

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉTUDE DE LA TENEUR EN MÉTAUX, DES PROPRIÉTÉS MÉCANIQUES, DE
LA STRUCTURE ET DE LA DYNAMIQUE MOLÉCULAIRE DES FIBRES DE
BYSSUS DE LA MOULE EN RELATION AVEC SON ENVIRONNEMENT

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR

MARC-OLIVIER SÉGUIN HEINE

AOÛT 2013

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

À !\$%?&*

REMERCIEMENTS

Je profite de cette section pour dire un merci particulier aux personnes et organismes qui m'ont soutenu intellectuellement ou financièrement durant mes études de maîtrise.

Je veux remercier ma directrice de recherche, Pr. Isabelle Marcotte et mon co-directeur, Pr. Réjean Tremblay pour leur soutien et leur encadrement tout au long de ce périple.

Un grand merci au NMR master Alexandre Arnold pour la réalisation des expériences de résonance magnétique nucléaire, à Bertrand Genard pour les analyses statistiques ainsi qu'au Pr. Christian Pellerin pour les analyses de propriétés mécaniques. Leur soutien technique et leurs conseils ont été très appréciés.

Je remercie les membres du laboratoire Marcotte, soit Frédéric Byette, Andrée Gravel, Souryvanh Nirasay et Maïwenn Beaugrand. Je voudrais également remercier Bruno Myrand ainsi que son équipe chez Merinov pour leur accueil lors de mes stages aux Îles-de-la-Madeleine.

Finalement, je désire remercier ces organismes pour l'octroi de bourses: l'Université du Québec à Montréal (UQAM) et Ressources Aquatiques Québec (RAQ) via le programme FONCER du Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG).

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	xii
LISTE DES SYMBOLES ET UNITÉS	xv
RÉSUMÉ	xvii
CHAPITRE I	
INTRODUCTION	1
1.1 Le byssus.....	1
1.2 Structure du byssus	4
1.3 Mytiliculture.....	8
1.4 Objectifs du projet.....	10
CHAPITRE II	
ASPECTS THÉORIQUES DES MÉTHODES ET TECHNIQUES UTILISÉES	13
2.1 Généralités de la RMN.....	13
2.1.1 Le spin.....	14
2.1.2 Effet Zeeman.....	15
2.1.3 RMN en solution et de l'état solide.....	16
2.2 Interactions en jeu lors d'une analyse de RMN	17
2.2.1 Déplacement chimique.....	17
2.2.2 Anisotropie de déplacement chimique	18
2.2.3 Couplage scalaire	19
2.2.4 Couplage dipolaire	19
2.2.5 Couplage électrique quadripolaire	21

2.3 Techniques pour augmenter la résolution et la sensibilité	22
2.3.1 Rotation à l'angle magique	22
2.3.2 Polarisation croisée	23
2.3.3 RINEPT	24
2.3.4 Découplage.....	25
2.4 Analyse de la dynamique d'un matériau	26
2.4.1 Largeur des pics	26
2.4.2 Comparaison CP / DP / RINEPT	26
2.4.3 WISE.....	27
2.4.4 Temps de relaxation T_2	29
2.4.5 Résumé des expériences de RMN.....	31
2.5 Propriétés mécaniques.....	32
2.5.1 Contrainte.....	32
2.5.2 Déformation	33
2.5.3 Module initial.....	33
2.6 Analyses statistiques	35
2.6.1 Analyse canonique de redondance.....	35
2.6.2 Test t.....	35
2.6.3 Analyse de la variance	36
2.6.4 Test Tukey.....	37
2.7 Analyses chromatographiques	38
2.7.1 Chromatographie liquide haute performance.....	38
2.7.2 Spectrométrie de masse par torche au plasma.....	38
CHAPITRE III	
IMPACT OF OPEN-SEA HABITAT ON BYSSUS ATTACHMENT OF SUSPENSION-CULTURED BLUE MUSSELS (MYTILUS EDULIS).....	40
3.1 Résumé.....	41
3.2 Abstract	42
3.3 Introduction.....	43

3.4 Materials and methods	45
3.4.1 Sites	45
3.4.2 Mussel sampling	46
3.4.3 Environmental data	46
3.4.4 Attachment strength and biological measurements.....	47
3.4.5 Mechanical properties of individual byssal threads	47
3.4.6 Byssus metal content.....	48
3.4.7 Statistical analysis	48
3.5 Results.....	50
3.5.1 Environmental characteristics	50
3.5.2 Mussels' performance	53
3.5.3 Mechanical properties and metal content of individual byssal threads..	54
3.6 Discussion	58
3.6.1 Mussels' performance	58
3.6.2 Site effect on byssus properties.....	59
3.6.3 Season effect on byssus properties.....	60
3.7 Conclusion	62
3.8 Acknowledgements	63
CHAPITRE IV	
ACCUMULATION PRÉFÉRENTIELLE EN MÉTAUX SELON LE SITE ET LA SAISON DANS QUATRE TISSUS DE <i>MYTILUS EDULIS</i>	
4.1 Objectifs	64
4.2 Matériel & méthode	65
4.2.1 Échantillonnage.....	65
4.2.2 Concentration en métaux dans les tissus.....	65
4.2.3 Analyses statistiques	66
4.3 Résultats et discussion	66
4.4 Conclusion	75

