) considèrent *Cyrtobelus* (Campanien supérieur, ~75 Ma – Maastrichtien inférieur ~70 Ma) comme le premier représentant non-ambigu de la lignée *Spirula*. Enfin, certains auteurs considèrent *Shimanskya*, du Carbonifère supérieur (~307-298 Ma), comme appartenant au groupe des Spirulidae (Doguzhaeva *et al.* 1999).

### 3) La coquille

Chez *Spirula*, la coquille est incluse dorsalement dans le manteau de l'animal. Cette coquille interne présente un enroulement endogastrique planispiralé et divisé en plusieurs loges (en nombre variable entre 24 et 34 environ, voir Neige & Warnke 2010, table 2), connectées les unes aux autres par un siphon. Ce canal siphonal assure ainsi la flottabilité de l'organisme, par la circulation d'un liquide caméral modifiant la densité de l'animal (Bruun 1943; Naef 1923).

### 3.1) *Microstructure*

#### a) Le mur coquillier

Appellöf (1893) est le premier à entreprendre l'étude de la microstructure coquillière chez *Spirula spirula*, et notamment de sa paroi externe. Il y décrit deux couches : la première, externe, s'épaissit sur le côté « antérieur » de la coquille et présente des tubercules externes, allongés, arrondis et d'une forme plus ou moins compliquée sur les faces latérales et « postérieures ». La seconde, interne, est plus épaisse dans la partie ventrale et serait divisée en deux sous-couches ; l'une, externe, présente des particules calcaires allongées et est finement transparente. L'autre, interne, plus épaisse et moins transparente, est formée de lamelles d'épaisseur variable qui courent obliquement vers l'intérieur et l'extérieur. Naef (1923) distingue trois couches dans le mur coquillier de *Spirula* : un périostracum externe, un ostracum moyen prismatique et un hypostracum épais, interne et lamelleux. Dans son étude sur les microstructures coquillières, Bøggild (1930) aborde brièvement la structure coquillière de l'organisme, qu'il décrit comme entièrement aragonitique. Selon lui, la couche externe est prismatique, avec des prismes plutôt réguliers, et il distingue une couche supérieure très mince et parfaitement homogène.

Mutvei (1964) propose une étude plus détaillée des microstructures de la coquille. Il reconnaît notamment deux couches semi-prismatiques au sein de la paroi externe, séparées par une couche périostracale très fine. Selon lui, la couche semi-prismatique externe est composée d'éléments cristallins spiculaires (dont le grand axe présente une disposition radiale vis-à-vis de l'axe morphologique dorso-ventrale), ainsi qu'une surface externe tuberculée, moins prononcée dans la partie juvénile de la coquille. Quant à la couche semi-prismatique interne, il la décrit comme constituée d'éléments cristallins aciculaires, identiques à ceux de la couche externe, mais « groupés en prismes plus ou moins distincts et irrégulièrement polygonaux en section transversale ». Enfin, l'auteur note l'existence d'un épaississement au niveau de la zone d'insertion des cloisons de la coquille dans la paroi, qu'il nomme ride annulaire suprasedale ("*supraseptal annular ridge*"). Ce n'est que quelques années plus tard qu'apparaissent les premières observations au microscope électronique à balayage. Dans son étude, Barskov (1973) décrit la couche externe de la paroi coquillière comme étant formée de cristaux prismatiques à disposition radiale, et dont la surface est tuberculée. Quant à la couche interne, il la présente comme semi-prismatique, avec des cristaux fins et anguleux. Enfin, il

note la présence d'une couche intermédiaire non calcifiée, séparant les deux autres couches précédemment citées, et constituée de "conchioline" (*i.e.* matrice organique).

Dans son article, Dauphin (1976) confirme la dualité du mur coquillier de *Spirula*. Elle confirme également la nature semi-prismatique des deux couches qui le composent. La première, externe, présente une limite extérieure irrégulière et tronquée, faite de tubercules reposant sur une semelle continue très mince. Selon elle, les tubercules et la semelle sont formés de prismes perpendiculaires à la surface de la coquille, et composés de baguettes d'aragonite jointives qu'elle associe aux "éléments cristallins spiculaires" de Mutvei (1964). L'auteur rejoint également les observations d'Appellöf (1893) en décomposant la couche semi-prismatique interne en deux sous-couches : une lame externe, et une lame interne. D'après ses observations, la lame externe représente la lame la plus épaisse. Elle est constituée de granules grossièrement alignés en "prismes" indistincts et verticaux. Dauphin remarque que cette granulation s'estompe progressivement, laissant ainsi la nature prismatique de la couche semi-prismatique interne devenir plus nette. La lame interne, quant à elle, ressemble à la couche semi-prismatique externe, mais sans tubercules, et semble s'épaissir près de la zone d'insertion des cloisons en une ride annulaire suprasedale, précédemment identifiée par Mutvei (1964). Enfin, Dauphin note une potentielle variation de ces structures en fonction de l'âge du spécimen, mais également de l'endroit de la coupe d'observation. Trois ans après, Bandel and Boletzky (1979) admettent l'existence de trois couches au sein du mur coquillier : une couche externe prismatique irrégulière ; une couche moyenne, dite lamellaire; et une couche interne prismatique. Les auteurs évoquent également l'existence d'un renforcement prismatique grossier de la couche interne, à l'insertion de la cloison dans le mur coquillier qu'ils nomment bord prismatique interne ("*prismatic inner rim*"). Enfin, Cuif *et al.* (1983) réaffirment la dualité du mur coquillier, alors composé de deux couches minéralisées séparées par une couche qu'ils qualifient « d'uniquement organique » après une attaque enzymatique du matériel. Les auteurs évoquent également l'existence de deux sous-couches au sein de la couche interne de la paroi. Les observations des auteurs confirment celles de Dauphin (1976) en décrivant la sous-couche interne comme composée « d'unités prismatiques de taille variable » et la sous-couche externe comme ayant un « aspect granulaire sans indication d'une structure lamellaire quelconque ».

Depuis ces observations, aucune nouvelle étude n'a montré de modification dans nos connaissances de la microstructure associée au mur coquillier de la coquille chez *Spirula*

*spirula*. En revanche, les septes et le canal siphonal de la coquille ont, quant à eux, fait l'objet d'études plus approfondies.

#### b) Les septes

Appellöf (1893) décrit la face ventrale des septes comme recouverte, localement, par une substance calcaire à indice de réfraction élevé. L'auteur explique également qu'à la jonction des cloisons avec le mur coquillier, il existe une formation calcaire dont l'indice de réfraction est supérieur à celui des cloisons et de la paroi dans lesquels elle passe, sans limites définies. Les cloisons semblent aussi constituées de nombreuses lamelles fragiles, coupées normalement par les « lignes de calcification ». Selon Bøggild (1930), les cloisons sont nacrées. Grégoire (1961) étudie spécifiquement la "nacre septale" de *Spirula* et explique que « contrairement à la conchioline de nacre, la substance organique des septes décalcifiés des Spirulidae est un matériel semi-rigide, qui garde la forme initiale, en verre de montre ou en dôme, du septum minéralisé ». L'auteur note ainsi de nombreuses différences avec la nacre *sensu stricto*. Il démontre la nature aragonitique des septes de *Spirula* par diffraction aux rayons X et conclut que la nacre septale des Spirulidae diffère de celle des autres mollusques.

Selon Mutvei (1964), il existe quatre couches distinctes au sein d'une cloison septale de *Spirula*. Il reconnaît une couche dorsale faite de conchioline, puis une couche sphérolitique prismatique constituée de granules d'aragonite polygonaux, épaisse à la périphérie de la cloison, mais absente dans sa région centrale. Ensuite, il distingue une couche nacrée, qu'il décrit comme la plus épaisse des quatre, et comme constituée de petits éléments aragonitiques. Enfin, il définit une couche semi-prismatique, composée d'éléments cristallins spiculaires généralement groupés en prismes. D'après lui, cette dernière couche occupe une zone centrale étroite sur la face ventrale des cloisons, autour du canal siphonal. En dressant une telle description, Mutvei (1964) rapproche la cloison de *Spirula* de celle de *Nautilus*. D'après Erben (1972), la nacre de *Spirula* et des autres dibranchiaux est une « fausse nacre »; il recommande plutôt l'utilisation du terme « lamello-fibrillaire » pour décrire la structure minérale des cloisons. Barskov (1973) identifie deux couches dans la partie "libre" de la cloison : une couche adapicale prismatique, homologue à la couche sphérolitique prismatique du nautilite, et une couche adorale nacrée homologue à la couche nacrée du nautilite. Il reconnaît

également l'existence d'une troisième couche, semi-prismatique, présente uniquement à proximité du canal siphonal. Dauphin (1976) reconnaît également, comme chez le nautilus, l'existence de trois couches minérales au sein d'une cloison. La première est une couche nacré, plus épaisse que les autres et dont l'architecture diffère de celle des autres mollusques (car constituée de baguettes au lieu de lamelles). L'auteur explique d'ailleurs que malgré les recommandations d'Erben (1972), l'incertitude qui règne autour de la nature des couches fibrillaires et de leur mode de formation la pousse à conserver le terme de nacre de type II pour décrire la structure de la cloison. La deuxième est une couche sphérolitique prismatique, localisée dans la zone dorsale de l'insertion des cloisons ; elle présente un aspect de nacre grossière. Enfin, la dernière, est une couche semi-prismatique exclusivement présente autour du canal siphonal. Pour Bandel and Boletzky (1979), les septes consistent en une couche lamello-fibrillaire. Selon eux, à l'insertion de la cloison dans le mur coquillier, les lamelles s'arrêtent de manière abrupte dans le bord interne ("*inner rim*"). Aujourd'hui, la nomenclature de la structure des septes de *Spirula* est encore très variable. Selon les auteurs, on trouve notamment les termes de nacre lamello-fibrillaire (Doguzhaeva 2000; Fuchs *et al.* 2012; Mutvei 2017) ou structure lamello-fibrillaire (Bandel 1990; Bandel & Boletzky 1979). Tout récemment, l'étude de Lemanis *et al.* (2020) penche pour l'utilisation de cette dernière terminologie : les auteurs décrivent ainsi « de fines lamelles, composées de baguettes d'aragonite parallèles entre elles au sein d'une lamelle ».

### c) L'insertion des septes dans le mur coquillier

Si plusieurs auteurs notent l'existence d'une formation ou d'un renforcement minéralisé dans la zone d'insertion de la cloison au sein de la paroi coquillière (Appellöf 1893; Bøggild 1930), que Mutvei (1964) nomme « ride annulaire suprasedale », Dauphin (1976) est la première à analyser la morphologie de cette insertion. Elle remarque ainsi que « cloison et test ne sont pas simplement superposés, ainsi que le représente la plupart des auteurs ». En effet, l'auteur décrit un amincissement de la cloison, qui se termine en une pointe effilée recouverte, de part et d'autre, par la couche semi-prismatique interne du test. Elle précise également que la couche sphérolitique prismatique de la cloison ne participe pas à l'élaboration de cette terminaison. Néanmoins, l'année d'après, l'auteur n'intègre pas ces observations au schéma structural de la coquille de *Spirula* (Fig. II.3) (Dauphin 1977). Dans leur schéma, Bandel et Boletzky (1979) représentent également la cloison et le mur coquillier

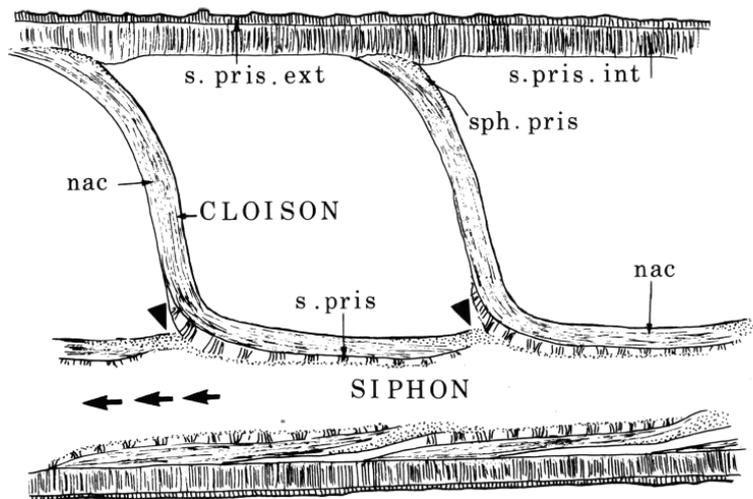


Figure II.3 : Coupe longitudinale de la coquille de spirule, d'après Dauphin (1997). nac., nacre ; sph. pris., sphérolitique prismatique ; s. pris. int., semi-prismatique interne ; s. pris. ext., semi-prismatique externe ; les flèches du siphon indiquent la partie la plus récente de la coquille, les triangles noirs la zone poreuse.

comme simplement superposés. Depuis, cette structure complexe et particulière chez *Spirula* n'a plus réellement bénéficié de descriptions ou de schémas conceptuels.

Néanmoins, des structures similaires ont également été mises en évidence chez des formes fossiles de la lignée de *Spirula* (Doguzhaeva 1996; Fuchs *et al.* 2013), que Fuchs *et al.* (2013) schématisent et nomment « mural flap ». Les auteurs définissent cette structure comme une extension de la couche interne du test venant recouvrir une portion de la face interne (concave) de la cloison. Récemment, Lemanis *et al.* (2020) schématisent et figurent cette structure chez *Spirula*, mais ne la décrivent pas. Il est également intéressant de noter que, d'après les auteurs, cette structure semble apparaître comme une autapomorphie du groupe comprenant le genre *Longibelus* (groupe frère des Decabrachia) et le reste des Decabrachia (Fuchs *et al.* 2013; Lemanis *et al.* 2020). Cette hypothèse implique que chez les dibranchiaux qui ne présentent pas de « mural flap », son absence relève d'une perte secondaire de ce caractère.

#### d) Le canal siphonal

La structure du canal siphonal chez *Spirula* a été étudiée par de nombreux auteurs au microscope optique (Appellöf 1893; Mutvei 1964; Naef 1923) mais les premières études structurales détaillées n'apparaissent qu'avec l'émergence du microscope électronique à balayage (Bandel 1990; Bandel & Boletzky 1979; Dauphin 1976; Doguzhaeva 2000; Mutvei & Donovan 2006). Dans ces études, une attention toute particulière a été portée sur la structure de la couche interne du tube siphonal.

Récemment, Mutvei (2017) propose une description plus complète du canal siphonal de *Spirula*. Chez cet organisme, le col septal s'étend d'une cloison à une autre ("*holochloanitic septal neck*", en anglais) et seul un espace très réduit existe entre deux cols successifs. En accord avec de nombreux auteurs avant lui, l'auteur décrit le col septal comme constitué de deux couches calcaires. La première, externe, est lamello-fibrillaire nacrée et s'inscrit dans la continuité de « la couche lamello-fibrillaire nacrée (= nacre de type II de Mutvei 1970 ; nacre lamello-fibrillaire de Doguzhaeva 2000 ; structure lamello-fibrillaire de Bandel et Boletzky 1979 et Bandel 1990) » d'un septe. La deuxième, interne, recouvre la surface intérieure du col septal et est constituée de piliers. Selon l'auteur, cette couche correspond à celle précédemment identifiée par d'autres auteurs comme une couche semi-prismatique (Dauphin 1976; Mutvei 1964), prismatique (Mutvei & Donovan 2006) ou sphérolitique prismatique (Doguzhaeva 2000). D'après Mutvei, cette couche en pilier résulterait de la modification structurale de la couche prismatique simple qui recouvre la surface interne du col septal de *Nautilus*.

L'anneau connectif, quant à lui, est également composé de deux couches similaires à celle du nautilus : une couche sphérolitique prismatique externe, et une couche interne chitineuse. La couche externe prendrait son origine au niveau de la surface externe du col septal, tandis que la couche interne serait la continuation non-calcifiée de la couche nacrée lamello-fibrillaire du col septal.

### 3.2) *Un premier modèle de construction coquillière*

À l'issue de son étude microstructurale du mur coquillier et des cloisons de *Spirula* (Fig. II.4), Dauphin (1976) propose un modèle d'élaboration de la coquille pour cet organisme. Selon l'auteur, le processus débute par la sécrétion partielle de la couche semi-prismatique interne du test suite à la division pariétale de l'épithélium calcifiant du manteau. Simultanément, la couche sphérolitique prismatique de la cloison est sécrétée, par division septale de l'épithélium. Tandis que la couche semi-prismatique poursuit sa croissance, la couche nacrée de la cloison est également produite. Par la suite, la couche semi-prismatique interne et la couche nacrée de la cloison s'accroissent en longueur. Puis, à un moment donné, la nacre cesse de croître en longueur tandis que la cloison s'épaissit. En parallèle, la couche semi-prismatique interne du test s'épaissit et finit par recouvrir la couche nacrée de la cloison. Enfin, après scellement de la cloison au sein du mur coquillier, celui-ci poursuit son

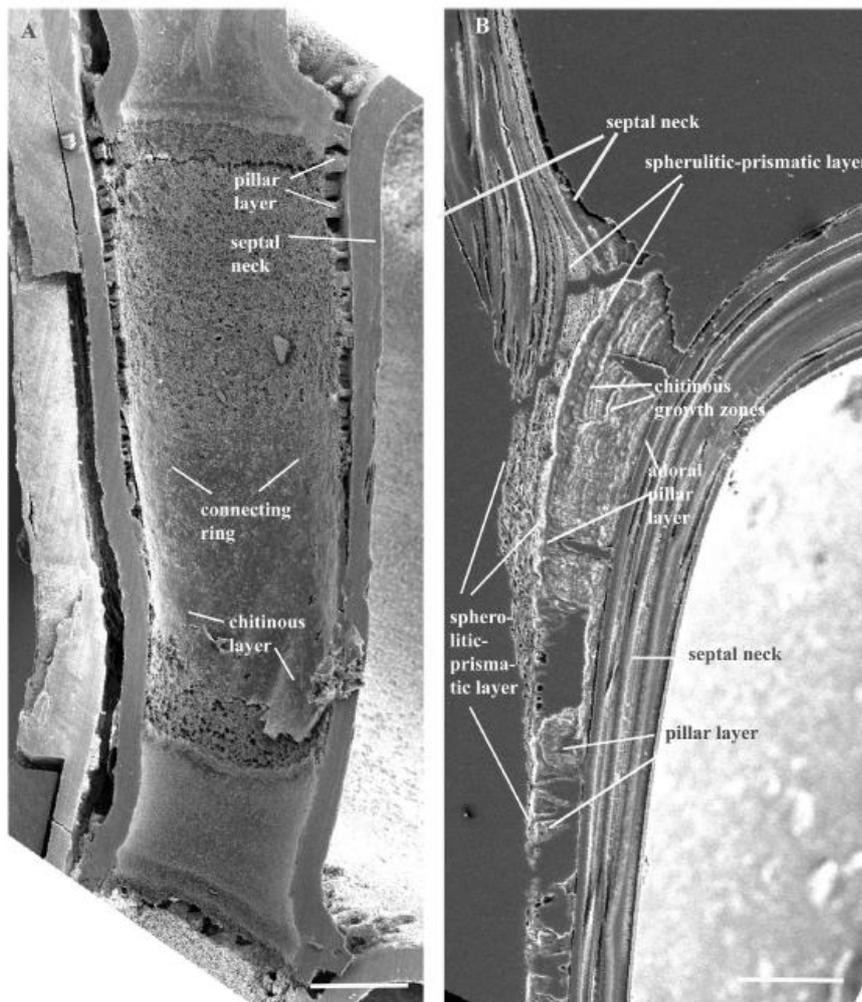


Figure II.4 : photographies de *Spirula* au MEB, d'après Mutvei (2017). A) Section médiane du siphon, montrant un long col septal tapissé dans sa partie interne par l'anneau connectif du segment siphonal suivant. B) Deux cols septaux consécutifs à fort grandissement ; la couche interne chitineuse de l'anneau connectif n'est pas préservée. Echelle : A = 200  $\mu\text{m}$ , B = 100  $\mu\text{m}$ .

accroissement en longueur. D'après Dauphin (1976), cette complexité assure à la coquille une cohésion et une rigidité plus grandes que ne le ferait une simple juxtaposition test-septe.

#### 4) La matrice organique

Le contenu de la matrice organique de *Spirula* est étudié pour la première fois par Degens *et al.* (1967), dans une étude paléobiochimique des protéines de la coquille de plusieurs mollusques. Selon les auteurs, la matrice coquillière de spirule contient environ 37,7 % de chitine contre 62,3 % de protéines. Après analyse biochimique, la matrice organique apparaît enrichie en acides aminés de type acide glutamique (17,1 % résidus), acide aspartique (13 % résidus), sérine (14,4 % résidus) et glycine (10,3 % résidus), les trois premiers étant des résidus hydrophiles. Ces résultats sont repris dans l'étude comparative de Hunt et Nixon (1981) chez les céphalopodes. Ils notent alors que la prépondérance d'acides aminés polaires hydrophiles au sein de la matrice organique de *Spirula* fait de celle-ci l'une des matrices les plus hydrophiles chez les céphalopodes.

L'étude la plus récente à ce jour est celle de Dauphin et Marin (1995), centrée sur l'analyse infra-rouge de la composition de la coquille de céphalopodes actuels, dont *Spirula*. Les spectres infra-rouge à transformée de Fourier montrent que la matrice organique de spirule (dans sa fraction soluble ou insoluble) présente les pics caractéristiques des protéines (notamment amides I et II) ainsi qu'un pic caractéristique d'un groupement saccharidique (autour de  $1075\text{ cm}^{-1}$ ). Une étude plus poussée du contenu saccharidique de la matrice organique révèle que les deux fractions soluble et insoluble ont des compositions différentes : bien que toutes deux enrichies en glucosamine, la fraction soluble est également composée de fucose, galactose, xylose, arabinose et rhamnose quand la fraction insoluble ne présente qu'une petite quantité de xylose et rhamnose. D'après les auteurs, la présence de glucosamine dans les deux fractions suggère la présence de chitine, sous forme soluble et insoluble.

##### 5) Le but de notre étude

D'un point de vue évolutif, la coquille de *Spirula* constitue un modèle d'étude intéressant. Son enroulement et son cloisonnement (phragmocône) la rapprochent morphologiquement des formes céphalopodes « ancestrales » comme le nautilus, tandis que son internalisation au sein du manteau de l'animal la rapproche d'organismes plus dérivés, comme la seiche. Cette coexistence de caractères plésiomorphes (*i.e.* ancestraux) et synapomorphes soulève une question majeure, au regard de la biominéralisation coquillière chez cet organisme : la spirule possède-t-elle une « boîte à outils biominéralisante » similaire à l'un de ces deux organismes ? Ou bien possède-t-elle une matrice organique complètement différente ? À ce jour, les compositions macromoléculaires des matrices organiques de céphalopodes ont principalement été étudiées chez les deux organismes "modèles" de ce clade, à savoir la seiche (*Sepia*) et chez le nautilus (*Nautilus*) (cf. Chapitre I). En revanche, très peu de données (essentiellement datées des années 1960 à 1990) sont disponibles sur des organismes tels que *Spirula*.

Notre étude se propose d'étudier les propriétés physiques et biochimiques de la coquille de *Spirula spirula*, le but étant de caractériser la signature biochimique de la matrice organique, afin d'en comprendre les multiples fonctions moléculaires dans la biominéralisation. Notre objectif est de déterminer si la matrice organique de la spirule possède des points communs avec celles d'autres céphalopodes et d'autres mollusques.

L'article de recherche présenté ci-après (Oudot *et al.* 2020a) se focalise sur les composés organiques de la coquille, indépendamment de leur localisation au sein de celle-ci (*e.g.* couche interne ou externe, mur coquillier, cloison, canal siphonal...). Ce travail constitue une première caractérisation exhaustive de la matrice organique de cet organisme, par l'utilisation de méthodes biochimiques. En parallèle, nous avons mené une analyse protéomique de la matrice soluble et insoluble extraites de la coquille de *Spirula*, supportée par l'obtention d'un transcriptome (obligeamment fourni par notre collègue australienne Jan Strugnell) issu du manteau de l'organisme. Enfin, nous discutons les potentielles fonctions dans la biominéralisation des principales protéines identifiées au sein de la matrice. Cet article, présenté ici en langue anglaise dans son format de publication, est précédé d'un résumé en français. Les données supplémentaires associées à cet article sont disponibles à la fin du manuscrit, dans les Annexes.

Enfin, le lecteur trouvera en fin de chapitre quelques résultats complémentaires, notamment concernant certains aspects microstructuraux, ainsi qu'un modèle préliminaire d'élaboration de la coquille chez la spirule. Le chapitre se clora par une conclusion retraçant les résultats majeurs obtenus dans le cadre de cette étude, leurs implications, ainsi que les questions qu'ils soulèvent et les pistes de recherches ultérieures à suivre.

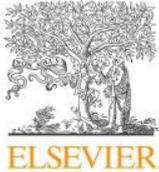
6) *The shell matrix and microstructure of the Ram's Horn squid : molecular and structural characterization – Journal of Structural Biology (2020), 211(1), art. number 107507*

### Résumé :

Les mollusques constituent un clade très diversifié au sein des métazoaires, mondialement connu pour la production d'une coquille externe calcifiée résultant de l'activité sécrétoire d'un tissu spécialisé, l'épithélium externe calcifiant du manteau. Parmi eux, les bivalves et les gastéropodes comptent parmi les organismes les plus étudiés. Pourtant, les céphalopodes représentent un groupe à l'histoire évolutive riche, particulièrement intéressante du point de vue de la biominéralisation coquillière. Ici, nous nous sommes intéressés à un organisme peu connu au sein de ce clade : la spirule *Spirula spirula*. Cet animal possède une coquille calcitique interne comme d'autres organismes dérivés (e.g. la seiche), mais qui conserve certaines caractéristiques morphologiques ancestrales telles qu'un cloisonnement et un enroulement planispiralé. Si la biologie de la spirule reste encore mal documentée à ce jour, il est fréquent de retrouver des coquilles vides le long des plages des océans Atlantique, Indien et Pacifique ouest et quelques études microstructurales datant des années 1970-2000 ont pu être réalisées. Dans ce travail, notre objectif était de proposer une caractérisation biochimique de la matrice organique coquillière de *S. spirula*, une caractérisation microstructurale de la coquille et une comparaison générale de l'ensemble de nos observations avec d'autres représentants de la classe des céphalopodes, et du phylum des mollusques en général.

L'étude au microscope électronique à balayage de la coquille a confirmé la dualité de la paroi coquillière, mais a également révélé une chronologie sécrétoire complexe étant donné l'organisation spatiale des structures. Nos observations confirment l'existence de deux couches au sein de la paroi coquillière et démontrent la nature lamello-fibrillaire des cloisons. L'insertion de ces dernières au sein de la paroi se fait sous la forme d'un biseau à la pointe effilée. Les analyses FT-IR et SS-NMR de la matrice organique ont suggéré l'existence d'une fraction saccharidique importante : la RMN a notamment identifié de la  $\beta$ -chitine ainsi que d'autres polysaccharides additionnels, comptant pour 80 % de la fraction insoluble de la matrice organique. Dans des tests de cristallisation *in vitro*, cette matrice interagit assez fortement avec les minéraux synthétisés. Une étude protéomique appliquée aux extraits solubles et insolubles de la matrice et des analyses *in silico* d'abord au sein d'une base de données de modèles métazoaires hétérologues, puis au sein du transcriptome non publié de *S. spirula*, ont également été réalisées. La première analyse a révélé un grand nombre de

peptides identifiés, certains d'entre eux identifiant des protéines telles que la tyrosinase, la chitinase 2, ainsi que des protéines appartenant aux familles d'immunoglobulines ou encore d'inhibiteurs de protéase. La seconde analyse a produit 39 résultats plus robustes, parmi lesquels la transferrine, la matriline, l'inhibiteur de protéase à sérine ou encore différentes histones. Le peu de ressemblance de nos résultats avec des protéines coquillères de mollusques déjà identifiées suggère que la spirule possède une matrice organique unique, vraisemblablement « clade-spécifique », et l'absence de similitudes avec d'autres proches parents céphalopodes suggère également que la matrice coquillière des céphalopodes ne porte pas un signal phylogénétique.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Structural Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yjsbi](http://www.elsevier.com/locate/yjsbi)

## The shell matrix and microstructure of the Ram's Horn squid: Molecular and structural characterization



Morgane Oudot<sup>a</sup>, Pascal Neige<sup>a</sup>, Ira Ben Shir<sup>b</sup>, Asher Schmidt<sup>b</sup>, Jan M. Strugnell<sup>c,d</sup>, Laurent Plasseraud<sup>e</sup>, Cédric Broussard<sup>f,g</sup>, René Hoffmann<sup>h</sup>, Alexander Lukeneder<sup>i</sup>, Frédéric Marin<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> UMR CNRS 6282 Biogeosciences, University of Burgundy - Franche-Comté, 6 Boulevard Gabriel, 21000 DIJON, France

<sup>b</sup> Schulich Faculty of Chemistry and Russell Berrie Nanotechnology Institute Technion-Israel Institute of Technology, Technion City, Haifa 32000, Israel

<sup>c</sup> Centre for Sustainable Tropical Fisheries and Aquaculture and College of Science and Engineering, James Cook University, Townsville, Qld, 4810, Australia

<sup>d</sup> Department of Ecology, Environment and Evolution, School of Life Sciences, La Trobe University, Kingsbury Drive, Melbourne, Vic 3086, Australia

<sup>e</sup> Institute of Molecular Chemistry, ICMUB, UMR CNRS 6302, University of Burgundy-Franche-Comté, 9 Avenue Alain Savary, Dijon, France

<sup>f</sup> 3P5 Proteomic Platform, Cochin Institute, 22 Rue Méchain, Paris, France

<sup>g</sup> 3P5 Proteomic Platform, University of Paris, Cochin Institute, INSERM, U1016, CNRS, UMR8104, F-75014 Paris, France

<sup>h</sup> Branch Paleontology, Institute of Geology, Mineralogy, and Geophysics, Dpt Earth Sciences, Ruhr-Universität Bochum, Universitätsstrasse 150, 44801 Bochum, Germany

<sup>i</sup> Natural History Museum Vienna, Burgring 7, 1010 Vienna, Austria

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Biomineralization  
Shell  
Ram's horn squid  
Microstructure  
Proteomic  
Chitin

### ABSTRACT

Molluscs are one of the most diversified phyla among metazoans. Most of them produce an external calcified shell, resulting from the secretory activity of a specialized epithelium of the calcifying mantle. This biomineralization process is controlled by a set of extracellular macromolecules, the organic matrix. In spite of several studies, these components are mainly known for bivalves and gastropods. In the present study, we investigated the physical and biochemical properties of the internal planispiral shell of the Ram's Horn squid *Spirula spirula*. Scanning Electron Microscope investigations of the shell reveal a complex microstructural organization. The saccharides constitute a quantitatively important moiety of the matrix, as shown by Fourier-transform infrared and solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopies. NMR identified  $\beta$ -chitin and additional polysaccharides for a total amount of 80% of the insoluble fraction. Proteomics was applied to both soluble and insoluble matrices and *in silico* searches were performed, first on heterologous metazoans models, and secondly on an unpublished transcriptome of *Spirula spirula*. In the first case, several peptides were identified, some of them matching with tyrosinase, chitinase 2, protease inhibitor, or immunoglobulin. In the second case, 39 hits were obtained, including transferrin, a serine protease inhibitor, matrilin, or different histones. The very few similarities with known molluscan shell matrix proteins suggest that *Spirula spirula* uses a unique set of shell matrix proteins for constructing its internal shell. The absence of similarity with closely related cephalopods demonstrates that there is no obvious phylogenetic signal in the cephalopod skeletal matrix.

### 1. Introduction

Molluscs, including chitons, oysters, mussels, snails, slugs, octopus and squids, constitute one of the most diversified phyla in the animal kingdom on the basis of shape, anatomy, size, development, habitat or number of living and fossil species (Bouchet et al., 2016; Mora et al., 2011; Ponder et al., 2019; Vinther, 2015). Many molluscs possess an external calcified shell, which protects and anchors the soft tissues of the organisms. This acellular multi-layered mineralized exoskeleton results from the secretory activity of a specialized epithelium that

delineates the mantle, the ciliated organ that coats the inner surface of the shell (Checa, 2018; Simkiss and Wilbur, 1989). The shell fabrication requires specific cellular and molecular machinery: the mineral deposition is indeed controlled by an extracellular organic matrix, which is subsequently occluded. Since its discovery as a key-player in regulating shell biomineralization, the organic matrix has been the subject of a large number of biochemical analyses focused on its protein moieties (Crenshaw, 1972; Hare, 1963; Marin and Luquet, 2004; Rusenko et al., 1991; Sarashina et al., 2006; Weiner, 1983). Most of these studies concentrated their efforts on bivalves and gastropods, the two modern

\* Corresponding author.

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

<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2020.107507>

Received 31 January 2020; Received in revised form 8 April 2020; Accepted 9 April 2020

Available online 15 April 2020

1047-8477/ © 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

largest mollusc classes. Far less studied are the cephalopods. They represent however an important class, with about 800 living and more than 10 000 fossil species (<http://cephbase.eol.org/>; Nishiguchi and Mapes, 2008). The fossil record indicates that the first indisputable cephalopods appeared in the Middle Cambrian (Kröger et al., 2011) but they may have been present as early as the Lower Cambrian with *Tannuella elinorae* (~530 Ma, Brock and Paterson, 2004; Kröger et al., 2011; Vinther, 2015). Since then, cephalopods experienced a complex evolutionary history with important Ordovician, Devonian-Carboniferous, Triassic and Cenozoic radiations and major crises, including the end-Permian and end-Cretaceous mass extinctions (Brayard et al., 2009; Murray, 1985; Nishiguchi and Mapes, 2008). From a “biomineralization” viewpoint, cephalopods have a singular evolutionary trajectory (Klug et al., 2019), with a general trend to shell size reduction and internalization (cuttlefish bone), a drastic mineralization decrease (the organic squid pen), leading ultimately to complete loss of skeletal structures, in the most recently appeared cephalopods, i.e., octopuses. Although the clade is commonly recognized as monophyletic, several uncertainties remain regarding the phylogenetic relationships among the major lineages of extant coleoid cephalopods, including that of the internally shelled sepiids (cuttlefishes) and *Spirula* (Lindgren and Anderson, 2018; Strugnell et al., 2017; Tanner et al., 2017). In addition, the molecular mechanism of shell formation remains poorly known for these taxa.

In this general framework, we focused on the Ram's Horn squid *Spirula spirula*. This species is a small-sized mesopelagic cephalopod (Coleoidea, Decabrachia), rarely observed in its natural environment. It is considered as a monospecific genus (Haring et al., 2012; Neige and Warnke, 2010) and even a monospecific order, whose shell exhibits peculiar characteristics. Some of them are reminiscent of the distantly related *Nautilus*, such as planispiral coiling and a chambered shell where chambers are separated by concave septa and communicate via a siphuncle, a primordial morphology (plesiomorphic character) within cephalopods. However, the siphuncle of *S. spirula* is in proximal position, while that of *Nautilus* is more centered in the septa. Furthermore, in contrast to *Nautilus* sp., the shell of *S. spirula* is fully internal and its microstructure is not nacreous (as it is in all nautiloids), both characters being considered as derived. These features, among others, are shared with some other coleoids, such as cuttlefishes and relatives (Kröger et al., 2011; Strugnell et al., 2017).

Even though the biology of *S. spirula* remains largely elusive (Ohkouchi et al., 2013), it is quite common to find shells on beaches of the Atlantic, Indian and West Pacific oceans (Bruun, 1943; Clarke, 1970) and different studies have investigated their microstructure (Cuif et al., 1983; Bandel and Boletzky v., 1979; Dauphin, 1976, 1977). Nevertheless, the shell biochemistry has been explored only very superficially (Dauphin, 1996; Dauphin and Marin, 1995; Degens et al., 1967). The aim of this work is to determine the biochemical characteristics of the shell matrix of *S. spirula*, with a view to understanding its multiple molecular functions in biomineralization. The second objective of our study is to compare our data with that obtained from better known representatives of the class Cephalopoda and, by extension, of the phylum Mollusca, in order to draw macroevolutionary conclusions.

## 2. Material and methods

### 2.1. Shell sampling

All *Spirula spirula* shell samples used in this study were collected on the beach. They were provided by four of us (R. H., J. M. S., P. N. and A. L.). For subsequent analyses, we used complete shells (Fig. 1) or almost complete, with the exception of the first chamber, frequently missing. Two batches, consisting of dozens of shells were collected in two locations: the beaches of Lanzarote (Playa de Famara), Canary Islands (R. H., sampling in November 2005), and the beaches of Tamandaré,

Pernambuco State, Brazil (sampling in July 2007 and donation to P. N.). Additional material in lesser quantities came from East Australian coast (Townsville, Queensland) (J. M. S.) and from Maldives Islands, Thailand, and Canary Islands (A. L.).

### 2.2. Shell embedding and microstructure analysis

Shell embedding was performed according to the manufacturer's instructions (Fluka): briefly, benzoyl peroxide (catalyst) was dissolved in the LR White resin monomer solution (9.9 g per 500 mL) for 24 h, at room temperature, under constant stirring. Complete dried specimens were immersed in sample vials containing the resin solution at room temperature, subsequently placed for a few hours in a desiccator under vacuum. The preparations were incubated at 60 °C to allow polymerization (three days). The resin blocks were sliced with a saw microtome (Leica SP1600). Shell sections were mirror-polished (0.05 µm aluminium oxide paste) and slightly etched with EDTA solution (1% wt/vol) for two minutes in an ultrasonic bath, before being rinsed, dried and carbon or gold-coated. The samples were observed with a Hitachi TM-1000 tabletop SEM or with a JEOL JSM-IT 100 InTouchScope™.

### 2.3. Shell matrix extraction

The shells were coarsely powdered with a mortar and bleached in a 10-times diluted sodium hypochlorite solution (Merck, 6–14% active chlorine, ref 105614) for 17 to 20 h. After several rinsing steps in ultrapure water, the powder was dried at 37 °C and finely ground manually then divided into two batches. The first one was immediately weighed and decalcified overnight at 4 °C by adding progressively cold dilute acetic acid (10% vol/vol) at a flow rate of 0.1 mL every 5 s, under constant stirring (according to the protocol described by Pavat et al., 2012). The second batch was bleached in sodium hypochlorite solution (same concentration) for additional 17–20 h, rinsed, dried then weighed and decalcified similarly to the first batch.

For each batch, the clear solution was centrifuged (3900 G, 30 min). The supernatant containing the acid soluble matrix (ASM) was filtered (5 µm, Millipore) on a Nalgene filtration device before being ultra-filtered for volume reduction on an Amicon cell (400 mL; cutoff 10 kDa). The solution (10–15 mL) was then extensively dialyzed against Milli-Q water for three days (6 water changes) and lyophilized. In parallel, the precipitate (i.e. pellet) containing the acid insoluble matrix (AIM) was rinsed via 5 cycles of resuspension in Milli-Q water - centrifugation, each supernatant being added to the ASM. Finally, the AIM pellet was lyophilized. All the lyophilisates were weighed on a precision balance (Sartorius Quintix35-1S) three to five times, and the mean value was calculated. In total, three extractions from the Canaries samples were performed, and two from the Brazil ones, leading each time to four batches of extracts, both ASM (ASM1<sub>b</sub>, ASM2<sub>b</sub>, ASM1<sub>c</sub>, ASM2<sub>c</sub>) and AIM (AIM1<sub>B</sub>, AIM2<sub>B</sub>, AIM1<sub>C</sub>, AIM2<sub>C</sub>).

### 2.4. Fourier transform Infra-Red spectroscopic characterization (FT-IR)

FT-IR spectroscopy was performed to identify the shell mineralogy of *S. spirula*, as well as the overall chemical characteristics of the extracted matrices (ASMs and AIMS). In both cases, minute amounts of samples (shell powder or freeze-dried chips (< 1 mg) of ASM and AIM) were analysed with an FT-IR Bruker Alpha spectrometer (Bruker Optics Sarl, Marne-la-Vallée, France) fitted with an Attenuated Total Reflectance (ATR) ALPHA-P device equipped with a mono-reflection diamond crystal in the 4000–375 cm<sup>-1</sup> wavenumber range (24 scans at a spectral resolution of 4 cm<sup>-1</sup>). The qualitative assignment of absorption bands was performed by comparison with previous spectra descriptions, achieved by our group or available in the literature. An additional spectrum was acquired from commercial crab chitin (Sigma, C9752).



Fig. 1. *Spirula spirula*. A, specimen from East Australian coast (Townsville, Queensland). B, specimen from Thailand. Note that the first specimen still possesses its initial chamber, while it is missing in the second one.

### 2.5. Solid state nuclear magnetic resonance (SS-NMR)

$^{13}\text{C}$  (75.4 MHz) and  $^{31}\text{P}$  (121.85 MHz) Magic Angle Spinning (MAS) NMR measurements were carried out on 300 MHz solid state NMR Bruker AVANCE III spectrometer using a 4 mm triple-resonance MAS NMR probe with zirconia rotors. Samples were spun at  $10,000 \pm 2$  Hz. Two excitation techniques were employed: DE - direct excitation, and CP - Cross Polarization (CP), both using rotor matched chemical shift echo (Stejskal et al., 1977). All experiments employed:  $5.0 \mu\text{s} \pi/2$ ,  $10.0 \mu\text{s} \pi$  pulse widths, and an echo interval of  $100 \mu\text{s}$  identical to the rotor period  $T_R$ ; TPPM  $^1\text{H}$  decoupling (Bennett et al., 1995) with rf field strength of 100 kHz. The Hartmann-Hahn CP employed 50 kHz rf level for the X-channel ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ ) and 50–70 kHz ramped rf level for the  $^1\text{H}$  channel with 1 and 2 ms duration (contact time, ct) for  $^{13}\text{C}$  and  $^{31}\text{P}$  respectively. Experiments were repeated using relaxation delays of 3 sec ( $^{13}\text{C}$ ) acquiring 8 k and 40 k transients (Canaries and Brazil samples, respectively) and 3 sec for  $^{31}\text{P}$  acquiring 2 k transients. Complementary  $^{13}\text{C}$  DE echo MAS NMR measurements were carried out for the bigger Canaries sample acquiring 64 transients with 200 sec relaxation delay (fully relaxed).

Two *Spirula spirula* AIM1 extracts – from the Canaries (16.8 mg, AIM1<sub>C</sub>) and from Brazil (6.0 mg, AIM1<sub>B</sub>), and a reference chitin standard (Sigma, ref. C9752) were subjected to solid-state MAS NMR measurement. CP MAS is the method of choice to effectively detect organic matter as it takes advantage of the abundant hydrogens as a source of signal, so highlighting all nearby carbons (below  $10 \text{ \AA}$ ) and yielding spectra with high sensitivity (high signal to noise ratio, S/N). Although the quantitative DE MAS spectra are inherently of lower sensitivity, here they were obtained to validate that all peaks (species) are accounted for in the CP spectra.

### 2.6. Mono-dimensional PAGE

The shell extracts were analyzed by conventional mono-dimensional denaturing SDS-PAGE (Bio-Rad, Mini Protean III gels), on precast gradient gels (Mini-PROTEAN TGX Gel 4–15% acrylamide,  $90 \times 70$  mm, Bio-Rad) or on homemade gels (12% polyacrylamide). Prior to migration, the samples were treated as follows: lyophilisates (both ASM and AIM) were dissolved in  $2 \times$  Laemmli Sample Buffer (LSB) to a final matrix concentration of  $5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Both preparations were heat-denatured at  $100 \text{ }^\circ\text{C}$ : 5 min. for the ASM and 10 min. for the AIM. Note that the AIMS are not fully solubilized by the Laemmli treatment: only the soluble fractions, referred as Laemmli-Soluble AIMS or LS-AIMS, can be visualized on gels. The preparations were cooled down and shortly centrifuged before being applied on the top of the gel. Subsequently, gels were stained by silver nitrate (Morrissey, 1981), carbocyanine, i.e., “Stains-all” (Campbell et al., 1983) and with Bio-Rad blue dye. Other staining methods, such as PAS for glycoproteins and Alcian blue for polyanionic substances, were applied too, but did not produce significant results.

### 2.7. In vitro crystallization assay

The effect of the *Spirula spirula* ASM on the growth of calcium carbonate crystals was tested *in vitro*, as previously described (Albeck et al., 1993) with some modifications (Pavat et al., 2012). In this assay, crystal growth is obtained by slow diffusion of  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  vapor into the  $\text{CaCl}_2$  solution. To this end, a 10 mM solution of  $\text{CaCl}_2$  solutions was prepared fresh, filtered ( $5 \mu\text{m}$  pore size) and used for serial dilutions of ASM in the range [0.25–16  $\mu\text{g}/\text{well}$ , i.e., 1.25 to 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]. The solutions were incubated in a 16-well culture slide (Lab-Tek, Nunc/Thermo Scientific, Rochester, NY, USA, 200  $\mu\text{L}$  per well), which was covered with a plastic cover that had been pierced in the middle of each well to allow vapor diffusion. The whole system was sealed using parafilm “M” laboratory film (Neenah, WI, USA). Finally, the slide was placed in a desiccator containing ammonium bicarbonate crystals that was subsequently closed and placed under vacuum. In parallel, blank controls were performed without ASMs.

After incubation, the slides were carefully dried by gently removing the solution using a blunt-ended syringe needle connected to a vacuum pump. Slides were dis-assembled and the glass plate was observed using a TM1000 tabletop scanning electron microscope (Hitachi) in back-scattered electron mode. To guarantee the reproducibility of the results, the crystallization assay was performed 5 times, each time with a blank control.

### 2.8. Enzyme-linked lectin assay (ELLA)

Screening of *Spirula spirula* ASMs by Enzyme-Linked Lectin Assay (ELLA) was performed using a set of 21 biotinylated lectins (Vector Labs, Kits I to III, ref. BK-1000, BK-2000, BK-3000 respectively). The binding preferences and specificities of each lectin are indicated in Kanold et al. (2015), which compiles data from different bibliographical sources.

The test was carried out in 96-well microplates (MaxiSorp, NuncTM, Rockslide, Denmark): the *Spirula* ASM diluted in TBS buffer (200 ng/well) was incubated for 90 min at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , immediately followed by three washing steps with TBS/Tween20. Wells were blocked with 1X concentrated Carbo-free blocking solution (Vector Labs, ref. SP-5040) for at least 30 min at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . The diluted lectins (in TBS/Tween20) were incubated into the microplate for 90 min at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , at the following dilution factors: 200 times for kits I and II, and 100 times for kit III. After three washes with TBS/Tween20, the microplates were incubated with a diluted solution of Avidin-Alkaline Phosphatase conjugate (1:70000, ref. Sigma A7294, St. Louis, MO, USA) for 90 min at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , for the detection of bound biotinylated lectins. They were then washed five times with TBS/Tween20 and revealed with a substrate solution containing aqueous diethanolamine (9.7% vol/vol, pH adjusted to 9.8 with HCl) and phosphatase substrate (0.5 mg/mL, pNPP Tablet, Sigma, St. Louis, MO, USA). The microplates were read at 405 nm every 15 min (BioRad Model 680). A check of the background signal without ASM, lectin or Avidin-AP showed no reaction with the substrate solution. This test was performed with quadruplicates of each lectin and the results

were normalized and translated in percentage of reactivity by subtracting the background and considering the highest response as 100%. The test was performed three times.

### 2.9. RNA extraction, transcriptome sequencing and assembly

Tissue samples, collected from a *Spirula spirula* individual captured from the Coral Sea, Australia, were stored in RNAlater (Qiagen) at  $-80^{\circ}\text{C}$ . RNA was extracted using an RNeasy Mini Kit (Qiagen) following the manufacturer's protocol. The sample was disrupted using a desktop homogenizer (IKA). RNA quality and quantity were measured using a Bioanalyzer (Agilent). The transcriptome was sequenced on a single lane of an Illumina HiSeq2000 by the Australian Genome Research Facility (AGRF). The transcriptome was assembled from all sequencing data using the assembly program Trinity (Version 2.2, Grabherr et al., 2011). Default parameters were used with data normalization. The *Spirula spirula* transcriptome assembly included 89,625 contigs and had an average contig length of 625.91 nucleotides. A reference protein database containing 16,405 amino acid sequences was constructed by predicting proteins from the transcriptome using TransDecoder followed by clustering highly similar sequences (95% identity) with cdhit. Sequencing information is available at NCBI under the BioProject (SRA accession reference PRJNA302677).

### 2.10. Proteomic analysis of the shell extracts and subsequent in silico analysis

MS/MS analyses were conducted on the four unfractionated bulk matrices, ASM and AIM, which were digested in-gel, after a short migration in an 8% acrylamide gel stained with Coomassie blue. In-gel digestions were carried out with trypsin. Samples were destained twice with a mixture of 100 mM ammonium bicarbonate (ABC) and 50% (v/v) acetonitrile (ACN) for 30 min at  $22^{\circ}\text{C}$  and then dehydrated using 100% ACN for 15 min, before being reduced with 25 mM ABC containing 10 mM DTT for 1 h at  $56^{\circ}\text{C}$  and alkylated with 55 mM iodoacetamide in 25 mM ABC for 30 min in the dark at  $22^{\circ}\text{C}$ . Gel pieces were washed twice with 25 mM ABC and dehydrated (twice, 20 min) with 100% ACN. Gel cubes were incubated with sequencing grade modified trypsin (Promega, USA; 12.5 ng/ $\mu\text{L}$  in 40 mM ABC with 10% ACN, pH 8.0) overnight at  $37^{\circ}\text{C}$ . After digestion, peptides were extracted twice with a mixture of 50% ACN – 5% formic acid (FA) and then with 100% ACN. Extracts were dried using a vacuum centrifuge Concentrator plus.

For MS and MS/MS ORBITRAP, analyses were performed using an Ultimate 3000 Rapid Separation Liquid Chromatographic (RSLC) system (Thermo Fisher Scientific) online with a Q-Exactive Plus hybrid quadrupole Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). Briefly, peptides were dissolved in 10  $\mu\text{L}$  of 10% ACN – 0.1% trifluoroacetic acid (TFA). Then, peptides were loaded and washed on a  $\text{C}_{18}$  reverse phase pre-column (3  $\mu\text{m}$  particle size, 100  $\text{\AA}$  pore size, 75  $\mu\text{m}$  i.d., 2 cm length). The loading buffer contained 98%  $\text{H}_2\text{O}$ , 2% ACN and 0.1% TFA. Peptides were then separated on a  $\text{C}_{18}$  reverse phase resin (2  $\mu\text{m}$  particle size, 100  $\text{\AA}$  pore size, 75  $\mu\text{m}$  i.d., 25 cm length) with a 1 h gradient from 99% A (0.1% FA and 100%  $\text{H}_2\text{O}$ ) to 90% B (80% ACN, 0.085% FA and 20%  $\text{H}_2\text{O}$ ).

The mass spectrometer acquired data throughout the elution process and operated in a data dependent scheme with full MS scans acquired with the Orbitrap, followed by up to 10 MS/MS HCD spectra. Mass spectrometer settings were full MS (AGC:  $3 \times 10^6$ , resolution:  $7 \times 10^4$ ,  $m/z$  range 400–2000, maximum ion injection time: 100 ms); MS/MS (AGC:  $1 \times 10^5$ , maximum injection time: 100 ms, isolation windows: 4  $m/z$  Da, dynamic exclusion time setting: 15 s). The fragmentation was permitted for precursors with a charge state of 2, 3, 4 and up. For the spectral processing, the software used to generate .mgf files is Proteome discoverer 1.4.

Database searches were carried out using Mascot version 2.5

(MatrixScience, London, UK) on 'Other Metazoa' proteins (2,282,777 sequences) from NCBI nr databank containing 67,337,701 sequences; 24,122,812,982 residues (April 2018) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A second search was performed with the 16,405 sequences of the protein-translated transcriptome built from the mantle tissue of *Spirula spirula*. In each case, the enzyme specificity was trypsin's and up to one missed tryptic cleavage was tolerated. The precursor mass tolerance was set to 4 ppm and the fragment mass tolerance to 20 mmu for Q-Exactive data. Carbamidomethylation of cysteins and oxidation of methionines were set as variable modifications. Hits with human keratins were ignored.

The hits found with the *Spirula spirula* transcriptome were analysed according to different bioinformatic tools: the identified proteins were blasted against the NCBI dataset "Mollusca", using either BLASTp or Smart BLAST at NCBI; the descriptive protein parameters (molecular weight, isoelectric point, amino acid composition) were assessed with ProtParam and the presence of signal peptide, with SignalP, both tools sheltered by the ExPasy Bioinformatics Resources Portal in proteomics (<https://www.expasy.org/proteomics>). Sequences from the *Spirula spirula* database that were identified by proteomics were all checked for the presence of conserved domains with CD-Search at NCBI (Lu et al., 2020).

## 3. Results

### 3.1. Shell microstructures

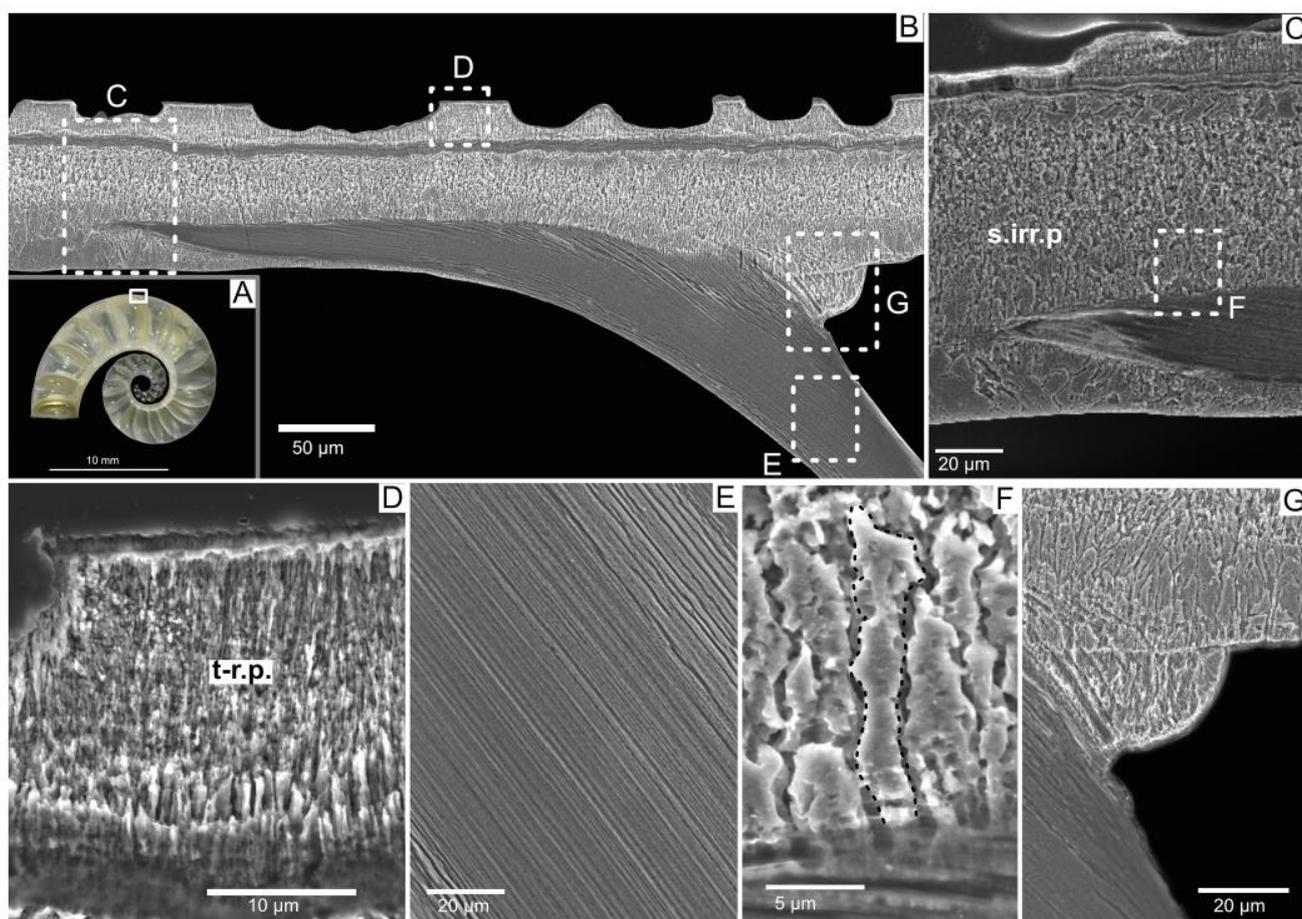
The different shell microstructures identified in the *S. spirula* are shown in Fig. 2. SEM observations confirmed that the shell wall is constituted of two layers: inner and outer. However, we noticed that the internal one is irregular semi-prismatic (Fig. 2C), while the external one appears as tuberculated and regular semi-prismatic (Fig. 2D), with well-developed spicular crystals. Between these two layers, we can observe a thin blackish layer. Moreover, the septa show a lamello-fibrillar pattern (Fig. 2E), which differs from a nacreous microstructure *sensu stricto*. We also noticed that the septa progressively insert into the shell wall in the form of a bevel. An observation made at higher magnification revealed that the internal layer progressively changes into the septa (Fig. 2E) with very gradual transition from the prisms to the lamello-fibrillar aspect of the septa. Finally, we noticed a little bulge in the aboral side of the septa, in the top corner between them and the shell wall (Fig. 2F).

### 3.2. Quantification of the organic matrix in the shell

Matrix quantification of the last extraction is shown in Table 1. However, we did not detect any significant variations between the different extractions, in term of absolute quantities of matrices, both ASM and AIM. Thus, we can consider that this quantification reflects accurately the amount of organics in the shell of *S. spirula*. After a single bleaching step, the composition of the matrix is dominated by acetic acid-insoluble components (AIM) that represent between two-third and four-fifth of the total matrix (around 70%). The latter accounts for about 1% of the shell powder weight (0.7 and 1.09%, respectively). The second bleaching has a drastic effect on the AIM, since the weight values of this matrix collapse to unquantifiable amounts for the Brazil samples. The effect is less pronounced for the ASM, the absolute quantity of which is divided by a factor 2–2.5.

### 3.3. FT-IR spectroscopy

FT-IR (ATR) spectra acquired from eight extracts of AIM and ASM fractions are shown in Fig. 3. Two additional spectra, corresponding to shell powder and commercial chitin ( $\alpha$ -type), respectively, are also added in the figure. For more details and to facilitate the comparison, the spectra exclusively focus on the range of  $2000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$  (full FT-IR data are depicted in the Supplementary figure 1). Firstly, we verified



**Fig. 2.** Shell microstructures of *Spirula spirula*, in the insertion zone of a septum into the shell wall. A) General view, equatorial section. B) General view of the septum insertion in the outer wall. Note the beveled shape of the whole structure. C) Zoom on the very beginning of the septum into the shell outer wall, showing its organization into an internal unit, with an irregular semi-prismatic layer (s.irr.p). D) Zoom on the external unit of the shell wall, showing its tuberculated and regular semi-prismatic structure (t-r.p). E) Zoom on the lamello-fibrillar structure of the septum. F) Zoom on the contact zone between the septum and the internal shell unit, at the very beginning of the insertion, showing the transformation from the irregular semi-prismatic structure into the lamello-fibrillar one. G) Zoom on the suprasedal annular ridge, observed on the aboral side, dorsal corner, of the septum. In spite of a thin delimitation between the annular ridge and the internal unit, one notices a microstructural continuity.

**Table 1**

Summary of the quantity and proportion of each organic shell matrix fraction (ASM, AIM) after one (batch 1) or two (batch 2) bleaching treatments. Separate data were obtained for samples of two different geographical sources, Canary Islands and Brazil.

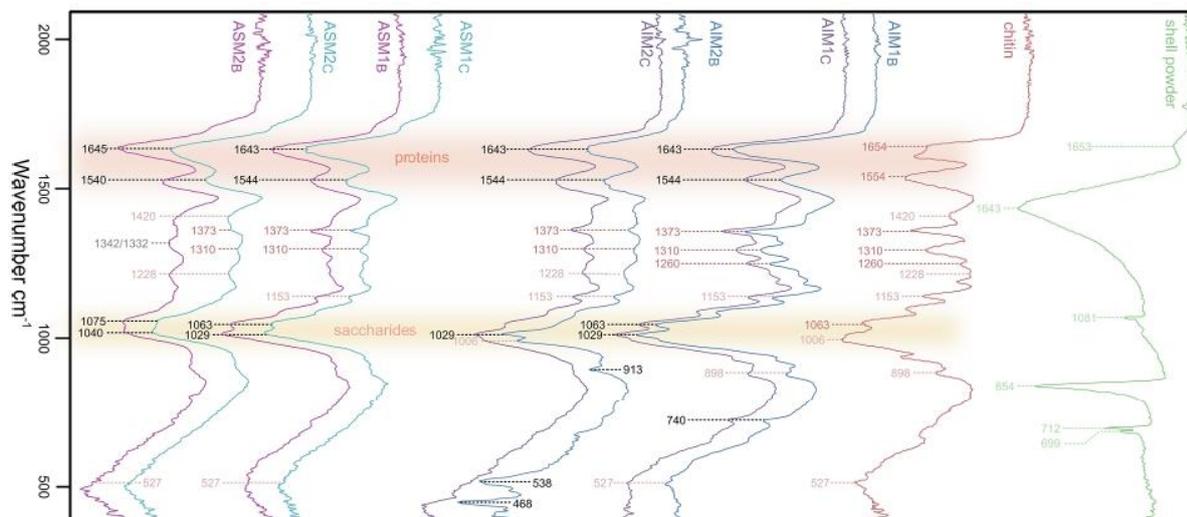
		Initial weight (g)	ASM extract (mg)	%ASM	AIM extract (mg)	%AIM
Canary Islands	Batch 1	2.0832	5.36	0.25%	22.6	1.09%
	Batch 2	2.0315	2.00	0.1%	0.35	0.01%
Brazil	Batch 1	1.6093	6.24	0.39%	11.2	0.7%
	Batch 2	1.6103	3.98	0.24%	N/A	N/A

standard deviation =  $\pm 0.02$  mg.

that the mineralogy of the samples was fully aragonitic – characterized in particular by the  $700\text{--}713\text{ cm}^{-1}$  double peak ( $\nu_4$  internal vibration modes of  $\text{CO}_3^{2-}$ ) (Balmain et al., 1999) – by checking different zones of the shell (initial chamber, one random intermediate chamber, last preserved chamber). For clarity, only the spectrum acquired from the powder of the last chamber is shown in Fig. 3. In the  $2500\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$  range (not shown in Fig. 3), the shell matrix samples exhibit one broad band located at  $3271\text{ cm}^{-1}$ , which is usually attributed to the amide A group [ $\nu(\text{N} - \text{H})$ ] (Kong and Yu, 2007). In addition, one low amplitude

enlarged band centered at  $2932\text{ cm}^{-1}$  can be observed, and usually assigned to the  $\nu(\text{C} - \text{H})$  stretching vibrations.

All extracts (8) show comparable fingerprints and a strong similarity in the distribution of their absorption bands. To facilitate comparisons, we have compiled the FT-IR profiles in pairs of samples from Brazil (B) and Canary Islands (C):  $\text{AIM1}_B/\text{AIM1}_C$ ,  $\text{AIM2}_B/\text{AIM2}_C$ ,  $\text{ASM1}_C/\text{ASM1}_B$  and  $\text{ASM2}_C/\text{ASM2}_B$ . Unambiguously, all spectra exhibit, in particular, the presence of amide absorption bands at  $1638/43$  and  $1535/43\text{ cm}^{-1}$ , ascribed to the Amide I [ $\nu(\text{C}=\text{O})$ ] and II [ $\nu(\text{C}-\text{N})$ ] bands, respectively, that characterize protein moieties. In addition, AIM and ASM fractions are also characterized by a high density of absorption bands between  $1500$  and  $1000\text{ cm}^{-1}$ , very similar to those observed for commercial  $\alpha$ -chitin. The most significant are located at  $1420$ ,  $1373$ ,  $1310$  and  $1260\text{ cm}^{-1}$ , and can be attributed to  $\delta(\text{CH}_2)$ ,  $\delta_s(\text{CH}_3)$ ,  $\delta(\text{C}-\text{H})$  and amide I bands, respectively. Moreover, absorptions of stretching vibrations of saccharidic moieties are clearly revealed by the presence of intense absorptions at  $1153$ ,  $1063$  and  $1006\text{ cm}^{-1}$  corresponding to  $\nu_s(\text{C}-\text{O}-\text{C})$ ,  $\nu_{as}(\text{C}-\text{O}-\text{C})$ , and  $\nu(\text{C}-\text{O})$ , respectively (Kaya et al., 2014). The spectra from both origins – Canary Islands and Brazil – are very similar. It is interesting to note that the  $\text{AIM2}_B$  spectrum exhibits additional bands, sharp and of medium intensities, between  $1000$  and  $400\text{ cm}^{-1}$  (located at  $913$ ,  $538$ ,  $468\text{ cm}^{-1}$ ). To the best of our knowledge, and based on the existing bibliography, these bands suggest the presence of phosphate groups ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) (Radev et al., 2012). Thus, the



**Fig. 3.** FT-IR spectra of the shell powder of *Spirula spirula*, of commercial  $\alpha$ -chitin and of the different organic fraction of the shell matrix (AIM1, AIM2, ASM1, ASM2) from both localities (*i.e.* Canaries, C, and Brazil, B). The “domains” of the characteristic absorption bands of protein and saccharidic moieties are highlighted, respectively, in pink and yellow. The values of the main absorption peaks are indicated under each of them, and colored in pink when identical to those of the commercial chitin.

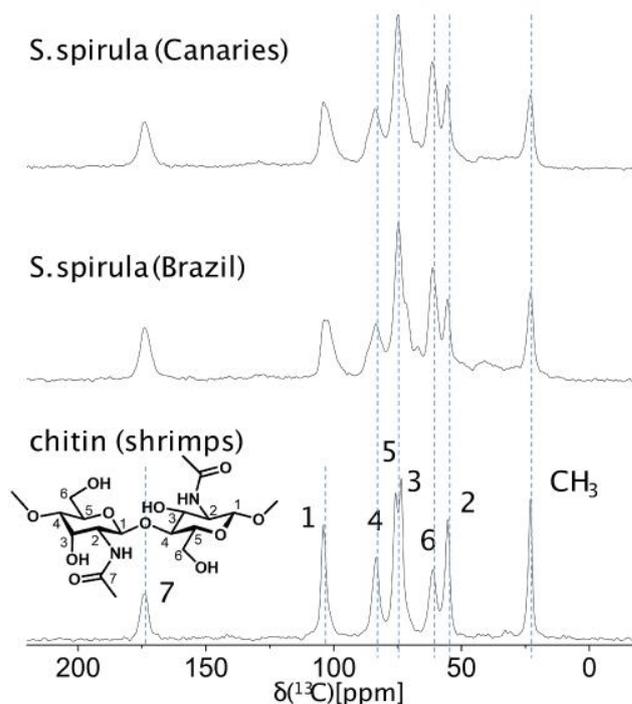
band at  $913\text{ cm}^{-1}$  can be assigned to the stretching P–O vibrations and those at  $538$  and  $468\text{ cm}^{-1}$  can be related to the bending O–P–O vibrations of phosphate groups (Jastrzbski et al., 2011). At this stage of investigations, the reason of this variance from other samples remains still undetermined. However, in recent studies on other shells of marine animals, such as *Pinctada margaritifera* (Schmitt et al., 2018) and *Porites australiensis* (Takeuchi et al., 2018), we already made the same spectroscopic observations on AIM fractions leading to comparable suppositions about the presence of  $\text{PO}_4^{3-}$  groups.

When compared to AIMS, ASMs show a decrease in intensity of the amplitude of their absorption bands in the  $1200\text{--}1420\text{ cm}^{-1}$  range. It is the same for the saccharidic bands of ASMs also showing a relative intensity decrease in comparison to that of amide absorptions. Finally, we observe that the second bleaching treatment alters the amplitude of the absorption bands in the  $1200\text{--}1420\text{ cm}^{-1}$  range, without modifying the overall appearance of spectra.

### 3.4. Solid state nuclear magnetic resonance

The  $^{13}\text{C}$  CP MAS NMR spectra of the two *Spirula spirula* extracts (AIM1) and of  $\alpha$ -chitin standard are shown in Fig. 4. The spectra from both origins – Canary Islands and Brazil – are closely identical, and are dominated by the characteristic chitin peaks. The latter are superimposed on a much weaker set of partially resolved peaks between 20 and 55 ppm, which are consistent with small residual proteinaceous content. The merged  $C_3$  and  $C_5$  peaks, the broadened methyl peak, and the chemical shifts of  $C_1$  and  $C_4$  peaks (103.9 and 83.9 ppm) in the  $^{13}\text{C}$  CP MAS spectra of the *S. spirula* samples are consistent with  $\beta$ -chitin (Jang et al., 2004; Kaya et al., 2017).

The chitin peaks exhibited by both *S. spirula* extracts deviate from those of the neat chitin peaks, showing broadening and reversed relative  $C_6$  and  $C_2$  peak intensities (increased and decreased, respectively); these deviations represent increased structural heterogeneity due to modification and/or disruption of local environments possibly as a result of the extraction procedure. Closer inspection of the spectra reveals additional partially resolved peaks (102.6, 86.3, and 71.5 ppm respectively; Supplementary figure 2) that appear as shoulders of the  $C_1$ ,  $C_4$  and  $C_5$  peaks; these suggest contributions from other polysaccharides. Given the increased linewidths, the co-occurrence of the other chitin polymorphs cannot be ruled out. In conclusion, the spectra imply that over 80% of the insoluble organic extract content (AIM1) is



**Fig. 4.** 75.4 MHz  $^{13}\text{C}$  CPMAS spectra of acid insoluble extracts (AIM1) of *Spirula spirula* shells from the Canaries and Brazil, and of  $\alpha$ -chitin standard (shrimp) showing that the organic content of AIM1 consists primarily of chitin (the dashed lines denote the characteristic peaks of chitin).

chitinous/saccharidic. This determination is further substantiated by the lower S/N DE MAS spectrum shown in Fig. 4.

Both *S. spirula* AIM1 extracts show a broad  $-0.2$  ppm phosphate peak in their  $^{31}\text{P}$  CP MAS spectra (Fig. 5), validating the above IR findings for the AIM2 samples.  $^{13}\text{C}\{^{31}\text{P}\}$  CP MAS REDOR measurements applied to AIM1<sub>C</sub> showed no REDOR effect (not shown) therefore ruling out phosphorylation of any of the chitin carbons. In the absence of such measurable proximity and in view of the resilience of these P-species under the extraction procedures (AIM1 and the more aggressive of AIM2), we conclude that the observed P-species are inseparable from

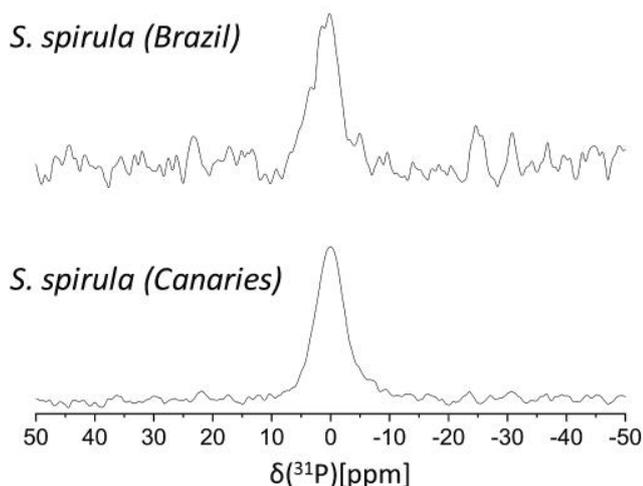


Fig. 5. 121.85 MHz  $^{31}\text{P}$  CP MAS NMR spectra of the acid insoluble extract (AIM1) of *Spirula spirula* shells from the Canaries and Brazil. The peaks are centered at  $-0.2$  ppm and are of similar normalized intensities (accounting for sample weights of 16.8 and 6.0 mg, respectively). Each spectrum was obtained acquiring 2 k transients.

the proteinaceous content. We have previously reported similar  $^{31}\text{P}$  peak for decalcified molluscs shells (Agbaje et al., 2018), and also here we ascribe this peak to represent phosphorylation, most likely of tyrosine and/or serine side chains.

### 3.5. SDS-PAGE of the shell matrix extracts

The results obtained after migrating the eight matrices in denaturing conditions are illustrated in Fig. 6. In the silver stained gel (Fig. 6A), all of them are characterized by the abundance of smearing macromolecules along the whole lane, in particular in the LS-AIMs

extracts. In addition, discrete bands, either blurred like the ones of low molecular weights ( $< 17$  kDa) in lanes 1, 3, 5 and 7, or thin and tenuous such as in the middle of the lanes 3 and 7, can be observed. We notice that the electrophoretic profiles produce superimposable patterns between similar extracts but from the two locations (such as those of lanes 1 and 5, 3 and 7). The effect of the second bleaching treatment is mainly visible on the ASMs extracts: disappearance of the high molecular diffused black band (above 170 kDa, lanes 1 and 5 versus lanes 3 and 7, respectively), and appearance of a set of four bands between 30 and 43 kDa (respectively 32.4, 35.88, 38.69 and 42.05 kDa). The Bio-Rad blue dye (Fig. 6B) stains mainly low molecular weight macromolecules, in particular the 17 kDa band, observed in lanes 4, 5, 7 and 8. Note that lanes 4 and 8 (LS-AIMs) are equally stained along their length, except a very high molecular weight fraction, which is intensely marked. The carbocyanine dye, which is supposed to stain calcium-binding macromolecules (Fig. 6C), discriminates the ASMs from the LS-AIMs: the first ones are stained blue, and the second, purple. None of the discrete bands observed in silver stained gels are visible with carbocyanine, except the migration front, which is intensely dyed in all cases. For all LS-AIMs, one notices in the migration front the superimposition of an additional greenish color (lanes 2, 4, 6, 8) that may suggest the presence of low molecular weight colored components, such as pigments. In some of our other attempts, we could lightly stain in the ASMs two discrete bands, one at 17 kDa and another one at very high molecular weight (Supplementary figure 3).

### 3.6. In vitro crystallization assay

The effect of the addition of the two soluble extracts, ASM1 and ASM2, when tested in the range  $[0-16 \mu\text{g}/\text{well}]$ , is shown in Fig. 7, which only presents few of the tested concentrations (0, 1, 4 and  $16 \mu\text{g}/\text{well}$ ). We notice that the effect of the first one (upper panel) is limited at all tested concentrations: we do not observe any significant differences with the blank, up to  $4 \mu\text{g}/\text{well}$ . Starting from  $8 \mu\text{g}/\text{well}$  (not shown here), the effect becomes progressively visible, with the

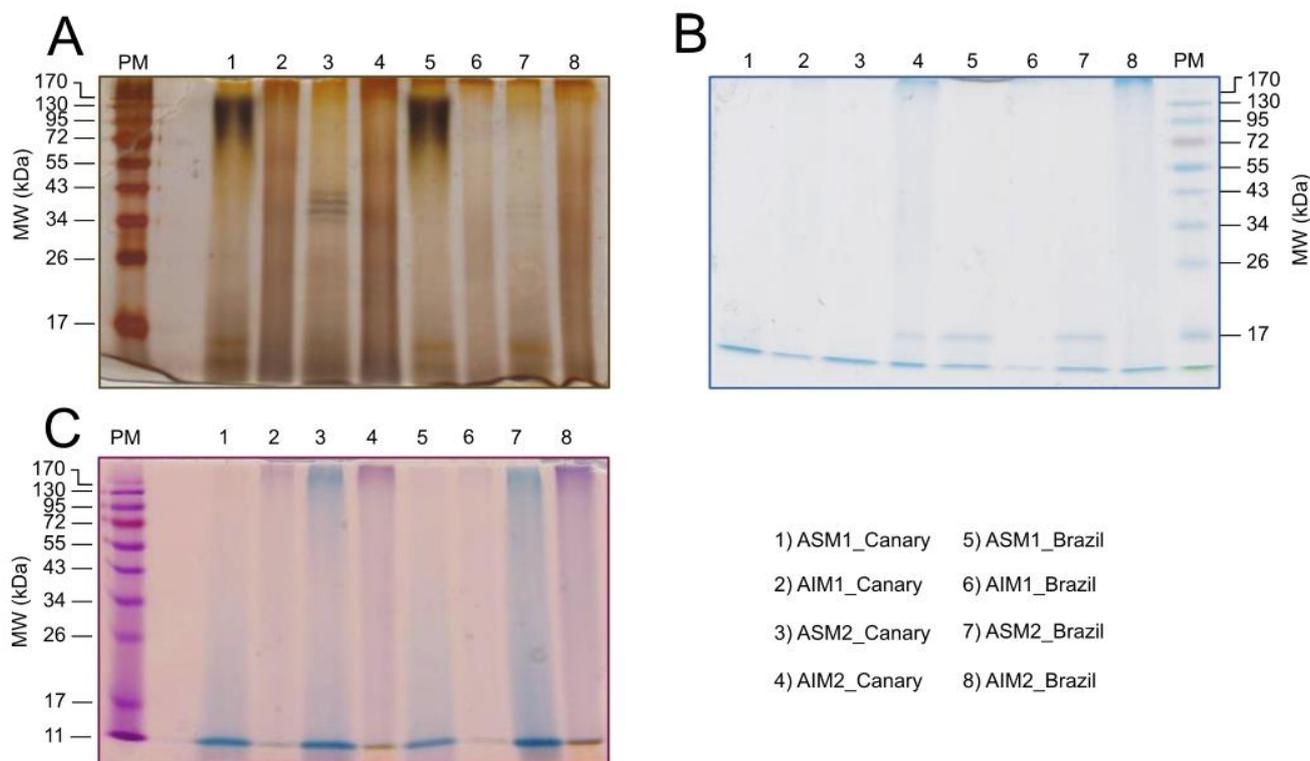


Fig. 6. SDS-Page gel electrophoresis on *Spirula spirula*. A) Silver-staining; B) Bio-rad blue staining; C) Stains-all. PM: standard molecular weight markers (Fermentas).

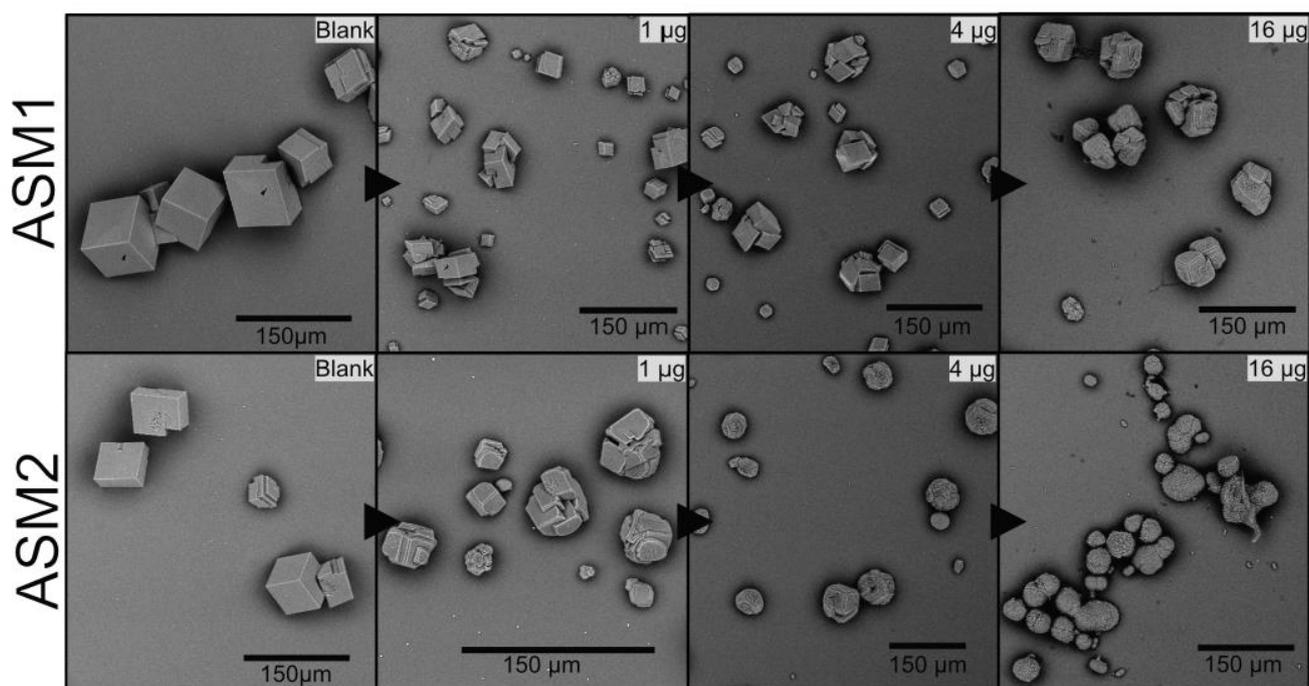


Fig. 7. *In-vitro* crystallization assay performed on both soluble matrix extracts of *Spirula spirula* (Canaries Islands) ASM1 (top) and ASM2 (bottom). The black arrows indicate the increasing matrix concentration within each well, from 0 (blank) to 16 µg/well (200 µL per well).

formation of grooves on the polycrystalline aggregates edges. At 16 µg/well, the effect is more pronounced with the formation of rounded angles. No signs of crystallization inhibition – characterized by a drastic decrease of the size of polycrystalline aggregates – are recorded with ASM1.

The effect of ASM2 (lower panel) appears much more drastic. At 1 µg/well, grooves are already visible on the crystal faces edges, while the 4 µg condition resembles the 16 µg one of ASM1. At 16 µg, polycrystalline aggregates evolve into complex spherulites, without any significant size changes.

### 3.7. Enzyme-Linked lectin assay (ELLA)

All screening experiments performed with a large set of commercial lectins are summarized in Table 2. We analyzed only ASMs: the insolubility of AIMS in standard buffers precluded the use of ELLA. Firstly, we do not detect significant variations of lectin reactivity between Canaries Island extracts and that of Brazil: the few low amplitude variations concern a couple of lectins that either do not react or react very weakly (10–20%), such as LCA or GSL-1. To summarize, we obtain three classes of reactivity: high, intermediate and low. In the first class, one finds LEL, WGA, STL (only for ASMs1) and Jacalin. The three first lectins bind oligomers (dimers and trimers in the case of WGA) of N-acetylglucosamine and are usually considered as chitin-binding lectins. Jacalin binds preferentially D-galactose or oligomers that terminate with galactose residues, as well as N-acetylgalactosamine-D-galactose dimers that very often correspond to the first glycosylation steps of Ser/Thr residues in O-glycosylated proteins. The second category of reactivity comprises ConA, succinylated-WGA and, in a lesser extent, GSL-II, and DSL. ConA binds specifically to mannose-N-acetylglucosamine dimers and is also considered as a mannose-binding lectin when this residue is part of N-linked oligosaccharides. Succinylated-WGA has similar binding properties as native WGA, but its binding capacity is inhibited by sialic acid. Thus, linking the reactivities of native and succinylated WGAs informs on the degree of sialylation of the tested extract. GSL-II and DSL bind either oligomers (DSL) or monomers (GSL-II) of N-acetylglucosamine, the latter one binding specifically the

Table 2

Summary of the reactivity pattern of lectins on both soluble fractions (ASM1 and ASM2) for both localities. 'XXXX' indicates a reactivity that exceeds 60%, 'XXX', a reactivity comprised between 40 and 60%, 'XX' between 20 and 40%, 'X', between 10 and 20% and '-' for a reactivity below 10%.

	Canary islands		Brazil	
	ASM1	ASM2	ASM1	ASM2
ConA	XX	XXX	XX	XXX
SBA	-	-	-	-
WGA	XXXX	XXXX	XXXX	XXXX
DBA	-	-	-	-
UEA 1	-	-	-	-
RCA	-	-	-	-
PNA	-	-	-	-
GSL 1	-	X	-	-
PSA	-	-	-	-
LCA	-	-	X	X
PHA-E	-	-	-	-
PHA-L	-	-	-	-
SJA	-	-	-	-
Succ-WGA	XX	X	XXX	X
GSL 2	X	X	X	XX
DSL	X	-	XX	-
ECL	-	-	-	-
Jacalin	XX	XXXX	XXX	XXXX
LEL	XXXX	XXXX	XXXX	XX
STL	XXXX	X	XXXX	X
VVA	-	-	-	-

Legend : - : 0–10%.

X: 10–20%.

XX: 20–40%.

XXX: 40–60%.

XXXX: > 60%.

terminal residues. The third category groups all the other lectins that give weak or no signal with the tested extracts, and will not be discussed further.

Although the reactivity patterns are very similar between ASM1 and ASM2, it is interesting to notice that the second bleaching step modifies

**Table 3**

Overview of the main proteomic results obtained by MASCOT. A) Summary of the identified hits per extract. B) Cross-comparison of shared hits in the 4 extracts. C) Summary of the identified peptides per extract and occurrence of the most represented AA residues (sorted by decreasing order and colored according to their chemical properties: Blue: basic; red: acidic; orange: hydroxylated; green: hydrophobic).

		AIM1	ASM1	AIM2	ASM2	TOTAL
A	Total number of hits	47	17	44	33	141
	Number of unique hits	22	5	19	15	61
	Number of shared hits between 2 or more extracts	25	12	25	18	30
B	AIM1		8	21	14	
	ASM1			8	8	
	AIM2				15	
	ASM2					
C	Number of identified peptides	82	20	55	42	199
	Number of hits identified by 2 or more peptides	4	2	5	6	17
	Number of hits identified by 1 peptide	43	15	39	27	124
	Dominant AA residues in the identified peptides	Leu: 13.7 Ile: 8.7 Asp: 8.3 Arg: 7.5 Ala: 7.2 Glu: 7.0 Gly, Val, Ser: 6.4 Thr: 6.0 Pro: 5.5	Leu: 13.6 Val: 8.9 Ala, Arg, Glu: 8.4 Pro, Ser: 6.3 Asp, Thr: 5.8 Ile: 5.2	Leu: 10.5 Ile: 9.6 Val: 8.8 Asp, Gly: 8.0 Arg: 7.8 Ala: 7.1 Ser: 6.8 Pro: 6.4 Thr: 6.3 Glu: 5.8	Leu: 10.8 Ile, Val: 8.4 Thr: 8.1 Glu: 7.9 Arg: 7.4 Ala: 6.9 Asp: 6.7 Ser: 6.2 Pro: 5.5	

the signal given by few lectins, suggesting that the saccharidic groups targeted by the diverse lectins are differentially exposed to sodium hypochlorite: in particular, STL collapses drastically, while, inversely, Jacalin increases significantly. Other minor variations are recorded: Succ-WGA and DSL tend to decrease whereas ConA rises substantially.

### 3.8. Proteomic analysis

Our proteomic *in silico* investigation on the four extracts (ASM1, AIM1, ASM2, AIM2) was performed on two databases: in the first case, we searched against “Other metazoans” NCBI dataset, and, in the second case, against the *Spirula spirula* transcriptome. The results of the first approach are summarized in Table 3. In addition, Table 4 represents the list of peptides identified for each extract and Table 5, the hits shared by the different extracts. The overall proteomic results are available in the Supplementary Table 1. In total, 141 hits are obtained,

and after suppressing duplicates, 91 (Table 3A). This score is particularly low. We notice that the two ASMs extracts yielded less hits than their insoluble counterparts. Unique hits represent about 40–45% of the total number of identified hits, except for ASM1, where it only accounts for 29%. In short, 22 hits are unique to AIM1, 19 to AIM2, 5 to ASM1 and 15 to ASM2. By focusing on shared hits (Table 3B), we notice that AIM1 and AIM2 are the most similar (21 hits), followed by ASM2, which exhibits some similarities with insoluble extract (14 shared hits with AIM1, and 15 with AIM2). ASM1 appears to be the most different extract from the four ones. Table 3C shows the number of identified peptides, combined to the occurrence of the main amino acid residues in each shell extract. It shows that very few hits (< 20% of the total matches per extract) are identified by two or more peptides, the remaining hits being recognized by only one peptide. A brief survey of the number of identified peptides per extract confirms our previous finding, namely that both AIMS exhibit higher number of peptides than ASMs. In

**Table 4**

List of the peptides identified by MASCOT within each organic fraction of the shell matrix of *Spirula spirula*. For each fraction, the number in parentheses corresponds to the number of peptides (number of queries) detected in total.

AIM1 (13959)	AGFAGDDAPR; GYSFTTAAER; EISALAPATMK; QEYDESGPSIVHR; SYELPDGQVITIGNER; VAPEEHPVLLTEAPLNPK; DLYANTVLSGGSTMFPGIADR; TTGIVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILR; EITALAPSTMK; VAIVITDGR; DYAIYVDER; STELLIR; ISGLIYEETR; TITLVEPSDTIENVK; DEVLGILR; LILPGELAK; GDGTGGLSIYDGR; IDVADLLR; SPNQNVQQAAGALR; VAVDTSYR; SPIDLVR; IDLLIPR; ITIDLFEK; IVMSQGTHTLYFDHPYEPDPEER; VSVITDGR; LQSDIKPQMKR; TPTDVPVNLSCGR; QLVQDSLDSL; ANLSILEK; KLVLLNYER; YSPVDPIR; QSIESVSPR; LGIYEDFGTK; IVIGLFGK; IAFVLK; DSTLIMQLLR; ELQDLNER; LFDQAFGLPR; DALEELDADR; KILSIVER; EGIEAIEDDR; LDILPLK; DLVDELADAIR; QLSGQQYR; LDTELNTYR; VLSHILEK; QLLEIIANLQK; NIIDLNTEMK; LMASFER; LLLTAAISADK; KINPPYYR; ATSQTLLDENDITFR; ATGLGPQPK; VATVPLSR; TGVSEGDITDKR; TTGIVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILR; SPLDLVR; VVMTQASHLYFDHPYEPDPEER; ASLVLDTGR; LDLLPLR; IGGITVVPVGR; IADADFR; IASYLEK; LGTALPFVR; DYLQIVDAR; EGELSDLSR; KILSDILR; LDILPIK; AQIEIIR; LGDVEILR; IGSLSLPR; LLLPGELAK; RIAEDSLLYFR; ASCSERCVAR; VATVPLSR; LAVVITDGR; EIIDLVLDR; SSFFVAR; GDFQLPALR; QEGAKDILLR; ATNLSNFR; FASFLDK
ASM1 (11712)	AGFAGDDAPR; GYSFTTAAER; SYELPDGQVITIGNER; VAPEEHPVLLTEAPLNPK; VAIVITDGR; VATVSLPR; DYAIYVDER; LVALFDLR; FQNALLVR; EDQTEYLEER; QSIESVSPR; IVIGLFGK; LPVLETER; FDCLLSR; KLVLLNYER; QLSGQQYR; LLLTAAISADK; IAFVLK; EPSQSPQLHR; VAVDTSYR
AIM2 (13977)	AGFAGDDAPR; GYSFTTAAER; EITALAPSTMK; QEYDESGPSIVHR; SYELPDGQVITIGNER; VAPEEHPVLLTEAPLNPK; DLYANTVLSGGSTMFPGIADR; EISALAPATMK; TTGIVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILR; AVFSPVGR; DYAIYVDER; NFDGLDLWWEYPANR; VAIVITDGR; IVMSQGTHTLYFDHPYEPDPEER; IALVITDGR; GDGTGGLSIYDGR; IDVADLLR; QLFQDVVK; IGFPPWSEIR; APDFVYAPR; FGGTLADCIR; STELLIR; LILPGELAK; ISGLIYEETR; EGIEAIEDDR; IAIVITDGR; IIVDSLGR; GWLEPLDR; IDLLIPR; ITQSNAILR; VSVITDGR; LVALFDLR; TITLVEPSDTIENVK; SETLFLR; DSTLIMQLLR; QFGSSIR; IPVLLNYMR; ASDGVPQVIVLTDGR; IATFVLR; QSIESVSPR; LDDVHLR; YSPVDPIR; IAFVLK; IVIGLFGK; EPSQSPQLHR; VAVDTSYR; LSSPTALSDR; HALSDAAVR; VESVASLKER; VPGVVTPE; TPTDVPVNLSCGR; DLVDELADAIR; SPIDLVR; LIGWGWQIR; ILITGGAGFVGSGLVDR; ;
ASM2 (13218)	FESFNNTQATNR; NTDGSTDYGLIQNSR; DYAIYVDER; LLLPGELAK; VFLENVIR; ISGLIYEETR; VAIVITDGR; STELLIR; LILPGELAK; AGFAGDDAPR; GYSFTTAAER; EITALAPSTMK; QEYDESGPSIVHR; VAPEEHPVLLTEAPLNPK; VSVITDGR; LPLQDVYK; YYVTIDAPGHR; TITLVEPSDTIENVK; EGIEAIEDDR; EDQTEYLEER; EISALAPATMK; LTAFLVR; TGVSVSSLR; YSPVDPIR; ILVPLQDR; EPSQSPQLHR; LSSPTALSDR; IAFVLK; INHDLR; GIVHTDLR; ASDGVPQVIVLTDGR; QAAIVNGTPE; IHSDCAANQQVTYR; IVIGLFGK; VAVDTSYR; KLVLLNYER; TANLETSLR; TLINEVDTR; NFEEDFYR; LMKFVTAVK; NIIDLNTEMK; SPIDLVR;

**Table 5**

Summary of the main proteomic hits obtained by MASCOT and their presence/absence (X/no X) within each fraction of the organic matrix. The hits mentioned here only represent those shared by, at least, two fractions; the list of the hits that are unique to each extract is available in the [Supplementary data](#).

