

Ecole doctorale du Muséum national d'Histoire naturelle ED 227
Proposition de sujet de thèse – 2009 -

Sujet :

Caractérisation de motifs moléculaires des matrices organiques liés à la mise en place des coquilles de mollusques.

Structure d'accueil :

Muséum National d'Histoire Naturelle

DMPA, UMR CNRS 7208 BOREA Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques

Equipe « Evolutions des Biominéralisations »

Directeur de thèse et contact : Christian MILET, milet@mnhn.fr

Contexte

Les coquilles de mollusques sont des structures complexes où minéral et organique sont intimement liés pour constituer un matériau composite, aux propriétés distinctes de celles de chaque composante. Ces dernières sont souvent remarquables, ainsi la nacre (carbonate de calcium cristallisé sous forme d'aragonite) des mollusques nacriers se révèle être 3.000 fois plus résistante que son homologue géochimique.

Les matrices organiques coquillères sont responsables de la synthèse du morphe cristallin du carbonate de calcium (amorphe, calcitique, aragonitique) en s'organisant en une structure tridimensionnelle constituant un réseau macromoléculaire incluant protéines, polysaccharides et lipides. La synthèse de ces matrices organiques est sous contrôle d'une « machinerie moléculaire » apparue, sans doute, à partir de la fin du Pré-Cambrien (autour 540 millions d'année). La connaissance des protéines associées à la phase minérale se heurte à plusieurs obstacles :

- 1- leur extraction du minéral est difficile. Les protéines extraites se séparent difficilement en chromatographie et en électrophorèse. La majorité des protéines de matrices minéralisées existe sous la forme de complexes insolubles, ce qui les rend de fait inaccessibles à toute forme de caractérisation ;
- 2- pour avoir accès à des domaines protéiques conservés actifs dans la minéralisation, il est nécessaire d'élargir les modèles de mollusques étudiés. Actuellement seuls quelques taxons pris chez les bivalves et les gastéropodes servent à identifier les protéines impliquées dans la formation des coquilles. Dans les autres classes, peu de matrices coquillères sont étudiées. Ce déficit en modèle est un obstacle à la compréhension des phénomènes nécessaires à la formation des coquilles ;
- 3- la dynamique d'expression des protéines matricielles au cours de l'ontogénèse des mollusques est peu connue. De nouvelles approches sont nécessaires pour avoir accès à ces complexes protéiques insolubles. Des méthodes à sensibilité élevée (spectrométrie de masse) demandent peu de matériel donc rendent possible les recherches sur les plus jeunes stades de développement des modèles étudiés.

Objectifs : La première étape consiste à identifier des structures peptidiques discrètes au sein des macromolécules protéiques matricielles, hautement conservées au cours de l'Evolution. La seconde étape visera à localiser les précurseurs de la matrice dans les tissus sécréteurs. La dernière étape sera d'analyser les relations structures/fonctions d'analogues peptidiques synthétiques dans un modèle *in vitro* de cristallisation de carbonate de calcium.

Les analyses porteront sur des modèles bivalves (*Unio pictorum*, *Pinctada margaritifera*), céphalopode (*Nautilus macromphalus*) et gastéropode (*Haliotis tuberculata*).

Méthodologie : Les analyses en procédure « gel free » des extraits organiques des coquilles après digestion par des endoprotéases et séparation sur colonne (phase inversée, échanges de cations forts, ou colonne mixte : échangeuse de cations et phase inversée) sont effectuées. L'analyse est désormais possible sur un système nano-HPLC couplée à une LC-MS/MS. Les peptides obtenus sont fragmentés en phase gazeuse et les séquences reconstituées des peptides sont utilisés pour interroger les banques de données protéiques (généralistes et/ou locales) contenant les ESTs pour identification. Ces résultats feront l'objet d'une analyse bioinformatique. Quelques microgrammes de protéines sous forme de mélange suffisent à ces études protéomique dites « hors gel ». La quantification du niveau d'expression des protéines est également possible dans cette approche protéomique « hors gel » grâce au marquage des peptides générés au moyen du procédé « iTraQ ».