CHAPITRE V	
ÉTUDE COMPARATIVE DE L'EFFET DE L'HYDRATATION SUR LES FILS D'ANCRAGE DES MOULES <i>M. EDULIS</i> ET <i>X. SECURIS</i> PAR RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE	76
5.1 Introduction et objectifs	76
5.2 Matériel et méthodes	78
5.2.1 Enrichissement en ¹³ C des byssus	79
5.2.2 Analyse d'acide aminés.....	79
5.2.3 Expériences de RMN	80
5.3 Résultats et discussion	81
5.3.1 Analyses en acides aminés	81
5.3.2 Analyses DP, CP et RINEPT	83
5.3.3 Analyses WISE	87
5.3.4 Analyses de T ₂	91
5.4 Conclusion	93
CHAPITRE VI	
CONCLUSION.....	94
ANNEXE A	98
BIBLIOGRAPHIE.....	113

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1	Byssus de <i>Mytilus edulis</i> 1
1.2	Pied de la moule <i>M. edulis</i> avec rainure au centre 2
1.3	Schéma des différentes parties d'un filament de byssus ainsi que la distribution des PréCols 3
1.4	Graphique contrainte-élongation de plusieurs protéines..... 4
1.5	A) Assemblage de 6+1 PréCols en forme hexagonale B) Ballot de PréCols en conformation banane 5
1.6	Les domaines variables des PréCol-P, -D et -NG sont semblable à de l'élastine, de la fibroïne de soie et aux parois cellulaires végétales respectivement..... 6
1.7	La réticulation des PréCols dans le byssus est assurée par les métaux de transition (M), les liens di-DOPA (Y-Y) et des ponts disulfures (S) entre les cystéines des PréCols-D et -NG 7
1.8	Culture de moule sur filière. Les boudins de moules sont tenus à une profondeur fixe à l'aide d'ancrages et de bouées 8
1.9	Schéma du montage utilisé pour l'acquisition de la force d'attachement d'une moule sur un boudin à l'aide d'un dynamomètre 11
2.1	Dégénérescence des niveaux d'énergie en présence d'un champ magnétique B_0 pour un noyau où $I=1/2$ et $I=1$ 15
2.2	Matrice de tenseur $\bar{\sigma}$ et diagonalisation..... 18
2.3	Angle θ entre B_0 et le vecteur internucléaire des noyaux A et B lors d'un couplage dipolaire..... 20
2.4	Doublet causé par le couplage électrique quadripolaire 21
2.5	Séquence d'impulsions de la polarisation croisée..... 23
2.6	Séquence d'impulsions du RINEPT..... 25

2.7	Séquence d'impulsion d'une expérience DP en ^{13}C avec découplage des protons	27
2.8	Séquence d'impulsion d'une expérience WISE.....	28
2.9	Séquence d'impulsion d'une expérience T_2 en ^{13}C	29
2.10	Détermination de T_2 à partir de la largeur à mi-hauteur ($\nu_{1/2}$) d'un pic	30
2.11	Graphique contrainte/déformation d'un brin de byssus complet de <i>M. edulis</i> hydraté	34
3.1	Map of the studied area: Magdalen Islands in the Gulf of St. Lawrence showing the sampling sites in House Harbour lagoon and Baie de Plaisance. Amherst Basin is the site of origin of the mussels...	45
3.2	Variation of different parameters in the two aquaculture sites: open-sea (black lines) and lagoon (grey lines). Sampling dates were separated by 7 days for the lagoon site and 14 days for the open-sea site. Asterisks represent significant differences between two successive dates as revealed by a T-test.....	51
3.3	Ordination biplot resulting of redundancy analysis (RDA) representing the significant ($p = 0.001$) effect of season and site (arrows) on mechanical properties (underlined names) and multivalent metal (normal names) concentration of byssus. Lines represent response variables.....	56
3.4	Variation of individual byssal force at break (A), diameter (B), and stress at break (C) with respect to the two experimental sites and seasons. Different letters or * indicate significant differences at $p < 0.05$	57
4.1	Ordination selon deux axes de l'analyse de redondance (RDA) représentant l'effet significatif des cinq tissus sur le pourcentage relatif en métaux pour le mois de novembre 2010.....	68
4.2	Ordination selon deux axes de l'analyse de redondance (RDA) représentant l'effet significatif des cinq tissus sur le pourcentage relatif en métaux pour le mois d'août 2011	69
5.1	Images MEB de <i>M. edulis</i> A) partie proximale B) partie distale et <i>X. securis</i> C) partie proximale et D) partie distale	77
5.2	Proportion des différents acides aminés dans les fibres de byssus de <i>M. edulis</i> et <i>X. securis</i>	82

5.3	Spectres de RMN-ÉS du byssus de <i>M. edulis</i> avec CP sur des fibres A) déshydratées et B) hydratées; avec DP sur des fibres C) déshydratées et D) hydratées; RINEPT sur des fibres E) déshydratées et F) hydratées. Les spectres obtenus par DP présentés ont subi une soustraction du signal du rotor 85
5.4	Spectres de RMN-ÉS du byssus de <i>X. securis</i> avec CP sur des fibres A) déshydratées et B) hydratées; avec DP sur des fibres C) déshydratées et D) hydratées; RINEPT sur des fibres E) hydratées. 86
5.5	Spectre WISE du byssus hydraté de <i>Mytilus edulis</i> 87
5.6	Spectre WISE du byssus déshydraté de <i>Mytilus edulis</i> 88
5.7	Spectre WISE du byssus hydraté de <i>Xenostrobus securis</i> 88
5.8	Spectre WISE du byssus déshydraté de <i>Xenostrobus securis</i> 89
5.9	Différence de largeur des bandes ^1H liées aux carbones des acides aminés du byssus hydraté et déshydraté de <i>M. edulis</i> et de <i>X. securis</i> .. 90
5.10	Temps de relaxation T_2 du byssus hydraté et déshydraté de (A) <i>M. edulis</i> et (B) <i>X. securis</i> 92