Protein hits			AIM1	ASM1	AIM2	ASM2
Id	Name	Organism				
gi 268575272	C. briggsae CBR-MUP-4 protein	<i>Caenorhabditis briggsae</i> - nematode	x	x	x	x
gi 405964315	Putative tyrosinase-like protein tyr-3	<i>Crassostrea gigas</i> - pacific oyster	x	x	x	x
gi 405970334	IgGfc-binding protein	<i>Crassostrea gigas</i> - pacific oyster	x	x	x	x
gi 268570024	C. briggsae CBR-CYN-5 protein	<i>Caenorhabditis briggsae</i> - nematode	x	x	x	x
gi 158297124	AGAP008053-PA, partial	<i>Anopheles gambiae str. PEST</i> - african malaria mosquito	x	x	x	x
gi 284999807	beta actin	<i>Idiosepius paradoxus</i> - northern pygmy squid	x	x	x	x
gi 323230	polyprotein [Bovine viral diarrhoea virus 1-Osloss]		x		x	x
gi 510849995	core histone H2A/H2B/H3/H4	<i>Ancylostoma ceylanicum</i> - nematode	x		x	x
gi 156359527	predicted protein	<i>Nematostella vectensis</i> - starlet sea anemone	x	x	x	
gi 170578661	Transmembrane cell adhesion receptor mua-3 precursor, partial	<i>Brugia malayi</i> - filarial nematode worm	x		x	x
gi 675868340	hypothetical protein HELRODRAFT_161577	<i>Helobdella robusta</i> - californian leech	x	x		x
gi 158300608	AGAP012043-PA, partial	<i>Anopheles gambiae str. PEST</i> - african malaria mosquito	x	x	x	x
gi 768189576	hypothetical protein DICVIV_07943, partial	<i>Dictyocaulus viviparus</i> - bovine lungworm	x	x	x	
gi 669305641	hypothetical protein M513_09906	<i>Trichuris suis</i> - pig whipworm	x	x	x	
gi 163637123	ribosomal protein S3, partial	<i>Crassostrea gigas</i> - pacific oyster	x	x	x	x
gi 223016075	actin	<i>Octopus vulgaris</i> - common octopus	x	x		
gi 524896874	PREDICTED: peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B-like	<i>Aplysia californica</i> - california sea hare	x	x		
gi 170586872	hypothetical protein Bm1_33780	<i>Brugia malayi</i> - filarial nematode worm	x	x		
gi 33321997	gamma-glutamyl phosphate reductase, partial	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. Lactis</i> - bacteria	x	x		
gi 676489609	hypothetical protein LOTGIDRAFT_236342	<i>Lotia gigantea</i> - owl limpet	x	x		
gi 748378928	homeobox domain protein, partial	<i>Ancylostoma duodenale</i> - nematode	x	x		
gi 1360640	14-3-3 zeta protein	<i>Xenopus laevis</i> - African clawed frog	x	x		
gi 156544592	PREDICTED: alpha-L-fucosidase-like	<i>Nasonia vitripennis</i> - jewel wasp	x	x		
gi 193591718	PREDICTED: signal peptide, CUB and EGF-like domain-containing protein 1	<i>Acyrtosiphon pisum</i> - pea aphid	x	x		
gi 542607731	carbamoylphosphate synthase, partial	<i>Culicoides immaculatus</i> - diptera	x			x
gi 307203534	Probable chitinase 2	<i>Harpegnathos saltator</i> - Jerdon's jumping ant	x	x		
gi 358337009	monocarboxylate transporter 14, partial	<i>Clonorchis sinensis</i> - chinese liver fluke	x	x		
gi 585686849	PREDICTED: collagen alpha-3(VI) chain isoform X1	<i>Elephantulus edwardii</i> - cape elephant shrew			x	x
gi 225718928	serine protease K12H4.7 precursor	<i>Caligus clemensi</i> - sea louse			x	x
gi 8272602	82 kDa heat shock protein 3, partial	<i>Philodina roseola</i> - rotifer	x			x

each extract, the most represented AA residues are the hydrophobic ones, with a peculiar emphasis on leucine, isoleucine and valine in all extracts. However, we observe that all hydrophobic residues are more abundant in the insoluble matrices. The two acidic residues (Asp, Glu) account for about 14% of all residues, and the hydroxylated ones, around 13%.

All the peptides identified per extract are listed in [Table 4](#). The shortest ones comprise 7 residues while the longest, 30. One can notice some variation on the identified number of peptides, depending on the bleaching. We observe that there is a slight decrease of the number of peptides from AIM1 to AIM2, and a significant increase from ASM1 to ASM2.

All the hits identified in 2, 3 or 4 extracts are summarized in [Table 5](#). Of particular relevance are the hits with specific enzymes that are putatively involved in biomineralization, such as "putative tyrosinase-like protein Tyr-3", a "probable chitinase 2", and a "serine protease K12H4.7 precursor". Other candidates of interest are proteins that exhibit calcium-binding properties (CBR-MUP-4 protein, transmembrane cell adhesion receptor MUA-3 precursor, and a hypothetical protein HELRODRAFT\_161577) and an immunoglobulin protein (IgGfc-binding protein). Five identified proteins are thus found into the four matrices extracts: CBR-MUP-4 from *Caenorhabditis briggsae*, putative tyrosinase-like from *Crassostrea gigas*, IgGfc-binding from *Crassostrea gigas*, CBR-CYN-5 from *Caenorhabditis briggsae* and AGAP008053-PA from *Anopheles gambiae str. PEST*. More strangely, we also find two hits with the cytoskeletal protein actin (found in three extracts), and one hit with a histone, a nuclear protein (also found in three extracts). Nine hits (on 31) are found with either hypothetical or predicted proteins, most of them from invertebrate models, including two molluscs. So far, we do not find any hits corresponding to proteins that exhibit either Low Complexity Domains (LCDs) or Repetitive Low-Complexity domains (RLCDs).

The results of the search against the *S. spirula* transcriptome brought

additional results that are summarized in [Table 6](#). In total, we obtained 39 hits: 27 with AIM1, 31 with AIM2, 10 with ASM1 and 12 with ASM2. Among them, 22 are shared: 6 between the 4 extracts, 7 between 3 of them and 9 between 2. In the shared hits, the percentage of coverage varies from almost 60 to 1.4%. Furthermore, 17 hits are unique to one of the four extracts: 6 to AIM1, 9 to AIM2, 1 to ASM1 and 1 to ASM2. It is interesting to note that the two AIMS generate more hits than the ASMs, and the second extracts (AIM2, ASM2), more than the first ones (AIM1, ASM1). Among the 6 hits shared by the four extracts, 4 of them are invariably the ones with the highest peptidic coverage. They include a true transferrin, a serine protease inhibitor (elastase-inhibitor like), a matrilin, and actin. The two other "shared by four" hits are an uncharacterized protein with a heme-binding domain and a peptidyl prolyl cis trans isomerase. Among the 7 hits shared by 3 extracts, four of them exhibit a peptidic coverage higher than 10% of their sequence. They include  $\alpha$ -2 macroglobulin, collagen (N-terminus), a protein/nucleic acid deglycase and a histone. The three other proteins are one ubiquitin and two histones. The proteins shared by two extracts are represented by a calcium-binding protein, a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, a chitinase/sugar-binding protein, a GLIPR1 protein, a transferrin fragment, a collagen N-terminus, and a lamin. The other 17 proteins found in one extract include, among others, a Cys-rich secretory protein, a galectin3 binding-protein, a calcium-binding protein and four enzymes involved in saccharidic moieties modifications (heparan sulfate glucosamine sulfotransferase, N-acetyl-galactosaminidase, chitin deacetylase, UDP-glucuronic acid decarboxylase)

#### 4. Discussion

The present paper describes the shell structure and biochemistry of the Ram's Horn squid *Spirula spirula*. To our knowledge, this work represents the first exhaustive characterization of the shell matrix of this species. We describe both the microstructural features of the shell and

**Table 6**

Summary of the protein hits identified by MASCOOT against the protein-translated transcriptome of *Spirula spirula*. Each of the four fractions was analysed separately. The left column indicates the proteins identified, from the most (top) to the least (bottom) one represented. For each protein, the central column indicates its occurrence in each fraction (X), the peptidic coverage of the sequence (in %) and the three successive numbers separated by '/': its length (number of AA residues), its molecular weight (in kDa) and its isoelectric point, respectively. Five sequences exhibit an additional number in parentheses, indicating the full length of the sequence with its signal peptide. The central column lists the functional domains, identified by CD-search at NCBI, and some motifs, identified manually and currently found in skeletal matrix proteins. The numbers in parentheses indicate the position of the starting and final AA residues of the conserved domains, and the domain accession number. Finally, the right column lists the putative function of the identified protein, in relation to shell formation. In particular, several proteins that are primarily cytoplasmic or nuclear (like histones) can also be found in extracellular environment. For these proteins, we tentatively list their function(s) in the context of extracellular biomineralization.

Protein hit * indicates complete sequences	Shell organic matrix extract				Functional domains and motifs		Putative function in biomineralization
	AIM1	AIM2	ASM1	ASM2	(starting AA - final AA, domain accession number)		
Transferrin*	X	X	X	X	Transferrin (28-311, cl30084)		Iron-binding & incorporation in the shell. Putative bactericidal substance (?)
	% cover.	50.1	59.7	36.2			
	AA/MW/	293 (316)/32.28/7.89					
Serine protease inhibitor/Elastase inhibitor-like	X	X	X	X	Serpin (1-99, pfam00079)		Protection against the degradation of the matrix
	% cover.	30.7	30.7	21.8			
	AA/MW/	101/11.07/4.74					
Matrilin/Collagen α-4 precursor (N-term)	X	X	X	X	vWF-type A (65-126, cd01450)		"Organizing" protein of the ECM. Interaction with other ECM proteins
	% cover.	19.6	19.6	9.8			
	AA/MW/	126/13.99/4.57					
Actin*	X	X	X	X	Actin (whole seq., PTZ00281)		Cytoskeletal - Filament formation
	% cover.	17.8	17.8	14.4			
	AA/MW/	376/41.78/5.29					
Uncharacterized (from <i>Ocropsus</i> )	X	X	X	X	SOUL heme-binding (57-224, pfam04832)		Interaction with heme, iron complexed in porphyrin ring
	% cover.	13.4	7.0	7.0			
	AA/MW/	284/31.59/7.72					
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B-like isoform*	X	X	X	X	Cyclophilin ABH-like (51-215, cd01926)		Cis-trans isomerization of Pro peptidic bonds. Regulates ECM proteins folding
	% cover.	3.4	3.4	3.4			
	AA/MW/	195 (232) 21.07/9.56					
α-2 macroglobulin (N-term fragment)	X	X	X	X	MG2 (72-119, pfam01835)		Stops or reduces the activity of endopeptidases
	% cover.	16.8	16.8	16.8			
	AA/MW/	119/13.40/9.24					
Collagen α-1 (XXI) (N-term fragment)	X	X	X	X	vWF-type A (41-120, pfam00092) Poly-T (130-147) in C-term		"Organizing" protein of the ECM. Interaction with other ECM proteins
	% cover.	22.5	9.0	9.0			
	AA/MW/	147/15.59/8.05					
Protein/Nucleic acid deglycase DJ-1	X	X	X	X	Type-1 glutamine aminotransferase (1-140, cd03135)		Precludes the formation of Maillard products. Redox sensitive chaperone
	% cover.	7.6	21.6	7.6			
	AA/MW/	157/16.38/9.19					
Histone H4-like*	X	X	X	X	Histone H4 (1-103, PIN00035)		If extracellular, involved in cell lysis may act as antimicrobial agent
	% cover.	9.7	9.7	17.4			
	AA/MW/	103/11.37/11.36					
Ubiquitin 40S ribosomal protein	X	X	X	X	Ubiquitin-like (23-98, cd01803) Ribosomal S27a (27-169, pfam01599) K-rich (100-121)		Conjugates to Lys residues of other proteins. Protein kinase activation, cell signaling
	% cover.	8.9	8.9	8.9			
	AA/MW/	179/20.85/9.65					

(continued on next page)

Table 6 (continued)

Protein hit * indicates complete sequences	Shell organic matrix extract				Functional domains and motifs (starting AA – final AA, domain accession number)	Putative function in biomineralization
	AIM1	AIM2	ASM1	ASM2		
Histone H2B gonadal-like	X	X	X	X	Histone H2B (39-127, smart00427) K-rich (17-38)	Immunity-related function when extracellular may act as antimicrobial peptide
% cover.		7.0		7.0		
AA/MW/	129/14.21/10.45					
<i>PI</i>						
Histone H3-like*	X	X	X	X	Histone H3 (1-136, PTZ00018)	Cadherin-binding. If extracellular, interacts with Toll-like receptors may act as antimicrobial agent
% cover.	5.0	5.0	5.0	5.0		
AA/MW/	136/15.33/11.27					
<i>PI</i>						
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B (partial)	X	X			Cyclophilin (3-124, cI00197)	Cis-trans isomerization of Pro peptidic bonds. Regulates ECM proteins folding
% cover.	17.0	17.0				
AA/MW/	141/15.34/8.97					
<i>PI</i>						
GLPR1-like protein 1, isoform X1 (fragment)	X	X			No identified domain	Unknown - Involved in defense mechanism (?). Highly similar to unknown <i>Ocupus</i> protein
% cover.	5.5	9.8				
AA/MW/	163/19.13/8.49					
<i>PI</i>						
Melanotransferrin/Transferrin (fragment)	X	X			Type 2 periplasmic binding fold (9-117, cI21456)	Fe-binding glycoprotein, controls the level of free Fe. Other putative functions (see transferrin)
% cover.	7.6	7.6				
AA/MW/	118/12.95/5.65					
<i>PI</i>						
Neurocalcin/hippocalcin-like/neuronal Ca sensor*	X	X			Homeodomain (5-34, smart00389) Ca-binding EF-hand (22-177, COG5126)	High affinity Ca-binding. Activation or inactivation of target proteins
% cover.	5.3	5.3				
AA/MW/	189/21.98/5.26					
<i>PI</i>						
Unhealthy ribosome biogenesis protein 2	X	X			No identified domain	Ribosome biogenesis - Unknown if extracellular
% cover.	3.9	3.9				
AA/MW/	180/20.31/5.20					
<i>PI</i>						
Collagen α-6 (N term)/Cartilage matrix protein*	X	X			vWF-type A (44-217, pfam00092) vWF-type A (243-397, smart00327)	Typical ECM protein, provides a scaffold. Organizes the matrix, binds to other ECM molecules
% cover.	3.6	3.6				
AA/MW/	389 (421)/44.02/8.14					
<i>PI</i>						
14-3-3 protein zeta/delta	X	X			14-3-3 protein (47-267, pfam00244)	Signal transduction pathway through phosphoprotein-binding
% cover.	3.5	3.5				
AA/MW/	284/32.14/5.21					
<i>PI</i>						
Chitinase/β-N-acetylhexosaminidase*	X	X			Carbohydrate-binding (13-160, pfam03173) Glycosylhydrolase 20 (198-322, pfam02838) Chitinase (773-850, pfam03174)	Polysaccharide binding - Chitin scaffold remodeling Oligosaccharide degradation
% cover.	2.6	2.6				
AA/MW/	860/98.40/5.38					
<i>PI</i>						
Lamin/Intermediate filament protein ifa1*	X	X			Intermediate filament (66-417, pfam00038) Lamin tail, Ig fold (465-569, pfam00932)	Nuclear/cytoplasmic protein. Possible binding of ECM proteins via lamin tail
% cover.	1.4	1.4				
AA/MW/	577/65.56/5.60					
<i>PI</i>						
Uncharacterized/Cys-rich secretory protein	X				Cap: Cys-rich secretory protein (42-103, cI00133)	GAG-binding
% cover.	10.3					
AA/MW/	106/12.28/8.06					
<i>PI</i>						
α-1-Tubulin (N term)	X				Tubulin α-chain (whole seq., cI30502)	Cytoskeletal protein. Unknown function if extracellular
% cover.	5.9					
AA/MW/	152/16.60/5.46					
<i>PI</i>						

(continued on next page)

Table 6 (continued)

Protein hit * indicates complete sequences	Shell organic matrix extract				Functional domains and motifs		Putative function in biomineralization
	AIM1	AIM2	ASMI	ASM2	(starting AA – final AA, domain accession number)		
Poly(U)-specific endoribonuclease-like isoform 3*	X				Somatostatin B (27-65, pfam01033) Endoribonuclease XendoU (82-335, pfam09412)	If extracellular, polysaccharide-binding (?). Metal ion-binding (?). Protease activity (?)	
	% cover. 4.8 AA/MW/ 316 (337)/35.75/9.68 PI						
Heparan sulfate gluco-samine sulfotransferase	X				Sulfotransferase (43-260, pfam00685)	Catalyzes the transfer of a sulfo group to glucosamine in heparan	
	% cover. 2.7 AA/MW/ 261/30.23/9.74 PI						
Alpha-N-acetyl-galactosaminidase-like*	X				$\alpha$ -galactosidase A (30-309, pfam16499) $\alpha$ -Galactosidase A (312-396, pfam17450)	Glycoside hydrolase (in glyco-lipids/-proteins)	
	% cover. 2.6 AA/MW/ 389 (411)/43.97/5.40 PI						
Elongation factor 1- $\alpha$ *	X				Elongation factor 1- $\alpha$ (1-454, PTZ00141)	Involved in protein translation - Binds actin. If extracellular, may regulate cell growth & immune response	
	% cover. 2.4 AA/MW/ 463/51.11/9.03 PI						
Methylmalonic aciduria & homocystinuria type C	X				MMACH type C (7-225, pfam16690)	Catalyzes the reductive dealkylation of cyanocobalamin - Binding of vitamin B12	
	% cover. 12.8 AA/MW/ 242/28.15/9.43 PI						
Ca-binding protein/Calmodulin-like (fragment)	X				Ca-binding EF hand (10-72, cl08302) Ca-binding EF hand (47-109, cl28895) Acidic C-term (80-111)	High affinity Ca-binding - Calcium cell signaling	
	% cover. 11.7 AA/MW/ 111/12.65/4.57 PI						
Galactin 3 binding protein (fragment)	X				Scavenger receptor Cys-rich (SRCR) (2-93, smart00202) - 6 Cys pattern	Involved in immunity (?)	
	% cover. 8.9 AA/MW/ 101/11.39/4.68 PI						
Chitin deacetylase-like 5 (C-term fragment)	X				Catalytic NodB homology domain of the carbohydrate esterases 4 (1-163, cl15692)	Deacetylation of O- and N-acetylated polysaccharides like chitin	
	% cover. 8.9 AA/MW/ 179/20.64/6.34 PI						
$\alpha$ -4 collagen-like (Ootropus) (fragment)	X				Poly-T (1-11) vWF type A (28-190, pfam00092)	Typical ECM protein. Interacts with other ECM proteins	
	% cover. 5.3 AA/MW/ 207/22.58/8.31 PI						
Moesin/Villin 2/Radixin *	X				FERM (203-299, cd13194) ERM (7-209, smart00295)	Actin-binding. Signaling pathway regulation	
	% cover. 4.6 AA/MW/ 583/68.82/5.76 PI						
UDP-glucuronic acid decarboxylase 1	X				DUF3573 (24-91, cl13524) UGD (95-398, cd05230)	Decarboxylation of UDP-glucuronic acid to UDP-xylose. Involved in ECM proteoglycan synthesis (?)	
	% cover. 4.1 AA/MW/ 417/47.79/9.42 PI						
Arginine kinase*	X				Arginine kinase (68-409, cd07932)	Phosphotransferase: conversion of ATP & arginine to ADP & phosphoarginine - If extracellular, binds to LPS	
	% cover. 2.4 AA/MW/ 409/46.24/8.57 PI						
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3	X				Eukaryotic translation initiation factor 2 $\gamma$ subunit (30-483, PTZ00327)	GTPase activity, GTP-binding, cadherin-binding. Regulation of the extracellular ERK pathway (?)	
	% cover. 1.6 AA/MW/ 489/53.26/8.84 PI						

(continued on next page)

Table 6 (continued)

Protein hit * indicates complete sequences	Shell organic matrix extract				Functional domains and motifs		Putative function in biomineralization
	AIM1	AIM2	ASMI	ASM2	(starting AA – final AA, domain accession number)		
Histone H2A*			X		Histone H2A (6-121, cl30550)		If extracellular, interaction with Toll-like receptors may act as antimicrobial agent
	% cover. AA/MW/ pI	128/13.42/10.58	7.0				
Elongation factor 1- $\alpha$ (fragment)	% cover. AA/MW/ pI	107/12.09/7.99		X 7.5	Elongation factor 1- $\alpha$ (whole seq., cl33168)		Same as above - If extracellular, may mediate cell growth & immune response

the matrix biochemical fingerprint, with a particular emphasis on sugars and protein content.

From a microstructural viewpoint, our investigation confirms that the shell wall is made of two layers, as previously suggested (Dauphin, 1976, 1977; Cuif et al., 1983). However, we do not recognize the homogeneous semi-prismatic pattern described by these authors. We rather describe the internal layer as a succession of block-like/irregular semi-prismatic structures, and the external tuberculated layer as a regular semi-prismatic unit. A thin blackish layer between the two previous units is observable, which has already been noticed (Dauphin, 1976, 1977) and described as purely organic by Cuif et al. (1983) after an enzymatic treatment.

We also observe the lamello-fibrillar microstructure of the septa, usually considered as a nacreous layer (Barskov, 1973; Bøggild, 1930; Dauphin, 1976; Mutvei, 1964). Macroscopically, the septa exhibit indeed iridescence properties. However, we feel that the “nacreous” terminology is misleading and we follow the assertion of Erben (1972) who claimed that the nacre of *Spirula* and other coleoids is rather a ‘false nacre’ and recommended the use of “lamello-fibrillar” terminology. This expression is entirely justified in view of a very recently published work (Lemanis et al., 2020), which precisely visualizes the substructures of the lamello-fibrillar layer, and describes it as the stacking of “thin lamellae that are themselves composed of aragonitic rods that tend to be parallel within a lamella.” The lamello-fibrillar terminology was also used by Fuchs et al. (2012) to describe the septal microstructure of ancestral spirulid coleoids. Two patterns are of particular importance: the insertion of the septa in the shell walls, and the presence of what resembles cameral deposit at the back of the insertion zone. The first one, although mentioned in earlier works (Bandel and Boletzky, 1979; Dauphin, 1976; Hoffmann et al., 2018), was neither fully described, nor schematized (Bandel and Boletzky, 1979). We confirm that the septa are sandwiched as a bevel in the internal wall. Such structures were also observed among the fossil relatives of *Spirula* (Doguzhaeva, 1996) and defined as “mural flap” (Fuchs et al., 2013): this character state may be an apomorphy of the Spirulida order. Given the thinness of the *S. spirula* shell, one can assume that a “sandwich” insertion considerably reinforces the overall shell mechanical properties and was consequently selected by evolution. However, Lemanis et al. (2020) question this hypothesis, demonstrating that mural flaps have “no notable structural function”. The second pattern - deposits in the dorsal septal corner and mentioned by Appellöf (1893), Bøggild (1930) and Dauphin (1976) – may evoke cameral deposits found in nautiloids (Mutvei, 2018). They are defined by different terminologies: “supraseptal annular ridges” (Mutvei, 1964), or “adapical ridge”, “mural ridge” and “septal ring” (Lemanis et al., 2020). Their function is also to increase the overall mechanical properties of the shell. However, their set-up appears enigmatic: as noted by Dauphin (1976) and confirmed by our observations, their microstructure is in continuity with the internal wall layer on which they lay. This suggests either a continuous growth from the internal wall, or an epitaxial growth after a growth stop between the secretion of the wall and that of the supraseptal annular ridges. The chronology of the different secretory steps of shell construction is not discussed further here.

Beside the microstructure overview, the biochemical characterization of the shell of *S. spirula* represents the core of the paper. To limit potential biases due to the geographical source of the samples, we performed our experiments on two batches of specimens from two spots, distant from each other (Canaries Islands, and Brazil). Our investigations revealed that the biochemical fingerprints do not depend on the geographical origin: there is no significant difference between the two batches, whatever technique used. From now, we will no longer consider the provenance of the specimens, but only focus on the biochemical signature.

After a superficial bleaching, the total shell matrix of *S. spirula* represents, in all our extractions, about 1% of the shell weight, a value that classifies it among the matrix-rich shells such as macro-prismatic

ones (Palmer, 1983, 1992). Similarly to these latter, a large proportion of the matrix is insoluble in acetic acid, representing around 70% of the organic content. A second thorough bleaching treatment decreases drastically the amount of matrix, in particular of the insoluble fraction. Following the criteria defined primarily by Crenshaw (Crenshaw, 1972), this obviously suggests that the shell matrix of *S. spirula* - including the soluble fraction - is predominantly intercrystalline and not protected by the mineral phase during the second bleaching step. Another argument in favor of an intercrystalline position of the matrix is the moderate capacity of the soluble fraction to interact with the *in vitro* precipitation of calcium carbonate and the absence of any sign of inhibition even at high matrix concentration (16 µg/well and higher, not shown), these two properties being often associated to acidic, *i.e.* Asprich intracrystalline proteins (Albeck et al., 1993). This suggests that most of the soluble fraction of *S. spirula* is not strongly bound to the mineral phase.

Our combined biochemical and physical investigations show that the saccharidic moieties constitute a notable fraction of the matrix. In particular, the FTIR spectra reveal high amplitude bands compared to those of proteinaceous moieties (amide), in both ASMs and AIMS. This finding is further substantiated by the SS-NMR spectra acquired for the AIM extracts which identify  $\beta$ -chitin and also additional polysaccharides that together constitute ~80% of the insoluble fraction. This percentage is higher than that indicated in earlier works, which found a protein/chitin ratio around two (Degens et al., 1967; Hunt and Nixon, 1981). However, this latter value is certainly overestimated (in favor of proteins) because these authors employed harsh hydrolytic conditions that have likely degraded a part of the saccharidic moieties. In our case, the abundance of chitin identified by SS-NMR confirms earlier findings based on monosaccharide analysis, which showed that both ASM and AIM are composed predominantly of the deacetylated form - due to hydrolytic conditions - of N-acetylglucosamine, the monomer of chitin (Dauphin and Marin, 1995). Such a composition where sugars predominate is rather unusual for matrices associated with mollusc shells: most of the works published so far on this type of materials tend to show that the saccharidic moieties are often much less abundant than the protein ones (Agbaje et al., 2018; Immel et al., 2016). Similarities of ASMs profiles with chitin, seen by FTIR, are also in agreement with the ELLA test, since the main chitin-binding lectins such as WGA, STL and LEL give the highest reactivity. The presence of chitin in ASMs may appear odd as this polymer is supposed to be particularly insoluble. This suggests different potential explanations that do not mutually exclude each other: 1. Soluble non-crossed-linked chitin may exist *per se* in the ASM, which would be rather unusual. 2. N-acetylglucosamine oligomers (that “mimic” chitin and are consequently targeted by chitin-binding lectins) are bound to soluble protein core. 3. From our discussion above, the chitin framework occupies an intercrystalline position in the biominerals; consequently, this framework is partly cleaved chemically in a random manner by sodium hypochlorite during the bleaching treatment, and then, released in solution during decalcification. Then, the cleaved fragments remain large enough not to be eliminated by subsequent ultrafiltration. It is interesting to notice that if chitin represents about 80% of the AIM, and that AIM itself accounts for about 70% of the whole matrix, this means that chitin represents between 50 and 60% of the matrix: in other words, this means that the matrix is more chitinous than proteinaceous. This character brings it close to the cuttlefish matrix (Stegemann, 1963), and consequently, to the Sepiidae.

Both insoluble extracts, AIM1 and AIM2, of *S. spirula* show phosphorus content that is inferred as being an integral part of the proteinaceous content most commonly through phosphorylation of the abundant tyrosine and/or serine sidechains (13% as shown above). We therefore propose that the P-signals we have found, both via IR and SS-NMR, are likely associated with post-translationally modified amino acids. While phosphates in general, and phosphorylation in particular, are implicated in regulation of biomineralization, their exact identity

and role herein, remain to be studied (Brauer and Sykes, 1984; Lowenstam, 1981; Sviben et al., 2016).

To investigate further the biochemical fingerprint of the matrix, we performed proteomics followed by two *in silico* investigations: one based on NCBI search on heterologous metazoan models, the second one, on the recently acquired transcriptome of *Spirula spirula*. The first approach identified around 200 peptides, from 7 to 30 residues long, but no complete protein sequences. We are fully aware that this relatively small number of peptides - although very informative - gives a very partial picture of its shell proteome and that this picture may be biased. For example, among all the identified peptides - regardless of the matrix extract - the hydrophobic amino acid residues are predominantly represented in our analysis, a property often encountered in mollusc shell matrices (Marin et al., 2008). However, in the single bulk amino acid analysis published so far on the shell matrix of *S. spirula* (Degens et al., 1967), glutamic acid, serine and aspartic acid are more abundant than glycine, alanine and leucine. It has to be noted that the two sets of data cannot be directly compared for several reasons: one of them is that Degens and coworkers analysed only the insoluble matrix, obtained after a harsh decalcification with a mixture of HCl/TCA followed by 6 N hydrochloric acid hydrolysis.

Other technical biases, not discussed here, may hamper the interpretation of the proteomic results (see Marin et al., 2016 for more details). Interestingly, the number of identified peptides significantly increased between ASM1 and ASM2. Similarly to what likely happens to chitin during the second bleaching treatment, we suggest that insoluble proteins are randomly cleaved by sodium hypochlorite and consequently, partly solubilized, becoming components of the ASM2 fraction. In total, the overall peptides lead to the identification of 91 protein hits, which constitutes a low score, given the number of peptides. In any event, the peptides recognized several interesting hits, namely specific enzymes, such as tyrosinase, chitinase and serine protease, which constitute a part of the molecular toolkit frequently found in shell matrices (Marie et al., 2012; Marin et al., 2014). Tyrosinase is thought to be biomineralization-linked by being involved either in the melanin biosynthesis or in the periostracum formation (Arivalagan et al., 2016; Nagai et al., 2007; Zhang et al., 2006), while chitinase and serine protease are associated to organic matrix remodeling (Marin et al., 2016; Yonezawa et al., 2016). We also identified a set of sequences that can be related to non-molluscan calcium-binding proteins, with either EF-hand, or EGF-like domains, both belonging to the “high-affinity - low capacity” category. Among the unexpected hits, one finds actin, the main cytoskeletal protein, and histone, a nuclear protein. The actin identified here is identical to that found in the cephalopods *Idiosepius paradoxus* and *Octopus vulgaris*. The significance of the presence of actin and histone in a shell matrix is discussed below. We also found the putative presence of IgG-Fc binding protein, a candidate that binds immunoglobulins, and which is involved in immune protection (Arivalagan et al., 2016; Harada et al., 1997). We did not detect proteins that exhibit Low Complexity Domains (LCDs) or Repetitive Low Complexity Domains (RLCDs) such as aspartic acid-rich proteins, with one exception: a peptide matching with a hypothetical protein from *Helobdella robusta* (Californian leech) that exhibits a very large C-terminal region composed of D-rich Low Complexity repeats.

The second approach we employed, based on the *S. spirula* transcriptome, generated another set of proteins: some of them, like actin, histones or calcium-binding, confirmed the hits found with MASCOT against the “other metazoans” database. Others, not identified before, are relevant in the context of biomineralization. Among the protein list shared with the four extracts, one finds the highly covered transferrin, a serine protease inhibitor, a matrilin and a peptidyl prolyl cis-trans isomerase B-like, in addition to actin and to an unknown protein with a heme-binding domain. Transferrin is a ferritic-ion-binding glycoprotein that controls the level of free iron in biological fluids and its activation requires the presence of an anion, preferably carbonate  $\text{CO}_3^{2-}$ . At first sight, transferrin might be involved in the incorporation of iron in the

shell. However, its presence in the organic matrix may appear odd and the link between iron and calcium carbonate is rather tenuous. Indeed, unpublished data on the iron content of *Spirula spirula* shell (Y. Dauphin, pers. comm.) show that the different shell layers contain between 67 and 110 ppm of this element, values that do not reflect any exceptional enrichment and fall in the range of most aragonitic mollusc shells (Masuda & Hirano, 1980). We may consequently have to infer other functions than “iron incorporation” and transferrin might be also considered as a carbonate transporter. Interestingly, transferrin has been identified in the biomineral-associated matrices of two other calcifying systems: the cichlid fish otolith (Weigle et al., 2016) and the hen's eggshell (Nys et al., 1999). In the first model, a true transferrin has been clearly identified, together with a transferrin domain-containing protein, OMP-1 (otolith matrix protein-1). It was suggested, without any experimental evidence, that transferrin is associated to the occurrence of ferric ions in the otolith, and to the presence of magnetite particles that are geomagnetic sensors. In the second model, transferrin is suspected to be multifunctional, by interacting with the formation of calcium carbonate and by playing a role in natural immunity (Giansanti et al., 2012). It is also suspected to act as a strong antimicrobial substance, by depriving bacteria of iron (Gautron, personal comm.). It is to note that beside the full-length transferrin present in the four extracts, we also identified a shortened variant of this protein present only in the two AIMs. The two transferrin sequences are 48% identical (69% similar) and may display different functions. In addition to transferrins, we detected in the four extracts a nameless protein (covered at 7 to 13%) with a SOUL heme-binding domain (pfam04832) which putatively complexes iron. This protein is 45% identical to an unknown protein (NCBI reference sequence XP\_014780085.1) from the octopus *Octopus bimaculoides*. To broaden the circle of the relation between iron and biomineralization to other mollusc models, one may mention another protein with analogous functions, *i.e.*, iron binding and storage: ferritin; ferritin was reported to be involved in shell formation of the pearl oyster *Pinctada fucata* but its function was not elucidated (Zhang et al., 2003). All these arguments combined together emphasize the underestimated - but not yet understood - role of iron in calcium carbonate biomineralization.

The elastase inhibitor-like isoform is a member of the SERPIN family (SERine Proteinase INhibitor), a large group of proteins that inhibit the activity of hydrolytic enzymes, such as elastase or cathepsin G. In the last decade, members of this protein family have been recurrently detected as major components of the matrices of multiple calcified tissues, including mollusc shell (Calvo-Iglesias et al., 2017; Marie et al., 2010; Marin et al., 2014). Although their molecular activity has never been firmly tested *in vitro*, protease inhibitors are usually believed to be part of a protective system that prevents the degradation of the calcifying matrix during mineral deposition, by proteolytic enzymes. More generally, they may also be involved in immune functions.

Third candidate of interest, matrilin is an acidic (theoretical pI 4.57) proteoglycan-associated protein and a major component of extracellular matrices (ECM) of various tissues. It comprises a von Willebrand type A domain (vWF-type A, simplified in VWA), commonly found in extracellular matrix proteins. This domain can bind several proteins of the ECM and is involved in cell adhesion (Whittaker and Hynes, 2002). It has been identified in diverse molluscan shell matrix proteins such as PIF (Suzuki et al., 2009) and many others (Arivalagan et al., 2016; Feng et al., 2017). In vertebrate calcified tissues, the VWA-containing matrilin is thought to act as an “organizing” protein of the ECM (Fresquet et al., 2010). In particular, it mediates interactions between collagens and proteoglycans. Its multiple functions are related to its ability to form filaments (Klatt et al., 2000). It is interesting to note that our analysis identified three other VWA domain-containing proteins that exhibit high similarity with diverse  $\alpha$ -collagens.

The identified peptidyl prolyl *cis*-*trans* isomerase B-like is an enzyme that exhibits a cyclophilin domain, which regulates protein folding by catalysing the *cis*-*trans* isomerization of proline imidic

peptidic bonds. It has been shown to be involved in collagen maturation in general, but, more specifically, in the maturation of the tooth extracellular matrix during development in murine model (Pandya et al., 2017). Interestingly, in the shell matrix of *S. spirula*, beside the full-length member, we detected a shortened version of peptidyl prolyl *cis*-*trans* isomerase B, with a reasonably good 17% peptidic coverage, and corresponding to 60% of the C-terminus of the first sequence. This fragment is not identical but a variant that exhibits 75% identity (and 89% similarity) with the complete form. Curiously, while the latter is present in the four extracts, the short variant has been detected only in the two AIMs, which suggests that it is cross-linked with other matrix components.

In the protein set identified in three, two or one extracts, some other hits are relevant in the biomineralization context. Our biochemical characterization underlines the quantitative importance of the carbohydrate moieties, in particular of chitin. Consequently, the proteomic analysis evidences logically enzymes that are involved, near or far, in the assembly, degradation and modification of extracellular saccharides, and more specifically, in the remodeling of the chitin scaffold: they include chitobiase, heparan sulfate glucosamine sulfotransferase, N-acetyl-galactosaminidase, chitin-deacetylase and UDP-glucuronic acid decarboxylase. They are accompanied by a set of putative carbohydrate-binding proteins, like the Cys-rich secretory protein. The case of deglycase is interesting since this enzyme, identified in three extracts on four, is thought to prevent the formation of Maillard products, *i.e.*, the reaction between sugars and amino acids. Thus, deglycase can be placed in the category of saccharide-interacting enzymes.

Other candidates of importance are the two calcium-binding proteins. Both are acidic (theoretical pI 4.57 and 5.26, respectively) and exhibit the typical EF-hand motif that binds calcium ions with high affinity. These proteins have been often identified in calcium carbonate associated matrices (Feng et al., 2017). They are thought to be part of the extracellular signaling machinery, rather than being involved in crystal nucleation or calcium ion transport for mineralization, a function that is usually attributed to low affinity - high capacity calcium-binding proteins, such as the aspartic acid-rich proteins, not detected here (Marin et al., 2008).

In Table 6, we identified a series of proteins that are not supposed to be present in the extracellular matrix since they are normally localized in the cytoplasmic or in the nucleus. The first ones include in particular cytoskeletal proteins, such as actin or tubulin, and other cytoplasmic partners that bind them, like elongation factors (actin-binding) or moesin/radixin. Nuclear proteins are represented by different histones (H2A, H2B, H3, H4) and lamin. For cytoskeletal proteins, we cannot exclude that these proteins are all cellular contaminants, in spite of the thorough cleaning of the skeletal tissues by sodium hypochlorite. We cannot rule out neither that a tight link exists between these proteins and the extracellular matrix, several evidences show it, in particular when vesicles are involved in the process: actin was found to be a component of ECM (Accinni et al., 1983); in cartilage, it is associated to ECM in mineralizing/demineralizing vesicles (Holliday et al., 2020; Rosenthal et al., 2011). In molluscs, Weiss and coworkers evidenced the relationship between the cytoskeletal forces and the shell forming matrix (Weiss et al., 2006), a concept that can be extended to other calcifying systems (Tyszkla et al., 2019). For histones, the identification of these very basic (lysine-rich) proteins in a calcium carbonate-associated matrix is not new. It is generally believed that histones or histone-derived peptides may function as antimicrobial agents. This hypothesis has been repeatedly evoked for the eggshell matrix (Réhault-Godbert et al., 2011) and somehow confirmed in another model: Molluskin, an antimicrobial peptide identified in several molluscs, was found to derive from histone H2A (Sathyan et al., 2012). Clearly, the presence of nuclear or cytoplasmic proteins in the calcifying extracellular matrix needs to be reevaluated and explained accurately.

To summarize, the shell matrix of *Spirula spirula*, as seen by the MASCOT analysis of the protein-translated transcriptome of *Spirula*

*spirula*, contains numerous molecular actors, including a minimum of 11 true enzymes and 28 proteins of very different functions. All these 39 members can be categorized as follows: extracellular matrix proteins (matrilin, collagen-like) together with ECM-binding partners and ECM-interacting enzymes (like cis–trans isomerase) required for ECM protein folding and activation; a set of enzymes that regulate, modify and remodel the saccharidic moieties (chitin deacetylase, N-acetylgalactosaminidase...) together with saccharide-binding proteins that are not enzymes; a set of cytoskeletal proteins (actin, lamin, tubulin) that function in extracellular environment together with their binding partners (elongation factor, moesin). The system includes also proteins involved in cell signaling (14–3-3 protein zeta, ubiquitin, protein with MMACH domain...) and calcium-binding proteins (hippocalcin-like, calmodulin-like). The system possesses also its protective functions at molecular and cellular levels, respectively: at molecular level, these are protease inhibitors on the one hand, and, at cellular level, putative bactericidal factors (histones?), immunity-related proteins and possibly proteins that bind iron, on the other hand. Finally, the system contains a set of proteins of totally unknown functions, as exemplified by the unhealthy ribosome biogenesis protein 2 and GLIPR1 protein 1.

Are notably absent from this molecular landscape the following candidates usually found in skeletal matrices: carbonic anhydrase and low complexity domain containing proteins. Carbonic anhydrase (CA) is a key-enzyme in calcium carbonate biomineralization. It reversibly catalyzes the conversion of CO<sub>2</sub> to bicarbonate. In the protein-translated transcriptome of *S. spirula*, we identified three CA sequences, which possess tryptic cleavage sites (data not shown) of which no peptide is present in the matrix proteomic results. This is a strong indication that CA is not incorporated as a shell matrix protein in the Ram's Horn model. This conclusion confirms earlier finding on the shell matrix of the abalone *Haliotis tuberculata* (Le Roy et al., 2014) and shows that CA, depending on the mollusc model, is or is not a shell matrix protein. The other absent players of the list are proteins that contain low complexity domains or repetitive low complexity domains. In calcium carbonate biomineralization, these domains can be of several types, the most known being the acidic, aspartic acid-rich ones, and the hydrophobic “alanine/glycine-rich” domains (Marin et al., 2016). We admit that their underrepresentation in the protein list may be due to technical bias, such domains having few or no trypsin cleavage sites. Clearly, the absence of peptides exhibiting low complexity sequences does not mean that the corresponding proteins are absent from the shell forming-machinery: a separate analysis of the proteome-translated transcriptome (not shown) reveals putative candidates, which - for an unknown reason - are either not seen by the analysis or not incorporated to the matrix.

From an evolutionary viewpoint, it is puzzling that most of the peptides obtained do not exhibit any similarity with already known molluscan shell proteins. Among the few hits with molluscan proteins, the majority belongs to a bivalve, the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (5 hits in total), while there are only two hits with a cephalopod, the common octopus *Octopus vulgaris*. A comparison of our peptide list with already published data on *Sepia* (Čadež et al., 2017; Le Pabic et al., 2017) and *Nautilus* (Marie et al., 2011, 2009) did not reveal any similarity. When compared with the complete transcriptome of *Octopus bimaculoides* (Albertin et al., 2015) our peptide dataset contains few hits, mainly with actin-like proteins (3 hits, exhibited by all the extract of the organic matrix of *Spirula spirula*) and H4 histones (9 hits in total, only with the ASM2 extract).

Such a paucity of hits with already studied cephalopods is intriguing but may be related to the uncertainty about the phylogenetic position of *Spirula* and to its unique evolutionary history, i.e., its relative evolutionary remoteness from other members of this mollusc class: indeed, within Decabrachia, the placement of the order Spirulida has historically been contentious (reviewed within Lindgren and Anderson, 2018). On the one hand, early phylogenetic studies based on a small number of genes proposed that *Spirula* occupies either a basal position relative to

other Decabrachia (Allcock et al., 2011; Warnke et al., 2003) or that a sister taxa relationship exists between the two families Spirulidae and Sepiidae (Strugnell et al., 2005). These views are congruent with morphological characters such as a well-developed shell with chambers and septa. On the other hand, recent studies, including those based on more comprehensive molecular datasets, have recovered a sister taxon relationship between Spirulida and a clade containing Oegopsida ('open eyed' squids) and Bathyteuthoidea (mesopelagic to bathopelagic squids) (Lindgren et al., 2012; Strugnell et al., 2017). Similarly, Tanner et al. (2017) reported a sister taxon relationship between spirulid and oegopsid squids. Although these authors did not include bathyteuthoid squids in their analyses, a close phylogenetic relationship between bathyteuthoids and oegopsids is well established (e.g. Lindgren et al., 2012; Strugnell et al., 2005). Recent divergence time estimates, incorporating molecular and fossil data, suggest that spirulids and oegopsids diverged around 128 Ma (Tanner et al., 2017), which accords with the appearance of stem group spirulids in the latest Cretaceous (~66–72 Ma) (Fuchs et al., 2012).

The absence of any similarity with *Nautilus* is not surprising, considering the deep divergence time between the subclasses Nautiloidea (*Nautilus*) and Coleoidea (octopus, cuttlefishes and squids) (~416 ± 60 Ma, Kröger et al., 2011). In addition, our study suggests that *Spirula* and *Sepia* have completely different molecular tools to construct their shell. This result is also not surprising. Sepiids and spirulids both possess an internal calcareous shell with a phragmocone and, as a result, they have extensive fossil records in comparison to other extant decabrachian lineages that have lost their shell (i.e., oegopsids, myopsids). The phragmocone is a plesiomorphic character within cephalopods and, therefore, the fact that it is present within sepids and spirulids does not indicate that these lineages are closely related. In support of this, several recent phylogenetic studies have recovered a sister taxon relationship between sepids and all remaining decabrachians (including spirulids) (Strugnell et al., 2017; Tanner et al., 2017; Uribe and Zardoya, 2017) with divergence of these two clades estimated to have occurred in the mid Jurassic (Tanner et al., 2017) or in the early Cretaceous (Uribe and Zardoya, 2017). This lapse of time is long enough to allow the independent evolution of the organic matrix proteins: recent findings suggest indeed that several skeletal matrix proteins exhibit a fast evolution rate (Jackson et al., 2006; McDougall et al., 2013). However, a rapid evolution of matrix components is not incompatible with the occurrence of very conservative characters, such as the abundance of chitin or the overall morphological similarities (septate inner shell, for example). The modern phylogenetic view of coleoids positions the Spirulida order as a sister group of the non-calcifying oegopsids: it will be relevant to determine how the molecular functions of the biomineralizing proteins of *Spirula* have evolved in their non-mineralizing counterparts.

#### Authors contribution

M. O. conducted the biochemical/structural characterization under the guidance of F. M.; L. P. performed FTIR spectroscopy, C. B., proteomic analyses, I. B. S. and A. S., SS-NMR characterization. J. M. S., R. H., P. N. and A. L. provided samples. J. M. S. provided transcriptomic data. M. O., F. M., and P. N. wrote the manuscript with inputs from A. S., L. P and J. M. S.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgements

The authors thank 3P5 proteomic platform (University of Paris, Cochin Institute, INSERM U1016, CNRS UMR8104, Paris). They also thank both Emmanuel Fara and Arnaud Brayard (UMR 6282 Biogéosciences, Dijon) for their valuable comments and advices, and two anonymous reviewers who contributed to improve the manuscript. At last, F. M. and M. O. thank Yannicke Dauphin (UMR CNRS 7205 ISYEB, MNHN, Paris) for providing minor element data on the shell of *S. spirula*. The work of M. Oudot, P. Neige and F. Marin was supported mostly by annual recurrent CNRS funding of UMR Biogéosciences. Complementary funding included CNRS-INTERRIVE project 'BECOME FREE' (F. Marin, 2019). The contribution of I. Ben Shir and A. Schmidt was supported by the Israel Science Foundation grant 2001/17.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2020.107507>.

## References

- Accinni, L., Natali, P.G., Silvestrini, M., De Martino, C., 1983. Actin in the extracellular matrix of smooth muscle cells. An immunoelectron microscopic study. *Conn. Tiss. Res.* 11, 69–78.
- Agbaje, O.B.A., Ben Shir, I., Zax, D.B., Schmidt, A., Jacob, D.E., 2018. Biomacromolecules within bivalve shells: is chitin abundant? *Acta Biomater.* 80, 176–187. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.09.009>.
- Albeck, S., Aizenberg, J., Addadi, L., Weiner, S., 1993. Interactions of various skeletal intracrystalline components with calcite crystals. *J. Am. Chem. Soc.* 115, 11691–11697. <https://doi.org/10.1021/ja00078a005>.
- Albertin, C.B., Simakov, O., Mitros, T., Wang, Z.Y., Pungor, J.R., Edsinger-Gonzales, E., Brenner, S., Ragsdale, C.W., Rokhsar, D.S., 2015. The octopus genome and the evolution of cephalopod neural and morphological novelties. *Nature* 524, 220–224. <https://doi.org/10.1038/nature14668>.
- Allcock, A.L., Cooke, I.R., Strugnell, J.M., 2011. What can the mitochondrial genome reveal about higher-level phylogeny of the molluscan class Cephalopoda? *Zool. J. Linn. Soc.* 161, 573–586. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2010.00656.x>.
- Appelöf, A., 1893. Die schalen von Sepia, Spirula und Nautilus: Studien über den Bau und das Wachstum. *K. Sven. Vetensk.Akad. Handl.*, Stock. 25, 1–106.
- Arivalagan, J., Yarra, T., Marie, B., Sleight, V.A., Duvernois-Berthet, E., Clark, M.S., Marie, A., Berland, S., 2016. Insights from the shell proteome: Biomineralization to adaptation. *Mol. Biol. Evol.* 34, 66–77. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw219>.
- Balmain, J., Hannyoyer, B., Lopez, E., 1999. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and X-ray diffraction analyses and organic matrix during heating of mother of pearl (nacre) from the shell of the mollusk *Pinctada maxima*. *J. Biomed. Mater. Res.* 48, 749–754.
- Bandel, K., Boletzky, S., 1979. A comparative study of the structure, development and morphological relationships of chambered cephalopod shells. *Veliger* 21, 313–354.
- Barskov, S., 1973. Microstructure of the skeletal layers of *Sepia* and *Spirula* compared with the shell layers of other mollusks. *J. Paleontol.* 3, 285–294.
- Bennett, A.E., Rienstra, C.M., Auger, M., Lakshmi, K.V., Griffin, R.G., 1995. Heteronuclear decoupling in rotating solids. *J. Chem. Phys.* 103, 6951–6958. <https://doi.org/10.1063/1.470372>.
- Bøggild, O.B., 1930. The shell structure of the mollusks. *K. Dan. Vidensk. Selsk. Skr. Naturvidensk. Math. Afd.* 9, 231–326.
- Bouchet, P., Bary, S., Héros, V., Marani, G., 2016. How many species of molluscs are there in the world's oceans, and who is going to describe them? *Mém. Mus. Natl. Hist. Nat.* 208, 9–24.
- Brauer, M., Sykes, B.D., 1984. Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies of phosphorylated proteins. *Method. Enzymol.* 107, 36–81. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(84\)07005-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(84)07005-1).
- Brayard, A., Escarguel, G., Bucher, H., Monnet, C., Brühwiler, T., Goudemand, N., Galfetti, T., Guex, J., 2009. Good genes and good luck: ammonoid diversity and the end-permian mass extinction. *Science* 325, 1118–1121. <https://doi.org/10.1126/science.1174638>.
- Brock, G., Paterson, J., 2004. A new species of *Tannuella* (Helcionellida, Mollusca) from the early Cambrian of South Australia. *Assoc. Australas. Palaeontol. Mem.* 30, 133–143.
- Bruun, A., 1943. The biology of *Spirula spirula* (L.). *Dana Rep.* 24, 1–46.
- Čadež, V., Škapin, S.D., Leonardi, A., Križaj, I., Kazazić, S., Salopek-Sondi, B., Sondi, I., 2017. Formation and morphogenesis of a cuttlebone's aragonite biomineral structures for the common cuttlefish (*Sepia officinalis*) on the nanoscale: revisited. *J. Colloid Interface Sci.* 508, 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.08.028>.
- Calvo-Iglesias, J., Pérez-Estévez, D., González-Fernández, Á., 2017. MSP22.8 is a protease inhibitor-like protein involved in shell mineralization in the edible mussel *Mytilus galloprovincialis*. *FEBS Open Bio* 7, 1539–1556. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12286>.
- Campbell, K., MacLennan, D., Jorgensen, A.O., 1983. Staining of the Ca<sup>2+</sup>-binding proteins, calsequestrin, calmodulin, troponin C, and S-100, with the cationic cyanine dye “Stains-all”. *J. Biol. Chem.* 258, 11267–11273.
- Checa, A.G., 2018. Physical and biological determinants of the fabrication of molluscan shell microstructures. *Front. Mar. Sci.* 5, 353. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00353>.
- Clarke, M.R., 1970. Growth and development of *Spirula spirula*. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 50, 53–64. <https://doi.org/10.1017/S00253154000059X>.
- Crenshaw, M.A., 1972. The soluble matrix from *Mercenaria mercenaria* shell. *Biomineralization* 6, 6–11.
- Cuif, J., Dauphin, Y., Denis, A., Gaspard, D., Keller, J., 1983. Etude des caractéristiques de la phase minérale dans les structures prismatiques du test de quelques mollusques. *Bull. Mus. Natl. Hist. Nat. Paris Sect. A. Zool. Biol. Ecol. Anim.* 5, 679–717.
- 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, 525–529. <https://doi.org/10.1007/BF00353265>.
- Dauphin, Y., 1977. Microstructure et flottabilité chez la spirule (Cephalopoda). *C. R. Acad. Sci. Paris D* 284, 2483–2485.
- Dauphin, Y., 1976. Microstructure des coquilles de céphalopodes. I. *Spirula spirula* L. (Dibranchiata, Decapoda). *Bull. Mus. Natl. Hist. Nat. 3ème série, n° 382, Sci. Terre* 54, 197–238.
- Dauphin, Y., Marin, F., 1995. The compositional analysis of recent cephalopod shell carbohydrates by Fourier transform infrared spectrometry and high performance anion exchange-pulsed amperometric detection. *Experientia* 51, 278–283. <https://doi.org/10.1007/BF01931112>.
- Degens, E.T., Spencer, D.W., Parker, R.H., 1967. Paleobiology of molluscan shell proteins. *Comp. Biochem. Physiol.* 20, 553–579. [https://doi.org/10.1016/0010-4066\(67\)90269-1](https://doi.org/10.1016/0010-4066(67)90269-1).
- Doguzhaeva, L., 1996. Two early Cretaceous spirulid coleoids of the north-western Caucasus: their shell ultrastructure and evolutionary implications. *Palaeontology* 39, 681–707.
- Erben, H.K., 1972. Über die Bildung und das Wachstum von Perlmutter. *Biomineralization* 4, 15–46.
- Feng, D., Li, Q., Yu, H., Kong, L., Du, S., 2017. Identification of conserved proteins from diverse shell matrix proteome in *Crassostrea gigas*: characterization of genetic bases regulating shell formation. *Sci. Rep.* 7, 45754. <https://doi.org/10.1038/srep45754>.
- Fresquet, M., Jowitt, T.A., Stephen, L.A., Ylöstalo, J., Briggs, M.D., 2010. Structural and functional investigations of Matrilin-1 A-domains reveal insights into their role in cartilage ECM assembly. *J. Biol. Chem.* 285, 34048–34061. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.154443>.
- Fuchs, D., Iba, Y., Ifrim, C., Nishimura, T., Kennedy, W.J., Keupp, H., Stinnesbeck, W., Tanabe, K., 2013. *Longibelus* gen. nov., a new Cretaceous coleoid genus linking Belemnoidea and early Decabrachia. *Palaeontology* 56, 1081–1106. <https://doi.org/10.1111/pala.12036>.
- Fuchs, D., Keupp, H., Trask, P., Tanabe, K., 2012. Taxonomy, morphology and phylogeny of Late Cretaceous spirulid coleoids (Cephalopoda) from Greenland and Canada. *Palaeontology* 55, 285–303. <https://doi.org/10.1111/j.1475-4983.2011.01125.x>.
- Giansanti, F., Leboffe, L., Pitari, G., Ippoliti, R., Antonini, G., 2012. Physiological roles of ovotransferrin. *Biochim. Biophys. Acta* 1820, 218–225. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.08.004>.
- Grabherr, M.G., Haas, B.J., Yassour, M., Levin, J.Z., Thompson, D.A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., Di Palma, F., Birren, B.W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., Friedman, N., Regev, A., 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat. Biotechnol.* 29, 644–652. <https://doi.org/10.1038/nbt.1883>.
- Harada, N., Iijima, S., Kobayashi, K., Yoshida, T., Brown, W.R., Hibi, T., Oshima, A., Morikawa, M., 1997. Human IgGfC binding protein (FcγBP) in colonic epithelial cells exhibits mucin-like structure. *J. Biol. Chem.* 272, 15232–15241. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.24.15232>.
- Hare, P.E., 1963. Amino acids in the proteins from aragonite and calcite in the shells of *Mytilus californianus*. *Science* 139, 216–217.
- Haring, E., Kruckenhauser, L., Lukeneder, A., 2012. New DNA sequence data on the enigmatic *Spirula spirula* (Linnaeus, 1758) (Decabrachia, suborder Spirulina). *Ann. Naturhist. Mus. Wien. Ser. B Bot. Zool.* 113, 37–48.
- Hoffmann, R., Lemanis, R.E., Wulff, L., Zachow, S., Lukeneder, A., Klug, C., Keupp, H., 2018. Traumatic events in the life of the deep-sea cephalopod mollusc, the coleoid *Spirula spirula*. *Deep. Res. Part I Oceanogr. Ser. Pap.* 142, 127–144. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2018.10.007>.
- Holliday, L.S., De Faria, L.P., Rody, W.J., 2020. Actin and actin-associated proteins in extracellular vesicles shed by osteoclasts. *Int. J. Mol. Sci.* 21, art. numb. 158. <https://doi.org/10.3390/ijms21010158>.
- Hunt, S., Nixon, M., 1981. A comparative study of protein composition in the chitin-protein complexes of the beak, pen, sucker disc, radula and oesophageal cuticle of cephalopods. *Comp. Biochem. Physiol.* 68 B, 535–546. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(81\)90071-7](https://doi.org/10.1016/0305-0491(81)90071-7).
- Immel, F., Broussard, C., Catherinet, B., Plasseraud, L., Alcaraz, G., Bundeleva, I., Marin, F., 2016. The shell of the invasive bivalve species *Dreissena polymorpha*: biochemical, elemental and textural investigations. *PLoS One* 11, 1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154264>.
- Jackson, D.J., McDougall, C., Green, K., Simpson, F., Wörheide, G., Degnan, B.M., 2006. A rapidly evolving secretome builds and patterns a sea shell. *BMC Biol.* 4, art. numb. 40. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-4-40>.
- Jang, M.-K., Kong, B.-G., Jeong, Y.-I., Lee, C.H., Nah, J.-W., 2004. Physicochemical characterization of α-chitin, β-chitin, and γ-chitin separated from natural resources. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 42, 3423–3432. <https://doi.org/10.1002/pola.20176>.
- Jastrzbski, W., Sitarz, M., Rokita, M., Bułat, K., 2011. Infrared spectroscopy of different

- phosphates structures. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 79, 722–727. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2010.08.044>.
- Kanold, J., Guichard, N., Immel, F., Plasseraud, L., Corneillat, M., Alcaraz, G., Brümmer, F., Marin, F., 2015. Spine and test skeletal matrices of the Mediterranean sea urchin *Arbacia lixula* - a comparative characterization of their sugar signature. *FEBS J.* 282, 1891–1905. <https://doi.org/10.1111/febs.13242>.
- Kaya, M., Baran, T., Mentas, A., Asaroglu, M., Sezen, G., Tozak, K.O., 2014. Extraction and characterization of  $\alpha$ -chitin and chitosan from six different aquatic invertebrates. *Food Biophys.* 9, 145–157.
- Kaya, M., Mujtaba, M., Ehrlich, H., Salaberria, A.M., Baran, T., Amemiya, C.T., Galli, R., Akyuz, L., Sargin, I., Labidi, J., 2017. On chemistry of  $\gamma$ -chitin. *Carbohydr. Polym.* 176, 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.076>.
- Klatt, R.A., Nitsche, P., Kobbe, B., Mörgelin, M., Paulsson, M., Wagener, R., 2000. Molecular structure and tissue distribution of matrilin-3, a filament-forming extracellular matrix protein expressed during skeletal development. *J. Biol. Chem.* 275, 3999–4006.
- Klug, C., Landman, N.H., Fuchs, D., Mapes, R.H., Pohle, A., Guériau, P., Reguer, S., Hoffmann, R., 2019. Anatomy and evolution of the first Coleoidea in the Carboniferous. *Commun. Biol.* 2, art. number 280. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0523-2>.
- Kong, J., Yu, S., 2007. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 39, 549–559.
- Kröger, B., Vinther, J., Fuchs, D., 2011. Cephalopod origin and evolution: a congruent picture emerging from fossils, development and molecules: Extant cephalopods are younger than previously realised and were under major selection to become agile, shell-less predators. *BioEssays* 33, 602–613. <https://doi.org/10.1002/bies.201100001>.
- Lemanis, R., Stier, D., Zlotnikov, I., Zaslansky, P., Fuchs, D., 2020. The role of mural mechanics on cephalopod palaeoecology. *J. R. Soc. Interface* 17, 20200009. <https://doi.org/10.1098/rsif.2020.0009>.
- Le Pabic, C., Marie, A., Marie, B., Percot, A., Bonnaud-Ponticelli, L., Lopez, P.J., Luquet, G., 2017. First proteomic analyses of the dorsal and ventral parts of the *Septia officinalis* cuttlebone. *J. Proteom.* 150, 63–73. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.08.015>.
- Le Roy, N., Jackson, D.J., Marie, B., Ramos-Silva, P., Marin, F., 2014. The evolution of metazoan alpha-carbonic anhydrases and their roles in CaCO<sub>3</sub> biomineralization. *Front. Zool.* 11, art. numb. 75. <https://doi.org/10.1186/s12983-014-0075-8>.
- Lindgren, A.R., Anderson, F.E., 2018. Assessing the utility of transcriptome data for inferring phylogenetic relationships among coleoid cephalopods. *Mol. Phylogenet. Evol.* 118, 330–342. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.10.004>.
- Lindgren, A.R., Pankey, M.S., Hochberg, F.G., Oakley, T.H., 2012. A multi-gene phylogeny of Cephalopoda supports convergent morphological evolution in association with multiple habitat shifts in the marine environment. *BMC Evol. Biol.* 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-129>.
- Lowenstam, H.A., 1981. Minerals formed by organisms. *Science* 211, 1126–1131. <https://doi.org/10.1126/science.7008198>.
- Lu, S., Wang, J., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., Geer, R.C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., Hurwitz, D.I., Marchler, G.H., Song, J.S., Thanki, N., Yamashita, R.A., Yang, M., Zhang, D., Zheng, C., Lanczycki, C.J., Marchler-Bauer, A., 2020. CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. *Nucleic Acids Res.* 48, D265–D268. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz991>.
- Marie, B., Joubert, C., Tayalé, A., Zanella-Cleón, I., Belliard, C., Piquemal, D., Cochenne-Laureau, N., Marin, F., Gueguen, Y., Montagnani, C., 2012. Different secretory repertoires control the biomineralization processes of prism and nacre deposition of the pearl oyster shell. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 20986–20991. <https://doi.org/10.1073/pnas.1210552109>.
- Marie, B., Marin, F., Marie, A., Bédouet, L., Dubost, L., Alcaraz, G., Millet, C., Luquet, G., 2009. Evolution of nacre: biochemistry and proteomics of the shell organic matrix of the cephalopod *Nautilus macromphalus*. *ChemBioChem* 10, 1495–1506. <https://doi.org/10.1002/cbic.200900009>.
- Marie, B., Zanella-Cleón, I., Corneillat, M., Becchi, M., Alcaraz, G., Plasseraud, L., Luquet, G., Marin, F., 2011. Nautilin-63, a novel acidic glycoprotein from the shell nacre of *Nautilus macromphalus*. *FEBS J.* 278, 2117–2130. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08129.x>.
- Marie, B., Zanella-Cleón, I., Le Roy, N., Becchi, M., Luquet, G., Marin, F., 2010. Proteomic analysis of the acid-soluble nacre matrix of the bivalve *Unio pictorum*: detection of novel carbonic anhydrase and putative protease inhibitor proteins. *ChemBioChem* 11, 2138–2147. <https://doi.org/10.1002/cbic.201000276>.
- Marin, F., Bundeleva, I., Takeuchi, T., Immel, F., Medakovic, D., 2016. Organic matrices in metazoan calcium carbonate skeletons: composition, functions, evolution. *J. Struct. Biol.* 196, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2016.04.006>.
- Marin, F., Le Roy, N., Marie, B., Ramos-Silva, P., Wolf, S., Benhamada, S., Guichard, N., Immel, F., 2014. Synthesis of calcium carbonate biological materials: how many proteins are needed? *Key Eng. Mater.* 614, 52–61. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.614.52>.
- Marin, F., Luquet, G., 2004. Molluscan shell proteins. *Comptes Rendus Palevol* 3, 469–492. <https://doi.org/10.1016/j.crpv.2004.07.009>.
- Marin, F., Luquet, G., Marie, B., Medakovic, D., 2008. Molluscan shell proteins: primary structure, origin, and evolution. *Curr. Top. Dev. Biol.* 80, 209–276. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(07\)80006-8](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(07)80006-8).
- Masuda, F., Hirano, M., 1980. Chemical composition of some modern pelecypod shells. *Sci. Rep. Inst. Geosci. Univ. Tsukuba, sec B* 1, 163–177.
- McDougall, C., Aguilera, F., Degnan, B.M., 2013. Rapid evolution of pearl oyster shell matrix proteins with repetitive, low-complexity domains. *J. R. Soc. Interface* 10, 20130041. <https://doi.org/10.1098/rsif.2013.0041>.
- Mora, C., Tittensor, D.P., Adl, S., Simpson, A.G.B., Worm, B., 2011. How many species are there on earth and in the ocean? *PLoS Biol.* 9, 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001127>.
- Morrissey, J.H., 1981. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.* 117, 307–310. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90783-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90783-1).
- Murray, J.W., 1985. Atlas of invertebrate microfossils. Longman, The Palaeontological Association, Harlow, England.
- Mutvei, H., 2018. Cameral deposits in Paleozoic cephalopods. *GFF* 140, 254–263. <https://doi.org/10.1080/11035897.2018.1483966>.
- Mutvei, H., 1964. On the shells of *Nautilus* and *Spirula* with notes on the shell secretion in non-cephalopod molluscs. *Ark. för Zool.* 16, 221–278.
- Nagai, K., Yano, M., Morimoto, K., Miyamoto, H., 2007. Tyrosinase localization in mollusc shells. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 146, 207–214. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.10.105>.
- Neige, P., Warnke, K., 2010. Just how many species of *Spirula* are there? A morphometric approach. In: Tanabe, K., Shigeta, Y., Sasaki, T., Hirano, H. (Eds.), *Cephalopods - Present and Past*. Tokai University Press, Tokyo, pp. 77–84.
- Nishiguchi, M.K., Mapes, R.H., 2008. *Cephalopoda*. In: Ponder, W.F., Lindberg, D.R. (Eds.), *Phylogeny and Evolution of the Mollusca*. University of California Press, Berkeley, CA, pp. 163–199.
- Nys, Y., Hincke, M.T., Arias, J.L., Garcia-Ruiz, J.M., Solomon, S.E., 1999. Avian eggshell mineralization. *Avian Poult. Biol. Rev.* 10, 143–166.
- Ohkouchi, N., Tsuda, R., Chikaraishi, Y., Tanabe, K., 2013. A preliminary estimate of the trophic position of the deep-water ram's horn squid *Spirula spirula* based on the nitrogen isotopic composition of amino acids. *Mar. Biol.* 160, 773–779. <https://doi.org/10.1007/s00227-012-2132-1>.
- Palmer, A.R., 1983. Relative cost of producing skeletal organic matrix versus calcification: evidence from marine gastropods. *Mar. Biol.* 75, 287–292. <https://doi.org/10.1007/BF00406014>.
- Palmer, A.R., 1992. Calcification in marine molluscs: how costly is it? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 1379–1382. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.4.1379>.
- Pandya, M., Liu, H., Dangaria, S.J., Zhu, W., Li, L.L., Pan, S., Abufarwa, M., Davis, R.G., Guggenheim, S., Keiderling, T., Luan, X., Diekwisch, T.G.H., 2017. Integrative tempo-spatial, mineralogic, spectroscopic, and proteomic analysis of postnatal enamel development in teeth with limited growth. *Front. Physiol.* 8, 793. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00793>.
- Pavat, C., Zanella-Cleón, I., Becchi, M., Medakovic, D., Luquet, G., Guichard, N., Alcaraz, G., Dommergues, J.L., Serpentine, A., Lebel, J.M., Marin, F., 2012. The shell matrix of the pulmonate land snail *Helix aspersa maxima*. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 161, 303–314. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.12.003>.
- Ponder, W.F., Lindberg, D.R., Ponder, J.M., 2019. *Biology and Evolution of the Mollusca*, vol. 1. CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Radev, L., Mostafa, Y.N., Michailova, I., Salvado, M.M.I., Fernandes, H.V.M., 2012. In Vitro bioactivity of collagen/calcium phosphate silicate composites, cross-linked with chondroitin sulfate. *Int. J. Mater. Chem.* 2, 1–9. <https://doi.org/10.5923/j.ijmc.20120201.01>.
- Réhault-Godbert, S., Hervé-Grépinet, V., Gautron, J., Cabau, C., Nys, Y., Hincke, M., 2011. Molecules involved in chemical defence of the chicken egg. In: Nys, Y., Bain, M., van Immerseel, F. (Eds.), *Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products - Egg Chemistry, Production and Consumption*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, pp. 183–208. <https://doi.org/10.1533/9780857093912.2.183>.
- Rosenthal, A.K., Gohr, C.M., Ninomiya, J., Wakim, B.T., 2011. Proteomic analysis of articular cartilage vesicles from normal and osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum.* 63, 401–411. <https://doi.org/10.1002/art.30120>.
- Rusenko, K.W., Donachy, J.E., Wheeler, A.P., 1991. Purification and characterization of a shell matrix phosphoprotein from the american oyster. In: Sykes, C.S., Wheeler, A.P. (Eds.), *Surface Reactive Peptides and Polymers - Discovery and Commercialization*. ACS Symposium Series, 444. American Chemical Society, pp. 107–124. <https://doi.org/10.1021/bk-1991-0444.ch008>.
- Sarashina, I., Yamaguchi, H., Haga, T., Iijima, M., Chiba, S., Endo, K., 2006. Molecular evolution and functionally important structures of molluscan dermatopontin: implications for the origins of molluscan shell matrix proteins. *J. Mol. Evol.* 62, 307–318. <https://doi.org/10.1007/s00239-005-0095-2>.
- Sathyan, N., Rosamma, P., Chaithanya, E.R., Anil Kumar, P.R., 2012. Identification and molecular characterization of Molluskin, a histone-H2A-derived antimicrobial peptide from molluscs. *ISRN Mol. Biol.* 2012, 219656. <https://doi.org/10.5402/2012/219656>.
- Schmitt, N., Marin, F., Thomas, J., Plasseraud, L., Demoy-Schneider, M., 2018. Pearl grafting: tracking the biological origin of nuclei by straightforward immunological methods. *Aquac. Res.* 49, 692–700. <https://doi.org/10.1111/are.13499>.
- Simkiss, K., Wilbur, K.M., 1989. Biomineralization. Cell biology and mineral deposition. Academic Press, San Diego. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-092584-4.50001-9>.
- Stegemann, H., 1963. Proteine (Conchogene) und chitin im stützgewebe von tintenfischen. *Hoppe-Seylers. Z. Physiol. Chem.* 331, 269–279. <https://doi.org/10.1515/bchm2.1963.331.1.269>.
- Stejskal, E.O., Schaefer, J., Waugh, J.S., 1977. Magic-angle spinning and polarization transfer in proton-enhanced NMR. *J. Magn. Reson.* 28, 105–112. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(77\)90260-8](https://doi.org/10.1016/0022-2364(77)90260-8).
- Strugnell, J., Norman, M., Jackson, J., Drummond, A.J., Cooper, A., 2005. Molecular phylogeny of coleoid cephalopods (Mollusca: Cephalopoda) using a multigene approach; the effect of data partitioning on resolving phylogenies in a Bayesian framework. *Mol. Phylogenet. Evol.* 37, 426–441. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2005.03.020>.
- Strugnell, J.M., Hall, N.E., Vecchione, M., Fuchs, D., Allcock, A.L., 2017. Whole

- mitochondrial genome of the Ram's Horn Squid shines light on the phylogenetic position of the monotypic order Spirulida (Haeckel, 1896). *Mol. Phylogenet. Evol.* 109, 296–301. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.01.011>.
- Suzuki, M., Saruwatari, K., Kogure, T., Yamamoto, Y., Nishimura, T., Kato, T., Nagasawa, H., 2009. An acidic matrix protein, Pif, is a key macromolecule for nacre formation. *Science* 325, 1388–1390. <https://doi.org/10.1126/science.1173793>.
- Sviben, S., Gal, A., Hood, M.A., Bertinetti, L., Politi, Y., Bennet, M., Krishnamoorthy, P., Schertel, A., Wirth, R., Sorrentino, A., Pereira, E., Faivre, D., Scheffel, A., 2016. A vacuole-like compartment concentrates a disordered calcium phase in a key coccolithophorid alga. *Nat. Commun.* 7, 11228. <https://doi.org/10.1038/ncomms11228>.
- Takeuchi, T., Plasseraud, L., Ziegler-Devin, I., Brosse, N., Shinzato, C., Satoh, N., Marin, F., 2018. Biochemical characterization of the skeletal matrix of the massive coral, *Porites australiensis* – The saccharide moieties and their localization. *J. Struct. Biol.* 203, 219–229. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2018.05.011>.
- Tanner, A.R., Fuchs, D., Winkelmann, I.E., Ribeiro, M., Gilbert, M.T.P., Pankey, M.S., Kocot, K.M., Halanych, K.M., Oakley, T.H., Fonseca, R.R., Pisani, D., Vinther, J., Vinther, J., 2017. Molecular clocks indicate turnover and diversification of modern coleoid cephalopods during the Mesozoic Marine Revolution. *Proc. R. Soc. B* 284, 20162818.
- Tyszká, J., Bickmeyer, U., Raitzsch, M., Bijma, J., Kaczmarek, K., Mewes, A., Topa, P., Janse, M., 2019. Form and function of F-actin during biomineralization revealed from live experiments on foraminifera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 116, 4111–4116. <https://doi.org/10.1073/pnas.1810394116>.
- Uribe, J.E., Zardoya, R., 2017. Revisiting the phylogeny of Cephalopoda using complete mitochondrial genomes. *J. Molluscan Stud.* 83, 133–144. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyw052>.
- Vinther, J., 2015. The origins of molluscs. *Palaeontology* 58, 19–34. <https://doi.org/10.1111/pala.12140>.
- Warne, K., Plötner, J., Santana, J.I., Rueda, M.J., Llinas, O., 2003. Reflections on the phylogenetic position of *Spirula* (Cephalopoda): preliminary evidence from the 18S ribosomal RNA gene. *Berliner Paläobiol. Abh.* 3, 253–260.
- Weigle, J., Franz-Odenaal, T.A., Hilbig, R., 2016. Not all inner ears are the same: otolith matrix proteins in the inner ear of sub-adult cichlid fish, *Oreochromis Mossambicus*, reveal insights into the biomineralization process. *Anat. Rec.* 299, 234–245. <https://doi.org/10.1002/ar.23289>.
- Weiner, S., 1983. Mollusk shell formation: isolation of two organic matrix proteins associated with calcite deposition in the bivalve *Mytilus californianus*. *Biochemistry* 22, 4139–4145. <https://doi.org/10.1021/bi00286a023>.
- Weiss, I.M., Schönitzer, V., Eichner, N., Sumper, M., 2006. The chitin synthase involved in marine bivalve mollusk shell formation contains a myosin domain. *FEBS Lett.* 580, 1846–1852. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.02.044>.
- Whittaker, C.A., Hynes, R.O., 2002. Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed adhesion and elsewhere. *Mol. Biol. Cell* 13, 3369–3387. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-05-0259>.
- Yonezawa, M., Sakuda, S., Yoshimura, E., Suzuki, M., 2016. Molecular cloning and functional analysis of chitinases in the fresh water snail, *Lymnaea stagnalis*. *J. Struct. Biol.* 196, 107–118. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2016.02.021>.
- Zhang, C., Xie, L., Huang, J., Chen, L., Zhang, R., 2006. A novel putative tyrosinase involved in periostracum formation from the pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342, 632–639. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.01.182>.
- Zhang, Y., Meng, Q., Jiang, T., Wang, H., Xie, L., Zhang, R., 2003. A novel ferritin subunit involved in shell formation from the pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 135, 43–54. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(03\)00050-2](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(03)00050-2).

## 7) Résultats complémentaires

### 7.1) *Schéma conceptuel de la construction coquillière*

À partir d'observations réalisées au microscope électronique à balayage des microstructures coquillières de *Spirula*, de leur organisation spatiale et de leur géométrie, nous proposons un premier schéma conceptuel de la chronologie des différents évènements sécrétoires chez cet organisme (Fig. II.5). Ce schéma en 2D ne représente que la partie dorsale de la coquille, mais nous supposons que le même processus opère en partie ventrale, en « miroir ». Comme chez les autres modèles "plus standards" de mollusques à coquille externe (*e.g.* bivalves, gastéropodes), le dépôt de différentes couches au sein de microstructures distinctes est régulé par l'activité sécrétoire de l'épithélium externe du manteau. Cet épithélium est en fait divisé en plusieurs zones, chacune d'entre elle étant responsable de la minéralisation d'une microstructure donnée. La principale différence réside dans le fait que chez *Spirula*, la coquille est interne : en d'autres termes, la croissance coquillière dans son épaisseur n'est pas unidirectionnelle (*i.e.* de l'extérieur vers l'intérieur, voir Linzmeier *et al.* 2016) mais s'effectue dans les deux directions.

Nous proposons la chronologie des évènements sécrétoires suivante :

- 1) Le processus débute par la sécrétion d'une fine couche organique, figurée en noir sur le schéma, prise en sandwich entre les deux unités (interne et externe) constitutives du mur coquillier (Fig. II.5-Etape 1). Sa sécrétion est assurée par un groupe de cellules spécialisées, équivalentes au sillon périostracal des bivalves. Cette fine lamelle organique sert probablement de support physique à la minéralisation, de chaque côté, des deux unités qui composent la paroi.
- 2) Par conséquent, les couches interne (semi-prismatique irrégulière) et externe (semi-prismatique régulière et tuberculée) sont sécrétées par deux régions cellulaires distinctes (en blanc sur le schéma) de part et d'autre de la lamelle organique (Fig. II.5-Etape 2). Le dépôt minéral se fait en direction de la gauche de la figure, en arrière du front de minéralisation de la couche organique.
- 3) Ensuite, un nouveau groupe de cellules spécialisées de l'épithélium, situé du côté interne de la coquille, débute la sécrétion d'un septum (Fig. II.5-Etape 3a, haut). À mesure que le septum croît en longueur, le manteau s'invagine de plus en plus mais reste néanmoins au contact à la fois de la structure en formation, et du mur coquillier (Fig. II.5-Etape 3a, milieu). De part et d'autre du septum en croissance, deux domaines

cellulaires participent au renforcement de son insertion dans la paroi coquillière (Fig. II.5-Etape 3a, bas) :

- En avant, la croissance de la couche interne de la paroi se poursuit, sans discontinuer. Par conséquent, cette unité déposée à plat finit par recouvrir et ainsi progressivement sceller le septe, conférant à la zone considérée cette forme caractéristique de biseau pris en sandwich au sein de l'unité interne du mur coquillier.
- En arrière, un autre groupe de cellules sécrète une ride annulaire suprasedptale qui apparaît, d'un point de vue microstructural, en continuité avec la couche interne du mur.

Si ce schéma est correct, cela signifie qu'au moins jusqu'à ce moment-là, le manteau occupe encore (partiellement ou totalement) l'avant dernière loge de la coquille.

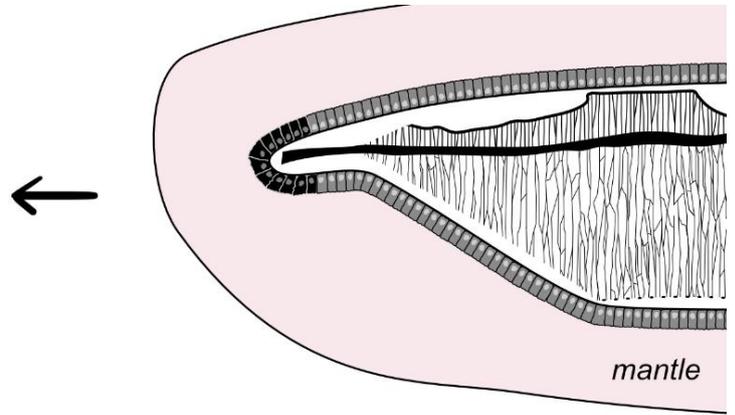
- 4) Tandis que la minéralisation du septe se poursuit, le manteau finit par se détacher du mur coquillier en arrière du septe en formation (Fig. II.5-Etape 3b). Néanmoins, il ne se rétracte pas complètement de l'avant dernière loge, se "préparant" à la sécrétion du canal siphonal.

En effet, l'observation au microscope électronique à balayage (MEB) de sections polies de la coquille, au niveau du canal siphonal, montre un arrangement spatial des microstructures particulier (Fig. II.6). À proximité du canal siphonal, les septes effectuent un repli, orienté vers l'avant de la coquille. Cette déformation ne s'accompagne d'aucun changement microstructural : les lamelles qui constituent les septes, bien visibles, demeurent inchangées et sont continues tout le long du repli, avant d'aller se biseauter dans le mur coquillier, du côté ventral de la coquille. Cette morphologie particulière implique : (i) qu'une étape succède nécessairement à l'invagination du manteau, sans quoi les lamelles au sein d'un septe se biseauteraient en direction du canal siphonal, ce qui n'est pas le cas ici (d'où la nécessité d'une étape 3b) ; (ii) que le manteau ne peut pas complètement se retirer de l'avant dernière-loge, car le canal siphonal traverse, de part en part, les loges : il doit donc sécréter ce tube en parallèle de la sécrétion du septum. Etant donné la difficulté que représente l'illustration d'un tel processus, celui-ci n'est pas figuré

Figure II.5 : Schéma conceptuel de la formation coquillière chez *Spirula spirula*. Etape 1 : sécrétion de la fine couche organique noire (équivalent du périostracum) par un groupe de cellules spécialisées. Etape 2 : les deux unités du mur coquilliers sont déposées, de part et d'autre de la couche organique de manière bidirectionnelle ; la couche semi-prismatique régulière et tuberculée du côté externe, et la couche semi-prismatique irrégulière du côté interne. Etape 3a : début de formation d'un septe. Cette étape, agrandie et détaillée en trois sous-dessins, correspond à l'initiation d'un septe et à son extension en longueur, accompagnées de l'invagination du manteau, ainsi qu'au renforcement de son insertion au sein du mur coquillier par la formation d'une ride annulaire suprasedptale. Etape 3b : la sécrétion du septe se poursuit tandis que le manteau se détache du mur coquillier en arrière du septe en cours de formation. La flèche noire indique la direction du dépôt minéral.

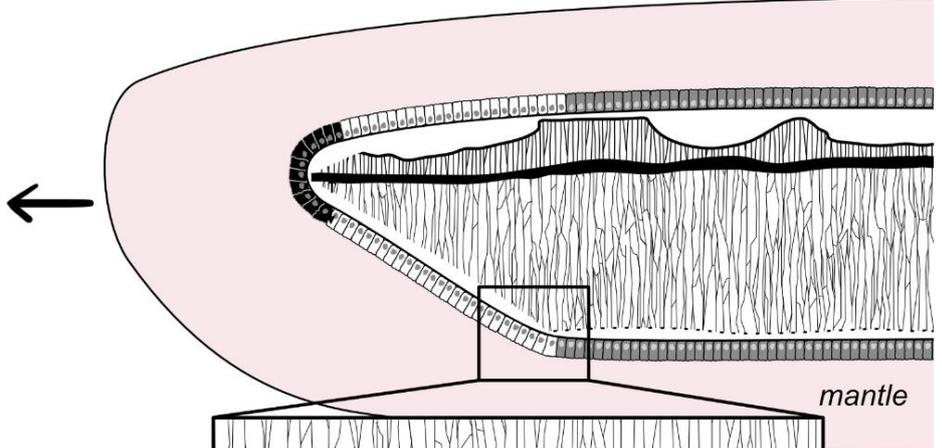
**Step 1**

**elaboration of the organic layer**



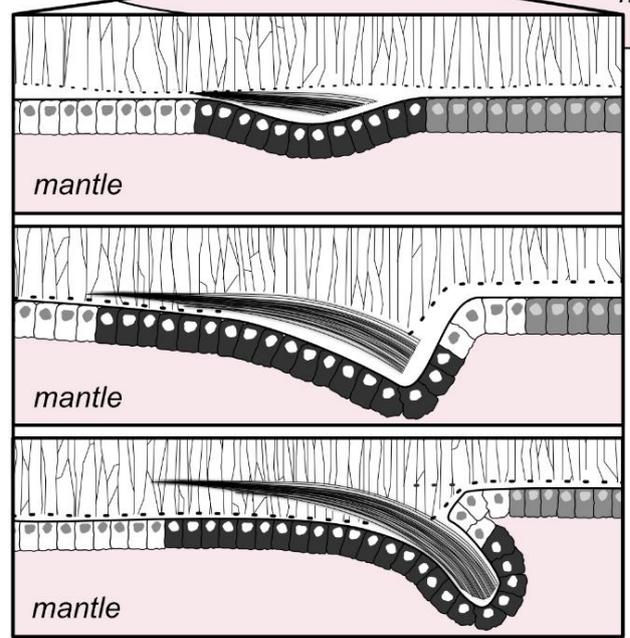
**Step 2**

**elaboration of the external and internal layer**



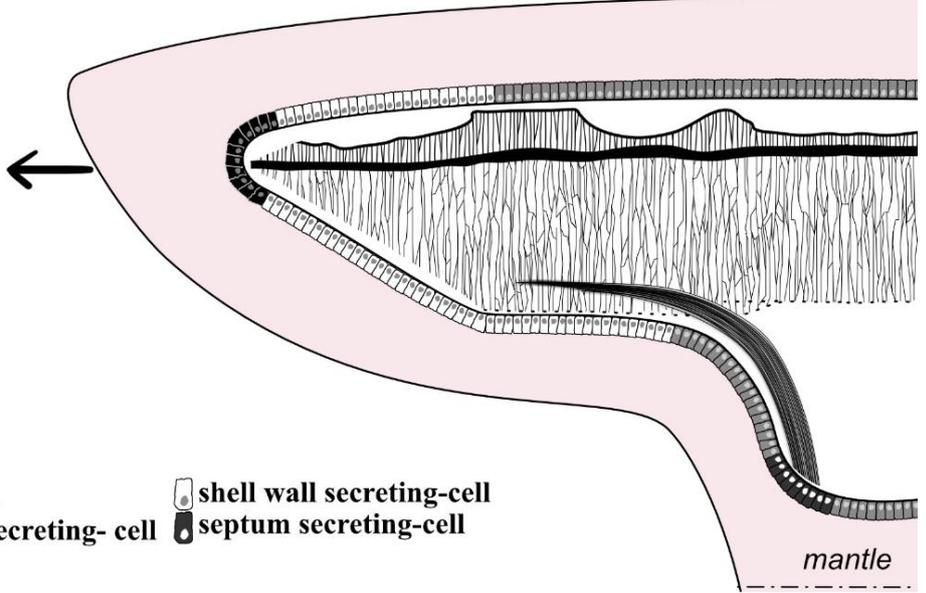
**Step 3a**

**formation of the septum by invagination of the mantle as a first step**



**Step 3b**

**formation of the septum by detachment of the mantle at the back of the novel septum as a second step**



**Legend:**

-  inactivated cell
-  organic layer secreting-cell
-  shell wall secreting-cell
-  septum secreting-cell

dans le schéma conceptuel présenté en Fig. II.5. Dans cette hypothèse, le manteau ne se retire qu'une fois la connexion faite entre le septum et le canal siphonal. À ce moment-là, il revêt probablement une morphologie très particulière, bombée en direction de l'avant de la coquille, permettant ainsi d'expliquer le repli décrit par les septes, comme observé sur la Fig. II.6.

Dans ce schéma, deux incertitudes demeurent :

- La sécrétion d'un septe est-elle synchrone de chaque côté de la coquille (*i.e.* côté dorsal et ventral) ? Si oui, alors la synchronisation de ces deux évènements nécessite une différence dans la vitesse de minéralisation. En effet, chez *Spirula*, le canal siphonal est situé en position ventrale. Dans notre schéma, l'hypothèse est que la sécrétion d'un septe débute de part et d'autre de la coquille pour se rejoindre au niveau du canal siphonal. Étant donné que la longueur de septe à produire n'est pas la même, si les deux évènements sont synchrones, alors ils ne progressent pas à la même vitesse. Pour répondre à cette question, un marquage au manganèse serait envisageable. Pour cela, il s'agirait de récupérer des organismes vivants et de les laisser baigner deux fois (à un intervalle de temps qui reste à préciser), quelques heures tout au plus, dans une eau enrichie en manganèse.

Après sacrifice, les coquilles pourraient être étudiées par cathodoluminescence, afin de vérifier si la sécrétion du septe est synchrone de chaque côté de la coquille ou non. En effet, le manganèse est incorporé par les organismes, lorsqu'ils sécrètent une couche minérale. De ce fait, si un dépôt de manganèse est observé du côté dorsal et ventral de la coquille, alors les évènements sécrétoires sont synchrones. Si non, ils sont dissociés.

- Comment le canal siphonal est-il sécrété, et comment s'effectue sa connexion avec le septe ? Pour répondre à cette question, l'étude du mécanisme de formation coquillière à partir d'organismes vivants apparaît nécessaire.

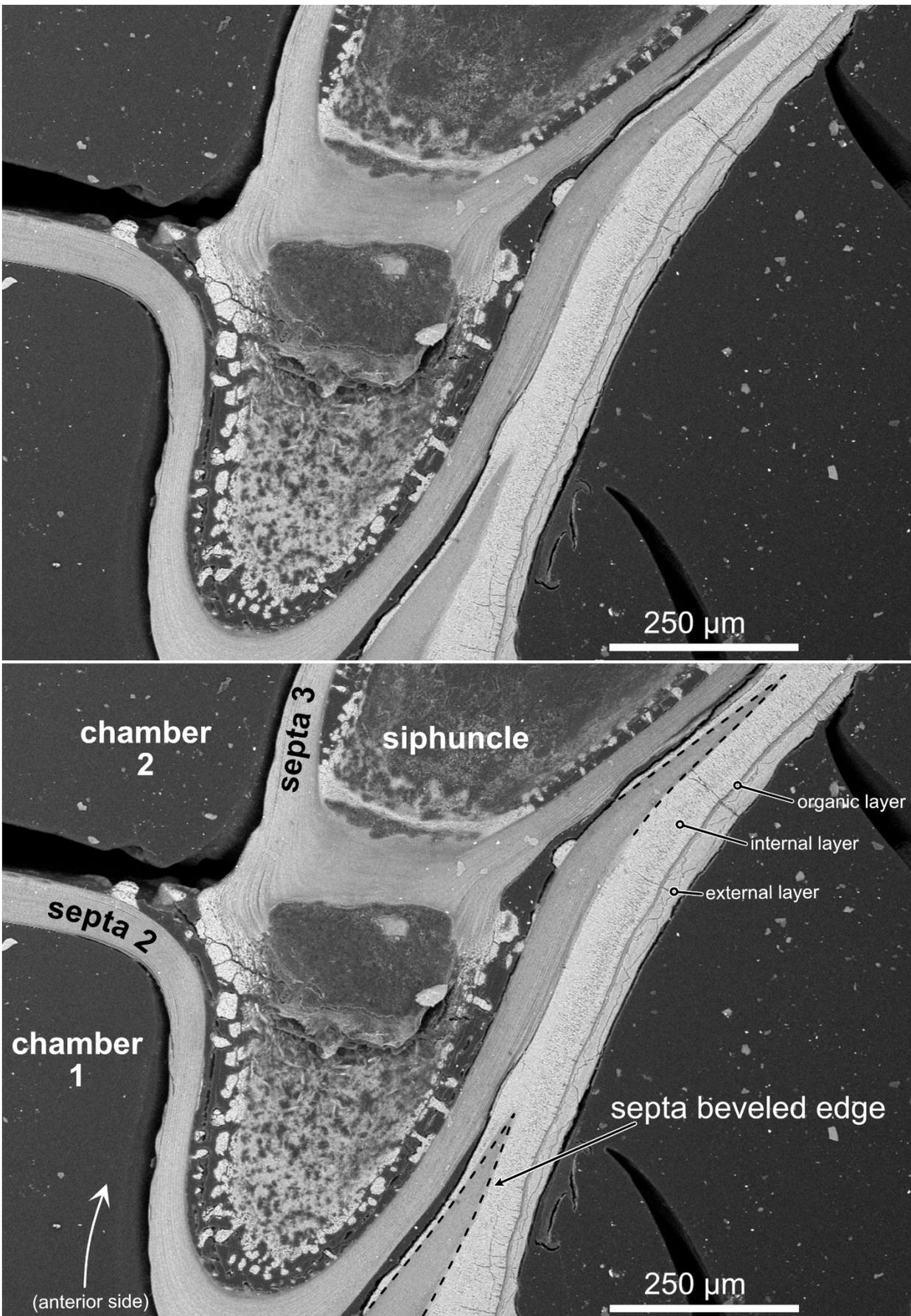


Figure II.6 : Photographie MEB de la région coquillière à proximité du canal siphonal. La section apparaît intéressante, car elle ne coupe pas le canal siphonal dans sa partie médiane, et laisse ainsi apparaître le mode de connexion entre le septa et le canal siphonal. On peut alors constater que les septes demeurent continus, malgré un repli en direction de l'arrière de la coquille. Comme du côté dorsal, les septes sont pris en sandwich au sein de la couche interne de la paroi coquillière, sous la forme d'un biseau. La flèche blanche indique la direction de l'ouverture de la coquille.

## 8) Conclusion

Au terme de cette étude sur la microstructure coquillière et la matrice organique de *Spirula spirula*, il nous est possible de dégager plusieurs informations importantes.

**La matrice organique de *Spirula* représente environ 1 % du poids de la coquille**, une valeur "élevée" qui classe cette-dernière parmi les plus riches en matrice organique. La fraction acido-insoluble (AIM) apparaît comme majoritaire au sein de la matrice, représentant environ 70 % du contenu organique de la coquille. De plus, la matrice organique de *Spirula* semble majoritairement intercrystalline, étant donné la diminution drastique de la quantité de matrice après un second traitement à l'hypochlorite de sodium ainsi que le relatif faible pouvoir de celle-ci sur la précipitation de carbonate de calcium *in-vitro*.

La combinaison d'approches biochimiques et physiques démontre que les saccharides représentent une fraction non-négligeable de la matrice organique, qu'il s'agisse de la fraction acido-soluble ou acido-insoluble. Notamment, les spectres RMN à l'état solide (ss-NMR) révèlent que la chitine et d'autres polysaccharides constituent près de 80 % de la fraction insoluble. Par conséquent, puisque la matrice acido-insoluble constitue 70 % de la matrice dans son ensemble, et que la chitine représente 50 à 60 % de la fraction insoluble, alors **la matrice organique de *Spirula* est plus chitineuse que protéique**, ce qui semble la rapprocher de celle des seiches.

L'approche protéomique *in silico* de la matrice organique, basée sur la recherche de modèles métazoaires hétérologues depuis NCBI, révèle plusieurs hits intéressants. Notamment, l'analyse révèle plusieurs enzymes spécifiques fréquemment observées au sein des matrices coquillières, telles que la tyrosinase, la chitinase ou la sérine protéase. Des protéines non-mollusques porteuses de domaines à affinité avec le calcium (EF-hand, par exemple) sont également identifiées.

**L'approche protéomique *in silico*, basée sur le transcriptome de *S. spirula*, génère un autre jeu de protéines parmi lesquelles une transferrine, un inhibiteur de sérine protéase, et une matriline.** En premier lieu, **la transferrine est supposée être associée à la présence d'ions ferrique au sein des structures minéralisées.** La découverte d'une autre

protéine, non identifiée, mais porteuse d'un domaine supposé complexer le fer, vient renforcer l'idée selon laquelle le fer joue un rôle important - bien qu'encore incompris - dans la biominéralisation du carbonate de calcium chez la spirule. Il est intéressant de noter que la transferrine a également été retrouvée dans la matrice minéralisante d'autres systèmes calcifiants, tels que la coquille d'œuf et qu'elle semble jouer un rôle-clé qui reste à préciser. **Les inhibiteurs de sérine protéase sont fréquemment observés au sein des matrices calcifiantes de nombreux tissus, dont la coquille de mollusque ; on les associe notamment à la protection de la matrice organique contre la dégradation par des enzymes protéolytiques.** Enfin, la matriline, également identifiée dans d'autres matrices de mollusques, est supposée être une protéine organisatrice de la matrice extracellulaire. L'analyse révèle également plus d'enzymes impliquées, de près ou de loin, dans l'assemblage, la dégradation et la modification de saccharides extracellulaires et plus spécifiquement, dans le remodelage de la trame chitineuse (chitobiase, chitin-deacetylase, etc.). Des protéines, porteuses de motifs ou de domaines à affinité avec le calcium, ont également été identifiées ; elles sont supposées jouer un rôle dans la signalisation extracellulaire, étant donné leur forte affinité à lier le calcium, plutôt que dans la nucléation cristalline ou le transport d'ions.