L'étude bioinformatique des séquences obtenues nous permettra d'identifier des domaines peptidiques conservés et/ou reliés à une activité de liaison au calcium et/ou comportant des signatures spécifiques de cytokines. Ces séquences seront utilisées afin d'obtenir des peptides de synthèse. Ceux-ci serviront alors d'antigènes pour générer des anticorps utilisables pour une immunolocalisation sur les tissus sécréteurs prélevés chez les différentes espèces modèles de l'étude.

Enfin, ces peptides synthétiques serviront dans des études de cristallisation *in vitro* réalisées au laboratoire afin de mettre en évidence les impacts de ces peptides sur les structures et la croissance des cristallites observés en MEB.

Attendus :

- 1- avoir accès à des protéines « non-solubles » des matrices organiques de coquilles de mollusques pour différents modèles,
- 2- identifier des peptides conservés jouant un rôle important dans la formation des coquilles ,
- 3- étudier, après synthèse de ces peptides, leur(s) fonction(s) dans un système *in vitro* de minéralisation.

L'équipe d'accueil possède une solide expérience dans la caractérisation des composants matriciels notamment au moyen de l'approche par analyse « protéomique » (Bédouet et al. 2007 ; Marie et al., 2008 ; 2009) en partenariat avec la plateforme de spectrométrie de masse du MNHN.

Sélection de publications du Directeur de thèse pour les 3 dernières années :

Marie B., Marin F., Arul M., Bédouet L., Dubost L., Alcaraz G., **Milet C.**, Luquet G. Evolution of nacre: biochemistry and 'shellomics' of the shell organic matrix of the cephalopod *Nautilus macromphalus*. *ChemBiochem*, sous presse

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.

Rousseau M., H. Boulzaguet, J Biagianti, D. Duplat, **C. Milet**, E. Lopez, L. Bédouet. Low molecular weight molecules of oyster nacre induce mineralization of the MC3T3-E1 cells.

Key Engineering Materials, 2008, 361-363 : 1017-1020.

Bédouet L., A. Marie, L. Dubost, J. Péduzzi, D. Duplat, S. Berland, M. Puisségur, H. Boulzaguet, M. Rousseau, **C. Milet**, E. Lopez. Proteomics Analysis of the Nacre Soluble and Insoluble Proteins from the Oyster *Pinctada margaritifera*.. *Marine Biotechnology*, 2007, 9 : 638-639.

Bédouet L., D. Duplat, A. Marie, L. Dubost, S. Berland, **C. Milet**, M. Rousseau, E. Lopez. Heterogeneity of the proteinase inhibitors in the water-soluble organic matrix from the oyster nacre. *Marine Biotechnology*, 2007, 9 : 437-439.

Duplat D., A. Chabadel, M. Gallet, S. Berland, L. Bédouet, M. Rousseau, S. Kamel, **C. Milet**, P. Jurdic, M. Brazier, E. Lopez. The in vitro osteoclastic degradation of nacre. *Biomaterials*, 2007, 28 : 2155-2162.

Duplat D., M. Puisségur, L. Bédouet, M. Rousseau, H. Boulzaguet, **C. Milet**, D. Sellos, A. Van Wormhoudt and E. Lopez. Identification of calconectin, a calcium-binding protein specifically expressed by the mantle of *Pinctada margaritifera*.. *FEBS Letters*, 2006, 580 (10) : 2435-2441.

Informations importantes :

Les candidats intéressés doivent prendre connaissance du dossier à constituer sur le site de l'École doctorale du Muséum national d'Histoire naturelle (<http://www.mnhn.fr>) ↪ Le Muséum des scientifiques ↪ École doctorale) et contacter le directeur du projet (milet@mnhn.fr).

Les postulants seront auditionnés par une commission qui devrait se réunir courant juillet.