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	page
2.1	Abondance naturelle et rapport gyromagnétique de quelques noyaux .. 14
2.2	Résumé des expériences RMN pour l'analyse de dynamique des matériaux..... 31
3.1	ANOVAs (Two-way and partially hierarchical) conducted with each parameter as dependent variable and date, site, their interaction and sleeve (nested in date and site, for biotic parameters) as factors. For these analyses, only values taken from the same sampling dates from both sites were used (n= 532) 52
3.2	Multivalent metal ions concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry byssus) for proximal (A) and distal parts (B) of byssus sampled on mussels grown in two sites and seasons 55
4.1	Composition en métaux des différents tissus de moules récoltées en novembre 2010 et août 2011, exprimé en % de métaux totaux \pm erreur standard. La somme totale représente l'addition de chaque concentration en ppm. Les lettres différentes indiquent des différences significatives à $p < 0,05$ suite au test <i>a posteriori</i> des MANOVA 70
4.2	Métaux retrouvés en plus grande concentration dans les tissus de la moule pour chacune des saisons. Le pourcentage relatif est indiqué entre parenthèses 73

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

Al	Aluminium
Ala	Alanine
ANOVA	Analyse de la variance
Arg	Arginine
As	Arsenic
Asp	Acide glutamique
¹ H	Proton
B	Bore
Ba	Barium
¹³ C	Carbone-13
Ca	Calcium
Co	Cobalt
CP	Polarisation croisée (<i>Cross Polarization</i>)
Cr	Chrome
Cu	Cuivre
Cys	Cystéine
DMA	Analyseur mécanique dynamique (<i>Dynamic Mechanical Analysis</i>)
DOPA	3,4- dihydroxyphenyl-L-alanine
DP	Impulsion directe (<i>Direct Pulse</i>)
Fe	Fer
Glu	Acide glutamique
Gly	Glycine
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène

His	Histidine
HNO ₃	Acide nitrique
H ₀	Hypothèse nulle
H ₁	Hypothèse alternative
Ile	Isoleucine
Leu	Leucine
Lys	Lysine
<i>M. edulis</i>	<i>Mytilus edulis</i>
Met	Méthionine
mfp-1	Mussel foot protein 1
Mg	Magnésium
Mn	Manganèse
Mo	Molybdène
m/z	Ratio masse/charge
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
Ni	Nickel
OH-Pro	Hydroxyproline
Pb	Plomb
Phe	Phénylalanine
Pro	Proline
Rb	Rubidium
RDA	Analyse de redondance
RF	Radiofréquences
RINEPT	<i>Refocused Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer</i>
RMN	Résonance magnétique nucléaire
Se	Sélénium
Ser	Sérine
Sr	Strontium
T ₂	Relaxation transversale

Thr	Thréonine
Ti	Titane
Tyr	Tyrosine
U	Uranium
V	Vanadium
Val	Valine
WISE	<i>Wideline Separation</i>
<i>X. securis</i>	<i>Xenostrobus securis</i>
Zn	Zinc

LISTE DES SYMBOLES ET UNITÉS

1D	Unidimensionnelle
2D	Bidimensionnelle
A	Aire de la section transversale du byssus
B_0	Champ magnétique externe
E	Module de Young
E	Énergie
GPa	Giga pascal (1×10^9 Pa)
h	Constante de Plank ($6,63 \times 10^{-34}$ m ² .kg. s ⁻¹)
I	Spin
\bar{I}	Moment angulaire
J	Constante de couplage
kDa	Kilodalton (1×10^3 Da)
kg	Kilogramme (1×10^3 g)
kHz	Kilohertz (1×10^3 Hz)
kPa	Kilopascal (1×10^3 Pa)
m	Nombre quantique magnétique
mol%	Ratio molaire
ms	Milliseconde (1×10^{-3} s)
N	Newton (unité = kg.m.s ²)
nm	Nanomètre (1×10^{-9} m)
• ppm	Unité de mesure de déplacement chimique (Contexte RMN)
ppm	Partie par million (1×10^{-6}) (Contexte analytique)
s	Seconde

μm	Micromètre (1×10^{-6} m)
μs	Microseconde (1×10^{-6} s)
δ_{iso}	Déplacement chimique isotrope
γ	Rapport gyromagnétique (unité = $\text{rad} \cdot \text{T}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
ω	Fréquence angulaire (unité = $\text{rad} \cdot \text{s}^{-1}$)
ω_0	Fréquence de Larmor
σ	Contrainte (unité = MPa)
ε	Déformation
ε_A	Contraction unitaire
ε_L	Déformation vraie
$\bar{\mu}$	Moment magnétique
γ	Rapport gyromagnétique
ν	Fréquence de radiation électromagnétique (contexte RMN) (unité = Hz ou s^{-1})
ν	Coefficient de Poisson (contexte de propriétés mécaniques)
δ	Anisotropie de déplacement chimique
$\bar{\sigma}$	Tenseur de blindage
θ	Thêta (pour désigner un angle)