Enfin, les deux approches protéomiques identifient des protéines cytoplasmiques, comme l'actine ou la tubuline, ou nucléaires, comme les histones. Ces protéines sont fréquemment observées au sein de matrices calcifiantes, et ce, malgré un protocole de nettoyage poussé. Il n'est donc pas impossible que ces protéines, bien loin d'être de simples contaminants, jouent un rôle dans la biominéralisation.

**L'étude du transcriptome de la spirule traduit en protéines révèle de nombreux acteurs moléculaires avec, au minimum, 11 vraies enzymes et 28 protéines aux fonctions diverses.** Pour résumer, il s'agit de protéines extracellulaires ; d'enzymes liant ou interagissant avec la matrice extracellulaire (ECM) ; d'enzymes associées aux saccharides (chitine-déacetylase, etc.) ; de protéines à affinité pour les saccharides ; un set de protéines cytoplasmiques (actine, tubuline, etc.) ; de protéines impliquées dans la signalisation cellulaire, de protéines à affinité pour le calcium, de protéines associées au système immunitaire ou à d'autres fonctions de protection (*i.e.* inhibiteurs de protéase), ainsi que des protéines aux fonctions encore inconnues.

Certains composés organiques, habituellement retrouvés au sein des matrices calcifiantes, manquent néanmoins à l'appel. La matrice coquillière de *Spirula* est notamment dénuée d'anhydrase carbonique (CA), alors que trois séquences de CA sont identifiées dans le transcriptome du manteau. **Ceci laisse donc à penser que l'anhydrase carbonique n'est pas incorporée dans la matrice coquillière de l'organisme.**

La matrice organique de la coquille de *Spirula* ne présente aucune ressemblance avec celle d'autres céphalopodes (*e.g.* le nautilus ou la seiche) ou mollusques à coquille. Ceci suggère alors que ***Spirula* possède un répertoire protéique coquillier unique.**

Nos observations confirment la dualité de la paroi coquillière de *S. spirula*, avec une couche externe et une couche interne séparées l'une de l'autre par un fin liséré sombre, probablement de nature organique. La couche externe apparaît comme tuberculée et de nature semi-prismatique régulière, tandis que la couche interne, non-homogène, semble être de nature semi-prismatique irrégulière. **La géométrie et l'organisation spatiale des microstructures coquillières suggèrent une chronologie des évènements sécrétoires complexe.** Notamment, le mode de construction des septes et la connexion de ceux-ci avec le canal siphonal, soulèvent encore beaucoup de questions.

Au vu de ces résultats, plusieurs pistes de recherche ultérieures paraissent particulièrement envisageables :

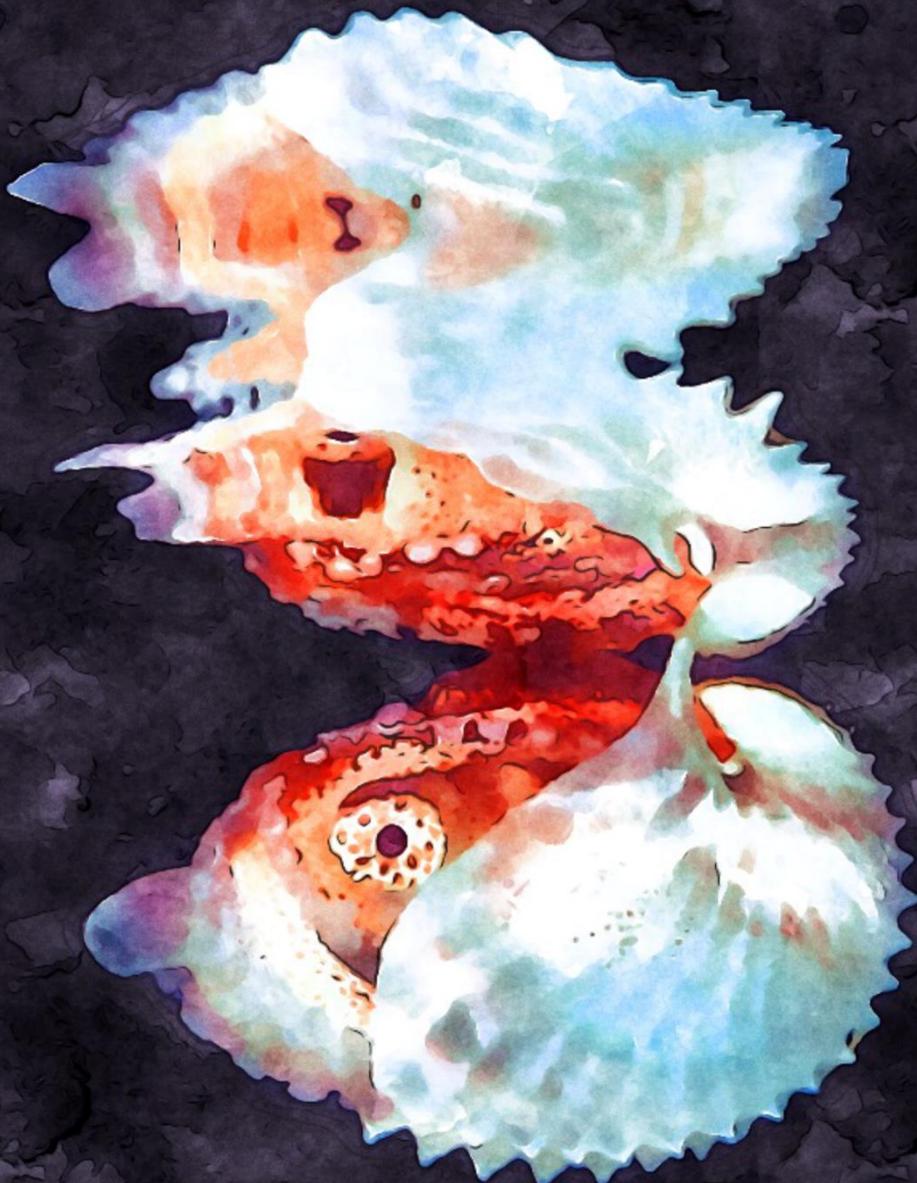
- La réalisation de plusieurs transcriptomes supplémentaires du manteau de *Spirula* permettrait d'établir une liste probablement plus complète des protéines sécrétées par ce tissu.
- L'étude de la croissance coquillière à différents stades ontogénétiques chez cet organisme permettrait de lever le voile sur les incertitudes qui entourent toujours la chronologie des évènements sécrétoires de cette structure minérale.
- La localisation de différents constituants (saccharides, protéines) de la matrice de *Spirula* au sein des tissus calcifiés permettrait également de mieux comprendre le processus de biominéralisation chez cet animal.

**Ces travaux permettraient d'apporter des données essentielles à la compréhension des mécanismes qui régissent la formation de la coquille chez *Spirula spirula*.**



## Chapitre III :

### La biominéralisation coquillière chez l'argonaute *Argonauta hians*





### 1) Description, biologie et cycle de vie

L'argonaute, également connu sous le nom anglais de "*paper nautilus*", est un octopode pélagique qui peuple les eaux tropicales et tempérées des océans du monde entier (Finn 2014, 2018; Stevens *et al.* 2015; Strugnell & Allcock 2010; Sukhsangchan *et al.* 2009). Bien que mondialement connu pour la superbe coquille blanche que fabriquent les femelles, la biologie, l'écologie et le cycle de vie de cet organisme demeurent encore mal documentés (Finn 2014; Stevens *et al.* 2015). Néanmoins, il semble que les femelles adultes occupent principalement les eaux de surface tandis que les mâles et les femelles juvéniles peuvent atteindre des profondeurs comprises entre 200 et 300m.

Comme les autres octopodes, les argonautes possèdent huit appendices péri-oraux, tous ornés d'une double rangée de ventouses (Fig. III.1A). Il existe, chez ces organismes, un dimorphisme sexuel important (Finn 2014; Norman 2000): les mâles sont de très petite taille (ils n'excèdent jamais les quatre centimètres de long; *cf.* Norman 2000) et développent, au sein d'une poche localisée sous l'œil gauche, un troisième bras modifié et spécialisé pour la reproduction, nommé hectocotyle. Les femelles, quant à elles, atteignent une dizaine de centimètres de long en moyenne et arborent une coquille blanche, fine et presque transparente pouvant atteindre jusqu'à 45 cm de diamètre, qu'elles élaborent à partir de leur première paire de bras dorsaux, modifiés en de vastes toiles membraneuses (Fig. III.1B). Ainsi, la coquille des femelles argonautes n'est pas homologue de celle des autres mollusques (Finn 2018; Finn & Norman 2010; Kniprath 1981), qui utilisent l'épithélium calcifiant du manteau. En position de vie, la femelle maintient sa coquille à l'aide de ses bras latéraux et

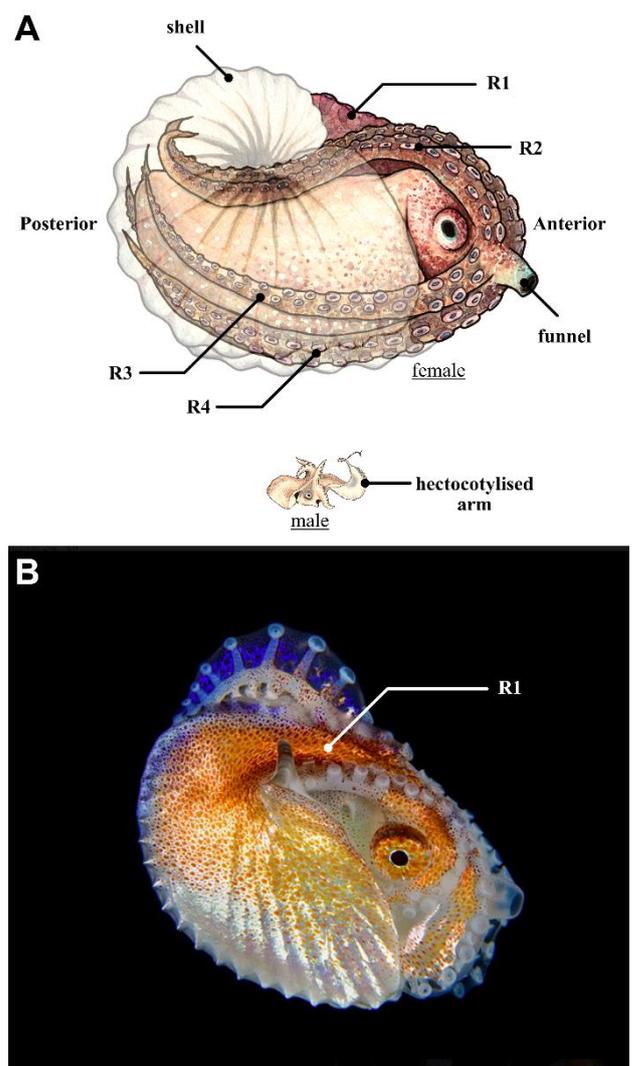


Figure III.1 : (A) dessin à l'aquarelle de l'anatomie externe d'une femelle et d'un mâle argonautes, illustrant le dimorphisme sexuel lié à la taille, réalisé par Margot Bernardi. Les paires de bras sont numérotées R1 à R4. ; (B) photographie d'une femelle de l'espèce *Argonauta hians*, montrant la position de la première paire de bras dorsaux à l'extérieur de la coquille,

ventraux, qu'elle recourbe en arrière, usant de leurs nombreuses ventouses pour adhérer à la surface interne de la coquille (Fig. III.1A). Les bras dorsaux (*i.e.* les voiles membraneux) recouvrent, quant à eux, la surface externe de la coquille mais ils peuvent également être maintenus à l'intérieur. En cas d'endommagement de la coquille, la femelle semble capable de la réparer voire de complètement reconstruire une partie de la coquille si besoin (Finn 2014). Chez l'argonaute, cette structure minéralisée sert de réceptacle et de protection aux nombreux œufs pondus par la femelle, mais également de structure hydrostatique, permettant à l'organisme de contrôler sa flottabilité (Finn & Norman 2010). En effet, les femelles utilisent leur coquille pour « avaler » une quantité bien précise d'air à la surface, puis piéger ce gaz en utilisant la seconde paire de bras avant de nager énergiquement jusqu'à une profondeur à laquelle la flottabilité du gaz comprimé contrebalance le poids du corps de l'animal (Fig. III.2). Ce processus permet à la femelle d'atteindre un niveau de flottaison neutre en profondeur, mais lui permet également d'ajuster sa flottabilité en fonction de la potentielle augmentation de son poids en lien avec la présence d'œufs dans sa coquille. Les femelles argonautes ont tendance à s'accrocher aux objets qui flottent ou dérivent à la surface de l'eau, mais des individus ont également été observés en train de « chevaucher » des méduses, ou bien attachés à des algues flottantes ou encore attachés les uns aux autres pour former de longues chaînes de 20 à 30 individus. Il semblerait que les argonautes soient les proies d'un vaste éventail de prédateurs incluant notamment les calmars, les mammifères marins, les poissons, les pingouins et bien d'autres oiseaux marins (Finn 2014) tandis que d'après plusieurs études, les argonautes se nourriraient de crustacés, de petits céphalopodes et de petits poissons (Nesis 1977; Robson 1932; Sukhsangchan *et al.* 2009).

La biologie et le cycle de vie de l'argonaute demeurent, encore aujourd'hui, assez obscurs. À maturation sexuelle, la femelle pond de longues chaînes d'œufs, attachées à l'axe d'enroulement interne de la coquille (Finn 2018). Les femelles argonautes sont itéropares, c'est-à-dire qu'elles sont à même de se reproduire plusieurs fois dans leur vie. Chez ces organismes, l'ovulation est asynchrone et la ponte est monocyclique : les œufs sont produits de manière asynchrone dès le début de la ponte. Ainsi, la femelle pond de manière continue tout au long de sa vie et une croissance somatique intervient entre chaque épisode de ponte : par conséquent, au sein de la coquille d'une femelle argonaute, tous les œufs ne présentent pas le même stade de développement (Boletzky 1998; Finn 2018; Laptikhovsky & Salman 2003; Rocha *et al.* 2001). Aucun individu mâle vivant n'a encore été observé en milieu naturel et

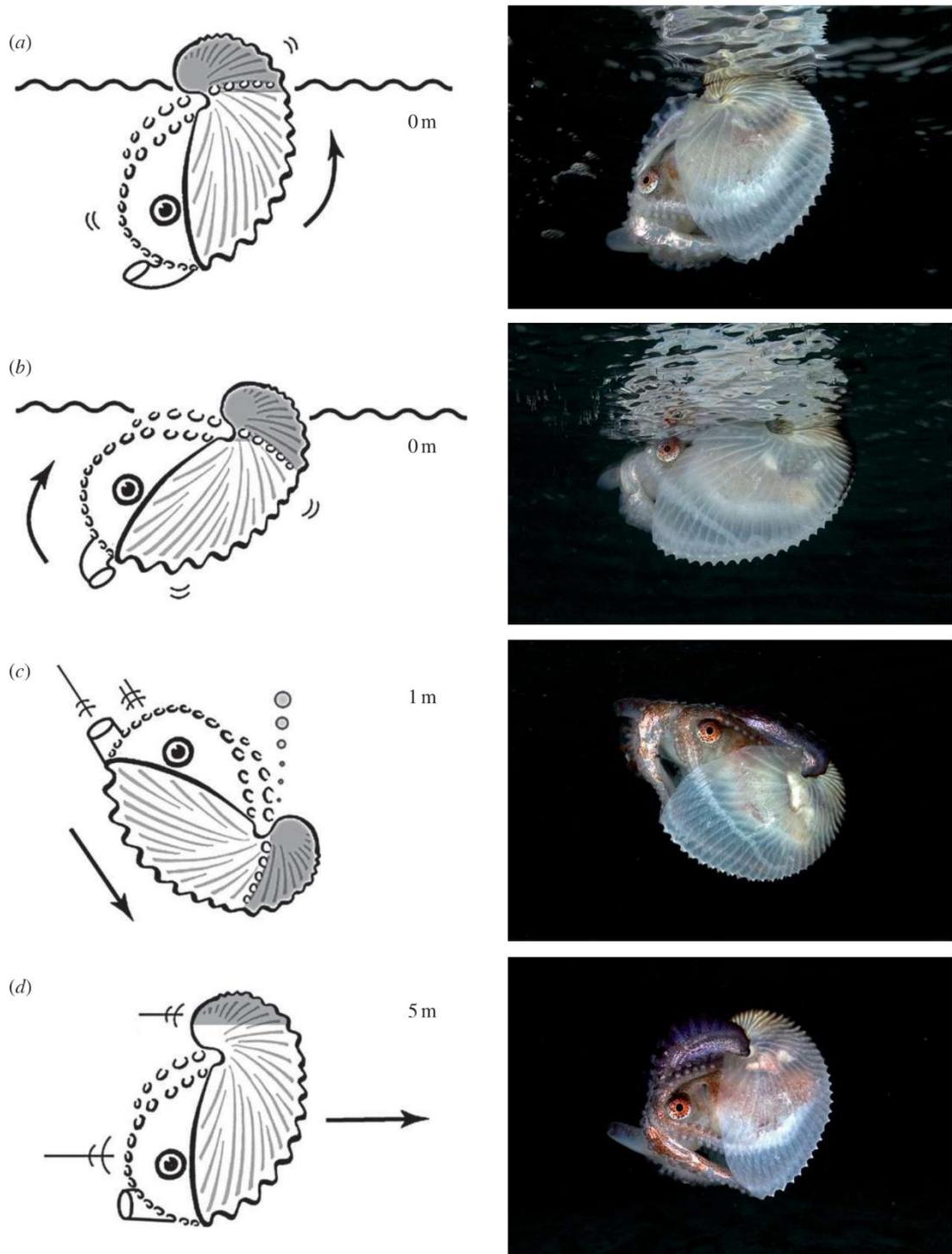


Figure III.2 : Illustration des différentes étapes comportementales de la femelle argonaute (ici, *A. argo*) pour atteindre une flottabilité neutre, d'après Finn & Norman 2010. Dans un premier temps, l'individu se propulse en direction de la surface. Là, l'animal oriente son entonnoir en direction dorsale, ce qui lui permet d'émerger une partie de sa coquille avant de basculer vers l'avant, engoutissant ainsi un volume d'air maximal (a) qu'il piège à l'intérieur de la coquille en utilisant sa deuxième paire de bras dorsaux. En orientant son entonnoir en direction ventrale, la femelle argonaute parvient à immerger sa coquille (b) et c'est à l'aide de puissants jets d'eau émis par son entonnoir que l'individu parvient à s'enfoncer en profondeur (c). Enfin, l'animal atteint une profondeur pour laquelle il existe un équilibre entre le poids de l'animal et la force exercée par l'air piégé dans sa coquille (d). Une fois cette neutralité atteinte, la femelle argonaute est capable de se déplacer rapidement, parallèlement à la surface de l'eau, à une vitesse supérieure à celle d'un plongeur.

par conséquent, aucun n'accouplement n'a jamais été décrit. Néanmoins, d'après l'étude de femelles récemment fécondées, il semblerait qu'à maturation sexuelle, l'hectocotyle du mâle soit libéré de la poche qui le contenait avant de complètement se détacher du corps de l'animal pour être transféré dans la cavité mantellique de la femelle (Finn 2014; Naef 1923; Norman 2000; Young *et al.* 1998). Là, l'hectocotyle libre peut se faufiler dans la masse d'œuf ou bien dans les ouïes, où il s'enroule parfois de lui-même autour des branchies. Il est d'ailleurs intéressant de noter que pendant plusieurs décennies, l'hectocotyle mâle a été considéré comme un parasite et donc comme un animal à part entière (Cuvier 1829). Dans la nature, plusieurs femelles ont déjà été retrouvées avec de multiples hectocotyles mâles au sein des ouïes, de la coquille ou bien au milieu des œufs (Finn 2014; Norman 2000). Le mâle décède probablement à la suite de cet accouplement, étant donné qu'aucun mâle n'a été retrouvé avec un bras reproductif en cours de régénération. La manière dont les femelles utilisent le sperme du mâle pour fertiliser leurs œufs demeure encore inconnue (Norman 2000).

## 2) Taxonomie et phylogénie

Si les coquilles d'argonautes sont connues depuis plusieurs centaines d'années, certaines ornant même des objets datant des civilisations Minoennes datées entre 3000 et 1050 avant JC (Hughes-Brock 1999; Walters 1897), l'identité de l'occupant de la coquille est longtemps restée un mystère. Et lorsque les femelles ont enfin été considérées comme les véritables habitantes des coquilles, ce sont les hectocotyles mâles qui ont été considérés comme des parasites (cf. ci-dessus).

En l'absence de connaissance des organismes qui créent la coquille, un système taxonomique uniquement basé sur les caractéristiques de la coquille s'est installé. Or, cette coquille n'est pas une structure homologue de la « vraie » coquille des mollusques et est, de plus, extrêmement sujette aux variations morphologiques (Boletzky 1983; Trego 1992, 1993; Voss & Williamson 1971). Ainsi, plus d'une cinquantaine d'espèces ont été attribuées au genre *Argonauta* (Linné 1758) au fil des années. Plus récemment, Finn (2013) a proposé une révision taxonomique de la famille des Argonautidae, sur la base de matériel australien. Il confirme l'existence de trois espèces au sein des eaux australiennes, ainsi que celle d'une autre espèce dans les eaux de l'est du Pacifique. Ainsi, les nombreuses espèces nominales

trouvées dans la littérature sont aujourd’hui réduites à quatre espèces avec pour systématique (d’après Finn 2013) :

Embranchement Mollusca Cuvier 1795

Classe Cephalopoda Cuvier 1797

Sous-classe Coleoidea Bather 1888

Super-ordre Octobranchia Fioroni 1981

Ordre Octopoda Leach 1818

Sous-ordre Incirrata Grimpe 1916

Super-famille Argonautoidea Berry 1920

Famille Argonautidae Tryon 1879

Genre *Argonauta* Linnae 1758

*A. argo* Linnae 1758

*A. nodosus* [Lightfoot] 1786

*A. hians* [Lightfoot] 1786

*A. nouryi* Lorois 1852

Jusqu’au milieu du XXème siècle, les plus vieux représentants fossiles connus appartenaient à l’espèce *A. joanneus* Hilber, 1915 (Fuchs & Lukeneder 2014), datés du Miocène moyen (~15,97 à 13,82 Ma). En 1954, Kobayashi découvre plusieurs spécimens datés de l’Oligocène, qu’il attribue à l’espèce *Obinautilus pulchra* et classe parmi les Nautilidae. Cependant, Noda *et al.* (1986) révisent la classification de ces spécimens, qu’ils proposent de rattacher au groupe des Argonautidae sur la base de critères morphologiques. Cette révision taxonomique fait donc remonter l’origine du groupe à la fin de l’Oligocène (Chattien, entre 27,8 à 23 Ma). À ce jour, ces spécimens sont encore considérés comme les plus vieux argonautidés du groupe. Les découvertes plus récentes ne font état que de

spécimens d'âge postérieur, du Miocène moyen (Gholamalian *et al.* 2020; Martill & Barker 2006).

Sur la base de données moléculaires, des études phylogénétiques suggèrent quant à elles une origine plus ancienne encore pour la super-famille des Argonautoidea. Strugnell *et al.* (2006) proposent un enracinement du clade dans le Jurassique (201,3 à 145 Ma), et une origine du genre *Argonauta* dans le Crétacé (145 à 66 Ma), suggérant alors la contemporanéité des ammonoïdés et des argonautes ancestraux. Dans une étude plus récente, Strugnell & Allcock (2010) proposent des dates de divergence plus récentes, selon deux hypothèses différentes :

- (1) Si l'absence de coquille au sein de la lignée des Ocythoïdés est un caractère primaire, alors l'âge moyen du dernier ancêtre commun de la superfamille des Argonautoidea est estimé à 61.7 Ma (Paléocène, début du Cénozoïque) ;
- (2) Si l'absence de coquille au sein des Ocythoïdés est un caractère secondaire (c'est-à-dire que la coquille aurait existé chez ces organismes avant d'être perdue au cours de l'évolution du groupe), alors l'âge moyen du dernier ancêtre commun de la superfamille des Argonautoidea est estimé à 45.6 Ma (Eocène).

Ces deux hypothèses induisent également l'existence de deux scénarios possibles quant à l'origine du genre *Argonauta* estimée (1) à 43 Ma (Eocène) ou (2) à 30.8 Ma (Oligocène).

### 3) La microstructure coquillière

En 1930, Bøggild propose une brève description des microstructures coquillières chez le genre *Argonauta*. Selon lui, la coquille consiste en deux couches fines prismatiques : une supérieure, qualifiée d'épaisse, et une inférieure plus fine. Entre les deux, l'auteur décrit une couche de grains calcitiques fins et irréguliers.

Plus tard, avec l'émergence de nouvelles techniques d'imagerie microscopique (notamment électronique : MEB et MET), de nouvelles études fournissent une description plus complète des microstructures coquillières. En 1971, Kobayashi décrit la coquille d'*Argonauta argo* comme étant composée de trois couches : prismatique externe, médiane et interne. Dans son étude, l'auteur stipule que les couches prismatiques interne et externe présentent une structure similaire, faite de prismes polygonaux allongés perpendiculairement à la surface coquillière. Il explique également que bien que la structure de la couche médiane

demeure obscure, celle-ci semble inclure une matrice organique composée de protéines et de « mucopolysaccharides » (terme générique désignant des polysaccharides de mucus, les principaux étant l'acide hyaluronique, le sulfate de chondroïtine, l'héparine, le sulfate d'héparane, etc...). Sur la base d'observations au microscope électronique à transmission (MET), Mitchell *et al.* (1994) décrivent, au sein de la paroi coquillière d'*Argonauta nodosa*, deux couches prismatiques séparées par une zone centrale (Fig. III.3), dont l'épaisseur et la porosité semblent énormément varier et constituée de grains désordonnés. Les auteurs expliquent que les deux couches prismatiques présentent des ultrastructures presque identiques, malgré des épaisseurs différentes. En effet, la couche interne tend à être plus fine que la couche externe. Néanmoins, les auteurs notent une certaine variabilité dans l'épaisseur de cette couche : si elle ne représente que la moitié de l'épaisseur de la couche externe à proximité de l'axe d'enroulement, elle atteint une épaisseur similaire à la couche externe à proximité de l'ouverture de la coquille. Mitchell *et al.* (1994) signalent également qu'aux extrémités de la zone centrale, les cristallites présentent initialement un mode de croissance sphérolitique avant de s'étendre en prismes (Fig. III.4). Selon eux, ce phénomène s'explique par une restriction de la croissance cristalline (en termes de directions disponibles) liée à la présence d'autres sphérolites dans l'environnement de minéralisation. D'après leurs observations, la zone centrale est elle-même constituée de sphérolites calcitiques dont le diamètre n'excède jamais les 5  $\mu\text{m}$  et qui, à la périphérie, poursuivent leur croissance et agissent comme des points de nucléation pour les prismes calcitiques des couches supérieure et inférieure. Ainsi, la zone centrale apparaît comme étant la première couche formée au moment de l'élaboration coquillière, et agirait ensuite comme un support de nucléation pour le reste de la coquille.

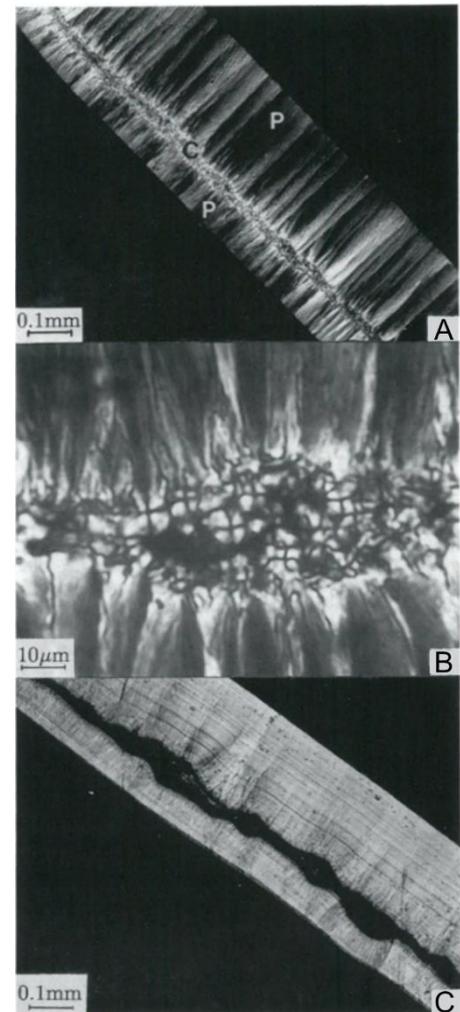


Figure III.3: Photographies au microscope optique de sections transversales de la coquille d'un spécimen d'*Argonauta nodosa*, d'après Mitchell *et al.* 1994. A. Vue entre deux polariseurs croisés, montrant le matériel prismatique (P) s'étendant depuis une zone centrale (C) ; B. Zoom sur la zone centrale, illustrant la configuration en croix de malte des grains et donc, le pattern de croissance sphérolitique ; C. Vue générale de la paroi coquillière, montrant la variation d'épaisseur de la zone centrale.

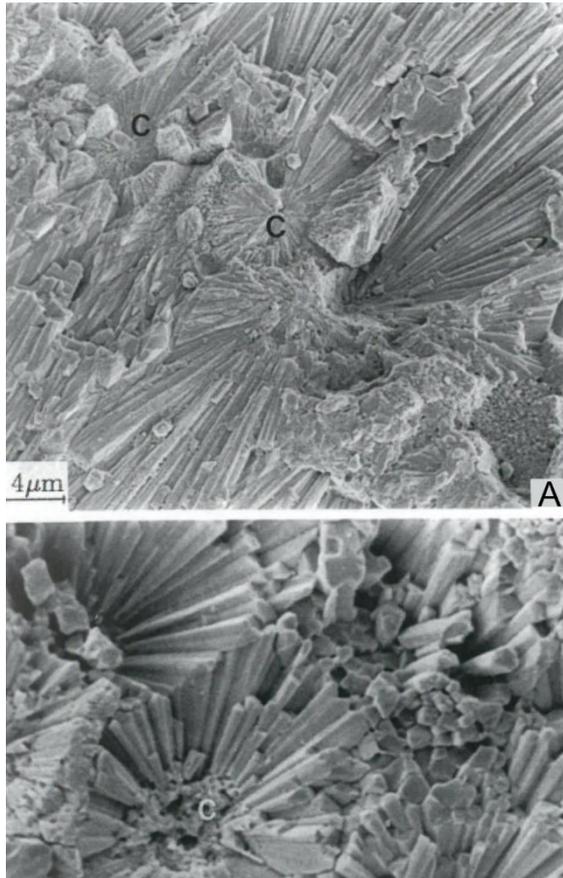


Figure III.4 : Photographies au microscope électronique à balayage illustrant l'origine sphérulitique des prismes depuis leur pointe de nucléation au sein de la zone centrale, d'après Mitchell *et al.* 1994. A. Surface de fracture perpendiculaire à la zone centrale, qui apparaît ici comme une rangée de points de nucléation (ou centre de radiation, C) d'où les cristaux prismatiques radient. B. Section au sein de la couche prismatique parallèle et adjacente à la zone centrale.

Dans leur étude, les auteurs soulignent également que la présence de deux couches prismatiques identiques de part et d'autre de la zone centrale implique nécessairement un mécanisme de formation similaire. Ils envisagent alors un mécanisme de construction coquillière très original impliquant un déplacement des voiles dorsaux : ces derniers alterneraient entre une position interne et externe à la surface de la coquille. Cette hypothèse est soutenue par l'observation de plusieurs organismes aux voiles dorsaux rétractés à l'intérieur de la coquille et ce, sur des périodes de temps fluctuantes (Stephens 1965; Young 1960). Mitchell *et al.* (1994) suggèrent alors que durant ces laps de temps, la femelle argonaute en profite pour minéraliser la couche interne de sa coquille. Les auteurs expliquent alors qu'un tel mécanisme de formation coquillière résulte en une sécrétion périodique de la coquille, et induit alors la formation de discontinuités (*i.e.* imperfections)

dans la couche prismatique formée. Selon eux, ces impuretés sont responsables des plans de fractures préférentiels observés au microscope électronique à balayage (MEB). Néanmoins, les auteurs reconnaissent que ce mécanisme de formation coquillière ne peut pas initier la première nucléation cristalline de la zone centrale. En effet, cette précipitation requiert un environnement clos ainsi qu'un substrat à partir duquel la croissance cristalline est réalisée. Ils invoquent alors un autre mécanisme de formation, durant lequel les deux voiles dorsaux créent, entre eux, un espace au sein duquel se trouve le fluide minéralisant saturé résultant alors en la formation de sphérulites. Ainsi, les auteurs envisagent la chronologie sécrétoire suivante :

- 1) Les voiles dorsaux de la femelle entrent en contact l'un avec l'autre, au niveau de leurs extrémités, créant ainsi l'espace clos nécessaire à la minéralisation. Dans ce contexte, le fluide extrapalléal saturé en ions précurseurs initie la première nucléation

cristalline et de petits sphérulites ( $\leq$  à 5  $\mu\text{m}$ ) sont alors produits, l'un des deux voiles agissant comme support physique à la précipitation cristalline.

La croissance des sphérulites est directement liée à deux facteurs. À mesure que les sphérulites sont formées, la quantité d'ions disponibles diminue et restreint ainsi leur production, si bien que tout l'espace initialement disponible n'est pas entièrement occupé par les sphérulites (*cf.* les vides visibles au sein de la zone centrale sur la Fig. III.3B). De même, plus la quantité de sphérulites au sein de l'espace clos augmente, plus le nombre de directions de croissance potentielles diminue. Il en résulte une croissance des derniers sphérulites (*i.e.* ceux situés en périphérie de la zone centrale) selon un axe préférentiel, ici perpendiculaire à la surface coquillière, aboutissant à la formation de prismes bien individualisés à partir de ces sphérulites (*cf.* Fig. III.4). Il s'agirait là d'un cas typique de croissance par compétition entre sphérulites.

Ainsi, il apparaît clairement que les sphérulites formées au niveau de la zone centrale agissent comme des points de nucléation pour les prismes des couches externe et interne de la coquille.

- 2) Une fois les premiers prismes formés, les voiles dorsaux de la femelle alternent entre une position interne et externe à la coquille pour produire respectivement les couches interne et externe, selon un mécanisme commun. Ainsi, la sécrétion coquillière chez l'argonaute apparaît comme étant périodique : en résulte l'existence d'imperfections ou de discontinuités au sein de la coquille liées aux interruptions de croissance. Par exemple, lorsque les voiles dorsaux passent en position interne, la surface externe de la coquille est exposée à l'environnement et donc, à des détériorations mineures, voire, à dépôt d'impuretés. De plus, lorsque les voiles reviennent en position externe, la croissance coquillière reprend, mais avec une composition potentiellement légèrement différente. Ces facteurs sont responsables de plans préférentiels de fracturation, associés à la présence de ces impuretés.

Dans leur article, Mitchell *et al.* (1994) rejettent l'idée selon laquelle les cavités observées au sein de la zone centrale ont été préalablement occupées par un matériel de nature organique : en effet, ils n'observent aucune différence entre des préparations traitées (à l'acide acétique 0,1M ou à l'hypochlorite de sodium 8 %) et non traitées. Selon eux, ces « vides » ne sont pas

des artéfacts, mais existent bel et bien dans la structure coquillière du vivant de l'organisme. En revanche, ils plaident en faveur de la présence de matériel organique au niveau des points de redémarrage de la croissance cristalline, au sein des couches prismatiques. Selon eux, ces points de redémarrage cristallins sont liés à l'incapacité des voiles dorsaux à poursuivre la croissance des prismes pour une raison quelconque (comme la présence d'une impureté, par exemple) et à la nécessité de récapituler la séquence de dépôt minéral en commençant par la formation de sphérulites. Une des conclusions importantes que tirent Mitchell *et al.* de leur étude est que l'argonaute exerce un contrôle moindre sur la biominéralisation de sa coquille que ne le font les mollusques en général, et que la matrice organique de la coquille ne joue pas un grand rôle dans la détermination de la microstructure coquillière.

Plus récemment, Wolfe *et al.* (2013) ont étudié la microstructure coquillière d'*Argonauta nodosa* dans le cadre d'une étude visant à comprendre l'impact de l'acidification océanique sur l'intégrité de sa coquille. Leurs observations par diffraction d'électrons rétrodiffusés (EBDS) suggèrent une radiation bidirectionnelle des cristallites de part et d'autre d'un cœur organique impliquant le dépôt du CaCO<sub>3</sub> depuis la couche organique vers l'intérieur et l'extérieur de la coquille. Par conséquent, la femelle argonaute semble utiliser un mode de calcification unique au regard des autres mollusques : en effet, la présence de deux couches calcitiques prismatiques disposées de part et d'autre d'une couche organique médiane implique une minéralisation bidirectionnelle, la couche centrale servant de support à la nucléation cristalline des deux couches calcitiques prismatiques en direction de l'intérieur et de l'extérieur de la coquille (Mitchell *et al.* 1994; Wolfe *et al.* 2013). Wolfe *et al.* (2013) notent d'ailleurs que l'arrangement radial des cristallites depuis le cœur organique (couche centrale et support de la minéralisation bidirectionnelle) ressemble d'avantage à celui de la coquille d'œuf, où les observations EBSD montrent une radiation depuis des points de nucléation uniques le long de la surface interne de la coquille (Dalbeck & Cusack 2006; Grellet-Tinner *et al.* 2011; Trimby & Grellet-Tinner 2011).

#### 4) La matrice organique

Malgré son originalité, la coquille de l'argonaute n'a fait l'objet que de deux études biochimiques. La première est celle de Turek (1933) qui souligne une quantité importante de substances organiques, sans pour autant en indiquer la nature. La seconde, également ancienne, est celle de Degens *et al.* (1967), lesquels analysent la composition en acides

aminés de la matrice organique insoluble. D'après leur étude, celle-ci est enrichie en résidus glycine, serine et acide aspartique. Ils détectent également deux sucres aminés très courants, à savoir la glucosamine et la galactosamine. À notre connaissance, aucune étude plus récente n'a été réalisée chez les membres du genre *Argonauta*.

##### 5) Le but de notre étude

La coquille d'*Argonauta* apparaît comme une véritable curiosité de la nature, aussi bien d'un point de vue évolutif que de celui de son mode de biominéralisation. En étant le seul octopode à minéraliser une coquille, la femelle argonaute constitue un modèle d'étude des plus intéressants : la morphologie planispiralée de la coquille n'est pas sans rappeler celle de céphalopodes plus « ancestraux » comme *Nautilus*, d'autant plus que cette coquille est, elle aussi, externe. D'ailleurs, les anglais le surnomment « *paper nautilus* » en référence à la ressemblance de leurs coquilles. Cependant, l'absence d'un cloisonnement au sein de la structure coquillière chez *Argonauta* apparaît comme un caractère très dérivé. À cela s'ajoute le fait que cette structure n'est pas homologue de celle d'autres mollusques, et que contrairement aux autres céphalopodes qui possèdent une coquille en aragonite, la femelle argonaute minéralise la sienne en calcite. L'ensemble de ces observations achève de faire de la coquille de l'argonaute une structure tout à fait particulière au sein du groupe des céphalopodes, et des mollusques de manière plus générale encore. Cette structure minéralisée, qui apparaît comme une véritable apomorphie des argonautidés, donne lieu à un questionnement : comment, du point de vue moléculaire, l'argonaute femelle, construit-elle sa coquille ? Utilise-t-elle des « outils moléculaires » analogues, voire homologues, de ceux identifiés chez d'autres céphalopodes, ou bien d'autres mollusques coquilliers ?

Notre étude se propose d'étudier les propriétés physiques et biochimiques de la coquille d'*Argonauta hians*, une espèce cosmopolite vivant dans les eaux tropicales et intertropicales des océans. Plus précisément, en cherchant à caractériser la signature biochimique de la matrice organique chez cet organisme, notre objectif est de déterminer s'il existe des points communs entre celle-ci et celles d'autres céphalopodes et/ou mollusques.

L'article de recherche présenté ci-après (Oudot *et al.* 2020b) se concentre sur les composés organiques de la coquille, indépendamment de leur localisation au sein de celle-ci

(e.g. couche centrale versus couches prismatiques périphériques). Nous avons également apporté un intérêt tout particulier à la microstructure coquillière de l'organisme, en comparant nos observations à celles déjà réalisées dans la littérature. Ce travail constitue une première caractérisation exhaustive de la matrice organique chez *A. hians*, par l'utilisation de méthodes biochimiques. En parallèle, une approche protéomique de la matrice a été menée. Enfin, nous discutons les potentielles fonctions dans la biominéralisation des principales protéines identifiées au sein de la matrice. Cet article, présenté ici en langue anglaise dans son format de publication, est précédé d'un résumé en français. Les données supplémentaires associées à cet article sont disponibles à la fin du manuscrit, dans les Annexes.

Le lecteur trouvera, à la suite de l'article et dans la continuité de ce chapitre, quelques résultats complémentaires ainsi qu'une conclusion concernant les résultats majeurs obtenus dans le cadre de cette étude, leurs implications, ainsi que les questions qu'ils soulèvent et les pistes de recherches ultérieures à suivre.

6) *A Nature's curiosity: the Argonaut « shell” and its organic content – Crystals, 10 (9), art. number 839 (2020)*

**Résumé :**

Les mollusques représentent une classe reconnue pour sa capacité à produire une coquille calcifiée, résultant d'un processus génétiquement contrôlé en domaine extracellulaire, par l'intermédiaire d'une matrice organique. Celle-ci est constituée d'un mélange de protéines, de glycoprotéines, de polysaccharides et de lipides sécrétés par un tissu minéralisant, généralement identifié comme étant l'épithélium externe calcifiant du manteau. À notre connaissance, le modèle étudié ici – l'argonaute – est le seul cas où ce schéma général n'est pas respecté: la coquille de ce céphalopode est en réalité élaborée par la première paire de bras dorsaux et fonctionne comme une chambre à couvain, sécrétée uniquement chez les femelles. De plus, cette structure n'arbore pas une nature aragonitique comme celle de ses voisins céphalopodes, mais plutôt une nature calcitique. Ainsi, la coquille de l'argonaute femelle apparaît comme une apomorphie du groupe, non-homologue des autres coquilles de céphalopodes. Dans ce travail, notre objectif était de proposer une première caractérisation biochimique de la matrice organique coquillière de l'espèce *Argonauta hians*, une caractérisation microstructurale de la coquille ainsi qu'une comparaison générale de l'ensemble de nos observations avec d'autres représentants de la classe des céphalopodes, et du phylum des mollusques en général.

L'étude au microscope électronique à balayage de la coquille a confirmé l'existence d'une couche organique centrale, et de deux couches de calcite fibreuse de part et d'autre de celle-ci, mais suggère également une chronologie sécrétoire tout à fait particulière impliquant le mouvement des bras de l'organisme depuis l'extérieur de la coquille vers l'intérieur, et inversement. La caractérisation physique et biochimique de la matrice organique révèle une proportion inhabituelle de composés solubles et insolubles, et plaide en faveur de la prédominance de la fraction protéique avec une faible quantité de saccharides, visiblement essentiellement composés de glycosaminoglycanes sulfatés (sGAGs). L'analyse protéomique *in silico* au sein d'une base de données de modèles métazoaires hétérologues, mais également au sein du transcriptome de la spirule (*Spirula spirula*), génère de nombreuses séquences peptidiques. Celles-ci permettent d'identifier quelques protéines, non partagées avec d'autres matrices coquillières de mollusques. Ce manque de correspondance avec des modèles déjà connus tend à démontrer que la matrice coquillière d'*A. hians* est unique. D'un point de vue évolutif, ceci semble suggérer que les outils moléculaires impliqués dans la formation de la

coquille de cet organisme ne sont pas hérités d'un ancêtre commun avec d'autres céphalopodes à coquilles, mais qu'ils ont plutôt été recrutés par le groupe des Argonautidae.

Article

# A Nature's Curiosity: The Argonaut "Shell" and Its Organic Content

Morgane Oudot <sup>1,\*</sup>, Ira Ben Shir <sup>2</sup>, Asher Schmidt <sup>2</sup>, Laurent Plasseraud <sup>3</sup>, Cédric Broussard <sup>4</sup>, Pascal Neige <sup>1</sup> and Frédéric Marin <sup>1</sup>

<sup>1</sup> UMR CNRS 6282 Biogeosciences, University of Burgundy-Franche-Comté, 6 Boulevard Gabriel, 21000 Dijon, France; pascal.neige@u-bourgogne.fr (P.N.); frederic.marin@u-bourgogne.fr (F.M.)

<sup>2</sup> Schulich Faculty of Chemistry and Russell Berrie Nanotechnology Institute Technion-Israel Institute of Technology, Technion City, Haifa 32000, Israel; ibenshir@gmail.com (I.B.S.); asher@ch.technion.ac.il (A.S.)

<sup>3</sup> Institute of Molecular Chemistry, ICMUB UMR CNRS 6302, University of Burgundy-Franche-Comté, 9 Avenue Alain Savary, 21000 Dijon, France; laurent.plasseraud@u-bourgogne.fr

<sup>4</sup> 3P5 Proteomic Platform, Cochin Institute, INSERM, U1016, CNRS, UMR8104, F-75014 Paris, France; cedric.broussard@inserm.fr

\* Correspondence: morgane.oudot@u-bourgogne.fr

Received: 5 August 2020; Accepted: 15 September 2020; Published: 19 September 2020



**Abstract:** Molluscs are known for their ability to produce a calcified shell resulting from a genetically controlled and matrix-mediated process, performed extracellularly. The occluded organic matrix consists of a complex mixture of proteins, glycoproteins and polysaccharides that are in most cases secreted by the mantle epithelium. To our knowledge, the model studied here—the argonaut, also called paper nautilus—represents the single mollusc example where this general scheme is not valid: the shell of this cephalopod is indeed formed by its first dorsal arms pair and it functions as an eggcase, secreted by females only; furthermore, this coiled structure is fully calcitic and the organization of its layered microstructures is unique. Thus, the argonautid shell appears as an apomorphy of this restricted family, not homologous to other cephalopod shells. In the present study, we investigated the physical and biochemical properties of the shell of *Argonauta hians*, the winged argonaut. We show that the shell matrix contains unusual proportions of soluble and insoluble components, and that it is mostly proteinaceous, with a low proportion of sugars that appear to be mostly sulfated glycosaminoglycans. Proteomics performed on different shell fractions generated several peptide sequences and identified a number of protein hits, not shared with other molluscan shell matrices. This may suggest the recruitment of unique molecular tools for mineralizing the argonaut's shell, a finding that has some implications on the evolution of cephalopod shell matrices.

**Keywords:** *Argonauta*; biomineral; shell; egg-case; microstructure; proteomic; SS-NMR

## 1. Introduction

Molluscs constitute a highly diversified phylum, widely famous for being expert mineralizers: the phylum contains eight taxonomic classes from which five, including monoplacophorans, scaphopods, bivalves, gastropods and cephalopods, are shell-bearing organisms [1]. Among them, the shell biomineralization is known to be a genetically controlled matrix-mediated process, performed extracellularly. The organic matrix consists of a complex mixture of proteins, glycoproteins, lipids and polysaccharides that are secreted by a calcifying tissue, generally known as the external calcifying epithelium of the mantle for most molluscs. These components are then released in the extrapallial space, together with mineral ion precursors, where they are supposed to interact

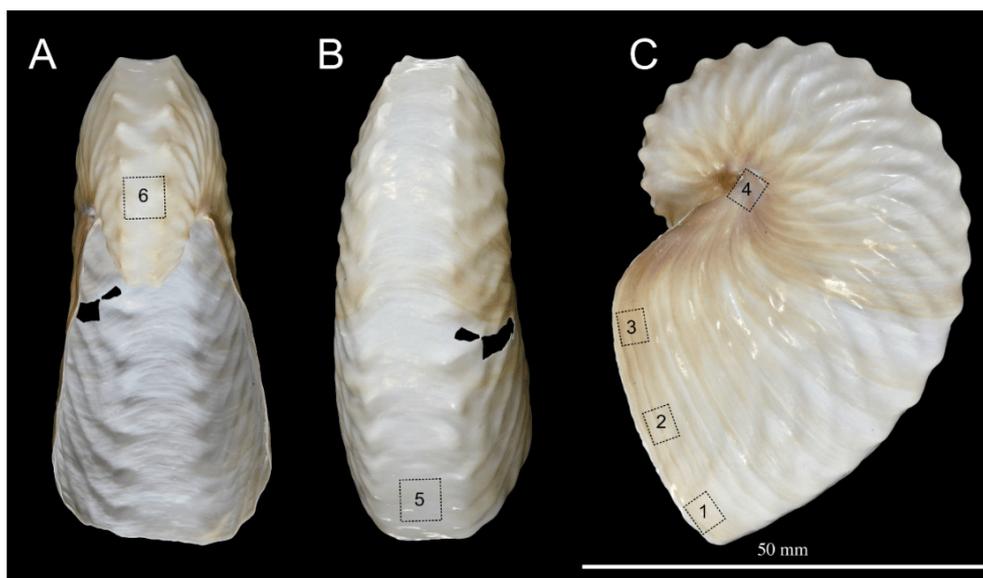
and self-assemble [2]. In this context, the matrix is thought to fulfil several functions: locally concentrating ions, providing a scaffold for mineral deposition, catalysing the mineral deposition, nucleating crystals and controlling their shape, and finally, inhibiting the crystal growth under certain circumstances [3]. Since its discovery as a key-player in shell biomineralization, the organic matrix has been the focus of a large number of biochemical analyses, mainly on its protein moieties [4–9]. But in spite of numerous studies, the components of the organic matrix are known mostly for two molluscan clades: the bivalves and the gastropods. In contrast, cephalopods which represent a major class of molluscs in past and present ecosystems, with about 800 living and more than 10,000 fossil species (<http://cephbase.eol.org/> [10]), remain far less studied. Since their appearance in the Middle Cambrian [11], they experienced a complex evolutionary history with important radiations into a great variety of marine habitats, punctuated by major crises [10,12,13]. The macroevolutionary history of the clade points out an interesting fact from a “biomineralization” point of view: a general trend of shell reduction and internalization, up to its complete disappearance in the most recent cephalopods, octopods. Among the latter, one cephalopod stands out as an exception: the argonaut.

Argonauts belong to a family (Argonautidae) of pelagic octopuses that inhabit tropical and temperate oceans [14,15]. This family comprises only one living genus, *Argonauta* and four described species, world widely known for their beautiful thin white shell, also named the paper nautilus shell. This unique feature among octopods is only produced by females and used as a brood chamber as well as a hydrostatic structure for attaining neutral buoyancy [16,17]. But most importantly, this calcified structure is not a “true” shell: in contrast to other shell-bearing cephalopods and molluscs in general, it is not produced by the calcifying epithelium of the mantle, the organ responsible for secreting the shell [18]. In fact, the argonaut shell is a secondary calcium carbonate structure, synthesized from webs on the distal ends of the female’s first dorsal arm pair, resulting in a different shell organization [19]. Thus, the argonaut shell is not homologous to that of other cephalopods and constitutes a derived character—i.e., an apomorphy—of the Argonautidae family. Since this character is not found in any other molluscan clade, present or past, and is consequently unique to argonautids, it can even be considered as an autapomorphy. Another peculiarity of this calcified structure is that it is entirely calcitic, unlike all other calcified cephalopod shells, external (*Nautilus*) or internal (*Spirula*, *Sepia*). Over the decades, the microstructure of the argonaut shell has been the subject of a number of studies [19–21], but the biochemistry of the organic matrix is extremely lacunar. In the present study, we focus on one species of paper nautilus, *Argonauta hians*, also known as the winged argonaut and named the grey sea-horse’s nest by the Chinese. It is a cosmopolitan species living in tropical and inter-tropical pelagic waters, and abundant in the Philippines and in the South China Sea. Our study aims at shedding light on the biochemical components of the shell, and at comparing this biochemical fingerprint with known data from other representatives of the Mollusca phylum.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Shell Sampling

Shells of *Argonauta hians* were bought online on Conchology website ([www.conchology.be](http://www.conchology.be)). Four cleaned specimens of 61, 70, 73 and 75 mm in diameter, respectively, were provided, all coming from the Philippines. Figure 1 shows one of them. Three specimens were sampled off Negros Island, with two exemplars collected in the Hinigaran waters, and the third one, in that of Cadiz. The fourth specimen was collected off Leyte Island, in the district of Sogod. One of these shells was exclusively used for embedding, microstructural analyses and lectin and immuno-localization. The three others were used for matrix extraction.



**Figure 1.** Macrophotography of the shell of *Argonauta hians*. (A). Apertural view. (B). Dorsal view. (C). Left lateral view. Note the pigmented protuberances of the keel. The dashed squares with numbers indicate the location of area sampled for SEM investigation of the shell wall.

## 2.2. Shell Embedding and Microstructure Analysis

Shell fragments were embedded in LR (London Resin) White resin, following the manufacturer's instructions (Fluka): benzoyl peroxide (catalyst) was dissolved in the LR White resin monomer solution (9.9 g per 500 mL) for 24 h, under constant stirring, at room temperature, prior to use. The samples were immersed in the resin solution at room temperature before being transferred at 60 °C for the polymerization to proceed (one night to two days). Resin blocks were then sliced with a saw microtome (Leica SP1600, Leica Biosystems, Nussloch, Germany): shell sections were polished under water with decreasing grain size sandpaper until reaching mirror-polish quality (0.05 µm, aluminium oxide). After short sonication, the preparations were slightly etched with EDTA solution (1% wt/vol, 2 min), before being dried and carbon or gold-sputtered. The samples were finally observed with a Hitachi TM-1000 (Hitachi, Tokyo, Japan) tabletop SEM or with a JEOL JSM-IT 100 InTouchScope™ (JEOL Ltd., Tokyo, Japan).

## 2.3. Shell Matrix Extraction

Prior to extraction, two cleaning procedures were applied: the first one consisted of coarsely powdering the first shell (referred to as Shell 1) with a mortar and pestle and bleaching the fragments in a 10-times diluted sodium hypochlorite solution (Merck, 0.6–1.4% active chlorine, ref 105614) for 20 h. The second one, applied on the second shell (referred to as Shell 2) added an additional step: after the first bleaching, the powder was divided in two batches: the first one was kept untreated further while the second one was submitted to another bleaching step (20 h, NaOCl solution, same dilution). After several rinsing steps in ultrapure water, all bleached powders were dried at 37 °C and manually ground. They were immediately weighed and decalcified overnight, at 4 °C by adding progressively cold dilute acetic acid (10% vol/vol) at a flow rate of 0.1 mL every 5 s, under constant stirring (according to the protocol of [22]). The clear solutions were centrifuged (3900 G, 30 min): each supernatant, containing the CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H-soluble matrix (acid soluble matrix—ASM) was filtered (5 µm, Millipore) on a Nalgene filtration device before being ultrafiltered for volume reduction on an Amicon stirred cell (model 8400, 400 mL, cutoff 10 kDa). The concentrated solution (15 mL) was dialyzed against ultrapure water for three days (5–6 changes of water) and lyophilized. In parallel, the precipitate that contained

the CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H-insoluble matrix (acid insoluble matrix—AIM) was rinsed via 5 cycles of resuspension in ultrapure water—centrifugation, each time the supernatant being added to the ASM in the Amicon cell. Finally, the AIM pellet was lyophilized. All six dried pellets were weighed on a precision balance (Quintix35-1S, Sartorius, Göttingen, Germany) four times and the mean value was calculated. Since the double bleaching procedure on Shell 2 yielded very low amount of matrix (in particular, of an insoluble one), only few characterizations were performed on these extracts, including FT-IR and proteomics. The third shell was used only for the quantification of matrix components: to this end, we employed the same protocol as the one for Shell 1. All the results are included in Table 1.

**Table 1.** Quantity of shell matrices (soluble and insoluble) extracted from the shell of *A. hians*. The first extraction was performed after one and two bleaching treatments, while the second and the third extractions were done after one bleaching treatment. ASM: acid soluble matrix; AIM: acid insoluble matrix.

	Fractions	Shell Powder (g)	Shell Matrix after Lyophilisation (mg)	Shell Weight %	Whole Shell Matrix (Shell Weight %)
1st extraction	ASM1	1.86	18.13	0.97	1.74
	AIM1		14.42	0.77	
	ASM2	1.95	17.90	0.91	≈0.93
	AIM2		<<1—not quantified	Not quantified	
2nd extraction	ASM	2.97	27.67	0.93	1.78
	AIM		25.25	0.85	
	ASM	3.76	39.70	1.05	1.78
AIM		27.50	0.73		

#### 2.4. Quantification of Sugars and Sulfated Glycosaminoglycans

The whole sugar content of the ASM was tested according to the classical sulfuric acid-phenol method [23], applied to smaller volumes adapted to microplates [24,25]. In brief, in eppendorf tubes, 200 µL of ASM sample, diluted from a 5 µg/µL stock solution, was allowed to react with 500 µL concentrated sulfuric acid. To the mixture, 100 µL phenol 5% was immediately added and the solution was allowed to cool down for ten min before being incubated at 37 °C for 30 min. Standard solutions of glucose and maltose (amounts ranging from 0 to 56 µg per well, i.e. 200 µL) were treated in parallel in a similar manner. Aliquots (200 µL, 1/4 of the total volume) were pipetted in a 96-well microplate. For each sample and standard concentration, triplicates were made. The test was read at 490 nm on a microplate reader (Bio Rad, model 680, Hercules, CA, USA) and a standard curve was traced.

The sulfated glycosaminoglycans (sGAGs) were quantified according to the Blyscan assay (Ref. B1000, Biocolor Ltd., Antrim, UK). In short, in eppendorf tubes, 100 µL of diluted samples and of reference standards (bovine tracheal chondroitin-4-sulfate) were allowed to react at room temperature with Blyscan dye reagent (900 µL) for 30 min under constant agitation. The tubes were then centrifuged for 12 min at 15,600 G, for generating pellets of dye-glycosaminoglycans complexes. The supernatants containing unbound dye were discarded, and the pellets were re-dissolved in 500 µL of dissociation reagent under vortexing. After a short centrifugation, aliquots (125 µL, 1/4 of the total amount) were disposed in triplicates in a 96-well microplate, which was subsequently read at 655 nm. A standard curve was traced for quantification.

#### 2.5. Mono-Dimensional PAGE

Both matrix fractions (ASM and AIM of Shell 1) were analyzed by conventional mono-dimensional denaturing SDS-PAGE (Bio-Rad, Mini Protean III gels, Hercules, CA, USA), on precast gradient gels (Mini-PROTEAN TGX Gel 4–15% acrylamide, 90 mm × 70 mm, Bio-Rad) or on homemade gels (12% polyacrylamide). This technique allows overall viewing of the matrix macromolecules by discriminating them according to their molecular weights. The ASM lyophilisates were dissolved in ultrapure water to a concentration of 5 µg/µL (stock solution). An aliquot was sampled, to which 4X Laemmli Sample Buffer (LSB, 1/4 of the final volume) was added. Chips of the AIM pellets

were resuspended in ultrapure water, to which a similar proportion of LSB solution was added. All preparations were heat-denatured for 5 min at 100 °C for the ASMs and 10 min for the AIMs. Note that the AIMs were partly solubilized by LSB. Only the soluble fractions, referred to as LS-AIMs (Laemmli Soluble-Acid Insoluble Matrix), were visualized on gels and the most insoluble fractions were not tested further. The preparations were cooled down on ice and shortly centrifuged before being applied on the top of the gel. Subsequently, gels were stained with Bio-Rad blue dye, silver nitrate [26] and carbocyanine, i.e., “Stains-all” [27].

#### 2.6. Fourier Transform Infra-Red Spectroscopic Characterization (FT-IR)

FT-IR spectroscopy allows the non-destructive characterization of chemical functions of a sample by passing an IR beam through it. It was performed to check both the shell mineralogy of *A. hians* and the overall chemical properties of the matrix fractions (ASM and AIM). Minute amounts of samples (shell powder  $\approx$  1–5 mg powder, freeze-dried chips of ASM and AIM  $\approx$  100–500  $\mu$ g) were analysed with an FT-IR Bruker Alpha spectrometer (Bruker Optics Sarl, Marne la Vallée, France) fitted with an Attenuated Total Reflectance (ATR) ALPHA-P device equipped with a mono-reflection diamond crystal in the 4000–375  $\text{cm}^{-1}$  wavenumber range (24 scans at a spectral resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$ ). The qualitative assignment of absorption bands was performed by comparison with previous spectra descriptions, achieved by our group or available in the literature. An additional spectrum was acquired from commercial crab chitin (Sigma, C9752).

#### 2.7. Solid State Nuclear Magnetic Resonance (SSNMR)

Solid-State NMR (SSNMR) is well suited to identify the occurrence and assess the composition of bioorganic matter within the inorganic matrix of intact shells or after demineralization. A specific advantage of  $^{13}\text{C}$  MAS NMR is that it holds out the prospect of quantification of the relative amounts of differing constituents of the sample, whether as whole shell or partial extract. An additional advantage is its ability to identify the structural forms of the calcareous inorganic matrix—crystalline and/or amorphous—and interactions with the bioorganics. [28,29].

$^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  Magic Angle Spinning (MAS) NMR measurements were carried out on 300 MHz solid state NMR Bruker AVANCE III spectrometer using a 4 mm triple-resonance MAS NMR probe with zirconia rotors. Samples were spun at  $10,000 \pm 2$  Hz. Cross polarization (CP) followed by chemical shift echo [30] was employed using  $\pi/2$  and  $\pi$  pulses of 5.0 and 10.0  $\mu$ s widths, and an echo interval of 100  $\mu$ s identical to the rotor period  $T_R$ ; TPPM  $^1\text{H}$  decoupling [31] with rf field strength of 100 kHz. The Hartmann–Hahn CP contact employed 1 ms and 2 ms duration and 50 kHz rf level for the X-channel ( $^{13}\text{C}$  and  $^{31}\text{P}$ , respectively) and 30–70 kHz ramped rf level for the  $^1\text{H}$  channel with. DE MAS spectra employed the same respective parameters. A sample of the AIM1 extract (20 mg), a lyophilized sample of the ASM1 extract (34 mg), and a sample of cleaned shell powder (110 mg) were packed in 4 mm rotors and their  $^{13}\text{C}$  and  $^{31}\text{P}$  CPMAS spectra were obtained by acquiring 2–70 k and 2–8 k transients, respectively, using a 3 s relaxation delay. The SSNMR signature of *Argonauta hians* AIM was compared to that of other shell matrices, including a chitinous matrix (*Spirula spirula*) and a proteinaceous one (*Arctica islandica*). A chitin spectrum was also acquired as a reference.

#### 2.8. In Vitro Interference Test with Calcium Carbonate

The effect of the ASM on the growth of calcium carbonate crystals was tested in vitro, as previously described [32,33]. In this assay, crystal growth was obtained by slow diffusion of  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  vapor into the  $\text{CaCl}_2$  solution. To this end, a 10 mM  $\text{CaCl}_2$  solution was prepared fresh, filtered (5  $\mu$ m) and used for serial dilutions of ASM in the range (0.5–32  $\mu$ g/mL). The solutions were incubated in a 16-well culture slide (Lab-Tek, Nunc/Thermo Scientific, Rochester, NY, USA), covered with a plastic cover, which had been pierced in the center of each well. The whole culture slide was sealed using parafilm “M” laboratory film (Neenah, WI, USA) and incubated for four to six days at room temperature in a desiccator containing ammonium bicarbonate crystals. Blank controls were performed without

ASMs. In parallel, a similar experience was performed on the ASM extract of *Spirula spirula* in order to compare its effect on calcification with that of *A. hians*.

Following the incubation, the wells were carefully dried by gently removing the solution via a blunt-ended syringe needle connected to a vacuum pump. Slides were dried at 37 °C and disassembled and the glass plate was directly observed using a TM1000 tabletop scanning electron microscope (Hitachi) in back-scattered electron mode. To guarantee the reproducibility of the results, the crystallization assay was performed 5 times, each time with a blank control and under the same conditions.

### 2.9. ELISA

ELISA assay allows quantifying the interaction of an antibody with an antigen, in the present case, the ASM in a microplate. The two batches of ASM (1 and 2) were checked for their ability to cross-react with 18 different antibodies developed against unfractionated or partly fractionated soluble shell matrices or against purified soluble shell proteins (see Table S1 for information on these antibodies, including their target antigens and their respective dilutions of use). In brief, the ASM, diluted in TBS buffer, was incubated in a Maxisorb 96-well microplate (Nunc TM, Rockslide, Denmark) at 37 °C for 90 min. The plate was subsequently rinsed (TBS/Tween) then blocked with 1% gelatin diluted in TBS (30 min) then with the antibody preparations. Each antibody was tested in quadruplicate. The microplate was rinsed, incubated 90 min at 37 °C with GAR-AP (goat anti-rabbit, alkaline phosphate) conjugate (1/30,000, Sigma ref. A3687). After extended rinsing step, the plate was developed with substrate buffer (aqueous solution of diethanolamine (10 mL) supplemented with 5 mg p-nitrophenyl phosphate). The microplate was read every 15 min at 405 nm on a multichannel microplate reader (Bio-Rad, model 680).

### 2.10. Westernblot

Westernblot combines SDS-PAGE and ELISA, by visualizing on a membrane (on which a gel was electro-transferred) macromolecules that cross-react with a given antibody. After SDS-PAGE migration under denaturing conditions, proteins were transferred for 80 min (intensity kept constant at 115 mA, starting voltage 50 V) to a polyvinylidene difluoride membrane (PVDF) following the “wet-blotting” protocol of Matsudaira [34]. The membrane was subsequently treated as follows: blocking with gelatin/TBS solution, incubation with the most cross-reacting antibody, the anti-P95 one (elicited against P95 protein from the nacre of the freshwater mussel *U. pictorum* [35], rinsing steps with TBS/tween (7 times), incubation with the secondary antibody (GAR-AP, Sigma, ref. A3687), rinsing steps with TBS/tween (7 times) and development with the chemoluminescent substrate CDP-Star. The signal was captured by contact with a X-Omat photo film (Kodak®) in a development cassette. Alternatively, the Western-blot membrane was incubated with Sigma Fast BCIP/ NBT (Sigma, ref. B5655) all-in-one tablets, until intense purple staining occurred. The staining was stopped by rinsing the membrane in water and drying it between two Whatman papers.

### 2.11. Immunogold Labeling

Immunogold labeling aims at visualizing in situ an antigen (directly on the sample surface), owing to a cross-reacting antibody, which is itself recognized by a secondary antibody coupled to gold particles. This experiment was performed from freshly broken shell fragments [36]. The samples were firstly etched with EDTA 1% for two min and then rinsed twice (2 × 5 min) with TBS. All incubation steps were performed in 12-well plates (MaxiSorp, Nunc™, Rockslide, Denmark) except the last silver-enhancement step performed in 96-well plates (MaxiSorp, Nunc™, Rockslide, Denmark). We used α-P95 antibody, similarly to the Western-blot assay. The shell fragments were blocked for at least 30 min in a filtered (5 μm) gelatin solution (1% w/vol) diluted in TBS, pH adjusted to 8 with NaOH. The shell fragments were incubated overnight in TBS/gelatin (0.5% wt/vol)/Tween 20, pH 8 containing the first antibody (α-P95; dilution 1:1500). The samples were thoroughly rinsed 10 times with TBS/Tween20 and incubated 90 min with a goat anti-rabbit antibody conjugated to 5 nm gold

particles (British Biocell International, ref. EM. GAR5, diluted 100 times). The shell fragments were thoroughly rinsed with TBS/Tween20 and the gold particle size was further increased, by incubation in a two components silver-enhancing solution (British Biocell International, ref. SEKL15) for 15 min. The samples were rinsed with ultrapure water, dried, and directly observed with a Hitachi TM1000 SEM. The experiment was performed four times. In each experiment, 4 negative controls were undertaken: one without first antibody, one without the second one, one without both of them, and a complete blank (without any treatment).

### 2.12. Enzyme-Linked Lectin Assay (ELLA)

Enzyme-Linked Lectin Assay (ELLA) is based on the same principle as ELISA, except that the tested antibodies are replaced by lectins, proteins that target specific sugar structures. Screening of *Argonaut* ASMs by Enzyme-Linked Lectin Assay (ELLA) was performed using a set of 21 biotinylated lectins (Vector Labs, Kits I to III, BK-1000, BK-2000, BK-3000). The binding preferences and specificities of each lectin are indicated in the supplementary information of an earlier publication [37].

The test was carried out in 96-well microplates (MaxiSorp, Nunc™, Rockslide, Denmark): the *Argonauta* ASM diluted in TBS buffer (200 ng/well) was incubated for 90 min at 37 °C, immediately followed by three washing steps with TBS/Tween20. Wells were blocked with 1X concentrated Carbo-free blocking solution (Vector Labs, ref. SP-5040) for at least 30 min at 37 °C. The diluted lectins (in TBS/Tween20) were incubated into the microplate for 90 min at 37 °C, at the following dilution factors: 200 times for kits I and II, and 100 times for kit III. After three washes with TBS/Tween20, the microplates were incubated with a diluted solution of avidin-alkaline phosphatase conjugate (1:70000, ref. Sigma A7294, St. Louis, MO, USA) for 90 min at 37 °C, for the detection of bound biotinylated lectins. They were then washed five times with TBS/Tween20 and revealed with a substrate solution containing aqueous diethanolamine (9.7% vol/vol, pH adjusted to 9.8 with HCl) and phosphatase substrate (0.5 mg/mL, pNPP Tablet, Sigma, St. Louis, MO, USA). The microplates were read at 405 nm every 15 min (BioRad Model 680, Hercules, CA, USA). A check of the background signal without ASM, lectin or Avidin-AP showed no reaction with the substrate solution. This test was performed with quadruplicates of each lectin and the results were normalized and translated in percentages of reactivity by subtracting the background and considering the highest response as 100%. The test was performed three times.

### 2.13. Lectin-Gold Labeling

Lectin-gold labeling consists in localizing in situ, directly on shell surfaces, sugar structures with a given lectin. Following the ELLA results, lectin-gold labeling was performed with shell fragments, which were previously etched with EDTA 1% for two min and then rinsed twice with TBS 1x, for 5 min each time. This test was carried out in 96-well plates (MaxiSorp, Nunc™, Rockslide, Denmark). A specific lectin used for this in situ labeling was chosen on the basis of the previous ELLA results: the most reactive lectin, i.e., concanavalin A (ConA) was used. Following the protocol of Kanold et al. [37], the shell fragments were blocked with a CarboFree solution (ref. above) at least one hour, then incubated overnight with the diluted biotin-conjugated lectins (1:100), thoroughly rinsed 5 times with TBS/Tween20, and incubated for 2 h with a goat anti-biotin antibody conjugated with ultrasmall 0.8 nm gold particles (Aurion, Wageningen, The Netherlands, ref. SKU: 100.088, dilution × 100). The shell fragments were thoroughly rinsed with TBS/Tween20 and the gold particle size was further increased, by incubating the shell fragments in a two components silver-enhancing solution (British Biocell International, ref. SEKL15) for 15–20 min. The samples were then rinsed, dried and directly observed with a Hitachi TM1000 SEM.

### 2.14. Proteomic Analysis of the Shell Extracts

The aim of proteomics is the identification of proteins in a complex mixture, after their enzymatic digestion. The resulting peptides are analysed by tandem mass-spectrometry. Their signature is

compared to that of databases, in order to infer the protein content of the sample. MS/MS analyses were conducted on the four unfractionated bulk matrices, ASM and AIM, which were digested in-gel, after a short migration in an 12% acrylamide gel stained with colloidal Coomassie blue. In-gel digestions were carried out with trypsin. Samples were de-stained twice with a mixture of 100 mM ammonium bicarbonate (ABC) and 50% (v/v) acetonitrile (ACN) for 30 min at 22 °C and then dehydrated using 100% ACN for 15 min, before being reduced with 25 mM ABC containing 10 mM DTT (dithiothreitol) for 1 h at 56 °C and alkylated with 55 mM iodoacetamide in 25 mM ABC for 30 min in the dark at 22 °C. Gel pieces were washed twice with 25 mM ABC and dehydrated (twice, 20 min) with 100% ACN. Gel cubes were incubated with sequencing grade modified trypsin (Promega, Madison, WI, USA; 12.5 ng/μL in 40 mM ABC with 10% ACN, pH 8.0) overnight at 37 °C. After digestion, peptides were extracted twice with a mixture of 50% ACN–5% formic acid (FA) and then with 100% ACN. Extracts were dried using a vacuum centrifuge Concentrator plus.

Mass spectrometry (MS) analyses were performed on a Thermo Fisher Scientific U3000 RSLC nano-LC system coupled to an Orbitrap Fusion Tribrid mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). After drying, peptides were solubilized in 10 μL of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) containing 10% acetonitrile (ACN). One μL was loaded, concentrated and washed for 3 min on a C<sub>18</sub> reverse phase precolumn (3 μm particle size, 100 Å pore size, 75 μm inner diameter, 2 cm length from Thermo Fisher Scientific). Peptides were separated on a C<sub>18</sub> reverse phase resin (2 μm particle size, 100 Å pore size, 75 μm inner diameter, 25 cm length from Thermo Fisher Scientific) with a 1 hour gradient starting from 99% of solvent A containing 0.1% FA in H<sub>2</sub>O and ending in 90% of solvent B containing 80% ACN, 0.085% FA in H<sub>2</sub>O. The mass spectrometer acquired data throughout the elution process and operated in a data-dependent scheme with full MS scans acquired with the Orbitrap, followed by MS/MS HCD (higher-energy collision-induced dissociation) fragmentations acquired with the Ion Trap on the most abundant ions detected in top speed mode for 3 s. Resolution was set to 60,000 for full scans at AGC target  $2 \times 10^5$  within 60 ms maximum injection ion time (MIIT). The MS scans spanned from 350 to 1500 m/z. A precursor selection window was set at 1.6 m/z, and the MS/MS scan resolution was set with AGC target  $2 \times 10^4$  within 100 ms MIIT. HCD Collision Energy was set at 30%. Dynamic exclusion was set to 30 s duration. For the spectral processing, the software used to generate .mgf files was Proteome Discoverer 1.4 (ThermoFisher Scientific). The mass spectrometry data were analyzed using Mascot v2.5 (Matrix science) on “Other Metazoa” (11,084 sequences) from the SwissProt databank containing 559,634 sequences; 201,129,965 residues (April 2019). A second search was performed, against the transcriptome of the Ram’s Horn squid *Spirula spirula* (Sequence Read Archive (SRA) accession reference PRJNA302677), as well as against the genome of *Octopus bimaculoides* (SRA accession reference PRJNA270931). In each case, the enzyme specificity was Trypsin’s and up to 1 missed cleavage was tolerated. The precursor mass tolerance was set to 4 ppm and the fragment mass tolerance to 0.56 Da for fusion data. Carbamidomethylation of cysteins residues and oxidation of methionines residues were set as variable modifications.

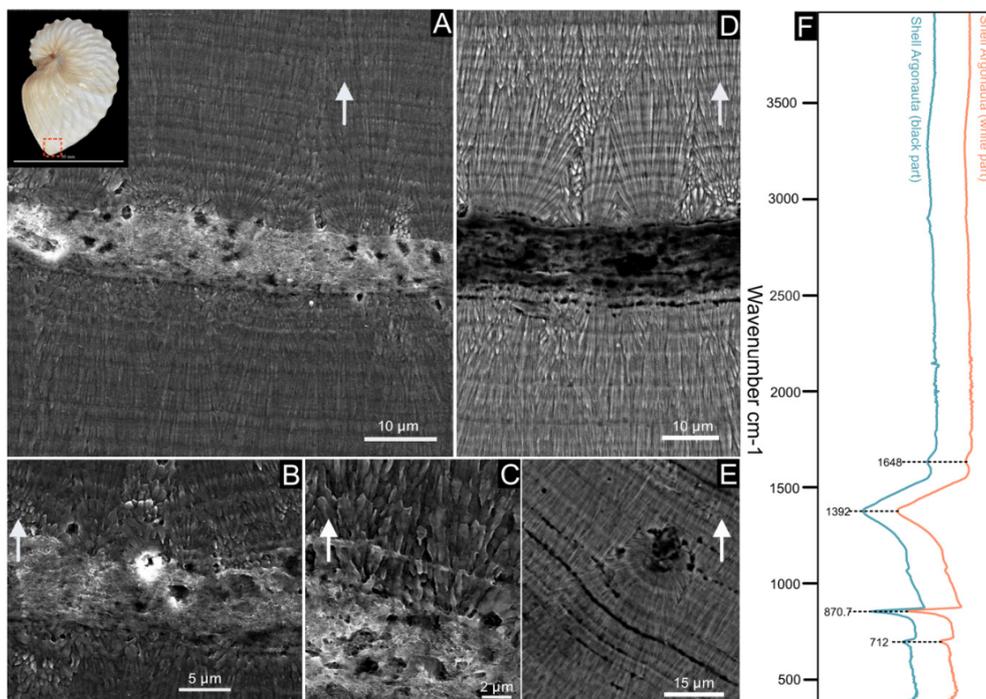
We are fully aware that proteomics, when performed alone, i.e., without the support of a transcriptome constructed from the calcifying tissue of the same species, gives less information than when the proteomics/transcriptomics approaches are coupled. However, it gives a peptidic fingerprint and a first overview of a matrix content. Because of this limitation, the stringency of in silico analyses is lower; consequently, some results may be moderately significant and should be confirmed by subsequent analyses.

### 3. Results

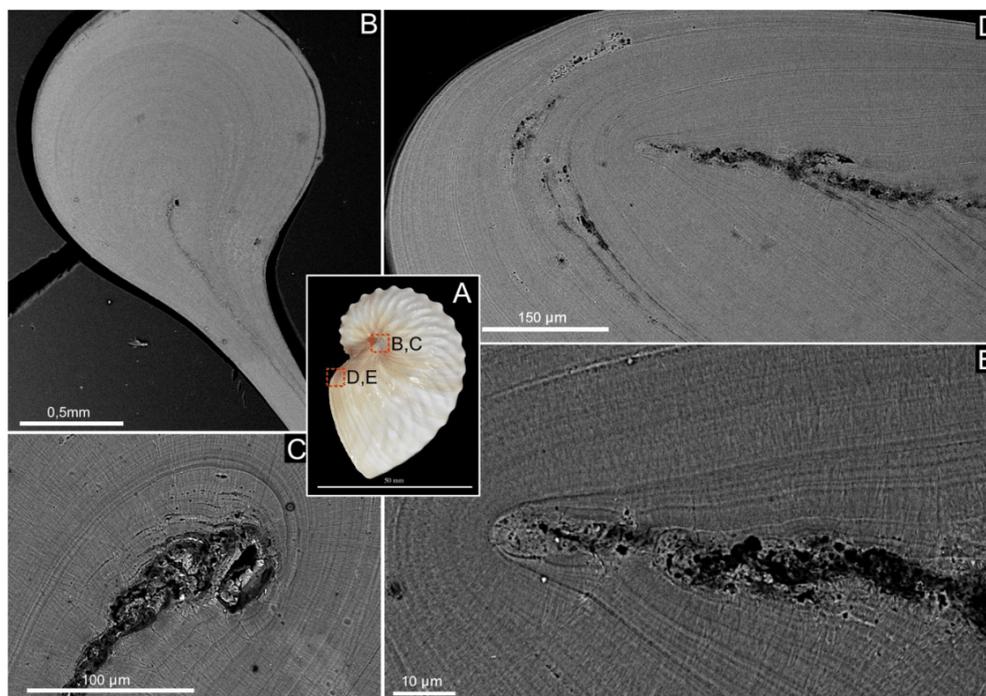
#### 3.1. Shell Microstructures

The shell of *Argonauta hians* is entirely calcitic, as shown by the IR spectrum depicted in Figure 2, and which displays in particular a single absorption band at 712 cm<sup>-1</sup> ( $\nu_4$  CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, C–O in plane bending), a sharp band at 870 cm<sup>-1</sup> ( $\nu_2$  CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, out-of-plane bending) and a broad band at 1392 cm<sup>-1</sup> ( $\nu_3$  CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>,

asymmetrical stretching) [38]. SEM observations of the shell microstructure (Figure 2) confirmed that the shell consists of one central thin “core” layer and, from either side, of two thick layers of thin calcite fibers. The core layer is irregular in thickness (from 9 to 27  $\mu\text{m}$ ) and sinuous. Observations in back-scattered electron mode show that it is darker than the adjacent calcitic ones, suggesting a partly organic nature. At the interface between the core and the mineralized layers, needles emerge from spherulites, i.e., bundles of radiating needles that grow from one spot. Each spot is separated from its closest neighbors by a quasi-invariant distance of 8–10 microns. Both fibrous layers vary in thickness. Around the enrollment axis, the shell appears macroscopically thicker and stronger (personal observations). There, an equatorial section of the shell evidences the starting point of the central core, which is wrapped by the fibrous calcite (Figure 3). On the aperture of the shell, on the dorsal side, one observes the central core edge, which gets progressively occluded into the calcite. This occlusion appears as a two-steps process: first, the formation of a calcite bevel on each side of the organic core; then the overall structure is wrapped in a continuous layer of calcite. Finally, the protuberances of the hull are not formed by the local thickening of the outer layer but correspond to a hollow ornamentation of the shell.



**Figure 2.** Shell microstructure of *Argonauta hians*. The localization of the following pictures is indicated in the shell, illustrated at the left top corner of the figure. (A) General view of the shell wall, showing two layers of fibrous calcite separated by a central core. (B,C) Close-up view of the interface between the central core and the calcitic layers, showing the gradual transition from a spherulite into fibers (C). (D) Magnification of the central core (in back-scattered electron mode), which appears darker than the two calcitic layers. This suggests a higher content of organic material. (E) Illustration of a depositional accident, showing the re-initialization of the mineralization from a spherulite to fibers. (F) FT-IR spectra of the shell powder of the white and black parts of the keel. The white arrows indicate the exterior of the shell.



**Figure 3.** Shell microstructure of *Argonauta hians*. (A) Lateral view of the shell illustrating the two different locations of the following pictures. (B) General view of the enrolment axis of the shell. (C) Magnification (back-scattered electron mode) of the birth of the central core wrapped by the fibrous calcite. (D) General view of the aperture of the shell, on the dorsal side, showing the edge of the central “core” and the calcitic material surrounding it. (E) Close-up view of the edge of the central core, showing that this layer is sandwiched, on either side, by a calcite bevel and finally wrapped in a continuous layer of calcite.

### 3.2. Quantification of the Organic Matrix in the Shell

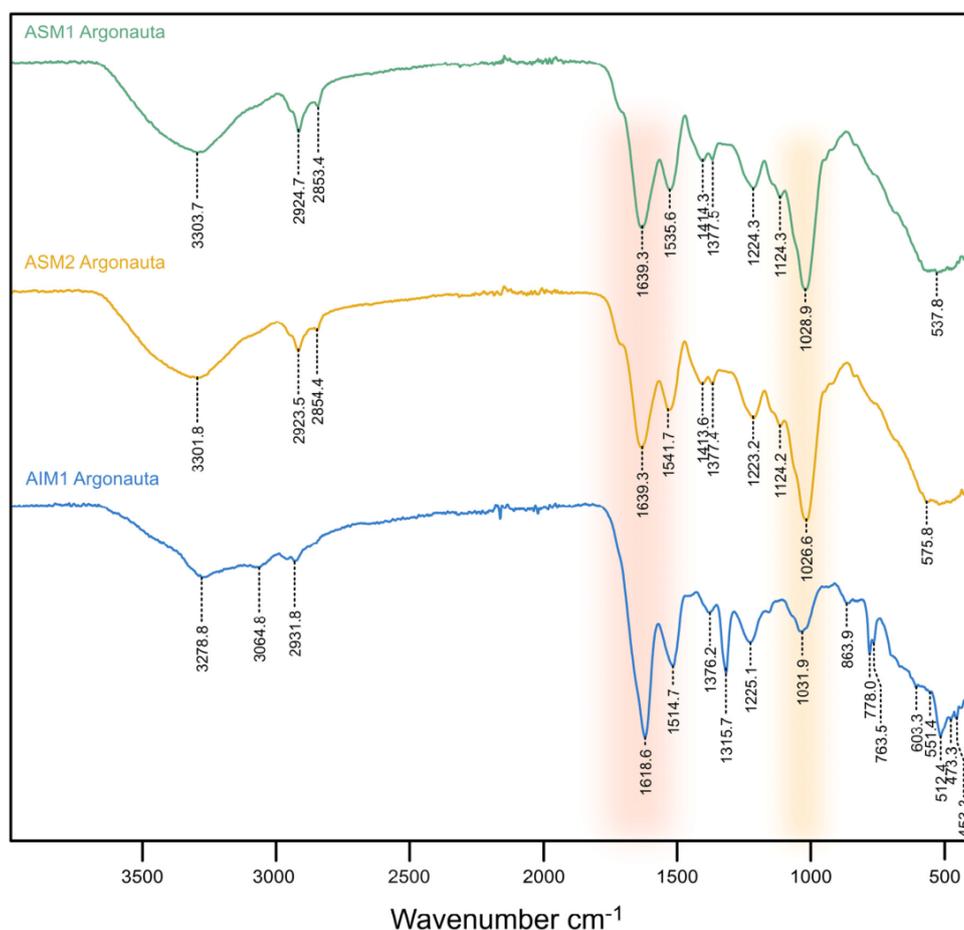
Matrix quantification of the extraction is shown in Table 1. Three shell batches were used, and the first one—used for proteomics—was subdivided in one and two bleaching steps. Batches two and three were bleached once. The second bleaching step affected mainly the insoluble matrix, which drastically collapsed. After one bleaching, we observed that the amount of soluble matrix is slightly higher than that of the insoluble one: (0.93 to 1.05 versus 0.73 to 0.85). In total, the matrix accounts for almost 1.8% of the shell weight. All three extractions give completely congruent results.

### 3.3. FT-IR Spectroscopy

FT-IR (ATR) spectra, acquired on both extracts of AIM and ASM fractions are summarized in Figure 4. The AIM2 extract was not analyzed due to a low amount of materials and was kept for further analyses. In the (2500–4000  $\text{cm}^{-1}$ ) range, all samples exhibit one broad band around 3300  $\text{cm}^{-1}$ , usually assigned to the amide A group ( $\nu(\text{N-H})$ ) [39]. A low amplitude enlarged band, around 2925  $\text{cm}^{-1}$  is also observed, corresponding to  $\nu(\text{C-H})$  stretching vibrations.

The extracts show comparable spectra and a good similarity in the distribution of their absorption bands. All spectra clearly exhibit the presence of amide absorption bands at 1639 (ASM2)/1618  $\text{cm}^{-1}$  (AIM1) and 1541 (ASM2)/1536 (ASM1)/1514  $\text{cm}^{-1}$  (AIM1), respectively, assigned to the Amide I ( $\nu(\text{C=O})$ ) and II ( $\nu(\text{C-N})$ ) bands that characterize protein moieties. In addition, the spectra also express a high-intensity absorption band at 1026 (AIM2)/1029 (AIM1)/1031  $\text{cm}^{-1}$  (AIM1) attributed to  $\nu(\text{C-O})$  stretching vibration and associated with the presence of saccharidic moieties. In both ASM and AIM extracts, a series of medium intensity bands are also present between 1450 and 1100  $\text{cm}^{-1}$ . Bands at

1414  $\text{cm}^{-1}$  (ASM1-2) can be attributed to  $\delta(\text{C-H})$  scissoring vibration while those at 1223 (ASM2), 1224 (ASM1) and 1225  $\text{cm}^{-1}$  (AIM1) are assigned to amide III vibrations (CN stretching, NH bending). Moreover, the weak bands at 1124  $\text{cm}^{-1}$  (ASM1-2) associated to the absorptions pointed at 537 and 576  $\text{cm}^{-1}$  (shoulders), suggest the presence of phosphate groups ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) [40] and can be related to P–O stretching and O–P–O bending vibrations, respectively [41]. Note that ASM1 and ASM2 spectra are almost superimposable and exhibit the same distribution of absorption bands with similar intensities, with only slight shifts. In the [1700–900  $\text{cm}^{-1}$ ] range, the AIM1 spectrum shows the same absorptions as the two ASMs but with different intensities. In the [900–450  $\text{cm}^{-1}$ ] range, the AIM spectrum differs notably, showing in particular a doublet at 778 and 763  $\text{cm}^{-1}$  and a sharp band at 512  $\text{cm}^{-1}$ . On the basis of bibliographic data, such a fingerprint could correspond to  $\nu(\text{Si-O})$  stretching vibrations which are typically observed on the infrared spectrum of  $\alpha$ -quartz [42].

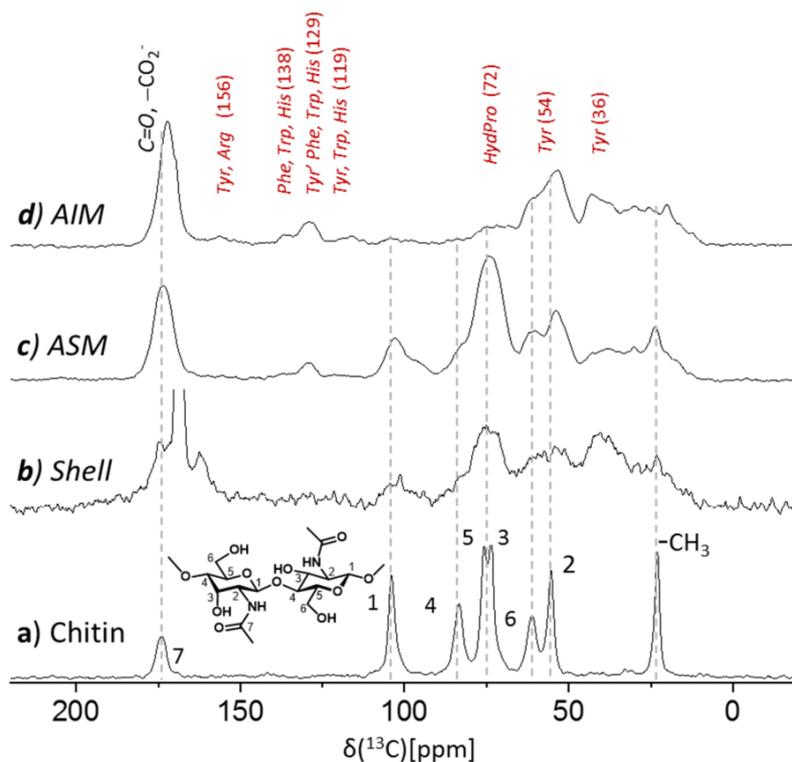


**Figure 4.** FT-IR spectra of three shell extracts acquired in Attenuated Total Reflectance mode (ATR). Note that the two ASMs, in spite of the extended bleaching treatment for ASM2, are almost superimposable. Due to low quantity, AIM2 could not be analyzed.

### 3.4. Solid State Nuclear Magnetic Resonance

The  $^{13}\text{C}$  DE MAS NMR spectrum (Figure S1) of the cleaned shell sample (110 mg) shows the carbonate 168.5 ppm peak, hence confirming the polymorph identity of the shell as calcite only. Its  $\sim 1$  ppm peak width (compared to 0.15 ppm in e.g., coccoliths [43]) suggests that the calcite lattice may be disrupted by occlusion of bioorganics and/or inorganics such as  $\text{Mg}^{2+}$  as is often found for biogenic calcite. The  $^{13}\text{C}$  CPMAS technique exposes only carbon species proximate to hydrogen

atoms. Hence, the  $^{13}\text{C}$  CPMAS spectrum of the shell shows a strong and broadened (1.5 ppm) interfacial carbonates peak (Figure S2b) arising from carbonates which are proximate to bioorganic and water content, consistent with the broadened peak width seen in the DE MAS spectrum above and substantiating the effective incorporation of bioorganic matter within the calcitic matrix. The entire bioorganic content of the shell is straightforwardly seen in this CP MAS spectrum (Figure 5) showing contributions (broad resonance peaks) from proteinaceous and (oligo)saccharide content. Identification of the components comprising this content may be refined by examining separately the contributions from the acid-insoluble and acid-soluble fractions.



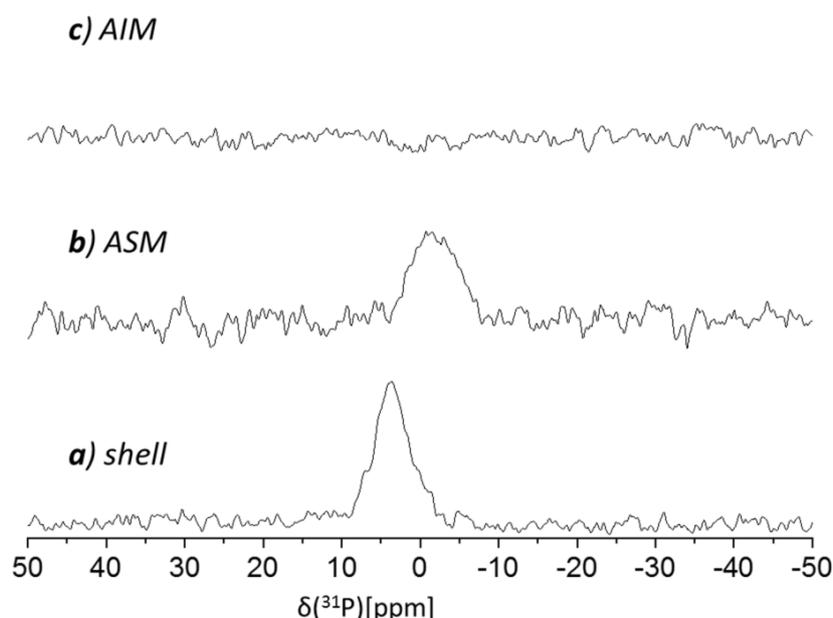
**Figure 5.** 75.4 MHz  $^{13}\text{C}$  CPMAS spectra of (a)  $\alpha$ -chitin standard (shrimp), (b) the cleaned shell of *Argonauta hians* (vertically extended), and of its extracts (c) acid soluble and (d) acid insoluble matrices (AIM1 and ASM1). AIM of *A. hians* shells is primarily proteinaceous content while (oligo)saccharides (characteristic shifts of chitin indicated by the dashed line), if present, comprise less than a 10% fraction. ASM exhibits a pronounced oligosaccharide(s) content and less pronounced proteinaceous content.

The  $^{13}\text{C}$  CP MAS NMR spectrum of the acid insoluble extract of *Argonauta hians* (AIM1, 20 mg; Figure 5d) exposes dominant proteinaceous content (~90%). The absence of pronounced peaks of oligosaccharides is inferred by comparison to the spectrum of chitin (Figure 5a and Figure S3d), a characteristic representative of polysaccharides implicated in biomineralization, so ruling out high oligosaccharides abundance in the AIM1 fraction. The pronounced amide peak centered at 170 ppm in this spectrum clearly substantiates the predominance of the proteinaceous content. The crowded aliphatic carbons region (15–80 ppm), including the alpha and most beta carbons, does not allow residue-by-residue assignment (Figure 5d). The resolved and less crowded aromatic region peaks (e.g., 129 ppm) suggest the occurrence of the aromatic amino acids (e.g., tyrosine) while the broad peak centered at 72 ppm may arise from either hydroxyprolines and/or polysaccharides. Different from *A. hians*, the bio-organic content of the AIM of the shell of *S. spirula* (Figure S3c)—another member of the cephalopod class—was shown as being dominated by chitin and possibly other oligosaccharides with only a minor proteinaceous content [28]. For comparison we also show the  $^{13}\text{C}$  CPMAS spectrum

of the AIM of *Arctica islandica* (Figure S3b)—a bivalve whose shell acid insoluble matrix is protein-rich (~90:10 proteins versus saccharides) [29].

The  $^{13}\text{C}$  CPMAS spectrum of the acid soluble matrix (ASM1, lyophilized; Figure 5c) shows a different bioorganic composition than that seen for the AIM. While a similar proteinaceous content still appears, there is a notable contribution from oligosaccharide(s) component as seen by the broad peaks at identical and/or similar chemical shifts as of the chitin reference. As chitin is insoluble, these oligosaccharides may be attributed to chitosan or GAGs (vide infra) that additional to sulfates also possess the same N-acetyl sidechains as chitin and would potentially have similar CP MAS spectrum [44]. The excessive width of the peaks in this spectrum is primarily a result of the lyophilization step, which hampers the resolution, nevertheless exposes the gross content information.

Our  $^{31}\text{P}$  CP MAS NMR spectrum of the cleaned shell (Figure 6a) showed a notable peak centered at 3.5 ppm; as a phosphate peak is exhibited by the ASM fraction however absent in the AIM spectra (Figure 6a and 6c, respectively), this suggests the ASM contains organo-phosphate. Low molecular weight P-content (including  $\text{P}_i$ ), if occurring in either fraction, would have been removed by the extraction procedures. We have previously reported similar  $^{31}\text{P}$  peaks for decalcified mollusc shells [29], and also, here we ascribe this peak to represent phosphorylation, most likely of tyrosine and/or serine side chains. Interestingly, while P-content in *A. hians* is present in the soluble matrix (ASM), in *Spirula spirula* it was found in the insoluble matrix (AIM) [28].



**Figure 6.** 121.85 MHz  $^{31}\text{P}$  CP MAS NMR spectra of the *Argonauta hians* shell extracts: (a) cleaned shell, (b) acid soluble matrix (ASM) and (c) acid insoluble matrix (AIM).

### 3.5. Quantification of Total Sugars and Sulfated GAGs in the ASM

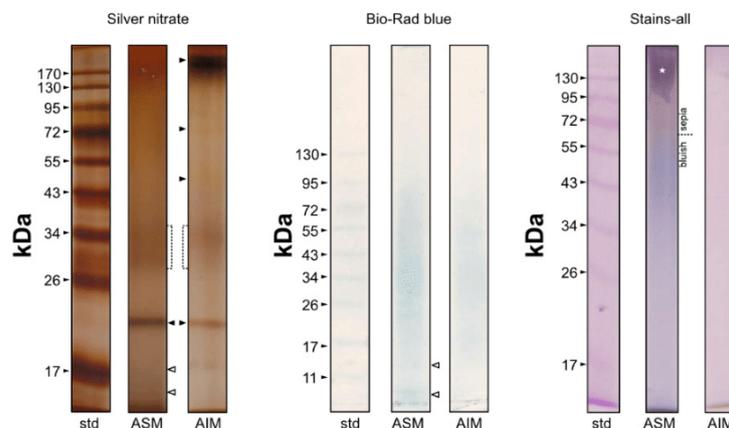
The quantification of total sugars and of sulfated glycosaminoglycans is shown in Table 2. The use of glucose and maltose for establishing the calibration curve indicates that the ASM contains between 7 and 12% (per weight) of total sugars, with all the rest being proteins. In addition, the colorimetric quantification of sulfated glycosaminoglycans indicates that these components are present in a similar percentage range (7 to 12%), which suggests that most of the saccharides of the ASM are actually sulfated GAGs.

**Table 2.** Quantification of the sugar content of the soluble shell matrix of *A. hians*. The upper panel depicts the total sugar quantification (based on two standards, glucose, and maltose) while the lower one indicates the concentration of sulfated glycosaminoglycans (GAGs).

Total Sugar Determination		
% of the Whole Matrix		
Standard	% min	% max
Glucose	4	10.7
Maltose	6	11
Sulfated Glycosaminoglycan Determination		
Chondroitin-4-sulfate	9	12

### 3.6. SDS-PAGE of the Shell Matrix Extracts

The results obtained after migration of extracts are illustrated in Figure 7. On silver-stained gels, the ASM is characterized by a smear, a main sharp band at 19 kDa and a diffuse zone between 28 and 38 kDa, where at least two blurred bands can be distinguished but these are not individualized enough for establishing their exact apparent molecular weight. One guesses that two additional bands (symbolized by white arrows) are present at the bottom of the gel, the first one around 17 kDa and the second one, below. The top of the gel is more densely stained but without any apparent band. The Bio-Rad blue staining identifies a smear with the maximal staining around 34 kDa. The 19 kDa band is not stained at all, while the two “bottom” bands can be distinguished. Carbocyanine dyes does not reveal any band but a smear, sepia in the top of the gel (until around 60 kDa) and bluish below 60 kDa, with a maximal intensity around 40–50 kDa. The top of the gel is characterized by a slimy purple stain (symbolized by a white star), always observed in our different attempts.



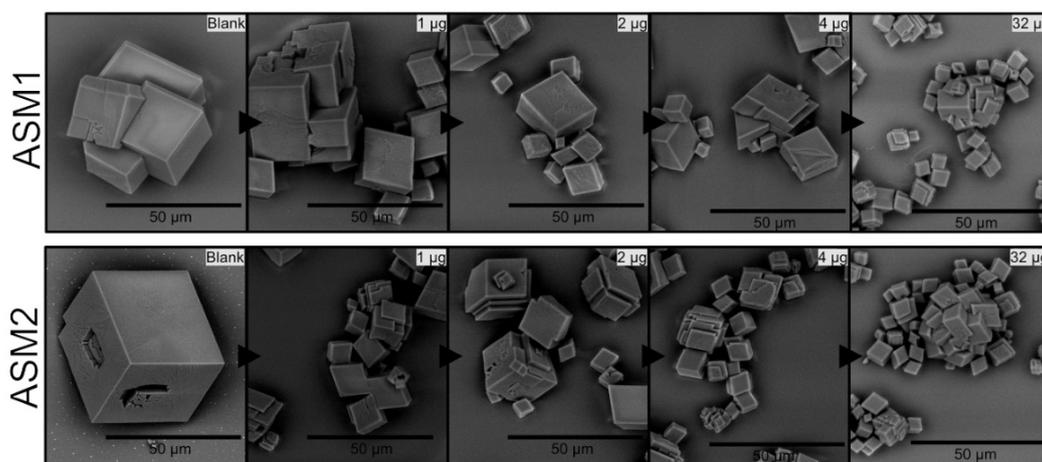
**Figure 7.** Monodimensional gel electrophoresis of shell extracts of *Argonauta hians* (ASM and Laemli-soluble AIM). Silver nitrate (left), Bio-Rad Blue (middle) and carbocyanine (right) staining were applied. The arrows point out discrete bands while the white star indicates the slimy purple stain obtained with carbocyanine on ASM.

On silver-stained gels, the AIM electrophoretic profile resembles that of ASM, with a prominent band at 19 kDa, a smearing pattern along the whole lane and a denser staining between 30 and 35 kDa. A few differences are also observed: the top of the lane is densely stained dark brown around 170–180 kDa; two discrete bands are observed at 71 and 46 kDa, respectively. AIM stains poorly with Bio-Rad blue dye, and in a similar manner as the ASM. Finally, Stains-all evidences only a light pinkish smearing, more densely stained in the top of the gel while the migration front is stained brown.

At last, a few attempts with PAS (Periodic Acid Schiff) staining (not shown here) failed to emphasize the presence of any saccharide moieties. Only a blurred signal was obtained for ASM, at a very high molecular weight (>170 KDa).

### 3.7. In-Vitro Crystallization Assay

The effect of the ASM extract of *A. hians* on calcium carbonate crystallization was tested in the range (0.5–32 µg/well). Figure 8 shows only a few concentrations (1, 2, 4, 32 µg/well). Up to 1–2 µg/well, we do not detect any effect. From 4 to 32 µg/well, the main effect lies in the size reduction but the polycrystals remain unchanged in their shape (e.g., no rounded angles). One can observe that no significant difference can be noticed between ASM1 and ASM2. In general, the two soluble matrices exert weak effects, even at high concentrations.



**Figure 8.** *In vitro* crystallization of calcite in the presence of ASM1 (top panel) and of ASM2 (lower panel) extracted from *Argonauta hians* shell. Note that both extracts exert moderate effects, even at high concentrations.

### 3.8. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Table 3 gives the cross-reactivity of the soluble extract 1 (ASM1) with a set of 17 polyclonal antibodies developed in our lab. These latter elicited against unfractionated or fractionated matrices, or against purified shell proteins, cover very different reactivity patterns, from narrow (anti-mucoperlin) to broad (K5087, K4952). Only one antibody cross-reacted with ASM1: that elicited against the P95 soluble protein of the nacreous layer of the freshwater mussel, *Unio pictorum*. This antibody was subsequently used for Western blotting and for immunogold staining.

**Table 3.** ELISA test on the ASM of *A. hians*. The matrix was tested against 17 polyclonal antibodies raised against diverse mollusc shell fractions or purified proteins (see Supplementary Table S1). XXX = >80% cross-reactivity; XX = 50–80% cross-reactivity; – = <10% cross-reactivity.

Antibody Names	Cross-Reactivity
K5087	–
K5088	–
K5089	–
K5090	–
K4772	–
K4951	–
K4952	–

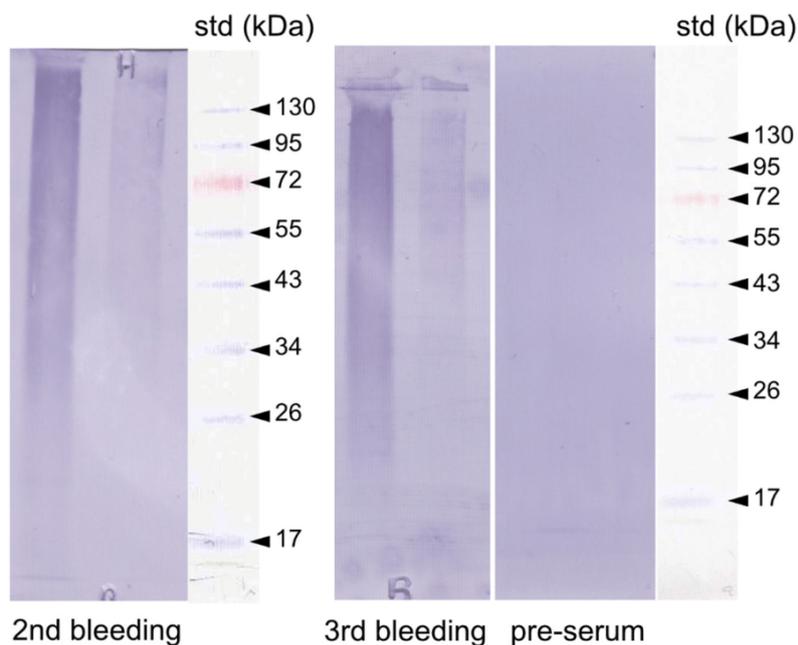
Table 3. Cont.

Antibody Names	Cross-Reactivity
Preserum $\alpha$ -caspartin	–
$\alpha$ -caspartin 17	–
$\alpha$ -calprismismin 37	–
$\alpha$ -mucoperlin	–
$\alpha$ -crassostrein	–
$\alpha$ -prism Pmarg	–
$\alpha$ -nacre Pmarg	–
$\alpha$ - <i>Mytilus</i> SM	–
$\alpha$ -N63	–
$\alpha$ -ASM deg. <i>Upict</i> J39	–
$\alpha$ -ASM deg. <i>Upict</i> J55	–
$\alpha$ -P95 J53	XXX
$\alpha$ -P95 J62	XX

XXX: >80% XX: 50–80% –: <10%.

### 3.9. Westernblot

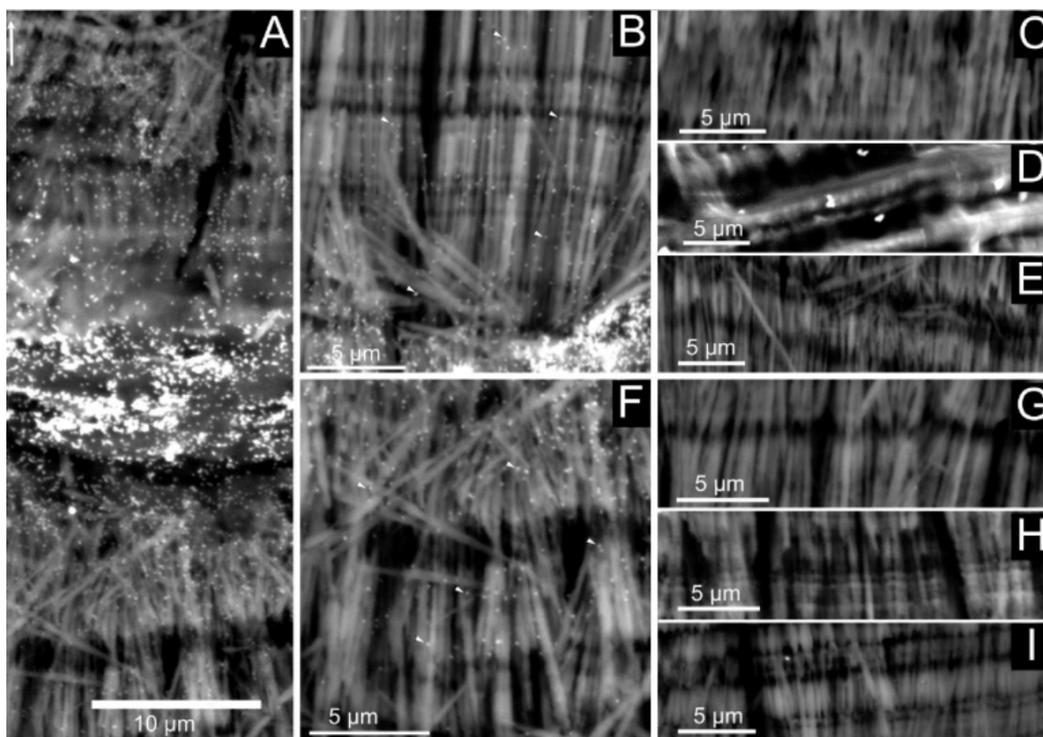
Following the ELISA results, we performed a Western-blot of the two extracts (AIM1, ASM1), which were allowed to react with the anti-P95 antibody (1st and 3rd bleeding). The results are shown in Figure 9. A marked staining is evidenced in both extracts, with a higher intensity in the ASM. In both cases, the reactivity is characterized by a smear, which is more pronounced towards high molecular weights. None of the discrete bands observed in the SDS-PAGE are visible.



**Figure 9.** Western-blot of the ASM1 and laemmli soluble-acid insoluble matrix (LS-AIM1) extracts of the shell of *Argonauta hiants*. The blotted extracts were incubated with a polyclonal antibody preparation (2nd and 3rd bleeding) elicited against a protein fraction, P95, identified in the soluble shell matrix of the freshwater mussel, *Unio pictorum*. The membrane was stained with BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitro blue tetrazolium). The pre-immune serum was used as negative control. Right sides: molecular weight standards.

### 3.10. Immunogold Labeling

We performed immunogold with anti-P95 polyclonal antibody. The data are illustrated by Figure 10. In this test, bright white spots (approx. diameter 100 nm) localize gold/silver particles bound to the secondary antibodies that target the primary antibodies, which, in turn, target specific shell matrix proteins, the biochemical identity of which is still unknown. Figure 10A (left panel) shows that most of the signal is concentrated along the central core of the shell but some sparse spots are also observed on either calcitic side. The signal however decreases towards the external shell surfaces (not shown). In the calcitic fibrous layers, near the central core, the spot distribution is relatively homogeneous, i.e., does not exhibit any peculiar pattern, in relation to the microstructure (Figure 10B,F). The right panel (Figure 10C-E,G-I) corresponds to different negative control preparations, which are invariably unmarked.



**Figure 10.** Immunogold labeling of shell preparations with anti-P95 antibody. The left panel (A) shows a general view of the shell wall, while the middle panel represents magnification of the outer (B) and inner (F) layers. The right panel corresponds to different negative controls, namely without the first antibody (anti-P95; C,G), without the second antibody GAR-AP (Goat anti-Rabbit, conjugated to alkaline phosphatase, D,H) and an absolute blank (E,I). An intense staining is observed in the central “core” layer (A), while the staining is more diffuse in the surrounding fibrous layers (B,F).

### 3.11. Enzyme-Linked Lectin Assay (ELLA)

The results, condensed in Table 4, summarize the outcome of eight different experiments that produced similar reactivity patterns. Three categories of lectins were identified according to their reactivities to the ASM: Those which give positive but moderate reactivities (-++); enter this category DSL, Concanavalin A and WGA. Those that give weak reactivities (-+); they include SBA, PHA-L, SJA, succinylated WGA, GSL II, jacalin, LEL and STL. At last, those which are completely unreactive (—), including ten remaining lectins. Among the three lectins that exhibit the highest reactivities, DSL targets trimers, dimers and monomers of-acetylglucosamine, while concanavalin A is a mannose-binding lectin

that targets N-linked glycoproteins; WGA has strong affinity with chitin oligomers, similarly to DSL. Strangely, in none of our eight experiments did we find a lectin that gave high reactivity, a phenomenon that we always observed with other shell extracts. In every case, we observed that the test developed slowly, a fact that persuaded us to increase the amount of matrix to use per well (from 200 ng to 900 ng), for obtaining lectin responses of higher amplitude. These experiments tend to show that the acetic acid-soluble matrix of *A. hians* is rather poor in sugar moieties.

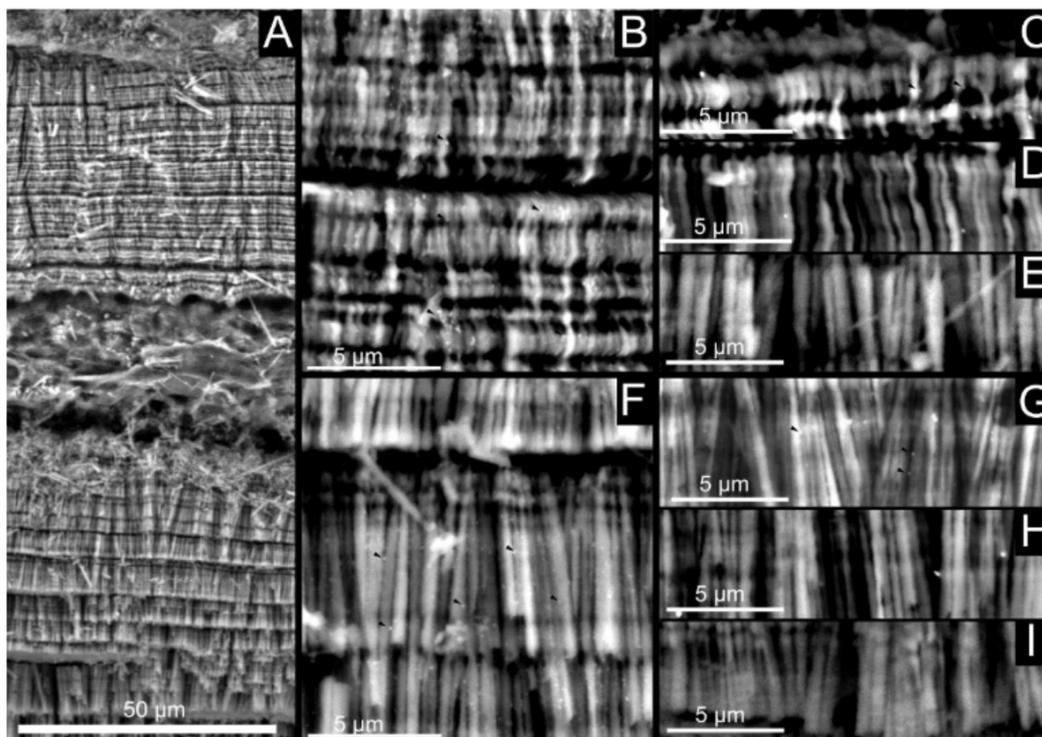
**Table 4.** Enzyme-Linked Lectin Assay (ELLA) test on the ASM of *A. hians*. The matrix was tested against 21 biotinylated lectins, expressed in absolute reactivity values of the optical density. --- = < 0.28 Optical Density (OD); --+ = 0.28 < OD < 0.33; -++ = 0.33 < OD < 0.44.

Lectins	Reactivity (Based on Absolute Value of The Optical Density)
ConA	- + +
SBA	-- +
WGA	- + +
DBA	---
UEA 1	---
RCA	---
PNA	---
GSL 1	---
PSA	---
LCA	---
PHA-E	---
PHA-L	-- +
SJA	-- +
succ-WGA	-- +
GSL 2	-- +
DSL	- + +
ECL	---
Jac	-- +
LEL	-- +
STL	-- +
VVA	---

---:  $X < 0.280$ ; --+:  $0.280 < X < 0.330$ ; -++:  $0.330 < X < 0.440$ .

### 3.12. Lectin Gold Labeling

The results of the lectin gold labeling are shown in Figure 11. The left panel (Figure 11A) is a general view of the shell cross-section, marked by the central organic layer. The central panel corresponds to a magnification of the upper and lower layers (Figure 11B,F), and the right one (Figure 11C–E,G–I), to different negative controls (respectively, from top to bottom, without ConA, without GABIO, and an absolute blank). Because the spots are tiny (approx. 100 nm), we have indicated the position of few of them by black arrows. The labeling is not continuous—i.e., the spots are not aligned with the depositional surfaces of the calcite fibers—but rather disperse among the fibers. We observed that the labeling tends to be more pronounced aside the central core than at the periphery of the shell wall. None of the negative controls exhibit such a signal.



**Figure 11.** Lectin-gold labeling of shell preparations with biotinylated concanavalin A. The left panel (A) shows a general view of the shell wall, while the middle panel represents magnification of the outer (B) and inner (F) layers. The right panel corresponds to different negative controls, namely without the lectin (C,G), without the GABIO (D,H) and an absolute blank (E,I). A, B and C show that the labeling is diffuse in the mineralized layers.

### 3.13. Proteomic Analysis

The proteomics results are shown in Tables 5 and 6. They summarize the MASCOT searches performed in “trypsin” and “semi-trypsin” modes. Table 5 lists all the peptides identified per extract—these peptides range from seven amino acid residues long to 21—and depicts the number of shared peptides between extracts when compared two by two. Table 6 represents the major and most significant protein hits, corresponding to proteins covered at more than 5% of their sequences. We have chosen not to show the hits corresponding to proteins covered at less than 5%. However, a complete version of Table 6 is accessible in the supplementary data (Table S2): it includes all the protein hits, the full sequences of the corresponding proteins and some chemical characteristics of their primary structure (number of amino acids, molecular weight, isoelectric point, number of negatively and positively charged amino acid residues).

Table 5A shows that the four extracts are not similarly covered: AIM1 comprises only 27 peptides in trypsin mode and 50 in semi-trypsin mode. For AIM2, these numbers are 57 and 77, respectively, 76 and 99 for ASM1, and, at last, 65 and 83 for ASM2. In term of peptide compositions, the four extracts overlap partially in trypsin mode: the highest overlap is obtained between ASM1 and ASM2 (50%), and the lowest, between AIM1 and ASM2 (20%) (Table 5B). In semi-trypsin mode, these percentages are kept identical.

**Table 5. (A)** List of the peptides identified by proteomics, in each of the four tested fractions, according to two stringencies: trypsin and semi-trypsin modes. **(B)** Shared peptides by extract, compared two by two (the common denominator refers to the number of peptides identified in the reference extract).

A	List of Peptides Identified Per Extract	
	Trypsin	Semi-Trypsin
AIM1	<p style="text-align: center;"><u>27</u></p> AGFAGDDAPR; AGLQFPVGR; DAILFK; DAVTYTEHAK; DSYVGDEAQS; EDIVIAK; EITALAPSTMK; EVQTAVR; GYSFTTTAER; IGSLSNR; ISGLIYEETR; KDTDNIGSSK; LLEGEESR; LLLPGELAK; LNSLSNR; LSSGLNISR; NLSGKER; QVDSVQR; SGSFLSR; SMESCQGDTC; SSVTTGGVVGR; STELLIR; TFVQGLSISR; TITLVEPSDTIENVK; TLSDYNIQK; VAPEEHPVLLTEAPLNPK; VATVSLPR	<p style="text-align: center;"><u>50</u></p> AFSSNIR; AGFAGDDAPR; AGLQFPVGR; CCGMYQILGK; CLSNGTIKCTE; DAVTYTEHAK; DDFDINR; DSYVGDEAQS; EGAEVLAKELPQ; EITALAPSTMK; EVHNSVGTSK; EVQTAVR; GSSMKSVEAMAIGR; GYSFTTTAER; IDENNVPEK; IGSLSNR; ISGLIYEETR; IVDGGISR; IYLSGQK; KDTDNIGSSK; LEITDVQR; LLEGEESR; LLGAFQK; LLLPGELAK; LSSGLNISR; LSSGLNISR; LSVNLGSGK; MGSGIQYGA; NLSSINR; NSFDLNR; QSVECESR; SEGSTLTK; SFTIHLGAQMK; SGVQFSK; SMESCQGDTC; SSSGIGSISSR; SSSLGFR; SSSVSASSTPSSPTSR; STELLIR; TFVQGLSISR; TITLVEPSDTIENVK; TLSDYNIQK; TQSLSHASTTTR; VADGVFR; VAGSVAGR; VAPEEHPVLLTEAPLNPK; VATVSLPR; VGGLNFR; VVSLISPR; YTKIGNTMDR
	<p style="text-align: center;"><u>57</u></p> AGLQFPVGR; AVFVDLEPTVVDEIR; AVLVDLEPGTMDSVR; DAGTIAGLNVMR; DAILFK; DAVTYTEHAK; DFDQLSPEQSK; DGVITVK; DLTDYLMK; DNIQGITKPAIR; DSYVGDEAQS; DVNAAIATIK; EDIVIAK; EIQTAVR; EITALAPSTMK; ELISNASDALDK; EREGALK; EVSYVNAR; FDLTGIPSAPR; GVVDSDELPLNISR; GYSFTTTAER; IGGIGTVPVGR; IIAPPER; IKDPSAK; ILEFFGLK; ILGSGIEAEASK; ILVGTNFNNAVAK; IQLLEEDLER; ISGLIYEETR; LDEVFEK; LDPPLSATDPDK; LEAAEAR; LLLPGELAK; LNDGFYSIK; LNSLSNR; LPLQDVYK; LSDECQEAVER; LVDDLADR; MDATANDLEDIK; NLIGVLK; NLLSVAYK; QEFINEGK; QFSIVAR; SASVDINR; STELLIR; SVDEALR; SYELPDGQVITIGNER; TISDLVK; TNKFDEFFK; TPAYFITK; TVQASVK; TVTAMDVVYALK; VAPEEHPVLLTEAPLNPK; VATVSLPR; VDATIEVDLAEK; VFLENVIR; VISSIEQK	<p style="text-align: center;"><u>77</u></p> AAGAGDVTANK; AFSSNIR; AGLQFPVGR; AIEENAVGLSDIA; AVFPSIVGR; AVFVDLEPTVVDEIR; AVLVDLEPGTMDSVR; CLSNGTIKCTE; DAGTIAGLNVMR; DAILFK; DAVTYTEHAK; DFDQLSPEQSK; DLTDYLMK; DNIQGITKPAIR; DSLEICK; DSYVGDEAQS; DVNAAIATIK; EDIVIAK; EIQTAVR; EITALAPSTMK; ELISNASDALDK; ELTEIR; EVSYVNAR; FDLTGIPSAPR; FTPKYMR; GVVDSDELPLNISR; GYSFTTTAER; IDENNVPEK; IETEISK; IGGIGTVPVGR; IIAPPER; IISNASCTTNCLAPLAK; ILEFFGLK; ILGSGIEAEASK; ILVGTNFNNAVAK; INSGSLGTVGR; IQLLEEDLER; ISGLIYEETR; IYLSGQK; KGGFEPK; LDPPLSATDPDK; LEAAEAR; LGNDDVK; LGTTVIK; LLLPGELAK; LPLQDVYK; LSDECQEAVER; LSDFYTK; LVDDLADR; MDATANDLEDIK; NLIGVLK; NLLSVAYK; NTQIIDP; QCTCTYK; QEFINEGK; QMCDGSLVAK; SFTIHLGAQMK; SGDDVIVIDR; SIMSVIEK; SKGFDSK; SPATLNSR; SSLKSQPQGNK; SSPATLNSR; STELLIR; STIPKPK; SYELPDGQVITIGNER; TISDLVK; TNKFDEFFK; TPAYFITK; TVQASVK; TVTAMDVVYALK; VAPEEHPVLLTEAPLNPK; VDATIEVDLAEK; VFLENVIR; VGGLNFR; VISSIEQK; VVSLISPR

Table 5. Cont.

A	List of Peptides Identified Per Extract	
	Trypsin	Semi-Trypsin
		99
		ADPIAYR; AFSSNIR; AGGFGVAMSK; AGLQFPVGR; AKLDEVFEK; ATMEGILAR; AVDTSIYCK; AVFPSIVGR; AVFPSIVGRPR; AVFVDLEPTVVDEIR; CLSNGTIKCTE; DAGTIAGLNVMR; DAIIIFK; DAVTYTEHAK; DFDQLSPEQSK; DIDEIVLVGGSTR; DLDEMLVQSR; DLYANTVLSGGTSMYPGIADR; DNIQGITKPAIR; DSYVGDEAQSK; DVNAAIATIK; EDIVIAK; EIAEAYLGK; EIQTAVR; ELISNASDALDK; FLESGGK; GDILAAAR; GLDVIAQAQSGTGK; GYSFTTAAER; HQGVMVGMGQK; IASDGLK; IFSGDIK; IGGIGTVPVGR; IIAPPER; IINEPTAAAIAAYGLDK; IINEPTAAALAYGLDK; ILVGTNFNNAVAK; IMNTFSVVPSPK; ISEQFTAMFR; ISGLIYEETR; IVDLILR; IYLSGQK; KVISETK; LAPEYEK; LDEVFEK; LEAAEAR; LEQLLQR; LFSDYLYFGK; LLEGEESR; LLLPGELAK; LNCSNIR; LQNTDYR; LQNYNAKEN; LSDECQEAVER; LSDFYTK; LSVNLGSGK; MDATANDLEDIK; MGSIGIYGDA; NLIGVLK; NSFDLNR; NTQIIDP; QCTCTYK; QNKSAVK; QVLVNILVK; SEGSTLTK; SFTIHLGAQMK; SGDDVIVIDR; SGDNVILLDR; SGVQFSK; SPATLNSR; SRPPVLPNDK; SSPATLNSR; SSSLGFR; STELLIR; SYELDTIAAAQGIK; SYELPDGQVITIGNER; TFVQGLSIGR; TITLEVEPSDTIENVK; TLEINPR; TLEPVEK; TLESDYNIQK; TNKFDEFFK; TPAYFITK; TSEGLDELDTK; TTPSYVAFTDAER; TVTAMDVVYALK; VAPEEHPVLLTEAPLNPK; VATVSLPR; VFLENVIR; VFSGTVSTGQK; VLITDILLAR; VLSPDAK; VSAIDAFR; YDIILIQEIR; YEDENKLR; YLTVATIFR
	76	
ASM1	AGGFGVAMSK; AGLQFPVGR; AKLDEVFEK; ATMEGILAR; AVDTSIYCK; AVFPSIVGRPR; AVFVDLEPTVVDEIR; DAGTIAGLNVMR; DAIIIFK; DAVTYTEHAK; DFDQLSPEQSK; DIDEIVLVGGSTR; DLDEMLVQSR; DLYANTVLSGGTSMYPGIADR; DNIQGITKPAIR; DSYVGDEAQSK; DVNAAIATIK; EDIVIAK; EIAEAYLGK; EIQTAVR; ELISNASDALDK; FLESGGK; GDILAAAR; GLDVIAQAQSGTGK; GYSFTTAAER; HQGVMVGMGQK; IASDGLK; IFSGDIK; IGGIGTVPVGR; IIAPPER; IINEPTAAAIAAYGLDK; ILVGTNFNNAVAK; IMNTFSVVPSPK; ISEQFTAMFR; ISGLIYEETR; LAPEYEK; LDEVFEK; LEAAEAR; LFSDYLYFGK; LLEGEESR; LLLPGELAK; LQNTDYR; LSDECQEAVER; LSSGLNISR; MDATANDLEDIK; NCVDATDGLK; NLIGVLK; NLLSVAYK; QFSIVAR; QNKSAVK; QVLVNILVK; SASVDINR; SGSFLSR; STELLIR; SYELDTIAAAQGIK; SYELPDGQVITIGNER; TFVQGLSIGR; TITLEVEPSDTIENVK; TLEINPR; TLEPVEK; TLESDYNIQK; TNKFDEFFK; TPAYFITK; TSEGLDELDTK; TTPSYVAFTDAER; TVTAMDVVYALK; VAPEEHPVLLTEAPLNPK; VATVSLPR; VFLENVIR; VFSGTVSTGQK; VLITDILLAR; VLSPDAK; VSAIDAFR; YDIILIQEIR; YEDENKLR; YLTVATIFR	

Table 5. Cont.

A		List of Peptides Identified Per Extract							
		Trypsin				Semi-Trypsin			
ASM2		65				83			
		AGLQFPVGR; AKLDEVFEK; AVFVDLEPTVVDEIR; AVLVDLEPGTMDSVR; DAGTIAGLNVMR; DAHFILR; DAILFK; DAVTYTEHAK; DIDEIVLVGGSTR; DLDEMLVQSR; DLYANTVLSGGSTMYPGIADR; DSYVGDEAQS; DSYVGDEAQSKR; DTYSISSQR; DVNAAIATIK; EIAEAYLGK; EITALAPSTMK; EQFSNYR; EQLRDPIQEVK; EVDEQMLNIQSK; FDLTGIPSAPR; GDILAAAR; GVVDESEDLPLNISR; HLQLAIR; IAGEASR; IASDGLK; IDLSVR; IFSGDIK; IINEPTAAAIAAYGLDK; ILGSGVIEAEASK; ILVGTNFNAVAK; ISGLIYEET; KDTDNIGSSK; KVEVEVK; LAVNMVPPFR; LEAAEAR; LGVIEDPSNR; LIPMMDLNK; LLLPGELAK; LNSLSNR; LSDECQEAVR; LTTYTALMQAK; LVDDLADR; MDATANDLEDIK; NLLSVAYK; NNIVIQNDQNR; QFSIVAR; QVLVNLVK; SAIMTGR; SASVDINR; STELLIR; TASEHVIK; TFVQGLSIGR; TNKFDEFFK; TSEGLDELDTK; TVQASVK; TVTAMDVVYALK; VACTNWR; VAPEEHPVLLTEAPLNPK; VATVSLP; VDNICNVAK; VFSGTVSTGQK; VLSPDAK; VTAEDKGTGNK; YDEMVSNMK				ADQDDDSLVR; AFSSNIR; AGLQFPVGR; AKLDEVFEK; AVFVDLEPTVVDEIR; AVLVDLEPGTMDSVR; DAGTIAGLNVMR; DAHFILR; DAILFK; DAVTYTEHAK; DIDEIVLVGGSTR; DIENIPVPKP; DLDEMLVQSR; DLYANTVLSGGSTMYPGIADR; DSYVGDEAQS; DSYVGDEAQSKR; DTYSISSQR; DVNAAIATIK; ECKAGAAEK; EGAEVLAKELPQ; EGNNFQLFQ; EIAEAYLGK; EITALAPSTMK; EQFSNYR; EQLRDPIQEVK; EVDEQMLNIQSK; FDLTGIPSAPR; FSEGSTLTK; GDILAAAR; GVVDESEDLPLNISR; HLQLAIR; IAGEASR; IASDGLK; IDENNVPEK; IFSGDIK; IINEPTAAAIAAYGLDK; ILGSGVIEAEASK; ILVGTNFNAVAK; ISGLIYEET; IYLSGQK; KDTDNIGSSK; KDTDNWK; LAVNMVPPFR; LEAAEAR; LGNDDVK; LGVIEDPSNR; LLLPGELAK; LSDECQEAVR; LSDFYTK; LSVNLGSGK; LTTYTALMQAK; LVDDLADR; MDATANDLEDIK; MGSGIQYGA; NLLSVAYK; NNIVIQNDQNR; NSFDLNR; QCTCTYK; QGFGCGDVR; QPSITVK; QVLVNLVK; SAIMTGR; SEGSTLTK; SGDDVIVDR; SGNVILLDR; SRPPVLPNDK; SSPATLNSR; SSSVSASSTPSSPTSR; STELLIR; TFVQGLSIGR; TNKFDEFFK; TSEGLDELDTK; TVTAMDVVYALK; VAALCSTIPF; VACTNWR; VAPEEHPVLLTEAPLNPK; VDNICNVAK; VFSGTVSTGQK; VSILSMR; VTAEDKGTGNK; VVSLISPR; YDEMVSNMK; YGSGSLTGFLSTDK			
B		Share Peptides by Extract, Two Per Two.							
		Trypsin				Semi-trypsin			
		AIM1	AIM2	ASM1	ASM2	AIM1	AIM2	ASM1	ASM2
AIM1		██████	13/57	17/76	13/65	AIM1	██████	16/77	21/99
AIM2		13/27	██████	36/76	30/65	AIM2	16/50	██████	38/99
ASM1		17/27	36/57	██████	33/65	ASM1	21/50	38/77	██████
ASM2		13/27	30/57	33/76	██████	ASM2	21/50	33/77	41/99

Table 6 shows that several proteins of heterogeneous families are represented: among the most prominent are a few histones, but also cytoskeletal proteins (actin, tubulin, tropomyosin), transcriptional regulator ATRX, ubiquitin, 14-3-3 proteins, i.e., proteins that bind to signaling molecules. One RNA helicase, one elongation factor, one sarcoplasmic calcium-binding protein are also present, in addition to few uncharacterized proteins from *Octopus* or from *Spirula*, the function of which is unknown. A few chaperones, i.e., proteins that help folding of other proteins, are also represented, such as one protein disulfide isomerase and one endoplasmic-like. Note the presence of a potassium channel toxin. Among the protein hits not listed in Table 6 because of low coverage, one can notice the presence of calreticulin, calyculin, heat shock proteins and other members but the significance of this hits is unclear.

**Table 6.** Main protein hits obtained by proteomics, according to two stringencies: trypsin (T), and semi-trypsin (ST). For each protein hit, the presence is indicated by “X”, as well as the protein coverage (Cov.) and the number of peptides (Pep.) that allow the protein identification, for each of the four extracts. A complete version of this table is available as Supplementary Table S2.

		TRYPSIN							
		AIM1		AIM2		ASM1		ASM2	
		T	ST	T	ST	T	ST	T	ST
PREDICTED: histone H3.3-like <i>Octopus bimaculoides</i> (XP_014778206.1)	P/A Cov. Pep.	X 15.6% 3	X 17% 3	X 10.8% 2	X 10.88% 2	X 10.8% 2	X 10.88% 2	X 10.8% 2	X 10.88% 2
Histone H4 <i>Acrolepiopsis assectella</i> (H4_ACRAS)	P/A Cov. Pep.	X 19.4% 2	X 19.41% 2	X 62.13% 6		X 50.5% 5		X 33% 3	
Tubulin alpha chain <i>Enteroctopus dofleini</i> (TBA_ENTDO)	P/A Cov. Pep.			X 5.54% 2	X 5.54% 2	X 5.54% 2	X 5.54% 2	X 5.54% 2	X 5.54% 2
TROPOMYOSIN <i>Spirula spirula</i> (Gene.1464c49820)	P/A Cov. Pep.			X 15.6% 2	X 13.93% 2	X 5.7% 1	X 5.74% 1	X 5.7% 1	X 5.74% 1
Actin <i>Brugia malayi</i> (ACT_BRUMA)	P/A Cov. Pep.	X 16% 5	X 16% 5	X 21.5% 7	X 23.93% 8				
Ubiquitin <i>Ceratitis capitata</i> (UBIQ_CERCA)	P/A Cov. Pep.	X 33% 2	X 33% 2			X 33% 2	X 33% 2		
TRANSCRIPTIONAL REGULAR ATRX-like <i>Spirula spirula</i> (Gene.30195::c80181)	P/A Cov. Pep.	X 5% 1				X 5% 1			
MITOCHONDRIAL TRANSCRIPTION RESCUE FACTOR <i>Spirula spirula</i> (Gene.23120::c53195)	P/A Cov. Pep.	X 9% 1	X 10.1% 2			X 9% 1			
60S RIBOSOMAL PROTEIN <i>Spirula spirula</i> (Gene.29788::c77903)	P/A Cov. Pep.			X 14.3% 1	X 14.3% 1			X 14.3% 1	X 14.3% 1
HEPARAN SULFATE SULFOTRANSFERASE <i>Spirula spirula</i> (Gene.5097::c36049)	P/A Cov. Pep.			X 2.35% 1	X 2.35% 1	X 5% 2	X 5% 2		
14-3-3 protein zeta <i>Aedes aegypti</i> (1433Z_AEDAE)	P/A Cov. Pep.			X 6.45% 2	X 6.45% 2	X 3.2% 1			
Histone H2B.1/H2B.2 <i>Tigriopus californicus</i> (H2B1_TIGCA)	P/A Cov. Pep.			X 13% 2	X 13% 2	X 13% 2	X 13% 2		
TUBULIN (beta) <i>Spirula spirula</i> (Gene.2411c23358)	P/A Cov. Pep.					X 7% 3	X 7% 3	X 8.3% 3	X 2.7% 1
ELONGATION FACTOR <i>Spirula spirula</i> (Gene.193c18579)	P/A Cov. Pep.					X 6.5% 1	X 6.5% 1	X 6.5% 1	X 6.5% 1
PREDICTED: uncharacterized protein LOC106879316 <i>Octopus bimaculoides</i> (XP_014784309.1)	P/A Cov. Pep.	X 5.46% 1							
Potassium channel toxin alpha-KTx 18.1 <i>Tityus obscurus</i> (KA181_TITOB)	P/A Cov. Pep.	X 31.42% 1	X 31.42% 1						
PREDICTED: uncharacterized protein LOC106881861 <i>Octopus bimaculoides</i> (XP_014787865.1)	P/A Cov. Pep.			X 5.64% 1					
Actin, cytoskeletal <i>Heliocidaris erythrogramma</i> (ACTM_HELER)	P/A Cov. Pep.					X 27.9% 8	X 24.73% 9		

Table 6. Cont.

		TRYPSIN							
		AIM1		AIM2		ASM1		ASM2	
		T	ST	T	ST	T	ST	T	ST
ATP-dependent RNA helicase OR eukaryotic initiation factor <i>Spirula spirula</i> (Gene.3798::c31126)	P/A Cov. Pep.					X 5.66% 2	X 5.66% 2		
UNCHARACTERIZED <i>Spirula spirula</i> (Gene.2897c68969)	P/A Cov. Pep.					X 6.1% 1	X 6.1% 1		
Actin-3 <i>Diphylllobothrium dendriticum</i> (ACT3_DIPDE)	P/A Cov. Pep.							X 13.53% 4	X 13.53% 4
PROTEIN DISULPHIDE ISOMERASE <i>Spirula spirula</i> (Gene.3279::c29062)	P/A Cov. Pep.							X 7.29% 4	X 7.29% 4
Actin-3 (Fragment) <i>Echinococcus granulosus</i> (ACT3_ECHGR)	P/A Cov. Pep.							X 16.18% 3	X 16.18% 3
14-3-3 PROTEIN <i>Spirula spirula</i> (Gene.2785c60160)	P/A Cov. Pep.							X 6.51% 2	X 6.51% 2
Histone H2A, sperm (Fragment) <i>Lytechinus pictus</i> (H2A3_LYTPI)	P/A Cov. Pep.							X 14.28% 2	X 14.28% 2
Histone H2B.1, embryonic <i>Psammechinus miliaris</i> (H2BE1_PSAMI)	P/A Cov. Pep.							X 13% 2	X 13% 2
ENDOPLASMIN-LIKE <i>Spirula spirula</i> (Gene.16::c147)	P/A Cov. Pep.							X 7.63% 1	X 7.63% 1
		SEMI-TRYPSIN							
PREDICTED: ras-related protein Rab-4B-like <i>Octopus bimaculoides</i> (XP_014772694.1)	P/A Cov. Pep.		X 5.49% 1					X 5.49% 1	X 5.49% 1
E3 ubiquitin-protein ligase HECTD1-like isoform <i>Spirula spirula</i> (Gene.28385::c63884)	P/A Cov. Pep.		X 6.18% 1						
PREDICTED: serine-rich adhesin for platelets-like isoform X2 <i>Octopus bimaculoides</i> (Gene.104::c674)	P/A Cov. Pep.		X 8% 1						
Histone H4 <i>Aplysia californica</i> (H4_APLCA)	P/A Cov. Pep.			X 56.31% 5		X 52.42% 5		X 31% 3	
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2 <i>Caenorhabditis briggsae</i> (G3P2_CAEBR)	P/A Cov. Pep.			X 4.99% 1					
PREDICTED: mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM14-like isoform <i>Spirula spirula</i> (Gene.29359::c72821)	P/A Cov. Pep.			X 5.99% 1					
PREDICTED: protein Wnt-7b-like <i>Octopus bimaculoides</i> (XP_014780612.1)	P/A Cov. Pep.			X 5.82% 1					
Uncharacterized protein <i>Spirula spirula</i> (Gene.21622c52882)	P/A Cov. Pep.			X 6.42% 1		X 6.42% 1			

The number of hits that are specific to shell proteins is singularly low (see Table S2): in the hits obtained in semi-trypsin mode, we identified in the two insoluble extracts one peptide of shematrin-like 2 protein from *Pinctada margaritifera*, while three extracts (AIM2, ASM1, SM2) exhibit one peptide of nautilin-63, a shell protein from *Nautilus macromphalus*. Proteins with biased amino acid compositions are notably absent: almost none of the peptides from Table 6 exhibit biased amino acid sequences.

## 4. Discussion

In the present study, we have investigated the physical and biochemical properties of the argonaut shell. This biomineralized structure—in reality a calcified eggcase—appears as an oddity of the argonautid family since it is secreted by the first pair of dorsal arms of females only and made of calcite, in marked contrast to any other mollusc shells. Our study focuses more precisely on the cosmopolitan—worldwide distributed—species, *Argonauta hians*, the winged argonaut, also defined as the muddy argonaut, or the brown paper nautilus.

### 4.1. Microstructure

From a microstructural viewpoint, the shell of *Argonauta hians*, like the shell of other species, consists of a central organic layer sandwiched between two layers of calcitic fibers. This general organization of the shell structure was previously described by several authors [19,21,45,46] on neighboring species. So far, to our knowledge, the most complete study is that of Mitchell et al. [19], who defined the peripheral layers as “prismatic calcite”. Here, we prefer the use of “fibrous calcite”. In spite of this difference, our observations corroborate theirs, namely, that at the periphery of the central core, the spherulites give birth to calcitic needles that gradually become parallel to each other; that both calcitic layers exhibit a variability in their thickness along the coiling and that depositional accidents, characterized by the re-initialization of mineralization (from a spherulite to diverging fibers) occur from time to time in the peripheral layers. However, Mitchell et al. [19] argue that the central core is mainly composed of mineral grains; they do not evoke any organic material in this layer, contrarily to Kobayashi [46]. In view of our SEM observation in back-scattered mode and of the intense labeling of the central layer by both antibody (anti-P95) and lectin (concanavalin A) labeling, we follow the assumption of Kobayashi, i.e., that the central layer: “includes organic matrixes... The matrixes seem to be composed of protein, neutral mucopolysaccharides and mucopolysaccharide”.

Considering the microstructural organization of the shell (core sandwiched between two fibrous layers) and the fact that, from either side of the core, spherulites grow in opposite directions, one logically concludes that the core layer is the starting point of the shell fabrication. Given that the two peripheral layers are microstructurally identical, we may infer that they are produced by a similar depositional mechanism. Mitchell et al. [19] proposed the following secretory chronology: first, the two dorsal webs (located on the distal ends of the female’s first dorsal arm pair) join together and seal the space where spherulite mineralization occurs; one of the two webs playing a template role. According to these authors: “the crystallites at the edges of the central layer initially show a spherulitic growth pattern and then extend into prisms due to the restriction in growth directions created by the presence of neighbouring spherulites. Since only those crystallites which are oriented perpendicular to the central zone have room for unrestricted growth, there is very good alignment between the resultant prismatic crystals”. Secondly, at a later stage, they suggest that the web positions alternate between the exterior and the interior of the shell. Thus, the shell growth appears to be periodical. The two main arguments for this hypothesis lie in the fact that living specimens were observed with their webs retracted into the shell [47,48] and also in the occurrence of mineralization accidents. For example, these accidents may be explained by the deposition of impurities on the last formed shell surface on the outer layer when the web is retracted into the shell (and vice-versa). We do not find any opposite argument; however, considering the dorsal extremity of the shell (Figure 3C,D) and its microstructural organization, it appears that the physiological mechanism is not as binary but may be more sophisticated and gradual. The bevel observed in the extremity (Figure 3D) may be explained by Mitchell’s model. However, at a later stage, the deposited layers that appear continuous from outside to inside without any discontinuity, and which envelop the subjacent structures, cannot be explained by a simple switch in web position. We propose that, at this formation stage, a new mechanism occurs: the web progressively migrates from the exterior to the interior of the shell, producing a continuous layer that terminates the shell synthesis.

#### 4.2. Shell Biochemistry

Besides being a Nature's oddity, the argonaut shell has been the focus of only two old biochemical characterizations: Turek [49] found a high quantity of organic substances, without indicating the nature of the organics. Degens and coworkers [50] analyzed the amino acid composition of the hydrochloric acid-insoluble matrix and obtained a composition enriched in glycine, serine and aspartic acid residues. They also detected the two most standard amino sugars, glucosamine and galactosamine. In our hands, the extraction of both soluble and insoluble matrices yielded relatively large amount of materials, around 1.8% of the shell weight. This classifies the *Argonauta hians* eggcase among the organic-rich shells. Curiously, the amount of acetic acid-soluble matrix is slightly higher (1.1 to 1.44 times) than that of the insoluble fraction, a rather unusual proportion in molluscan shells: indeed, shell microstructures of organic-rich shells such as nacre or prisms are usually constituted of insoluble materials that can represent up to 90–95% of the whole organic matrix and above 1% of the shell weight [51]. At the opposite, organic-poor shell microstructures, i.e., crossed-lamellar, are mostly constituted of soluble materials that represents, at best, 0.1% of the shell weight. Another interesting point is that the *A. hians* shell matrix seems to be mostly proteinaceous, as deduced from SSNMR (AIM) or from the ELLA assay (ASM), which is another peculiarity of this matrix. Our finding is in agreement with the old data of Degens and coworkers who obtained a protein/amino sugars ratio of 108, from the HCl-insoluble matrix of *A. hians*. The sugar moieties represent about 7–10% of the ASM, while the AIM seems devoid of chitin. It is remarkable to note that the shell matrix of *A. hians* is consequently very different from that of other cephalopods, such as the Ram's horn squid *Spirula spirula* ([28], see also Table S2) or the cuttlefish *Sepia officinalis* [52], both being particularly enriched in chitin. The last interesting point about saccharide moieties is that most of them identified in the ASM are sulfated glycosaminoglycans (GAGs). Because of their net negative charge, GAGs are usually known to interact strongly with the in vitro precipitation of calcium carbonate. In our test, the ASM did not exhibit such effect and was found to be poorly reactive (in our in vitro crystallization assay), in spite of being associated to calcite.

#### 4.3. Proteomics on the Shell Matrix

Finally, in order to obtain a more precise idea of the proteins that constitute the shell matrix of *A. hians*, we performed proteomics. As there is not yet any transcriptomic data to lean on for this species in particular, and for argonautids in general, the information provided by proteomics is partial and consists mainly in peptide lists, rather than full protein sequences. In addition to these limitations, proteomics can be flawed by two series of factors: firstly, the intrinsic properties of the matrix proteins, secondly, analytical bias. The first ones include the complexity of the matrix (several different proteins and sugars), extensive cross-linking, numerous post-translational modifications and finally, the presence of long sequences of low complexity that cannot be easily digested, i.e., analyzed accurately by tandem mass spectrometry. The second ones include the cleaning procedure, the digestion with a single enzyme (most of the time, trypsin) and the use of a qualitative analysis (based on presence /absence), instead of a quantitative one.

In spite of these bottlenecks, we were able to present, for the first time, a peptidic fingerprint of four fractions, soluble or insoluble, obtained after one or two bleaching steps, of the shell matrix of *A. hians*. It is interesting to observe that the four fractions share a number of peptides, which means that their peptide compositions partly overlap. This is especially true for the two ASMs, but AIM2 also has a lot in common with these two fractions. This finding is in agreement with some of our previous data acquired on other mollusc shells (such as the freshwater mussel *Unio pictorum*), namely that the soluble and insoluble matrices resemble each other more than what old mollusc shell mineralization models used to predict [53].

The protein identification was performed according to two modes, "trypsin", and "semi-trypsin". The second mode brings additional hits, which have to be taken more cautiously but are congruent with those obtained in trypsin mode. Among the most prominent hits, one finds histones. Histones are very basic proteins associated to DNA in the nucleus. Their presence in an extracellular matrix may

appear odd, at first sight. However, it is known that histones or histone-derived peptides can function extracellularly as antimicrobial agents. It has been repeatedly shown that the calcifying matrix in metazoans contains such peptides: the eggshell matrix [54], molluscs [28,55]. In the case of argonautids, one can infer that antimicrobial peptides are fully necessary since the process of shell mineralization requires the webs to move from outside to inside of the shell and vice-versa [19]. Under these conditions, the mineralization front is periodically uncovered, and thus, exposed to bacterial infection. Another putative candidate for such defensive mechanism, may include a potassium channel toxin, well-covered in the AIM1 fraction. In a previous paper, we also identified a toxin in the skeletal matrix of the colonial coral *Acropora millepora* [56] and we suppose that these toxins play similar protective functions in these two very different calcifiers.

Cytoskeletal proteins (actin, tropomyosin, tubulin) are, strangely, also well represented. We cannot exclude that they are contaminants, in spite of the thorough cleaning procedure with bleach. We cannot rule out that a subtle link exists between cytoskeletal proteins and the extracellular matrix; several evidences show it, in particular when vesicles are involved in mineralization process. For example, Weiss and coworkers have nicely demonstrated the tight “physical link” between the cytoskeletal forces and the extracellular shell-forming matrix [57] in marine mussels.

Other proteins represented in the analysis include a few enzymes and signaling molecules. Among the enzymes of interest, one finds heparan sulfate sulfotransferase, a protein disulfide isomerase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase 2 and a translocase. Heparan sulfate sulfotransferases are involved in the biosynthesis of sulfated glycosaminoglycans (GAGs), and the presence of one member of this enzyme family is congruent with the occurrence of GAGs in the matrix. Protein disulfide isomerases are involved in the correct folding of extracellular matrix proteins and play a role similar to that of chaperones. The function of the two other enzymes is more elusive. Among the signaling proteins, one recognizes 14-3-3 protein and Wnt. The first one was already found in the shell matrix of *Spirula spirula* [28]. Cell signaling is an important function in many—if not all—extracellular matrices involved in calcification [58].

Some molecular functions that are commonly found in most shell matrices, shine by their absence in our analysis. We did not detect proteins that are associated to chitin metabolism: they include a set of enzymes (chitinase, chitinase, etc.) and non-enzyme chitin-binding proteins which play a structural role by being constructional elements of the three-dimensional scaffold. Their absence is not really surprising as we did not detect in any manner the presence of chitin in the shell of *A. hians*. More surprising is the absence of “classical” enzymes like carbonic anhydrase or tyrosinase, that play functions in bicarbonate conversion and in quinone-tanning (cross-linking) processes, respectively. Their absence in our dataset cannot be easily explained, unless they belong to the fraction of the skeletal matrix, not occluded in the shell during mineralization [59]. However, let us mention the presence of a putative thioredoxin peroxidase in AIM2 fraction, covered at 3.6%. Peroxidase are often found in numerous calcifying extracellular matrices and they may be involved in cross-linking too [60], in addition to playing numerous other functions. At last, the absence of proteins that exhibit low complexity domains—also defined as compositionally-biased regions—is puzzling. Firstly, in the list of identified peptides (Table 5), only a limited number of them exhibit biased compositions (such as alanine-rich, aspartic acid-rich or serine-rich) but most of them exhibit sequences with no remarkable composition. Secondly, we did not find hits for shell proteins that have low complexity domain sequences characteristics, such as nacrein, glycine-rich proteins, aspein, MSP-1 (matrix soluble protein-1) or related members. Only one sequence matches with a shematin, but not in the low complexity region, and the coverage is too low to assess the effective presence of a member of this protein family in the extracts. All these “missing molecular functions” do not mean that the corresponding proteins are not there in the shell matrix. They may somehow be “masked” for the reasons given above (no trypsin cleavage or other technical biases). This underpins the necessity of constructing one or more transcriptomes of the webs of this non-model organism to bring conclusive evidences on the dissimilarity of the shell matrix of *Argonauta hians* with that of better-known models.

#### 4.4. Evolutionary Considerations

Our data (both physical, biochemical and molecular) indicate that *Argonauta hians* has a peculiar shell. This calcified structure is not homologous to a standard molluscan shell, since its synthesis is not performed by the “classical” molluscan calcifying organ, i.e., the mantle, but by the webs of the first dorsal arm pair. Its entirely calcitic nature puts it apart from all other calcifying cephalopods. Even though the microstructural organization—an organic layer sandwiched between two identical mineral layers—is reminiscent of the Ram’s Horn squid shell wall (*Spirula spirula*), the mode of construction (in particular, the secretory events and their physiology) appears completely different. Indeed, in *Argonauta* (contrarily to *Spirula*), the shell is external and lacks a periostracal layer (utilized for sealing the space dedicated to mineralization and as the first template for mineral deposition), which implies obviously different physiological constraints. To date, the single hypothesis proposed suggests that the arms secrete the central organic layer first, which functions as template for the deposition of the two peripheral layers. This is only possible by the switching movement of the webs from the outside to the inside of the shell [19], a physiological process unique among molluscs.

Concerning the proteomic data, we find a few shared peptides (in total, 14) with the *Spirula*’s shell matrix [28], but no matches with the already published peptides of the cuttlefish *Sepia officinalis* [61,62] and of the nautilus *Nautilus macromphalus* [53]. This is not really surprising: although the Ram’s Horn squid and the cuttlefish are the mineralizing cephalopods that are phylogenetically the closest to *Argonauta*, the divergence time between the “*Sepia-Spirula*” clade (Decabrachia) and argonautids (Octobrachia) is deep, and may have occurred in the Permian [11,63]. By enlarging the circle to other molluscan classes for which shell proteomic data are available (gastropods, bivalves), we found hardly any similarity in term of peptide fingerprint. All these proteomic data suggest strongly—but do not demonstrate firmly—that the matrix of *A. hians* does not resemble that of other molluscs for which proteomic data are available.

This partial finding is substantiated by two complementary biochemical results: the absence of chitin and the ELISA signal. The lack of chitin in the shell matrix clearly separates *A. hians* from the cuttlefish [50] and the Ram’s horn squid [28] and, to a lesser extent, from the nautilus [50]. Furthermore, it seems that an important proportion of the saccharides in *A. hians* are sulfated GAGs. ELISA data constitute another strong argument: with one exception, no cross-reactivity of the ASM of *A. hians* was recorded with a large set of polyclonal antibodies, some of which exhibiting a high level of cross-reactivity with several skeletal matrices of different classes or even phylums [64]. This suggests once more—but does not prove yet—that the shell matrix of *A. hians* is very peculiar and unique. From an evolutionary viewpoint, this means that the “molecular tools” (i.e., the proteins) used for the construction of the argonaut’s shell are not inherited from one cephalopod shell-forming ancestor. Although these functions may be ancient (or not), their recruitment and orchestration for mineralizing the argonaut shell seems to be specific of this clade and not seen elsewhere. Our conclusions will, however, be better substantiated when one or more transcriptomes of the argonaut’s mineralizing arms are available.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4352/10/9/839/s1>. Figure S1. 75.4 MHz <sup>13</sup>C DE MAS NMR spectrum (black) of the cleaned shell powder of *A. hians* (110 mg; 30 scans) and of <sup>13</sup>C-enriched coccoliths (red) [43] superimposed for comparison. The spectra were obtained by acquiring transients with repetition delay of 40 min (close to fully relaxed). Figure S2. 75.4 MHz <sup>13</sup>C CPMAS spectra of (a) of α-chitin standard (shrimp), (b) the cleaned shell of *Argonauta hians*, and of its extracts (c) acid soluble and (d) acid insoluble matrices (AIM1 and ASM1). The spectra are the same as in Figure 5 except the non-expanded spectrum of the cleaned shell that demonstrates the strong peak of interfacial carbonates. Figure S3. 75.4 MHz <sup>13</sup>C CPMAS spectra of acid insoluble shell extracts (AIM1) of a) *Argonauta hians*, compared to other insoluble shell matrices: b) *Arctica islandica*, c) *Spirula spirula*, and d) α-chitin standard (shrimp). The comparison shows that the organic content of *A. hians* consists primarily of proteinaceous matter while (oligo) saccharides, if present, comprise no more than 10% of the shell matrix. Table S1. List of the antibodies used for the ELISA test. Their target antigens are indicated, as well as their respective dilution of use (titers). Table S2. Complete protein hits obtained by proteomics, according to two stringencies: trypsin (T), and semi-trypsin (ST). For each protein hit, the presence is indicated by “x”, as well as the protein coverage (Cov.) and the number of peptides (Pep.) that allow the protein

identification, for each of the four extracts. For each sequence, the signal peptide is indicated in red and italic. Protein hits above 10% coverage are in green; hits with coverage between 5 and 10% are in blue, and those below 5% are in orange.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.O. and F.M.; methodology, M.O. and F.M.; validation, M.O. and F.M.; formal analysis, M.O.; F.M.; C.B., L.P.; A.S. and I.B.S.; investigation, M.O., F.M., L.P., A.S. and I.B.S.; data curation, F.M.; writing—original draft preparation, M.O. and F.M.; writing—review and editing, M.O.; F.M.; A.S., I.B.S., C.B., L.P., P.N.; visualization, M.O.; supervision, F.M.; project administration, F.M.; P.N.; funding acquisition, F.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was financially supported by a grant from INSU–CNRS (INTERRVIE program, 2019) and by annual recurrent budget from UMR CNRS 6282. The contribution of I. Ben Shir and A. Schmidt was supported by the Israel Science Foundation grant 2001/17.

**Acknowledgments:** The authors thank Kevin Stevens (Ruhr-Universität Bochum, Bochum, Germany) for providing one shell of *Argonauta argo* and Jan Strugnell (James Cook University, Townsville, Australia) for providing the *Spirula spirula* molecular dataset. They also thank Jérôme Thomas (UMR CNRS 6282 Biogéosciences Dijon) for designing Figure 1.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

1. Lowenstam, H.A.; Weiner, S. *On Biomineralization*; Oxford University Press: Oxford, UK, 1989.
2. Addadi, L.; Joester, D.; Nudelman, F.; Weiner, S. Mollusk shell formation: A source of new concepts for understanding biomineralization processes. *Chem. A Eur. J.* **2006**, *12*, 980–987. [[CrossRef](#)]
3. Simkiss, K.; Wilbur, K.M. *Biomineralization: Cell Biology and Mineral Deposition*; Elsevier, Ed.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 1989.
4. Hare, P.E. Amino acids in the proteins from aragonite and calcite in the shells of mytilus californianus. *Science* **1963**, *139*, 216–217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Crenshaw, M.A. The soluble matrix from Mercenaria mercenaria shell. *Biomineralization* **1972**, *6*, 6–11.
6. Weiner, S. Mollusk shell formation: Isolation of two organic matrix proteins associated with calcite deposition in the bivalve Mytilus californianus. *Biochemistry* **1983**, *22*, 4139–4145. [[CrossRef](#)]
7. Rusenko, K.W.; Donachy, J.E.; Wheeler, A.P. Purification and characterization of a shell matrix phosphoprotein from the american oyster. In *Surface Reactive Peptides and Polymers*; Sykes, C.S., Wheeler, A.P., Eds.; ACS Symposium Series; American Chemical Society (ACS): Washington, DC, USA, 1991; Volume 444, pp. 107–124.
8. Marin, F.; Luquet, G. Molluscan shell proteins. *Comptes Rendus Palevol* **2004**, *3*, 469–492. [[CrossRef](#)]
9. Sarashina, I.; Yamaguchi, H.; Haga, T.; Iijima, M.; Chiba, S.; Endo, K. Molecular evolution and functionally important structures of molluscan dermatopontin: Implications for the origins of molluscan shell matrix proteins. *J. Mol. Evol.* **2006**, *62*, 307–318. [[CrossRef](#)]
10. Nishiguchi, M.K.; Mapes, R.H. Cephalopoda. In *Phylogeny and Evolution of the Mollusca*; Ponder, W.F., Lindberg, D.R., Eds.; University of California Press: Berkeley, CA, USA, 2008; pp. 163–199.
11. Kröger, B.; Vinther, J.; Fuchs, D. Cephalopod origin and evolution: A congruent picture emerging from fossils, development and molecules. *BioEssays* **2011**, *33*, 602–613. [[CrossRef](#)]
12. Brayard, A.; Escarguel, G.; Bucher, H.; Monnet, C.; Brühwiler, T.; Goudemand, N.; Galfetti, T.; Guex, J.; Meehl, G.A.; Arblaster, J.M.; et al. Good genes and good luck: Ammonoid diversity and the end-permian mass extinction. *Science* **2009**, *325*, 1118–1121. [[CrossRef](#)]
13. Murray, J.W. *Atlas of Invertebrate Macrofossils*; Longman & The Palaeontological Association: Harlow, UK, 1985.
14. Finn, J.K. Family argonautidae. In *Cephalopods of the World. An Annotated and Illustrated Catalogue of Cephalopod Species Known to Date*; Octopods and Vampire Squids. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes; Jereb, P., Roper, C.F., Norman, M.D., Finn, J.K., Eds.; FAO Species Catalogue for Fishery Purposes: Rome, Italy, 2014; Volume 3, pp. 228–237.
15. Finn, J.K.; Victoria, M. Recognising variability in the shells of argonauts (Cephalopoda: Argonautidae): The key to resolving the taxonomy of the family. *Mem. Mus. Vic.* **2018**, *77*, 63–104. [[CrossRef](#)]
16. Finn, J.K.; Norman, M.D. The argonaut shell: Gas-mediated buoyancy control in a pelagic octopus. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2010**, *277*, 2967–2971. [[CrossRef](#)]

17. Naef, A. Cephalopoda. *Fauna Flora Golf. Neapel* **1923**, *35*, 1–863.
18. Kniprath, E. Ontogeny of the molluscan shell field: A review. *Zool. Scr.* **1981**, *10*, 61–79. [[CrossRef](#)]
19. Mitchell, P.R.; Phakey, P.P.; Rachinger, W.A. Ultrastructural observations of the argonaut shell. *Scan. Microsc.* **1994**, *8*, 35–46.
20. Bandel, K.; Dullo, W.C. Zur Schalenstruktur fossiler und rezenter Argonauta-Gehäuse (Octopoda, Cephalopoda). *Nat. Mensch Jahresmitt. Nat. Ges. Nurnb.* **1984**, *1984*, 33–38.
21. Wolfe, K.; Smith, A.M.; Trimby, P.; Byrne, M. Microstructure of the paper nautilus (*Argonauta nodosa*) shell and the novel application of electron backscatter diffraction (EBSD) to address effects of ocean acidification. *Mar. Biol.* **2012**, *160*, 2271–2278. [[CrossRef](#)]
22. Marie, B.; Luquet, G.; De Barros, J.-P.P.; Guichard, N.; Morel, S.; Alcaraz, G.; Bollache, L.; Marin, F. The shell matrix of the freshwater mussel *Unio pictorum* (Paleoheterodonta, Unionoida). *FEBS J.* **2007**, *274*, 2933–2945. [[CrossRef](#)]
23. Dubois, M.; Gilles, K.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F.; Dubois, K.G.M. A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature* **1951**, *168*, 167. [[CrossRef](#)]
24. Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **1956**, *28*, 350–356. [[CrossRef](#)]
25. Masuko, T.; Minami, A.; Iwasaki, N.; Majima, T.; Nishimura, S.-I.; Lee, Y.C. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Anal. Biochem.* **2005**, *339*, 69–72. [[CrossRef](#)]
26. Morrissey, J.H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.* **1981**, *117*, 307–310. [[CrossRef](#)]
27. Campbell, K.P.; MacLennan, D.H.; Jorgensen, A.O. Staining of the Ca<sup>2+</sup>-binding proteins, calsequestrin, calmodulin, troponin C, and S-100, with the cationic carbocyanine dye “Stains-all”. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 11267–11273. [[PubMed](#)]
28. Oudot, M.; Neige, P.; Ben, S.I.; Schmidt, A.; Strugnell, J.M.; Plasseraud, L.; Broussard, C.; Hoffmann, R.; Lukeneder, A.; Marin, F. The shell matrix and microstructure of the Ram’s Horn squid: Molecular and structural characterization. *J. Struct. Biol.* **2020**, *211*, 107507. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Agbaje, O.B.A.; Ben, S.I.; Zax, D.B.; Schmidt, A.; Jacob, D.E. Biomacromolecules within bivalve shells: Is chitin abundant? *Acta Biomater.* **2018**, *80*, 176–187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Stejskal, E.; Schaefer, J.; Waugh, J. Magic-angle spinning and polarization transfer in proton-enhanced NMR. *J. Magn. Reson.* **1977**, *28*, 105–112. [[CrossRef](#)]
31. Bennett, A.E.; Rienstra, C.M.; Auger, M.; Lakshmi, K.; Griffin, R.G. Heteronuclear decoupling in rotating solids. *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 6951–6958. [[CrossRef](#)]
32. Albeck, S.; Aizenberg, J.; Addadi, L.; Weiner, S. Interactions of various skeletal intracrystalline components with calcite crystals. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 11691–11697. [[CrossRef](#)]
33. Pavat, C.; Zanella-Cleon, I.; Becchi, M.; Medakovic, D.; Luquet, G.; Guichard, N.; Alcaraz, G.; Dommergues, J.-L.; Serpentine, A.; Lebel, J.-M.; et al. The shell matrix of the pulmonate land snail *Helix aspersa maxima*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* **2012**, *161*, 303–314. [[CrossRef](#)]
34. Matsudaira, P. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 10035–10038.
35. 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*, 2515–2523. [[CrossRef](#)]
36. Marin, F.; Pokroy, B.; Luquet, G.; Layrolle, P.; De Groot, K. Protein mapping of calcium carbonate biominerals by immunogold. *Biomaterials* **2007**, *28*, 2368–2377. [[CrossRef](#)]
37. Kanold, J.M.; Guichard, N.; Immel, F.; Plasseraud, L.; Corneillat, M.; Alcaraz, G.; Brümmer, F.; Marin, F. Spine and test skeletal matrices of the Mediterranean sea urchin *Arbacia lixula* a comparative characterization of their sugar signature. *FEBS J.* **2015**, *282*, 1891–1905. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Loftus, E.; Rogers, K.; Lee-Thorp, J. A simple method to establish calcite: Aragonite ratios in archaeological mollusc shells. *J. Quat. Sci.* **2015**, *30*, 731–735. [[CrossRef](#)]
39. Kong, J.; Yu, S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2007**, *39*, 549–559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

40. Radev, L.; Mostafa, N.Y.; Michailova, I.; Salvado, I.M.M.; Fernandes, M.H.V. In vitro bioactivity of collagen/calcium phosphate silicate composites, cross-linked with chondroitin sulfate. *Int. J. Mater. Chem.* **2012**, *2*, 1–9. [[CrossRef](#)]
41. Jastrzebski, W.; Sitarz, M.; Rokita, M.; Bułat, K. Infrared spectroscopy of different phosphates structures. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2011**, *79*, 722–727. [[CrossRef](#)]
42. Anbalagan, G.; Prabakaran, A.R.; Gunasekaran, S. Spectroscopic characterization of Indian standard sand. *J. Appl. Spectrosc.* **2010**, *77*, 86–94. [[CrossRef](#)]
43. Gertman, R.; Ben, S.I.; Kababya, S.; Schmidt, A. In situ observation of the internal structure and composition of biom mineralized emiliana huxleyi calcite by solid-state NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13425–13432. [[CrossRef](#)]
44. Pomin, V.H. NMR chemical shifts in structural biology of glycosaminoglycans. *Anal. Chem.* **2013**, *86*, 65–94. [[CrossRef](#)]
45. Bøggild, O.B. The shell structure of the mollusks. *K. Dan. Vidensk. Selsk. Skr. Naturvidensk. Math. Afd.* **1930**, *9*, 231–326.
46. Kobayashi, I. Internal microstructure of the shell of argonauta argo. *Venus* **1971**, *30*, 103–112. [[CrossRef](#)]
47. Young, J.Z. Observations on argonauta and especially its method of feeding. *J. Zool.* **2009**, *133*, 471–479. [[CrossRef](#)]
48. Stephens, W.M. The exquisite argonauts. *Sea Front.* **1965**, *11*, 139–147.
49. Turek, R. Chemisch-analytische untersuchungen an mollusken-schalen. *Arch. für Nat. Z. für Syst. Zool.* **1933**, *2*, 291–302.
50. Degens, E.T.; Spencer, D.W.; Parker, R.H. Paleobiochemistry of molluscan shell proteins. *Comp. Biochem. Physiol.* **1967**, *20*, 553–579. [[CrossRef](#)]
51. Marin, F.; Marie, B.; Hamada, S.B.; Silva, P.; Roy, N.L.; Wolf, S.E.; Montagnani, C.; Joubert, C.; Piquemal, D.; Marie, B. “Shellome”: Proteins involved in mollusc shell biomineralization—Diversity, functions. In *Recent Advances in Pearl Research*; TERRAPUB: Tokyo, Japan, 2013; pp. 149–166.
52. Dauphin, Y.; Marin, F. The compositional analysis of recent cephalopod shell carbohydrates by Fourier transform infrared spectrometry and high performance anion exchange-pulsed amperometric detection. *Cell. Mol. Life Sci.* **1995**, *51*, 278–283. [[CrossRef](#)]
53. Marie, B.; Marin, F.; Marie, A.; Bédouet, L.; Dubost, L.; Alcaraz, G.; Milet, C.; Luquet, G. Evolution of nacre: Biochemistry and proteomics of the shell organic matrix of the cephalopod nautilus macromphalus. *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1495–1506. [[CrossRef](#)]
54. Réhault-Godbert, S.; Hervé-Grépinet, V.; Gautron, J.; Cabau, C.; Nys, Y.; Hincke, M. Molecules involved in chemical defence of the chicken egg. In *Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products: Egg Chemistry, Production and Consumption*; Nys, Y., Bain, M., Van Immerseel, F., Eds.; Woodhead Publishing: Cambridge, UK, 2011; pp. 183–208.
55. Sathyan, N.; Philip, R.; Chaithanya, E.R.; Kumar, P.R.A. Identification and molecular characterization of molluskin, a histone-H2A-derived antimicrobial peptide from molluscs. *ISRN Mol. Biol.* **2012**, *2012*, 219656. [[CrossRef](#)]
56. Ramos-Silva, P.; Kaandorp, J.A.; Huisman, L.; Marie, B.; Zanella-Cléon, I.; Guichard, N.; Miller, D.J.; Marin, F. The skeletal proteome of the coral acropora millepora: The evolution of calcification by co-option and domain shuffling. *Mol. Biol. Evol.* **2013**, *30*, 2099–2112. [[CrossRef](#)]
57. Weiss, I.M.; Schönitzer, V.; Eichner, N.; Sumper, M. The chitin synthase involved in marine bivalve mollusk shell formation contains a myosin domain. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 1846–1852. [[CrossRef](#)]
58. Marin, F. Mollusc shellomes: Past, present and future. *J. Struct. Biol.* **2020**, *212*, 107583. [[CrossRef](#)]
59. Marin, F.; Bundelava, I.A.; Takeuchi, T.; Immel, F.; Medakovic, D. Organic matrices in metazoan calcium carbonate skeletons: Composition, functions, evolution. *J. Struct. Biol.* **2016**, *196*, 98–106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Herlitzte, I.; Marie, B.; Marin, F.; Jackson, D.J. Molecular modularity and asymmetry of the molluscan mantle revealed by a gene expression atlas. *GigaScience* **2018**, *7*, 1–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Le Pabic, C.; Marie, A.; Marie, B.; Percot, A.; Bonnaud-Ponticelli, L.; Lopez, P.-J.; Luquet, G. First proteomic analyses of the dorsal and ventral parts of the Sepia officinalis cuttlebone. *J. Proteom.* **2017**, *150*, 63–73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

62. Čadež, V.; Škapin, S.D.; Leonardi, A.; Križaj, I.; Kazazić, S.; Salopek-Sondi, B.; Sondi, I. Formation and morphogenesis of a cuttlebone's aragonite biomineral structures for the common cuttlefish (*Sepia officinalis*) on the nanoscale: Revisited. *J. Colloid Interface Sci.* **2017**, *508*, 95–104. [[CrossRef](#)]
63. Tanner, A.R.; Fuchs, D.; Winkelmann, I.E.; Gilbert, M.T.P.; Pankey, M.S.; Ribeiro, Â.M.; Kocot, K.M.; Halanych, K.M.; Oakley, T.H.; Da Fonseca, R.R.; et al. Molecular clocks indicate turnover and diversification of modern coleoid cephalopods during the Mesozoic Marine Revolution. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2017**, *284*, 20162818. [[CrossRef](#)]
64. Marin, F.; Gillibert, M.; Westbroek, P.; Muyzer, G.; Dauphin, Y. Evolution: Disjunct degeneration of immunological determinants. *Neth. J. Geosci.* **1999**, *78*, 135–139. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 7) Résultats complémentaires

### 7.1) Test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) chez quatre céphalopodes.

Dans une étude préliminaire, nous avons souhaité comparer la capacité de réactivité croisée de la matrice organique soluble (ASM) de différents céphalopodes actuels, avec un jeu épuré de 11 anticorps, dirigés contre des matrices fractionnées ou non ou bien contre des protéines coquillères purifiées (cf. tableau supplémentaire S1 de l'article précédent pour plus d'information à leur sujet). Pour cette analyse, nous nous sommes particulièrement intéressés à *Spirula spirula*, *Argonauta hians*, *Sepia officinalis* et *Nautilus macromphalus*. Pour ces deux derniers organismes, une extraction "minute" de la matrice coquillière a été réalisée tandis que pour *S. spirula* et *A. hians* des solutions stocks de matrice organique soluble étaient

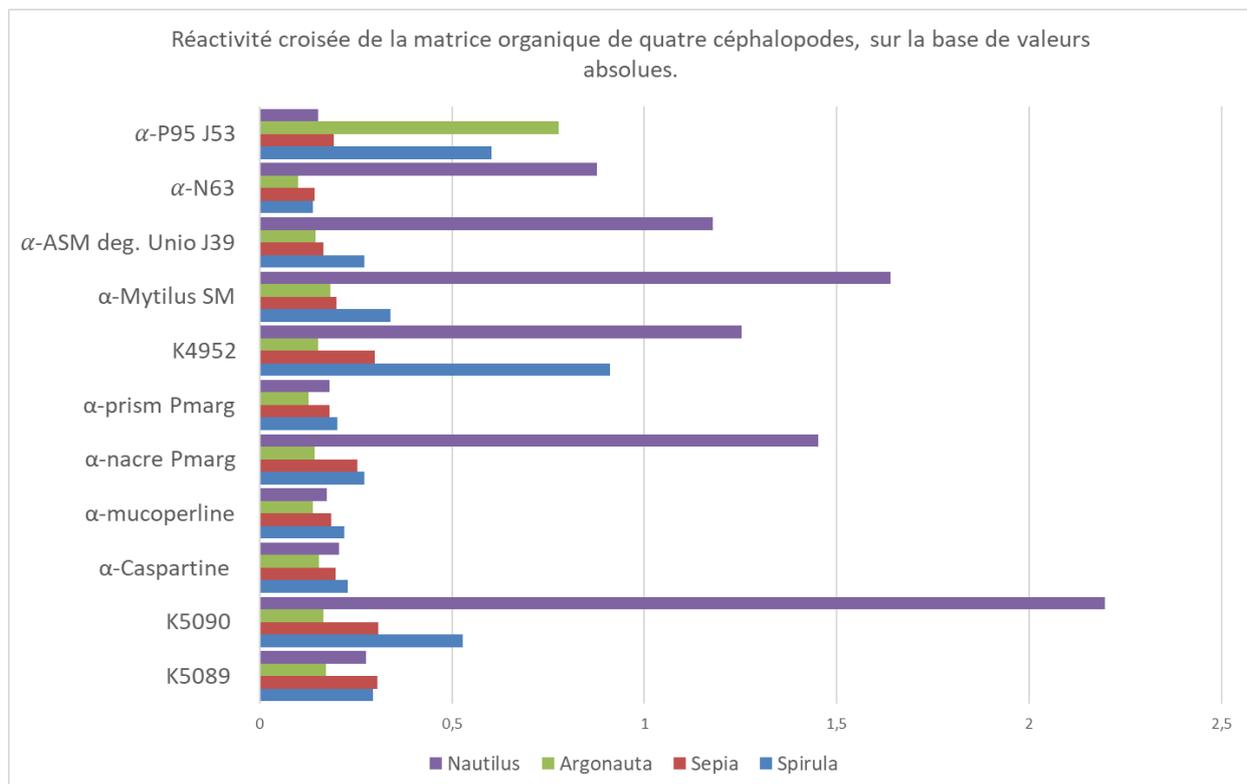


Figure III.5 : Résultats d'un test ELISA sur la matrice coquillière de quatre céphalopodes actuels : le nautilus (en violet), l'argonaute (en vert), la seiche (en rouge) et la spirule (en bleu). Ce graphique est construit sur la base des valeurs absolues d'absorbance.

déjà disponibles.

Les résultats de ce test sont résumés au sein de la Figure III.5, élaborée à partir de valeurs absolues. Il est intéressant de noter que la matrice organique soluble d'*A. hians* présente un patron de réactivité tout à fait particulier, puisqu'elle ne réagit avec aucun anticorps excepté l'anticorps anti-P95. Cet anticorps polyclonal a été produit contre une protéine soluble de

nacre du bivalve d'eau douce *Unio pictorum* (Marie *et al.* 2008). Il est également intéressant de constater qu'aucun des patrons de réactivité des quatre céphalopodes ne se ressemblent deux à deux. En effet, si la matrice de *N. macromphalus* semble réagir avec la grande majorité des anticorps utilisés ici (avec un pic de réactivité pour l'anticorps K5090 dirigé contre la matrice acido-soluble de nacre de *Pinna nobilis*), celle de *S. spirula* présente une réactivité relativement élevée avec trois anticorps principaux ( $\alpha$ -P95, K5090 et  $\alpha$ -ASM de *Bathymodiolus*) et celle de *S. officinalis* ne semble réagir significativement avec aucun des anticorps sélectionnés. Cette expérience très préliminaire et qui comporte des biais analytiques démontre néanmoins que les quatre matrices solubles testées ont des signatures sérologiques différentes, ce qui implique qu'elles sont différentes entre elles. Concernant le modèle argonaute, il est fascinant de constater qu'un seul anticorps dirigé contre une protéine d'un mollusque d'une classe différente (bivalve) extraite et purifiée à partir d'une microstructure différente (nacre) donne une réactivité croisée significative. La raison de cette réactivité peut être expliquée de deux manières. 1. Il existe un ou plusieurs déterminants antigéniques ou épitopes (de courtes séquences de 6 à 10 acides aminés, des motifs saccharidiques particuliers) très immunogènes, communs aux matrices d'*Unio pictorum* et d'*Argonauta hians*. C'est une possibilité bien réelle si l'on songe que bon nombre de protéines de matrices sont modulaires et que les modules fonctionnels sont assemblés comme les pièces d'un « Meccano » (Marin *et al.* 2008). 2. Les réactivités croisées sont complètement fortuites, ce qui revient à dire que si un ou plusieurs déterminants antigéniques/épitopes sont communs, cela ne signifie pas qu'ils appartiennent à des domaines fonctionnels ayant les mêmes fonctions. Cela s'est notamment vu pour des déterminants antigéniques communs aux plantes, mollusques et insectes (Faye & Chrispeels 1988).

#### 8) Conclusion

À l'issue de cette étude sur la microstructure coquillière et la signature biochimique de la matrice organique d'*Argonauta hians*, il nous est possible de dégager plusieurs informations importantes.

**La matrice organique de *A. hians* représente environ 1,8 % du poids de la coquille**, une valeur « élevée » qui classe celle-ci parmi les plus riches en matrice organique. Étonnamment, c'est la matrice organique soluble (ASM) qui apparaît comme majoritaire au sein de la coquille : d'ordinaire, les microstructures coquillières sont plutôt enrichies en

fraction insoluble qui peut alors représenter jusqu'à 95 % de la matrice organique, comme c'est le cas de la nacre (Marin *et al.* 2008).

La combinaison d'approches biochimiques (tests ELLA notamment) et physiques (FT-IR, SS-NMR) démontre **une prédominance de la fraction protéique au sein de la matrice organique, une caractéristique tout à fait particulière**. Ainsi, *A. hians* semble posséder une matrice organique coquillière très différente de celles d'autres céphalopodes, comme par exemple *Spirula spirula* ou *Sepia officinalis*, toutes deux particulièrement enrichies en chitine. Enfin, la fraction saccharidique constitutive de la matrice organique soluble (ASM) de *A. hians* apparaît comme essentiellement constituée de glycosaminoglycanes sulfatés (GAGs). Ces derniers, par leur forte charge négative, sont généralement supposés interagir avec la précipitation du carbonate de calcium (effet inhibiteur, ou bien effet d'interférence avec la cristallisation). Cependant, nos tests de cristallisation *in vitro*, réalisés sur la matrice organique soluble, dénotent **une très faible réactivité** de celle-ci avec le carbonate de calcium. Ces observations sont déconcertantes car contradictoires. Ces résultats ne concernent cependant que la matrice soluble, et l'influence de la fraction insoluble sur la cristallisation demeure encore inconnue. Néanmoins, en s'appuyant sur le modèle de minéralisation coquillière bidirectionnelle et périodique telle que suggérée par Mitchell et ses co-auteurs (1994), il est possible d'expliquer la morphologie cristalline uniquement à l'aide de l'espace disponible au moment de la cristallisation. De même, le mouvement des voiles dorsaux depuis l'extérieur vers l'intérieur de la coquille (ou inversement) permet d'expliquer l'inhibition cristalline ponctuelle du front de minéralisation, plutôt que par un jeu de protéines dédiées à cette fonction.

L'approche protéomique *in silico* de la matrice organique, basée sur la recherche de modèles métaboliques hétérologues depuis NCBI, ne révèle qu'un **nombre très limité de résultats** (« hits ») **avec des protéines coquillières déjà connues chez les mollusques**. Un grand nombre de protéines identifiées appartiennent à la famille des histones, connues pour jouer le rôle d'agents antimicrobiens au sein des matrices extracellulaires calcifiantes. Chez l'argonaute, il est possible que ces peptides antimicrobiens soient utiles lors du processus de minéralisation coquillière, lorsque les voiles des bras dorsaux passent d'une position externe à une position interne, au sein de la coquille. Sous ces conditions, le front de minéralisation est périodiquement exposé à l'environnement extérieur et donc, à de potentielles infections bactériennes.

**Certaines fonctions moléculaires, communément observées au sein des matrices coquillières, brillent par leur absence** au sein de notre analyse. Notamment, nous ne détectons pas des protéines associées au métabolisme de la chitine, d'enzymes « classiques » comme l'anhydrase carbonique ou la tyrosinase, ou de protéines à domaines de faible complexité. Pour ces dernières, notons cependant qu'elles peuvent être présentes mais non détectées, l'approche protéomique pouvant comporter un biais analytique pour ce type de séquences très particulières (Marin *et al.* 2016).

Ainsi, l'ensemble de nos résultats suggère que la matrice organique de *A. hians* possède **un jeu de protéines coquillières unique**, très différent de celui d'autres céphalopodes ou d'autres mollusques, de manière plus générale. Il est possible que la plupart des outils moléculaires utilisés par l'organisme pour élaborer sa coquille ne sont pas hérités d'un ancêtre commun aux céphalopodes; ils auraient été recrutés lors de l'émergence de la famille des Argonautidae. Il est par ailleurs très probable que ces outils moléculaires ont évolué durant tout le Cénozoïque jusqu'à maintenant.

**La géométrie et l'organisation spatiale des microstructures coquillières chez *A. hians* suggèrent une physiologie sécrétoire particulière** : l'existence d'une couche centrale organique et de deux couches calcitiques prismatiques identiques plaident en faveur d'un mode de minéralisation similaire de part et d'autre de la couche centrale. Dans de telles circonstances, il semblerait alors que les voiles dorsaux soient capables d'alterner entre une position externe et interne à la coquille, sécrétant alternativement la couche externe et la couche interne selon un même processus. Un tel mode de sécrétion coquillier implique l'exposition du front de minéralisation à l'environnement extérieur de manière périodique, phénomène qu'on peut potentiellement corrélérer à la présence et au besoin d'agents antimicrobiens au sein de la matrice organique coquillière.

Au vu de ces résultats, plusieurs pistes de recherche ultérieures paraissent particulièrement attrayantes, bien que difficiles à réaliser étant donné le mode de vie de l'argonaute :

- La réalisation de plusieurs transcriptomes du manteau des différents représentants du genre *Argonauta* permettrait d'établir une liste plus complète des protéines sécrétées par le tissu des voiles dorsaux.

- La localisation *in situ* de différents constituants (saccharides, protéines) de la matrice organique au sein des tissus calcifiés permettrait également de mieux comprendre le processus de biominéralisation chez cet animal.
- L'étude de la croissance coquillière à différents stades ontogénétiques chez les femelles argonautes, associée à l'observation *in vivo* de spécimens en pleine croissance permettrait de mieux comprendre le processus de sécrétion coquillière chez cet organisme, à la fois d'un point de vue chronologique et physiologique.

**Ces travaux pourraient apporter des données essentielles à la compréhension des mécanismes dynamiques qui régissent la formation coquillière chez les représentants du genre *Argonauta*.**



## Chapitre IV :

### La biominéralisation coquillière chez la seiche *Sepia officinalis*





### 1) Description, biologie et cycle de vie

*Sepia officinalis*, également connue sous le nom de seiche commune (Fig. IV.1 haut), est un céphalopode néritique peuplant les eaux peu profondes de l'est Atlantique et de la mer Méditerranée (Fig. IV.1bas). Cette espèce démersale (*i.e.* vivant près du fond sans pour autant y vivre de façon permanente) est généralement retrouvée à faible profondeur (pas au-delà de 200 m) le long de la plateforme continentale, notamment sur des substrats sableux ou boueux. Cet organisme effectue des migrations saisonnières entre des eaux côtières au printemps et en été, et des eaux plus profondes (environ 100 m) durant l'automne et l'hiver (Reid *et al.* 2005).

Cette espèce compte parmi les céphalopodes les plus pêchés au sein de nombreux pays, et représente donc un intérêt économique majeur. Par ailleurs, cette espèce a probablement atteint son rendement de production maximum dans certaines zones géographiques : en effet, des tendances de capture négatives ont été observées ces dernières années dans certaines zones de surpêche telles que la Méditerranée (Jereb *et al.* 2015).

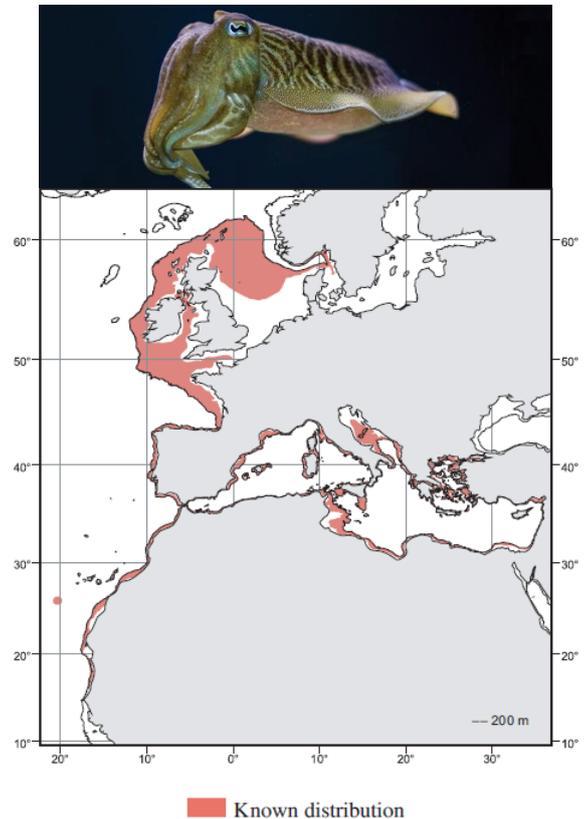


Figure IV.1: (Haut) Photographie d'un individu en milieu naturel (source Google Image); (Bas) Distribution géographique connue de *Sepia officinalis* (d'après Reid *et al.* 2005).

Comme les autres représentants du super-ordre Decabrachia, la seiche possède dix appendices péri-oraux à ventouses, à savoir huit bras et deux tentacules (Fig. IV.2). Les bras sont munis de quatre rangées de ventouses, tandis que les tentacules, dénués de ventouses sur leur longueur présentent 5 à 6 rangées transversales de ventouses de taille variable à leur extrémité nommée massue tentaculaire. Chez le mâle, le bras ventral gauche est transformé en organe reproducteur : c'est l'hectocotyle ; il présente 6 rangées de ventouses proximales, de taille normale, ainsi que 4 à 9 rangées de ventouses médianes réduites. Les deux tentacules préhensibles, plus longs, sont

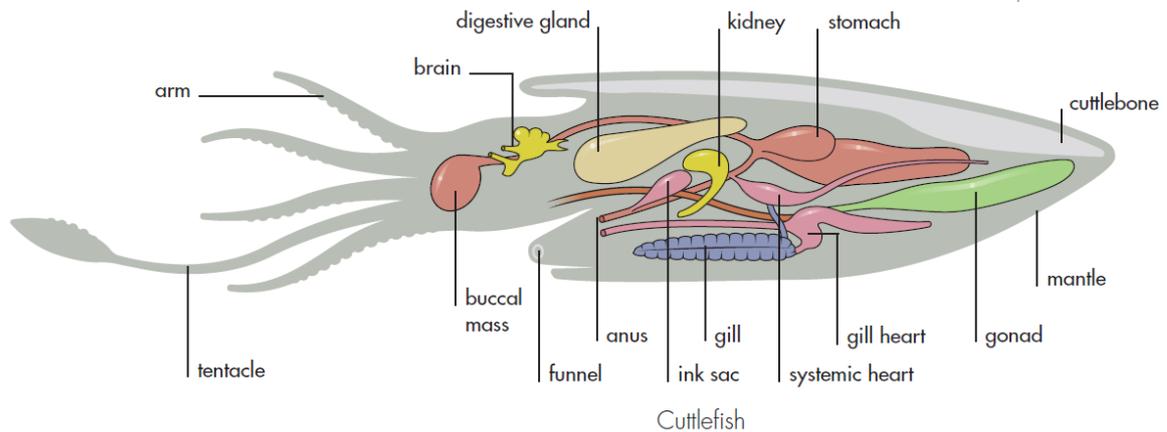


Figure IV.2: Anatomie générale d'une seiche commune, d'après Hanlon *et al.* 2018.

généralement rétractés et dissimulés mais peuvent être rapidement projetés en avant pour capturer une proie avant d'être ramenés à la masse buccale de manière tout aussi vive (Hanlon *et al.* 2018). L'animal possède une structure minéralisée interne, en carbonate de calcium, nommée « os de seiche ». Cette structure oblongue s'affine en position postérieure et se termine en pointe, tandis qu'elle s'arrondit à son extrémité antérieure. Situé en position dorsale, l'une des nombreuses fonctions de l'os de seiche est d'assurer la protection des viscères et autres parties molles de l'animal (Fig. IV.2). Cette structure minéralisée, par son organisation microstructurale, sert également à la flottabilité de l'organisme : l'os de seiche est en réalité composé d'une multitude de chambres que l'animal est à même de remplir de liquide, influant ainsi sur la densité de la structure calcaire et permettant la régulation de son niveau de flottaison.