RÉSUMÉ

Le byssus est un réseau de filaments protéiques synthétisés par la moule pour se lier à un substrat solide, comme un rocher, pour ne pas être emportée par les vagues ou la marée. Un filament de byssus est formé de PréCols qui sont des protéines principalement composées de blocs de collagène se terminant par un bloc d'histidine et de DOPA et reliés entre eux principalement par des métaux de transition qui assurent la réticulation des fibres. Lors de leur culture, les moules sont suspendues à des boudins à l'aide de leur byssus. Par contre, leurs propriétés mécaniques varient tout au long de l'année, ce qui entraîne une perte de moules par décrochage à certains moments. Les objectifs de ce travail de recherche étaient d'étudier la variation des propriétés mécaniques des brins de byssus et de composition en métaux selon la saison et le site de culture. De plus, afin de mieux comprendre la relation structure-propriétés mécaniques des brins de byssus, nous avons étudié par résonance magnétique nucléaire (RMN) des filaments de byssus de *Xenostrobus securis* et *Mytilus edulis*, ainsi que l'effet de l'hydratation sur les fibres. Dans un premier temps, les propriétés mécaniques des brins de byssus individuels ont été déterminées à l'été et à l'automne et dans deux environnements aux Îles-de-la-Madeleine, soit dans une lagune et en mer. Il a été conclu que la force variait significativement selon la saison en raison de la variation des diamètres et selon le site en raison d'une variation de la structure des fibres. Les métaux étant utilisés comme agent de réticulation, leur concentration a été déterminée dans la partie proximale et distale des brins byssaux ainsi que dans les branchies, le manteau et la glande digestive. Il y a une variation statistiquement significative de la concentration en métaux selon les tissus et la saison, mais pas entre les parties proximale et distale des brins de byssus. Les métaux des brins de byssus semblent provenir du métabolisme de la moule et pas directement de l'eau lors de la formation de la fibre. Aussi, la moule semble utiliser son byssus pour se détoxifier car on y retrouve des métaux toxiques qui ne sont pas présents dans les chairs. Des expériences RMN en une et deux dimensions ont permis de déterminer que les brins de byssus de *M. edulis* et *X. securis* ont une structure moléculaire semblable mais une stratégie de réticulation différente. On a également trouvé que l'hydratation augmente la mobilité moléculaire. Par contre, cette hydratation n'est pas uniforme dans les protéines des deux fibres.

Mots Clefs : Byssus, Propriétés mécaniques, Métaux, Résonance Magnétique Nucléaire, Hydratation, Structure, Dynamique, *Mytilus edulis*, *Xenostrobus securis*

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Le byssus

Le byssus est un ensemble de filaments protéiques synthétisés par la moule (fig. 1.1). Il est essentiel à la survie de l'animal car il lui permet de se lier à une surface solide pour ne pas être emporté par les vagues ou la marée. La moule bleue, *Mytilus edulis*, synthétise entre 20 et 200 brins de byssus de 2 à 4 cm de long et de moins de 100 μm de diamètre pour s'ancrer à un substrat [1].



Figure 1.1 Byssus de *Mytilus edulis*

La moule forme les brins de byssus dans son pied, un muscle flexible qui se trouve à l'intérieur de la coquille (fig. 1.2). Il possède une rainure en son centre, qui le traverse de façon longitudinale. Pour former un fil de byssus, la moule étend son pied sur le substrat pendant 2 à 5 min et lorsqu'elle le retire, le filament est formé [2]. La méthode de formation est encore mal connue. L'hypothèse la plus probable est celle du moulage par injection [2]. Des glandes situées tout le long de la rainure y injectent les protéines qui composent le « byssus liquide ». Le fil est ensuite moulé dans sa forme finale solide grâce à des contractions musculaires du pied [2].

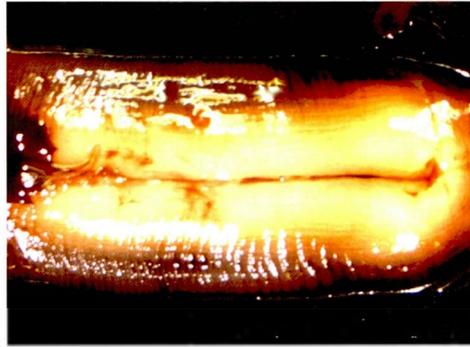


Figure 1.2 Pied de la moule *M. edulis* avec rainure au centre

Le brin de byssus peut être séparé en quatre parties soient la colonne, la partie proximale, la partie distale et la plaque (fig. 1.3). La colonne se trouve dans la moule et fait le lien avec le byssus. Les parties proximale et distale forment la majorité de la fibre dans un rapport un tiers – deux tiers respectivement [3]. Chez *Mytilus edulis*, la partie proximale représente $34,6 \pm 4,7$ % du byssus total [4]. La partie proximale est la plus proche du mollusque alors que la partie distale est la plus éloignée. Finalement, la plaque colle le fil au substrat et est située à l'extrémité de la partie distale.

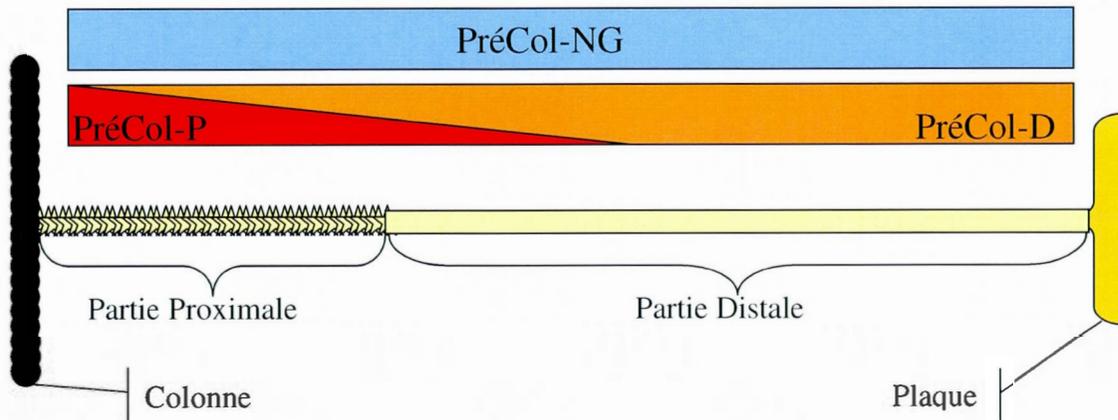


Figure 1.3 Schéma des différentes parties d'un filament de byssus ainsi que de la distribution des PréCols.