Suite à une parade amoureuse élaborée, et comme la plupart des autres céphalopodes, la reproduction se fait par l'implantation du spermatophore mâle, via l'hectocotyle, au sein du réceptacle séminal de la femelle, la spermathèque. Pour cela, le mâle et la femelle se placent face à face, permettant ainsi au mâle d'introduire l'hectocotyle au sein d'une poche, remplie d'œufs non fertilisés, appelée le réceptacle séminal. Dans cette poche, la femelle est à même de conserver et d'utiliser le sperme de plusieurs mâles reproducteurs afin de fertiliser ses œufs. Lors de la ponte, les œufs, mesurant 8 à 10 mm de diamètre et reliés les uns aux autres sous forme de grappe, sont attachés à un substrat, tel que des algues, des débris coquilliers, etc. La femelle ne tarde généralement pas à mourir peu de temps après avoir déposé ses œufs (Reid *et al.* 2005). Après 30 à 90 jours, selon la température, les œufs éclosent. Les juvéniles, mesurant entre 7 et 8 mm de longueur, ne peuvent pas rejoindre de trop grandes

profondeurs : leur os, petit et fragile, ne supporte pas une pression d'eau supérieure à 6-9 atmosphères. Jusqu'à ce qu'ils atteignent le stade adulte, les juvéniles présentent un comportement d'enfouissement induit par la lumière : les individus passent la journée cachés dans le sable et n'en sortent qu'à la nuit tombée.

Généralement, la reproduction et la ponte ont lieu durant le printemps et l'éclosion survient au début de l'été. Néanmoins, des pontes sont également observées durant l'hiver (Dan *et al.* 2012; Guerra & Castro 1988). Ainsi, l'espérance de vie d'un individu s'étend de 12 à 24 mois : certains juvéniles semblent alors capables d'atteindre leur maturité sexuelle à seulement quelques mois et se reproduisent donc durant leur première année d'existence, tandis que d'autres ne l'atteignent que plus tardivement (entre 18 et 22 mois) et ne peuvent donc se reproduire qu'au terme de leur deuxième année. *Sepia officinalis* présente donc, à la fois, un cycle de vie court (1 an) et long (2 ans). Il est néanmoins intéressant de noter que la taille minimale permettant la maturité sexuelle chez les femelles est supérieure à celle des mâles : de ce fait, les femelles reproductrices sont plus grosses et moins nombreuses que les mâles reproducteurs. Cette observation est renforcée par la mortalité massive de ces femelles reproductrices au terme de la ponte (Guerra & Castro 1988; Le Goff & Daguzan 1991; Reid *et al.* 2005).

D'après l'étude du contenu stomacal de près de 2000 spécimens, *Sepia officinalis* apparaît comme une espèce de prédateur opportuniste (Du Sel *et al.* 2000): avec un régime flexible, elle peut survivre dans des environnements où ses proies habituelles ne sont pas disponibles. Durant leurs trois premiers mois de vie, les individus semblent essentiellement se nourrir de crustacés amphipodes avant de changer de régime, et de consommer une plus grosse part de poissons au cours de leur croissance. À maturité sexuelle, les individus regagnent les eaux côtières (moins de 10 m de profondeur) et changent une nouvelle fois de régime alimentaire avec une prédominance de crustacés. Lors de son activité de prédation (Fig. IV.3), la seiche utilise l'homochromie (ou coloration cryptique) afin de se dissimuler aux yeux de sa proie avant de projeter ses tentacules sur elle (cf. vidéo accessible via le QR code en Fig. 3), de l'immobiliser à l'aide de ses bras et de lui injecter un venin toxique. Chez la seiche, le camouflage cryptique sert également un grand nombre de fonctions autres que la prédation (pour des revues, cf. Hanlon & Messenger 1988; Holmes 1940; Kelman *et al.* 2007) comme

par exemple la communication entre les individus (notamment en période de parade amoureuse) ou encore la dissuasion et l'intimidation de prédateurs potentiels.



Figure IV.3: Photographies illustrant l'homochromie de la seiche (à droite) et la projection en avant de ses deux tentacules préhensiles (à gauche). Scannez le QR code pour voir une vidéo de prédation d'une jeune seiche sur une crevette de quelques millimètres, réalisée lors d'une mission au SMEL.

## 2) Taxonomie et phylogénie

La seiche commune *Sepia officinalis* Linné, 1758 représente l'un des rares modèles d'étude chez les céphalopodes. Appartenant à la grande famille Sepiidae et membre d'un genre ne comptant pas moins de 94 espèces valides (Neige 2003, des études plus récentes décomptent plus d'une centaine d'espèces, voir Reid *et al.* 2005), il s'agit d'un organisme largement connu (biologie, cycle de vie, écologie, etc.), notamment en raison de son grand intérêt économique, avec pour systématique (d'après Sweeney & Roper 1998):

Embranchement Mollusca Cuvier 1795

Classe Cephalopoda Cuvier 1797

Sous-classe Coleoidea Bather 1888

Super-ordre Decabrachia Haeckel 1866

Ordre Sepiida Zittel 1895

Famille Sepiidae Keferstein 1866

Genre *Sepia* Linnae 1758

*S. officinalis* Linnae 1758

La famille des Sepiidae compte, à ce jour, uniquement trois genres : *Sepia*, *Metasepia* et *Sepiella*. Malgré une classification largement acceptée au sein de la famille des Sepiidae, le statut monophylétique du genre *Sepia* est, encore aujourd'hui, débattu. Khromov (1998) définit six sous-groupes au sein du genre : *Hemisepius*, *Acanthosepion*, *Sepia sensu stricto*, *Anomalosepia*, *Rhombosepion* et *Doratosepion*. Si, à ce jour, aucune étude moléculaire à large échelle n'a démontré cette hypothèse, des études récentes à petite échelle ont apporté un support moléculaire à certains de ces sous-groupes (*Acanthosepion* et *Doratosepion* ; Yoshida *et al.* 2010). Cependant, des études phylogénétiques moléculaires ont également révélé des relations insoupçonnées entre *Sepia officinalis* et *Sepiella*, suggérant ainsi la paraphylie du genre *Sepia* (Bonnaud *et al.* 2006; Lindgren *et al.* 2012; Yoshida *et al.* 2010).

De plus, la position phylogénétique de l'ordre des Sepiida n'est pas encore parfaitement résolue: malgré l'acceptation de ce clade au sein des Decabrachia, ses relations de parenté avec les autres membres de ce super-ordre font toujours débat (Lindgren & Anderson 2018). La radiation des Sepiida trouverait son origine durant le Cénozoïque (Lindgren & Anderson 2018; Neige 2003) : quelques fossiles cénozoïques ont notamment été retrouvés en Europe, en Amérique du Nord, en Arabie et en Inde (voir Khromov 1998). Cependant, le genre *Sepia* (tel que décrit et accepté aujourd'hui), n'est connu que dans les sédiments post-Eocène de l'Europe, suggérant ainsi une origine de ce genre au sein de l'Ancien Monde (*i.e.* l'ensemble Afrique, Asie et Europe ; Khromov 1987). Neige *et al.* (2016) suggèrent néanmoins la présence de *Sepia* dans des sédiments datés de -46 à -43 Ma (Lutétien, Eocène moyen) du bassin de Paris à partir de l'analyse de statolithes fossiles. Certains de ces statolithes sont assignés au genre *Sepia* (*S. boletzkyi* sp. nov et ?*S. pira* sp. nov.) sur la base de leur morphologie typique montrant un dôme latéral bien arrondi, caractère que Neige *et al.* (2016) interprètent comme une apomorphie du genre *Sepia*.

### 3) La coquille

La coquille interne de *Sepia*, également appelée « os de seiche » ou « sépion » est essentiellement constituée d'aragonite. Elle sert à la fois de support physique aux tissus mous de l'organisme, mais également de système de régulation de la flottaison comme chez d'autres céphalopodes, tels que *Nautilus* ou *Spirula*. Néanmoins, l'os de seiche présente une organisation structurale très différente de celle des autres céphalopodes : la coquille consiste en deux régions bien distinctes : le bouclier dorsal et la partie ventrale cloisonnée (Fig. IV.4).

### 3.1) *Microstructure*

La microstructure coquillière de l'os de seiche est étudiée très tôt par divers auteurs (Appellöf 1893; Naef 1922). Ces travaux proposent une terminologie devenue classique à savoir, les termes de bouclier dorsal, partie ventrale cloisonnée ou rostre (ce terme désignant la petite pointe à l'arrière de la structure). Néanmoins, ces premières descriptions reposent sur des lames minces, réalisées sur un seul plan d'analyse : elles limitent donc considérablement l'étude des rapports et transitions qu'entretiennent les différentes couches coquillières entre elles. Depuis, les progrès technologiques ont permis à de nombreux autres auteurs d'analyser la microstructure coquillière de cet organisme.



Figure IV.4: Photographies d'un os de seiche en vue dorsale (gauche) et ventrale (droite), coté postérieur en haut montrant le rostre.

#### a) Le bouclier dorsal

Les trois couches du bouclier dorsal, décrites par Appellöf (1893) ont également été reconnues par Barskov (1973) à savoir : (i) une couche externe sphérulitique prismatique, responsable de l'ornementation tuberculée caractéristique de la surface externe et disparaissant avant le rostre ; (ii) une couche médiane fortement calcifiée en son centre et organique au niveau des ailes, à l'aspect lamellaire-croisé et supposée être minéralisée en deux épisodes successifs ; (iii) une couche interne semi-prismatique et poreuse. Bandel et Boletzky (1979) décrivent et illustrent également ces trois couches au sein du bouclier dorsal. Dauphin (1981) confirme l'existence de trois couches, mais apporte cependant quelques corrections aux observations précédentes : selon elle, la couche externe persiste à proximité du rostre mais modifie son aspect en devenant progressivement feuilletée, voire même granulaire. De même, elle explique que la couche médiane présente une structuration lamellaire plutôt que lamellaire-croisée. À notre connaissance, aucune autre étude n'a été menée à ce jour sur la microstructure du bouclier dorsal de l'os de seiche.

## b) La partie ventrale cloisonnée

La partie ventrale cloisonnée correspond à la superposition de nombreuses chambres vides, d'une centaine de micromètres de haut, séparées les unes des autres par des lamelles minérales également appelées septes. Chacune de ces chambres est ouverte dans sa partie postérieure, permettant alors à l'organisme de remplir ces cavités de gaz et de liquides variés pour ajuster sa flottabilité dans la tranche d'eau. Chaque chambre, ou loge, possède des piliers verticaux qui servent d'éléments de support aux septes.

Selon Barskov (1973), les cloisons (ou septes) comportent deux couches : une antérieure à structure semi-prismatique et une postérieure, lamellaire. L'auteur explique également que les cloisons sont reliées entre elles par une série de couches plissées (qu'il nomme "undular plates" dans son ouvrage) aujourd'hui reconnues comme les piliers. Il présente ces couches plissées comme un équivalent de la couche sphérulitique prismatique postérieure qu'il observe dans les septes de céphalopodes à coquille externe. Bandel et Boletzky (1979) font également la distinction entre les cloisons et les piliers : selon eux, les cloisons comportent un toit prismatique et un plancher lamellaire, le passage entre les deux étant progressif.

Cependant, les auteurs n'illustrent pas la structure des piliers, ni même ne l'évoquent. Dauphin (1981) décrit les cloisons comme étant formées de trois assises distinctes : (i) une ventrale, semi-prismatique ; (ii) une médiane, lamellaire généralement très fine et (iii) une dorsale, en « piliers ». Selon l'auteure, la couche médiane montre une surface semblable à celle de la nacre de type II (Mutvei 1970) et n'est donc pas du tout similaire à la couche médiane du bouclier dorsal. Dans un article plus ancien, Dauphin (1979) plaide pour une correspondance des piliers avec la couche prismatique des cloisons. Plus récemment, Le Pabic *et al.* (2016) décrivent les cloisons comme étant constituées de deux structures

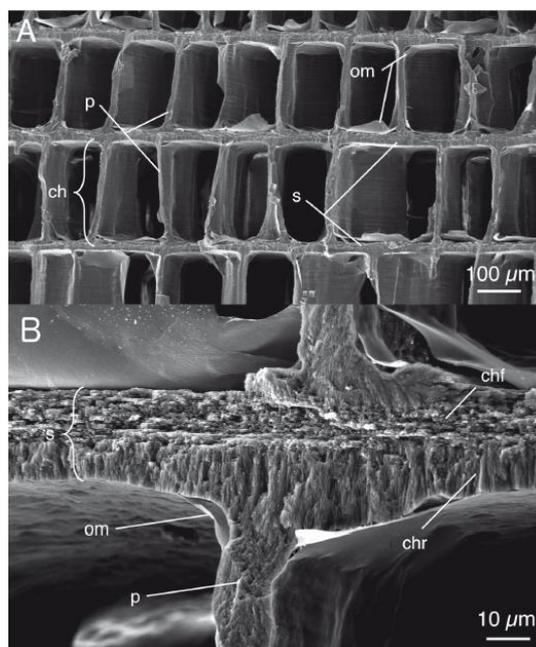


Figure IV.5 : Photographies obtenues au microscope électronique à balayage sur des sections latérales de la coquille de *Sepia officinalis* montrant ses structures internes, d'après Le Pabic *et al.* 2016. A. Vue d'ensemble des chambres (ch) de l'os de seiche, montrant les piliers (p), les septes (s) et les membranes organiques (om). B. Grossissement d'un sept, illustrant les différences structurales entre le plafond (chr) et le plancher (chf) d'une chambre.

distinctes (Fig. IV.5): un plafond (partie inférieure) et un plancher (partie supérieure). Selon eux, le plafond arbore une structure prismatique, composée de prismes rectangulaires en bâtonnets, similaire à la structure observée au sein des piliers et à la partie inférieure de la couche interne du bouclier dorsal. Le plancher, quant à lui, montre une structuration lamellaire, comme évoquée par Bandel et Boletzky (1979).

Sur la base de cette littérature, la microstructure de l'os de seiche peut-être envisagée de la manière suivante (Fig. IV.6, tiré de Le Pabic *et al.* 2017) : le bouclier dorsal est constitué de trois couches : (i) une couche externe sphérolitique prismatique, (ii) une couche médiane lamellaire dans sa partie calcifiée et (iii) une couche interne semi-prismatique. La partie ventrale est quant à elle divisée en deux composants : les cloisons, composées de deux couches (le plancher, lamellaire et le plafond, prismatique) et les piliers prismatiques.

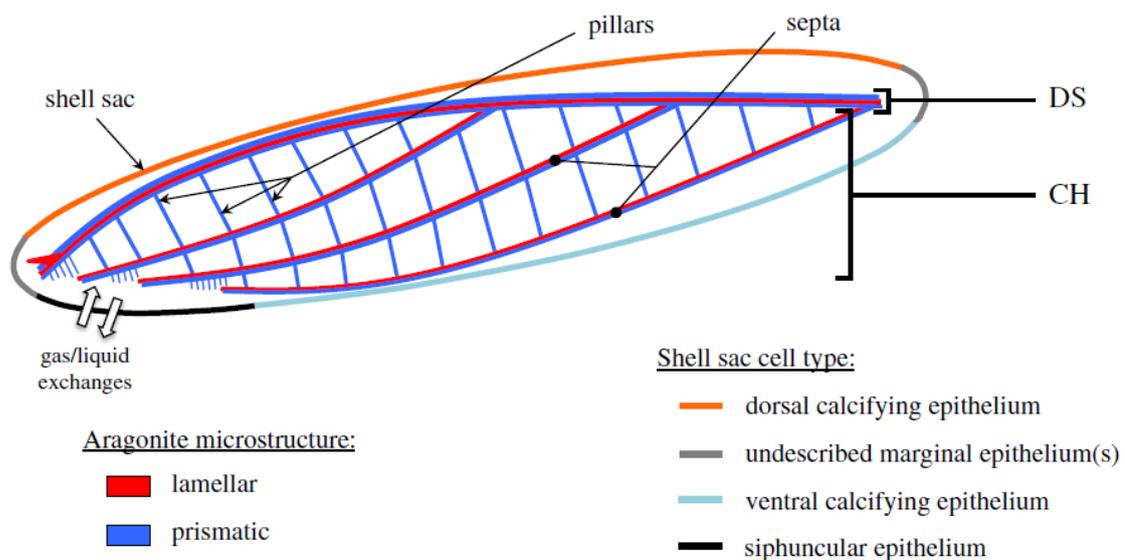


Figure IV.6 : Représentation schématisée, selon le plan sagittal, des principaux constituants de l'os de seiche, avec les microstructures minérales et la répartition des différents types cellulaires du sac coquillier associés, d'après Le Pabic *et al.* 2017. DS : bouclier dorsal (« dorsal shield ») ; CH : partie ventrale cloisonnée (« chambered ventral part »).

#### 4) La matrice organique

L'os de seiche a déjà fait l'objet de plusieurs caractérisations biochimiques de la matrice organique dans son ensemble (Dauphin & Marin 1995; Degens *et al.* 1967b; Florek *et al.* 2009; Le Pabic *et al.* 2017; Okafor 1965). Okafor (1965) est le premier à extraire et caractériser la fraction chitineuse de l'os de seiche par diffraction aux rayons X (DRX) et Infra-rouge (FT-IR) qu'il identifie comme de la  $\beta$ -chitine. Degens *et al.* (1967) établissent la

composition en acides aminés de l'ensemble de la coquille qui se révèle être faiblement enrichie en résidus acide aspartique, en glycine, en proline et en alanine. La matrice organique représente entre 4 et 10% du poids total de la coquille (Birchall & Thomas 1983; Čadež *et al.* 2017; Florek *et al.* 2009; Le Pabic *et al.* 2017) et est décrite comme un assemblage de polysaccharides, de glycoprotéines et de protéines. D'après Dauphin & Marin (1995), la fraction saccharidique insoluble est essentiellement représentée par la glucosamine tandis que son équivalent soluble est majoritairement constitué de glucosamine, de xylose, de fucose, de glucose et de galactose. Les résidus « glucosamine » en abondance suggèrent la présence de chitine (de type  $\beta$ ), qui jouerait le rôle de support mécanique lors de l'élaboration de la coquille (Birchall & Thomas 1983; Dauphin & Marin 1995; Florek *et al.* 2009; Le Pabic *et al.* 2017). L'ensemble des macromolécules nécessaires à la minéralisation coquillière est sécrété par un épithélium monocouche, enveloppant l'os de seiche, nommé « sac coquillier ». Celui-ci est décrit comme un tissu complexe, composé de trois à cinq types cellulaires différents (Appellöf 1893; Bandel & Boletzky 1979; Denton & Gilpin-Brown 1961; Le Pabic *et al.* 2017).

Actuellement, il n'existe que peu d'informations au sujet du contenu protéique de l'os de seiche dans son ensemble, ou bien au sujet des différents compartiments qui le composent (*i.e.* bouclier dorsal ou partie ventrale cloisonnée). En 2017, Čadež *et al.* (2017) caractérisent par protéomique quelques protéines à partir de peptides extraits de gels d'électrophorèse 2D (2D-PAGE), à la fois dans le bouclier dorsal et dans la partie ventrale cloisonnée de l'os de seiche. Ils identifient notamment une chitine synthase au sein du bouclier dorsal et une ficoline au sein de la partie ventrale cloisonnée ; une lectine à affinité avec la chitine présentant des domaines de type collagène et fibrinogènes, avec des sites de fixation de carbohydrates, est également identifiée. Du fait de l'absence de protéome, ces auteurs ne présentent qu'une douzaine de séquences peptidiques.

La même année, de manière indépendante, Le Pabic *et al.* (2017) proposent la première analyse protéomique de la matrice organique de *Sepia*, en considérant séparément le bouclier dorsal et la partie ventrale cloisonnée. Leur analyse ne parvient cependant qu'à identifier 5 protéines à partir des bases de données actuelles de nucléotides et de protéines chez les céphalopodes : la protéine reconnue avec le meilleur score contient un domaine transferrine (responsable du transport du fer dans le sang), correspondant à plus de 42 % d'identité aux sérotransférines de poisson. Parmi les cinq protéines identifiées, une seule présente une séquence complète : elle montre notamment un domaine de fixation de la chitine de type 2,

avec 42.7 % de similitude avec une protéine d'affinité avec la chitine du calmar *Dosidicus gigas*. Les trois autres protéines reconnues lors de l'analyse contiennent respectivement un domaine O-glycosyl hydrolase (impliqué notamment dans les fonctions de dégradation des glucides complexes, de défenses antibactériennes, de métabolisme cellulaire, etc.), un domaine vWF ("*von Willebrand factor*") de type A et 3 domaines inhibiteurs de protéase ("*protease inhibitors*", ou domaines kunitz ; responsables de l'inhibition des enzymes de dégradation de protéines). La première correspond à 63 % à une chitinase de *Sepia esculenta*, la seconde à 42.2 % à une protéine non caractérisée de *Lottia gigantea* (la patelle géante) possédant une fonction de fixation de la chitine et la dernière à plusieurs serpinines (inhibiteurs de protéase à serine ou "*serine protease inhibitors*" en anglais). Ces deux études font ainsi état d'une composition protéique différente entre le bouclier dorsal et la partie ventrale cloisonnée, suggérant l'existence de deux processus de minéralisation distincts, ou du moins, de deux régimes sécrétoires différents, selon que l'on se situe du côté du bouclier dorsal ou de la partie ventrale cloisonnée.

#### 5) Un premier modèle de construction coquillière

Tanabe *et al.* (1985) sont les premiers à proposer un modèle de construction des chambres (*i.e.* partie ventrale cloisonnée) de l'os de seiche. Néanmoins, sur la base de données structurales plus détaillées, et notamment à partir d'observations au microscope électronique à balayage (MEB) et à transmission (MET), Checa *et al.* (2015) proposent un nouveau cycle de formation des chambres chez *Sepia*, selon la chronologie suivante :

- 1) Croissance de la chambre : l'épithélium calcifiant du manteau assure de manière simultanée la sécrétion (i) d'une série de lamines organiques organisées en couches, à partir d'une phase de type « cristaux liquides », et (ii) du toit du septum (*i.e.* "*septum roof*" en anglais) par un précurseur organique (Fig. IV.7a). Par la suite, la sécrétion assurée par ce précurseur organique est restreinte aux zones de croissance des piliers : il en résulte alors une continuité cristallographique entre le toit du septum et les piliers. Les cristaux liquides sont sécrétés couche après couche, et les lamines traversent les piliers organiques formant ainsi une partition horizontale de ceux-ci. Il est intéressant de constater que Checa *et al.* reprennent à leur compte les concepts de cristaux liquides, développés par Yves Bouligand sur la cuticule chitineuse des crustacés (Bouligand 1965, 1972, 2004).

- 2) Achèvement de la chambre : la sécrétion du précurseur organique du plancher du septum (*i.e.* "roof floor" en anglais) achève la croissance en hauteur d'une chambre (Fig. IV.7b). À ce moment-là, l'extrémité ventrale de chaque pilier est tractée par le manteau, conférant ainsi à ces extrémités et aux membranes qui les entourent une forme convexe ventralement. Il en résulte une digitation visqueuse (*i.e.* "viscous-fingering" en anglais), un phénomène d'instabilité à l'interface de deux fluides de viscosité différente, induisant alors la modification morphologique des piliers, qui passent d'une morphologie labyrinthique en position dorsale à une morphologie dendritique en position ventrale (Fig. IV.7b – encarts gauches et droits). Le phénomène de traction par le manteau est également responsable de l'amincissement du plancher du septum au niveau de sa zone de contact avec les piliers et probablement aussi de la différence structurale qui oppose le plancher au complexe plafond/piliers. En effet, les fibres d'aragonite qui composent le plancher sont horizontales et changent de direction en fonction de l'orientation des fibres de chitine, tandis que le plafond et les piliers présentent des aiguilles aragonitiques, perpendiculaires au plancher et parallèles à l'axe des piliers.
  
- 3) Minéralisation de la chambre : la minéralisation de la chambre survient après son cloisonnement, lorsqu'un nouveau cycle de formation de chambre est initié (Fig. IV.7c). Des granules ou particules de carbonate de calcium se forment à l'intérieur des lamines organiques du plafond puis, dans un second temps, des piliers jusqu'à complète minéralisation de ces deux structures (Fig. IV.7d). Le plancher du septum minéralise en dernier.
  
- 4) La dessiccation par drainage de la chambre nouvellement formée et minéralisée pousse les lamines organiques primaires à fusionner en lamines horizontales et périphériques secondaires (Fig. IV.7d – encart droit).

En 2017, Čadež *et al.* apportent plus de précision au modèle conceptuel de Checa *et al.* (2015) en examinant les propriétés structurales et morphologiques des deux structures qui composent l'os de seiche, le bouclier dorsal et la partie ventrale cloisonnée, mais également en étudiant leur contenu protéique. Leurs résultats montrent l'existence de deux processus à l'échelle nanométrique responsables de la morphogenèse des deux structures coquillères de

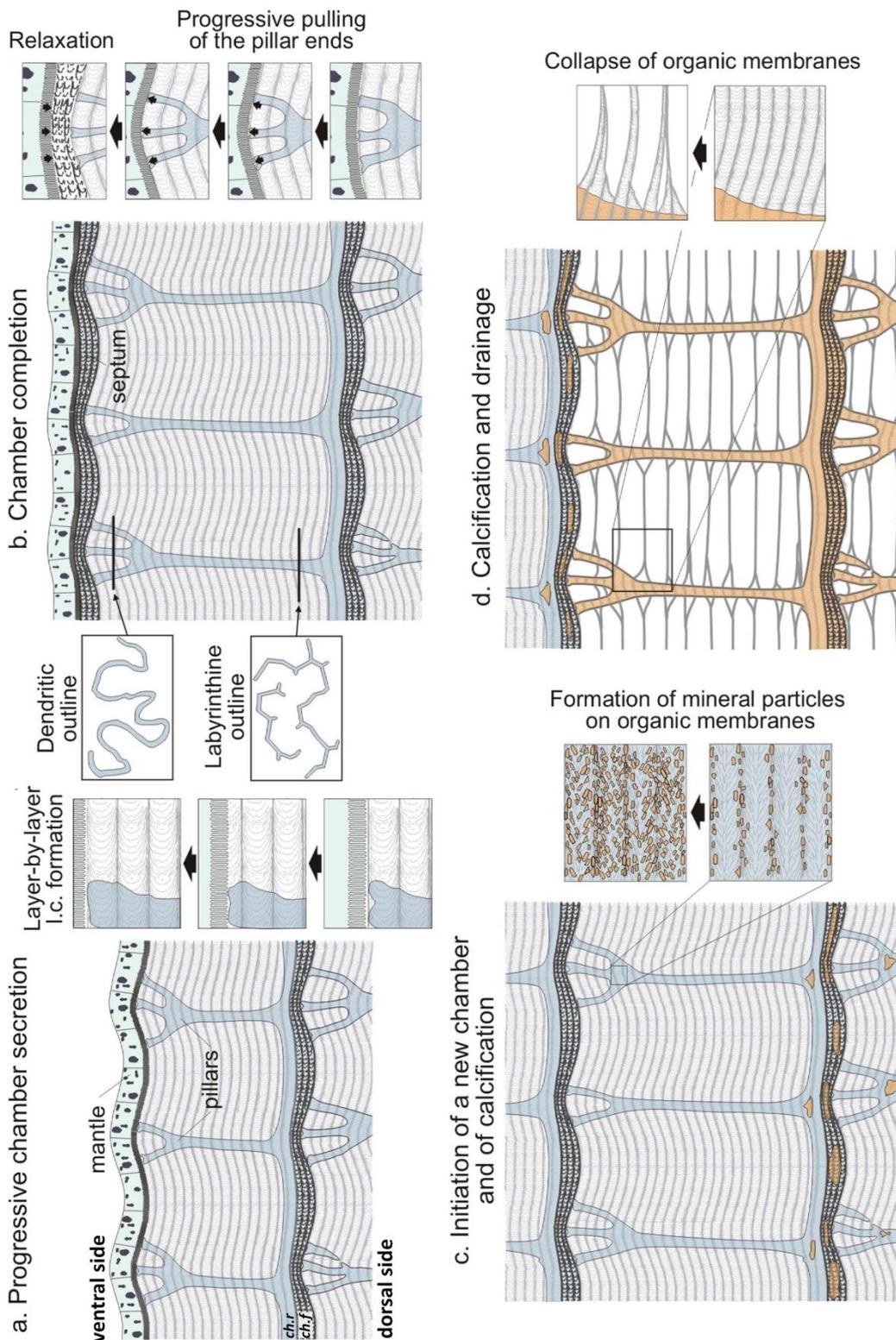


Figure IV.7 : schéma résumant les principales étapes du processus d'élaboration coquillière, dans la zone ventrale cloisonnée de l'os de seiche, d'après Checa *et al.* 2015. A. croissance progressive d'une chambre par sécrétion simultanée de lamines organiques organisées en couches (cf. encart de droite) et d'un plafond, dont les piliers sont la continuité. Selon les auteurs, les lamines sont formées à partir de cristaux liquides tandis que le plafond et les piliers, sont sécrétés par l'intermédiaire d'un précurseur organique ; B. complétion d'une chambre : le précurseur organique achève la croissance en hauteur de la chambre, en produisant un plancher. Les extrémités ventrales des piliers sont alors tractées par le manteau de l'animal (cf. encart de droite), donnant ainsi une forme bombée à ces structures et causant l'amincissement local du plancher. Les auteurs notent également que les piliers évoluent d'une structure labyrinthique côté dorsal à une structure dendritique, côté ventral ; C. Nouveau cycle de formation d'une chambre et minéralisation de la précédente : selon les auteurs, des granules de carbonates de calcium précipitent d'abord à l'intérieur du plafond, puis des piliers jusqu'à complète minéralisation. Ce phénomène s'achève par la solidification du plancher ; D. Dessiccation par drainage de la chambre, poussant alors les lamines organiques primaires à fusionner en lamines horizontales et périphériques secondaires (cf. encart de droite).

l'os de seiche. Selon le modèle proposé par ces auteurs, ces deux processus seraient influencés par les protéines acides de la matrice organique: le premier gouvernerait la nucléation extracellulaire initiale des nanocristaux d'aragonite au sein d'une matrice gélatineuse (*i.e.* "gel-like matrix") contenant des fibres de chitine et diverses protéines combinées sous la forme de complexes supramoléculaires qui offrent alors un environnement de nucléation idéal. Le second serait responsable de la modulation morphologique des nanocristaux d'aragonite nouvellement formés, via des processus d'agrégation et de coalescence aboutissant alors à la formation d'un biominéral aragonitique hiérarchisé et nanostructuré sous le contrôle de la matrice organique. Le modèle proposé par Čadež *et al.* reste cependant très simple et n'apporte pas d'idées fondamentalement nouvelles par rapport aux connaissances établies sur les mollusques depuis plusieurs décennies.

#### 6) Le but de notre étude

Dans le cadre de l'étude de la biominéralisation des céphalopodes actuels, la seiche apparaît comme un modèle d'étude très intéressant et ce, à plusieurs égards. Tout d'abord, il s'agit de l'un des céphalopodes les mieux connus et documentés à ce jour, à la fois en termes de cycle de vie, de développement et de biologie cellulaire. Par conséquent, cet organisme permet d'étudier le mécanisme responsable de la minéralisation coquillière, sans doute de manière plus approfondie que ne le permettent des céphalopodes moins bien connus comme la spirule ou l'argonaute. De plus, l'accès au matériel d'étude est facilité, du fait de l'intérêt économique majeur de cet organisme : ainsi tissus organiques et tissus minéralisés sont accessibles. D'un point de vue évolutif, l'os de seiche s'avère également particulièrement intéressant. En effet, en plus d'être interne, cette coquille présente la particularité de ne pas être enroulée. De plus, son cloisonnement par un jeu de plafonds/planchers et piliers la distingue des autres structures minéralisées observées chez les céphalopodes actuels et fossiles. Au vu de ces informations, plusieurs questions émergent. La seiche possède-t-elle une « boîte à outils biominéralisante » similaire à celles d'autres céphalopodes et/ou mollusques ? Quelle est la chronologie sécrétoire de l'os de seiche ? Comment opère le processus de minéralisation coquillière ? Diffère-t-il entre le bouclier dorsal et la partie ventrale ?

À ce jour, plusieurs études ont été menées chez la seiche commune, *Sepia officinalis*, dans le but de répondre, ne serait-ce que partiellement, à l'ensemble de ces questions. Notre étude

se propose d'examiner à la fois les tissus organiques et minéralisés de cet animal en cherchant notamment à visualiser, par différents outils, la relation géométrique et spatiale de ces tissus entre eux, mais également en s'intéressant aux propriétés physiques et biochimiques de la coquille de *S. officinalis*. Les résultats présentés ci-après constituent une approche préliminaire de ce modèle et des analyses sont toujours en cours.

Le lecteur trouvera à la suite de ce travail et dans la continuité de ce chapitre les conclusions provisoires de notre étude, calibrée sous forme d'un article. Des pistes de recherches ultérieures sont également exposées dans ce qui suit.

### 7) *The cuttlefish's shell: a microstructural and biochemical characterisation*

#### Résumé :

Les mollusques constituent un clade très diversifié, reconnu pour sa capacité à minéraliser une coquille. Cette structure résulte de l'activité sécrétoire d'un tissu calcifiant, l'épithélium externe du manteau. Cet épithélium est responsable de la sécrétion d'une matrice organique au sein de l'espace extrapalléal. Depuis sa découverte en tant qu'acteur clé de la biominéralisation coquillière, la matrice organique a fait l'objet de nombreuses études, notamment chez les bivalves et les gastéropodes. Les céphalopodes représentent pourtant un clade majeur à l'histoire macroévolutive particulièrement intéressante avec une tendance générale à l'internalisation et à la réduction coquillière. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'un des céphalopodes coquilliers les mieux connus à l'heure actuelle : la seiche commune *Sepia officinalis*. Cet organisme présente une coquille interne, le fameux "os de seiche", enveloppée dans le tissu qui la sécrète : le sac coquillier. L'os de seiche présente la particularité de ne pas être enroulé et se divise en deux régions distinctes : le bouclier dorsal et la partie ventrale cloisonnée. Au sein de celle-ci, les traditionnelles cloisons sont remplacées par un jeu de plafond, de plancher et de piliers, constituant les différentes chambres. Cette structure a déjà fait l'objet d'un certain nombre d'études microstructurales mais jusqu'à très récemment, les données biochimiques sur la matrice organique étaient éparses. Seules deux études font état des premières données protéomiques et un seul modèle de biominéralisation a été proposé pour expliquer la partie ventrale de l'os de seiche. Ainsi, le processus de biominéralisation à l'origine de la fabrication de la coquille dans son ensemble demeure encore obscur. La présente étude propose une caractérisation biochimique de la matrice organique de *S. officinalis*, combinée à une approche microstructurale de l'os de seiche et de

ses relations avec le sac coquillier, ainsi qu'une étude histologique des tissus organiques. L'objectif final de ce travail toujours en cours est une comparaison générale de l'ensemble de nos observations avec d'autres représentants de la classe des céphalopodes, et du phylum des mollusques en général.

La caractérisation biochimique révèle que la matrice organique représente une part importante de la structure minéralisée (5 à 7 %) où abonde du matériel insoluble. La combinaison d'approches biochimiques et physiques démontre une correspondance presque parfaite entre fraction insoluble et chitine. Cette tendance, bien que moins prononcée, est également vraie pour la fraction soluble. Au sein de cette dernière, les glycosaminoglycanes sulfatés ne représentent qu'une part mineure.

Le couplage d'analyses microstructurales (géométrie, organisation spatiale, etc.) et histologiques suggère l'existence d'un contact étroit entre les tissus organiques et minéralisés et un front de minéralisation à l'interface. L'approche démontre également un processus de minéralisation bidirectionnel, de part et d'autre de la couche la plus interne du bouclier dorsal. Un phénomène de minéralisation tardif est supposé, sur la base d'observations macroscopiques. Enfin, nous proposons une chronologie sécrétoire hypothétique.

L'ensemble de ces résultats préliminaires laisse à penser qu'il existe de grandes différences entre la matrice organique de *S. officinalis* et celle d'autres céphalopodes. Néanmoins, la validation de cette hypothèse nécessite l'apport de données protéomiques en cours d'acquisition.

# The cuttlefish's shell: a microstructural and biochemical characterization

## *Introduction*

Molluscs are widely famous for their ability to produce a calcified shell. Indeed, from the eight taxonomic classes the phylum contains, five are shell-bearing organisms: monoplacophorans, scaphopods, bivalves, gastropods and cephalopods (Lowenstam 1981). Among them, the shell biomineralization is known to be a genetically controlled process, performed extracellularly. Such a mechanism results from the secretory activity of a specialized tissue, commonly known as the external calcifying epithelium of the mantle. This later is responsible for the secretion of an organic matrix, a complex mixture of proteins, glycoproteins, lipids and polysaccharides. These components are released in the extrapallial space, together with precursor mineral ions, where they are thought to interact and self-assemble (Addadi *et al.* 2006). In this context, several functions are attributed to the organic matrix: locally increasing the ion concentration, providing a scaffold for mineral deposition, catalyzing this process, nucleating crystals and controlling their shape and finally, orient crystal growth in privileged directions by inhibiting the development of some crystal faces (Simkiss & Wilbur 1989). Since its discovery as a key-player in shell biomineralization, the organic matrix has been the subject of several biochemical studies, mainly dealing with its protein moieties. In spite of the wealth of data, these studies focused almost entirely on two molluscan classes: the bivalves and the gastropods. In contrast, cephalopods remain far less studied even if they represent a major class of molluscs, both in terms of past and present ecosystems with about 800 living species and more than 10,000 fossil ones (<http://cephbase.eol.org/>; Nishiguchi & Mapes 2008). Since their appearance in the Middle Cambrian (Murray 1985), they have experienced a complex evolutionary history pointing out a very interesting macroevolutionary trend: a shell reduction and internalization, up to its complex disappearance in the most recent and derived cephalopods (octopods, squids). The perfect embodiment of such an evolutionary trend is the cuttlefish model.

Cuttlefishes, all grouped together under the Sepiidae family, are pelagic cephalopods that inhabit tropical, subtropical and temperate ocean waters (Reid *et al.* 2005). They are mostly shallow-water animals, although they are known to dive up to 1000 meters. They

possess an internal shell, known as the cuttlebone, located in the dorsal side of the animal and embedded in a very particular soft tissue: the shell sac. Even if the shell is thought to be involved in tissue support and buoyancy regulation as for Spirulidae and Nautilidae, its overall morphology and structural organization is quite different. In fact, the cuttlebone consists in two distinct regions: a dorsal shield and a ventral chambered part. On top of that, the shell is not coiled but planar and the “traditional” septa are here replaced by a set of “roofs”, “floors” and “pillars” that together constitute a chamber. Over the decades, the microstructure of the cuttlebone has been the subject of several studies (Bandel & Boletzky 1979; Barskov 1973; Dauphin 1981). Until recently, the biochemical data about the organic matrix of the cuttlebone were scarce (Dauphin & Marin 1995; Degens *et al.* 1967; Florek *et al.* 2009; Okafor 1965) but some recent investigations shed the light on cuttlebone proteomics (Čadež *et al.* 2017; Checa *et al.* 2015; Le Pabic *et al.* 2017). However, very little is still known about the biomineralization process that governs the cuttlebone construction. The present study constitutes an ongoing preliminary work that combines physical observations and biochemical characterizations. It aims at understanding the shell formation process of *Sepia officinalis*.

## ***Material and methods***

### ***Specimens breeding and cuttlebone sampling***

The research and development center of SMEL (Synergie Mer Et Littoral), based in Blainville-sur-Mer, Normandy, France, provided us with cuttlefish eggs collected in May 2018 and placed in culture at 17/17.5°C water, a temperature required for a hatching period after about a month. After hatching, ten juveniles were sacrificed with eugenol, according to ethics rules used to prevent animal suffering, then placed in alcohol (70%) for histological sections, without any further fixation with glutaraldehyde or partial decalcification. Forty-four other juveniles were placed in three tanks, in a water at about 23°C for a rapid growth. All the specimens were daily fed with tiny living amphipod crustaceans collected on the foreshore. After 3 weeks, ten specimens were sacrificed and directly immersed in alcohol (70%) and ten others were immediately dissected: their calcifying tissue was retrieved and frozen in liquid nitrogen and their cuttlebone was placed in alcohol. After 6 weeks, we proceeded to a third sacrifice: two juveniles were directly placed in alcohol after a eugenol treatment, and four

specimens were dissected following the same protocol as above. All specimens that died between two phases of sacrifice were also collected and placed in ethanol (70%).

In total, two cuttlebones at 3 weeks old were used for matrix extraction, as well as two at 6 weeks old. Non-dissected specimens were used for histology experiments or structural investigation after critical point drying (the hatchlings were kept untouched but older specimens were dissected for their cuttlebones). Cuttlebones alone were used for shell embedding and microstructural observations.

The SMEL also provided us with four adult frozen specimens, retrieved from fishing. These specimens were dissected and their cuttlebones were placed in alcohol, mainly for organic matrix extraction but also for shell embedding. Finally, few months after the end of our breeding experiment, the center sent us a batch of several older juveniles (from 7-10 cm long, no age estimated) mainly used for dissection.

#### Macroscopic observations

In total, two 6 weeks old juveniles and two older ones (from 7-10 cm long, no age estimated) were dissected. For each age class, one was ventrally cut open and gutted while the other was incised laterally, following the edge of the cuttlebone, before pulling off the dorsal skin and mantle of the animal. Such dissection procedure aimed at keeping the shell sac in place and at observing its spatial relation with the cuttlebone. Dissected specimens were photographed using a Nikon D750 using an AF-S VR Micro-Nikkor 105mm f/2.8G IF-ED) lens.

#### Shell embedding, critical point drying and microstructure analysis

Shell fragments were embedded in LR (London Resin) White resin, following the manufacturer's instructions (Fluka): benzoyl peroxide (catalyst) was dissolved in the LR White resin monomer solution (9.9 g per 500 mL) for 24 h, under constant stirring, at room temperature, prior to use. Following their immersion at room temperature and under vacuum, the samples were then transferred at 60 °C for the polymerization to proceed (one night to two days). Resin blocks were sliced with a saw microtome (Leica SP1600, manufacturer Leica Biosystems, Nussloch, Germany) and shell sections were polished under water with decreasing grain size sandpaper until reaching mirror-polish quality (0.05 µm, aluminium

oxide). After a short sonication and a slight EDTA etching (1% wt/vol, 2 min), the preparations were dried and carbon or gold-sputtered.

In parallel, a 3 weeks old juvenile specimen that was kept in 70% ethanol was immersed in successive baths of increasing concentration in ethanol (from 80% to 100%, every three hours) before being critically point dried using an automated Leica critical point dryer, model EM CPD300, according to the manufacturer's instructions. Twelve to fifteen cycles of fluid replacement by liquid CO<sub>2</sub> were performed. The dry sample was then embedded in LR-White following the previous protocol. Since the sample was completely dehydrated, sections through the resin block were made in dry conditions (without water) with the Leica saw microtome, before being polished in dry conditions until reaching an almost mirror-polish quality and blown with dry air to remove dust and other debris as much as possible.

#### Shell matrix extraction

Prior to the extraction, the four juvenile cuttlebones (two 3 weeks old and two 6 weeks old) were first, rehydrated for two hours and then, submitted to an ultrasonic cleaning procedure coupled with a saline buffer (0.9% NaCl, 0.1% Tris 10 mM, 0.1% Tween20, 0.1% NaN<sub>3</sub> 1%, pH readjusted to 9 with 0.1 M NaOH) for 20 minutes. The use of Tween 20 allows desorbing contaminant proteins and macromolecules from the surface of the cuttlebones. These latter were rinsed several times with ultrapure water and dried for SEM observation to check if there were any remaining organic tissues. The procedure was repeated if necessary. Once perfectly cleaned, both cuttlebones from each age class were coarsely powdered with a mortar and pestle, immediately weighted and decalcified overnight, at 4°C, in 5 mL of cold dilute acetic acid (10% vol/vol) under constant stirring (according to the protocol described by Pavat *et al.* 2012). For each batch, the clear solution was centrifuged (3900G, 30 min): the supernatant, containing the acid soluble matrix (ASM) was filtered (5 µm, Millipore) on a Nalgene filtration device before being extensively dialyzed against ultrapure water for three days (6 water changes). In parallel, the pellet containing the acid insoluble matrix (AIM) was rinsed *via* 5 cycles of resuspension in ultrapure water-centrifugation (each supernatant being added to the ASM) and retrieved. Finally, both ASM and AIM were freeze-dried and the lyophilisates were weighted on a precision balance (Sartorius Quintix35-1S) three to five times, and the mean value was calculated.

A fragment (3-4 cm long) from a sub-adult specimen was also submitted to a matrix extraction, following a slightly different protocol. Following a two hours rehydration, the dorsal shield and the ventral part were separated by gently scraping the soft porous ventral part of the cuttlebone. The dorsal shield was finely powdered, using a mortar and a pestle and both parts were cleaned over 24 hours, using a saline buffer (3-4 buffer changes). Each batch was then submitted to five cycles of rinsing with ultrapure water and centrifugation (3900G, 10 min) before being dried and weighted. Both parts were then decalcified overnight, at 4°C, by adding progressively cold dilute acetic acid (10% vol/vol) at a flow rate of 0.5 mL every 10 s, under constant stirring. The clear solutions were centrifuged (3900G, 30 min): the ASM was filtered (5 µm, Millipore) before being ultrafiltered for volume reduction on an Amicon stirred cell (model 8400, 400 mL), firstly using a 10 KDa cutoff: this fraction is referred to as the ASM10. The filtrate (what went through the membrane) was collected and ultrafiltered again on a 3 KDa membrane: this soluble fraction, referred to as the ASM3, only contains macromolecules of molecular weight between 10 and 3 KDa. The concentrated solutions (15 mL) were dialyzed (1 KDa cutoff) against ultrapure water for three days (6 changes of water) and lyophilized. The AIM was rinsed several times (the supernatant being added to the ASM)

	Fractions	Shell powder (g)	Shell matrix after lyophilisation (mg)	Shell weight (%)	
<b>3 weeks old</b>	ASM	0.039	Not quantified	Not quantified	
	AIM		2.97	7.55 ± 0.2	
<b>6 weeks old</b>	ASM	0.114	0.05	0.042 ± 0.02	
	AIM		8.77	7.52 ± 0.2	
<b>Sub-adult</b>	D.sh.	ASM > 10 KDa	9.56	0.28 ± 0.1	
		ASM > 3 KDa	3.41	0.028 ± 0.02	
		AIM	300	8.78 ± 0.2	
	V.prt.	ASM > 10 KDa	10.93	34.24	0.31 ± 0.2
		ASM > 3 KDa	6.69*	12.39	0.11 ± 0.1
		AIM		154.9	1.41 ± 0.5

**Table 1:** Quantity of shell matrices (soluble and insoluble) extracted from the cuttlebone of *S. officinalis*. On the sub-adult specimen, the organic matrix was retrieved from the dorsal shield (D.sh.) and the ventral part (V.prt.) separately. ASM: acid soluble matrix; AIM: acid insoluble matrix. “\*” indicates two values of shell powder, the first one being the actual amount put to cleaning and the second one being the amount of shell powder retrieved from the saline buffer cleaning procedure. The percentage of organic matrix was calculated based on this second amount, in order to keep the estimation unbiased.

and freeze-dried. All six dried pellets (ASM>10 KDa, ASM>3 KDa, AIM from both parts) were also weighed on a precision balance three to five times, and the mean value was calculated. All the results are included in Table 1.

For quantity issues, the ASM10 fractions (especially for the dorsal shield) was only used for SDS-PAGE, FT-IR, ELLA tests and a minute amount was set aside for proteomic investigations.

#### Quantification of sugars, sulfated glycosaminoglycans and proteins

The whole sugar content of the ASM (only the fraction higher than 10KDa, since the material available for the ASM>3KDa of the dorsal shield was in negligible quantity) was tested according to the classical sulfuric acid-phenol method (Dubois *et al.* 1951) applied to smaller volumes adapted to microplates (Dubois *et al.* 1956; Masuko *et al.* 2005). In Eppendorf tubes, 200  $\mu$ L of ASM sample, diluted from a 5 $\mu$ g/ $\mu$ L solution, was allowed to react with 500  $\mu$ L concentrated sulfuric acid and 100  $\mu$ L phenol 5% before being allowed to cool down for ten minutes before being incubated at 37°C for 10 additional minutes. Standard solutions of glucose (amounts ranging from 0 to 37.5  $\mu$ g/well, *i.e.* 200 $\mu$ L) were treated in parallel in a similar manner. Aliquots (200  $\mu$ L,  $\frac{1}{4}$  of the total volume) were pipetted in a 96-well microplate and for each sample, a triplicate was made. Finally, the test was read at 490 nm on a microplate reader (Bio Rad, model 680, Hercules, CA, USA) and a standard curve was traced.

The sulfated glycosaminoglycans (sGAGs) were quantified with the Blyscan assay (Ref. B1000, Biocolor Ltd., Antrim, UK): in Eppendorf tubes, 100  $\mu$ L of diluted samples and reference standard (bovine tracheal chondroitin-4-sulfate) were allowed to react with Blyscan dye reagent (900  $\mu$ L) for 30 minutes, under constant agitation and at room temperature. The tubes were centrifuged for 15 minutes at 15,300 G, thus generating pellets of dye-glycosaminoglycans complexes. The supernatants were carefully discarded and the pellets were re-dissolved in 500  $\mu$ L of dissociation reagent under vortexing. After a short centrifugation, aliquots (150  $\mu$ L) were put in triplicates in a 96-well microplate, which was subsequently read at 655 nm. A standard curve was traced for quantification.

Finally, the protein content was quantified using the Quick Start™ Bradford Protein Assay Kit 2 (Ref. 5000202, Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA). In brief, our samples, diluted from a solution of 5 µg/µL and the reference standard, diluted according to seven different concentrations (BSA, ranging from 2mg/mL to 0.125 mg/mL), were allowed to react with Bradford dye reagent (for a final volume of 800 µL). The mixture was then vortexed, then incubated at room temperature for 5 minutes before being pipetted in a 96-well microplate (200 µL/well) and read at 595 nm with a microplate reader, and a standard curve was traced for quantification.

### *Mono-Dimensional PAGE*

All the matrix fractions (ASM10, ASM3 and AIM) were analyzed by conventional mono-dimensional denaturing SDS-PAGE (Bio-Rad, Mini Protean III gels, Hercules, CA, USA), on precast gradient gels (Mini-PROTEAN TGX Gel 4–15% acrylamide, 90 mm × 70 mm, Bio-Rad). The ASM lyophilisates were dissolved in ultrapure water to a concentration of 5 µg/µL (stock solution). An aliquot was sampled, to which 4X Laemmli Sample Buffer (LSB, 1/4 of the final volume) was added. Chips of the AIM pellets were resuspended in ultrapure water, to which a similar proportion of LSB solution was added. All preparations were heat-denatured for 5 min at 100 °C for the ASMs and 10 min for the AIMS. Note that the AIMS were partly solubilized by LSB. Only the soluble fractions, referred to as LS-AIMS (Laemmli Soluble-Acid Insoluble Matrix), were run on gels and the most insoluble fractions were not tested further. The preparations were cooled down on ice and shortly centrifuged before being applied on the top of the gel. Subsequently, gels were stained with Bio-Rad blue dye, silver nitrate, alcian blue, PAS and carbocyanine, *i.e.*, "Stains-all". Due to low quantity, the two ASM3 fractions were only investigated with the silver nitrate stain.

### *Fourier Transform Infra-red Spectroscopic Characterization (FT-IR)*

Minute amounts of samples (shell powder ≈ 1–5 mg powder, freeze-dried chips of ASM and AIM ≈ 100–500 µg) were analysed with an FT-IR Bruker Alpha spectrometer (Bruker Optics Sarl, Marne la Vallée, France) fitted with an Attenuated Total Reflectance (ATR) ALPHA-P device equipped with a mono-reflection diamond crystal in the 4000–375 cm<sup>-1</sup> wavenumber range (24 scans at a spectral resolution of 4 cm<sup>-1</sup>). The qualitative

assignment of absorption bands was performed by comparison with previous spectra descriptions, achieved by our group or available in the literature. An additional spectrum was acquired from commercial crab chitin (Sigma, C9752).

#### Enzyme-Linked Lectin Assay (ELLA)

The test was carried out in 96-well microplates (MaxiSorp, Nunc <sup>TM</sup>, Rockslide, Denmark): the *Sepia* ASMs (both >10 KDa and >3KDa) diluted in TBS buffer (200 ng/well) was incubated overnight at 37 °C. Then, the wells are washed 3 times with TBS/Tween20. Wells were blocked with 1X concentrated Carbo-free blocking solution (Vector Labs, ref. SP-5040) for at least 30 min at 37 °C. The diluted lectins (in TBS/Tween20) were incubated into the microplate for 90 min at 37 °C, at the following dilution factors: 200 times for kits I and II, and 100 times for kit III. After three washes with TBS/Tween20, the microplates were finally incubated with a diluted solution of avidin-alkaline phosphatase conjugate (1:70000, ref. Sigma A7294, St. Louis, MO, USA) for 90 min at 37 °C, for the detection of bound biotinylated lectins. Following five washes with TBS/Tween20, the microplates were revealed with a substrate solution containing aqueous diethanolamine (9.7% vol/vol, pH adjusted to 9.8 with HCl) and phosphatase substrate (0.5 mg/mL, pNPP Tablet, Sigma, St. Louis, MO, USA). The microplates were read at 405 nm every 15 min (BioRad Model 680, Hercules, CA, USA). A check of the background signal without ASM, lectin or Avidin-AP showed no reaction with the substrate solution. This test was performed with duplicates of each lectin and the results were normalized and translated in percentages of reactivity by subtracting the background and considering the highest response to represent 100%. The test was performed three times.

#### Histological observations

Following the different dissections of juvenile specimens, we undertook histological investigations. Briefly, samples were fixed in neutral buffered formalin, before being dehydrated in a dehydration automat (ASP300S Leica) in graded alcohols (70 to 100%), cleared in xylene and embedded in paraffin. Slices of 5 µm thick were obtained with microtome (RM2145 Leica). Slices were deposited on slide to achieve the Hematoxylin-Eosin or Von Kossa (presence of calcium deposits) staining, using an AutoStainer automat

XLST5010 Leica. Both colorations were performed according to standard protocols (Sheehan & Hrapchak 1980).

## ***Results***

### ***Shell microstructures***

The shell of *S. officinalis* is entirely aragonitic, as suggested by the IR spectrum depicted in Figure 1D, with the characteristic double peak around 700-713  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_4$  internal vibration modes of  $\text{CO}_3^{2-}$ ; see Balmain *et al.* 1999). According to SEM observations (Figure 1), the dorsal shield consists in three layers: a prismatic uppermost, a lamellar central and a prismatic innermost (Figure 1B1-B6). The most external one is made of prismatic crystals (Fig. 1B3), arranged in fans at the junction with the lamellar layer (Fig. 1B2), but this organization is somehow lost in the upper part of this layer. The internal layer, also composed of prismatic crystals (Fig. 1B6), does not exhibit such arrangements (Fig. 1B5).

The ventral part appears as a succession of chambers, piled up on each other (Fig. 1C1). There, the septum consists in two different layers (Fig. 1C3): the upper part, named floor, exhibits a lamellar structure while the lower part, called roof, appears as prismatic. The pillars show a prismatic structure and seem to be in continuity with the roof of each septum (Fig. 1C2-C3). At the junction between a pillar and a septum, the latter appears slightly bent towards the ventral side of the structure (Fig. 1C1-C2). One can also notice the presence of light horizontal membranes within each chamber (Fig. 1C2, pointed out by black arrows).

SEM observations of the critically point dried specimen (Figure 2) demonstrate a close contact between soft tissues and mineralized ones without any discontinuity between the external surface of the dorsal shield, rather rough and more or less thick, and the very beginning of the shell sac (Fig. 2B-C). One can notice that the soft tissues may be here divided into two distinct layers (Fig. 2A) according to a slight change in color: a light one and darker one that may be recognized as the outer and the inner epitheliums respectively (Zheng *et al.* 2018).

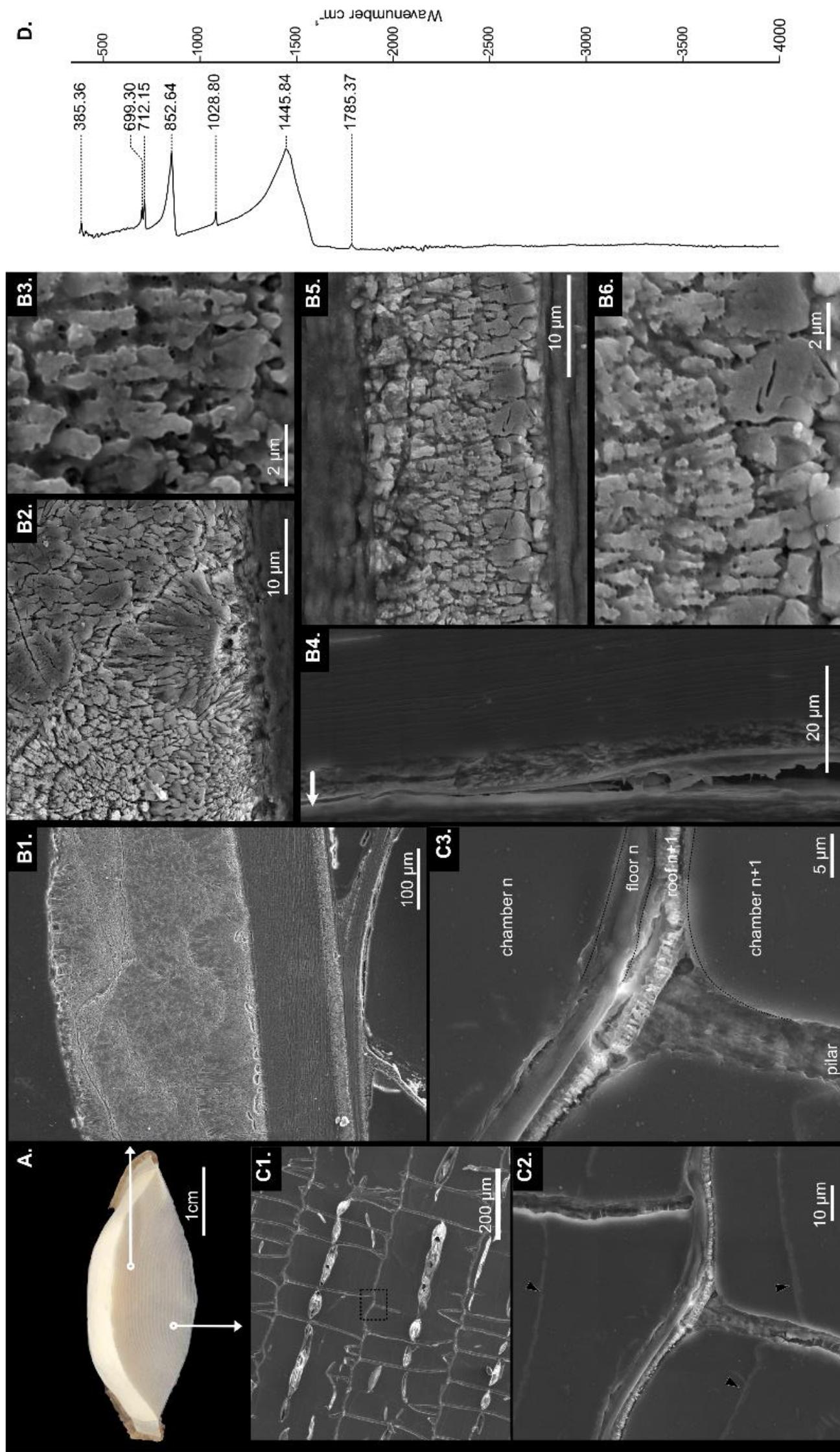


Figure 1: Shell microstructure of *Sepia officinalis*. A) General view, transversal section; B1) General view of the dorsal shield, B2-3) close-up of the uppermost layer (at the junction with the lamellar layer), showing its prismatic nature and details of its crystals; B4) General view of the lamellar layer. The white arrow indicates the exterior of the cuttlebone; B5-6) close-up of the innermost prismatic layer; C1) General view of the ventral part of the cuttlebone; C2) Magnification of the junction between two pillars and a septum; C3) Higher magnification of the structural organization of such a contact zone; D) FT-IR spectra of the shell powder, showing its fully aragonitic nature.

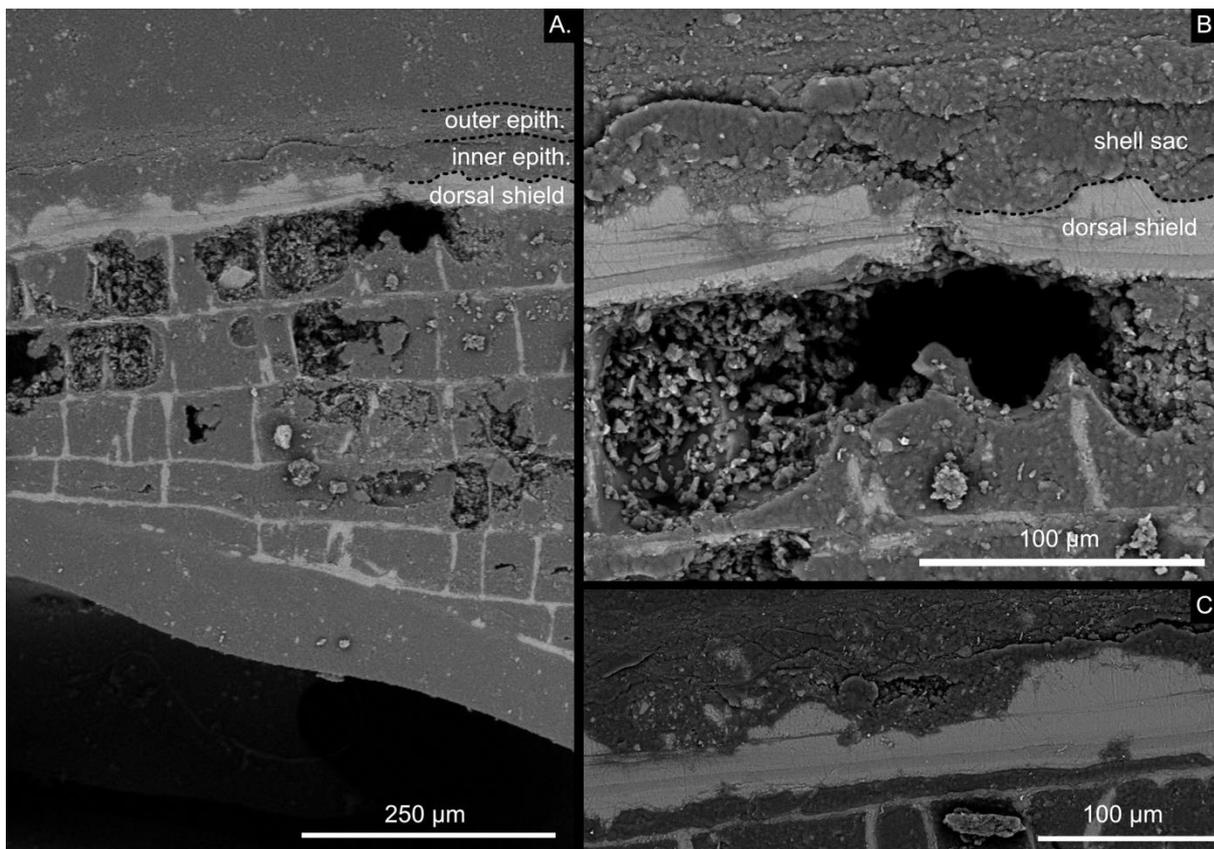


Figure 2 : SEM observations of an individual critically dried and embedded in resin, showing the relationship between soft and mineralized tissues. A. General view of the cuttlebone in contact with the shell sac, showing that this latter is made, at least, of two layers here recognized as the outer epithelium (outer epith., lighter zone) and the inner epithelium (inner epith., darker one); B-C. Higher magnification showing a direct contact between the tissues.

### Quantification of the organic matrix in the shell

Matrix quantification of the extraction is shown in Table 1. For young specimens (*i.e.* 3 weeks and 6 weeks old), the organic matrix is mostly insoluble with AIMs accounting for approximately 7.5% of the shell weight, while the acid soluble matrix accounts for less than 0.05% when quantifiable (on 6 weeks-old specimens only). Older specimens (sub-adults) yield similar amounts, where the insoluble fraction consistently predominates. Within the dorsal shield, the AIM accounts for almost 8.8% of the shell weight and ASM only 0.3%, both fractions altogether (*i.e.* ASM10 + ASM3). This represents an AIM/ASM ratio of 29. For the ventral part, this ratio is not as important, with an AIM accounting for 1.5% and an ASM (both fractions altogether) around 0.4% of the shell weight. In total, the organic matrix accounts for 5.12% of the shell weight for a sub-adult specimen and almost 8% for younger individuals. In spite of potential loss of material during the scrupulous cleaning procedure, these values are consistent with that of earlier publications.

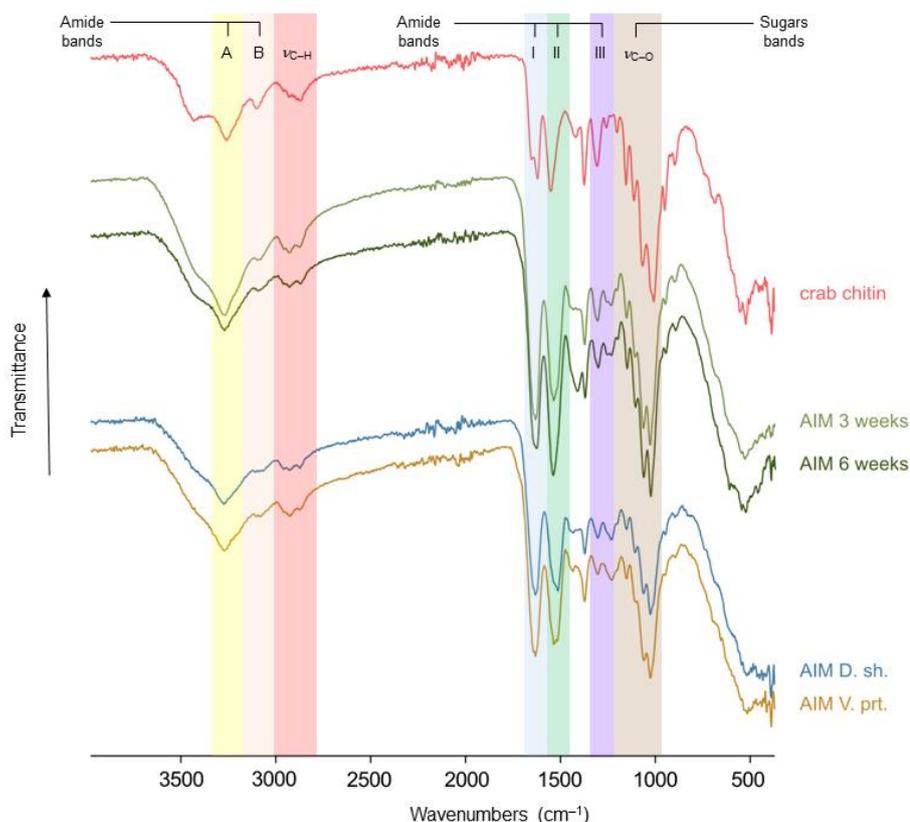
### FT-IR spectroscopy

FT-IR spectroscopy analyses were performed to characterize the mineralogy of *Sepia*, as well as to assign the organic chemical functions of the extracted matrices (ASM and AIM). Infrared spectra are displayed in Figures 1, 3 and 4 and assignments of main infrared absorption bands are described in Tables 2-4. First of all, the examination of the mineral fractions,

**Table 2:** Attribution of main infrared absorption bands of mineral fractions of *Sepia*.

<i>Sepia</i> juvenile Absorption (cm <sup>-1</sup> )	Point of <i>Sepia</i> Absorption (cm <sup>-1</sup> )	Bands Assignment
1785	1787	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> (ν <sub>C=O</sub> )
1445	1445	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> (ν <sub>3</sub> )
1082	1082	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> (ν <sub>1</sub> )
852	852	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> (ν <sub>2</sub> )
712/699	712/699	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> (ν <sub>4</sub> )

from juvenile and point of *Sepia*, shows in both cases exclusively the fingerprint of CaCO<sub>3</sub> crystallized in the aragonite structure, which is supported by the presence of the characteristic ν<sub>2</sub> band at 852 cm<sup>-1</sup> [in the case of calcite, ν<sub>2</sub> is located at 875 cm<sup>-1</sup>] (Figure 1, Table 2). Moreover, the splitting of ν<sub>4</sub> absorption bands, at 712 and 699 cm<sup>-1</sup>, corroborate also the aragonitic character of inorganic matrices (Zhou *et al.* 2004).

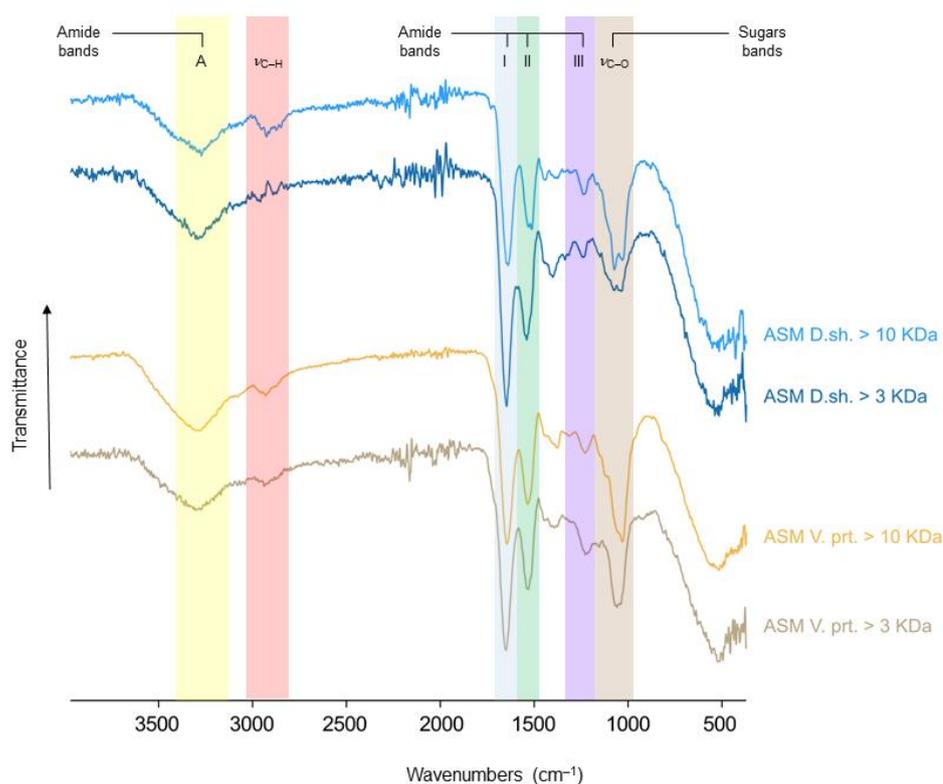


**Figure 3:** FT-IR spectra of a commercial α-chitin and of the insoluble fractions of the shell matrix from 3 weeks-old specimens, 6 weeks-old specimens and from the dorsal shield (D. sh.) and the ventral part (V. prt.) of older juveniles. The “domains” of the characteristic absorption bands of amide and sugars are highlighted.

**Table 3:** Attribution of main infrared absorption bands of AIM fractions.

Crab chitin Absorption (cm <sup>-1</sup> )	AIM 3 weeks Absorption (cm <sup>-1</sup> )	AIM 6 weeks Absorption (cm <sup>-1</sup> )	AIM <i>D. sh</i> Absorption (cm <sup>-1</sup> )	AIM <i>V. prt</i> Absorption (cm <sup>-1</sup> )	Bands assignment
3431					$\nu_{OH}$
3257	3269	3275	3274	3273	Amide A ( $\nu_{NH}$ )
3099	3099	3100	3110/3093	3100/3082	Amide B ( $\nu_{NH}$ )
2931/2869	2959/2828/2875	2933/2876	2958/2926/2873	2924/2879	$\nu_{C-H}$
1652/1620	1633	1631	1633	1643/1634	Amide I ( $\nu_{C=O}$ )
1550	1538	1543	1515	1537/1519	Amide II ( $\nu_{C-N}$ )
1418/1375	1374	1416/1375	1373	1435/1374	$\delta_{C-H}$
1306	1306	1306	1304	1304	Amide III ( $\nu_{C-N}$ )
1258	1256	1259	1233	1233	$\delta_{N-H}$
1154	1153	1153	1152	1153	$\nu_{C-O-C}$
1112/1067/1008	1107/1064/1029	1110/1066/1029	1106/1063/1027	1105/1062/1028	$\nu_{C-O}$
950	949	950	948	951	$\gamma_{C-H}$

Regarding the analysis of insoluble organic fractions, AIM, reported in Figure 3 and Table 3, the spectra of the four samples show a very strong similarity and the absorption bands recorded largely coincide with those characterizing the chitin of crab (top spectrum in Figure 3). Thus, the amino-polysaccharide composition of fractions is clearly demonstrated by the presence of the characteristic A, B, I, II, and III amide bands, accompanied by glycosidic stretching bands (1150-1000  $\text{cm}^{-1}$ ). However, due to the width of the amide I band of AIM fractions, establishing the predominance of  $\alpha$ - or  $\beta$ -chitin is difficult. Indeed, according to the



**Figure 4:** FT-IR spectra of the soluble fractions of the shell matrix from 3 weeks-old specimens, 6 weeks-old specimens and from the dorsal shield (D. sh.) and the ventral part (V. prt.) of older juveniles. The “domains” of the characteristic absorption bands of amide and sugars are highlighted, accordingly to the colors used in Fig. 3.

bibliography,  $\alpha$ -chitin points out two infrared absorption bands in the region 1660 and 1620  $\text{cm}^{-1}$  while  $\beta$ -chitin exhibits only one (Cárdenas *et al.* 2004). Spectra of soluble organic fractions, ASM, reported in Figure 4 and Table 4, also show a fingerprint of amino-polysaccharide type by highlighting A, I, II, III amide bands, as well as those that characterize glycosidic linkages. Weak absorptions in the range of 2950-2850  $\text{cm}^{-1}$  are consistent with  $\nu_{\text{C-H}}$  stretching vibrations. All four samples of ASM reveal very comparable infrared profiles.

**Table 4:** Attribution of main infrared absorption bands of ASM

ASM D. sh. > 10 KDa Absorption ( $\text{cm}^{-1}$ )	ASM D. sh. > 3 KDa Absorption ( $\text{cm}^{-1}$ )	ASM V. prt. > 10 KDa Absorption ( $\text{cm}^{-1}$ )	ASM V. prt. > 3 KDa Absorption ( $\text{cm}^{-1}$ )	Bands assignment
3276	3305	3285	3304	Amide A (NH)
2927/2876/2851		2933	2940	$\nu_{\text{C-H}}$
1641	1649	1647	1653	Amide I ( $\nu_{\text{C=O}}$ )
1533/1516	1542	1538	1534	Amide II ( $\nu_{\text{C-N}}$ )
1443/1395/1386 /1376	1403/1339	1444/1380/1373	1448/1410/1396/1 380	$\delta_{\text{C-H}}$
1314	1318	1315	1304	Amide III ( $\nu_{\text{C-N}}$ )
1242	1241	1231	1229	$\delta_{\text{N-H}}$
1146	1152	/	1155	$\nu_{\text{C-O-C}}$
1076/1034	1073/1042	1117/1033	1071/1061/1042	$\nu_{\text{C-O}}$

Quantification of total sugars, sulfated GAGs and proteins in the ASM

The quantification of total sugars, sulfated glycosaminoglycans and proteins is shown in Table 5. The use of glucose for establishing the calibration curve indicates that the ASM10 fraction of the dorsal shield contains between 5-8% (per weight) of total sugars, while that of the ventral part consists in 8 to 12% of total sugars. In addition, the colorimetric quantification of sulfated glycosaminoglycans indicates that these components account for 0.4 to 0.8% and 0.1 to 0.4% of the ASM10 for the dorsal shield and the ventral part respectively, suggesting that sulfated GAGs are a minor component of the soluble organic material of the cuttlebone. Finally, the Bradford test detects 20 to 35% of proteins in the dorsal shield, and only 4 to 7.5% within the ventral part. These values are singularly low and are likely underestimated, since they leave an important "missing mass". The reasons for this are multiple and potentially additive: firstly, the BSA standard may be non-adapted to the type of samples

analyzed here (with a curve slope dissimilar to that of the samples). Secondly, we cannot exclude the presence of macromolecules other than proteins and saccharides, *i.e.*, lipids and pigments. The presence of lipids might be suspected from the cleaning procedure prior to the matrix extraction of the ventral part: one part of the materials was found to behave as a colloidal phase and could not be precipitated by centrifugation. We also observed that the soluble matrix of the ventral part was slightly colored in yellow, suggesting the presence of pigments. However, pigments in biomineralized tissues generally represent an ultra-minor fraction of the organic matrix (Bonnard 2020). Finally, the intrinsic biochemical properties of the matrix may induce a poor fixation of the dye, during the Bradford test, which leads to an underestimation of the protein amount.

Saccharides		
	Test 1	Test 2
<b>Dorsal shield</b>	5-7,5%	6-8%
<b>Ventral part</b>	8-10%	8-12%
GAGs		
	Test 1	Test 2
<b>Dorsal shield</b>	0,4-0,7%	0,6-0,8%
<b>Ventral part</b>	0,1-0,3%	0,3-0,4%
Proteins		
	Test 1	Test 2
<b>Dorsal shield</b>	20-30%	25-35%
<b>Ventral part</b>	4-6%	5-7,5%

**Table 4:** Quantification of the sugar and the protein content of the soluble shell matrix of *S. officinalis*. The upper panel depicts the total sugar quantification (based on one standard, the glucose), the middle one indicates the concentration of sulfated glycosaminoglycans (GAGs) and the lower panel shows the protein quantification (based on the BSA standard).fractions.

#### SDS-PAGE of the shell matrix extracts

The results obtained after migration of extracts are illustrated in Figure 5. On silver-stained gels, the dorsal shield ASMs are characterized by several bands: for the ASM10, one can recognize three discrete bands of high molecular weights, at 232, 252 and 265 kDa, a more diffuse one around 104 kDa and two lighter ones at 17 and 15 kDa and a smear extending from the top of the gel to 26 kDa. For the ASM3 one can notice the same three uppermost bands (but slightly less pronounced), as well as six lower ones at 35, 28.7, 23.5, 19, 15 and 8.5 kDa respectively, in addition to a low molecular smear (from 43 to less than 11 kDa). Carbocyanine dye reveals three discrete bands stained purple in the ASM10 at 17, 15

and 11 kDa in addition to the migration front, as well as a blue smear and two discrete bands stained blue, at higher molecular weights (273 and around 240 kDa). The Bio-Rad blue staining identifies a smear and several discrete bands that correspond (for most of them) to that of the silver-stained gel, as well as two blurred bands not seen before, between 34-26 kDa and 26-17 kDa respectively. Finally, alcian blue staining underlines only two discrete bands of high molecular weights (probably those around 252 and 231 kDa).

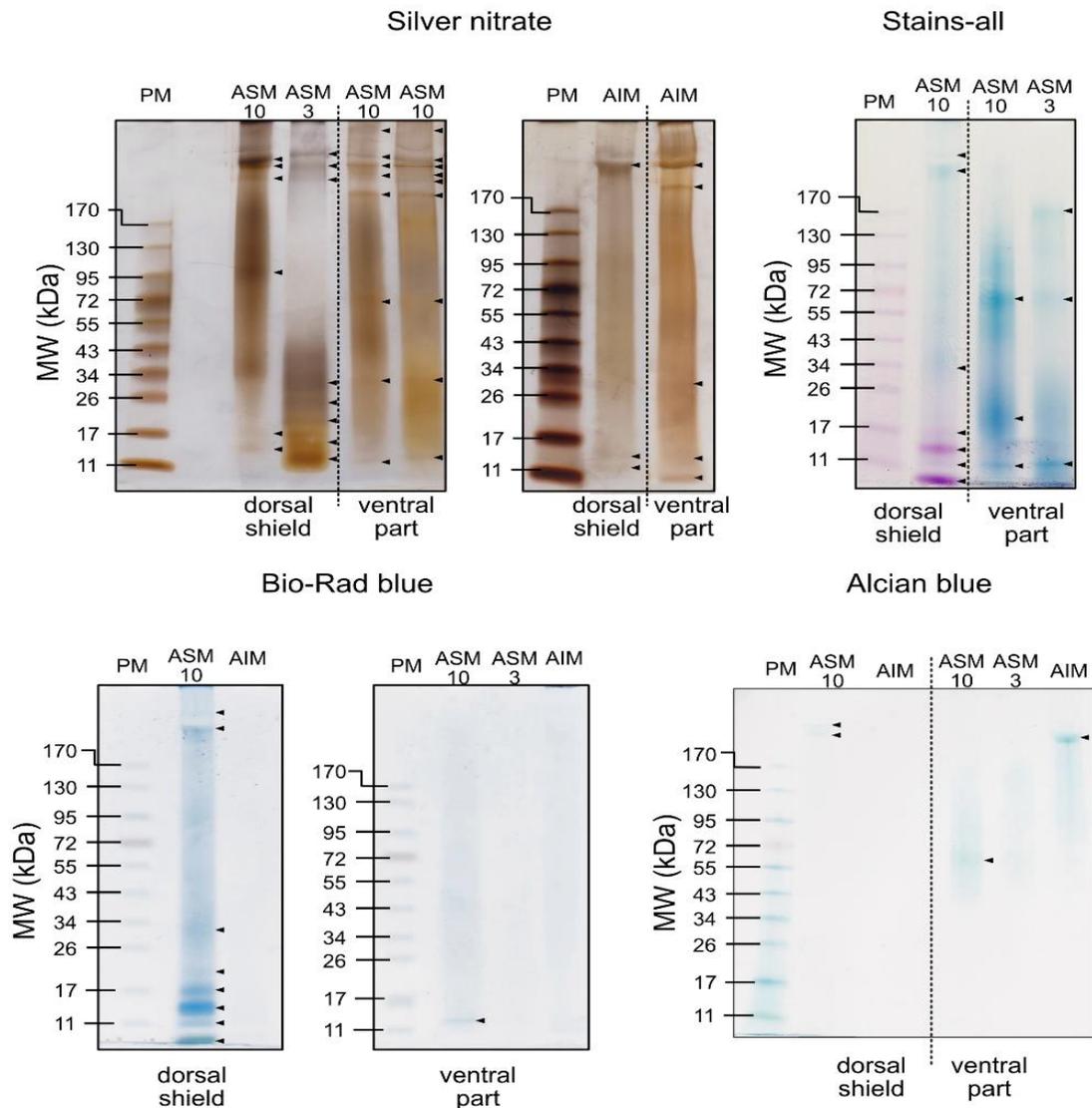


Figure 5: Monodimensional gel electrophoresis of shell extracts of *S. officinalis* (ASMs and Laemmli-soluble AIMS), stained with silver nitrate (left top corner), Stains-all (Carbocyanine, right top corner), Bio-Rad blue (left bottom corner) and Alcian blue (right bottom corner). The arrows point out discrete bands identified in the electrophoresis profile of each extract.

On the silver-stained gel, the AIM exhibits a discrete band around 226 kDa and two additional ones at 16 and 14 kDa, as well as a smear. The Bio-Rad blue staining fails to evidence any discrete bands, as well as the alcian blue coloration.

For the ventral part, the silver-stained gels reveal similar electrophoretic profile for both ASMs fractions (ASM10 and ASM3), highlighting a set of five bands at high molecular weights (around 316.8, 269, 252, 236 and 204 kDa each) and three bands at lower molecular weights (75, 29 and 8 kDa each), in addition to a smear. Carbocyanine dye identifies a blue smear in both ASMs fractions and evidences three discrete bands in each of them: between 72-55 kDa, 26-17 kDa and around 11 kDa for ASM10; around 170 kDa, between 72-55 kDa and around 11 kDa for ASM3. We observe a relative similarity between the two staining patterns. The Bio-Rad blue staining reveals only one discrete band, within the ASM10 fraction, between 17-11 kDa. Finally, alcian blue staining depicts one discrete band for the ASM10 fraction (between 72-55 kDa) in addition to a slight smear.

Table 6 : Enzyme-Linked Lectin Assay (ELLA) of the soluble extracts of the cuttlebone, based on absolute values of absorbance. ++: reactivity > 60%; +: 60% > reactivity > 30%; -: <30%.

Lectins	Reactivity (based on absolute value of the optical density)			
	Dorsal shield		Ventral part	
	ASM10	ASM3	ASM10	ASM3
ConA	++	++	++	++
SBA	+	+	-	+
WGA	++	++	++	++
DBA	+	++	-	-
UEA 1	-	-	-	-
RCA	-	-	-	-
PNA	-	-	-	-
GSL 1	-	-	-	-
PSA	-	-	-	-
LCA	+	-	+	-
PHA-E	-	-	-	-
PHA-L	-	-	-	-
SJA	-	-	-	-
succ-WGA	-	-	-	-
GSL 2	-	-	-	-
DSL	+	+	-	-
ECL	-	-	-	-
Jac	+	-	-	+
LEL	++	+	+	+
STL	++	++	++	++
VVA	-	-	-	-

On the silver-stained gel, a smear characterizes the AIM as well as five discrete bands at 227, 195, 28, 14.5 and 8 kDa respectively. The same fraction exhibits a unique discrete band in alcian blue coloration, around 230 kDa.

Our silver-stained gel results are congruent with those obtained by Le Pabic et al. (2017) few years ago.

#### Enzyme-linked Lectin Assay (ELLA)

The results shown in Table 6 summarize the outcome of three different experiments that lead to similar reactivity patterns. Both skeletal parts (and both ASMs fractions) seem to exhibit a common pattern of reactivity and three categories of lectins can be identified: those giving a high reactivity (++), among which Concanavalin A, WGA and STL, those that give a moderate reactivity (+), such as SBA,

DBA, DSL and LEL and finally, those producing a weak reactivity (-) which will not be further discussed. Among reactive lectins, one finds WGA, STL, DSL and LEL, all recognizing motifs (dimer, trimer or tetramer) related to chitin, as well as concanavalin A and LCA, two mannose-binding lectins. Finally, two galactosamine-binding lectins - DBA and SBA - react weakly. The patterns obtained by ELLA are similar between ASM10 and ASM3, and also between dorsal- and ventral-extracted soluble matrices.

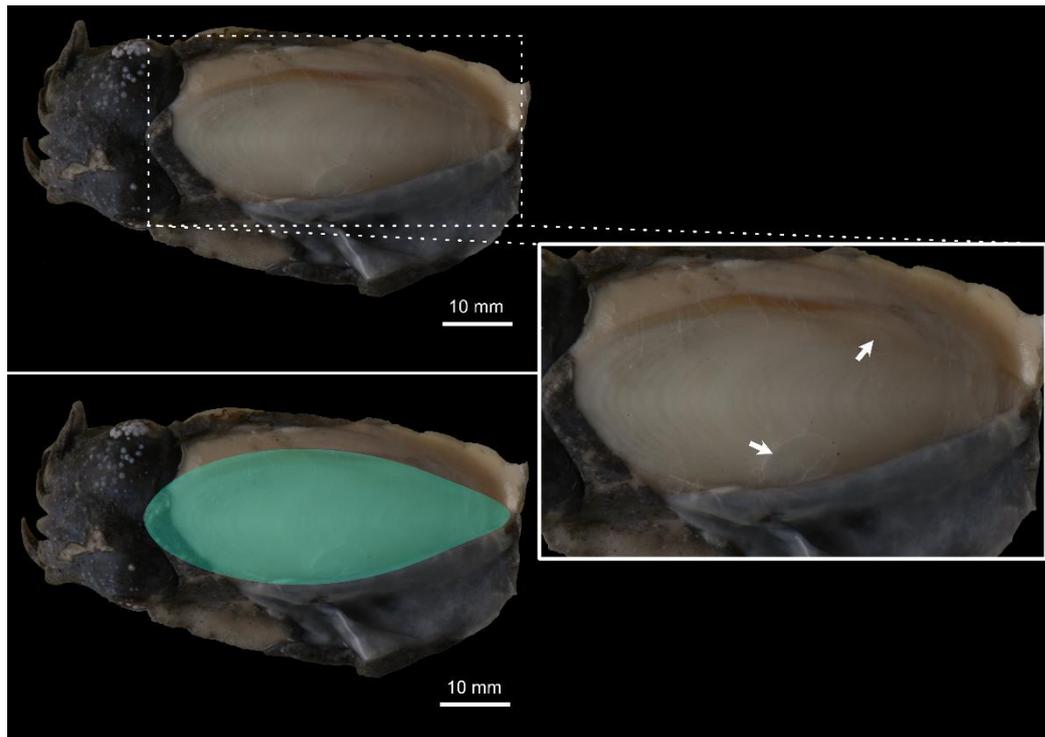


Figure 6 : Dorsal dissection of a sub-adult specimen, showing air bubbles that underline the presence of the shell sac epithelium (pointed out by white arrows). We depict in green what we believe to be the limits of the shell sac.

### Dissection and histology

Results of cuttlefish histology are shown in figures 8-9. While preparing specimens for histology, we noticed that the shell sac was well visible on sub-adults. We took this opportunity to illustrate this peculiar organ, via dissections illustrated in Figures 6 and 7. In both of them, one notices the presence of air bubbles that underline the shell sac (white arrows). On the basis of our observations, we traced the extent of the shell sac by a green area. In dorsal view, we noticed that striae are visible in transparence through the dorsal shield. They become almost invisible once the cuttlebone is extracted and dried.

Figure 8 shows a longitudinal section through a freshly hatched specimen, stained with HE (hematoxylin - eosin), which stains nuclei (hematoxylin, dark purple) and cytoplasm and extracellular matrix (eosin, pink). Figure 9 shows exactly the same section through the same individual (both slices being consecutive), but stained with von Kossa for calcium (brownish to orange). In both cases, the cuttlebone is kept in place.

Figure 8 shows that the cells surrounding the cuttlebone are in close contact with it. We did not evidence any space in between. On the dorsal side, one finds cell clusters that are stained reddish (white stars). They probably correspond to pigmented cells (chromatophores). Below the visceral mass, one sees the ink pocket.

Figure 9 underlines with a strong contrast three "structures": first, the cuttlebone itself (accentuated brown); secondly, at the interface with the shell sac, a more or less continuous layer, stained in orange (black arrow), which corresponds to the mineralization front; finally, in what appears to be the inner epithelium of the shell sac (Zheng *et al.* 2007), sub-micrometric orange spots (little black arrow), which could be intra- or intercellular calcified granules.

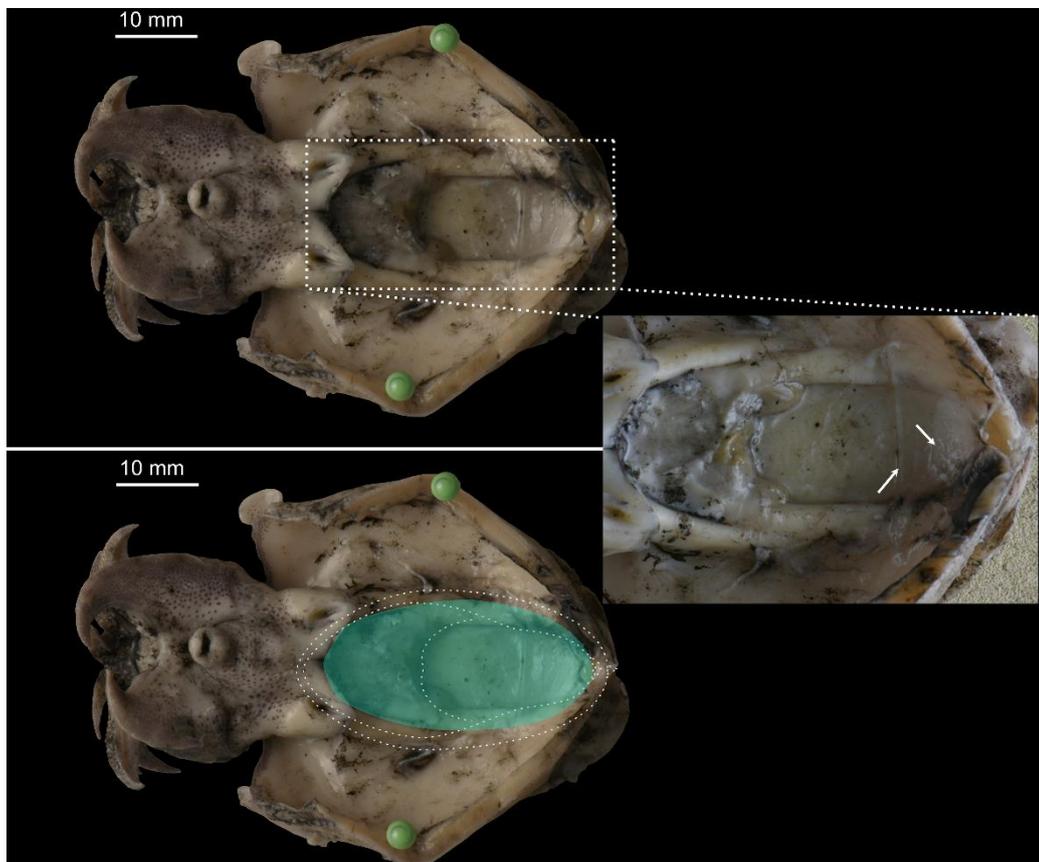


Figure 7: Ventral dissection of a sub-adult specimen, after guts removal. The shell sac epithelium is underlined by the presence of air bubbles and pointed out by white arrows. We depict in green what we believe to be the limits of the shell sac, and redraw the contours of the cuttlebone in dashed lines.

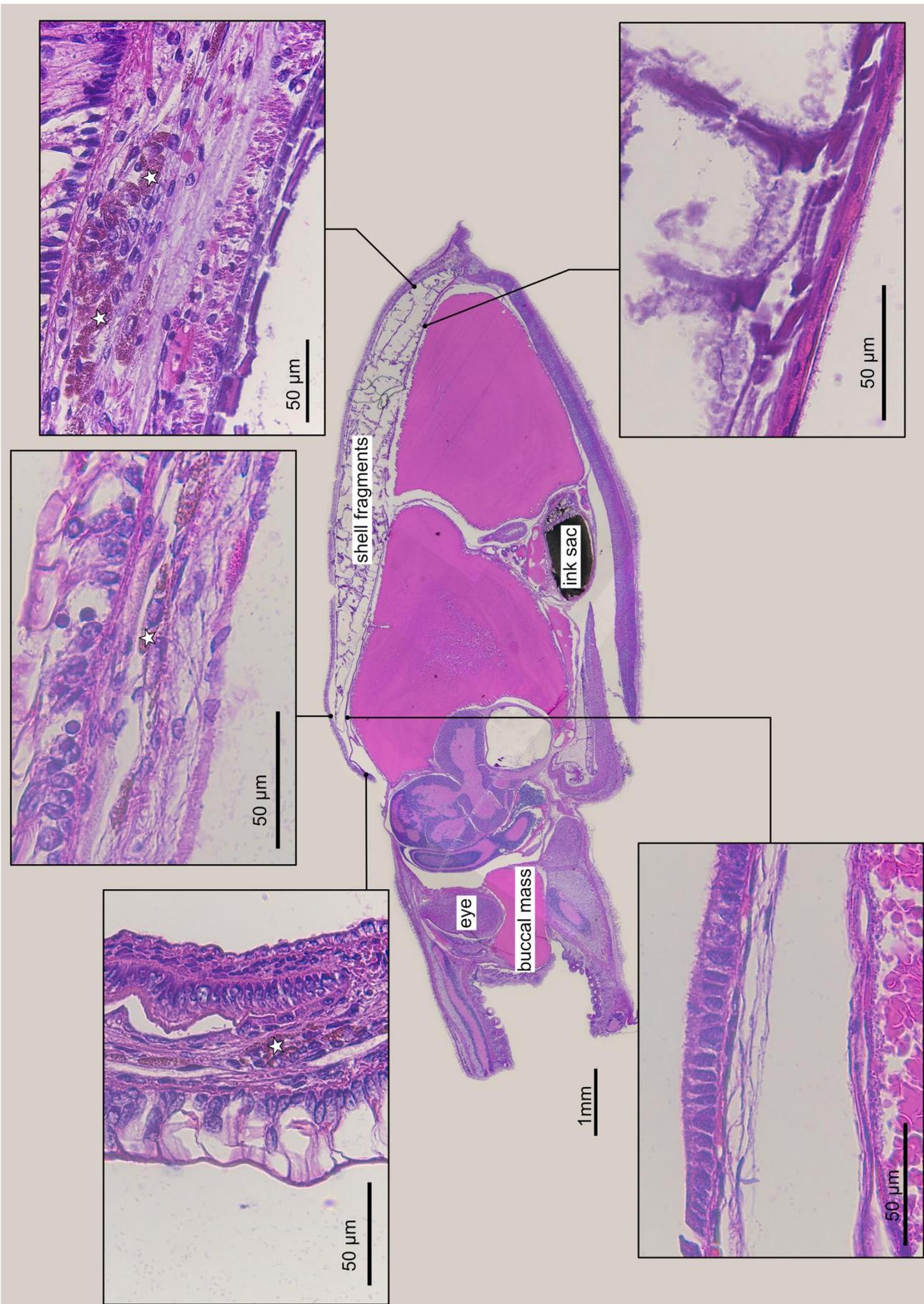


Figure 8 : Histological preparation of a freshly hatched specimen, stained with HE (hematoxylin - eosin), which stains nuclei (hematoxylin, dark purple) and cytoplasm and extracellular matrix (eosin, pink). The white stars indicate cells groups that may be of pigment nature, also visible in Von Kossa staining (Fig. 9).

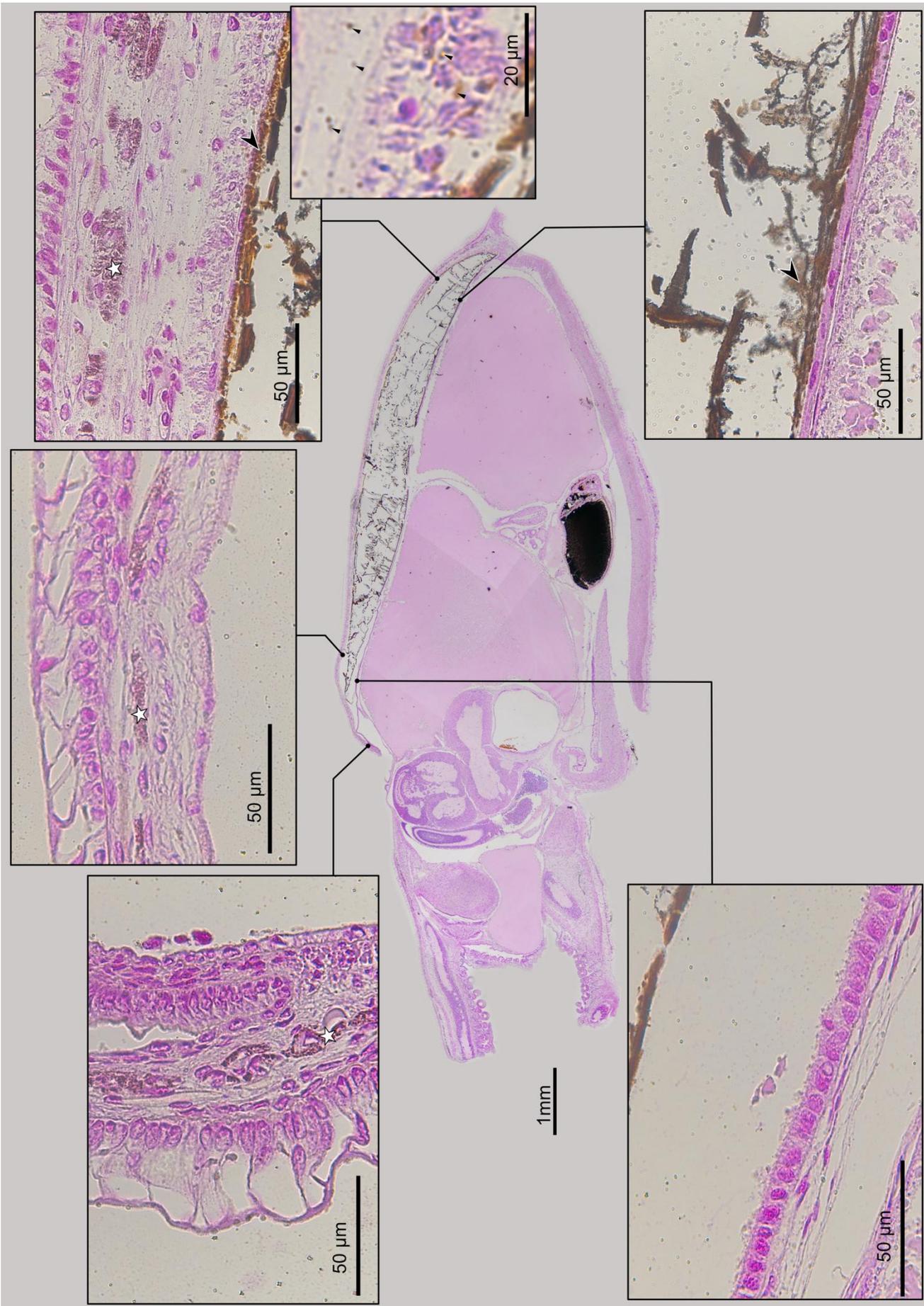


Figure 9: Histological preparation of a freshly hatched specimen, stained with Von Kossa, which stains the presence of calcium in soft tissues. The white stars indicate cells groups that may be of pigment nature, also visible in HE staining (Fig. 8). The biggest black arrows indicate what we supposed to be the mineralization front, and the smaller ones point out the calcium granules in the internal epithelium of the shell sac.

## *Discussion*

In spite of being a rather popular cephalopod, known for its numerous uses (in gastronomy) and its talents (cleverness, camouflage, hunting capacities), the cuttlefish *Sepia officinalis* remains largely under-investigated from a biomineralization viewpoint. The present study combines physical observations and biochemical characterizations in order to understand the dynamic process of cuttlebone formation. On the one hand, the physical exploration of the cuttlebone lies on macro-observations, SEM investigations (on sections and also on critically-dried specimens) and histology; on the other hand, the biochemical approach performed on the extracted organics, comprises matrix quantification (Dubois assay, sulfated GAGs assay) and characterization (SDS-PAGE, FTIR, ELLA assay, proteomics).

Although our microstructural observations do not really add supplementary elements in comparison to earlier works, they however bring substantial information on key-points. First of all, by opposition to what we observed with the ram's horns squid *Spirula spirula*, the septa are leant against on the dorsal shield but not buried in it. This simple geometry implies that the inner prismatic layer of the dorsal shield is secreted before the septum, at a given location. Secondly, we noticed a microstructural continuity between the roof of the septa and the pillars (see fig 1 C3). These latter are linked together with horizontal thin membranes (about 1  $\mu\text{m}$  thick?) that would be un-mineralized. Finally, septa are curved downwards (*i.e.*, ventrally), whatever the position. All these observations are fully congruent with the milestone ultrastructural study of Checa *et al.* (2015).

In our biochemical analyses, in view of the differences of the physical properties of the dorsal shield and the ventral chambered part, we chose to separate these two structures and analyze their respective associated matrices, as performed in recent works (Čadež *et al.* 2017; Le Pabic *et al.* 2017). This was done only for sub-adult specimens, the procedure being impossible with younger cuttlebones (3 and 6 weeks-old). Earlier works include that of Appellöf 1893; Birchall & Thomas 1983; Dauphin & Marin 1995; Degens *et al.* 1967; Denton & Gilpin-Brown 1961; Florek *et al.* 2009; Okafor 1965; Stegemann 1963. In our hands, for sub-adult specimens, we obtained about 5.12% of organics, and higher amounts (around 7.5 %) for juvenile specimens; since the two extractions (sub-adult *vs.* juvenile) were slightly different, a bias in the quantification might be possible. The dorsal shield yielded more organics than the ventral chambered part (around 9% *vs.* 2%). The insoluble/soluble ratios between these two parts are clearly different: 29 for the dorsal shield, but only 3.5 for the ventral part. Our matrix quantification lies in the range that is commonly accepted, between 4

and 10%. These values are rather uncommon for shelled molluscs, for which the skeletal matrix generally represents less than 1% of the shell weight (Degens *et al.* 1967b). It is remarkable to observe that *Sepia officinalis*, which belongs to a recently appeared clade (Sepiidae emerged in the Paleogene (Neige 2003) possesses a matrix-rich shell, a character that is often associated to an archaic state (plesiomorphic), as it is typically the case for bivalves and gastropods (Palmer 1983, 1992).

Besides quantification, our biochemical analyses revealed other interesting findings: a quasi-perfect fit (by FTIR) between chitin standard and the insoluble extracts, independently from the location of the extracts, either the dorsal shield or the ventral chambered part. The similarity of the ASMs with chitin is less marked with FTIR, but still significant. This partial similarity is reemphasized by ELLA test, which pinpoints the high reactivity of the soluble extracts with chitin-recognizing lectins (STL, LEL, WGA), besides reactivity with ConA. In term of sugar content, the dorsal shield yielded between 5 and 8% while 8-12% were obtained for the ventral part. Curiously, sulfated GAGs - a class of sugars that are usually associated to mineralized tissues and consequently abundant (Marxen *et al.* 1998) - represent only a very minor part of the saccharidic moieties.

Our observations raise the question of the mineralization process of the cuttlebone, including the tempo of deposition of the different structures, the location of the calcifying epithelium and the occurrence of a mineralizing space at the interface. About this latter aspect, the concept of the existence of an "extrapallial space" devoted to mineralization has been long debated (Marin *et al.* 2008). Here, we observed a close contact between the soft tissues and the cuttlebone, both on critically dried specimens and on histological preparations. This tends to demonstrate that there is no space or that this space is extremely reduced.

About the location of the mineralizing domains, two hypotheses may be advanced: on the one hand, calcification occurs unidirectionally, from the dorsal shield towards the ventral side (downward). This implies that only the ventral epithelium of the shell sac is active and responsible for the deposition of the overall cuttlebone. One can say that a downward growth is obvious, at least for the ventral part, based on geometrical arguments: the septa are appended on the internal side of the dorsal shield, and are consequently deposited posteriorly. On the other hand, the shell deposition process may be bidirectional, originating from the central inner prismatic layer of the dorsal shield and propagating upward and downward. This model implies that the epithelium of the dorsal and the ventral sides are both active. Our finding tends to privilege this second option for the following reasons: a thin acellular and

continuous layer is observed at the interface by histology, surrounding the entire cuttlebone. This layer is stained (brownish to orange) on its whole circumference by the von Kossa staining and may be viewed as an extracellular matrix associated to the presence of calcium ions. In addition, we observed in the soft tissues surrounding the cuttlebone many colored spots that may indicate a calcifying activity in the whole internal epithelium of the shell sac. At last, one macroscopic argument pleads in favor of an upward growth: striae that are clearly visible on dorsal view of juvenile cuttlebones are only visible on the anterior part (where the youngest layer was deposited) of adult cuttlebones. This implies that the striae are progressively erased, remodeled or covered by new calcified materials during the lifetime of the animal. If so, this clearly suggests that the dorsal epithelium of the shell sac is active in mineralizing the upper part of the shield.

To summarize, none of our microstructural findings contradict the observations made by Checa *et al.* (2015). These authors propose a chronology of chambers formation within the ventral part as follows: 1. The chamber initiation occurs by the simultaneous secretion of the roof and the organic laminae; 2. Chamber completion is achieved by the secretion of the floor. During this stage, pillars are progressively stretched by the mantle, generating *in fine* the downwards bending of the floor. 3. Initiation of the chamber calcification from the roof to the pillars; 4. Desiccation of the newly formed chamber and calcification of the floor. The drainage provokes the coalescence of organic laminae into secondary thicker membranes. In congruence with this model, we observed the microstructural continuity between the pillars and the roof of each septum that proves that they are built simultaneously, the ventral curvature downwards of the septa, the presence of horizontal membranes within each chamber. These structures are indirect clues of the mechanism proposed by Checa *et al.* (2015).

One can sketch a general chronology that applies to both parts of the cuttlebone, the dorsal shield and the ventral chambered part. We propose that the starting point of the overall process is the deposition of the inner prismatic layer of the dorsal shield. Calcifications proceeds from both sides: downwards, the Checa's model applies while upwards, the lamellar layer is deposited and then the outer prismatic one. At later stage (not defined yet), a process occurs that masks the striae, visible at early juvenile stages. This process can be a (partial) redissolution/remodeling of the upper shield layer then precipitation, or a 'reroofing' of the striae with new deposits. We still do not know which of the two processes occurs, but we hope to solve this question soon.

These preliminary results, acquired tardily, suggest but do not prove that despite a common bidirectional mode of mineralization the organic matrix of *S. officinalis* is rather different from that of the two other cephalopods studied in this manuscript (*i.e.* the ram's horn squid and the argonaut). However, this hypothesis needs to be confirmed by proteomic data, currently in acquisition.

## 8) Conclusion

À l'issue de cette étude sur la microstructure coquillière et la signature biochimique de la matrice organique de *Sepia officinalis*, il nous est possible de dégager plusieurs informations importantes.

**La matrice organique de *S. officinalis* représente environ 5 % du poids de la coquille**, une valeur particulièrement élevée, classant l'os de seiche parmi les structures les plus riches en matrice organique. La fraction insoluble (AIM) est prépondérante, notamment dans le bouclier dorsal où le ratio AIM/ASM est de 29. Dans la partie ventrale, ce ratio conserve ce déséquilibre en faveur de la matrice acido-insoluble, bien que plus faible (ratio de 3,5).

L'approche physique (FT-IR) de la matrice organique démontre une **correspondance presque parfaite entre la fraction insoluble et un standard chitineux de référence** (ici la chitine de crabe). Cette tendance, bien que moins prononcée avec la fraction soluble, reste néanmoins significative comme en attestent les résultats des tests ELLA, dont les lectines les plus réactives possèdent une affinité forte avec les motifs "glucosamine". Au sein de la fraction soluble de la matrice, les glycosaminoglycanes sulfatés, souvent associés à la minéralisation carbonatée, semblent ne représenter qu'une partie mineure de l'ensemble des composés saccharidiques.

L'analyse microstructurale de l'os de seiche et de ses relations avec les tissus mous de l'organisme, ainsi que l'investigation histologique de ceux-ci, semblent attester d'un **contact étroit entre les tissus organiques et minéralisés, remettant ainsi en question l'existence même d'un espace dédié à la minéralisation** (du type espace extrapalléal) chez la seiche. Si cet espace existe, il est forcément minuscule, d'échelle submicrométrique. Les préparations histologiques mettent en évidence une fine couche continue à l'interface entre l'os de seiche et le sac coquillier, interprétée ici comme une matrice extracellulaire associée à des ions minéraux, ainsi que de nombreux granules au sein de l'épithélium le plus interne du sac coquillier, attestant probablement de son activité dans la minéralisation de l'os.

L'analyse de la géométrie et de l'organisation spatiale des microstructures coquillières, associée aux observations précédentes, semble démontrer l'existence d'un **processus de formation coquillière bidirectionnel**, ayant pour origine la couche interne prismatique du bouclier dorsal. En direction ventrale, la minéralisation s'effectuerait selon le modèle proposé

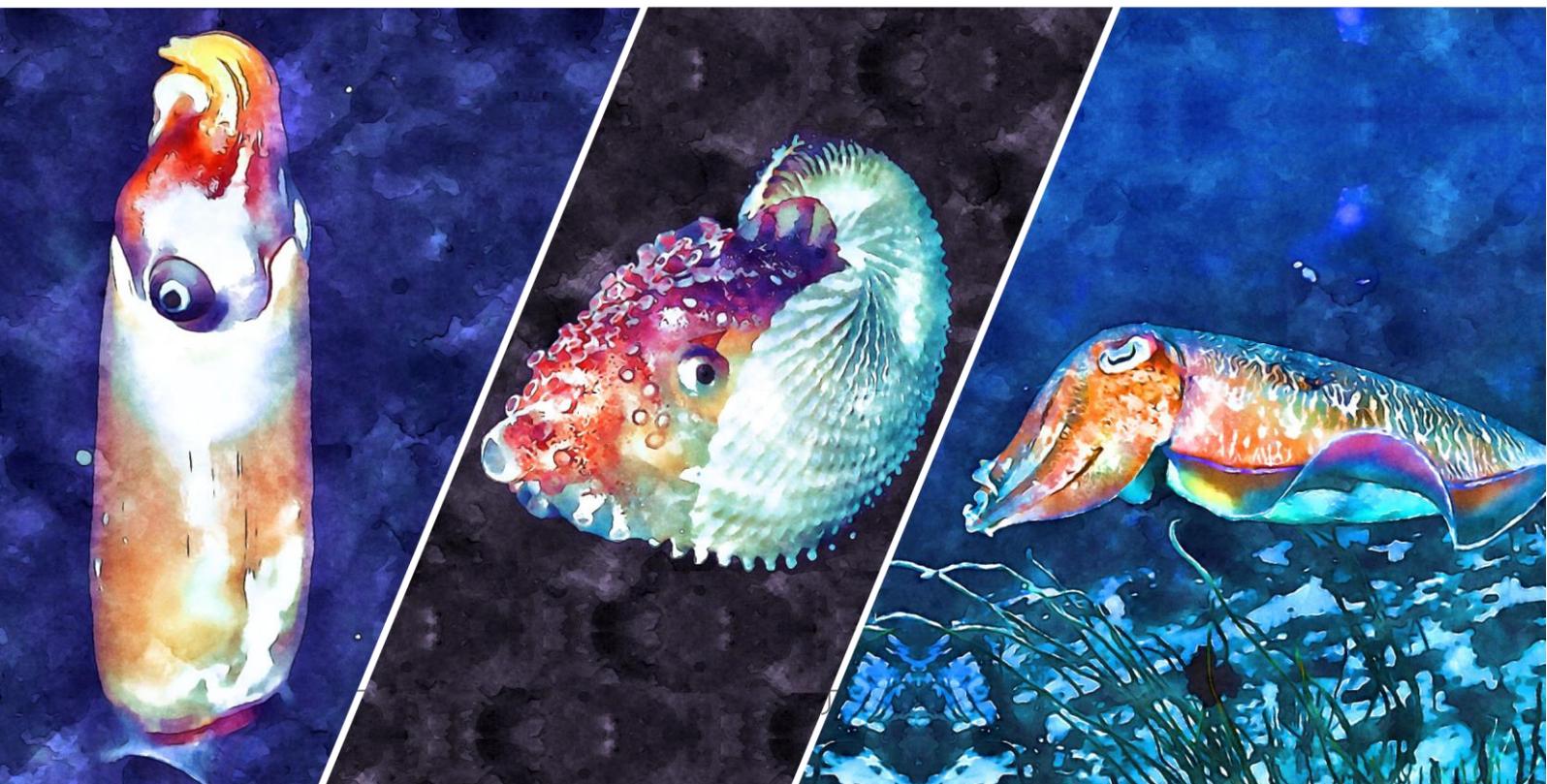
par Checa *et al.* (2015) tandis qu'en direction dorsal, la couche lamellaire puis la couche prismatique externe du bouclier seraient sécrétées par l'épithélium dorsal du sac coquillier. Nous envisageons ici l'existence d'un phénomène tardif, ayant pour conséquence la disparition chez les os matures des stries pourtant visibles sur les structures juvéniles.

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

- La comparaison microstructurale fine d'os de seiche à différents stades (jeune éclos, juvéniles de quelques semaines à adultes) permettrait de mieux comprendre le phénomène à l'origine de la disparition des stries du bouclier dorsal.
- La réalisation de nouvelles préparations histologiques et l'utilisation de colorations supplémentaires (notamment le rouge d'alizarine) permettrait de mieux documenter le contact entre les tissus mous et minéralisés de l'animal, ainsi que la nature de la fine couche extracellulaire identifiée dans cette étude.
- La localisation *in situ* de constituants saccharidiques ou protéiques de la matrice au sein de l'os de seiche et des tissus organiques du sac coquillier permettrait également de mieux comprendre le processus de formation coquillière.
- La réalisation de tests ELISA et de Western Blot apporterait plus d'informations quant à la nature des constituants protéiques de la matrice organique.
- L'étude par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) des extraits solubles et insolubles constituerait un apport appréciable dans la caractérisation saccharidique de la matrice.
- L'analyse protéomique de la matrice organique constituerait un apport précieux dans l'étude du phénomène de biominéralisation chez cet organisme.
- La réalisation de plusieurs transcriptomes du manteau permettrait, quant à elle, d'établir une liste des protéines sécrétées par l'épithélium calcifiant.
- L'étude de la biominéralisation de l'os de seiche chez d'autres représentant du groupe des Sepiidae représenterait un apport considérable dans les processus de minéralisation, notamment en analysant des espèces vivant à plus grande profondeur (*Sepia hedleyi* Reid *et al.* 2005) que *Sepia officinalis*. Une telle étude comparative permettrait notamment de corrélérer ou non les caractéristiques microstructurales des os aux conditions de pression hydrostatique et au répertoire sécrétoire coquillier.

**Ces travaux pourraient apporter des données essentielles à la compréhension des mécanismes qui régissent la formation coquillière chez *Sepia officinalis* et ses proches parents.**

## Conclusions et perspectives





## Conclusions et perspectives

La biominéralisation est un phénomène ancien, connu au moins depuis la fin de l'Ediacarien (~550 Ma) chez les métazoaires. Parmi eux, les mollusques représentent un phylum fascinant, largement étudié dans le contexte de la minéralisation coquillière : les bivalves et les gastéropodes, notamment, ont fait l'objet d'un grand nombre de travaux de recherche principalement centrés sur la structure et l'ultrastructure de leur coquille ainsi que sur la caractérisation de la matrice organique responsable de la formation de cette coquille. Les céphalopodes, quant à eux, ont plutôt été délaissés. Ils représentent pourtant un groupe majeur de mollusques, particulièrement intéressants dans le cadre de l'étude du phénomène de biominéralisation. En effet, leur histoire macroévolutive témoigne d'une tendance générale à l'internalisation et à la réduction coquillière, voire à sa disparition complète. Cependant, les données concernant la matrice organique de ces organismes sont encore rares et éparées, et il est impossible de déterminer si les représentants à coquille de ce groupe utilisent un même ensemble de macromolécules (*i.e.* une même « boîte à outils moléculaires ») dans l'élaboration de leur coquille.

L'objectif de ce travail de thèse était donc de comparer les « boîtes à outils moléculaires » de trois représentants actuels du groupe, à savoir la spirule *Spirula spirula*, l'argonaute voilier brun *Argonauta hians* et la seiche commune *Sepia officinalis*. Pour cela, deux approches couplées ont été entreprises avec, d'une part, une caractérisation physique de la structure minéralisée de chacun de ces organismes et d'autre part, une caractérisation biochimique et protéomique de leur matrice organique coquillière.

Les résultats obtenus ont permis d'élargir notre connaissance sur les processus de biominéralisation chez les céphalopodes, en permettant notamment l'acquisition des toutes premières bases de données biochimiques et protéomiques de deux organismes encore énigmatiques à ce jour : la spirule et l'argonaute.

### 1) Synthèses des principaux résultats

**Dans le chapitre dédié à l'étude de la biominéralisation chez *Spirula spirula*,** l'observation au MEB de la géométrie et de l'organisation spatiale des différentes microstructures coquillières nous a permis de proposer un premier modèle conceptuel de la

chronologie sécrétoire de la coquille chez cet organisme. Dans ce modèle, nous envisageons une croissance bidirectionnelle de part et d'autre d'une lamelle de nature organique, ainsi qu'une invagination progressive du tissu minéralisant pour expliquer la morphologie particulière de la jonction septe/paroi coquillière.

La combinaison d'approches physiques et biochimiques témoigne d'une prédominance des saccharides au sein de la matrice coquillière : la  $\beta$ -chitine et autres polysaccharides représentent à eux seuls près de 80 % de la fraction insoluble. Cette dernière constitue 70 % du matériel organique de la coquille. La fraction soluble, quant à elle, présente également une grande similitude avec la chitine, comme en témoigne la réactivité de lectines fixatrices de chitine par test ELLA. Il semble que la chitine représente 50 à 60 % de la matrice organique, ce qui signifie que la matrice organique coquillière de *S. spirula* est plus chitineuse que protéique, une caractéristique particulièrement surprenante et inhabituelle qui rapproche cette matrice de celle des seiches (Sepiidae).

L'analyse protéomique *in silico*, basée à la fois sur une base de données issue de modèles métazoaires hétérologues et sur le transcriptome du manteau de l'organisme lui-même, génère un jeu de protéines en cohérence avec les résultats précédents, parmi lesquelles plusieurs enzymes impliquées dans l'assemblage, la dégradation et la modification de la trame chitineuse (chitobiase, chitine-déacetylase, chitinase, etc.). L'analyse révèle également des protéines particulièrement intéressantes dans le contexte de la biominéralisation : une tyrosinase, une sérine protéase, une transferrine, une inhibitrice de sérine protéase et une matriline. D'autres protéines, porteuses de motifs ou de domaines à affinités avec le calcium sont également identifiées, mais sont supposées plutôt jouer un rôle dans la signalisation extracellulaire plutôt que dans la nucléation cristalline ou le transport d'ions. Enfin, ces analyses identifient un certain nombre de protéines cytoplasmiques ou nucléaires (actine, tubuline, histones...), ces dernières pouvant avoir une fonction antibactérienne.

L'étude du transcriptome du manteau révèle, quant à lui, de nombreux acteurs moléculaires parmi lesquels des protéines extracellulaires, des enzymes et des protéines associées aux saccharides, des protéines cytoplasmiques, des protéines impliquées dans la signalisation cellulaire et d'autres, aux fonctions encore inconnues. Autre fait particulièrement intéressant, la matrice semble dénuée de certains composés organiques habituellement associés aux matrices calcifiantes : c'est notamment le cas de l'anhydrase carbonique qui ne serait donc pas incorporée à la matrice coquillière de *S. spirula*.

Enfin, nos données tendent à montrer qu'il n'existe aucune ressemblance entre la matrice organique coquillière de la spirule et celles d'autres céphalopodes ou mollusques à coquille. Cela suggère que la spirule possède un répertoire sécrétoire unique pour l'élaboration de sa coquille, ce qui revient à dire que ce répertoire est propre au clade ("clade-dépendant").

**Dans le chapitre dédié à l'étude de la biominéralisation chez *Argonauta hians*,** nous avons suggéré un mode de minéralisation bidirectionnel, de part et d'autre d'une fine couche organique, impliquant le mouvement des voiles dorsaux de l'animal depuis l'extérieur de la coquille vers l'intérieur, et inversement. Ce modèle semble soutenu par l'observation, *in situ*, de spécimens aux voiles dorsaux rétractés à l'intérieur de la coquille (Peigné *et al.* 2009; Stephens 1965).

L'approche biochimique de la matrice organique coquillière suggère la prédominance de la fraction soluble sur la fraction insoluble, un fait particulièrement inhabituel chez les coquilles riches en matière organique. Autre fait intéressant : la fraction protéique apparaît comme prépondérante au sein de la matrice. Ainsi, la matrice soluble semble constituée de 7 à 10 % de saccharides, essentiellement du type glycosaminoglycanes sulfatés (généralement associés à la précipitation du carbonate de calcium), tandis que la matrice insoluble est dénuée de chitine. Par ces simples observations, la matrice organique coquillière de *A. hians* est fondamentalement différente de celle de la spirule ou de la seiche, toutes deux enrichies en chitine.

L'analyse protéomique *in silico* de la matrice ne révèle qu'un nombre très limité de résultats (« hits ») avec des protéines coquillières déjà connues au sein du phylum des mollusques. Parmi elles, les histones (protéines nucléaires) systématiquement recouvertes à plus de 10 % par nos peptides. Ces peptides « *histone-like* », déjà découverts au sein d'autres matrices coquillières, sont généralement associés à un rôle d'agent antimicrobien en domaine extracellulaire. Dans le cas de l'argonaute, une telle fonction semble essentielle sur le front de minéralisation – si les voiles dorsaux alternent bien entre une position externe et interne à la coquille – afin d'en protéger l'intégrité. L'analyse révèle également plusieurs protéines cytoplasmiques (actines, tubulines, tropomyosines, etc.) ainsi qu'une enzyme impliquée dans la sécrétion des glycosaminoglycanes sulfatés. Un autre fait intéressant est l'absence de certaines fonctions moléculaires habituellement identifiées au sein des matrices coquillières :

c'est notamment le cas de l'anhydrase carbonique ou de la tyrosinase, deux enzymes « classiques » en biominéralisation.

Là encore, l'ensemble de ces résultats suggère un jeu de macromolécules unique, très différent de celui des autres céphalopodes (y compris *Spirula spirula*) et mollusques connus à ce jour et laisse supposer que ces outils moléculaires ne sont pas hérités d'un ancêtre commun aux céphalopodes ou aux mollusques, mais auraient plutôt été recrutés au sein du clade des Argonautidae.

**Dans le chapitre dédié à l'étude de la biominéralisation chez *Sepia officinalis*,** l'étude de préparations histologiques et de la géométrie des microstructures coquillières plaide en faveur d'une minéralisation bidirectionnelle, de part et d'autre de la couche la plus interne du bouclier dorsal de l'animal, sous l'activité combinée des parties dorsales et ventrales du sac coquillier. L'analyse microstructurale et histologique de l'os de seiche et de sa relation avec l'épithélium calcifiant semble témoigner d'un contact étroit entre les deux tissus, remettant ainsi en question l'existence même d'un espace extrapalléal, dédié à la minéralisation, chez cet organisme. Le concept d'« espace extrapalléal » suppose que l'épithélium calcifiant exerce un contrôle à distance sur le dépôt minéral, sans contact direct avec le front de minéralisation. Il suppose également qu'il existe une sorte de « téléguidage » et d'auto-assemblage de la matrice organique et des ions minéraux précurseurs, sans intervention cellulaire. Outre la question des dimensions de cet espace, largement variable d'un modèle à un autre (Audino *et al.* 2015; Checa *et al.* 2014; Rousseau *et al.* 2009; Simonet Roda *et al.* 2019), l'attribution d'un rôle à celui-ci est aujourd'hui encore débattue dans la littérature, où on lui préfère un modèle dans lequel l'épithélium calcifiant est en contact direct avec la coquille et où la matrice organique est sécrétée sous la forme d'un gel au sein duquel se produit la biominéralisation (Addadi *et al.* 2006; Nudelman *et al.* 2007). Ici, et considérant nos observations, nous ne pouvons pas certifier qu'il n'existe pas d'espace sub-micrométrique ou nanométrique entre les tissus organiques et minéralisés. Nos observations en microscopie optique montrent simplement un contact étroit entre front de minéralisation et épithélium interne du sac coquillier.

La combinaison d'approches physiques et biochimiques démontre une correspondance presque parfaite entre la fraction insoluble de la matrice et la chitine. Dans une moindre mesure, cette similitude est également vraie pour la fraction soluble. Nos observations

témoignent d'une composition coquillière riche en matière organique (5 à 7 % du poids total de la coquille) : il s'agit là d'une caractéristique inhabituelle chez les mollusques coquilliers, pour lesquels la matrice représente rarement plus de 1 % du poids total (Marin *et al.* 2014). Un tel caractère (*i.e.* coquille riche en matrice organique) est généralement associé à un état plésiomorphe, « ancestral » (notamment chez les bivalves, Palmer 1983, 1992) : il est donc intéressant de noter que la seiche, un organisme appartenant à un groupe récent (apparu au Paléogène, Neige 2003) possède une telle caractéristique.

L'analyse protéomique *in silico*, en cours au moment de l'écriture de ce manuscrit, devrait fournir des informations intéressantes sur l'éventuelle similitude de la matrice organique de *S. officinalis* avec d'autres mollusques/céphalopodes minéralisants, notamment la spirule.

Par conséquent, il semblerait que malgré un mode de minéralisation similaire (*i.e.* bidirectionnel), la matrice organique de *Spirula spirula* et *Argonauta hians* ne se ressemblent pas. Les quelques comparaisons effectuées avec les données disponibles dans la littérature sur les modèles *Nautilus* et *Sepia* demeurent également infructueuses. Plus intéressant encore, ces matrices ne présentent que peu (voire pas) de ressemblance avec celles d'autres mollusques coquilliers. Ces résultats suggèrent que les outils moléculaires impliqués dans les processus de formation coquillières de chacun de ces organismes ne sont pas hérités d'un ancêtre commun aux céphalopodes ou mollusques proches, mais qu'ils ont évolué, de manière indépendante, au sein de chaque clade. Ils laissent également à penser qu'il n'existerait pas de signal phylogénétique dans les outils moléculaires des différents représentants du groupe : en effet, la spirule et la seiche, deux organismes *a priori* proches, semblent présenter des matrices coquillières différentes bien que toutes deux riches en chitine. Néanmoins, il est nécessaire de noter que les analyses protéomiques *in silico* réalisées au cours de ce travail de recherche reposent sur des bases de données préexistantes, compilant seulement les informations connues sur la matrice organique d'une quarantaine de mollusques, toutes classes confondues. Ainsi, ce registre de données sur lequel nous basons nos comparaisons apparaît comme largement incomplet, au vu de la diversité actuelle des mollusques coquilliers. De plus, l'absence de données transcriptomiques à combiner à l'approche protéomique, notamment chez l'argonaute, entraîne la production de résultats partiels à interpréter avec précaution.

Enfin, il est important de souligner que les matrices organiques ne constituent pas un support simple de l'information taxonomique. Les coquilles (et autres structures minéralisées) apparaissent généralement composées d'un mélange de protéines à fonctions « anciennes » conservées au cours de l'évolution (c'est le cas des anhydrases carboniques ou des tyrosinases, Marie *et al.* 2017) et d'autres, dont les fonctions semblent évoluer très rapidement (Jackson *et al.* 2006; McDougall *et al.* 2013): parmi elles, on retrouve notamment les fonctions portées par les domaines moléculaires à faible complexité (RLCDs). Il en résulte donc que les matrices coquillières font preuve d'une évolution « mosaïque » (Marin *et al.* 2016), dans le sens où tous les constituants protéiques n'évoluent pas au même rythme. Cette problématique est remarquablement bien illustrée dans le travail de Jackson *et al.* (2015), où les auteurs identifient des protéines uniques à la lignée du brachiopode *Magellania venosa*, mais également des protéines présentant des similarités de séquences avec certaines protéines coquillières de *Pinctada margaritifera* (bivalve), de *Crassostrea gigas* (bivalve), de *Strongylocentrotus* (oursin) ou encore d'*Acropora millepora* (corail scléactiniaire). Par conséquent, il apparaît difficile d'envisager les matrices organiques coquillières comme des sortes d' « horloges » permettant de juger – ou tout du moins, d'estimer – la proximité phylogénétique de différents spécimens, étant donné les rythmes évolutifs hétérogènes de ses constituants protéiques et les potentielles homologies/convergences évolutives.

## 2) Les perspectives « immédiates »

### *L'importance du transcriptome*

La très faible quantité de données existantes à ce jour sur les matrices coquillières des céphalopodes, et le puzzle encore incomplet que constituent nos caractérisations biochimiques et protéomiques de celles-ci soulignent l'importance de l'acquisition de transcriptomes des tissus minéralisants chez ces organismes.

L'analyse protéomique *in silico* entreprise dans ce travail de recherche est un moyen très efficace d'identifier les protéines présentes dans la coquille : néanmoins, la mise en évidence de la présence d'une protéine dans une structure minéralisée ne suffit pas à en prédire la fonction dans le processus de calcification. En effet, il est parfaitement envisageable que certaines protéines piégées dans le squelette minéral de l'organisme ne soient incorporées que du seul fait de leur présence dans le milieu au moment de la minéralisation, et n'auraient donc aucun rôle biologique dans la formation de la coquille (Marin *et al.* 2016). À l'inverse,

d'autres protéines peuvent ne pas avoir été incorporées bien que biologiquement actives dans le processus (Le Roy *et al.* 2012, 2014; Marin *et al.* 2016). De plus, ce type d'étude repose sur la comparaison de données expérimentales et théoriques très dépendantes de la quantité et de la qualité des informations de séquences contenues dans les bases de données pour une espèce donnée. Or, les espèces étudiées ici ne sont pas des organismes « modèles » de biologie et par conséquent, les données à leur sujet sont encore extrêmement lacunaires et nos comparaisons doivent donc s'étendre à des organismes plus éloignés phylogénétiquement.

L'analyse transcriptomique permet, quant à elle, d'accéder à l'ensemble des séquences des protéines sécrétées par le tissu minéralisant à un instant t. Ces séquences pourraient être ensuite comparées aux bases de données de séquences déjà connues chez les mollusques et les céphalopodes, mais permettraient également d'étudier les séquences inconnues afin d'en prédire les éventuelles fonctions. Enfin, seul le couplage protéomique - transcriptomique offre la possibilité d'accroître nos connaissances de la matrice organique coquillière, comme c'est le cas ici avec la spirule *Spirula spirula*.

L'obtention d'un nombre important de transcriptomes chez l'ensemble des céphalopodes à coquille apparaît donc comme une nécessité dans l'étude du phénomène de biominéralisation : elle permettrait, d'une part, la documentation plus complète de la matrice coquillière chez chacun de ces organismes et d'autre part, de quantifier avec plus de matière et de confiance le degré de similitude entre matrices organiques dédiées à la minéralisation. À plus long terme, cette approche nous permettrait d'inférer l'histoire évolutive de la matrice coquillière chez ces organismes.

Au cours de l'embryogenèse, tous les céphalopodes présentent un sac coquillier, même ceux dénués de rudiments coquilliers au stade adulte (Boletzky 1989; Naef 1928). En effet, parmi tous les représentants actuels du groupe, certains gardent encore les vestiges d'une coquille : ainsi, les calmars ont une structure chitineuse (la plume de calmar) sécrétée par un tissu coquillier et certains octopodes possèdent des stylets, interprétés comme les restes de la coquille ancestrale. Dans ce contexte, l'étude transcriptomique du sac coquillier chez les formes non minéralisantes apparaît comme particulièrement pertinente afin de mieux documenter l'histoire évolutive des processus de minéralisation coquillière au sein de ce groupe : existe-t-il des protéines, originellement dédiées à l'activité de biominéralisation qui auraient été conservées chez ces formes et recrutées pour d'autres fonctions ? Les formes non

calcifiantes de céphalopodes ont-elles gardé dans leurs gènes la capacité à sécréter un squelette minéralisé ?

*Les anticorps, première approche de la quantification des similitudes entre les matrices organiques calcifiantes.*

L'acquisition de transcriptomes, impliquant l'échantillonnage de plusieurs individus par espèce, est un procédé hasardeux en ce qui concerne nos modèles d'étude, en particulier deux d'entre eux : cette technique nécessite l'obtention de tissus fraîchement disséqués, d'individus actifs, c'est-à-dire calcifiants. Or, se procurer ce genre de matériel est compliqué, notamment pour des organismes énigmatiques comme la spirule ou l'argonaute dont l'élevage en laboratoire n'est pas envisageable à l'heure actuelle. Aussi, dans le cadre de l'étude et de la quantification (même relative) des potentielles similitudes entre les matrices organiques de céphalopodes actuels, une autre approche peut être tentée lorsque la réalisation de transcriptomes n'est pas immédiatement réalisable : l'utilisation d'anticorps, qui ne nécessite que du matériel coquillier dont on extrait la matrice organique. À partir de là, au moins deux possibilités s'offrent à nous :

- Le lyophilisat de la matrice totale peut être utilisé à la production d'anticorps polyclonaux, dirigés contre l'ensemble de la matrice organique, qu'elle soit telle quelle, c'est-à-dire avec sa fraction saccharidique, ou bien déglycosylée chimiquement, ce qui est mieux. Ces anticorps peuvent ensuite être utilisés par tests ELISA croisés avec d'autres représentants du groupe des céphalopodes, mais également lors d'expériences de marquage *in situ*, à la fois au sein de la coquille dont a été extraite la matrice, mais aussi au sein de la coquille d'autres céphalopodes.
- À la suite de préparations électrophorétiques monodimensionnelles SDS-PAGE, des fractions protéiques semi- ou complètement purifiées peuvent également servir à la production d'anticorps polyclonaux utilisables dans les mêmes conditions qu'indiqué ci-dessus.

Bien que largement en deçà des approches « omiques » de par la quantité et la qualité d'informations obtenues, l'approche par les anticorps permet aussi d'accroître notre connaissance quant aux potentielles similitudes qui existent entre les matrices organiques de céphalopodes. Néanmoins, il est important de noter que l'utilisation d'anticorps polyclonaux présente quelques limitations, inhérentes à la technique : on ne peut prédire la qualité d'un

anticorps qu'après l'avoir testé. Certains anticorps sont trop « spécifiques », d'autres trop « généralistes ». L'immunodominance de certains épitopes introduit des biais analytiques, rapprochant faussement des matrices qui sont en réalité très différentes, éloignant d'autres qui au contraire, possèdent de nombreuses similitudes.

Loin d'opposer approche immunologique et approches « omiques », on peut les associer. En effet, à partir d'un transcriptome du manteau d'un organisme, il est possible d'identifier une protéine d'intérêt, notamment sur la base de ses potentielles fonctions dans la minéralisation. Dans un tel cas de figure, il est envisageable de déterminer les séquences peptidiques les plus immunogènes au sein de cette protéine, qu'il s'agira ensuite de synthétiser. Les peptides immunogènes synthétiques sont alors liés de manière covalente à une protéine vectrice (un « carrier », le plus souvent la KLH), et inoculés à un lapin pour la production d'anticorps dirigés contre ces peptides immunogènes. Ceux-ci peuvent être ensuite utilisés dans le cadre d'un marquage *in situ* de la protéine d'intérêt, à la fois au sein de la structure coquillière de l'organisme, mais également au sein de ses tissus organiques calcifiants, c'est-à-dire l'épithélium de son manteau. Ainsi, la transcriptomique couplée au marquage *in situ* permettrait d'élaborer une cartographie précise de la distribution d'une protéine au sein des deux compartiments de la biominéralisations : la coquille et le tissu calcifiant. Il nous serait alors possible de savoir quelle région cellulaire est responsable de la sécrétion de cette protéine, et à quel endroit de la coquille celle-ci est localisée.

Les anticorps peuvent être également utilisés dans le cadre de tests ELISA croisés avec la matrice organique d'autres céphalopodes coquillier, puis dans un second temps, lors d'expériences de marquage *in situ* au sein de la coquille de ceux-ci. Cette seconde alternative permet, quant à elle, la mise en évidence de protéines coquillières communes et donc conservées au sein du groupe des céphalopodes.

*L'histologie et l'ontogénie pour mieux comprendre le mécanisme et la physiologie du processus de biominéralisation...*

L'exploration de préparations histologiques apparaît également comme un outil puissant dans l'étude du phénomène de minéralisation coquillière. Cela nous permettrait notamment de mieux comprendre les relations entre les tissus organiques et minéralisés

d'organismes encore méconnus (spirule, argonaute), mais également de répondre à certaines questions majeures dans le contexte de la biominéralisation : la nucléation cristalline survient-elle en milieu extracellulaire, sous l'effet d'une sursaturation du fluide extrapalléal (*via* l'activité de pompes membranaires) ou bien des granules minéralisés sont-ils acheminés depuis le domaine intracellulaire ? Existe-t-il une zonation cellulaire au sein du tissu minéralisant ? Quelle zone est-elle active ? De plus, une approche histologique à différents stades ontogénétiques (chez la seiche notamment, par souci d'acquisition de suffisamment d'échantillons) permettrait de documenter le processus de formation coquillière, du point de vue de l'activité des tissus minéralisants, tout au long du développement de l'organisme.

L'étude en profondeur des microstructures coquillières, de leur géométrie et de leur organisation spatiale nous a permis, dans ce manuscrit, de proposer une potentielle chronologie des évènements sécrétoires. Néanmoins, ces travaux de recherche mettent en exergue la nécessité absolue d'étudier, à l'échelle microscopique et microstructurale, le développement coquillier au cours de l'ontogénèse de chacun de ces organismes.

Par exemple, dans notre schéma conceptuel chez *S. spirula*, nous invoquons une invagination progressive de l'épithélium externe calcifiant du manteau pour permettre la formation d'un septe. Néanmoins, cette hypothèse suppose la sécrétion simultanée de toute la longueur du septe (et du canal siphonal) ainsi qu'une morphologie très particulière de l'épithélium calcifiant au moment de la jonction septe/canal siphonal. Il apparaît alors nécessaire d'étudier la formation coquillière à différents stades de développement afin de mieux comprendre la physionomie du processus : quelles positions successives l'épithélium minéralisant occupe-t-il, et à quel moment ? De la même manière, il semble nécessaire d'étudier le développement coquillier chez des femelles argonautes à coquilles juvéniles (c'est-à-dire lorsqu'elles sont en train d'élaborer leur coquille) afin d'élucider l'incertitude planant encore sur la physionomie de la sécrétion coquillière : les bras alternent-ils réellement entre deux positions pour fabriquer la coquille ? Dans le cas de la seiche, l'investigation des microstructures coquillières depuis des stades juvéniles jusqu'à adultes paraît également incontournable afin de pleinement comprendre la chronologie de sécrétion coquillière, mais également d'expliquer la disparition tardive des stries visibles à travers le bouclier dorsal chez les juvéniles.

Enfin, l'émergence au cours de ces dix dernières années de nouveaux outils moléculaires dégage un champ infini de possibilités dans l'étude des processus et mécanismes de la biominéralisation. Parmi eux, la méthode CRISPR-Cas9 (Doudna & Charpentier 2014) apparaît comme particulièrement intéressante : elle permet notamment de cibler un gène donné pour le neutraliser de manière simple et précise. Cette technique repose sur un système naturel, utilisé par les bactéries pour se protéger des infections virales, à savoir l'inactivation d'un gène par sectionnement d'une séquence cible en son sein. Pour cela, il est nécessaire de fournir à la protéine Cas9 un ARN guide : c'est-à-dire une copie de la séquence cible du gène d'intérêt, lui permettant ainsi de la reconnaître et de l'éliminer. Ainsi, ces véritables ciseaux moléculaires permettent d'envisager deux stratégies dans l'étude du rôle de certains gènes dans le processus de biominéralisation, et par extension de la fonction des protéines codées par celui-ci. La première consiste à éliminer la séquence cible et à laisser le gène se recombiner, induisant des mutations et donc l'inactivation de ce gène. La seconde consiste à remplacer la séquence cible par une autre version. L'une ou l'autre de ces stratégies permet d'étudier le rôle et la fonction des protéines finalement codées par le gène dans le processus de biominéralisation. Évidemment, une telle approche ne semble envisageable que dans le cas de la seiche commune *Sepia officinalis*, qui peut s'élever en laboratoire et dont un génome est déjà disponible. Cela nécessite néanmoins une connaissance approfondie du transcriptome (*i.e.* des protéines sécrétées par le tissu calcifiant) afin de pouvoir cibler des gènes d'intérêt au sein du génome.

### 3) Les perspectives à plus long terme

*La chitine : preuve de l'évolution mosaïque de la matrice organique.*

Après la cellulose, la chitine constitue le polysaccharide naturel le plus abondant du monde vivant. Étant donnée la diversité des phylums qui expriment cette molécule et leur éloignement phylogénétique, la chitine est une invention biologique très ancienne (Wagner 1994) : on la retrouve en effet aussi bien chez les champignons que chez les métazoaires et, chez ces derniers, aussi bien chez les ecdysozoaires (arthropodes) que chez les lophotrochozoaires (mollusques, par exemple). Apparue bien avant le processus de biominéralisation, elle semble constituer un support physique incontournable au dépôt minéral : en effet, chez les mollusques, la chitine est responsable de la nucléation et de l'orientation de la phase minérale au cours du processus de minéralisation, notamment dans le

cas de la nacre (Nudelman 2015), microstructure « inventée » très précocement (Cambro-Ordovicien). Ainsi, la chitine apparaît comme une caractéristique ancestrale (plésiomorphe) de la biominéralisation. Néanmoins, chez les céphalopodes, certains clades récents comme *Spirula* ou *Sepia* utilisent encore cette molécule dans l'élaboration de leur coquille. Ainsi, la matrice organique coquillière de ces organismes concentre à la fois des caractères modernes (avec certaines molécules probablement clade-spécifiques) et plésiomorphes tels que la chitine. Cette coexistence de molécules profondément conservées et d'autres, évoluant visiblement plus rapidement démontre l'évolution « mosaïque » (Marin *et al.* 2016) de la matrice organique lorsqu'elle est considérée dans son ensemble, chez ces représentants du groupe des céphalopodes.

À l'inverse, il est également très intéressant de remarquer que l'argonaute, lui, semble dépourvu de cette molécule au sein de sa coquille. En effet, nos différentes analyses ont échoué à mettre en évidence la présence, même indirecte, de chitine au sein de la matrice organique. Il semble donc que cet organisme ait abandonné l'usage de la chitine dans le modelage et la minéralisation de sa coquille. Ainsi, la perte de chitine apparaît comme une apomorphie propre au clade des Argonautidae. Ceci soulève une question majeure : comment l'argonaute s'est-il affranchi de la chitine dans l'élaboration de sa coquille ? L'a-t-il remplacé par une autre molécule « support » ?

Au vu de ces constatations, il serait intéressant de vérifier si d'autres céphalopodes possèdent encore cette capacité à fabriquer et à utiliser la chitine, à partir de leur sac coquillier. Cette problématique pourrait être abordée sous l'angle de la présence ou l'absence du cortège d'enzymes et protéines impliquées dans le métabolisme de la chitine. La question ne se pose évidemment pas pour des organismes comme le calmar, présentant un vestige coquillier purement chitineux (*i.e.* la plume de calmar) mais elle prend tout son sens dans le cas des pieuvres qui possèdent, pour certaines, un vestige coquillier en phosphate de calcium (Márquez & Ré 2009; Napoleão *et al.* 2005). Étendre l'étude à d'autres représentants à coquille apparaît également pertinent, afin de dresser une cartographie précise de la richesse en chitine des différentes matrices minéralisantes du groupe. Ceci permettrait sans doute de mieux comprendre l'histoire évolutive de ces matrices chez les céphalopodes.

### *Vers l'exploration des autres structures minéralisées et non-minéralisées chez les céphalopodes*

Les céphalopodes, actuels ou fossiles, sont également dotés de plusieurs autres structures minéralisées et non-minéralisées aux fonctions diverses : les statolithes, par exemple, sont des structures calcaires qui servent notamment à l'orientation de l'animal. Le bec et la radula (ou encore certains anneaux de ventouses), des structures essentiellement chitineuses, sont quant à elles associées à la nutrition. Dans la prolongation de notre étude, l'exploration de ces structures apparaît comme particulièrement intéressante.

D'une part, les statolithes représentent un intérêt majeur dans l'étude des phénomènes de biominéralisation chez les céphalopodes. Ces structures calcaires, généralement de nature aragonitique, sont au nombre de deux chez ces organismes : chaque statolithe est enfermé dans une cavité appelée statocyste, remplie d'un fluide, et dont la paroi interne est tapissée de récepteurs sensoriels cellulaires ciliés. Les statolithes ont déjà fait l'objet de nombreuses études chez les céphalopodes : chez les coléoides, leur croissance par incrémentation sert notamment à évaluer l'âge des spécimens auxquels ils appartiennent (Arkhipkin *et al.* 2018). En revanche, la documentation sur le phénomène de biominéralisation de ces structures, ainsi que sur le pourcentage de matière organique en leur sein, est quasi-inexistante : une seule étude semble faire état de ces problématiques à ce jour (Bettencourt & Guerra 2000). Il apparaît donc particulièrement pertinent de s'intéresser à ces structures, et au phénomène de biominéralisation à leur origine : quel est le processus qui régit cette minéralisation ? Quel(s) point(s) commun(s) entre le tissu *a priori* minéralisant des statocystes et le sac coquillier ? Existe-t-il des outils moléculaires identiques entre le processus de formation des statolithes et celui de l'élaboration coquillière ? Existe-t-il une part chitineuse, qui servirait de trame à la minéralisation de ces structures ?

D'autre part, les structures plus chitineuses telles que le bec ou la radula, soulèvent notamment deux questions dans le contexte de cette étude. La première concerne l'unicité des macromolécules impliquées dans le métabolisme de la chitine : existe-t-il un jeu de macromolécules unique à tous les représentants du groupe des céphalopodes, ou bien chaque organisme a-t-il recruté une boîte à outils moléculaire qui lui est propre, dans la sécrétion et le modelage de la chitine ? La seconde concerne l'utilisation de macromolécules similaires, si ce n'est identiques, entre ces structures purement chitineuses et la « trame » chitineuse de la

coquille chez certains représentants actuels : la seiche ou la spirule utilisent-elles des protéines ou enzymes identiques lors de la fabrication des statolithes et de celle de la coquille ?

*Quel(s) rôle(s) pour la transferrine, l'actine et les histones dans la minéralisation ?*

Les analyses protéomiques *in silico* entreprises dans ce travail de recherche ont révélé des résultats particulièrement énigmatiques du point de vue de la minéralisation. Nous identifions ainsi une transferrine dans le transcriptome de *Spirula spirula* : il s'agit d'une glycoprotéine capable de lier les ions ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) afin de contrôler le niveau de fer libre dans les fluides biologiques. Son activation nécessite la présence d'un anion, généralement le carbonate  $\text{CO}_3^{2-}$ . Ce type de protéine a déjà été identifié au sein de la matrice organique de métazoaires : dans l'os de seiche (Le Pabic *et al.* 2017), dans les otolithes d'un poisson cichlidé (Weigle *et al.* 2016) ou encore dans la coquille d'œuf (Nys *et al.* 1999). Des études récentes tendent à démontrer que les transferrines sont des protéines multifonctionnelles, aux rôles physiologiques divers qui commencent tout juste à être cernés (Hughes & Friedman 2014; Lambert *et al.* 2005). Certaines sont notamment envisagées comme pleinement actives dans le processus de biominéralisation : c'est le cas de l'ovotransferrine, retrouvée dans la coquille d'œuf, supposée influencer la nucléation et la croissance cristalline en plus de jouer un rôle antimicrobien (Gautron *et al.* 2001). L'ensemble de ces considérations souligne la nécessité urgente d'étudier ce type de macromolécules, afin d'en comprendre le rôle et les fonctions au cours du processus de minéralisation.

Nos analyses ont également révélé plusieurs protéines cytoplasmiques et nucléaires, parmi lesquelles des actines et des histones, à la fois chez *Spirula spirula* et *Argonauta hians*. Les actines et autres protéines cytoplasmiques (tubulines, tropomyosines, etc.) sont souvent interprétées comme une contamination des échantillons. Dans notre cas, nous ne pouvons pas éliminer cette hypothèse. Cependant, nos protocoles de nettoyage des structures coquillières avant extraction de la matrice sont minutieux et poussés, si bien qu'ils nous permettent d'envisager une autre alternative : celle d'un rôle de ces protéines au sein de la matrice extracellulaire. De telles relations entre ces protéines et le phénomène de minéralisation ont déjà été mises en évidence, notamment lorsque des vésicules sont impliquées dans le processus (Accinni *et al.* 1983; Holliday *et al.* 2020; Rosenthal *et al.* 2011). Chez les

mollusques, Weiss *et al.* (2006) démontrent une relation entre cytosquelette et matrice organique coquillière calcifiante. Ce concept s'étend à d'autres systèmes calcifiants, comme les foraminifères où l'actine, sous la forme de pseudo-bras, contrôle activement la formation minérale (Tyszka *et al.* 2019).

Les histones sont des protéines très basiques, associées à l'ADN nucléaire. Leur présence – ou tout du moins celle de peptides dérivés d'histones – au sein de la matrice minéralisante n'est pas nouvelle et la communauté scientifique s'accorde à penser que ces protéines (ou peptides) peuvent fonctionner en domaine extracellulaire en tant qu'agents antimicrobiens. Cette hypothèse a été évoquée à de nombreuses reprises dans le cadre de l'étude de la matrice organique de la coquille d'œuf (Réhault-Godbert *et al.* 2011) et a même été partiellement confirmée dans un autre modèle. La molluskine, un peptide antimicrobien retrouvé chez plusieurs mollusques, semble être dérivée d'une histone H2A (Sathyan *et al.* 2012). Il se peut alors que ces histones (ou domaines similaires à ceux d'une histone) fassent partie d'un système moléculaire de protection, impliquant également des protéines aux propriétés immunitaires (de type "immunoglobulines" ou "lectines").

L'ensemble de ces considérations témoigne du rôle encore sous-évalué des protéines nucléaires et cytoplasmiques dans le processus de minéralisation coquillière et de la nécessité d'étudier ces problématiques afin de pouvoir les expliquer de manière appropriée. Dans un premier temps, ce type d'investigation pourrait être mené chez des organismes modèles de la biominéralisation, comme certains bivalves (*Pinctada*, *Mytilus*, etc.) avant d'envisager d'étendre les expérimentations à des modèles moins connus, comme ceux présentés ici.

#### *Pluralité des répertoires sécrétoires versus microstructure du produit fini.*

Les travaux de recherches présentés dans ce manuscrit ont révélé l'existence de certains points communs du point de vue de la microstructure coquillière de nos organismes. Les modèles étudiés ici ont tous une paroi coquillière divisée en trois couches distinctes : néanmoins, seules la spirule et la seiche présentent des microstructures similaires. En effet, les couches interne et externe de la paroi de *S. spirula*, de nature (semi-) prismatique, ressemblent à celles prismatiques, du bouclier dorsal de *S. officinalis*. De plus, la couche lamellaire observée au centre du bouclier dorsal de la seiche rappelle celle, lamello-fibrillaire, des septes

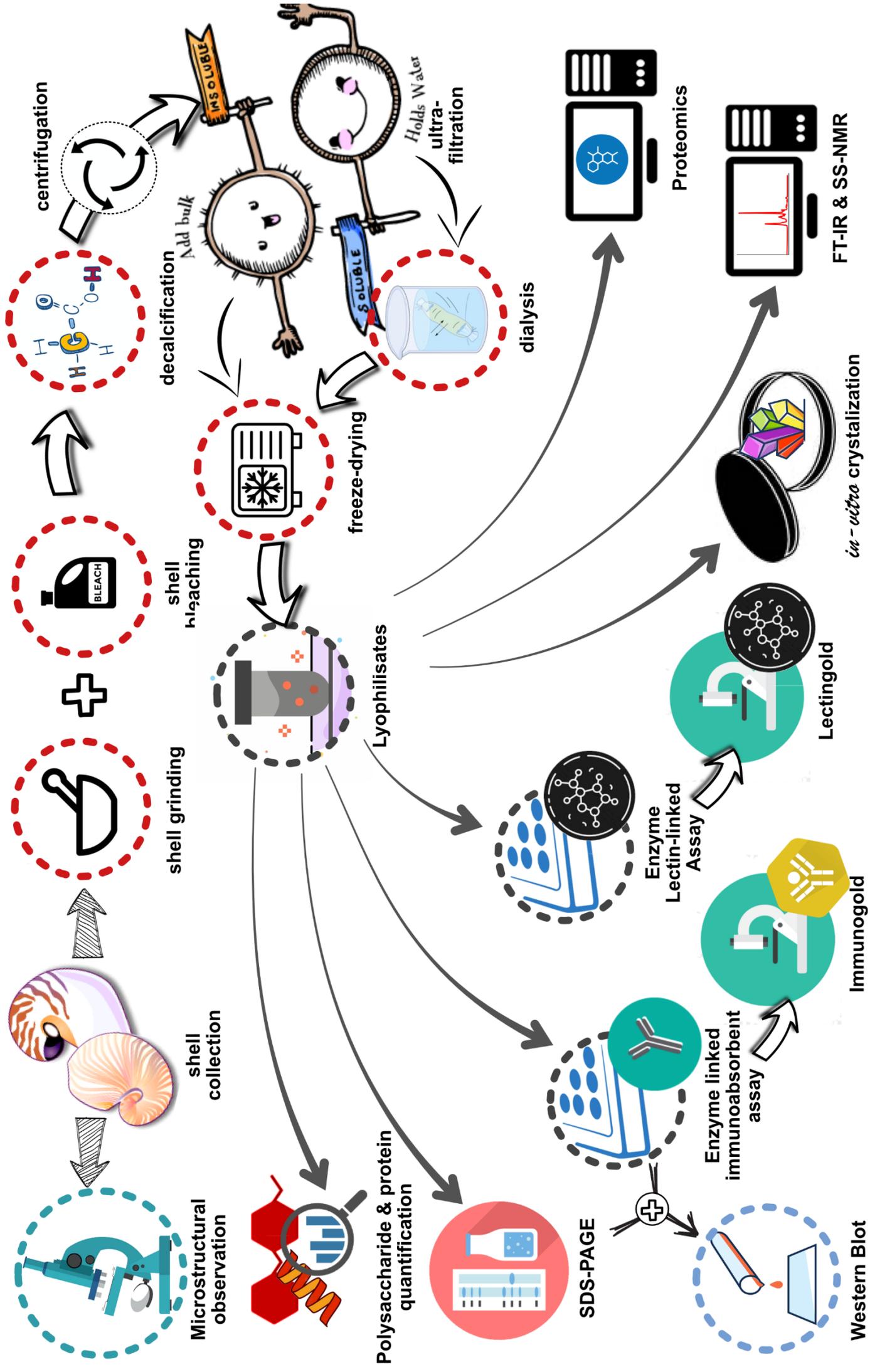
de la spirule. Pourtant, les informations en notre possession au moment de la rédaction de ce manuscrit semblent indiquer que les matrices coquillières de ces deux organismes ne possèdent pas beaucoup de similitudes moléculaires. Ces observations laissent à penser qu'il n'existe pas un seul répertoire de macromolécules, c'est-à-dire une seule boîte à outils moléculaires dans la fabrication d'une microstructure donnée. Cette hypothèse, proposée par Marin (2020) suggère que les microstructures coquillières sont des propriétés émergentes, *i.e.* des propriétés qui ne peuvent pas être expliquées en considérant leurs constituants pris un à un. Dans ce contexte, les protéines coquillières sont les « ouvrières » d'un réseau de régulation, dont la coopération conduit à la formation d'une microstructure donnée (« modèle en entonnoirs »). La vérification d'un tel modèle nécessite la documentation intensive des matrices coquillières et la normalisation des connaissances afin que les répertoires coquilliers puissent être comparés entre eux à large échelle.

*Biomimétisme : à quand une copie parfaite de ces structures complexes ?*

Lorsqu'on étudie les microstructures coquillières et la matrice organique qui leur est associée, on en vient nécessairement à se demander si nous parviendrons, un jour, à reproduire des structures aussi perfectionnées par le biais de techniques purement *in vitro*. Force est de constater que de nombreux aspects de la biominéralisation coquillière demeurent encore aujourd'hui flous, si ce n'est, carrément opaques. Malgré la disponibilité de génomes et de transcriptomes pour certains organismes modèles, certaines fonctions moléculaires sont encore inconnues et les interactions entre les différents acteurs de la biominéralisation sont encore sujettes à débat. Il ne s'agit pas là de dresser un portrait défaitiste de nos connaissances sur le phénomène de minéralisation biologique, mais plutôt de reconnaître qu'il existe encore beaucoup d'inconnues au tableau. Par exemple, le rôle de protéines cytoplasmiques ou nucléaires comme cité précédemment, est encore mal estimé. De même, la manière selon laquelle la matrice organique influe sur la formation minérale fait encore débat. Il apparaît donc nécessaire de poursuivre les efforts de caractérisation et de compréhension des matrices organiques de métazoaires, modèles ou non, afin de cerner au mieux la globalité du processus pour – pourquoi pas ? – être à même, dans une phase ultérieure, d'en reproduire la mécanique.

# **Méthodes et protocoles analytiques**

# A guide to the experimentations



## **Inclusion coquillière et observations microscopiques**

L'inclusion des coquilles (entières ou fragmentées, selon la taille de celles-ci) a été réalisée dans le respect des instructions du fabricant (Fluka) : le peroxyde de benzoyle (catalyseur) est dissout dans la solution de résine LR White (9,9 g per 500 mL) pendant vingt-quatre heures, à température ambiante et sous agitation constante. Les coquilles, nettoyées et sèches sont immergées dans la résine, au sein de flacons à échantillons. Les préparations sont ensuite placées dans une cloche à vide pendant quelques heures, pour le dégazage, puis incubées à 60°C pendant 24 heures minimum afin de permettre la polymérisation de la résine. Les blocs sont finalement sciés à l'aide d'une scie microtome (Leica SP1600) et polis sur disques de toile abrasive de granulométrie décroissante, jusqu'à l'ultime polissage "miroir", à l'aide d'une pâte d'alumine (oxyde d'aluminium) de 0,05 µm. Entre chaque phase de polissage et après la dernière étape, les préparations sont passés au bain d'ultrasons pour enlever les éventuels résidus qui rayeraient les surfaces polies. Les préparations sont ensuite légèrement attaquées à l'EDTA (1% wt/vol) pendant deux minutes dans un bain à ultrasons, rincées à l'eau claire puis à l'alcool et étuvées ou séchées au sèche-cheveux. Elles peuvent ensuite être observées au microscope électronique à balayage (MEB de paillasse Hitachi TM-1000 ou JEOL JSM-IT 100 InTouchScope™).

## **Séchage au point critique**

Dans le cadre de l'étude de la seiche commune (*Sepia officinalis*), nous avons eu recours à la méthode de séchage au point critique afin de sécher sans endommager les spécimens biologiques. Cette technique permet d'éviter la transition directe liquide-gaz d'un séchage ordinaire. Ce procédé consiste alors à utiliser le CO<sub>2</sub> sous pression, qui se comporte comme un liquide. Dans un diagramme de phase eau-CO<sub>2</sub> il y a entière miscibilité du CO<sub>2</sub> et de l'eau au-delà d'une pression d'environ 50 bars. Le CO<sub>2</sub> est alors utilisé pour remplacer les fluides cellulaires aqueux. Après évaporation du CO<sub>2</sub>, la préparation est en quelque sorte "momifiée", sans déformation. Un tel processus préserve ainsi la structure des tissus biologiques des échantillons en évitant une tension de surface trop élevée au moment du séchage.

Dans notre étude, les seiches juvéniles jusqu'à lors conservées dans de l'éthanol 70% sont soumises à des bains successifs d'éthanol de plus en plus concentré (80, 90, 100%) ; chacun d'entre eux durant au minimum 3h. Les échantillons sont ensuite placés dans la cellule d'un appareil à séchage au point critique automatisé (LEICA EM CPD300, Leica Biosystems, Nusslog, Allemagne) avec ~70mL d'éthanol 100% : la cellule est ensuite refroidie à une température inférieure de 5°C à celle de la bouteille de CO<sub>2</sub>. Par la suite, le CO<sub>2</sub> liquide est injecté au sein de la cellule selon plusieurs cycles d'échanges (entre 15 et 30 selon la taille de l'échantillon). Enfin, la cellule est chauffée à 40°C, permettant ainsi au CO<sub>2</sub> liquide d'atteindre un état supercritique (où son comportement est intermédiaire à celui d'un liquide et d'un gaz) puis elle ventilée afin de sécher l'échantillon.

Une fois l'échantillon séché, il est utilisé tel quel ou inclus au sein d'une résine LR-White pour observation au microscope électronique à balayage. L'échantillon sec peut également être utilisé tel quel pour la reconstitution de sa morphologie 3D par scanner surfacique ou microtomographie (CT scan).

## **Préparations histologiques**

Les spécimens fraîchement éclos, par leurs os faiblement minéralisés, ne nécessitent pas de dissection préalable. En revanche, les juvéniles plus âgés (3 à 6 semaines) sont d'abord disséqués afin de retirer l'os de seiche des tissus organiques. Les échantillons sont fixés à l'aide d'une solution tampon neutre de formaline (10% formaldéhyde). Ils sont ensuite déshydratés au sein d'un automate de déshydratation (ASP300S, Leica) : ils subissent ainsi un premier bain de 30 min d'éthanol 70%, puis un bain de 2h30 min d'éthanol 95% (avec changement de solution à 30min et à 1h30) et finalement un bain de 2h30 d'éthanol 100% (mêmes changements) avant d'être nettoyés au xylène pur durant 3h15 (avec changement de solution à 45min et à 1h45). Les échantillons sont ensuite incubés dans la paraffine pour une durée totale de 7h à 59°C. Des sections de 5µm d'épaisseur sont réalisées, à l'aide d'un microtome (RM2145 Leica), avant d'être déposés sur lame mince où les préparations sont colorées à l'aide d'un AutoStainer XL ST5010 (Leica).

La coloration à l'Hematoxyline-Eosine, colorant les noyaux en violet ainsi que le cytoplasme et la matrice extracellulaire en rose, est réalisée selon le protocole suivant : les sections sont nettoyées au xylène à deux reprises, durant 3 minutes avant d'être plongées dans l'éthanol 100% (2x3 minutes) puis 70% (3 min) et finalement rincées à l'eau (3x3 minutes). Une solution d'hematoxyline de Harris (Leica) est appliquée durant 1 minute, puis les sections sont rincées à l'eau (3x2 minutes) avant d'être immergées dans l'éthanol 50% durant 30 secondes. La solution d'Eosine Y alcoolique (Leica) est ensuite appliquée durant 1min30, puis les sections sont immergées dans l'éthanol 50% durant 30 secondes, puis à 2 reprises dans l'éthanol 100% pendant 10 secondes. Finalement, elles sont nettoyées au xylène durant 30 secondes, à deux reprises, avant d'être montées en lames minces, en milieu organique, pour observation.

La coloration Von Kossa, permettant de mettre en évidence le calcium au sein des tissus (couleur brun orangé), est réalisée selon le protocole suivant : les sections sont nettoyées au xylène à deux reprises, durant 3 minutes avant d'être plongées dans l'éthanol 100% (2x3 minutes) puis 70% (3 min) et finalement rincées à l'eau (3x3 minutes). Une solution de nitrate d'argent 2% est appliquée durant 1h30 sous une source lumineuse forte, puis les sections sont rincées à l'eau (2x1 minute) puis baignées dans le rouge nucléaire 0,1% durant 10 minutes avant d'être rincées à l'eau distillée pendant 1 minute, à deux reprises. Les sections sont ensuite baignées dans l'éthanol 100% (2x10 secondes) puis dans le xylène (2x30 secondes) avant d'être montées en lame mince, en milieu organique, pour observation.

## **Extraction de la matrice organique**

Dans un premier temps, le matériel coquillier subit un broyage manuel (*Spirula spirula*, *Sepia officinalis*) ou semi-manuel (*Argonauta hians*), en fonction de la solidité des structures coquillières. La poudre grossière ainsi obtenue est ensuite traitée à l'hypochlorite de sodium (Merck, 0,6-1,4% de chlore actif, ref 105614) durant vingt heures. Dans le cas de la seiche, étant donné sa grande porosité, le nettoyage est réalisé à l'aide d'un tampon salin (0,9% NaCl, 0,1% Tris 10 mM, 0,1% Tween20, 0,1% NaN<sub>3</sub> 1%, pH réajusté à 9 avec du

NaOH 0,1 M) pendant 20 minutes pour les os de seiche juvéniles et 24 h pour l'os de seiche adulte. L'emploi du Tween20, agent surfactant qui, par ses propriétés tensio-actives, permet la désorption des protéines contaminant les surfaces minérales. Enfin, la poudre est rincée à l'eau milli-Q, selon plusieurs cycles de mise en suspension et de centrifugation, avant d'être mise à l'étuve (37°C) pour séchage avant d'être pesée.

Une variante de ce protocole a parfois été utilisée (notamment chez *Spirula spirula*), afin de s'intéresser plus particulièrement à la matrice organique intracristalline, et ainsi mettre en évidence de potentielles différences de composition entre cette dernière et la matrice organique intercristalline. Pour cela, le matériel coquillier est scindé en deux lots : le premier subit un nettoyage unique, tandis que le second est soumis à un autre nettoyage à l'hypochlorite de sodium, pour une durée de vingt heures également.

Dans un second temps, la poudre séchée est mise en suspension dans de l'eau Milli-Q, puis elle est décalcifiée par ajout progressif d'acide acétique froid (10% vol/vol), selon un débit de 0,1 à 0,5mL (0,1mL pour *S. spirula*, 0,2 mL pour *A. hians* et 0.5 mL pour *S. officinalis*) toutes les 5 secondes (*S. spirula* et *A. hians*) à 10 secondes (*S. officinalis*) sous agitation constante pendant une nuit entière (d'après le protocole de Marin 2003). La solution claire est finalement centrifugée (3900 G, 30 min), permettant de distinguer deux phases : un surnageant, et un culot. Le premier, contenant la matrice organique soluble dans l'acide (ASM) est filtré sur membrane Millipore de 5 µm puis placé en cellule d'ultrafiltration Amicon (400 mL, seuil de 10 kDa pour *S. spirula* et 3 kDa pour *A. hians* et *S. officinalis*) afin de réduire la solution à un volume facile à manipuler (env. 15 mL) et, par là même, concentrer la matrice soluble. Le second, contenant la matrice organique insoluble dans l'acide (AIM), est rincé à l'eau ultra pure selon plusieurs cycles de mise en suspension et de centrifugation, ce qui permet de débarrasser la fraction insoluble des derniers sels de calcium. Au terme de chaque cycle, le surnageant est transféré dans la cellule d'ultrafiltration, avec l'ASM. Après cinq cycles de rinçage, le culot est conservé au froid (-80°C). En parallèle, la solution d'ASM (10 à 15 mL) est soumise à une dialyse à l'eau milli-Q pendant trois à quatre jours (6 changements d'eau au total). Enfin, les deux fractions organiques (ASM et AIM) sont lyophilisées puis pesées trois à cinq fois sur une balance de précision (Sartorius Quintix35-1S). Leur masse représente la moyenne des valeurs obtenues.

## **Quantification des saccharides, des glycosaminoglycanes sulfatés, et des protéines**

Le contenu saccharidique de la matrice organique soluble (ASM) est analysé selon la méthode de Dubois *et al.* (1951), adaptée à de faibles volumes, dispensés sur microplaque 96 puits (Dubois *et al.* 1956; Masuko *et al.* 2005). Cette technique repose sur la réaction de nos échantillons (200  $\mu\text{L}$ , à partir d'une solution stock de  $5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) avec de l'acide sulfurique (500  $\mu\text{L}$ ) et du phénol 5% (100  $\mu\text{L}$ ). La préparation est ensuite laissée à refroidir pendant dix minutes avant d'être incubée à  $37^\circ\text{C}$  pendant trente minutes. Des solutions standard de glucose et de maltose (0 à 56  $\mu\text{g}/\text{puits}$ ) sont traitées de manière similaire en parallèle de nos échantillons. Enfin, 200  $\mu\text{L}$  de chaque préparation sont répartis dans les puits d'une microplaque de 96 puits. Pour chaque échantillon (ASM organisme et standards), des triplicats sont réalisés. La microplaque est finalement lue, à 490 nm, dans un lecteur de microplaque (BioRad, modèle 680) et une courbe standard est établie.

Les sucres sulfatés sont quantifiés d'après une technique de détection spectrophotométrique. Cette technique, utilisant le bleu de 1,9-diméthylméthylène (DMB) a été adapté dans le kit Blyscan<sup>TM</sup> (Biocolor Ltd., Antrim, Angleterre) pour une détection directe à 655 nm sur microplaque. Le sulfate de chondroïtine est utilisé comme standard pour la quantification des polysaccharides sulfatés.

Le contenu protéique de la matrice est quantifié à l'aide du kit Quick Start<sup>TM</sup> Bradford Protein Assay (Ref. 5000202, Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA). Dans des Ependorfs 2mL, les échantillons sont dilués à partir d'une solution stock de  $5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , et le standard de référence est dilué selon sept concentrations différentes (BSA, allant de 2 mg/mL à 0,125 mg/mL), avant d'être amenés à réagir avec le réactif de Bradford pour un volume final de 800  $\mu\text{L}$ . La mixture est ensuite vortexée, puis incubée à température ambiante pendant 5 minutes avant d'être pipetée dans une microplaque 96 puits (200  $\mu\text{L}/\text{puits}$ ) et lue à l'aide d'un lecteur de microplaque à 595 nm. Une courbe standard est ensuite tracée afin de pouvoir mesurer la concentration de protéines présentes dans nos échantillons.

## Électrophorèse monodimensionnelle – SDS-PAGE

La séparation des macromolécules des matrices organiques a été effectuée par SDS-PAGE : il s'agit d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide, pré-coulé (Mini-PROTEAN TGX Gel 4-15% d'acrylamide, 90 mm x 70 mm, Bio-Rad) ou fait maison (12% de polyacrylamide), en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS). Le SDS, agent dénaturant, se lie aux protéines et leur confère une charge négative uniforme. Les protéines qui migrent sous l'action d'un champ électrique continu sont séparées en fonction de leur poids moléculaire : en effet, elles sont plus ou moins retenues selon leur encombrement stérique dans le gel de polyacrylamide qui joue ainsi le rôle de tamis moléculaire. En conditions dénaturantes (c'est-à-dire en présence de SDS et de  $\beta$ -mercaptoéthanol, ce dernier permettant l'hydrolyse des ponts disulfures entre résidus cystéine), la comparaison des distances de migration parcourues par les différentes macromolécules de la matrice à celles de protéines connues (standard) permet de déterminer le poids moléculaire apparent de ces polypeptides.

La matrice soluble est directement mise en solution dans un tampon de dénaturation (Laemmli, 1970), dit tampon de Laemmli (Tris-HCl 60 mM pH 6,8 ; glycérol 5%, SDS 0,4% ;  $\beta$ -mercaptoéthanol 0,02% ; bleu de bromophénol 0,1%) puis incubée pendant 5 à 10 minutes (respectivement pour l'ASM et l'AIM) à 100°C afin d'obtenir une dénaturation complète de l'échantillon. Les extraits sont ensuite déposés au sommet du gel de polyacrylamide : les étapes de pénétration et de migration des macromolécules au sein du gels s'effectuent dans un système mini-protean 3 (Bio-Rad®), par application d'un courant continu de 100-120 V dans un tampon de migration (25 mM Tris, 192 mM glycine, 2% SDS) pendant une heure à une heure et demie selon la concentration du gel en polyacrylamide.

Il existe de nombreux protocoles de coloration des macromolécules présentes dans les gels d'électrophorèse après migration. Ils sont généralement basés sur la capacité du colorant ou du révélateur à se lier aux différents groupements chimiques des macromolécules. Alors que certaines colorations sont spécifiques des groupements acides (Bleu Alcian), d'autres permettent de révéler les composés dithiols des sucres (acide périodique/réactif de Schiff, PAS) ou encore les groupements aromatiques des acides aminés aromatiques (Bleu de Coomassie). Il est généralement préconisé de diversifier les types de colorations mises en

œuvre afin de révéler les différents composés présents dans les matrices organiques coquillières. En effet, en raison de leur composition en acides aminés originale et singulière, certaines protéines coquillières ne réagissent pas très bien avec les colorations classiquement utilisées pour les extraits de tissus non-minéralisés.

La coloration au nitrate d'argent (Morrissey 1981) permet de révéler l'ensemble (ou la grande majorité) des macromolécules présentes dans le gel. Elle colore, en nuances de bruns et d'ocre, les différents composés acides de la matrice, de manière plus ou moins intense en fonction de la quantité de matériel et du temps de révélation. Il est néanmoins important de noter, que d'une expérimentation à une autre, les colorations sont peu reproductibles. De plus, certaines protéines très acides peuvent colorer « négativement » lorsque présentes en trop grande quantité dans le gel.

La coloration au bleu de Coomassie (ou bleu BioRad) est la coloration la plus classiquement utilisée pour révéler les protéines : le colorant se lie par interaction ionique avec les groupements chargés positivement des acides aminés (par ordre de réactivité décroissante : arginine, lysine, histidine, tryptophane, tyrosine et phénylalanine). Ce colorant ne convient donc pas à l'observation des protéines qui contiennent peu d'acides aminés basiques.

La coloration à l'acide périodique, combiné au réactif de Schiff (PAS) est spécifique des groupements diols de la majorité des sucres associés aux protéines (Zaccharius et al. 1969). Dans le cadre de nos expérimentations, nous avons choisi de suivre le protocole de Kapitany & Zebrowski (1973).

La coloration au « Stains-all » (1-Ethyl-2-[3-(1-ethyl-naphto[1,2-d]thiazoline-2-ylidene)-2-methylpropenyl] naphtho[1,2-d]thiazolium bromide) a été effectuée selon le protocole de Campbell *et al.* (1983). Elle permet de colorer les protéines « classiques » dans des teintes rouges et les protéines qui peuvent, potentiellement, lier le calcium en une teinte bleu turquoise caractéristique. Le gel, une fois coloré, est rapidement numérisé car la coloration s'estompe et finit par disparaître à la lumière.

## **Enzyme-linked immunosorbent assay – tests ELISA**

Cette technique se base sur la réaction spécifique de liaison entre un anticorps et son antigène-cible. Elle permet ainsi de détecter et de doser un antigène au sein d'un échantillon, par l'intermédiaire d'anticorps spécialisés.

Pour cela, notre échantillon (contenant une quantité d'antigène inconnue) est déposé, en triplicats au sein d'une plaque 96-puits faite en un polymère (Nunc Maxisorp) qui permet l'attachement des macromolécules (protéines, polysaccharides). La microplaque est incubée durant une heure et demie à 37°C, voire une nuit entière à température ambiante. Après avoir retiré la solution et rincé 3 fois les puits, la microplaque est incubée (minimum une demi-heure, à 37°C) dans une solution de blocage (TBS/gélatine 1%). Les puits sont ensuite vidés et la microplaque est incubée durant une heure et demie, à 37°C, avec l'anticorps primaire. Dans nos expériences, nous avons utilisé un jeu de douze à dix-sept anticorps différents, produits chez le lapin et dirigés contre des matrices fractionnées ou non, ou des protéines coquillières purifiées et aux patrons de réactivités variés. Les puits sont rincés trois à cinq fois à l'aide d'une solution de TBS/Tween20 0,5% avant d'être incubés durant une heure et demie, à 37°C, avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-lapin couplé à une enzyme, la phosphatase alcaline (GAR-AP). Après avoir de nouveau rincé les puits cinq fois à l'aide d'une solution de TBS/Tween20 0,5%, l'activité phosphatase alcaline est révélée par ajout d'une solution de substrat (10 mL d'une solution aqueuse de diéthanolamine, à laquelle 5mg de p-nitrophenyl phosphate ont été ajoutés). La microplaque est finalement lue toutes les quinze minutes, à 405 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de microplaque 96-puits. Sur chaque microplaque, une série de blanc (sans antigène ni traitement) est réalisée afin de quantifier le « bruit de fond » de l'analyse.

## **Western Blot**

Cette technique permet la détection et l'identification de protéines (séparées préalablement par électrophorèse sur gel), par des anticorps dirigés contre ces protéines. Dans le cas de nos échantillons, les anticorps choisis pour l'expérience sont ceux qui présentaient la plus forte réponse au cours des tests ELISA.

Après migration SDS-PAGE en conditions dénaturantes, les protéines sont transférées sur une membrane de polyvinyldène difluoride (PVDF) selon le protocole de Matsudaira (1987) : les protéines sont chargées négativement et soumises à un champ électrique

permettant leur migration depuis la cathode vers l'anode, les détachant ainsi du gel et les transférant sur la membrane. Avant transfert, le gel est incubé une quinzaine de minutes dans un tampon de transfert (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% méthanol) et mis au contact de la membrane de PVDF (Immobilon™), après hydratation de celle-ci au méthanol 100% et rinçage à l'aide du tampon de Tris-glycine. L'électro-transfert est réalisé, par application d'un courant de 120 mA durant une heure et demie.

La membrane est incubée successivement dans un tampon de blocage (TBS, 1% gélatine) permettant de limiter la fixation non-spécifique des anticorps puis dans un tampon de TBS (0,1% de gélatine, 0,5% Tween 20) contenant l'anticorps primaire de lapin (dilué selon le titre approprié, incubation 90 minutes, température ambiante). Après une série de 7 rinçages (deux rapides et cinq de dix minutes chacun) dans du TBS/0,5% Tween 20, la membrane est finalement incubée dans un tampon de TBS (0,1% de gélatine, 0,5% Tween 20) contenant le second anticorps (IgG de chèvre anti-lapin couplé à une enzyme, la phosphatase alcaline « GAR-AP » dilué 30000 fois). Après une série de rinçages similaire à la première, la membrane est incubée 5 min dans le noir dans une solution chémoluminescente (CDP-Star) et est finalement révélée par exposition à un film photo X-Omat (Kodak®), monté dans une cassette de développement. Enfin, la membrane est incubée dans une solution de Sigma Fast BCIP/NBT (Sigma, ref. B5655), jusqu'à obtention d'une coloration violette intense. La coloration est alors interrompue en rinçant la membrane à l'eau avant de la mettre à sécher.

En parallèle de nos échantillons, un témoin utilisant un sérum pré-immun non dilué à la place de l'anticorps primaire est réalisé.

## **Localisation *in situ* d'anticorps – Immunogold labelling**

Le marquage d'anticorps ("*immunogold labelling*" en anglais) permet la visualisation d'un antigène directement à la surface d'un échantillon coquillier, à l'aide d'un anticorps donné. Cette technique repose ainsi sur des principes similaires à ceux d'un test ELISA : l'antigène est identifié à l'aide de la réactivité croisée d'un anticorps donné (celui ayant présenté la meilleure réponse lors des tests ELISA), lui-même reconnu par un anticorps secondaire couplé à une particule d'or nanométrique. Ce sont ces particules qui sont ensuite visualisées à l'aide d'un microscope électronique à balayage, à la surface de l'échantillon.

Cette technique, mise au point initialement sur tissus mous, a été adaptée par F. Marin sur carbonates biogéniques (Marin *et al.* 2007). Elle est réalisée sur des fragments coquilliers frais, dont la surface est légèrement redissoute à l'EDTA 1% pendant deux minutes (cuve à ultrasons) pour exposer les déterminants antigéniques, puis rincée à deux reprises au TBS durant plusieurs minutes. Toutes les étapes d'incubation sont réalisées dans une plaque 12 ou 24 puits à l'exception de l'étape d'accroissement à l'argent (visant à augmenter la taille des particules d'or en s'agglutinant autour de celles-ci) qui est réalisée sur des micro-volumes. Les fragments coquilliers sont d'abord incubés dans une solution de blocage durant 30 minutes à l'aide d'une solution filtrée (5 µm) de gélatine (1% w/vol) diluée dans du TBS au pH ajusté à 8 avec du NaOH. Puis, ils sont incubés durant une nuit entière dans la solution contenant le premier anticorps, dilué dans du TBS/Tween 20 combiné à 0,5% de gélatine (pH 8) + Azide de sodium (0,001%). Les échantillons sont abondamment rincés au TBS/Tween 20 à dix reprises puis incubés durant 90 minutes dans la solution contenant le second anticorps couplé à l'or, dilué dans du TBS/Tween 20 combiné à 0,5% de gélatine, pH 8. Les échantillons sont une nouvelle fois abondamment rincés et la taille des particules d'or est augmentée dans un bain d'argent ("silver enhancement solution", British Biocell International, ref. SEKL15) durant 15 à 20 minutes. Finalement, les échantillons sont rincés à l'eau ultrapure, séchés et directement observés au microscope électronique à balayage (MEB de paillasse Hitachi TM1000).

## **Enzyme-linked lectin assay – tests ELLA**

Cette technique répond aux mêmes principes que ceux d'un test ELISA, à ceci près que les anticorps de première couche sont ici remplacés par des lectines ; protéines ciblant des structures mono- ou oligo-saccharidiques spécifiques. Elle permet ainsi de caractériser, de manière qualitative et globale, les grandes familles de sucre présentes au sein d'un échantillon.

Ici, nous utilisons trois kits de sept lectines biotinylées chacun (Vector Labs, Kits I to III, BK-1000, BK-2000, BK-3000), dont les spécificités et les préférences de liaisons sont précisés par Kanold *et al.* (2015). Ce test est réalisé au sein d'une plaque 96 puits (MaxiSorp, Nunc™, Rockslide, Denmark) : l'ASM est diluée au sein d'une solution de TBS et incubée pendant 90 minutes à 37°C avant d'être rincée au TBS/Tween 20. Les puits sont ensuite

bloqués à l'aide d'une solution 1x concentrée de Carbo-free (Vector Labs, ref. SP-5040) pendant 30 minutes à 37°C. Contrairement à la gélatine utilisée en ELISA, cet agent bloquant ne comporte pas de sucres. Les lectines diluées (200x pour les Kits I et II et 100 x pour le Kit III, dans du TBS/Tween 20) sont ensuite incubées dans les puits pendant 90 minutes à 37°C. Les puits sont rincés à trois reprises au TBS/Tween 20 puis la microplaque est incubée dans une solution diluée d'avidine conjuguée à l'alkaline phosphatase (1:70000, ref. Sigma A7294, St. Louis, MO, USA) pendant 90 minutes à 37°C. L'avidine est une protéine qui a une très forte affinité pour la biotine, avec laquelle elle forme un complexe avidine-biotine. Elle est donc l'équivalent de l'anticorps "seconde couche" des tests ELISA. Les puits sont rincés abondamment au TBS/Tween 20 à cinq reprises puis incubés dans la solution de substrat, contenant du diéthanolamine aqueux (9,7% vol/vol, pH ajusté à 9.8 avec HCl) et du substrat phosphatase (0,5 mg/mL, pNPP Tablet, Sigma, St. Louis, MO, USA) : la microplaque est lue à 405 nm toutes les 15 minutes à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de multiplaque 96-puits (BioRad Model 680).

### **Localisation *in situ* de lectines – Lectingold labeling**

Basée sur le même principe que la localisation *in situ* d'anticorps, le marquage de lectine permet la visualisation, à la surface d'un échantillon coquillier, d'une structure saccharidique à l'aide d'une lectine donnée.

Cette technique suit donc les mêmes étapes : les fragments coquilliers sont décapés brièvement à l'EDTA 1% pendant deux minutes puis rincés à deux reprises au TBS 1x, avant d'être incubés pendant une heure dans la solution de blocage (Carbo-free). Ils sont ensuite incubés durant une nuit entière dans une solution contenant la lectine biotinylée choisie pour le test (celle ayant présentée la plus forte réactivité au test ELLA) diluée dans du TBS/Tween 20. Les échantillons sont rincés abondamment à cinq reprises dans du TBS/Tween 20 et incubés durant deux heures dans une solution contenant un anticorps de chèvre dirigé contre la biotine (Goat anti-biotine antibody) couplé à des particules d'or nanométriques (Aurion, Wageningen, The Netherlands, ref. SKU: 100.088, dilution x 100). Après avoir été abondamment rincés, les échantillons sont plongés dans une solution d'accroissement à l'argent (British Biocell International, ref. SEKL15) pendant 15 à 20 minutes, puis rincés,

séchés et directement observés à l'aide d'un microscope électronique à balayage (MEB de paillasse Hitachi TM1000).

### **Cristallisation *in vitro***

Ce test est couramment utilisé pour observer les effets de la matrice organique coquillière, extraite de biominéraux, sur la cristallisation du carbonate de calcium en solution *in vitro* (Addadi & Weiner 1985). Le principe en est le suivant : le bicarbonate d'ammonium est un solide cristallin qui se sublime spontanément, se dégradant en ammoniac, dioxyde de carbone et vapeur d'eau. Le dioxyde de carbone, en diffusant dans une solution contenant du chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ), entraîne ainsi la précipitation de carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ). Lors de la réaction, le dioxyde de carbone se transforme, en solution, en ions carbonates ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) et bicarbonates ( $\text{HCO}_3^-$ ) tandis que les ions ammonium entraînent l'augmentation du pH de la solution, permettant ainsi la stabilisation des ions  $\text{CO}_3^{2-}$  qui peuvent alors interagir avec les ions  $\text{Ca}^{2+}$  pour précipiter.

Pour cela, une solution de 10 mM de  $\text{CaCl}_2$  est préparée, filtrée à  $5\mu\text{m}$  et finalement utilisée pour les dilutions sériées de nos échantillons de matrice organique soluble (ASM) selon une gamme de concentration de 0 (blanc) à  $32\ \mu\text{g/mL}$ . Les solutions sont incubées dans des plaques de culture de 16 puits (Lab-Tek, Nunc/Thermo Scientific, Rochester, NY, USA), couverte d'un couvercle plastique, percé au centre de chaque puits. La plaque est ensuite placée pour trois à six jours, à température ambiante, dans un dessiccateur en présence de cristaux de bicarbonate d'ammonium. Après cette incubation, les puits sont précautionneusement vidés de leur contenu à l'aide d'une pointe de seringue à bout franc connectée à une pompe à vide. La plaque est finalement désassemblée et la lame en verre est observée au microscope électronique à balayage, en mode électrons rétrodiffusés (MEB de paillasse Hitachi TM-1000).