Le byssus possède des propriétés mécaniques remarquables qui varient tout au long de la fibre. En effet, la partie proximale est rugueuse, extensible et possède un module de Young de 0,05 GPa alors que la partie distale est lisse, rigide et a un module de Young de 0,50 GPa [1]. Le module de Young sera défini à la section 2.5.3. La soie d'araignée est la seule protéine extensible dont les propriétés mécaniques surpassent celles du byssus [5] (fig. 1.4). Le byssus a une ténacité comparable à celle du kevlar et de la fibre de carbone et une extensibilité comparable à la résiline retrouvée, par exemple dans les ailes d'insectes et lépidoptères [5].

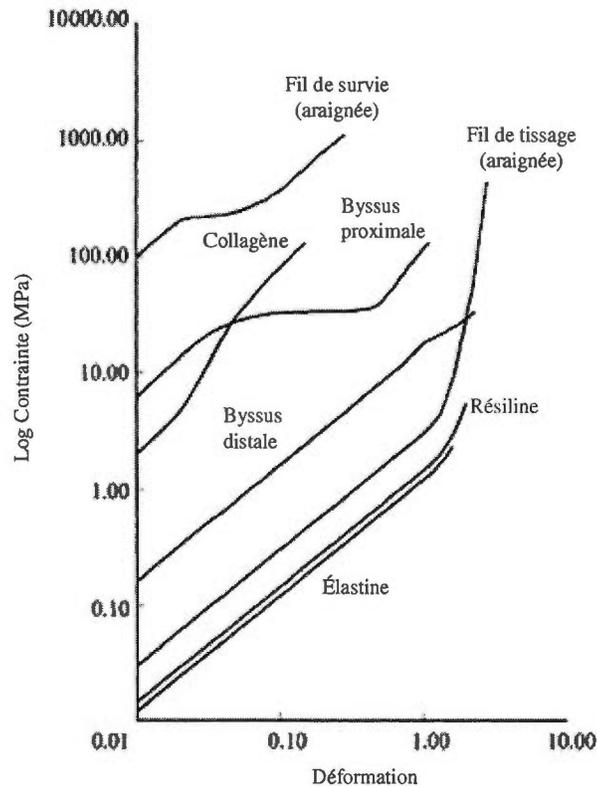


Figure 1.4 Graphique contrainte-élongation de plusieurs protéines (tiré et modifié de [5])

1.2 Structure du byssus

Le centre du byssus est composé de trois protéines appelées PréCols (fig. 1.3). Le PréCol-P est retrouvé majoritairement dans la partie proximale et tend à diminuer vers la partie distale. La concentration des PréCol-P et PréCol-D varie en proportion inverse de façon longitudinale à la fibre, alors que la concentration de PréCol-NG est uniforme tout au long de celle-ci. Les PréCols sont regroupés en ballot de 6+1 pour former un hexagone [6] (fig. 1.5 A). Ceux-ci ont la forme d'une banane de 200 nm de long et sont empilés de façon perpendiculaire à l'axe de la fibre avec une distance de

22 nm entre chacun [6] (fig. 1.5 B). Ils sont liés de façon tête-tête et queue-queue, c'est à dire C-terminal avec C-terminal et N-terminal avec N-terminal [6].

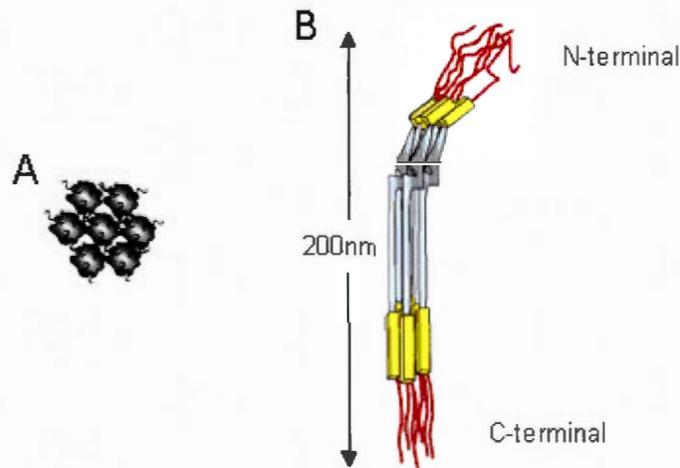


Figure 1.5 A) Assemblage de 6+1 PréCols en forme hexagonale B) Ballot de PréCols en conformation banane (tiré et modifié de [6-7])

L'assemblage des différents ballots tout au long de la fibre n'est pas connu. Plusieurs théories sont mises de l'avant. Les deux modèles les plus probables seront présentés. Dans le premier, les PréCols forment des chaînes d'homopolymères, c'est-à-dire une répétition du même PréCol. Dans le second, les chaînes sont des copolymères formées de plusieurs PréCols, soit NG et P dans la partie proximale ou NG et D dans la partie distale. La structure de base des différents PréCols est semblable (fig. 1.6). Ils sont tous formés d'un bloc central de collagène flanqué de domaines qui varient selon le PréCol et qui tendent à expliquer les propriétés mécaniques des différentes parties du byssus. En effet, dans le PréCol-P extensible, ce domaine variable est semblable à de l'élastine tandis que dans le PréCol-D plus rigide, il est semblable à de la fibroïne de soie [3]. Finalement, dans le PréCol-NG, ce domaine est semblable aux parois cellulaires de plantes [3]. À l'extrémité de ceux-ci se trouve un bloc d'histidine et de 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine (DOPA) [3].