### **Spectroscopie à Infra-rouge par transformée de Fourier** **(FT-IR)**

L'analyse par spectroscopie infrarouge (IR) permet, de manière non destructive, la caractérisation des principaux groupement chimiques qui composent un échantillon. Pour cela, l'échantillon est soumis à un rayonnement infrarouge, permettant alors de mesurer les longueurs d'ondes absorbées et leurs intensités dans le domaine infrarouge du spectre de la lumière.

Les spectres d'absorption sont directement mesurés à sec sur les échantillons qui consistent soit, en une poudre coquillière finement broyée soit, en une très faible quantité de lyophilisat de la matrice organique d'intérêt. L'acquisition se fait à l'aide d'un spectromètre Brüker Alpha (Brüker Optics Sarl, Marne la Vallée, France) équipé d'un dispositif ALPHA-P ATR (Attenuated Total Reflectance) au « Laboratoire de synthèse et électrosynthèse organométalliques » de Dijon. Les mesures spectroscopiques des infra-rouges à transformée de Fourier (FT-IR) sont acquises sur la plage 4000-375  $\text{cm}^{-1}$ , à une résolution de 4 $\text{cm}^{-1}$  et sont représentées comme la moyenne de 24 mesures successives.

## **Résonance magnétique nucléaire à l'état solide (SS-NMR)**

L'étude d'échantillons biologiques par résonance magnétique nucléaire à l'état solide (SS-NMR – *solid state nuclear magnetic resonance*) sert notamment à identifier la présence de certains composés, caractérisés par leur signature, au sein de la matrice inorganique de coquilles intactes ou bien après déminéralisation (*i.e.* matrice organique insoluble, AIM). L'étude de la rotation à l'angle magique pour le  $^{13}\text{C}$  ( $^{13}\text{C}$  MAS-NMR) permettrait notamment de quantifier, de manière relative, les différents constituants de l'échantillon, qu'il s'agisse d'une coquille intacte ou bien d'un extrait partiel de celle-ci (AIM). Un autre avantage réside en la possibilité d'identifier les formes structurales de la matrice inorganique calcaire (cristalline ou amorphe) et de ses interactions avec les matières bioorganiques.

Les mesures de résonance magnétique nucléaire (NMR, en anglais) par rotation à l'angle magique (Magical Angle Spinning)  $^{13}\text{C}$  et  $^{31}\text{P}$  sont réalisées à l'aide d'un spectromètre NMR à semi-conducteurs Brüker AVANCE III à 300 MHz, en utilisant une sonde RMN MAS à triple résonance de 4 mm avec des rotors en zircon, à l'institut de nanotechnologie Technion d'Israël par Asher Schmidt et Ira Ben Shir.

## Protéomique

L'objectif de la protéomique est l'identification des protéines contenues au sein de mélanges complexes, après leur digestion enzymatique et l'analyse des peptides résultants, ionisés, par spectrométrie de masse en tandem (MS-MS). La signature spectrale de chacun d'eux (la masse de l'ion parent et celles des ions fils) est comparée à celle de peptides issus de plusieurs bases de données, à l'aide de logiciels tel que Mascot. Un tel procédé permet alors de reconstituer le contenu protéique d'un échantillon donné. Ce type d'analyse est qualitative puisqu'on n'obtient pas la quantité de chaque protéine identifiée, mais seulement sa présence ou son absence.

La première étape consiste à faire migrer les échantillons sur 1 cm, dans le gel de séparation d'un gel d'acrylamide à 12%, coloré au bleu de Coomassie colloïdal, afin de "nettoyer" les échantillons (les débarrasser d'éventuelles traces de sels). Les bandes de gel de 1 cm sont ensuite extraites puis digérées, le plus souvent à l'aide de la trypsine, une enzyme qui a la spécificité de cliver les protéines uniquement après les résidus lysine et arginine. Préalablement, les morceaux de gel sont décolorés à deux reprises (via un mélange de 100 mM de bicarbonate d'ammonium (ABC) et de 50% (v/v) acétonitrile (ACN)) pendant 30 minutes à 22°C puis déshydratés en utilisant une solution de 100% acétonitrile pendant 15 minutes avant de réduire les ponts disulfures à l'aide d'une solution à 25 mM de ABC contenant 10 mM de DTT (dithiothréitol) pendant 1 heure à 56°C et de les alkyler avec une solution à 55 mM d'iodoacétamide dilué dans 25 mM de bicarbonate d'ammonium pendant 30 minutes dans l'obscurité à 22°C. Les morceaux de gel sont ensuite lavés à deux reprises avec 25 mM de ABC et déshydratés à deux reprises pendant 20 minutes dans de l'ACN 100% avant d'être incubés avec de la trypsine modifiée (Promega, USA ; 12,5 ng/μl dans 40 mM ABC avec 10% ACN, pH 8) durant la nuit à 37°C. Après digestion, les peptides sont extraits du gel à deux reprises, d'abord à l'aide d'un mélange de 50% ACN avec 5% d'acide formique (FA) puis avec de l'ACN 100%-FA 5%. Les extraits sont finalement séchés en utilisant un concentrateur sous vide.

Les analyses de spectrométrie de masse en tandem sont réalisées à l'aide d'un système de séparation rapide par chromatographie liquide (RSLC) Ultimate 3000 (Thermo Fischer Scientific) relié à un spectromètre de masse hybride de type Orbitrap (Fusion Tribrid ou Q-

Exactive Plus de Thermo Fischer Scientific). Les peptides sont dissous dans 10 $\mu$ L d'ACN 10% mélangé à 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA). Un  $\mu$ l seulement est ensuite chargé et nettoyé dans une pré-colonne de phase inverse en C<sub>18</sub> (3  $\mu$ m de taille de particules, 100 Å de taille de pores, 75  $\mu$ m de diamètre interne, 2 cm de long) contenant 98% d'eau, 2% d'ACN avec 0,1% de TFA. Les peptides sont ensuite séparés dans une résine de phase inverse en C<sub>18</sub> (2  $\mu$ m de taille de particules, 100 Å de taille de pores, 75  $\mu$ m de diamètre interne, 25 cm de long) et élués en fonction de leur hydrophobicité durant une heure, selon un gradient allant de 99% d'une solution A (100% H<sub>2</sub>O avec 0,1% de FA) à 90% d'une solution B (80% ACN et 20% H<sub>2</sub>O avec 0,085% FA)

Pour le traitement spectral, le logiciel Proteome Discover 1.4 (ThermoFisher Scientific) est utilisé pour générer le fichier ".mgf" à partir du fichier brut. Ce fichier ".mgf" est finalement analysé à l'aide de la version 2.5 du logiciel Mascot (Matrix science) en interrogeant plusieurs bases de données, selon l'échantillon étudié, afin de comparer les masses expérimentales obtenues avec les masses théoriques contenues dans ces bases et faire ressortir les protéines présentes dans les échantillons.



## **Bibliographie**



- Accinni, L., Natali, P. G., Silvestrini, M., & Martino, C. De. (1983). Actin in the extracellular matrix of smooth muscle cells. An immunoelectron microscopic study. *Connective Tissue Research*, **11**, 69–78.  
DOI: 10.3109/03008208309015012
- Addadi, L., Gal, A., Faivre, D., Scheffel, A., & Weiner, S. (2016). Control of biogenic nanocrystal formation in biomineralization. *Israel Journal of Chemistry*, **56**, 227–241.  
DOI: 10.1002/ijch.201500038
- Addadi, L., Joester, D., Nudelman, F., & Weiner, S. (2006). Mollusk shell formation: a source of new concepts for understanding biomineralization processes. *Chemistry - A European Journal*, **12**, 980–987.  
DOI: 10.1002/chem.200500980
- Addadi, L., & Weiner, S. (1985). Interactions between acidic proteins and crystals: stereochemical requirements in biomineralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **82**, 4110–4114.  
DOI: 10.1073/pnas.82.12.4110
- Agbaje, O. B. A., Ben Shir, I., Zax, D. B., Schmidt, A., & Jacob, D. E. (2018). Biomacromolecules within bivalve shells: is chitin abundant? *Acta Biomaterialia*, **80**, 176–187.  
DOI: 10.1016/j.actbio.2018.09.009
- Albeck, S., Addadi, L., & Weiner, S. (1996). Regulation of calcite crystal morphology by intracrystalline acidic proteins and glycoproteins. *Connective Tissue Research*, **35**, 365–370.  
DOI: 10.3109/03008209609029213
- Allcock, A. L., Cooke, I. R., & Strugnell, J. M. (2011). What can the mitochondrial genome reveal about higher-level phylogeny of the molluscan class Cephalopoda? *Zoological Journal of the Linnean Society*, **161**, 573–586.  
DOI: 10.1111/j.1096-3642.2010.00656.x
- Allcock, A. L., Lindgren, A., & Strugnell, J. M. (2015). The contribution of molecular data to our understanding of cephalopod evolution and systematics: a review. *Journal of Natural History*, **49**, 1373–1421.  
DOI: 10.1080/00222933.2013.825342
- Appellöf, A. (1893). Die schalen von *Sepia*, *Spirula* und *Nautilus* studien über den Bau und das Wachstum. *Kunliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar, Stockholm*, **25**, 1–106.
- Arivalagan, J., Yarra, T., Marie, B., Sleight, V. A., Duvernois-Berthet, E., Clark, M. S., Marie, A., & Berland, S. (2017). Insights from the shell proteome: biomineralization to adaptation. *Molecular Biology and Evolution*, **34**, 66–77.  
DOI: 10.1093/molbev/msw219
- Arkhipkin, A. I., & Bizikov, V. A. (2000). Role of the statolith in functioning of the acceleration receptor system in squids and sepioids. *Journal of Zoology*, **250**, 31–55.  
DOI: 10.1017/S0952836900001035
- Arkhipkin, A. I., Bizikov, V. A., Doubleday, Z. A., Laptikhovsky, V. V., Lishchenko, F. V.,

Perales-Raya, C., & Hollyman, P. R. (2018). Techniques for estimating the age and growth of molluscs: Cephalopoda. *Journal of Shellfish Research*, **37**, 783–792.  
DOI: 10.2983/035.037.0409

Audino, J. A., Marian, J. E. A. R., Wanninger, A., & Lopes, S. G. B. C. (2015). Mantle margin morphogenesis in *Nodipecten nodosus* (Mollusca: Bivalvia): new insights into the development and the roles of bivalve pallial folds. *BMC Developmental Biology*, **15**, 15–22.  
DOI: 10.1186/s12861-015-0074-9

**- B -**

Bahn, S. Y., Jo, B. H., Hwang, B. H., Choi, Y. S., & Cha, H. J. (2015). Role of Pif97 in nacre biomineralization: in vitro characterization of recombinant Pif97 as a framework protein for the association of organic-inorganic layers in nacre. *Crystal Growth and Design*, **15**, 3666–3673.  
DOI: 10.1021/acs.cgd.5b00275

Balmain, J., Hannover, B., & Lopez, E. (1999). Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and X-ray diffraction analyses and organic matrix during heating of mother of pearl (nacre) from the shell of the mollusk *Pinctada maxima*. *Journal of Biomedical Materials Research*, **48**, 749–754.

Bandel, K. (1990). Cephalopod shell structure and general mechanisms of shell formation. In J. G. Carter, ed., *Skeletal Biomineralization: Patterns, Processes and Evolutionary Trends*, Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 97–115.  
DOI: 10.1007/978-1-4899-5740-5\_8

Bandel, K., & Boletzky, S. (1979). A comparative study of the structure, development and morphological relationships of chambered cephalopod shells. *Veliger*, **21**, 313–354.

Barord, G. J., & Boyle, P. (2019). Cephalopods. In J. K. Cochran, H. J. Bokuniewicz, & P. L. Yager, eds., *Encyclopedia of Ocean Sciences, Vol. I Marine Biogeochemistry*, Academic Press, pp. 516–522.  
DOI: 10.1016/B978-0-12-409548-9.11604-5

Barskov, I. S., Boiko, M. S., Konovalova, V. A., Leonova, T. B., & Nikolaeva, S. V. (2008). Cephalopods in the marine ecosystems of the Paleozoic. *Paleontological Journal*, **42**, 1167.  
DOI: 10.1134/S0031030108110014

Barskov, S. (1973). Microstructure of the skeletal layers of *Sepia* and *Spirula* compared with the shell layers of other mollusks. *Journal of Paleontology*, **3**, 285–294.

Bathurst, R. G. C. (1972). *Carbonate sediments and their diagenesis, Vol. 12*, Elsevier, Elsevier, 657p.

Beniash, E., Aizenberg, J., Addadi, L., & Weiner, S. (1997). Amorphous calcium carbonate transforms into calcite during sea urchin larval spicule growth. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **264**, 461–465.  
DOI: 10.1098/rspb.1997.0066

Bertucci, A., Tambutté, S., Supuran, C. T., Allemand, D., & Zoccola, D. (2011). A new coral carbonic anhydrase in *Stylophora pistillata*. *Marine Biotechnology*, **13**, 992–1002.  
DOI: 10.1007/s10126-011-9363-x

- Bettencourt, V., & Guerra, A. (2000). Growth increments and biomineralization process in cephalopod statoliths. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **248**, 191–205.  
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(00\)00161-1](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(00)00161-1)
- Birchall, J. D., & Thomas, N. L. (1983). On the architecture and function of cuttlefish bone. *Journal of Materials Science*, **18**, 2081–2086.  
DOI: [10.1007/BF00555001](https://doi.org/10.1007/BF00555001)
- Blank, S., Arnoldi, M., Khoshnavaz, S., Treccani, L., Kuntz, M., Mann, K., Grathwohl, G., & Fritz, M. (2003). The nacre protein perlucin nucleates growth of calcium carbonate crystals. *Journal of Microscopy*, **212**, 280–291.  
DOI: [10.1111/j.1365-2818.2003.01263.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2003.01263.x)
- Bøggild, O. B. (1930). The shell structure of the mollusks. *Det Kongelige Danske Videnskabernes Selskabs Skrifter. Naturvidenskabelig Og Matematisk Afdeling*, **9**, 231–326.
- Boletzky, S. (1974). The “larvae” of Cephalopoda: a review. *Thalassia Jugoslavica*, **10**, 45–76.
- Boletzky, S. (1983). Laboratory observations on a female *Argonauta argo* (Mollusca: Cephalopoda). *Rapports et Procès-Verbaux Des Réunions. Commission Internationale Pour l'Exploration Scientifique de La Mer Méditerranée*, **28**, 289–290.
- Boletzky, S. (1989). Early ontogeny and evolution: the cephalopod model viewed from the point of developmental morphology. *Geobios*, **22**, 67–780.  
DOI: [10.1016/S0016-6995\(89\)80008-7](https://doi.org/10.1016/S0016-6995(89)80008-7)
- Boletzky, S. (1998). Cephalopod eggs and egg masses. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, **36**, 341–372.
- Boletzky, S. (1999). Brève mise au point sur la classification des céphalopodes actuels. *Bulletin de La Société Zoologique de France*, **124**, 271–278.
- Boletzky, S. (2003). Biology of early life stages in cephalopod molluscs. *Advances in Marine Biology*, **44**, 144–204.  
DOI: [10.1016/S0065-2881\(03\)44003-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2881(03)44003-0)
- Bonnard, M. (2020). *Identification de composés valorisables présents dans la coquille de l'huître comestible Crassostrea gigas*, Thèse de 3ème cycle, Université de Montpellier, 249p.
- Bonnaud, L., Boucher-Rodoni, R., & Monnerot, M. (1997). Phylogeny of cephalopods inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **7**, 44–54.  
DOI: [10.1006/mpev.1996.0366](https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0366)
- Bonnaud, L., Lu, C. C., & Boucher-Rodoni, R. (2006). Morphological character evolution and molecular trees in sepiids (Mollusca: Cephalopoda): is the cuttlebone a robust phylogenetic marker? *Biological Journal of the Linnean Society*, **89**, 139–150.  
DOI: [10.1111/j.1095-8312.2006.00664.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2006.00664.x)
- Bouligand, Y. (1965). Sur une architecture torsadée répandue dans de nombreuses cuticules d'Arthropodes. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Séances de l'Académie Des Sciences*, **261**, 3665–3668.

- Bouligand, Y. (1972). Twisted fibrous arrangements in biological materials and cholesteric mesophases. *Tissue and Cell*, **4**, 189–217.  
DOI: 10.1016/S0040-8166(72)80042-9
- Bouligand, Y. (2004). The renewal of ideas about biomineralisations. *Comptes Rendus - Palevol*, **3**, 617–628.  
DOI: 10.1016/j.crpv.2004.07.008
- Boyle, P. (1999). Cephalopods. In T. Poole, ed., *The care and management of laboratory animals*, Vol. 2, Oxford: Oxford, Blackwell Science, pp. 115–139.
- Boyle, P., & Rodhouse, P. (2008). *Cephalopods: ecology and fisheries*, Oxford: Wiley-Blackwell, 464p.
- Brusca, R. C., Moore, W., & Shuster, S. M. (2016). *Invertebrates, third edition*, Sunderland, Massachusetts U.S.A.: Sinauer Associates, Inc., 1104p.
- Bruun, A. F. (1943). The biology of *Spirula spirula* (L.). *Dana Report*, **24**, 1–46.

- C -

- Čadež, V., Škapin, S. D., Leonardi, A., Križaj, I., Kazazić, S., Salopek-Sondi, B., & Sondi, I. (2017). Formation and morphogenesis of a cuttlebone's aragonite biomineral structures for the common cuttlefish (*Sepia officinalis*) on the nanoscale: revisited. *Journal of Colloid and Interface Science*, **508**, 95–104.  
DOI: 10.1016/j.jcis.2017.08.028
- Campbell, K., MacLennan, D., & Jorgensen, A. O. (1983). Staining of the Ca<sup>2+</sup>-binding proteins, calsequestrin, calmodulin, troponin C, and S-100, with the cationic carbocyanine dye “Stains-all.” *The Journal of Biological Chemistry*, **258**, 11267–11273.
- Cárdenas, G., Cabrera, G., Taboada, E., & Miranda, S. P. (2004). Chitin characterization by SEM, FTIR, XRD, and <sup>13</sup>C cross polarization/mass angle spinning NMR. *Journal of Applied Polymer Science*, **93**, 1876–1885.  
DOI: <https://doi.org/10.1002/app.20647>
- Carter, J. G., & Clark, G. R. (1985). Classification and phylogenetic significance of molluscan shell microstructure. *Notes for a Short Course: Studies in Geology*, **13**, 50–71.  
DOI: 10.1017/S0271164800001093
- Cartwright, J. H. E., Checa, A. G., Gale, J. D., Gebauer, D., & Sainz-Díaz, C. I. (2012). Calcium carbonate polyamorphism and its role in biomineralization: how many amorphous calcium carbonates are there? *Angewandte Chemie International Edition*, **51**, 11960–11970.  
DOI: 10.1002/anie.201203125
- Checa, A. (2000). A new model for periostracum and shell formation in Unionidae (Bivalvia, Mollusca). *Tissue and Cell*, **32**, 405–416.  
DOI: 10.1054/tice.2000.0129
- Checa, A. G., Cartwright, J. H. E., Sánchez-Almazo, I., Andrade, J. P., & Ruiz-Raya, F. (2015). The cuttlefish *Sepia officinalis* (Sepiidae, Cephalopoda) constructs cuttlebone from a liquid-crystal precursor. *Scientific Reports*, **5**, 1–13.  
DOI: 10.1038/srep11513
- Checa, A. G., Jiménez-López, C., Rodríguez-Navarro, A., & Machado, J. P. (2007).

- Precipitation of aragonite by calcitic bivalves in Mg-enriched marine waters. *Marine Biology*, **150**, 819–827.  
DOI: 10.1007/s00227-006-0411-4
- Checa, A. G., Salas, C., Harper, E. M., & De Dios Bueno-Pérez, J. (2014). Early stage biomineralization in the periostracum of the “living fossil” bivalve *Neotrigonia*. *PLoS ONE*, **9**, e90033.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0090033
- Cheng, T. C. (1984). A classification of molluscan hemocytes based on functional evidences. In T. C. Cheng, ed., *Invertebrate blood. Comparative pathobiology, vol 6.*, Springer, Boston, MA, pp. 111–146.  
DOI: 10.1007/978-1-4684-4766-8\_5
- Clarke, M. R. (1966). A review of the systematics and ecology of oceanic squids. *Advances in Marine Biology*, **4**, 91–300.  
DOI: 10.1016/S0065-2881(08)60314-4
- Clarke, M. R. (1969). Cephalopoda collected on the SOND Cruise. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **49**, 961–976.  
DOI: 10.1017/S0025315400038042
- Clarke, M. R. (1970). Growth and development of *Spirula spirula*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **50**, 53–64.  
DOI: 10.1017/S002531540000059X
- Clarke, M. R. (1978). The cephalopod statolith— an introduction to its form. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **58**, 701–712.
- Cobabe, E. A., & Pratt, L. M. (1995). Molecular and isotopic compositions of lipids in bivalve shells: a new prospect for molecular paleontology. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **59**, 87–95.  
DOI: 10.1016/0016-7037(94)00374-U
- Cohen, P. A., & Knoll, A. H. (2012). Scale microfossils from the mid-Neoproterozoic Fifteenmile Group, Yukon Territory. *Journal of Paleontology*, **86**, 775–800.  
DOI: 10.1666/11-138.1
- Cohen, P. A., Schopf, J. W., Butterfield, N. J., Kudryavtsev, A. B., & Macdonald, F. A. (2011). Phosphate biomineralization in mid-neoproterozoic protists. *Geology*, **39**, 539–542.  
DOI: 10.1130/G31833.1
- Cölfen, H. (2007). Bio-inspired mineralization using hydrophilic polymers. In K. Naka, ed., *Biomineralization II: mineralization using synthetic polymers and templates*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 1–77.  
DOI: 10.1007/128\_056
- Crenshaw, M. A., & Ristedt, H. (1976). The histochemical localization of reactive groups in septal nacre from *Nautilus pompilius*. In N. Watabe & K. M. Wilbur, eds., *The mechanisms of mineralization in the invertebrates and plants*, University of South Carolina Press, Columbia, pp. 355–367.
- Crick, R. E., & Mann, K. O. (2010). Biomineralization and systematic implications. In W. B. Saunders & N. H. Landman, eds., *Nautilus: the biology and paleobiology of a living*

*fossil, reprint with additions*, Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 115–134.  
DOI: 10.1007/978-90-481-3299-7\_8

Cuif, J., Dauphin, Y., Denis, A., Gaspard, D., & Keller, J. (1983). Etude des caractéristiques de la phase minérale dans les structures prismatiques du test de quelques mollusques. *Bulletin Du Muséum National d'histoire Naturelle. Section A, Zoologie, Biologie et Écologie Animales*, **5**, 679–717.

Cuvier, M. (1829). Mémoires sur un ver parasite d'un nouveau genre (*Hectocotylus octopodis*). *Annales Des Sciences Naturelles*, **18**, 147–156.

## - D -

Dalbeck, P., & Cusack, M. (2006). Crystallography (electron backscatter diffraction) and chemistry (electron probe microanalysis) of the avian eggshell. *Crystal Growth and Design*, **6**, 2558–2562.  
DOI: 10.1021/cg068008t

Dan, S., Hamasaki, K., Yamashita, T., Oka, M., & Kitada, S. (2012). Age-based life cycle traits of the broadclub cuttlefish *Sepia latimanus* confirmed through release-recapture experiments. *Aquatic Biology*, **17**, 181–195.  
DOI: 10.3354/ab00474

Dauphin, Y. (1976). Microstructure des coquilles de céphalopodes. I. *Spirula spirula* L. (Dibranchiata, Decapoda). *Bulletin Du Muséum National d'histoire Naturelle 3ème Série, Sciences de La Terre* **54**, **382**, 197–238.

Dauphin, Y. (1977). Microstructure et flottabilité chez la spirule (Cephalopoda). *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Séances de l'Académie Des Sciences Paris D*, **284**, 2483–2485.

Dauphin, Y. (1979). Organisation microstructurale de l'os de seiche (Cephalopoda - Dibranchiata). *Comptes Rendus de l'Académie Des Sciences de Paris*, **288**, 619–622.

Dauphin, Y. (1981). Microstructures des coquilles de céphalopodes II - la seiche (Mollusca, Coleoidea). *Palaeontographica Abteilung A*, **176**, 35–51.

Dauphin, Y. (2006). Structure and composition of the septal nacreous layer of *Nautilus macromphalus* L. (Mollusca, Cephalopoda). *Zoology*, **109**, 85–95.  
DOI: 10.1016/j.zool.2005.08.005

Dauphin, Y., Cuif, J.-P., Mutvei, H., & Denis, A. (1989). Mineralogy, chemistry and ultrastructure of the external shell layer in ten species of *Haliotis* with reference to *Haliotis tuberculata* (Mollusca: Archaeogastropoda). *Bulletin of the Geological Institutions of the University of Uppsala*, **15**, 7–38.

Dauphin, Y., & Marin, F. (1995). The compositional analysis of recent cephalopod shell carbohydrates by Fourier transform infrared spectrometry and high performance anion exchange-pulsed amperometric detection. *Experientia*, **51**, 278–283.  
DOI: 10.1007/BF01931112

De Yoreo, J. J. (2017). A holistic view of nucleation and self-assembly. *Materials Research Society Bulletin*, **42**, 525–536.  
DOI: 10.1557/mrs.2017.143

De Yoreo, J. J., Gilbert, P. U. P. A., Sommerdijk, N. A. J. M., Penn, R. L., Whitlam, S.,

- Joester, D., Zhang, H., Rimer, J. D., Navrotsky, A., Banfield, J. F., Wallace, A. F., Michel, F. M., Meldrum, F. C., Cölfen, H., & Dove, P. M. (2015). Crystallization by particle attachment in synthetic, biogenic, and geologic environments. *Science*, **349**, aaa6760.  
DOI: 10.1126/science.aaa6760
- Défarge, C. (2011). Organomineralization. In J. Reitner & V. Thiel, eds., *Encyclopedia of Geobiology. Encyclopedia of Earth Sciences Series*, Springer, Dordrecht, pp. 697–701.  
DOI: 10.1007/978-1-4020-9212-1\_159
- Défarge, C., & Trichet, J. (1995). From biominerals to ‘organominerals’: the example of the modern lacustrine calcareous stromatolites from Polynesian atolls. *Proceedings of the 7th International Symposium on Biomineralization. Bulletin de l’Institut Océanographique de Monaco*, **14**, 265–271.
- Degens, E. T., Spencer, D. W., & Parker, R. H. (1967a). Amino-acids and amino-sugars in calcified tissues of portunid crabs. *Nature*, **216**, 601–603.  
DOI: 10.1038/216601a0
- Degens, E. T., Spencer, D. W., & Parker, R. H. (1967b). Paleobiochemistry of molluscan shell proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **20**, 553–579.  
DOI: 10.1016/0010-406X(67)90269-1
- Denton, E. J., & Gilpin-Brown, J. B. (1961). The buoyancy of the cuttlefish, *Sepia Officinalis* (L.). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **41**, 319–342.  
DOI: 10.1017/S0025315400023948
- Denton, E. J., Gilpin-Brown, J. B., & Howarth, J. V. (1967). On the buoyancy of *Spirula spirula*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **47**, 181–191.  
DOI: 10.1017/S0025315400033658
- Dgebuadze, P. Y., Fedosov, A. E., & Kantor, Y. I. (2012). Host specificity of parasitic gastropods of the genus *Annulobalcis* Habe, 1965 (Mollusca, Gastropoda, Eulimidae) from crinoids in Vietnam, with descriptions of four new species. *Zoosystema*, **34**, 139–155.  
DOI: 10.5252/z2012n1a6
- Dobberschütz, S., Nielsen, M. R., Sand, K. K., Civioc, R., Bovet, N., Stipp, S. L. S., & Andersson, M. P. (2018). The mechanisms of crystal growth inhibition by organic and inorganic inhibitors. *Nature Communications*, **9**, 1–6.  
DOI: 10.1038/s41467-018-04022-0
- Doguzhaeva, L. (1996). Two early Cretaceous spirulid coleoids of the north-western Caucasus: their shell ultrastructure and evolutionary implications. *Palaeontology*, **39**, 681–707.
- Doguzhaeva, L. A. (2000). The evolutionary morphology of siphonal tube, in Spirulida (Cephalopoda, Coleoidea). *Revue de Paleobiologie*, **19**, 83–94.
- Doguzhaeva, L. A., Mapes, R. H., & Mutvei, H. (1999). A late carboniferous spirulid coleoid from the southern mid-continent (USA). In F. Olóriz & F. Rodríguez-Tovar, eds., *Advancing Research on Living and Fossil Cephalopods*, New York, NY: Springer, pp. 47–57.  
DOI: 10.1007/978-1-4615-4837-9\_5

- Donoghue, P. C. J., & Sansom, I. J. (2002). Origin and early evolution of vertebrate skeletonization. *Microscopy Research and Technique*, **59**, 352–372.  
DOI: 10.1002/jemt.10217
- Donovan, D. T. (1977). Evolution of the dibranchiate Cephalopoda. *In Symposia of the Zoological Society of London*, pp. 15–48.
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, **346**, 1258096.  
DOI: 10.1126/science.1258096
- Dreyfuss, G., & Rondelaud, D. (2011). Molluscs in the transmission of human and veterinary helminthiasis. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, **164**, 13–20.
- Du Sel, G. P., Blanc, A., & Daguzan, J. (2000). The diet of the cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca: Cephalopoda) during its life cycle in the Northern Bay of Biscay (France). *Aquatic Sciences*, **62**, 167–178.  
DOI: 10.1007/PL00001329
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, **28**, 350–356.  
DOI: 10.1021/ac60111a017
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1951). A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature*, pp. 167–167.  
DOI: 10.1038/168167a0
- Dupraz, C., Reid, R. P., Braissant, O., Decho, A. W., Norman, R. S., & Visscher, P. T. (2009). Processes of carbonate precipitation in modern microbial mats. *Earth-Science Reviews*, **96**, 141–162.  
DOI: 10.1016/j.earscirev.2008.10.005

- E -

- Engeser, T., & Bandel, K. (1988). Phylogenetic classification of coleoid cephalopods. *In* J. Wiedman & J. Kullman, eds., *Cephalopods - Present and Past*, Schweitzerbart Stuttgart, pp. 105–115.
- Erben, H. K. (1972). Über die bildung und das wachstum von perlmutt. *Biomineralization*, **4**, 15–46.
- Evans, J. S. (2012). Aragonite-associated biomineralization proteins are disordered and contain interactive motifs. *Bioinformatics*, **28**, 3182–3185.  
DOI: 10.1093/bioinformatics/bts604

- F -

- Falini, G., Albeck, S., Weiner, S., & Addadi, L. (1996). Control of aragonite or calcite polymorphism by mollusk shell macromolecules. *Science*, **271**, 67–69.  
DOI: 10.1126/science.271.5245.67
- Fan, W., Li, C., Wang, X., Gong, N., Xie, L., & Zhang, R. (2007). Cloning, characterization and expression analysis of calcium channel  $\beta$  subunit from pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **104**, 47–54.  
DOI: 10.1263/jbb.104.47

- Faye, L., & Chrispeels, M. J. (1988). Common antigenic determinants in the glycoproteins of plants, molluscs and insects. *Glycoconjugate Journal*, **5**, 245–256.  
DOI: 10.1007/BF01049085
- Fedonkin, M. A., & Waggoner, B. M. (1997). The late Precambrian fossil *Kimberella* is a mollusc-like bilaterian organism. *Nature*, **388**, 868–871.  
DOI: 10.1038/42242
- Feng, D., Li, Q., Yu, H., Kong, L., & Du, S. (2017). Identification of conserved proteins from diverse shell matrix proteome in *Crassostrea gigas*: characterization of genetic bases regulating shell formation. *Scientific Reports*, **7**, 45754.  
DOI: 10.1038/srep45754
- Fernandez-Martinez, A., Lopez-Martinez, H., & Wang, D. (2017). Structural characteristics and the occurrence of polyamorphism in amorphous calcium carbonate. In A. E. S. Van Driessche, M. Kellermeier, L. G. Benning, & D. Gebauer, eds., *New perspectives on mineral nucleation and growth: from solution precursors to solid materials*, Cham, Switzerland: Springer International Publishing, pp. 77–92.  
DOI: 10.1007/978-3-319-45669-0\_4
- Finn, J. K. (2013). Taxonomy and biology of the argonauts (Cephalopoda: Argonautidae) with particular reference to Australian material. *Molluscan Research*, **33**, 143–222.  
DOI: 10.1080/13235818.2013.824854
- Finn, J. K. (2014). Family Argonautidae. In P. Jereb, C. F. . Roper, M. D. Norman, & J. K. Finn, eds., *Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of cephalopod species known to date. Volume 3. Octopods and Vampire Squids. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes.*, Rome., pp. 228–237.  
DOI: 10.1017/CBO9781107415324.004
- Finn, J. K. (2018). Recognising variability in the shells of argonauts (Cephalopoda: Argonautidae): the key to resolving the taxonomy of the family. *Memoirs of Museum Victoria*, **77**, 63–104.  
DOI: 10.24199/J.MMV.2018.77.05
- Finn, J. K., & Norman, M. D. (2010). The argonaut shell: gas-mediated buoyancy control in a pelagic octopus. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **277**, 2967–2971.  
DOI: 10.1098/rspb.2010.0155
- Florek, M., Fornal, E., Gómez-Romero, P., Zieba, E., Paszkowicz, W., Lekki, J., Nowak, J., & Kuczumow, A. (2009). Complementary microstructural and chemical analyses of *Sepia officinalis* endoskeleton. *Materials Science and Engineering C*, **29**, 1220–1226.  
DOI: 10.1016/j.msec.2008.09.040
- Fremy, E. (1855). Recherches chimiques sur les os. *Annales de Chimie et de Physique*, **43**, 47–107.
- Fuchs, D., Iba, Y., Ifrim, C., Nishimura, T., Kennedy, W. J., Keupp, H., Stinnesbeck, W., & Tanabe, K. (2013). *Longibelus* gen. nov., a new Cretaceous coleoid genus linking Belemnoidea and early Decabrachia. *Palaeontology*, **56**, 1081–1106.  
DOI: 10.1111/pala.12036
- Fuchs, D., Keupp, H., Trask, P., & Tanabe, K. (2012). Taxonomy, morphology and phylogeny of Late Cretaceous spirulid coleoids (Cephalopoda) from Greenland and

Canada. *Palaeontology*, **55**, 285–303.  
DOI: 10.1111/j.1475-4983.2011.01125.x

Fuchs, D., & Lukeneder, A. (2014). Cenozoic coleoids (Cephalopoda) from Austria – a review of Schultz’s *Catalogus Fossilium Austriae*. *Denisia*, **157**, 23–32.

- G -

Gal, A., Weiner, S., & Addadi, L. (2015). A perspective on underlying crystal growth mechanisms in biomineralization: solution mediated growth versus nanosphere particle accretion. *CrystEngComm*, **17**, 2606–2615.  
DOI: 10.1039/c4ce01474j

Gardner, L. D., Mills, D., Wiegand, A., Leavesley, D., & Elizur, A. (2011). Spatial analysis of biomineralization associated gene expression from the mantle organ of the pearl oyster *Pinctada maxima*. *BMC Genomics*, **12**, 455.  
DOI: 10.1186/1471-2164-12-455

Gautron, J., Hincke, M. T., Panheleux, M., Garcia-Ruiz, J. M., Boldicke, T., & Nys, Y. (2001). Ovotransferrin is a matrix protein of the hen eggshell membranes and basal calcified layer. *Connective Tissue Research*, **42**, 255–267.  
DOI: 10.3109/03008200109016840

Germis, G. J. B. (1972). New shelly fossils from Nama Group, South West Africa. *American Journal of Science*, **272**, 752–761.  
DOI: 10.2475/ajs.272.8.752

Gholamalalian, H., Hassani, M. J., & Hosseinipour, F. (2020). Miocene Argonautidae (Octopoda) from the Persian Gulf area and their palaeogeographic distribution. *Acta Geologica Polonica*, **70**, 135–145.  
DOI: 10.24425/agp.2019.126455

Giribet, G., & Edgecombe, G. D. (2020). *The invertebrate tree of life*, Princeton University Press, 608p.

Goffinet, G. (1969). Etude au microscope électronique de structures organisées des constituants de la conchioline de nacre du *Nautilus macromphalus* Sowerby. *Comparative Biochemistry And Physiology*, **29**, 835–839.  
DOI: 10.1016/0010-406x(69)91635-1

Goffinet, G., & Jeuniaux, C. (1979). Distribution et importance quantitative de la chitine dans les coquilles de mollusques. *Cahiers de Biologie Marine*, **20**, 341–349.

González-Vallejo, N. E. (2008). Parasitism of *Monogamus minibulla* (Olsson and McGinty, 1958) (Gastropoda: Eulimidae) on the red sea-urchin *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758) (Echinodermata: Echinometridae) on the Caribbean coast of Mexico. *Nautilus*, **122**, 178–181.

Gotliv, B. A., Kessler, N., Sumerel, J. L., Morse, D. E., Tuross, N., Addadi, L., & Weiner, S. (2005). Asprich: a novel aspartic acid-rich protein family from the prismatic shell matrix of the bivalve *Atrina rigida*. *ChemBioChem*, **6**, 304–314.  
DOI: 10.1002/cbic.200400221

Grégoire, C. (1961). Communication brève: sur la structure de la nacre septale des Spirulidæ

étudiée au microscope électronique. *Archives of Physiology and Biochemistry*, **69**, 374–377.

DOI: 10.3109/13813456109092805

Grégoire, C. (1962). On submicroscopic structure of the *Nautilus* shell. *Bulletin de l'Institut Royal Des Sciences Naturelles de Belgique*, **38**, 1–71.

Grégoire, C. (1972). Structure of the molluscan shell. In B. T. S. M. Florkin, ed., *Chemical Zoology, Vol. VII: Mollusca*, Academic Press, New York, pp. 5–101.

Grégoire, C. (2010). Ultrastructure of the *Nautilus* shell. In W. B. Saunders & N. H. Landman, eds., *Nautilus: the biology and paleobiology of a living fossil, reprinted with additions*, Plenum press, New York., pp. 463–486.

DOI: 10.1007/978-90-481-3299-7\_31

Grellet-Tinner, G., Sim, C. M., Kim, D. H., Trimby, P., Higa, A., An, S. L., Oh, H. S., Kim, T. J., & Kardjilov, N. (2011). Description of the first lithostrotian titanosaur embryo in ovo with neutron characterization and implications for lithostrotian aptian migration and dispersion. *Gondwana Research*, **20**, 621–629.

DOI: 10.1016/j.gr.2011.02.007

Guerra, A., & Castro, B. (1988). On the life cycle of *Sepia officinalis* (Cephalopoda, Sepioidea) in the ria de Vigo (NW Spain). *Cahiers de Biologie Marine*, **29**, 395–405.

## - H -

Halanych, K. M. (2004). The new view of animal phylogeny. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **35**, 229–256.

DOI: 10.1146/annurev.ecolsys.35.112202.130124

Hanlon, R. T., & Messenger, J. B. (1988). Adaptive coloration in young cuttlefish (*Sepia officinalis* L.): the morphology and development of body patterns and their relation to behaviour. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, **320**, 437–487.

DOI: 10.1098/rstb.1988.0087

Hanlon, R., Vecchione, M., & Allcock, L. (2018). *Octopus, squid, and cuttlefish: a visual, scientific guide to the Ocean's most advanced invertebrates*, University of Chicago Press, 224p.

Haring, E., Kruckenhauser, L., & Lukeneder, A. (2012). New DNA sequence data on the enigmatic *Spirula spirula* (Linnaeus, 1758)(Decabrachia, suborder Spirulina). *Annalen Des Naturhistorischen Museums in Wien. Serie B Für Botanik Und Zoologie*, **113**, 37–48.

Hattan, S. J., Laue, T. M., & Chasteen, N. D. (2001). Purification and characterization of a novel calcium-binding protein from the extrapallial fluid of the mollusc *Mytilus edulis*. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 4461–4468.

DOI: 10.1074/jbc.M006803200

Hayward, B. W. (1976). *Spirula* (sepioidea: Cephalopoda) from the lower miocene of kaipara harbour, New Zealand. *New Zealand Journal of Geology and Geophysics*, **19**, 145–147.

DOI: 10.1080/00288306.1976.10423557

Herlitze, I., Marie, B., Marin, F., & Jackson, D. J. (2018). Molecular modularity and asymmetry of the molluscan mantle revealed by a gene expression atlas. *GigaScience*, **7**,

giy056.

DOI: 10.1093/gigascience/giy056

Herring, P. J., Clarke, M. R., Boletzky, S., & Ryan, K. P. (1981). The light organs of *Sepiolo atlantica* and *Spirula spirula* (mollusca: Cephalopoda): bacterial and intrinsic systems in the order Sepioidea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **61**, 901–916.

DOI: 10.1017/S0025315400023043

Holliday, L. S., de Faria, L. P., & Rody, W. J. (2020). Actin and actin-associated proteins in extracellular vesicles shed by osteoclasts. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**, 158–177.

DOI: 10.3390/ijms21010158

Holmes, W. (1940). The colour changes and colour patterns of *Sepia officinalis* L. *Proceedings of the Zoological Society of London*, **110 A**, 17–35.

DOI: 10.1111/j.1469-7998.1940.tb08457.x

Huan, P., Liu, G., Wang, H., & Liu, B. (2013). Identification of a tyrosinase gene potentially involved in early larval shell biogenesis of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Development Genes and Evolution*, **223**, 389–394.

DOI: 10.1007/s00427-013-0450-z

Huang, J., Zhang, C., Ma, Z., Xie, L., & Zhang, R. (2007). A novel extracellular EF-hand protein involved in the shell formation of pearl oyster. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, **1770**, 1037–1044.

DOI: 10.1016/j.bbagen.2007.03.006

Hughes-Brock, H. (1999). Mycenaean beads: dender and social contexts. *Oxford Journal of Archaeology*, **18**, 277–296.

DOI: 10.1111/1468-0092.00084

Hughes, A. L., & Friedman, R. (2014). Evolutionary diversification of the vertebrate transferrin multi-gene family. *Immunogenetics*, **66**, 651–661.

DOI: 10.1007/s00251-014-0798-x

Hunt, S., & Nixon, M. (1981). A comparative study of protein composition in the chitin-protein complexes of the beak, pen, sucker disc, radula and oesophageal cuticle of cephalopods. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry and Molecular Biology*, **68**, 535–546.

DOI: 10.1016/0305-0491(81)90071-7

Hunt, S., & Oates, K. (1984). Chitin helicoids accompany protein helicoids in the periostracum of a whelk, *Buccinum*. *Tissue and Cell*, **16**, 565–575.

DOI: 10.1016/0040-8166(84)90031-4

- I -

Inoue, K., Takeuchi, Y., Miki, D., & Odo, S. (1995). Mussel adhesive plaque protein gene is a novel member of epidermal growth factor-like gene family. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 6698–6701.

DOI: 10.1074/jbc.270.12.6698

Isaji, S. (1993). Formation of organic sheets in the inner shell layer of *Geloina* (Bivalvia: Corbiculidae): an adaptive response to shell dissolution. *The Veliger*, **36**, 166–173.

- J -

- Jackson, D. J., Mann, K., Häussermann, V., Schilhabel, M. B., Lüter, C., Griesshaber, E., Schmahl, W., & Wörheide, G. (2015). The *Magellania venosa* biomineralizing proteome: a window into brachiopod shell evolution. *Genome Biology and Evolution*, **7**, 1349–1362.  
DOI: 10.1093/gbe/evv074
- Jackson, D. J., McDougall, C., Green, K., Simpson, F., Wörheide, G., & Degnan, B. M. (2006). A rapidly evolving secretome builds and patterns a sea shell. *BMC Biology*, **4**, 40.  
DOI: 10.1186/1741-7007-4-40
- Jackson, D. J., McDougall, C., Woodcroft, B., Moase, P., Rose, R. A., Kube, M., Reinhardt, R., Rokhsar, D. S., Montagnani, C., Joubert, C., Piquemal, D., & Degnan, B. M. (2010). Parallel evolution of nacre building gene sets in molluscs. *Molecular Biology and Evolution*, **27**, 591–608.  
DOI: 10.1093/molbev/msp278
- Jackson, D. J., Wörheide, G., & Degnan, B. M. (2007). Dynamic expression of ancient and novel molluscan shell genes during ecological transitions. *BMC Evolutionary Biology*, **7**, 1–17.  
DOI: 10.1186/1471-2148-7-160
- Jereb, P., Allcock, A. L., Lefkaditou, E., Piatkowski, U., Hastie, L. C., & Pierce, G. J. (Eds.). (2015). *Cephalopod biology and fisheries in Europe: II. Species Accounts*, Vol. 325, ICES Cooperative Research Report, 360p.
- Jolly, C., Berland, S., Milet, C., Borzeix, S., Lopez, E., & Doumenc, D. (2004). Zona localization of shell matrix proteins in mantle of *Haliotis tuberculata* (Mollusca, Gastropoda). *Marine Biotechnology*, **6**, 541–551.  
DOI: 10.1007/s10126-004-3129-7

- K -

- Kalmar, L., Homola, D., Varga, G., & Tompa, P. (2012). Structural disorder in proteins brings order to crystal growth in biomineralization. *Bone*, **51**, 528–534.  
DOI: 10.1016/j.bone.2012.05.009
- Kamat, S., Su, X., Ballarini, R., & Heuer, A. H. (2000). Structural basis for the fracture toughness of the shell of the conch *Strombus gigas*. *Nature*, **405**, 1036–1040.  
DOI: 10.1038/35016535
- Kanold, J. M., Guichard, N., Immel, F., Plasseraud, L., Corneillat, M., Alcaraz, G., Brümmer, F., & Marin, F. (2015). Spine and test skeletal matrices of the Mediterranean sea urchin *Arbacia lixula* - A comparative characterization of their sugar signature. *FEBS Journal*, **282**, 1891–1905.  
DOI: 10.1111/febs.13242
- Kapitany, R. A., & Zebrowski, E. J. (1973). A high resolution PAS stain for polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, **56**, 361–369.  
DOI: 10.1016/0003-2697(73)90202-9
- Katti, K. S., & Katti, D. R. (2006). Why is nacre so tough and strong? *Materials Science and Engineering: C*, **26**, 1317–1324.

DOI: 10.1016/J.MSEC.2005.08.013

Keith, J., Stockwell, S., Ball, D., Remillard, K., Kaplan, D., Thannhauser, T., & Sherwood, R. (1993). Comparative analysis of macromolecules in mollusc shells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **105**, 487–496.

DOI: 10.1016/0305-0491(93)90078-J

Kelman, E. J., Baddeley, R. J., Shohet, A. J., & Osorio, D. (2007). Perception of visual texture and the expression of disruptive camouflage by the cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **274**, 1369–1375.

DOI: 10.1098/rspb.2007.0240

Khromov, D. N. (1987). System and phylogeny of the cuttlefish family Sepiidae (Cephalopoda). *Zoologicheskii Zhurnal*, **66**, 1164–1176.

Khromov, D. N. (1998). Distribution patterns of Sepiidae. *Smithsonian Contribution to Zoology*, **586**, 191–206.

Killian, C. E., & Wilt, F. H. (1996). Characterization of the proteins comprising the integral matrix of *Strongylocentrotus purpuratus* embryonic spicules. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 9150–9159.

DOI: 10.1074/jbc.271.15.9150

Kim, I. W., Collino, S., Morse, D. E., & Evans, J. S. (2006). A crystal modulating protein from molluscan nacre that limits the growth of calcite in vitro. *Crystal Growth and Design*, **6**, 1078–1082.

DOI: 10.1021/cg060056q

Klug, C., Meyer, E. P., Richter, U., & Korn, D. (2008). Soft-tissue imprints in fossil and recent cephalopod septa and septum formation. *Lethaia*, **41**, 477–492.

DOI: 10.1111/j.1502-3931.2008.00100.x

Kniprath, E. (1981). Ontogeny of the molluscan shell field: a review. *Zoologica Scripta*, **10**, 61–79.

DOI: 10.1111/j.1463-6409.1981.tb00485.x

Knoll, A. H. (2003). Biomineralization and evolutionary history. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, **54**, 329–356.

DOI: 10.2113/0540329

Kobayashi, I. (1971). Internal microstructure of the shell of *Argonauta argo*. *Venus*, **30**, 103–111.

DOI: 10.18941/venusjjm.30.3\_103

Kobayashi, T. (1954). *Izumonauta*, a new genus of the Argonautinae, with a note on their rare but gregarious fossil occurrence. *Japanese Journal of Geology and Geography Transactions*, **25**, 21–34.

Kocot, K. M., Aguilera, F., McDougall, C., Jackson, D. J., & Degnan, B. M. (2016a). Sea shell diversity and rapidly evolving secretomes: insights into the evolution of biomineralization. *Frontiers in Zoology*, **13**, 23.

DOI: 10.1186/s12983-016-0155-z

Kocot, K. M., McDougal, C., & Degnan, B. M. (2016b). Developing perspectives on molluscan shells, Part 1: introduction and molecular biology. In S. Saleuddin & S.

Mukai, eds., *Physiology of Molluscs: A Collection of Selected Reviews*, Vol. 1, Waretown, NJ: Apple Academic Press, pp. 1–41.  
DOI: 10.1201/9781315207483

Kono, M., Hayashi, N., & Samata, T. (2000). Molecular mechanism of the nacreous layer formation in *Pinctada maxima*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **269**, 213–216.  
DOI: 10.1006/bbrc.2000.2274

Kröger, B., Vinther, J., & Fuchs, D. (2011). Cephalopod origin and evolution: a congruent picture emerging from fossils, development and molecules: extant cephalopods are younger than previously realised and were under major selection to become agile, shell-less predators. *BioEssays*, **33**, 602–613.  
DOI: 10.1002/bies.201100001

- L -

Lambert, L. A., Perri, H., & Meehan, T. J. (2005). Evolution of duplications in the transferrin family of proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **140**, 11–25.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.09.012>

Laptikhovskiy, V., & Salman, A. (2003). On reproductive strategies of the epipelagic octopods of the superfamily Argonautoidea (Cephalopoda: Octopoda). *Marine Biology*, **142**, 321–326.  
DOI: 10.1007/s00227-002-0959-6

Le Goff, C., Ganot, P., Zoccola, D., Caminiti-Segonds, N., Allemand, D., & Tambutté, S. (2016). Carbonic anhydrases in cnidarians: novel perspectives from the octocorallian *Corallium rubrum*. *PLoS ONE*, **11**, e0160368.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0160368

Le Goff, R., & Daguzan, J. (1991). Growth and life cycles of the cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca: Cephalopoda) in South Brittany (France). *Bulletin of Marine Science*, **49**, 341–348.

Le Pabic, C., Marie, A., Marie, B., Percot, A., Bonnaud-Ponticelli, L., Lopez, P. J., & Luquet, G. (2017). First proteomic analyses of the dorsal and ventral parts of the *Sepia officinalis* cuttlebone. *Journal of Proteomics*, **150**, 63–73.  
DOI: 10.1016/j.jprot.2016.08.015

Le Pabic, C. Le, Rousseau, M., Bonnaud-Ponticelli, L., & Boletzky, S. (2016). Overview of the shell development of the common cuttlefish *Sepia officinalis* during early-life stages. *Vie et Milieu*, **66**, 35–42.

Le Roy, N., Jackson, D. J., Marie, B., Ramos-Silva, P., & Marin, F. (2014). The evolution of metazoan  $\alpha$ -carbonic anhydrases and their roles in calcium carbonate biomineralization. *Frontiers in Zoology*, **11**, 75.  
DOI: 10.1186/s12983-014-0075-8

Le Roy, N., Marie, B., Gaume, B., Guichard, N., Delgado, S., Zanella-Cléon, I., Becchi, M., Auzoux-Bordenave, S., Sire, J.-Y., & Marin, F. (2012). Identification of two carbonic anhydrases in the mantle of the european abalone *Haliotis tuberculata* (Gastropoda, Haliotidae): phylogenetic implications. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, **318**, 353–367.

DOI: 10.1002/jez.b.22452

- Lecointre, G., & Le Guyader, H. (2001). *Classification phylogénétique du vivant*. 3<sup>éd</sup>, Bertin, Paris: France, 560p.
- Lemanis, R., Stier, D., Zlotnikov, I., Zaslansky, P., & Fuchs, D. (2020). The role of mural mechanics on cephalopod palaeoecology. *Journal of the Royal Society, Interface*, **17**, 20200009.  
DOI: 10.1098/rsif.2020.0009
- Lindgren, A. R., & Anderson, F. E. (2018). Assessing the utility of transcriptome data for inferring phylogenetic relationships among coleoid cephalopods. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **118**, 330–342.  
DOI: 10.1016/j.ympev.2017.10.004
- Lindgren, A. R., Giribet, G., & Nishiguchi, M. K. (2004). A combined approach to the phylogeny of Cephalopoda (Mollusca). *Cladistics*, **20**, 454–486.  
DOI: 10.1111/j.1096-0031.2004.00032.x
- Lindgren, A. R., Pankey, M. S., Hochberg, F. G., & Oakley, T. H. (2012). A multi-gene phylogeny of Cephalopoda supports convergent morphological evolution in association with multiple habitat shifts in the marine environment. *BMC Evolutionary Biology*, **12**, 129.  
DOI: 10.1186/1471-2148-12-129
- Lindsay, D. J., Hunt, J. C., McNeil, M., Beaman, R. J., & Vecchione, M. (2020). The first in situ observation of the ram’s horn squid *Spirula spirula* turns “common knowledge” upside down. *Diversity*, **12**, 450.  
DOI: 10.3390/d12120449
- Linzmeier, B. J., Kozdon, R., Peters, S. E., & Valley, J. W. (2016). Oxygen isotope variability within *Nautilus* shell growth bands. *PLoS ONE*, **11**, 1–31.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0153890
- Livingston, B. T., Killian, C. E., Wilt, F., Cameron, A., Landrum, M. J., Ermolaeva, O., Sapojnikov, V., Maglott, D. R., Buchanan, A. M., & Etensohn, C. A. (2006). A genome-wide analysis of biomineralization-related proteins in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Developmental Biology*, **300**, 335–348.  
DOI: 10.1016/J.YDBIO.2006.07.047
- Lopes-Lima, M., Ribeiro, I., Pinto, R. A., & Machado, J. (2005). Isolation, purification and characterization of glycosaminoglycans in the fluids of the mollusc *Anodonta cygnea*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, **141**, 319–326.  
DOI: 10.1016/j.cbpb.2005.06.007
- Lowenstam, H. A. (1981). Minerals formed by organisms. *Science*, **211**, 1126–1131.  
DOI: 10.1126/science.7008198
- Lowenstam, H. A., & Margulis, L. (1980). Evolutionary prerequisites for early phanerozoic calcareous skeletons. *BioSystems*, **12**, 27–41.  
DOI: 10.1016/0303-2647(80)90036-2
- Lowenstam, H. A., & Weiner, S. (1989). *On biomineralization*, Oxford University Press, 324p.

Lukeneder, A. (2016). New size data on the enigmatic *Spirula spirula* (Decabrachia, suborder Spirulina), on a global geographic scale. *Swiss Journal of Palaeontology*, **135**, 87–99.  
DOI: 10.1007/s13358-015-0088-8

Lukeneder, A., Harzhauser, M., Müllegger, S., & Piller, W. E. (2010). Ontogeny and habitat change in Mesozoic cephalopods revealed by stable isotopes ( $\delta^{18}\text{O}$ ,  $\delta^{13}\text{C}$ ). *Earth and Planetary Science Letters*, **296**, 103–114.  
DOI: 10.1016/j.epsl.2010.04.053

- M -

Ma, Z., Huang, J., Sun, J., Wang, G., Li, C., Xie, L., & Zhang, R. (2007). A novel extrapallial fluid protein controls the morphology of nacre lamellae in the pearl oyster, *Pinctada fucata*. *Journal of Biological Chemistry*, **282**, 23253–23263.  
DOI: 10.1074/jbc.M700001200

Mangold, K., & Bidder, A. M. (1989). L'appareil digestif et la digestion. In P. P. Grassé, ed., *Traité de Zoologie: anatomie, systématique, biologie. Tome V. Fascicule 4. Céphalopodes*, Paris: Masson, pp. 321–373.

Mann, K., Siedler, F., Treccani, L., Heinemann, F., & Fritz, M. (2007). Perlinhibin, a cysteine-, histidine-, and arginine-rich miniprotein from abalone (*Haliotis laevigata*) nacre, inhibits in vitro calcium carbonate crystallization. *Biophysical Journal*, **93**, 1246–1254.  
DOI: 10.1529/biophysj.106.100636

Mann, K., Weiss, I. M., André, S., Gabius, H. J., & Fritz, M. (2000). The amino-acid sequence of the abalone (*Haliotis laevigata*) nacre protein perlucin: detection of a functional C-type lectin domain with galactose/mannose specificity. *European Journal of Biochemistry*, **267**, 5257–5264.  
DOI: 10.1046/j.1432-1327.2000.01602.x

Mann, K., Wilt, F. H., & Poustka, A. J. (2010). Proteomic analysis of sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) spicule matrix. *Proteome Science*, **8**, 33.  
DOI: 10.1186/1477-5956-8-33

Mann, S. (1983). Mineralization in biological systems. *Structure and Bonding*, **54**, 125–174.  
DOI: 10.1007/BFb0111320

Mann, S. (2001). *Biomineralization: principles and concepts in bioinorganic materials chemistry (Vol. 5)*, Oxford University Press, 198p.

Marie, B., Arivalagan, J., Mathéron, L., Bolbach, G., Berland, S., Marie, A., & Marin, F. (2017). Deep conservation of bivalve nacre proteins highlighted by shell matrix proteomics of the Unionoida *Elliptio complanata* and *Villosa lienosa*. *Journal of The Royal Society Interface*, **14**, 20160846.  
DOI: 10.1098/rsif.2016.0846

Marie, B., Jackson, D. J., Ramos-Silva, P., Zanella-Cléon, I., Guichard, N., & Marin, F. (2013). The shell-forming proteome of *Lottia gigantea* reveals both deep conservations and lineage-specific novelties. *The FEBS Journal*, **280**, 214–232.  
DOI: 10.1111/febs.12062

Marie, B., Joubert, C., Tayalé, A., Zanella-Cleón, I., Belliard, C., Piquemal, D., Cochenne-Laureau, N., Marin, F., Gueguen, Y., & Montagnani, C. (2012). Different secretory

- repertoires control the biomineralization processes of prism and nacre deposition of the pearl oyster shell. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, 20986–20991.  
DOI: 10.1073/pnas.1210552109
- Marie, B., Le Roy, N., Marie, A., Dubost, L., Milet, C., Bedouet, L., Becchi, M., Zanella-Cleon, I., Jackson, D., Degnan, B., Luquet, G., & Marin, F. (2009a). Nacre evolution: a proteomic approach. *Materials Research Society Symposium Proceedings*, **1187**, 3–8.  
DOI: 10.1557/proc-1187-kk01-03
- Marie, B., Luquet, G., Bédouet, L., Milet, C., Guichard, N., Medakovic, D., & Marin, F. (2008). Nacre calcification in the freshwater mussel *Unio pictorum*: carbonic anhydrase activity and purification of a 95 kDa calcium-binding glycoprotein. *ChemBioChem*, **9**, 2515–2523.  
DOI: 10.1002/cbic.200800159
- Marie, B., Marie, A., Jackson, D. J., Dubost, L., Degnan, B. M., Milet, C., & Marin, F. (2010a). Proteomic analysis of the organic matrix of the abalone *Haliotis asinina* calcified shell. *Proteome Science*, **8**, 54.  
DOI: 10.1186/1477-5956-8-54
- Marie, B., Marin, F., Marie, A., Bédouet, L., Dubost, L., Alcaraz, G., Milet, C., & Luquet, G. (2009b). Evolution of nacre: biochemistry and proteomics of the shell organic matrix of the cephalopod *Nautilus macromphalus*. *ChemBioChem*, **10**, 1495–1506.  
DOI: 10.1002/cbic.200900009
- Marie, B., Trinkler, N., Zanella-Cleon, I., Guichard, N., Becchi, M., Paillard, C., & Marin, F. (2011a). Proteomic identification of novel proteins from the calcifying shell matrix of the manila clam *Venerupis philippinarum*. *Marine Biotechnology*, **13**, 955–962.  
DOI: 10.1007/s10126-010-9357-0
- Marie, B., Zanella-Cléon, I., Corneillat, M., Becchi, M., Alcaraz, G., Plasseraud, L., Luquet, G., & Marin, F. (2011b). Nautilin-63, a novel acidic glycoprotein from the shell nacre of *Nautilus macromphalus*. *FEBS Journal*, **278**, 2117–2130.  
DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08129.x
- Marie, B., Zanella-Cléon, I., Le Roy, N., Becchi, M., Luquet, G., & Marin, F. (2010b). Proteomic analysis of the acid-soluble nacre matrix of the bivalve *Unio pictorum*: detection of novel carbonic anhydrase and putative protease inhibitor proteins. *ChemBioChem*, **11**, 2138–2147.  
DOI: 10.1002/cbic.201000276
- Marin, F. (2003). Molluscan shell matrix characterization by preparative SDS-PAGE. *The Scientific World Journal*, **3**, 329210.  
DOI: 10.1100/tsw.2003.30
- Marin, F. (2009). *Biominéralisation de la coquille des mollusques : origine, évolution, formation*, Mémoire d'Habilitation à Diriger des Recherches. Université de Bourgogne, Dijon, 243p.
- Marin, F. (2020). Mollusc shellomes: past, present and future. *Journal of Structural Biology*, **212**, 107583.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2020.107583>
- Marin, F., Bundeleva, I., Takeuchi, T., Immel, F., & Medakovic, D. (2016). Organic matrices

- in metazoan calcium carbonate skeletons: composition, functions, evolution. *Journal of Structural Biology*, **196**, 98–106.  
DOI: 10.1016/j.jsb.2016.04.006
- Marin, F., Corstjens, P., De Gaulejac, B., De Vrind-De Jong, E., & Westbroek, P. (2000). Mucins and molluscan calcification: molecular characterization of mucoperlin, a novel mucin-like protein from the nacreous shell layer of the fan mussel *Pinna nobilis* (Bivalvia, Pteriomorpha). *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 20667–20675.  
DOI: 10.1074/jbc.M003006200
- Marin, F., Le Roy, N., & Marie, B. (2012). The formation and mineralization of mollusk shell. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*, **4**, 1099–1125.  
DOI: 10.2741/s321
- Marin, F., Le Roy, N., Marie, B., Ramos-Silva, P., Bundeleva, I., Guichard, N., & Immel, F. (2014). Metazoan calcium carbonate biomineralizations: macroevolutionary trends – challenges for the coming decade. *Bulletin de La Société Géologique de France*, **185**, 217–232.  
DOI: 10.2113/gssgfbull.185.4.217
- Marin, F., & Luquet, G. (2007). Unusually acidic proteins in biomineralization. *Handbook of Biomineralization: Biological Aspects and Structure Formation*, **1**, 273–290.  
DOI: 10.1002/9783527619443.ch16
- Marin, F., Luquet, G., Marie, B., & Medakovic, D. (2008). Molluscan shell proteins: primary structure, origin, and evolution. *Current Topics in Developmental Biology*, **80**, 209–276.  
DOI: 10.1016/S0070-2153(07)80006-8
- Marin, F., Pokroy, B., Luquet, G., Layrolle, P., & De Groot, K. (2007). Protein mapping of calcium carbonate biominerals by immunogold. *Biomaterials*, **28**, 2368–2377.  
DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.01.029
- Márquez, F., & Ré, M. E. (2009). Morphological and chemical description of the stylets of the red octopus, *Enteroctopus megalocyathus* (Mollusca: Cephalopoda). *Molluscan Research*, **29**, 27–32.
- Marsh, M. E. E. (2003). Regulation of CaCO<sub>3</sub> formation in coccolithophores. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **136**, 743–754.  
DOI: 10.1016/S1096-4959(03)00180-5
- Martill, D. M., & Barker, M. J. (2006). A paper nautilus (Octopoda, *Argonauta*) from the Miocene Pakhna formation of Cyprus. *Palaeontology*, **49**, 1035–1041.  
DOI: 10.1111/j.1475-4983.2006.00578.x
- Marxen, J. C., & Becker, W. (2000). Calcium binding constituents of the organic shell matrix from the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **127**, 235–242.
- Marxen, J. C., Hammer, M., Gehrke, T., & Becker, W. (1998). Carbohydrates of the organic shell matrix and the shell-forming tissue of the snail *Biomphalaria glabrata* (Say). *The Biological Bulletin*, **194**, 231–240.  
DOI: 10.2307/1543052
- Marxen, J. C., Nimtz, M., Becker, W., & Mann, K. (2003). The major soluble 19.6 kDa

- protein of the organic shell matrix of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* is an N-glycosylated dermatopontin. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, **1650**, 92–98.  
DOI: 10.1016/S1570-9639(03)00203-6
- Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S. I., & Lee, Y. C. (2005). Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry*, **339**, 69–72.  
DOI: 10.1016/j.ab.2004.12.001
- Matsudaira, P. (1987). Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *Journal of Biological Chemistry*, **262**, 10035–10038.
- Matsushiro, A., Miyashita, T., Miyamoto, H., Morimoto, K., Tonomura, B., Tanaka, A., & Sato, K. (2003). Presence of protein complex is prerequisite for aragonite crystallization in the nacreous layer. *Marine Biotechnology*, **5**, 37–44.  
DOI: 10.1007/s10126-002-0048-3
- Maurer, P., & Hohenester, E. (1997). Structural and functional aspects of calcium binding in extracellular matrix proteins. *Matrix Biology*, **15**, 569–580.  
DOI: 10.1016/S0945-053X(97)90033-0
- McDougall, C., Aguilera, F., & Degnan, B. M. (2013). Rapid evolution of pearl oyster shell matrix proteins with repetitive, low-complexity domains. *Journal of The Royal Society Interface*, **10**, 20130041.  
DOI: 10.1098/rsif.2013.0041
- Meenakshi, V. R., Martin, A. W., & Wilbur, K. M. (1974). Shell repair in *Nautilus macromphalus*. *Marine Biology*, **27**, 27–35.  
DOI: 10.1007/BF00394757
- Miglioli, A., Dumollard, R., Balbi, T., Besnardeau, L., & Canesi, L. (2019). Characterization of the main steps in first shell formation in *Mytilus galloprovincialis*: possible role of tyrosinase. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **286**, 20192043.  
DOI: 10.1098/rspb.2019.2043
- Misogianes, M. J., & Chasteen, N. D. (1979). A chemical and spectral characterization of the extrapallial fluid of *Mytilus edulis*. *Analytical Biochemistry*, **100**, 324–334.  
DOI: 10.1016/0003-2697(79)90236-7
- Mitchell, P. R., Phakey, P. P., & Rachinger, W. A. (1994). Ultrastructural observations of the argonaut shell. *Scanning Microscopy*, **8**, 35–46.
- Miyamoto, H., Miyashita, T., Okushima, M., Nakano, S., Morita, T., & Matsushiro, A. (1996). A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 9657–9660.  
DOI: 10.1073/pnas.93.18.9657
- Miyamoto, H., Miyoshi, F., & Kohno, J. (2005). The carbonic anhydrase domain protein nacrein is expressed in the epithelial cells of the mantle and acts as a negative regulator in calcification in the mollusc *Pinctada fucata*. *Zoological Science*, **22**, 311–315.  
DOI: 10.2108/zsj.22.311
- Miyamoto, H., Yano, M., & Miyashita, T. (2003). Similarities in the structure of nacrein, the

- shell-matrix protein, in a bivalve and a gastropod. *Journal of Molluscan Studies*, **69**, 87–89.  
DOI: 10.1093/mollus/69.1.87
- Miyashita, T., Takagi, R., Miyamoto, H., & Matsushiro, A. (2002). Identical carbonic anhydrase contributes to nacreous or prismatic layer formation in *Pinctada fucata* (Mollusca: Bivalvia). *Veliger*, **45**, 250–255.
- Miyashita, T., Takagi, R., Okushima, M., Nakano, S., Miyamoto, H., Nishikawa, E., & Matsushiro, A. (2000). Complementary DNA cloning and characterization of Pearlin, a new class of matrix protein in the nacreous layer of oyster pearls. *Marine Biotechnology*, **2**, 409–418.  
DOI: 10.1007/PL00021687
- Morais, L., Fairchild, T. R., Lahr, D. J. G., Rudnitzki, I. D., Schopf, J. W., Garcia, A. K., Kudryavtsev, A. B., & Romero, G. R. (2017). Carbonaceous and siliceous Neoproterozoic vase-shaped microfossils (Urucum Formation, Brazil) and the question of early protistan biomineralization. *Journal of Paleontology*, **91**, 393–406.  
DOI: 10.1017/jpa.2017.16
- Morrissey, J. H. (1981). Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Analytical Biochemistry*, **117**, 307–310.  
DOI: 10.1016/0003-2697(81)90783-1
- Mount, A. S., Wheeler, A. P., Paradkar, R. P., & Snider, D. (2004). Hemocyte-mediated shell mineralization in the eastern oyster. *Science*, **304**, 297–300.  
DOI: 10.1126/science.1090506
- Moura, G., Vilarinho, L., Santos, A. C. A. C., & Machado, J. (2000). 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*, **125**, 293–306.  
DOI: 10.1016/S0305-0491(99)00192-3
- Moya, A., Tambutté, S., Bertucci, A., Tambutté, E., Lotto, S., Vullo, D., Supuran, C. T., Allemand, D., & Zoccola, D. (2008). Carbonic anhydrase in the scleractinian coral *Stylophora pistillata*: characterization, localization, and role in biomineralization. *Journal of Biological Chemistry*, **283**, 25475–25484.  
DOI: 10.1074/jbc.M804726200
- Murdock, D. J. E., & Donoghue, P. C. J. (2011). Evolutionary origins of animal skeletal biomineralization. *Cells Tissues Organs*, **194**, 98–102.  
DOI: 10.1159/000324245
- Murray, J. W. (1985). *Atlas of invertebrate macrofossils*, Harlow, England: Longman, The Palaeontological Association, 241p.
- Mutvei, H. (1964). On the shells of *Nautilus* and *Spirula* with notes on the shell secretion in non-cephalopod molluscs. *Arkiv För Zoologi*, **16**, 221–278.
- Mutvei, H. (1970). Ultrastructure of the mineral and organic components of molluscan nacreous layers. *Biomineralization*, **2**, 48–61.
- Mutvei, H. (2017). Siphuncular structure in the extant *Spirula* and in other coleoids (Cephalopoda). *Geologiska Föreningens Förhandlingar*, **139**, 129–139.

DOI: 10.1080/11035897.2016.1227364

- Mutvei, H., Dauphin, Y., & Cuif, J. P. (1985). Observations sur l'organisation de la couche externe du test des *Haliotis* (Gastropoda): un cas exceptionnel de variabilité minéralogique et microstructurale. *Bulletin Du Muséum National d'histoire Naturelle*, **7**, 73–91.
- Mutvei, H., & Donovan, D. T. (2006). Siphuncular structure in some fossil coleoids and recent *Spirula*. *Palaeontology*, **49**, 685–691.  
DOI: 10.1111/j.1475-4983.2006.00533.x

- N -

- Naef, A. (1922). *Die fossilen Tintenfische. Eine paläozoologische Monographie*, Verlag von Gustav Fischer, Jena, 334p.
- Naef, A. (1923). Cephalopoda. *Fauna Und Flora Des Golfes von Neapel*, **35**, 1–863.
- Naef, A. (1928). *Die Cephalopoden (Embryologie). Fauna Flora Golfo Napoli; monogr. N° 35*, Friedländer & Sohn, Berlin, 459p.
- Nagai, K., Yano, M., Morimoto, K., & Miyamoto, H. (2007). Tyrosinase localization in mollusc shells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **146**, 207–214.  
DOI: 10.1016/j.cbpb.2006.10.105
- Napoleão, P., Reis, C. S., Alves, L. C., & Pinheiro, T. (2005). Morphologic characterisation and elemental distribution of *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 vestigial shell. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, **231**, 345–349.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nimb.2005.01.081>
- Naraoka, T., Uchisawa, H., Mori, H., Matsue, H., Chiba, S., & Kimura, A. (2003). Purification, characterization and molecular cloning of tyrosinase from the cephalopod mollusk, *Illex argentinus*. *European Journal of Biochemistry*, **270**, 4026–4038.  
DOI: 10.1046/j.1432-1033.2003.03795.x
- Neige, P. (2003). Spatial patterns of disparity and diversity of the recent cuttlefishes (Cephalopoda) across the Old World. *Journal of Biogeography*, **30**, 1125–1137.  
DOI: 10.1046/j.1365-2699.2003.00918.x
- Neige, P., Lapierre, H., & Merle, D. (2016). New eocene coleoid (Cephalopoda) diversity from statolith remains: taxonomic assignation, fossil record analysis, and new data for calibrating molecular phylogenies. *PLoS ONE*, **11**, 1–24.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0154062
- Neige, P., & Warnke, K. (2010). Just how many species of *Spirula* are there? A morphometric approach. In K. Tanabe, Y. Shigeta, T. Sasaki, & H. Hirano, eds., *Cephalopods - Present and Past*, Tokai University Press, Tokyo, pp. 77–84.
- Nesis, K. N. (1977). The biology of paper nautilus, *Argonauta boettgeri* and *Argonauta hians* (Cephalopoda, Octopoda), in the western Pacific and the seas of the east Indian Archipelago. *Zoologicheskii Zhurnal*, **56**, 1004–1014.
- Nesis, K. N. (1987). *Cephalopods of the World Squids, Cuttlefishes, Octopuses, and Allies*, Neptune City, New Jersey, T.F.H. Publications Inc. Ltd., 351p.

- Nishiguchi, M. K., & Mapes, R. H. (2008). Cephalopoda. In W. F. Ponder & D. R. Lindberg, eds., *Phylogeny and evolution of the Mollusca*, Berkeley, CA: University of California Press, pp. 163–199.
- Noda, H., Ogasawara, K., & Nomura, R. (1986). Systematic and paleobiogeographic studies on the Japanese Miocene argonautid “*Nautilus*” *izumoensis*. *University of Tsukuba, Institute of Geoscience, Science Reports, Section B, Geological Sciences*, **7**, 15–42.
- Norman, M. (2000). *Cephalopods. A world guide*, Conch Book, Hackenheim, 318p.
- Norman, M., & Reid, A. (2000). *Guide to squid, cuttlefish and octopuses of Australasia*, Collingwood, Victoria: The Gould League and CSIRO Publishing, 96p.
- Nudelman, F. (2015). Nacre biomineralisation: a review on the mechanisms of crystal nucleation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **46**, 2–10.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.07.004>
- Nudelman, F., Chen, H. H., Goldberg, H. A., Weiner, S., & Addadi, L. (2007). Spiers memorial lecture: lessons from biomineralization: comparing the growth strategies of mollusc shell prismatic and nacreous layers in *Atrina rigida*. *Faraday Discussions*, **136**, 9–25.  
DOI: 10.1039/b704418f
- Nudelman, F., Gotliv, B. A., Addadi, L., & Weiner, S. (2006). Mollusk shell formation: mapping the distribution of organic matrix components underlying a single aragonitic tablet in nacre. *Journal of Structural Biology*, **153**, 176–187.  
DOI: 10.1016/J.JSB.2005.09.009
- Nys, Y., Hincke, M. T., Arias, J. L., Garcia-Ruiz, J. M., & Solomon, S. E. (1999). Avian eggshell mineralization. *Avian and Poultry Biology Reviews*, **10**, 143–166.

- O -

- Ohkouchi, N., Tsuda, R., Chikaraishi, Y., & Tanabe, K. (2013). A preliminary estimate of the trophic position of the deep-water ram’s horn squid *Spirula spirula* based on the nitrogen isotopic composition of amino acids. *Marine Biology*, **160**, 773–779.  
DOI: 10.1007/s00227-012-2132-1
- Okafor, N. (1965). Isolation of chitin from the shell of the cuttlefish, *Sepia officinalis* L. *Biochimica et Biophysica Acta - Mucoproteins and Mucopolysaccharides*, **101**, 193–200.  
DOI: 10.1016/0926-6534(65)90050-3
- Ortiz, N., & Ré, M. E. (2006). First report of pseudohermaphroditism in cephalopods. *Journal of Molluscan Studies*, **72**, 321–323.  
DOI: 10.1093/mollus/eyl011
- Oudot, M., Neige, P., Ben Shir, I., Schmidt, A., Strugnelli, J. M., Plasseraud, L., Broussard, C., Hoffmann, R., Lukeneder, A., & Marin, F. (2020a). The shell matrix and microstructure of the ram’s horn squid: molecular and structural characterization. *Journal of Structural Biology*, **211**, 107507.  
DOI: 10.1016/J.JSB.2020.107507
- Oudot, M., Shir, I. B., Schmidt, A., Plasseraud, L., Broussard, C., Neige, P., & Marin, F. (2020b). A nature’s curiosity: the argonaut “shell” and its organic content. *Crystals*, **10**, 839.  
DOI: 10.3390/cryst10090839

- P -

- Palmer, A. R. (1983). Relative cost of producing skeletal organic matrix versus calcification: evidence from marine gastropods. *Marine Biology*, **75**, 287–292.  
DOI: 10.1007/BF00406014
- Palmer, A. R. (1992). Calcification in marine molluscs: how costly is it? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 1379–1382.  
DOI: 10.1073/pnas.89.4.1379
- Pavat, C., Zanella-Cléon, I., Becchi, M., Medakovic, D., Luquet, G., Guichard, N., Alcaraz, G., Dommergues, J. L., Serpentine, A., Lebel, J. M., & Marin, F. (2012). The shell matrix of the pulmonate land snail *Helix aspersa maxima*. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, **161**, 303–314.  
DOI: 10.1016/j.cbpb.2011.12.003
- Peigné, S., Goillot, C., Germonpré, M., Blondel, C., Bignon, O., & Merceron, G. (2009). Predormancy omnivory in European cave bears evidenced by a dental microwear analysis of *Ursus spelaeus* from Goyet, Belgium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 15390–15393.  
DOI: 10.1073/pnas.0907373106
- Perdikouri, C., Kasiotas, A., Geisler, T., Schmidt, B. C., & Putnis, A. (2011). Experimental study of the aragonite to calcite transition in aqueous solution. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **75**, 6211–6224.  
DOI: 10.1016/J.GCA.2011.07.045
- Petit, H., Davis, W. L., & Jones, R. (1979). Morphological studies on the periostracum of the fresh-water mussel *Amblyma* (unionidae): light microscopy, transmission electron microscopy, and scanning electron microscopy. *Tissue and Cell*, **11**, 633–642.  
DOI: 10.1016/0040-8166(79)90020-X
- Pickford, G. E. (1939). The Vampyromorpha. A new order of dibranchiate Cephalopoda. *Věstník Československé Zoologické Společnosti v Praze*, **6–7**, 346–358.
- Pickford, G. E. (1947). Untitled in “Comments by Readers.” *Science*, **105**, 522.  
DOI: 10.1126/science.105.2733.522
- Pokroy, B., Fitch, A. N., Marin, F., Kapon, M., Adir, N., & Zolotoyabko, E. (2006). Anisotropic lattice distortions in biogenic calcite induced by intra-crystalline organic molecules. *Journal of Structural Biology*, **155**, 96–103.  
DOI: 10.1016/j.jsb.2006.03.008
- Pokroy, B., Kapon, M., Marin, F., Adir, N., & Zolotoyabko, E. (2007). Protein-induced, previously unidentified twin form of calcite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 7337–7341.  
DOI: 10.1073/pnas.0608584104
- Ponder, W. F., Lindberg, D. R., & Ponder, J. M. (2019). Introducing molluscs. *In Biology and Evolution of the Mollusca, Vol. 1*, Publisher: CRC Press, pp. 1–20.  
DOI: 10.1201/9781351115667-1
- Ponder, W. F., Lindberg, D. R., & Ponder, J. M. (2020a). Early history and extinct groups. *In Biology and Evolution of the Mollusca, Vol. 2*, CRC Press, pp. 11–66.  
DOI: 10.1201/9781351115254-2

- Ponder, W. F., Lindberg, D. R., & Ponder, J. M. (2020b). The Cephalopoda. *In Biology and Evolution of the Mollusca, Vol. 2*, CRC Press, pp. 195–288.
- Porter, S. M. (2010). Calcite and aragonite seas and the de novo acquisition of carbonate skeletons. *Geobiology*, **8**, 256–277.  
DOI: 10.1111/j.1472-4669.2010.00246.x
- Porter, S. M., Meisterfeld, R., & Knoll, A. H. (2003). Vase-shaped microfossils from the Neoproterozoic Chuar Group, Grand Canyon: a classification guided by modern *Testate amoebae*. *Journal of Paleontology*, **77**, 409–429.  
DOI: 10.1017/s0022336000044140
- Price, G. D., Twitchett, R. J., Smale, C., & Marks, V. (2009). Isotopic analysis of the life history of the enigmatic squid *Spirula spirula*, with implications for studies of fossil cephalopods. *Palaios*, **24**, 273–279.  
DOI: 10.2110/palo.2008.p08-067r

- R -

- Ramos-Silva, P., Kaandorp, J., Huisman, L., Marie, B., Zanella-Cléon, I., Guichard, N., Miller, D. J., & Marin, F. (2013). The skeletal proteome of the coral *Acropora millepora*: the evolution of calcification by co-option and domain shuffling. *Molecular Biology and Evolution*, **30**, 2099–2112.  
DOI: 10.1093/molbev/mst109
- Raz, S., Hamilton, P. C., Wilt, F. H., Weiner, S., & Addadi, L. (2003). The transient phase of amorphous calcium carbonate in sea urchin larval spicules: the involvement of proteins and magnesium ions in its formation and stabilization. *Advanced Functional Materials*, **13**, 480–486.  
DOI: 10.1002/adfm.200304285
- Réhault-Godbert, S., Hervé-Grépinet, V., Gautron, J., Cabau, C., Nys, Y., & Hincke, M. (2011). Molecules involved in chemical defence of the chicken egg. *In Y. Nys, M. Bain, & F. Van Immerseel, eds., Improving the safety and quality of eggs and egg products: egg chemistry, production and consumption*, Woodhead Publishing, pp. 183–208.  
DOI: 10.1533/9780857093912.2.183
- Reid, A., Jereb, P., & Roper, C. F. E. (2005). Family Sepiidae. *In P. Jereb & C. F. E. Roper, eds., Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of species known to date. Volume 1. Chambered nautilus and sepioids (Nautilidae, Sepiidae, Sepiolidae, Sepiadariidae, Idiosepiidae and Spirulidae) FAO Species Catalogue for Fishery Purpose*, Rome, pp. 57–152.
- Robson, G. C. (1932). *A monograph of the recent Cephalopoda based on the collections in the British Museum (Natural History), Part II, The Octopoda (excluding the Octopodinae)*, Vol. 2, London: British Museum (Natural History), 359p.
- Rocha, F., Guerra, A., & González, A. F. (2001). A review of reproductive strategies in cephalopods. *Biological Reviews*, **76**, 291–304.  
DOI: 10.1017/S1464793101005681
- Rodríguez-Lopez, J. N., Tudela, J., Varon, R., Garcia-Carmona, F., & Garcia-Canovas, F. (1992). Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 3801–3810.

- Rosenthal, A. K., Gohr, C. M., Ninomiya, J., & Wakim, B. T. (2011). Proteomic analysis of articular cartilage vesicles from normal and osteoarthritic cartilage. *Arthritis & Rheumatism*, **63**, 401–411.  
DOI: <https://doi.org/10.1002/art.30120>
- Rousseau, M., Bédouet, L., Lati, E., Gasser, P., Le Ny, K., & Lopez, E. (2006). Restoration of stratum corneum with nacre lipids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **145**, 1–9.  
DOI: [10.1016/j.cbpb.2006.06.012](https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.06.012)
- Rousseau, M., Meibom, A., Gèze, M., Bourrat, X., Angellier, M., & Lopez, E. (2009). Dynamics of sheet nacre formation in bivalves. *Journal of Structural Biology*, **165**, 190–195.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2008.11.011>
- Rusenko, K. W., Donachy, J. E., & Wheeler, A. P. (1991). Purification and characterization of a shell matrix phosphoprotein from the american oyster. In C. S. Sykes & A. P. Wheeler, eds., *Surface Reactive Peptides and Polymers*, Vol. 444, American Chemical Society, pp. 107–124.  
DOI: [doi:10.1021/bk-1991-0444.ch008](https://doi.org/10.1021/bk-1991-0444.ch008)

- S -

- Saleuddin, A. S. M., & Petit, H. P. (1983). The mode of formation and the structure of the periostracum. In A. S. M. Saleuddin & K. M. Wilbur, eds., *The Mollusca, Vol. 4: Physiology*, Academic Press, New York, pp. 199–234.  
DOI: [10.1016/B978-0-12-751404-8.50013-X](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-751404-8.50013-X)
- Sanchez, G., Setiamarga, D. H. E., Tuanapaya, S., Tongtherm, K., Winkelmann, I. E., Schmidbaur, H., Umino, T., Albertin, C., Allcock, L., Perales-Raya, C., Gleadall, I., Strugnell, J. M., Simakov, O., & Nabhitabhata, J. (2018). Genus-level phylogeny of cephalopods using molecular markers: Current status and problematic areas. *PeerJ*, 1–19.  
DOI: [10.7717/peerj.4331](https://doi.org/10.7717/peerj.4331)
- Sarashina, I., & Endo, K. (2001). The complete primary structure of molluscan shell protein 1 (MSP-1), an acidic glycoprotein in the shell matrix of the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Marine Biotechnology*, **3**, 362–369.  
DOI: [10.1007/s10126-001-0013-6](https://doi.org/10.1007/s10126-001-0013-6)
- Sarashina, I., & Endo, K. (2006). Skeletal matrix proteins of invertebrate animals: comparative analysis of their amino acid sequences. *Paleontological Research*, **10**, 311–336.  
DOI: [10.2517/prpsj.10.311](https://doi.org/10.2517/prpsj.10.311)
- Sathyan, N., Philip, R., Chaithanya, E. R., & Anil Kumar, P. R. (2012). Identification and molecular characterization of Molluskin, a histone-H2A-derived antimicrobial peptide from molluscs. *ISRN Molecular Biology*, **2012**, 219656.  
DOI: [10.5402/2012/219656](https://doi.org/10.5402/2012/219656)
- Schmidt, J. (1922). Live specimens of *Spirula*. *Nature*, **110**, 788–790.  
DOI: [10.1038/110788a0](https://doi.org/10.1038/110788a0)
- Schönitzer, V., & Weiss, I. M. (2007). The structure of mollusc larval shells formed in the presence of the chitin synthase inhibitor Nikkomycin Z. *BMC Structural Biology*, **7**, 1–

24.

DOI: 10.1186/1472-6807-7-71

- Sheehan, D. C., & Hrapchak, B. B. (1980). *Theory and practice of histotechnology.*, C.V Mosby Company, St. Louis, MO., 481p.
- Shen, X., Belcher, A. M., Hansma, P. K., Stucky, G. D., & Morse, D. E. (1997). Molecular cloning and characterization of Lustrin A, a matrix protein from shell and pearl nacre of *Haliotis rufescens*. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 32472–32481.  
DOI: 10.1074/jbc.272.51.32472
- Shigeno, S., Sasaki, T., Moritaki, T., Kasugai, T., Vecchione, M., & Agata, K. (2008). Evolution of the cephalopod head complex by assembly of multiple molluscan body parts: evidence from *Nautilus* embryonic development. *Journal of Morphology*, **269**, 1–17.  
DOI: 10.1002/jmor.10564
- Shigeno, S., Takenori, S., & Boletzky, S. (2010). The origins of cephalopod body plans: a geometrical and developmental basis for the evolution of vertebrate-like organ systems. In K. Tanabe, Y. Shigeta, T. Sasaki, & H. Hirano, eds., *Cephalopods - Present and Past*, Tokyo: Tokai University Press., pp. 23–34.
- Simkiss, K. (1976). Intracellular and extracellular routes in biomineralization. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, **30**, 423–444.
- Simkiss, K. (1977). Biomineralization and detoxification. *Calcified Tissue Research*, **24**, 199–200.  
DOI: 10.1007/BF02223316
- Simkiss, K. (1980). Detoxification, calcification and the intracellular storage of ions. In M. Omori & N. Watabe, eds., *Mechanisms of biomineralization in animals and plants*, Tokai University Press, Tokyo, pp. 13–18.
- Simkiss, K. (1986). The processes of biomineralization in lower plants and animals-an overview. In *Biomineralization in lower plants and animals*, Vol. 30, Clarendon Press, Oxford, pp. 19–37.
- Simkiss, K., Taylor, M., & Mason, A. Z. (1982). Metal detoxification and bioaccumulation in mollusks. *Marine Biology Letters*, **3**, 187–201.
- Simkiss, K., & Wilbur, K. M. (1989). *Biomineralization. Cell biology and mineral deposition*, San Diego, CA: Academic Press, 337p.
- Simonet Roda, M., Ziegler, A., Griesshaber, E., Yin, X., Rupp, U., Greiner, M., Henkel, D., Häussermann, V., Eisenhauer, A., Laudien, J., & Schmahl, W. W. (2019). Terebratulide brachiopod shell biomineralization by mantle epithelial cells. *Journal of Structural Biology*, **207**, 136–157.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2019.05.002>
- Skovsted, C. B., Balthasar, U., Brock, G. A., & Paterson, J. R. (2009). The Tommotiid *Camenella reticulosa* from the Early Cambrian of South Australia: morphology, scleritome reconstruction, and phylogeny. *Acta Palaeontologica Polonica*, **54**, 525–540.  
DOI: 10.4202/app.2008.0082
- Stegemann, H. (1963). Proteine (Conchagene) und chitin im stützgewebe von tintenfischen. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift Fur Physiologische Chemie*, **331**, 269–279.

DOI: 10.1515/bchm2.1963.331.1.269

- Stenflo, J., Stenberg, Y., & Muranyi, A. (2000). Calcium-binding EGF-like modules in coagulation proteinases: function of the calcium ion in module interactions. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, **1477**, 51–63.  
DOI: 10.1016/S0167-4838(99)00262-9
- Stephens, W. M. (1965). The exquisite Argonauts. *Sea Frontiers*, **11**, 139–147.
- Stevens, K., Iba, Y., Suzuki, A., & Mutterlose, J. (2015). Biological and environmental signals recorded in shells of *Argonauta argo* (Cephalopoda, Octobranchia) from the Sea of Japan. *Marine Biology*, **162**, 2203–2215.  
DOI: 10.1007/s00227-015-2750-5
- Strugnell, J., & Allcock, A. L. (2010). Co-estimation of phylogeny and divergence times of Argonautoidea using relaxed phylogenetics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **54**, 701–708.  
DOI: 10.1016/j.ympev.2009.11.017
- Strugnell, J., Jackson, J., Drummond, A. J., & Cooper, A. (2006). Divergence time estimates for major cephalopod groups: evidence from multiple genes. *Cladistics*, **22**, 89–96.  
DOI: 10.1111/j.1096-0031.2006.00086.x
- Strugnell, J. M., Hall, N. E., Vecchione, M., Fuchs, D., & Allcock, A. L. (2017). Whole mitochondrial genome of the ram's horn squid shines light on the phylogenetic position of the monotypic order Spirulida (Haeckel, 1896). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **109**, 296–301.  
DOI: 10.1016/j.ympev.2017.01.011
- Strugnell, J., Norman, M., Jackson, J., Drummond, A. J., & Cooper, A. (2005). Molecular phylogeny of coleoid cephalopods (Mollusca: Cephalopoda) using a multigene approach; the effect of data partitioning on resolving phylogenies in a Bayesian framework. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **37**, 426–441.  
DOI: 10.1016/j.ympev.2005.03.020
- Sudo, S., Fujikawa, T., Nagakura, T., Ohkubo, T., Sakaguchi, K., Tanaka, M., Nakashima, K., & Takahashi, T. (1997). Structures of mollusc shell framework proteins. *Nature*, **387**, 563–564.  
DOI: 10.1038/42391
- Suetake, T., Tsuda, S., Kawabata, S. I., Miura, K., Iwanaga, S., Hikichi, K., Nitta, K., & Kawano, K. (2000). Chitin-binding proteins in invertebrates and plants comprise a common chitin-binding structural motif. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 17929–19932.  
DOI: 10.1074/jbc.C000184200
- Sukhsangchan, C., Meksumpun, S., Nabhitabhata, J., & Segawa, S. (2009). Distribution, biology, and stomach contents of paper nautilus (*Argonauta hians*) in the Andaman Sea. *Science Asia*, **35**, 315–319.  
DOI: 10.2306/scienceasia1513-1874.2009.35.315
- Suzuki, M., Murayama, E., Inoue, H., Ozaki, N., Tohse, H., Kogure, T., & Nagasawa, H. (2004). Characterization of Prismaticin-14, a novel matrix protein from the prismatic layer of the Japanese pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Biochemical Journal*, **382**, 205–213.  
DOI: 10.1042/BJ20040319

Suzuki, M., Sugisaka-Nobayashi, A., Kogure, T., & Nagasawa, H. (2013). Structural and functional analyses of a strong chitin-binding protein-1 (SCBP-1) from the exoskeleton of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **77**, 361–368.

DOI: 10.1271/bbb.120787

Sweeney, M. J., & Roper, C. F. E. (1998). Classification, type localities, and type repositories of recent Cephalopoda. *Smithsonian Contributions to Zoology*, **586**, 561–599.

- T -

Takeuchi, T., & Endo, K. (2006). Biphasic and dually coordinated expression of the genes encoding major shell matrix proteins in the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Marine Biotechnology*, **8**, 52–61.

DOI: 10.1007/s10126-005-5037-x

Takgi, R., & Miyashita, T. (2014). A cDNA cloning of a novel alpha-class tyrosinase of *Pinctada fucata*: its expression analysis and characterization of the expressed protein. *Enzyme Research*, **2014**, 780549.

DOI: 10.1155/2014/780549

Tanabe, K., Fukuda, Y., & Ohtsuka, Y. (1985). New chamber formation in the cuttlefish *Sepia esculenta* Hoyle. *The Japanese Journal of Malacology*, **44**, 55–67.

DOI: 10.18941/venusjjm.44.1\_55

Tanner, A. R., Fuchs, D., Winkelmann, I. E., Gilbert, M. T. P., Pankey, M. S., Ribeiro, Â. M., Kocot, K. M., Halanych, K. M., Oakley, T. H., da Fonseca, R. R., Pisani, D., & Vinther, J. (2017). Molecular clocks indicate turnover and diversification of modern coleoid cephalopods during the Mesozoic marine revolution. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **284**, 20162818.

DOI: 10.1098/rspb.2016.2818

Tanzarella, S. (2005). *Perception et communication chez les animaux*, De Boeck Supérieur Sciences, 336p.

Taylor, J. D., Kennedy, W. J., & Hall, A. (1969). The shell structure and mineralogy of the Bivalvia. Introduction. Nuculacea-Trigonacea. *Bulletin of the British Museum (Natural History) Zoology Supplement*, **3**, 1–125.

Taylor, J. D., Kennedy, W. J., & Hall, A. (1973). The shell structure and mineralogy of the Bivalvia. II. Lucinacea-Clavagellaceae. Conclusions. *Bulletin of the British Museum (Natural History) Zoology*, **22**, 256–294.