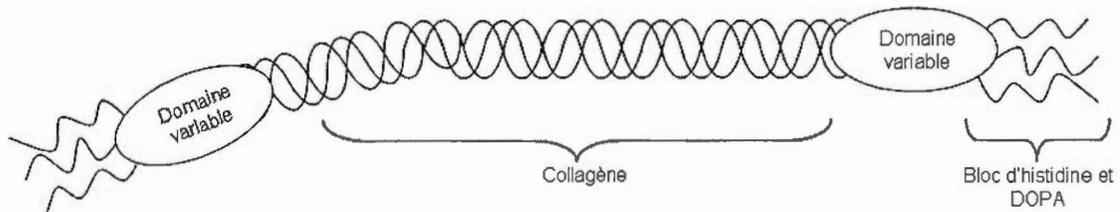


Figure 1.6 Les domaines variables des PréCol-P, -D et -NG sont semblables à de l'élastine, de la fibroïne de soie et aux parois cellulaires végétales respectivement.

Chez *Mytilus edulis*, les blocs collagènes des PréCols-P et -D sont assez semblables, mais non identiques. Le Col-P a une masse de 50 kDa alors que le Col-D a une masse de 60 kDa [8]. Tous les deux contiennent trois chaînes- α identiques ainsi que 35 mol% de glycine, 20 mol% de proline et de 4-hydroxyproline [8]. Le Col-P a une longueur de 128 nm et est formé de 146 tripeptides (Gly-X-Y) consécutifs dans lesquels X et Y représentent n'importe quel acide aminé [8]. Par contre, à 10 reprises, X est remplacé par une glycine sauf au 11^e tripeptide, où la glycine est manquante [2]. Le Col-P, qui est le bloc collagène du PréCol-P, est semblable au Col-NG au niveau de la structure. De plus, dans les deux cas, la glycine du 11^e tripeptide est manquante. Le domaine variable du PréCol-P est composé à 50 mol% de glycines et d'alanines. Il contient également beaucoup de prolines, de sérines et d'acides aminés hydrophobes. Le domaine variable du PréCol-D contient plus de 60 mol% de glycines et d'alanines, mais ne contient aucune hydroxyproline. Ce domaine, qui peut être apparenté à de la soie d'araignée, consiste en des feuillets- β antiparallèles connectés par des coudes- β [9]. Le domaine variable du PréCol-NG est constitué de longues chaînes de polyalanine et d'une répétition de X-Gly_n particulièrement longue, avec une structure de feuillets- β , qui apparente ce domaine aux parois cellulaires végétales riches en glycines, et où X représente une leucine ou une alanine [9]. Les PréCols-P, -D et -NG ont une masse respective de 95 kDa, 75 kDa et 76 kDa.

Dans le byssus, les différents PréCols sont reliés entre eux par des métaux de transition, des liens di-DOPA et des ponts disulfures [10] (fig. 1.7). Les principaux

métaux de transition retrouvés dans le byssus sont le zinc, le fer et le cuivre à une concentration de 1% dans le byssus sec [1]. Des ponts disulfures se forment à partir des cystéines du bloc collagène des PréCols-D et -NG, qui sont absentes du PréCol-P. Ainsi, seuls les PréCols-D et -NG peuvent faire des ponts disulfures.

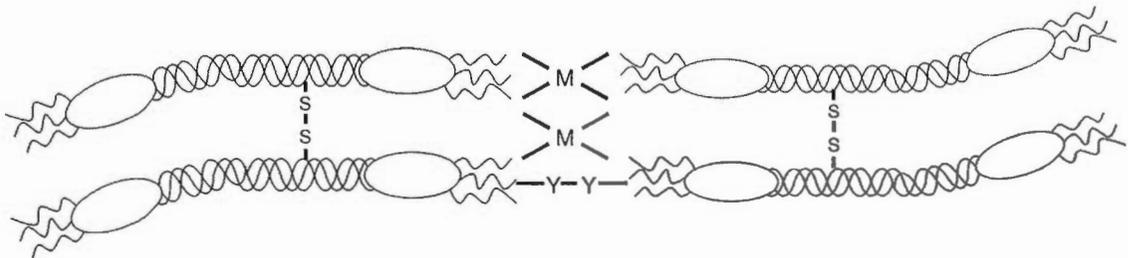


Figure 1.7 La réticulation des PréCols dans le byssus est assurée par les métaux de transition (M), les liens di-DOPA (Y-Y) et des ponts disulfures (S) entre les cystéines des PréCols-D et -NG

Le byssus est entouré d'une gaine qui le protège contre l'usure. Celle de *Mytilus edulis* a une épaisseur variant entre 2 et 5 μm et compose environ 1 % de la masse totale sèche du filament de byssus [11]. Elle doit être assez résistante pour protéger le cœur de la fibre, mais également assez flexible et extensible pour suivre ses mouvements [12]. À cet effet, la gaine est un ordre de grandeur plus dure et rigide que le cœur du byssus [12]. Celle-ci est formée de protéines non structurées dont une seule est connue, soit la *mussel foot protein 1* (mfp-1) qui, chez *Mytilus edulis*, a une masse d'environ 110 kDa et est majoritairement composée d'une répétition de 85 décapeptides et hexapeptides [9,13]. Le décapeptide est le plus abondant et sa structure est : AKPSYP*P*TY*K où P* représente l'hydroxyproline et Y* la DOPA [14]. Les mfp-1 sont composées de 10-15 mol% de DOPA qui provient de la modification de la tyrosine et sont reliées entre elles à l'aide de métaux de transition par des liens non covalents et réversibles [11,13].