Timmermans M., L. P. (1969). Studies on shell formation in molluscs. *Netherlands Journal of Zoology*, **19**, 417–523.

Treccani, L., Mann, K., Heinemann, F., & Fritz, M. (2006). Perlwapin, an abalone nacre protein with three four-disulfide core (whey acidic protein) domains, inhibits the growth of calcium carbonate crystals. *Biophysical Journal*, **91**, 2601–2608.

DOI: 10.1529/biophysj.106.086108

Trego, K. D. (1992). Shell variation within the cephalopod genera *Nautilus* and *Argonauta*. *Of Sea and Shore*, **15**, 132–138.

Trego, K. D. (1993). Questionable species in the cephalopod genus *Argonauta*. *Veliger*, **36**,

298–299.

- Trichet, J., & Défarge, C. (1995). Non-biologically supported organomineralization. *Proceedings of the 7th International Symposium on Biomineralization. Bulletin de l'Institut Océanographique de Monaco*, **14**, 203–236.
- Trimby, P., & Grellet-Tinner, G. (2011). The hidden secrets of dinosaur eggs revealed using analytical scanning electron microscopy. *Infocus*, **24**, 4–21.
- Tsukamoto, D., Sarashina, I., & Endo, K. (2004). Structure and expression of an unusually acidic matrix protein of pearl oyster shells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **320**, 1175–1180.  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.06.072
- Tucker, M. E., & Wright, V. P. (1990). *Carbonate sedimentology*, Blackwell Science Ltd, 482p.
- Turek, R. (1933). Chemisch-analytische untersuchungen an mollusken-schalen. *Archiv Für Naturgeschichte: Zeitschrift Für Systematische Zoologie*, **2**, 291–302.
- Tyszka, J., Bickmeyer, U., Raitzsch, M., Bijma, J., Kaczmarek, K., Mewes, A., & Topa Pawełand Janse, M. (2019). Form and function of F-actin during biomineralization revealed from live experiments on foraminifera. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **116**, 4111–4116.  
DOI: 10.1073/pnas.1810394116

- U -

- Uribe, J. E., & Zardoya, R. (2017). Revisiting the phylogeny of Cephalopoda using complete mitochondrial genomes. *Journal of Molluscan Studies*, **83**, 133–144.  
DOI: 10.1093/mollus/eyw052

- V -

- Vinther, J. (2015). The origins of molluscs. *Palaeontology*, **58**, 19–34.  
DOI: 10.1111/pala.12140
- Vinther, J., & Nielsen, C. (2005). The Early Cambrian *Halkieria* is a mollusc. *Zoologica Scripta*, **34**, 81–89.  
DOI: 10.1111/j.1463-6409.2005.00177.x
- Vinther, J., Van Roy, P., & Briggs, D. E. G. (2008). Machaeridians are Palaeozoic armoured annelids. *Nature*, **451**, 185–188.  
DOI: 10.1038/nature06474
- Voight, J. (1997). Cladistic analysis of octopods based on anatomical characters. *Journal of Molluscan Studies* **63**, 311–325
- Voss, G. L., & Williamson, G. (1971). *Cephalopods of Hong Kong*, Government Press, Hong Kong, 138p.

- W -

- Wagner, G. P. (1994). Evolution and multi-functionality of the chitin system. In B. Schierwater, B. Streit, G. P. Wagner, & R. DeSalle, eds., *Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications*, Basel: Birkhäuser Basel, pp. 559–577.

DOI: 10.1007/978-3-0348-7527-1\_33

- Waite, H. J., Saleuddin, A. S. M., & Andersen, S. O. (1979). Periostracin - a soluble precursor of sclerotized periostracum in *Mytilus edulis* L. *Journal of Comparative Physiology - B*, **130**, 301–307.  
DOI: 10.1007/BF00689847
- Waite, J. H. (1983). Quinone-tanned scleroproteins. In A. S. M. Saleuddin & K. M. Wilbur, eds., *The Mollusca, Vol. 4: Physiology*, Academic Press, New York, pp. 467–504.  
DOI: 10.1016/B978-0-12-751401-7.50018-1
- Waite, J. H. (1995). Precursors of quinone tanning: Dopa-containing proteins. *Methods in Enzymology*, **258**, 1–20.  
DOI: 10.1016/0076-6879(95)58033-6
- Walters, H. B. (1897). On some antiquities of the Mycenaean Age recently acquired by the British Museum. *The Journal of Hellenic Studies*, **17**, 63–77.  
DOI: 10.2307/623818
- Warnke, K., & Keupp, H. (2005). *Spirula* - A window to the embryonic development of ammonoids? Morphological and molecular indications for a palaeontological hypothesis. *Facies*, **51**, 60–65.  
DOI: 10.1007/s10347-005-0054-9
- Warnke, K., Plötner, J., Santana, J. I., Rueda, M. J., & Llinas, O. (2003). Reflections on the phylogenetic position of *Spirula* (Cephalopoda): preliminary evidence from the 18S ribosomal RNA gene. *Berliner Paläobiologische Abhandlungen*, **3**, 253–260.
- Weigele, J., Franz-Odenaal, T. A., & Hilbig, R. (2016). Not all inner ears are the same: otolith matrix proteins in the inner ear of sub-adult cichlid fish, *Oreochromis mossambicus*, reveal insights into the biomineralization process. *The Anatomical Record*, **299**, 234–245.  
DOI: 10.1002/ar.23289
- Weiner, S. (1979). Aspartic acid-rich proteins: major components of the soluble organic matrix of mollusk shells. *Calcified Tissue International*, **29**, 163–167.  
DOI: 10.1007/BF02408072
- Weiner, S., & Dove, P. M. (2003). An overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, **54**, 1–29.  
DOI: 10.2113/0540001
- Weiner, S., & Hood, L. (1975). Soluble protein of the organic matrix of mollusk shells: a potential template for shell formation. *Science*, **190**, 987 LP – 989.  
DOI: 10.1126/science.1188379
- Weiner, S., Mahamid, J., Politi, Y., Ma, Y., & Addadi, L. (2009). Overview of the amorphous precursor phase strategy in biomineralization. *Frontiers of Materials Science in China*, **3**, 104–108.  
DOI: 10.1007/s11706-009-0036-x
- Weiner, S., & Traub, W. (1980). X-ray diffraction study of the insoluble organic matrix of mollusk shells. *FEBS Letters*, **111**, 311–316.  
DOI: 10.1016/0014-5793(80)80817-9
- Weiner, S., & Traub, W. (1984). Macromolecules in mollusc shells and their functions in

- biomineralization. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, **304**, 425–434.  
DOI: 10.1098/rstb.1984.0036
- Weiss, I. M., Göhring, W., Fritz, M., & Mann, K. (2001). Perlustrin, a *Haliotis laevis* (abalone) nacre protein, is homologous to the insulin-like growth factor binding protein N-terminal module of vertebrates. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **285**, 244–249.  
DOI: 10.1006/bbrc.2001.5170
- Weiss, I. M., Kaufmann, S., Mann, K., & Fritz, M. (2000). Purification and characterization of perlucin and perlustrin, two new proteins from the shell of the mollusc *Haliotis laevis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **267**, 17–21.  
DOI: 10.1006/bbrc.1999.1907
- Weiss, I. M., Lüke, F., Eichner, N., Guth, C., & Clausen-Schaumann, H. (2013). On the function of chitin synthase extracellular domains in biomineralization. *Journal of Structural Biology*, **183**, 216–225.  
DOI: 10.1016/J.JSB.2013.04.011
- Weiss, I. M., Schönitzer, V., Eichner, N., & Sumper, M. (2006). The chitin synthase involved in marine bivalve mollusk shell formation contains a myosin domain. *FEBS Letters*, **580**, 1846–1852.  
DOI: 10.1016/j.febslet.2006.02.044
- Westall, F., Steele, A., Toporski, J., Walsh, M., Allen, C., Guidry, S., McKay, D., Gibson, E., & Chafetz, H. (2000). Polymeric substances and biofilms as biomarkers in terrestrial materials: implications for extraterrestrial samples. *Journal of Geophysical Research: Planets*, **105**, 24511–24527.  
DOI: 10.1029/2000JE001250
- Westbroek, P., & Marin, F. (1998). A marriage of bone and nacre. *Nature*, **392**, 861–862.  
DOI: 10.1038/31798
- Wheeler, A. P., George, J. W., & Evans, C. A. (1981). Control of calcium carbonate nucleation and crystal growth by soluble matrix of oyster shell. *Science*, **212**, 1397–1398.  
DOI: 10.1126/science.212.4501.1397
- Wheeler, A. P., & Sikes, C. S. (1984). Regulation of carbonate calcification by organic matrix. *Integrative and Comparative Biology*, **24**, 933–944.  
DOI: 10.1093/icb/24.4.933
- Wilbur, K. M. (1984). Many minerals, several phyla, and a few considerations. *American Zoologist*, **24**, 839–845.  
DOI: 10.1093/icb/24.4.839
- Williamson, R., & Chrachri, A. (2004). Cephalopod Neural Networks. *NeuroSignals*, pp. 87–98.  
DOI: 10.1159/000076160
- Wilt, F. H., Killian, C. E., & Livingston, B. T. (2003). Development of calcareous skeletal elements in invertebrates. *Differentiation: Review*, **71**, 237–250.  
DOI: 10.1046/j.1432-0436.2003.7104501.x

Wolfe, K., Smith, A. M., Trimby, P., & Byrne, M. (2013). Microstructure of the paper nautilus (*Argonauta nodosa*) shell and the novel application of electron backscatter diffraction (EBSD) to address effects of ocean acidification. *Marine Biology*, **160**, 2271–2278.

DOI: 10.1007/s00227-012-2032-4

- Y -

Yang, B., Pu, F., Li, L., You, W., Ke, C., & Feng, D. (2017). Functional analysis of a tyrosinase gene involved in early larval shell biogenesis in *Crassostrea angulata* and its response to ocean acidification. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **206**, 8–15.

DOI: 10.1016/j.cbpb.2017.01.006

Yang, B., Steiner, M., Zhu, M., Li, G., Liu, J., & Liu, P. (2016). Transitional Ediacaran–Cambrian small skeletal fossil assemblages from South China and Kazakhstan: implications for chronostratigraphy and metazoan evolution. *Precambrian Research*, **285**, 202–215.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.precamres.2016.09.016>

Yano, M., Nagai, K., Morimoto, K., & Miyamoto, H. (2006). Shematrin: a family of glycine-rich structural proteins in the shell of the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **144**, 254–262.

DOI: 10.1016/J.CBPPB.2006.03.004

Yin, Y., Huang, J., Paine, M. L., Reinhold, V. N., & Chasteen, N. D. (2005). Structural characterization of the major extrapallial fluid protein of the mollusc *Mytilus edulis*: implications for function. *Biochemistry*, **44**, 10720–10731.

DOI: 10.1021/bi0505565

Yool, A., & Tyrrell, T. (2003). Role of diatoms in regulating the ocean's silicon cycle. *Global Biogeochemical Cycles*, **17**, 1103.

DOI: 10.1029/2002GB002018

Yoshida, M., Tsuneki, D., & Furuya, H. (2010). Molecular phylogeny among east-Asian cuttlefishes using three mitochondrial genes. In K. Tanabe, Y. Shigeta, T. Sasaki, & H. Hirano, eds., *Cephalopods Present and Past: new insights and fresh perspectives*, Tokai University Press, Tokyo, pp. 15–21.

Young, J. Z. (1960). Observations on *Argonauta* and especially its method of feeding. *Proceedings of the Zoological Society of London*, **133**, 471–479.

DOI: 10.1111/j.1469-7998.1960.tb05574.x

Young, R. E., Vecchione, M., & Donovan, D. T. (1998). The evolution of coleoid cephalopods and their present biodiversity and ecology. *South African Journal of Marine Science*, **20**, 393–420.

DOI: 10.2989/025776198784126287

Yu, H., Li, H., & Li, Q. (2017). Molecular characterization and expression profiles of myosin essential light chain gene in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **213**, 1–7.

DOI: 10.1016/j.cbpb.2017.07.007

Yu, X., Yu, H., Kong, L., Guo, F., Zhu, G., & Li, Q. (2014). Molecular cloning and

differential expression in tissues of a tyrosinase gene in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Molecular Biology Reports*, **41**, 5403–5411.

DOI: 10.1007/s11033-014-3412-2

- Z -

Zhang, C., Xie, L., Huang, J., Chen, L., & Zhang, R. (2006a). A novel putative tyrosinase involved in periostracum formation from the pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **342**, 632–639.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.01.182

Zhang, C., Xie, L., Huang, J., Liu, X., & Zhang, R. (2006b). A novel matrix protein family participating in the prismatic layer framework formation of pearl oyster, *Pinctada fucata*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **344**, 735–740.

DOI: 10.1016/J.BBRC.2006.03.179

Zhang, R., Xie, L., & Yan, Z. (2019). Molecular basis of biomineralization in *Pinctada fucata*. In *Biomineralization Mechanism of the Pearl Oyster, Pinctada fucata*, Singapore: Springer Singapore, pp. 1–22.

DOI: 10.1007/978-981-13-1459-9\_1

Zhao, H., Samata, T., Takakura, D., Hashimoto, R., Miyazaki, Y., Nozawa, T., & Hikita, Y. (2003). Organic matrix proteins preserved in fossil molluscan shells. In I. Kobayashi & H. Ozawa, eds., *Biomineralization (BIOM2001): Formation, Diversity, Evolution and Application*, Tokai University Press, Kanagawa, pp. 108–111.

Zheng, X., Xiao, S., Wang, Z., & Wang, R. (2007). Histological and histochemical analyses of the cuttlebone sac of the golden cuttlefish *Sepia esculenta*. *Journal of Ocean University of China*, **6**, 393–397.

DOI: 10.1007/s11802-007-0393-y

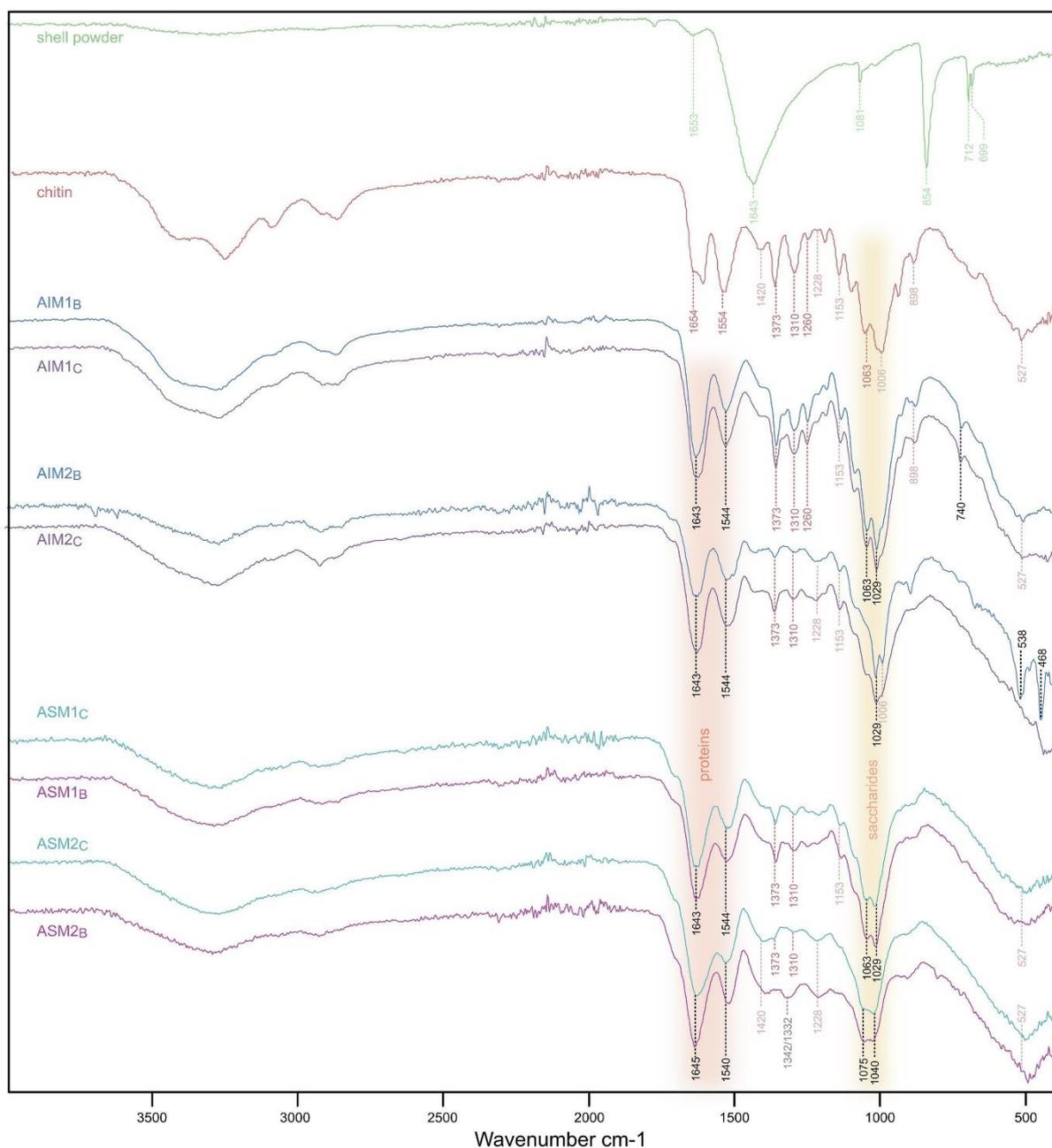
Zhou, G.-T., Yu, J. C., Wang, X.-C., & Zhang, L.-Z. (2004). Sonochemical synthesis of aragonite-type calcium carbonate with different morphologies. *New Journal of Chemistry*, **28**, 1027–1031.

DOI: 10.1039/B315198K

**Annexes:**  
**supplementary figures to the articles**

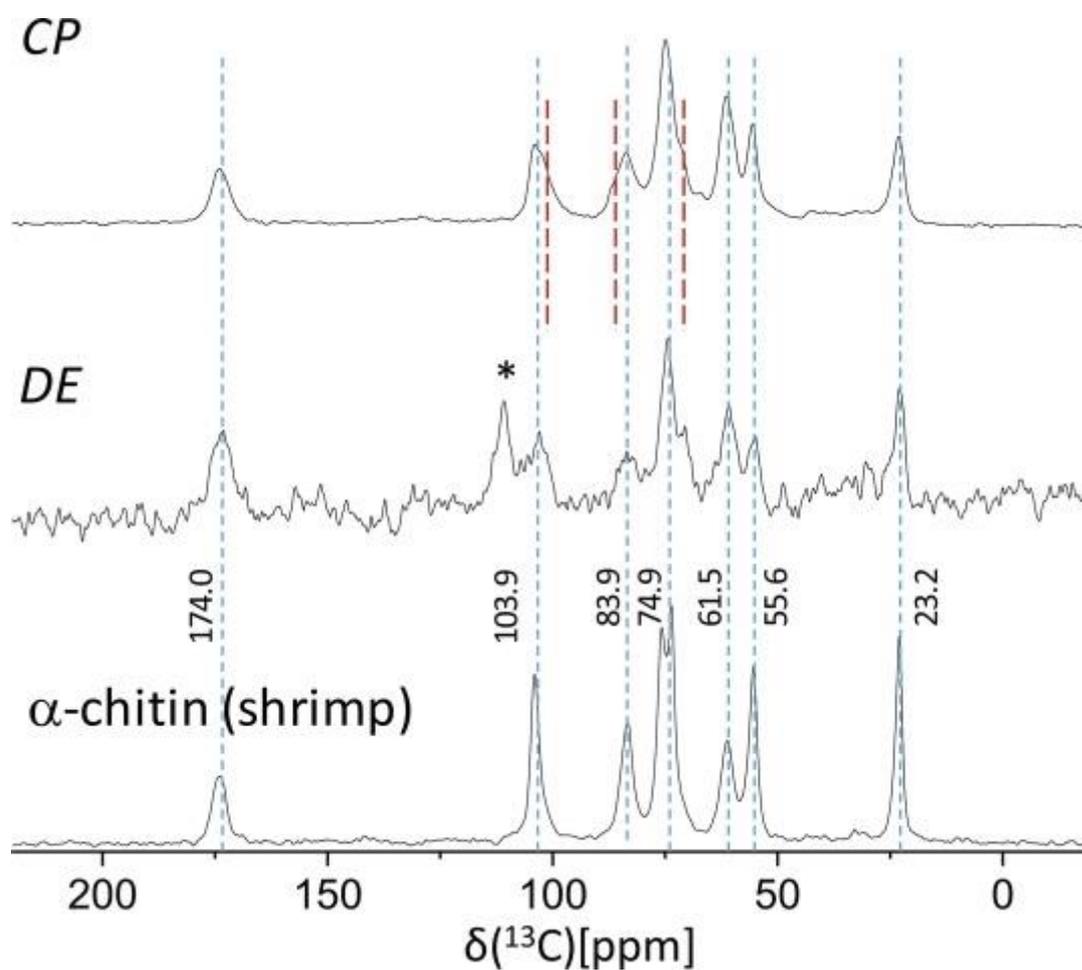
**Article I:** The shell matrix and microstructure of the Ram's Horn squid : molecular and structural characterization – Journal of Structural Biology, 211(1), art. number 107507 (2020)

**Supplementary Figure 1:** full range FTIR spectra of the different *Spirula spirula* shell extracts.

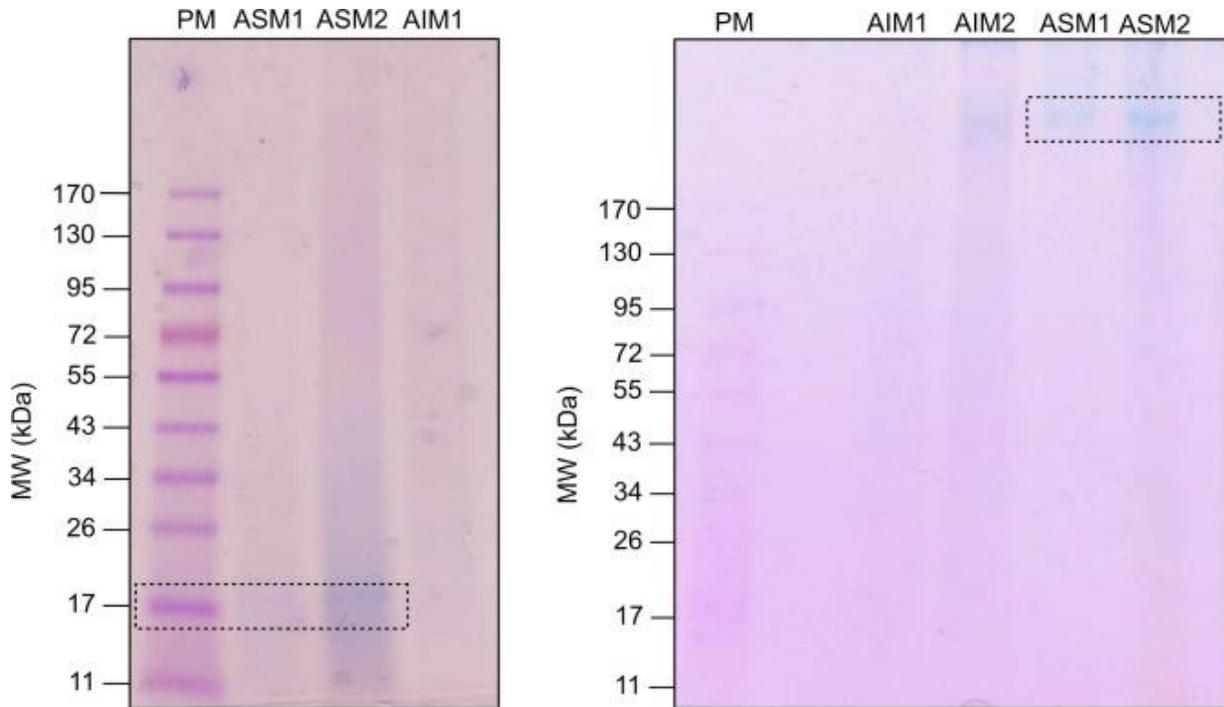


**Supplementary Figure 2:** 75.4 MHz  $^{13}\text{C}$  CP and DE MAS NMR spectra of the acid insoluble extract (AIM1) of *Spirula spirula* shell from the Canaries, and CPMAS spectrum of the  $\alpha$ -chitin reference (Sigma). The quantitative DE spectrum confirms that the organic content consists primarily of chitin (bottom). The peak labelled by \* in the DE spectrum is from a Teflon (PTFE) spacer in the rotor.

The blue dashed lines denote the characteristic peaks of chitin; the brown dashed lines (short) denote the additional peaks (partially resolved) at 102.6, 86.3, and 71.5 ppm



**Supplementary Figure 3:** Additional SDS-Page gels after carbocyanine (Stains-all) staining, showing two more discrete bands on the ASMs, one at 17kDa and another one at very high molecular weight.



Legend : **blue** = shared by the 4 extracts ; **green** = shared by 3 extracts; **yellow** = shared by 2 extracts.

The percentage of coverage is indicated for each extract, in the following order: AIM1, AIM2, ASM1, ASM2.

**Supplementary Data 1** : Summary of the identified proteins in the *S. spirula* transcriptome.

**Gene.17747::c51579\_g4\_i1::g.17747::m.17747**      **Gene.17747::c51579\_g4\_i1::g.17747**  
**ORF type:complete len:317 (+) c51579\_g4\_i1:88-1038(+)**

MGFLSSSSSLLMFVAIFGLTCADQLTLCVTSQKEMDKCETFIDITCVL  
GTDGIDCVNKINKNEANITTLGGDIYLAGKCHNIKPIMTECTTDMASAGIG  
YYAVAVAKISSNVTIKTLKGVKSCHTGVNKTSGWYVPMSILFKNK**NNQLE**  
**QASAFFSESCVPGAKPNSNLCRLCTPNCNRNSDNSYYGYSGAARCLEETE**  
**ADVAFVKHLTFLSKANKNNFKLLCKDGSTTSIDNYIHCYLAKVPSHAIVA**  
**KKETTQOEINDIFTRLHRTSTDILFSQNYGKNTIFSSSTTSLRTTYGTYTDYL**  
**GTDYINALPEKVC\***

**Number of Aa:** 293

**Theoretical pI:** 7.89

**Molecular Weight:** 32275.55

**Covering %:** 50.1% ; 59.7% ; 36.2% ;  
35.5%

**Dominant Aa:**

- Thr (T) 10.9 %

- Ile (I) 6.8%

- Asn (N), Lys (K), Ser (S) 8.2%

- Ala (A) 6.1%

- Leu (L) 7.2%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 28

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 30

**Blast against Mollusca database on NCBI :**

serotransferrin-like [Octopus vulgaris] 98% / 9e-125 / 60.21% [XP\_029651218.1]

transferrin [Sepioteuthis lessoniana] 97% / 9e-63 / 40.84% [QGK85629.1]

hypothetical protein OCBIM\_22010792mg [Octopus bimaculoides] 99% / 2e-58 / 37.50%  
[KOF90658.1]

PREDICTED: transferrin-like [Octopus bimaculoides] 99% / 3e-58 / 37.50%  
[XP\_014770899.1]

Legend : blue = shared by the 4 extracts ; green = shared by 3 extracts; yellow = shared by 2 extracts.

The percentage of coverage is indicated for each extract, in the following order: AIM1, AIM2, ASM1, ASM2.

transferrin-like protein [*Haliotis discus discus*] 98% / 7e-56 / 38.08% [AKS25341.1]

Legend : **blue** = shared by the 4 extracts ; **green** = shared by 3 extracts; **yellow** = shared by 2 extracts.

The percentage of coverage is indicated for each extract, in the following order: AIM1, AIM2, ASM1, ASM2.

Gene.30402::c83709\_g1\_i1::g.30402::m.30402      Gene.30402::c83709\_g1\_i1::g.30402

ORF type:complete len:377 (+) c83709\_g1\_i1:199-1329(+)

MCDDDVAALVVDNGSGMCK**AGFAGDDAPRA**VFPSIVGRPRHQGVMV  
GMGQKDSYVGDEAQSQRGILTLKYPIEHGIVTNWDDMEKIWHHTFYNEL  
R**VAPEEHPVLLTEAPLNPK**ANREKMTQIMFETFNAPAMYVAIQAVLSLYA  
SGRRTTGIVLDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILRLDLAGRDLTDYLMKILTE  
R**GYSFTTTAERE**IIVRDIKEKLCYVALDFEQEMATAASSSSLEK**SYELPDGQ**  
**VITIGNER**FRCPESLFQPSFLGMESAGIHETTYNSIMKCDVDIRKDLYANTV  
LSGGTTMFPGIADRMQKEITSLAPSTMKIKIIPPERKYSVWIGGSILASLST  
FQQMWISK**QEYDESGPSIVHR**KCF\*

**Number of Aa:** 376

**Theoretical pI:** 5.29

**Molecular Weight:** 41777.73

**Covering %:** 17.81% ; 17.81% ;  
14.36% ; 13.6%

**Dominant Aa:**

- Ala (A) 7.7%

- Glu (E) 6.9%

- Gly (G), Leu (L) 7.4%

- Thr (T) 6.6%

- Ile (I), Ser (S) 7.2%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 49

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 37

**Blast against Mollusca database on NCBI :**

PREDICTED: actin, adductor muscle [Octopus bimaculoides] 100%/ 0.0 / 100.00%  
[XP\_014771927.1]

hypothetical protein LOTGIDRAFT\_193218 [Lottia gigantea] 100%/ 0.0 / 99.73%  
[XP\_009060604.1]

actin, adductor muscle [Crassostrea virginica] 100% / 0.0 / 99.47% [XP\_022325998.1]

Legend : **blue** = shared by the 4 extracts ; **green** = shared by 3 extracts; **yellow** = shared by 2 extracts.

The percentage of coverage is indicated for each extract, in the following order: AIM1, AIM2, ASM1, ASM2.

actin [*Heterololigo bleekeri*] 100% / 0.0 / 99.47% [ADU19851.1]

actin [*Octopus vulgaris*] 100% / 0.0 / 99.20% [ACM77788.1]

beta-actin [*Azumapecten farreri*] 100% / 0.0 / 99.20% [AHN65064.1]

Legend : **blue** = shared by the 4 extracts ; **green** = shared by 3 extracts; **yellow** = shared by 2 extracts.

The percentage of coverage is indicated for each extract, in the following order: AIM1, AIM2, ASM1, ASM2.

Gene.6259::c39304\_g1\_i1::g.6259::m.6259 Gene.6259::c39304\_g1\_i1::g.6259 ORF  
type:internal len:285 (+) c39304\_g1\_i1:2-853(+)

FYVMYK**TSFPFGLAEIR**LQKMTGYLSKNKTR**CPPDDSNIEELCK**GDSG  
YSCPNMTFEESDGVAVRNVSMYVVTGEPTTGANCSFSSARFTQYMGNHH  
YFMGENSQSKMRRTIPVMTKAIRISSHEDPCQKKYQMIFYVNTAHLDES  
NLPCPTQAGVMLQKVENMQLYVK**TFNGNPDTDMSQAK**DMFTKELDGNN  
MNYINGNHYIAQYRGHGPMFGRTMEIWVEKTVPQYVTVCRGTAGTAETS  
SASFLSTPTTAPQTSSPSFLGTTSTTAPQTSSPSFLGTT

**Number of Aa:** 284

**Theoretical pI:** 7.72

**Molecular Weight:** 31594.53

**Covering %:** 13.38% ; 7% ; 7% ; 7%

**Dominant Aa:**

- Thr (T) 11.6%

- Gly (G) 7%

- Ser (S) 9.5%

- Asn (N), Pro (P) 6%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 24

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 25

**Blast against Mollusca database on NCBI :**

PREDICTED: uncharacterized protein LOC106876168 [Octopus bimaculoides] 67% / 6e-52 / 45.36% [XP\_014780085.1]

uncharacterized protein LOC115225721 [Octopus vulgaris] 69% / 7e-49 / 42.71% [XP\_029652506.1]

hypothetical protein EGW08\_012692 [Elysia chlorotica] 52% / 8e-11 / 27.33% [RUS79562.1]

heme-binding protein 2-like [Crassostrea virginica] 67% / 1e-08 / 26.94% [XP\_022345420.1]

hypothetical protein EGW08\_004780 [Elysia chlorotica] 64% / 4e-08 / 25.67% [RUS87464.1]

Legend : blue = shared by the 4 extracts ; green = shared by 3 extracts; yellow = shared by 2 extracts.

The percentage of coverage is indicated for each extract, in the following order: AIM1, AIM2, ASM1, ASM2.

PREDICTED: heme-binding protein 2 [Crassostrea gigas] 51% / 2e-06 / 27.70% [XP\_011425608.1]

Legend : **blue** = shared by the 4 extracts ; **green** = shared by 3 extracts; **yellow** = shared by 2 extracts.

The percentage of coverage is indicated for each extract, in the following order: AIM1, AIM2, ASM1, ASM2.

Gene.18409::c51852\_g1\_i1::g.18409::m.18409      Gene.18409::c51852\_g1\_i1::g.18409

ORF type:5prime\_partial len:102 (+) c51852\_g1\_i1:3-308(+)

FELEDILAKMGLTDLFDEQKSDLSGMVSEVKQLYVSKVIHKAFVEVNE  
EGTEAAAATAGIMCAMS LAMGIEFKADHPFMFSIVDKQSKAVLFVGRVIN  
PQN\*

**Number of Aa:** 101

**Theoretical pI:** 4.74

**Molecular Weight:** 11071.82

**Covering %:** 30.7% ; 30.7% ; 21.8% ;  
30.7%

**Dominant Aa:**

- Ala (A) 10%

- Glu (E) 8.9%

- Val (V) 9.9%

- Leu (L), Lys (K) 7.9%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 15

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 9

**Blast against Mollusca database on NCBI :**

leukocyte elastase inhibitor-like isoform X4 [Octopus vulgaris] 98% / 2e-34 / 55.56%  
[XP\_029647970.1]

leukocyte elastase inhibitor-like isoform X1 [Octopus vulgaris] 98% / 3e-34 / 55.56%  
[XP\_029647966.1]

hypothetical protein OCBIM\_22028248mg [Octopus bimaculoides] 98% / 3e-33 /  
55.56% [KOG01103.1]

Legend : **blue** = shared by the 4 extracts ; **green** = shared by 3 extracts; **yellow** = shared by 2 extracts.

The percentage of coverage is indicated for each extract, in the following order: AIM1, AIM2, ASM1, ASM2.

**Gene.528::c4884\_g1\_i1::g.528::m.528 Gene.528::c4884\_g1\_i1::g.528 ORF type:internal len:127 (-) c4884\_g1\_i1:1-378(-)**

NTLLISNMWIKVILFATLVILGNAFILDDINPAPRSLDALLAELKDREAR  
NPGDNLQEECEGKPADIAFIIDSSRSIYPPDYDK**GIAFLQNFVKLFQIGPDNV**  
**RIAAVSFGQRVITDSAFGFDQHN**

**Number of Aa:** 102

**Theoretical pI:** 4.45

**Molecular Weight:** 11353.69

**Covering %:** 19.6% ; 19.6% ; 9.8% ;  
18.6%

**Dominant Aa:**

- Asp (D) 11.8%

- Leu (L), Phe (F) 7.8%

- Ala (A), Ile (I) 9.8%

- Pro (P) 6.9%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 17

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 10

**Blast against Mollusca database on NCBI :**

matrilin-4-like [Octopus vulgaris] 93% / 6e-21 / 43.16% / [XP\_029654105.1]

PREDICTED: collagen alpha-1(XXI) chain-like [Aplysia californica] 86% / 3e-20 /  
43.82% [XP\_012936662.1]

PREDICTED: uncharacterized protein LOC106870666 [Octopus bimaculoides] 92% / 3e-  
19 / 42.55% [XP\_014772302.1]

collagen alpha-1(XII) chain-like [Octopus vulgaris] 88% / 1e-18 / 41.30%  
[XP\_029655835.1]

Legend : **blue** = shared by the 4 extracts ; **green** = shared by 3 extracts; **yellow** = shared by 2 extracts.

The percentage of coverage is indicated for each extract, in the following order: AIM1, AIM2, ASM1, ASM2.

Gene.14457::c49725\_g1\_i1::g.14457::m.14457      Gene.14457::c49725\_g1\_i1::g.14457

ORF type:complete len:233 (+) c49725\_g1\_i1:431-1129(+)

MERVLDYCNISHRRRRYFYIMMKLLSFVLFLSLIPAFLLSTTAKPKGPKVTDKVFDD  
IKIGDKPAGR**IVIGLFGK**TVPKTVKNFKTLAEGTMTKGDKPLTYKGSSFHRVIPAFMIQ  
GGDFTKGDGTGGVSIYGEKFSDENFKLKHYGAGWLSMANAGKDTNGSQFFITTKITE  
WLDGRHVVFVGKVLGEMKVVREIENTKTGEQNRPVVPVIIADCGSLPVDQPFVASKAS  
ADK\*

**Number of Aa:** 232

**Theoretical pI:** 9.70

**Molecular Weight:** 25699.94

**Covering %:** 3.44% ; 3.44% ; 3.44%

;

3.44%

**Dominant Aa:**

- Lys (K) 10.8%

- Val (V) 8.2%

- Gly (G) 10.3%

- Phe (P), Thr (T) 7.3%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 22

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 35

**Blast against Mollusca database on NCBI :**

peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B-like isoform X1 [Octopus vulgaris] 100% / 2e-171 / 99.57% [XP\_029633390.1]

peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B-like isoform X1 [Octopus vulgaris]100% / 8e-169 / 98.28% [XP\_029633393.1]

peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B-like isoform X2 [Octopus vulgaris]100% / 8e-135 / 82.76% [XP\_029633391.1]

peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B-like isoform X2 [Octopus vulgaris] 100% / 3e-132 / 81.47% [XP\_029633394.1]

Legend : blue = shared by the 4 extracts ; green = shared by 3 extracts; yellow = shared by 2 extracts.

The percentage of coverage is indicated for each extract, in the following order: AIM1, AIM2, ASM1, ASM2.

Legend : **blue** = shared by the 4 extracts ; **green** = shared by 3 extracts; **yellow** = shared by 2 extracts.

The percentage of coverage is indicated for each extract, in the following order: AIM1, AIM2, ASM1, ASM2.

**Gene.11159::c46950\_g1\_i2::g.11159::m.11159**    **Gene.11159::c46950\_g1\_i2::g.11159**

**ORF type:5prime\_partial len:158 (+) c46950\_g1\_i2:2-475(+)** AIM1,AIM2,ASM1

INVTVAGLTGAGEVKCSRDVVIKPKDSLEDAVASQYNAVVIPGGLKGS  
QSIGESSAVKTLLEAQEKRGAYIAAICAGPTALMSHGIFKGKKLTSYPSFKD  
**KLSSGGYQYSEDR**VVVDGKLITSRGPGTAFEFALAIVKALVSKEKADSLV  
APMLIKM\*

**Number of Aa:** 157

**Theoretical pI:** 9.19

**Molecular Weight:** 16380.00

**Covering %:** 7.6% ; 21,6% ; 7.6%

**Dominant Aa:**

- Ala (A) 11.5%

- Val (V) 9.6%

- Gly (G), Lys (K), Ser (S) 10.2%

- Leu (L) 8.3%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 15

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 20

**Blast against Mollusca database on NCBI :**

protein/nucleic acid deglycase DJ-1-like [Octopus vulgaris] 100% / 4e-77 / 71.52%[XP\_029651542.1]

hypothetical protein LOTGIDRAFT\_223821 [Lottia gigantea] 100% / 1e-64 / 62.66% [XP\_009044749.1]

protein/nucleic acid deglycase DJ-1-like [Pomacea canaliculata] 100% / 4e-61 / 60.13% [XP\_025082706.1]

hypothetical protein EGW08\_011224 [Elysia chlorotica] 100% / 1e-60 / 60.76% [RUS81019.1]

PREDICTED: protein deglycase DJ-1-like [Aplysia californica] 100% / 3e-60 / 63.29% [XP\_005099056.1]

Legend : blue = shared by the 4 extracts ; green = shared by 3 extracts; yellow = shared by 2 extracts.

The percentage of coverage is indicated for each extract, in the following order: AIM1, AIM2, ASM1, ASM2.

Gene.8870::c44075\_g1\_i1::g.8870::m.8870 Gene.8870::c44075\_g1\_i1::g.8870 ORF  
type:complete len:104 (+) c44075\_g1\_i1:161-472(+) AIM1, AIM2, ASM2

MSGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVLRDNIQGITKPAIRRLARRGGVKRISGL  
IYEETRGV LKVFLENVIRDAVTYTEHAKRKTVTAMDVVYALKRQGR TLYGFG  
G\*

**Number of Aa:** 103

**Theoretical pI:** 11.36

**Molecular Weight:** 11367.34

**Covering %:** 9.7% ; 9.7% ; 17.4%

**Dominant Aa:**

- Gly (G) 16.5%

- Val (V) 8.7%

- Arg (R) 13.6%

- Leu (L) 7.8%

- Lys (K) 10.7%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 7

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 25

**Blast against Mollusca database on NCBI :**

hypothetical protein LOTGIDRAFT\_175997 [Lottia gigantea] 100% / 1e-67 / 100.00%  
[XP\_009062584.1]

histone H3-like [Crassostrea virginica] 100% / 2e-67 / 100.00% [XP\_022313759.1]

histone H3-like [Crassostrea virginica] 100% / 2e-67 / 100.00% [XP\_022314759.1]

histone H3-like [Crassostrea virginica] 100% / 3e-67 / 100.00% [XP\_022319408.1]

PREDICTED: histone H4-like [Octopus bimaculoides] 100% / 4e-67 / 99.03%  
[XP\_014775990.1]

Legend : **blue** = shared by the 4 extracts ; **green** = shared by 3 extracts; **yellow** = shared by 2 extracts.

The percentage of coverage is indicated for each extract, in the following order: AIM1, AIM2, ASM1, ASM2.

**Gene.29156::c71926\_g1\_i1::g.29156** **Gene.29156::c71926\_g1\_i1::g.29156**

**ORF type:5prime\_partial len:180 (+) c71926\_g1\_i1:3-542(+)** AIM1, AIM2, ASM2

ENEAFLLVGIRHCTTLQWLLNMQIFVKTLTGK**TITLEVEPSDTIENVK**  
AKIQDKEGIPPDQQLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLGGAK  
KRKKKNYTTTPKKNKHKKKKVKLAVLKYYKVDENGKITRLRRECPNEECG  
AGVFMASHFDRHYCGKCYLTYVFNKPEERQ\*

**Number of Aa:** 179

**Theoretical pI:** 9.65

**Molecular Weight:** 20845.24

**Covering %:** 8.9%

**Dominant Aa:**

- Lys (K) 14%

- Thr (T) 7.3%

- Leu (L) 10.1%

- Arg (R), Gly (G) 6.1%

- Glu (E) 7.8%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 21

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 36

**Blast against Mollusca database on NCBI :**

PREDICTED: ubiquitin-40S ribosomal protein S27a [Octopus bimaculoides] 87% / 6e-114 / 100.00% [XP\_014787008.1]

ubiquitin-40S ribosomal protein S27a isoform X2 [Pomacea canaliculata] 87% / 8e-111 / 98.08% [XP\_025105321.1]

ubiquitin-40S ribosomal protein S27a isoform X1 [Pomacea canaliculata] 87% / 8e-111 / 98.08% [XP\_025105320.1]

ubiquitin-40S ribosomal protein S27a [Crassostrea gigas] 87% / 5e-110 / 98.08% [NP\_001292281.1]

Legend : **blue** = shared by the 4 extracts ; **green** = shared by 3 extracts; **yellow** = shared by 2 extracts.

The percentage of coverage is indicated for each extract, in the following order: AIM1, AIM2, ASM1, ASM2.

ubiquitin-ribosomal protein S27a [Mytilus trossulus] 88% / 7e-109 / 96.20%  
[AIL82417.1]

Legend : **blue** = shared by the 4 extracts ; **green** = shared by 3 extracts; **yellow** = shared by 2 extracts.

The percentage of coverage is indicated for each extract, in the following order: AIM1, AIM2, ASM1, ASM2.

**Gene.30838::c85946\_g1\_i1::g.30838**      **Gene.30838::c85946\_g1\_i1::g.30838**

**ORF type:internal len:120 (-) c85946\_g1\_i1:2-358(-)** AIM1, AIM2, ASM1

ALPILNFKFSSKEKQITK**LFNHGVDGCFDVAIPFTVEK**MANLEVEGKAL  
EDNDGYTFFGKHVLQISQDLLVILVQSDKPVYKPGQTVKFRILGFTRDLKA  
WSGVIKKIIITDPKNTRIA

**Number of Aa:** 119

**Theoretical pI:** 9.24

**Molecular Weight:** 13396.67

**Covering %:** 16.8%

**Dominant Aa:**

- Lys (K) 11.8%

- Val (V) 8.4%

- Ile (I), Leu (L) 9.2%

- Phe (P) 7.6%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 13

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 17

**Blast against Mollusca database on NCBI :**

pregnancy zone protein-like [Octopus vulgaris] 92% / 3e-26 / 47.27% [XP\_029638059.1]

PREDICTED: pregnancy zone protein-like [Octopus bimaculoides] 92% / 9e-26 / 47.79%  
[XP\_014770566.1]

alpha-2-macroglobulin-P-like isoform X7 [Pomacea canaliculata] 88% / 2e-14 / 39.09%  
[XP\_025078480.1]

murinoglobulin-1-like isoform X3 [Pomacea canaliculata] 88% / 2e-14 / 39.09%  
[XP\_025078475.1]

murinoglobulin-1-like isoform X9 [Pomacea canaliculata] 88% / 2e-14 / 39.09%  
[XP\_025078482.1]

Legend : **blue** = shared by the 4 extracts ; **green** = shared by 3 extracts; **yellow** = shared by 2 extracts.

The percentage of coverage is indicated for each extract, in the following order: AIM1, AIM2, ASM1, ASM2.

**Gene.27770::c59912\_g1\_i1::g.27770::m.27770 Gene.27770::c59912\_g1\_i1::g.27770**

**ORF type:5prime\_partial len:130 (-) c59912\_g1\_i1:570-959(-)** AIM1, AIM2, ASM2

RITTMPPAPATASKGAKKASKAKASRPPGDKKRKKRKRKESYSIYIKV  
MKQVHPDTGISSKAMSIMNSFVNDLFEIASEASRLAHYNKRSTISSREVQ  
TAVR**LLP**GELAKHAVSEGTKAVTKYTSSK\*

**Number of Aa:** 129

**Theoretical pI:** 10.45

**Molecular Weight:** 14210.50

**Covering %:** 7%

**Dominant Aa:**

- Lys (K) 14.7%

- Ala (A) 11.6%

- Ser (S) 13.2%

- Arg (R), Thr (T) 7%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 9

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 28

**Blast against Mollusca database on NCBI :**

histone H2B, gonadal-like [Octopus vulgaris] 96% / 2e-86 / 100.00% [XP\_029640618.1]

PREDICTED: histone H2B, gonadal-like [Octopus bimaculoides] 99% / 2e-85 / 96.88% [XP\_014775991.1]

histone H2B, gonadal-like [Octopus vulgaris] 96% / 2e-85 / 99.20% [XP\_029643621.1]

hypothetical protein OCBIM\_22023917mg [Octopus bimaculoides] 96% / 5e-85 / 98.40% [KOF83378.1]

Legend : **blue** = shared by the 4 extracts ; **green** = shared by 3 extracts; **yellow** = shared by 2 extracts.

The percentage of coverage is indicated for each extract, in the following order: AIM1, AIM2, ASM1, ASM2.

**Gene.3282::c29067\_g1\_i1::g.3282::m.3282 Gene.3282::c29067\_g1\_i1::g.3282 ORF type:complete len:137 (+) c29067\_g1\_i1:238-648(+)** AIM1, AIM2, ASM2

MARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKSAPSTGGVKKPHRYRPGT  
VALREIRRYQK**STELLIR**KLPFQRLVREIAQDFKTDLRFQSA AIGALQEASE  
AYLVGLFEDTNLCAIHAKRVTIMPKDIQLARRIRGERA\*

**Number of Aa:** 136

**Theoretical pI:** 11.27

**Molecular Weight:** 15327.91

**Covering %:** 5%

**Dominant Aa:**

- Ala (A), Arg (R) 13.2%

- Leu (L) 8.8%

- Lys (K) 9.6%

- Thr (T) 7.4%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 11

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 31

**Blast against Mollusca database on NCBI :**

histone 3 [Aplysia californica] 100% / 2e-95 / 100.00% [NP\_001191424.1]

histone H3.3 [Mytilus edulis] 100% / 8e-95 / 99.26% [AIS25385.1]

histone H3 [Haliotis discus discus] 100% / 8e-95 / 99.26% [ABO26658.1]

histone H3.3 [Mytilus galloprovincialis] 100% / 8e-95 / 99.26% [AIS25392.1]

Legend : **blue** = shared by the 4 extracts ; **green** = shared by 3 extracts; **yellow** = shared by 2 extracts.

The percentage of coverage is indicated for each extract, in the following order: AIM1, AIM2, ASM1, ASM2.

**Gene.29715::c75923\_g1\_i1::g.29715**      **Gene.29715::c75923\_g1\_i1::g.29715**

**ORF type:internal len:148 (-) c75923\_g1\_i1:2-442(-)** AIM2, ASM1, ASM2

LLDSINITGKTRFFRLSSRSLLNPSSGVAPTQLWPSFLPVNIFSSMPGLML  
KIAIVLTDGKSDNFDKTKAEAELLK**SQGVEMTAIGVGR**GAALEELK**AIASS**  
**GETVFK**VDSYDALKDITQTLGFITCKVTTTAAPITTAITTTTTTT

**Number of Aa:** 147

**Theoretical pI:** 8.05

**Molecular Weight:** 15590.98

**Covering %:** 22.5% ; 9% ; 9%

**Dominant Aa:**

- Thr (T) 15%

- Ala (A) 8.8%

- Leu (L) 10.9%

- Ile (I) 7.5%

- Ser (S) 9.5%

- Gly (G), Lys (K) 6.8%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 13

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 14

**Blast against Mollusca database on NCBI :**

PREDICTED: uncharacterized protein LOC106870666 [Octopus bimaculoides] 73% / 1e-17 / 39.17% [XP\_014772302.1]

hypothetical protein OCBIM\_22014598mg [Octopus bimaculoides] 73% / 2e-17 / 39.17% [KOF88655.1]

matrilin-4-like [Octopus vulgaris] 63% / 5e-17 / 42.55% [XP\_029654105.1]

collagen alpha-1(XII) chain-like [Octopus vulgaris] 53% / 4e-16 / 52.50% [XP\_029635147.1]

PREDICTED: collagen alpha-1(XII) chain-like [Octopus bimaculoides] 53% / 5e-16 / 52.50% [XP\_014771413.1]

Legend : **blue** = shared by the 4 extracts ; **green** = shared by 3 extracts; **yellow** = shared by 2 extracts.

The percentage of coverage is indicated for each extract, in the following order: AIM1, AIM2, ASM1, ASM2.

Gene.6822::c40400\_g1\_i1::g.6822::m.6822 Gene.6822::c40400\_g1\_i1::g.6822 ORF  
type:5prime\_partial len:142 (+) c40400\_g1\_i1:2-427(+) AIM1, AIM2

SRNGKTLTYKGS GFHRVIK **GFMIQAGDFTKGDGTGGLSIYGDR**FNDEN  
FKLKHYGAGWLSMANAGKDTNGSQFFITTEKTQWLDGRHV VFGVVLEG  
MNVVRKIESTKTESGDKPSKKVVIEDCGSLPVAEPFAVEKKA AAE\*

**Number of Aa:** 141

**Theoretical pI:** 8.97

**Molecular Weight:** 15339.34

**Covering %:** 17%

**Dominant Aa:**

- Gly (G) 13.5%

- Thr (T) 7.1%

- Lys (K) 10.6%

- Ala (A), Glu (E), Ser (S) 6.4%

- Val (V) 7.8%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 17

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 20

**Blast against Mollusca database on NCBI :**

hypothetical protein OCBIM\_22031994mg [Octopus bimaculoides] 97% / 1e-76 / 77.70%  
[KOF77541.1]

PREDICTED: peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B-like [Octopus bimaculoides] 97% /  
2e-76 / 77.70% [XP\_014780153.1]

peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B-like [Crassostrea virginica] 97%/2e-76/  
77.54%[XP\_022330620.1]

PREDICTED: peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B [Crassostrea gigas] 97% / 2e-76 /  
78.26% [XP\_019921722.1]

PREDICTED: peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B-like [Aplysia californica] 99% / 5e-  
76 / 76.60% [XP\_005104908.1]

Legend : blue = shared by the 4 extracts ; green = shared by 3 extracts; yellow = shared by 2 extracts.

The percentage of coverage is indicated for each extract, in the following order: AIM1, AIM2, ASM1, ASM2.

Legend : **blue** = shared by the 4 extracts ; **green** = shared by 3 extracts; **yellow** = shared by 2 extracts.

The percentage of coverage is indicated for each extract, in the following order: AIM1, AIM2, ASM1, ASM2.

**Gene.3286::c29074\_g1\_i1::g.3286::m.3286 Gene.3286::c29074\_g1\_i1::g.3286 ORF type:complete len:190 (-) c29074\_g1\_i1:75-644(-) AIM1, AIM2**

MGNRHSKKKLTKEDMQFLTKHTHFGESQIKIWYQGFMKDCPKGLLSK  
DKLMEVYSDFRQGNPEMFCDHVFRTFDHDNSGHIDFKEFMLAISVTSAR  
DPKEKLNWAFTMYDKNKDGTEKSEMVEIITAIYEMLGCTDSQEPPEKRTE  
SIFHKMDVNNDGVLSKEEFITGCLDDDDLRQMLTVDAICPP\*

**Number of Aa:** 189

**Theoretical pI:** 5.26

**Molecular Weight:** 21978.03

**Covering %:** 5.3%

**Dominant Aa:**

- Asp (D), Lys (K) 10.1%

- Leu (L) 6.9%

- Glu (E) 7.9%

- Phe (P), Thr (T) 6.3%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 34

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 25

**Blast against Mollusca database on NCBI :**

PREDICTED: neuronal calcium sensor 2-like [Octopus bimaculoides] 100% / 2e-141 / 99.47% [XP\_014776191.1]

neuronal calcium sensor 2-like [Octopus vulgaris] 80% / 3e-112 / 100.00% [XP\_029638865.1]

neuronal calcium sensor 2-like [Crassostrea virginica] 97% / 2e-84 / 63.83% [XP\_022315889.1]

neuronal calcium sensor 2-like [Mizuhopecten yessoensis] 97% / 2e-81 / 61.70% [XP\_021350806.1]

Inerpro site : calcium-ion binding (EF-hand domains), Interacting selectively and non-covalently with calcium ions (Ca<sup>2+</sup>).

Legend : **blue** = shared by the 4 extracts ; **green** = shared by 3 extracts; **yellow** = shared by 2 extracts.

The percentage of coverage is indicated for each extract, in the following order: AIM1, AIM2, ASM1, ASM2.

Gene.13881::c49322\_g1\_i1::g.13881::m.13881      Gene.13881::c49322\_g1\_i1::g.13881

ORF type:complete len:861 (-) c49322\_g1\_i1:165-2747(-) AIM1, AIM2

MDQKSFDLLDTLDIHVEVLDNIHQGRKIFKAAITLTNHCSVPLEPGPW  
AIYLCHIRLIEPKYLSKNSFAELTEYGVKFSHVNGSLFKLEPLESFKTLTNN  
DSVKIIFLAQYYSVAKTDVLPNWYMTYPDLIPRIKCTADEDLNFVVGQFNK  
PSQWKRYDYELADGKRRYDIYDPFTPVKVRFERNLSAYSSNEEIKPVIPTPL  
QMVCSTKCIYLREGNWVIYTKDLTSLKDAEYLSGKLQLKIVSQLPETKYI  
YLKLVPSVQLPPQKHSLSKEAYTLTVDCLEDVIEITASTSQGLFWGIQSLLS  
LYKDERIPEVKIVDAPRYEYRGLHVDVVRNRFHGKQEMFKLIDSMIMYKM  
NKLHLHLTDDEGWRIEIPGLEEMTSVGGYRGHNASGDCHILPLLGS GPNSD  
TSGSGYYSVKDYREILLYATERHVEIPEVDMPGHCNAAIQAVKSHYEKLC  
SAGKMEEAAKYMLHESSEVQSSVTTQSCQLFHENLLNPGLESTFNFVEMV  
VLALKEMHEDIAPLRVFHFGGDEVPIDMWEESPACRKLFNSSDIVTLDDL  
LEHFVRRVAAIVYKHGLSLGAWQDGMV SIDGPFERSSIPQEDVLVYAWQN  
VWESGKANAIYMLANAGYK**VVMSQATHLYFDHPYEPDPEER**GLYWAAR  
FIDTEKVFKFIPDDLYANADYKLTGEPLSIDDIKTYEKKIVNLKVPENIIGIQ  
GQLWSELVRTSEQLECMVFPRLIAMAERA WHKASWEDETDKCKRDAEST  
KDWASLAKTLGTKELSRLEQAHIAYHLVPPGARFLEDGRLEVNCTYPGLPI  
QYSIDNGETWTTQSNPIPIPSNTKVLLQTSSTDRHRSSRQIELLSPNIS\*

**Number of Aa:** 860

**Theoretical pI:** 5.38

**Molecular Weight:** 98399.13

**Covering %:** 2.6%

**Dominant Aa:**

- Leu (L) 10.2%

- Ile (I) 6.6%

- Glu (E) 8%

- Lys (K) 6.5%

- Ser (S) 7.6%

Asp (D), Val (V) 6%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 121

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 90

Legend : **blue** = shared by the 4 extracts ; **green** = shared by 3 extracts; **yellow** = shared by 2 extracts.

The percentage of coverage is indicated for each extract, in the following order: AIM1, AIM2, ASM1, ASM2.

**Blast against Mollusca database on NCBI :**

uncharacterized protein LOC115210690 [Octopus vulgaris] 100% / 0.0 / 99.88%  
[XP\_029635231.1]

PREDICTED: N,N'-diacetylchitobiase-like [Octopus bimaculoides] 100% / 0.0 / 97.56%  
[XP\_014790058.1]

Chitobiase [Mizuhopecten yessoensis] 99% / 0.0 / 50.75% [OWF39511.1]

uncharacterized protein LOC110464940 [Mizuhopecten yessoensis] 99% / 0.0 / 50.75%  
[XP\_021376103.1]

PREDICTED: uncharacterized protein LOC105324935 [Crassostrea gigas] 99% / 0.0 / 48.85% [XP\_011422500.1]

Legend : **blue** = shared by the 4 extracts ; **green** = shared by 3 extracts; **yellow** = shared by 2 extracts.

The percentage of coverage is indicated for each extract, in the following order: AIM1, AIM2, ASM1, ASM2.

**Gene.4192::c32486\_g1\_i1::g.4192::m.4192 Gene.4192::c32486\_g1\_i1::g.4192 ORF**  
**type:complete len:464 (+) c32486\_g1\_i1:197-1588(+)** AIM1, ASM2

MPKEKTHINIVVIGHVDSGKSTTTGHLIYKCGGIDKRVIEKFEKEAQEM  
GKGSFKYAWVLDKKAERERGITIDIALWKFETDKYCITIIDAPGHRDFIKN  
MITGTSQADCAVLVVAAGKGEFETGISKNGQTRHALLAYTLGVKQLIVA  
VNKMDTHEYDKSRFLEIVKEVSNYIKKIGYNPKAVAFVPSVSGWHGDNMM  
EKSTNMPWYEGWEIERKEGNCKGNTLFDNALDSIIPPQRPTERPLRLPLQDV  
YK**IGGIGTVPVGR**VETGVLKPGTVVTFAPAMVSTEVKSVEMHHESLPEAN  
PGDNVGFNVKNVSVKDLRRGYVAGDSKNDPPKETKCFDAQVIVINHPGQI  
GAGYSPVLDCHTAHIACKFTELKEKIDRRSGKKLEDSPKAIKSGDAAIVTL  
TPTKPMCVETFNEFPPLGRFAVRDMRQTVAVGVIKSVEHADTTSKVTKSA  
MKVNKASDKKK\*

**Number of Aa:** 463

**Theoretical pI:** 9.03

**Molecular Weight:** 51110.91

**Covering %:** 2.37% ; 1.7%

**Dominant Aa:**

- Lys (K) 10.8%

- Gly (G) 8.2%

- Val (V) 9.3%

- Glu (E), Ile (I), Thr (T) 6.9%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 57

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 68

**Blast against Mollusca database on NCBI :**

elongation factor 1-alpha-like [Octopus vulgaris] 100% / 0.0 / 100.00%  
[XP\_029633267.1]

PREDICTED: elongation factor 1-alpha-like [Octopus bimaculoides] 100% / 0.0 / 93.30%  
[XP\_014782958.1]

elongation factor 1 alpha [Sepioteuthis lessoniana] 99% / 0.0 / 87.88% [AYP74777.1]

elongation factor [Callistoctopus minor] 100% / 0.0 / 87.07% [AWD75468.1]

elongation factor 1 alpha [Octopus bimaculoides] 88% / 0.0 / 92.67% [AEJ33821.1]

Legend : blue = shared by the 4 extracts ; green = shared by 3 extracts; yellow = shared by 2 extracts.

The percentage of coverage is indicated for each extract, in the following order: AIM1, AIM2, ASM1, ASM2.

Gene.15595::c50454\_g1\_i1::g.15595::m.15595      Gene.15595::c50454\_g1\_i1::g.15595

ORF type:complete len:422 (+) c50454\_g1\_i1:281-1546(+) AIM1, AIM2

MNLCSYSQKMKPYTSIVHTIFLLLAGLKLLSAQETYYCGGKPADVYFL  
LDSSTSIWFVDFAKQIKFVENMIELFEVAPNKTRIGLGTFSNSFYPQFSFKD  
YTNKTQVIGALKSIRQNYGGTNTAKAIKEMREREFNPLGARQDVAHIAILL  
TDGKSWLSKTAEEAKIAKEKGVYMFVAVGIGSNVDLDELKGIASESNKKE  
SQFVFHVENFDALDSIKEILAIQTCEVVPNDQYRCGASGQADMIFLLDRLV  
MAPSRIQLIKDFIARTADLLDMGPNNPVRIGVFTDCPDEDIYLNHDNDKY  
SFIKELKVTKDKSRIHTLRRVHRVGFSGKNNGARTEARKLVILFVDSPLIDAK  
KVLLEAMKMKLSDIEIFVVTIGNEYLEKEMSRLASRKVKEHTIRVPSYSEL  
NDSVANFVNLIKEKL\*

**Number of Aa:** 389

**Theoretical pI:** 8.14

**Molecular Weight:** 44019.61

**Covering      %:**                      3.6%

**Dominant Aa:**

- Lys (K) 9%

- Ser (S), Val (V) 7.2%

- Leu (L) 8.2%

- Ala (A), Glu (E) 6.9%

- Ile (I) 8%

- Asp (D) 6.4%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 52

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 54

**Blast against Mollusca database on NCBI :**

collagen alpha-6(VI) chain-like [Octopus vulgaris] 100% / 0.0 / 100.00%  
[XP\_029635459.1]

PREDICTED: collagen alpha-4(VI) chain-like [Octopus bimaculoides] 100% / 0.0 /  
94.09% [XP\_014787765.1]

Legend : blue = shared by the 4 extracts ; green = shared by 3 extracts; yellow = shared by 2 extracts.

The percentage of coverage is indicated for each extract, in the following order: AIM1, AIM2, ASM1, ASM2.

PREDICTED: cartilage matrix protein-like [Octopus bimaculoides] 98% / 2e-74 / 38.52%  
[XP\_014791031.1]

collagen alpha-4(VI) chain-like isoform X1 [Pomacea canaliculata] 98% / 1e-72 / 34.54%  
[XP\_025076849.1]

hypothetical protein COQ70\_19708 [Pomacea canaliculata] 98% / 3e-71 / 34.37%  
[PVD19223.1]

Legend : **blue** = shared by the 4 extracts ; **green** = shared by 3 extracts; **yellow** = shared by 2 extracts.

The percentage of coverage is indicated for each extract, in the following order: AIM1, AIM2, ASM1, ASM2.

**Gene.2668::c24620\_g1\_i1::g.2668::m.2668 Gene.2668::c24620\_g1\_i1::g.2668 ORF**  
**type:internal len:164 (-) c24620\_g1\_i1:3-491(-)** AIM1, AIM2

FTPGEICSDCDEGFACKKDLCASETNFTLPYRETLAKKLIYPPHYQKNIRHMMSD  
GTKRSRRQLVNGEGSLTDTEEYLLSAHNTMRRRTEKPELKWSAYLSRWANYVIRC  
NIQYPGPRSA YTNFGKMKVETRRESSPIYQVVFEWGNEGYDVKEMESGCR

**Number of Aa:** 163

**Theoretical pI:** 8.49

**Molecular Weight:** 19128.56

**Covering %:** 5.5%, 9.8%

**Dominant Aa:**

- Glu (E) 9.2%

- Ser (S), Tyr (Y) 7.4%

- Arg (R) 8.6%

- Lys (K), Thr (T) 6.7%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 22

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 25

**Blast against Mollusca database on NCBI :**

GLIPR1-like protein 1 isoform X1 [Octopus vulgaris] 100% / 4e-63 / 58.90%  
[XP\_029635418.1]

GLIPR1-like protein 1 isoform X2 [Octopus vulgaris] 100% / 8e-57 / 55.83%  
[XP\_029635426.1]

hypothetical protein OCBIM\_22013032mg [Octopus bimaculoides] 57% / 2e-46 / 69.15%  
[KOF66248.1]

hypothetical protein OCBIM\_22013032mg [Octopus bimaculoides] 57% / 4e-43 / 61.11%  
[KOF66249.1]

PREDICTED: uncharacterized protein LOC106882199 isoform X2 [Octopus  
bimaculoides] 51% / 2e-39 / 66.67% [XP\_014788279.1]

Legend : **blue** = shared by the 4 extracts ; **green** = shared by 3 extracts; **yellow** = shared by 2 extracts.

The percentage of coverage is indicated for each extract, in the following order: AIM1, AIM2, ASM1, ASM2.

**Gene.27733::c58750\_g1\_i1::g.27733::m.27733**      **Gene.27733::c58750\_g1\_i1::g.27733**

**ORF type:internal len:119 (+) c58750\_g1\_i1:3-356(+)** AIM1, AIM2

SSDLNPKSLCALCPNNGTDCQRNSENKYDYSGAFRCLVETGADVAFVKHTTV  
SESTDGNGKEEWEKLNKSSNYKLLCKDGTAAVTEWSKCNLAK**VPAHAIVVR**NDA  
KLGELLFQI

**Number of Aa:** 118

**Theoretical pI:** 5.65

**Molecular Weight:** 12952.46

**Covering %:** 7.6%

**Dominant Aa:**

- Leu (L), Lys (K) 9.3%

- Asp (D), Glu (E), Thr (T), Val (V)

- Ala (A), Asn (N), Ser (S) 8.5%

6.8%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 16

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 14

**Blast against Mollusca database on NCBI :**

transferrin [Sepioteuthis lessoniana] 98% / 3e-57 / 76.07% [QGK85629.1]

hypothetical protein OCBIM\_22010792mg [Octopus bimaculoides] 96% / 1e-46 / 64.91%  
[KOF90658.1]

PREDICTED: transferrin-like [Octopus bimaculoides] 96% / 2e-46 / 64.91%  
[XP\_014770899.1]

LOW QUALITY PROTEIN: serotransferrin-1-like [Octopus vulgaris] 95% / 7e-42 /  
60.18% [XP\_029645846.1]

transferrin-like protein [Haliotis discus discus] 86% / 3e-33 / 58.00% [AKS25341.1]

Legend : **blue** = shared by the 4 extracts ; **green** = shared by 3 extracts; **yellow** = shared by 2 extracts.

The percentage of coverage is indicated for each extract, in the following order: AIM1, AIM2, ASM1, ASM2.

**Gene.7500::c41859\_g1\_i2::g.7500::m.7500 Gene.7500::c41859\_g1\_i2::g.7500 ORF type:5prime\_partial len:285 (+) c41859\_g1\_i2:1-855(+)** AIM1, AIM2

CVSAIFVKGGSLTLKFVCYIFEFPFALTFLRKMTEQSGNSKEDLVAKAK  
LAEQAERYDDMAVTMKKVTENGVELNNEERNLLSVAYKNVVGARRSSW  
RVISSIESKAENCERKLAMAKHYREKVELELKAICTEVLELLENYLISKAST  
TESKVFYLMKMGDYRYRLAEVAQGEERKGVLGHSQCAYKDAFDIAKNQ  
MQPTHPIRLGLALNFSVFYYEILNAPEKACCLAKQAFDEAIAELDQLNEES  
YK**DSTLIMQLLR**DNLTLWTSDTQCGDEEGGEGGDNN\*

**Number of Aa:** 284

**Theoretical pI:** 5.21

**Molecular Weight:** 32139.60

**Covering %:** 3.5%

**Dominant Aa:**

- Glu (E), Leu (L) 10.9%

- Lys (K) 8.5%

- Ala (A) 9.2%

- Ser (S) 6.3%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 44

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 36

**Blast against Mollusca database on NCBI :**

14-3-3 protein zeta/delta-like [Octopus vulgaris] 88% / 0.0 / 100.00% [XP\_029634804.1]

PREDICTED: 14-3-3 protein zeta/delta-like [Octopus bimaculoides] 88% / 0.0 / 98.81% [XP\_014785483.1]

hypothetical protein OCBIM\_22003454mg [Octopus bimaculoides] 88% / 4e-155 / 86.11% [KOF70107.1]

PREDICTED: 14-3-3 protein zeta-like [Biomphalaria glabrata] 87% / 7e-117 / 67.44% [XP\_013087187.1]

PREDICTED: 14-3-3 protein zeta-like [Aplysia californica] 87% / 5e-116 / 67.05% [XP\_005109589.1]

Legend : **blue** = shared by the 4 extracts ; **green** = shared by 3 extracts; **yellow** = shared by 2 extracts.

The percentage of coverage is indicated for each extract, in the following order: AIM1, AIM2, ASM1, ASM2.

Gene.17402::c51426\_g1\_i1::g.17402::m.17402      Gene.17402::c51426\_g1\_i1::g.17402

ORF type:complete len:578 (+) c51426\_g1\_i1:232-1965(+) AIM1, AIM2

MNNNSSVKTMYRKSSSNIPERNSVIFRKSRMYNTMNAQSPLSLGTGVA  
SSISHKGVTDIRC�REKEKKELQDLNERFANYIEKVRFLEAENKTLREALK  
KSKRDFNIEPIKAMYQAEIDETKKLLDDSTNENGLKARIGTLEDELDELNR  
VQLRHLTDVNDQQQCTIDTLNDDISRRVADCEMLRRKVQELEKQLADWK  
ARHGHLLEGQLHQVRLDLQEETAQRMGETNRANSLEDELNFLREVSDAEIK  
EYRALLSKDNSIPDMREYWTTELGNCLKEIREEFEGQLEGMSASMEARYQ  
SELNEMRLGASKGNAETAHMSEENKRLRSQKNDLEAKLLDCQAQIAQLT  
SQLRALQSEFQSVSADLESEKSEHRGDVDRLNGELEAMIKELRDLMDAKL  
SMELEIAAYRKLLEGEENRLSLGGVVQSIGGFQSHSEEALANALQNRASSG  
FHTPETGKITINRTASGTVSIAEVEPNGKYVQITESSKVGRPSTNLKNWKLV  
RTFDDGRATVTHVFKDNNVFATEKEVKIWSKFGNTKDGVVSSSVNEWG  
PLNVASRITLRDENDRERALLHVKYSG\*

**Number of Aa:** 577

**Theoretical pI:** 5.60

**Molecular Weight:** 65557.29

**Covering      %:**                      1.4%

**Dominant Aa:**

- Glu (E) 11.3%

- Arg (R) 7.6%

- Leu (L) 10.2%

- Lys (K) 7.1%

- Ser (S) 8.7%

- Ala (A), Asn (N) 6.8%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 98

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 85

**Blast against Mollusca database on NCBI :**

60 kDa neurofilament protein-like [Octopus vulgaris] 100% / 0.0 / 70.39%  
[XP\_029649249.1]

Legend : blue = shared by the 4 extracts ; green = shared by 3 extracts; yellow = shared by 2 extracts.

The percentage of coverage is indicated for each extract, in the following order: AIM1, AIM2, ASM1, ASM2.

PREDICTED: 60 kDa neurofilament protein-like [Octopus bimaculoides] 83% / 0.0 / 88.82% [XP\_014776803.1]

omega-crystallin [Enteroctopus dofleini] 100% / 0.0 / 68.87% [AAA16613.1]

70 kDa neurofilament protein-like [Octopus vulgaris] 98% / 0.0 / 55.82% [XP\_029649219.1]

Legend : **blue** = shared by the 4 extracts ; **green** = shared by 3 extracts; **yellow** = shared by 2 extracts.

The percentage of coverage is indicated for each extract, in the following order: AIM1, AIM2, ASM1, ASM2.

**Gene.7068::c40876\_g2\_i1::g.7068::m.7068 Gene.7068::c40876\_g2\_i1::g.7068 ORF type:internal len:181 (+) c40876\_g2\_i1:2-541(+)** AIM1, AIM2

WNNPNDKKTSEALKIVGEGFCILFGNSVAQSDAQEKVLQKSSTIIK**IVELLPRRFLP**  
PNEKIQITFGLHLVISCCPVSDICPDDSNLVSTVPNDQKLSLITNCIDCLSTLMMSSENV  
FIYNYLRPEVVLNLFLETSLSKIQKQKPNSQQALLMCYYRLLEYSISSIIIEGFTLCSILETY  
IM

**Number of Aa:** 180

**Theoretical pI:** 5.20

**Molecular Weight:** 20308.65

**Covering %:** 3.9%

**Dominant Aa:**

- Leu (L) 12.8%

- Asn (N) 6.7%

- Ser (S) 11.1%

- Glu (E), Lys (K), Val (V) 6.1%

- Ile (I) 10%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 18

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 15

**Blast against Mollusca database on NCBI :**

unhealthy ribosome biogenesis protein 2 homolog [Octopus vulgaris] 100% / 8e-117 / 98.89% [XP\_029647240.1]

PREDICTED: unhealthy ribosome biogenesis protein 2 homolog [Octopus bimaculoides] 100% / 8e-100 / 87.78% [XP\_014784498.1]

hypothetical protein OCBIM\_220010171mg [Octopus bimaculoides] 78% / 2e-77 / 88.03% [KOF71477.1]

hypothetical protein OCBIM\_220010177mg [Octopus bimaculoides] 21% / 6e-15 / 86.84% [KOF71476.1]

Legend : blue = shared by the 4 extracts ; green = shared by 3 extracts; yellow = shared by 2 extracts.

The percentage of coverage is indicated for each extract, in the following order: AIM1, AIM2, ASM1, ASM2.

**Supplementary Data 2:** List of the proteomic hits identified by MASCOT in one fraction only, on the four tested.

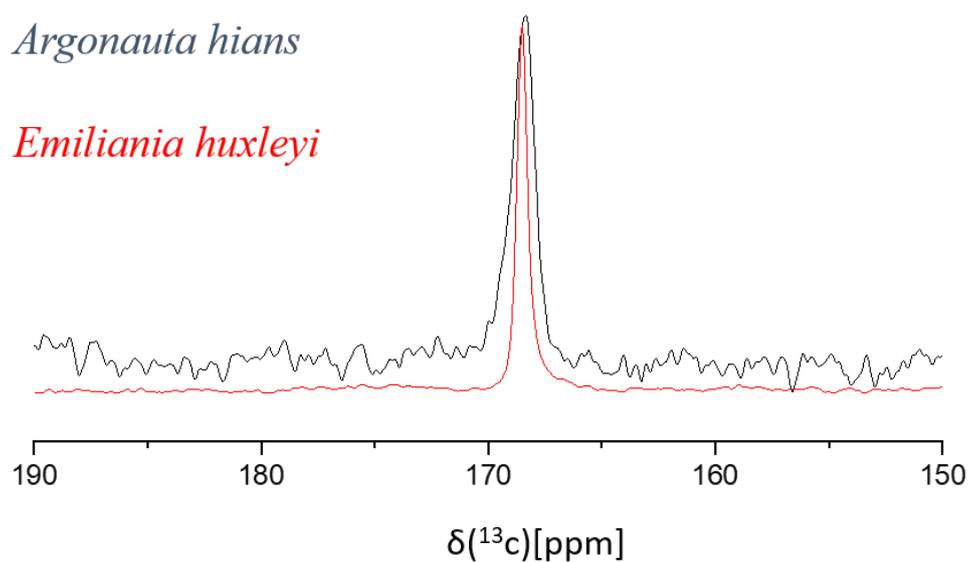
Protein hits			AIM	ASM <sup>1</sup>	AIM <sup>1</sup>	ASM <sup>2</sup>
Id	Name	Organism				
gi 510858535	core histone H2A/H2B/H3/H4	<i>Ancylostoma ceylanicum</i> - nematode	X			
gi 91091764	PREDICTED: DNA polymerase theta	<i>Tribolium castaneum</i> - red flour beetle	X			
gi 585681960	PREDICTED: plakophilin-1	<i>Elephantulus edwardii</i> - cape elephant shrew	X			
gi 86171727	conserved Plasmodium protein, unknown function	<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7 - malarial parasite	X			
gi 308458182	hypothetical protein CRE_08613	<i>Caenorhabditis remanei</i> - nematode	X			
gi 390343572	PREDICTED: nicotinate phosphoribosyltransferase isoform X2	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> - purple sea urchin	X			
gi 328700255	PREDICTED: nuclear RNA export factor 1 isoform X1	<i>Acyrtosiphon pisum</i> - pea aphid	X			
gi 443727169	hypothetical protein CAPTEDRAFT_154474	<i>Capitella teleta</i> - polychaete worm	X			
gi 159741	omega-crystallin	<i>Enteroctopus dofleini</i> - north pacific giant octopus	X			
gi 55926209	heat shock protein beta-1	<i>Sus scrofa</i> - pig	X			
gi 780125691	glutamate--ammonia ligase	<i>Vibrio owensii</i> - bacteria	X			
gi 7504266	hypothetical protein F55C12.5 -	<i>Caenorhabditis elegans</i> -nematode	X			
gi 156551155	PREDICTED: AN1-type zinc finger protein 2A-like OBSOLETE	<i>Nasonia vitripennis</i> - jewel wasp	X			
gi 560134091	Filament and Intermediate filament domain containing protein	<i>Haemonchus contortus</i> - barber pole worm	X			
gi 449689695	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101240615, partial OBSOLETE	<i>Hydra vulgaris</i> -hydra	X			
gi 524912489	PREDICTED: disks large homolog 5-like, partial	<i>Aplysia californica</i> - california sea hare	X			
gi 501454245	hypothetical protein	<i>Escherichia coli</i>	X			
gi 291236777	PREDICTED: heparan sulfate glucosamine 3-O-sulfotransferase 2-like	<i>Saccoglossus kowalevskii</i> - acorn worm	X			
gi 746844707	PREDICTED: uncharacterized protein LOC105145019	<i>Acromyrmex echinator</i> - panamian leafcutter ant	X			

gi 669309493	hypothetical protein M513_06097	<i>Trichuris suis</i> - pig whipworm	X			
gi 478254954	hypothetical protein YQE_08199, partial	<i>Dendroctonus ponderosae</i> - montain pine beetle	X			
gi 684375790	hypothetical protein T265_02620	<i>Opisthorchis viverrini</i> - nematode	X			
gi 321462784	cytoplasmatic actin	<i>Daphnia pulex</i> - water flea			X	
gi 397455174	chitinase-3	<i>Hyriopsis cumingii</i> - triangle sail mussel			X	
gi 38197044	COL6A1 protein, partial	<i>Homo sapiens</i>			X	
gi 405962295	Radixin	<i>Crassostrea gigas</i> - pacific oyster			X	
gi 524885605	PREDICTED: arginine kinase-like isoform X3 (obsolete version 'removed as a result of standard genome annotation processing')	<i>Aplysia californica</i> - california sea hare			X	
gi 405975735	Collagen alpha-5(VI) chain	<i>Crassostrea gigas</i> - pacific oyster			X	
gi 734555169	hypothetical protein Tcan_08986	<i>Toxocara canis</i> - canine roundworm			X	
gi 170030636	N-acetylgalactosaminyltransferase	<i>Culex quinquefasciatus</i> - southern house mosquito			X	
gi 204499	glutathione S-transferase Y-b subunit (EC 2.5.1.18), partial	<i>Rattus norvegicus</i> - rat			X	
gi 170039797	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 1	<i>Culex quinquefasciatus</i> - southern house mosquito			X	
gi 524870997	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101858247 OBSOLETE ' removed as a result of standard genome annotation processing'	<i>Aplysia californica</i> - california sea hare			X	
gi 443700020	hypothetical protein CAPTEDRAFT_172619	<i>Capitella teleta</i> - polychaete worm			X	
gi 195997701	expressed hypothetical protein	<i>Trichoplax adhaerens</i> - placozoa			X	
gi 242023094	myosin heavy chain, cardiac muscle isoform, putative	<i>Pediculus humanus corporis</i> - human body louse			X	
gi 576693979	Tryptophan 5-hydroxylase 2	<i>Echinococcus granulosus</i> - hydatid tapeworm			X	
gi 568451090	hypothetical protein AGABI2DRAFT_191453	<i>Agaricus bisporus</i> var. <i>bisporus</i> H97 - white button mushroom			X	

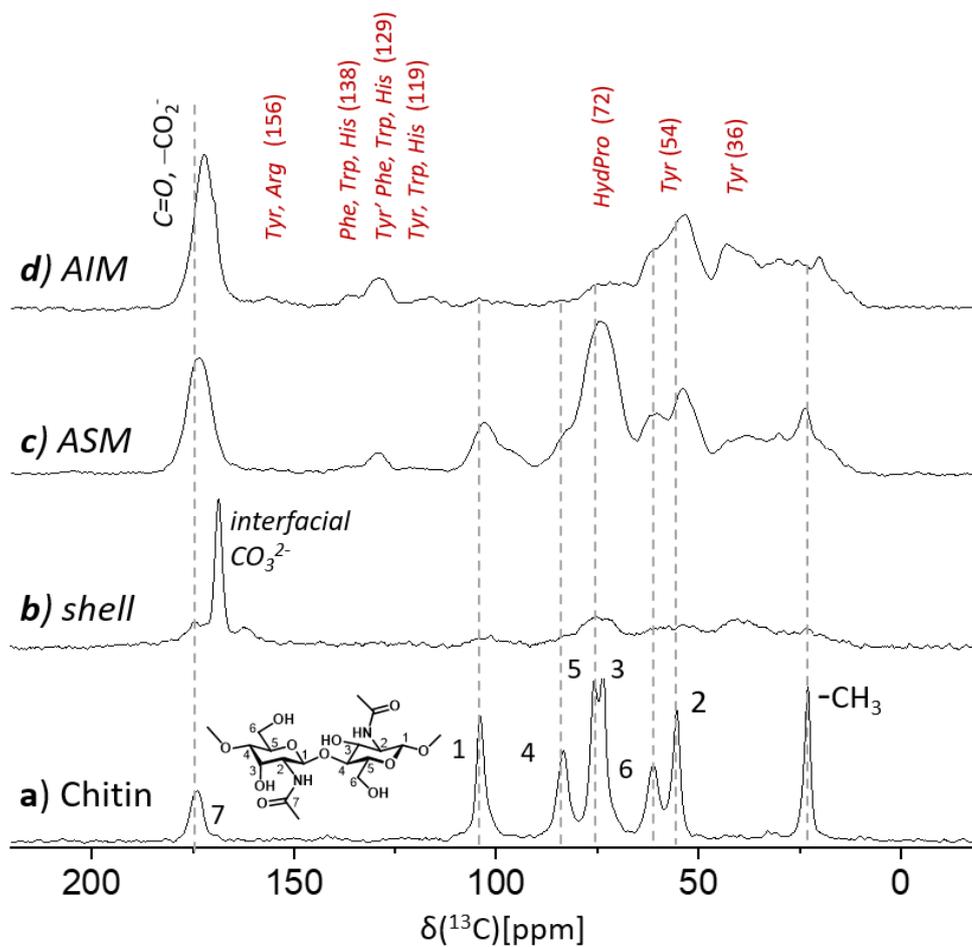
gi 761908431	PREDICTED: integrin beta-1-like OBSOLETE 'removed as a result of standard genome annotation processing'	<i>Amphimedon queenslandica</i> - sponge			X	
gi 51965682	translation initiation factor 2 gamma subunit	<i>Lithobius forficatus</i> - centipede			X	
gi 91094999	PREDICTED: UDP-glucuronic acid decarboxylase 1	<i>Tribolium castaneum</i> - red flour beetle			X	
gi 113226	Actin-15A	<i>Mesocentrotus franciscanus</i> - giant red sea urchin		X		
gi 338819392	Sarcoplasmic calcium-binding protein	<i>Chionoecetes opilio</i> - snow crab		X		
gi 6013427	serum albumin precursor	<i>Homo sapiens</i> - human		X		
gi 568297945	pyruvate synthase	<i>Necator americanus</i> - human hookworm		X		
gi 597871317	hypothetical protein Y032_0021g374	<i>Ancylostoma ceylanicum</i> - nematode		X		
gi 157831654	Chain A, Analysis Of The Stabilization Of Hen Lysozyme With The Helix Dipole And Charged Side Chains	<i>Gallus gallus</i> - chicken				X
gi 156371481	predicted protein	<i>Nematostella vectensis</i> - starlet sea anemone				X
gi 46561734	putative cytoplasmic actin A3a1	<i>Homalodisca vitripennis</i> - glassy- winged sharpshooter				X
gi 2196980	elongation factor-1 alpha, partial	<i>Testudinalia testudinalis</i> - plant limpet				X
gi 512931176	PREDICTED: uncharacterized aarF domain-containing protein kinase 5 isoform X1 OBSOLETE	<i>Heterocephalus glaber</i> - naked mole- rat				X
gi 341883148	hypothetical protein CAEBREN_11594	<i>Caenorhabditis brenneri</i> - nematode				X
gi 662218687	PREDICTED: nuclear export mediator factor NEMF homolog, partial OBSOLETE	<i>Diaphorina citri</i> - asian citrus psyllid				X
gi 642931853	PREDICTED: radial spoke head 1 homolog	<i>Tribolium castaneum</i> - red flour beetle				X
gi 156402303	predicted protein	<i>Nematostella vectensis</i> - starlet sea anemone				X
gi 669307714	hypothetical protein M513_07822	<i>Trichuris suis</i> - pig whipworm				X
gi 512924542	PREDICTED: desmoglein-1 OBSOLETE	<i>Heterocephalus glaber</i> - naked mole- rat				X

gi 321473347	hypothetical protein DAPPUDRAFT_314966	<i>Daphnia pulex</i> - common water flea				X
gi 685834417	Prolyl endopeptidase	<i>Strongyloides ratti</i> - nematode				X
gi 242024415	conserved hypothetical protein	<i>Pediculus humanus corporis</i> - human body louse				X
gi 389609807	glutathionetransferase	<i>Papilio xuthus</i> - asian swallowtail				X

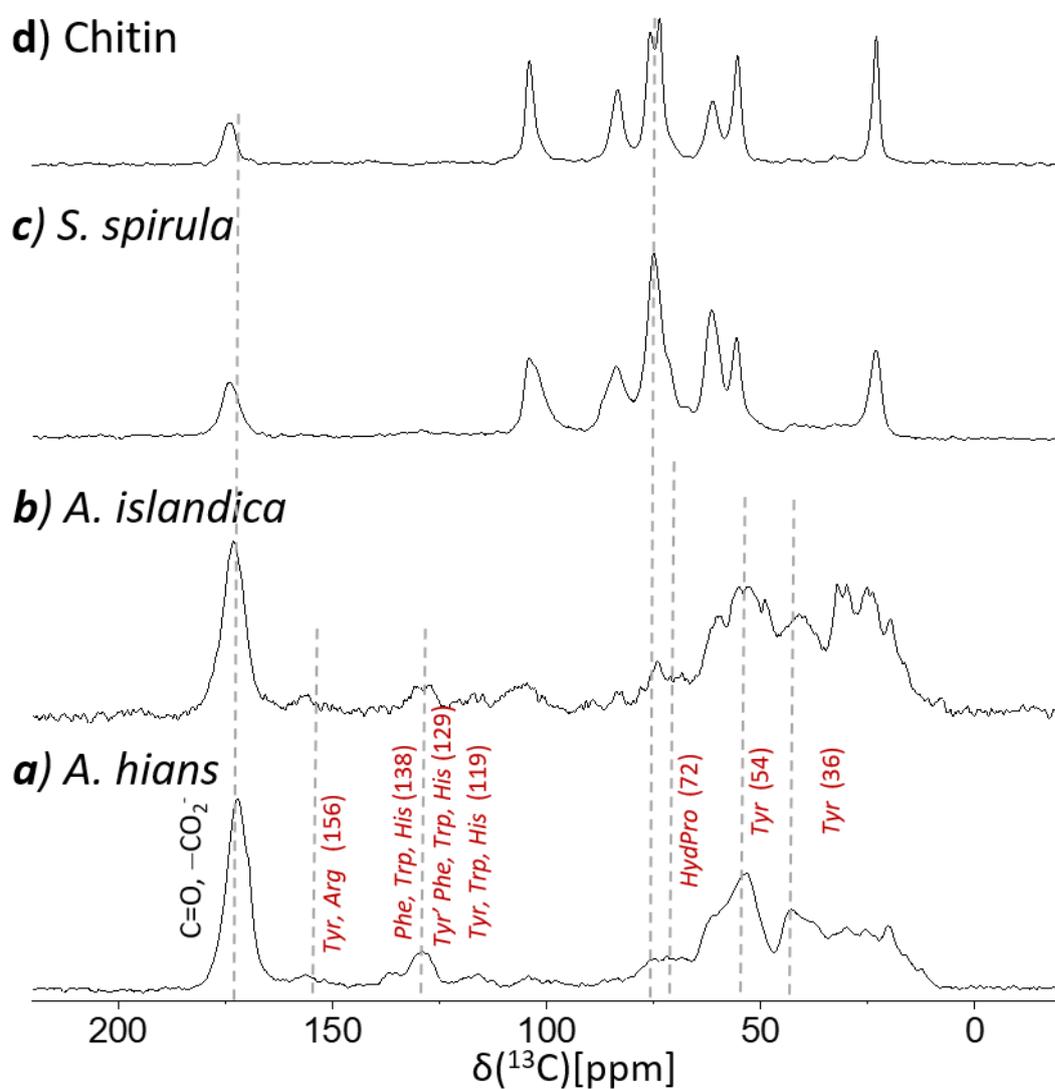
**Figure S1:** 75.4 MHz  $^{13}\text{C}$  DE MAS NMR spectrum (black) of the cleaned shell powder of *A. hians* (110 mg; 30 scans) and of  $^{13}\text{C}$ -enriched coccoliths (red) superimposed for comparison. The spectra were obtained by acquiring transients with repetition delay of 40 min (close to fully relaxed).



**Figure S2:** 75.4 MHz  $^{13}\text{C}$  CPMAS spectra of (a) of  $\alpha$ -chitin standard (shrimp), (b) the cleaned shell of *Argonauta hians*, and of its extracts (c) acid soluble and (d) acid insoluble matrices (AIM1 and ASM1). The spectra are the same as in Figure 5 except the non-expanded spectrum of the cleaned shell that demonstrates the strong peak of interfacial carbonates.



**Figure S3:** 75.4 MHz  $^{13}\text{C}$  CPMAS spectra of acid insoluble shell extracts (AIM1) of a) *Argonauta hians*, compared to other insoluble shell matrices: b) *Arctica islandica*, c) *Spirula spirula*, and d)  $\alpha$ -chitin standard (shrimp). The comparison shows that the organic content of *A. hians* consists primarily of proteinaceous matter while (oligo) saccharides, if present, comprise no more than 10% of the shell matrix.



**Table S1:** List of the antibodies used for the ELISA test. Their target antigens are indicated, as well as their respective dilution of use (titers).

Antibody name	Target antigens	Dilution factor used (titer)
K5087	Acetic-acid soluble prism matrix of <i>Pinctada margaritifera</i>	1/500
K5088	Acetic-acid soluble nacre matrix of <i>Pinctada margaritifera</i>	1/500
K5089	Acetic-acid soluble prism matrix of <i>Pinna nobilis</i>	1/500
K5090	Acetic acid-soluble nacre matrix of <i>Pinna nobilis</i>	1/500
K4772	EDTA-soluble matrix of <i>Mercenaria mercenaria</i>	1/500
K4951	EDTA-soluble matrix of <i>Mercenaria mercenaria</i>	1/500
K4952	EDTA-soluble matrix of <i>Bathymodiolus</i> sp.	1/1000
Preserum $\alpha$ -caspartin	Pre-immune serum of anti-caspartin	1/3000
$\alpha$ -caspartin 17	Caspartin 17, a soluble acidic shell protein of the prisms of <i>Pinna nobilis</i>	1/3000
$\alpha$ -calprismin 37	Calprismin 37, a soluble acidic shell protein of the prisms of <i>Pinna nobilis</i>	1/3000
$\alpha$ -mucoperlin	Mucoperlin, a soluble mucin-like nacre matrix protein of <i>Pinna nobilis</i>	1/3000
$\alpha$ -crassostrein	Crassostrein, a 26 kDa fraction of the soluble matrix of <i>Crassostrea gigas</i>	1/2000
$\alpha$ -prism Pmarg	Acetic-acid soluble prism matrix of <i>Pinctada margaritifera</i>	1/1000
$\alpha$ -nacre Pmarg	Acetic-acid soluble nacre matrix of <i>Pinctada margaritifera</i>	1/1000
$\alpha$ - <i>Mytilus</i> SM	Acetic-acid soluble matrix (prisms +nacre) of <i>Mytilus edulis</i>	1/1000
$\alpha$ -N63	N63 purified protein of <i>Nautilus macromphalus</i>	1/1000
$\alpha$ -ASM deg. <i>Upict</i> J39	Deglycosylated acetic acid-soluble matrix of <i>Unio pictorum</i> , 2nd bleed.	1/1000
$\alpha$ -ASM deg. <i>Upict</i> J55	Deglycosylated acetic acid-soluble matrix of <i>Unio pictorum</i> , 3rd bleed.	1/1000
$\alpha$ -P95 J53	P95 purified protein of the soluble nacre matrix of <i>Unio pictorum</i> , 2nd bleed.	1/2000
$\alpha$ -P95 J62	P95 purified protein of the soluble nacre matrix of <i>Unio pictorum</i> , 2nd bleed.	1/2000

**Table S2:** Complete protein hits obtained by proteomics, according to two stringencies: trypsin (T), and semi-trypsin (ST). For each protein hit, the presence is indicated by "x", as well as the protein coverage (Cov.) and the number of peptides (Pep.) that allow the protein identification, for each of the four extracts. For each sequence, the signal peptide is indicated in red and italic. Protein hits above 10% coverage are in green; hits with coverage between 5 and 10% are in blue, and those below 5% are in orange.

Considering the important volume of this file, you can access it by scanning the following QRcode :