La gaine peut être séparée en deux zones distinctes, soit la matrice et les agrégats. Dans ces derniers, les liens métaux-DOPA sont plus denses [11]. Deux

hypothèses peuvent expliquer ceci. Ces zones contiennent une plus grande concentration de mfp-1 ou elles contiennent une plus grande concentration de DOPA [11]. Ces agrégats évitent la propagation des micro-fissures qui se forment dans la matrice lorsque la déformation de la fibre est supérieure à 30% [11-12].

1.3 Mytiliculture

La culture des moules à travers le monde se fait principalement selon deux techniques, soit la culture dans le fond marin, qui représente environ 15%, et la culture en suspension sur ligne flottante, qui représente environ 85% [15]. Aux Îles-de-la-Madeleine, la culture sur boudins est utilisée où les moules sont suspendues sur des cordes de polypropylène à l'aide de leurs filaments de byssus. Ces boudins sont plongés dans l'eau et tenus à une profondeur déterminée à l'aide de blocs de ciment dans le fond de l'eau et de bouées à la surface (fig. 1.8). La culture sur boudin est largement répandue, autant dans les étendues d'eau ouvertes qu'en lagune. La profondeur des boudins est donc directement reliée à l'environnement.

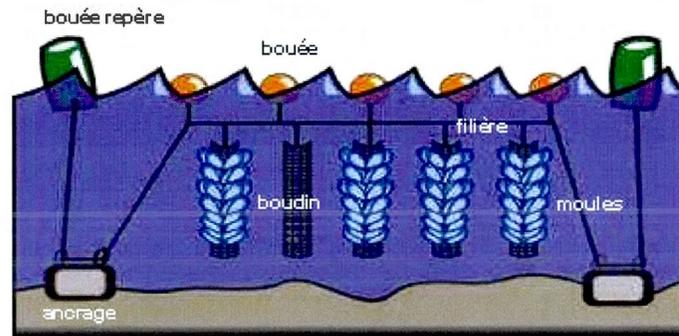


Figure 1.8 Culture de moule sur filière. Les boudins de moules sont tenus à une profondeur fixe à l'aide d'ancrages et de bouées [16]

Les boudins sont plongés dans l'eau pour une période d'un à deux ans, soit jusqu'à maturité des moules qui sont alors retirées de l'eau pour être vendues. Par contre, pendant ces deux années d'élevage, il y a des pertes de moules par décrochage et plus particulièrement lors de la récolte. Par conséquent, cela entraîne une perte de

revenus chez les mytiliculteurs car les moules qui se décrochent tombent dans les fonds benthiques et ne sont plus récupérables. Il a été déterminé qu'en 2004, pendant la période estivale aux Îles-de-la-Madeleine, la perte de moules se chiffrait entre 0,32 et 2,68 kg de moules de taille adulte par mètre de boudin récolté [17]. Sachant qu'une filière de Grande Entrée aux Îles-de-la-Madeleine possède 366 m de boudin, il s'agit d'une perte allant jusqu'à 981 kg de moules [17]. Au prix moyen de 1,20\$/kg, il s'agit donc d'une perte de plus de 1000\$ par filière pour les producteurs [17]. Aussi, les moules qui se décrochent meurent et créent une augmentation en matière organique des sédiments [18]. Ceci entraîne une eutrophisation par la favorisation de l'ammonification et la réduction des sulfates ainsi qu'une augmentation des bactéries dans les sédiments [18]. De plus, les moules qui tombent peuvent modifier considérablement le fond benthique. En effet, elles peuvent notamment transformer un fond mou en un fond dur de type récif et modifier le benthos [15]. Finalement, les moules qui se décrochent deviennent une source significative de nourriture facilement accessible par les prédateurs des fonds benthiques. Il a été démontré qu'il y a une augmentation des prédateurs sous les cultures de moules, comparativement aux sites de contrôle [15]. Ces prédateurs incluent des étoiles de mer, des crabes, des poissons benthivores, des concombres de mer et des oursins [15]. Le décrochage des moules est donc un enjeu économique majeur avec des retombées environnementales significatives.

Il est connu que la force d'attachement des moules varie selon la saison et la ponte [19]. En effet, la force d'attachement des moules est plus élevée en automne qu'en été, soit pendant la période de la ponte. Elle peut être reliée à plusieurs facteurs dont le nombre de fils de byssus synthétisés par la moule et la force intrinsèque des byssus [19]. Le fait qu'une moule décide de s'ancrer plus solidement à un substrat peut être causé par des facteurs relatifs à l'eau comme la température, la turbulence et le courant. Elle peut également être reliée à l'accessibilité à la nourriture dans le cas où celle-ci se fait plus rare [19]. Aussi, il y a une diminution de la force d'attachement de 32% au moment de la ponte car la moule peut décider d'utiliser son

énergie pour d'autres fonctions vitales [19]. Finalement, la force d'attachement peut également varier selon la stabilité de substrat [19]. Entre mai et octobre, la force d'attachement d'une moule sur un boudin en milieu naturel varie entre 24,1 et 46,6 N [19].

1.4 Objectifs du projet

Dans ce contexte, le premier objectif de mon projet est de déterminer la variation des propriétés mécaniques et du contenu en métaux des brins de byssus individuels selon l'environnement, la saison ainsi que la ponte de *Mytilus edulis*. Puisque la réticulation des PréCols est principalement assurée par les métaux de transition, une variation des propriétés mécaniques des brins de byssus pourrait être due à une variation de la concentration en métaux (fig.1.7). Ainsi, nous avons vérifié la corrélation entre les propriétés mécaniques des brins de byssus individuels et leur concentration en métaux. Plusieurs recherches sur le sujet ont été réalisées, mais la majorité traite seulement de la force d'attachement. Celle-ci est déterminée en reliant une moule fixée sur un boudin à un dynamomètre qui est tirée par un moteur (fig. 1.9). Ceci permet ainsi d'établir la force maximale, en Newton (N), nécessaire pour détacher la moule du boudin [19]. La force d'attachement est donc définie comme la force nécessaire pour «déraciner» une moule d'un substrat sur lequel elle est reliée par son byssus. Mes recherches portent sur les propriétés mécaniques des brins de byssus individuels. Pour mieux comprendre l'accumulation des métaux dans le byssus, nous avons déterminé la dynamique d'incorporation dans la moule en fonction de l'environnement.

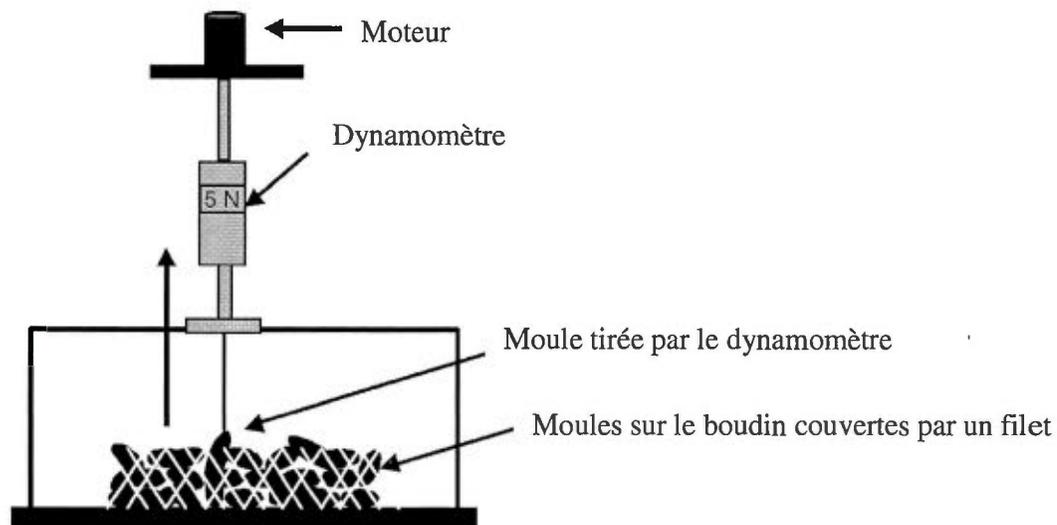


Figure 1.9 Schéma du montage utilisé pour l'acquisition de la force d'attachement d'une moule sur un boudin à l'aide d'un dynamomètre (Figure modifiée de [19])

Le second objectif de mon projet est d'étudier les différences structurales et dynamiques des byssus de moules. Les objectifs spécifiques étaient d'établir des comparaisons inter- et intra-genres et de vérifier l'effet de l'hydratation. Dans un premier temps, nous avons étudié les fibres produites par *Mytilus edulis* et *Xenostrobus securis* qui proviennent d'habitats différents. En effet, *M. edulis* de ce projet est originaire des Îles-de-la-Madeleine au Québec tandis que *X. securis* provient de Ria de Vigo, au nord-ouest de l'Espagne, où elles sont une espèce envahissante. Les filaments de byssus de ces moules sont visuellement très différents. En effet, contrairement aux brins hydratés de *M. edulis* qui ont une cassure franche lorsqu'étirés, ceux de *X. securis* s'effilochent de façon irrégulière le long de la fibre, comme une gomme à mâcher [20]. Les brins de byssus de *X. securis* sont très minces et leur diamètre ne varient pas avec la taille de la moule comme c'est le cas avec *M. edulis* [20].

Nous avons également déterminé les différences structurales et dynamiques dues à l'hydratation des byssus. Les propriétés mécaniques des filaments de byssus de ces deux moules varient selon qu'il est hydraté ou déshydraté. Le byssus de *M. edulis* déshydraté est 4 à 5 fois plus rigide et moins souple que lorsqu'il est hydraté [21]. Ces analyses ont été réalisées par résonance magnétique nucléaire de l'état solide à l'aide d'expériences uni (1D) et bidimensionnelles (2D).

Ces problématiques seront discutées dans les chapitres suivant. Le chapitre II traitera des aspects théoriques nécessaires à la bonne compréhension du texte et des expériences réalisées. Le chapitre III est un article soumis à la revue *Aquaculture* et qui a pour titre : *Impact of open-sea habitat on byssus attachment of suspension-cultured blue mussels (Mytilus edulis)*. Le chapitre IV présente les recherches sur l'accumulation privilégiée des métaux dans les tissus de la moule bleue influencée par la saison et le site. Au chapitre V, les différentes études de structure et de dynamique faites par résonance magnétique nucléaire sur les byssus de *Mytilus edulis* et *Xenostrobus securis* sont présentées. Un retour général sur les principaux résultats sera fait au chapitre VI.

CHAPITRE II

ASPECTS THÉORIQUES DES MÉTHODES ET TECHNIQUES UTILISÉES

2.1 Généralités de la RMN

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une méthode de caractérisation non destructive qui utilise la réponse des noyaux dans un champ magnétique pour définir leur environnement atomique. Un spectre de RMN permet d'obtenir des informations structurales et dynamiques sur la molécule analysée qui peuvent être très difficiles, même impossibles à obtenir à l'aide d'autres méthodes comme la cristallographie de rayons-X. La RMN permet d'analyser des composés en solution ou sous forme solide.

2.1.1 Le spin

Tous les noyaux qui ont un numéro atomique ou un nombre de masse impair possèdent une propriété quantique appelée spin (I), tel qu'illustré au moyen de quelques exemples dans le tableau 2.1.

Tableau 2.1 Abondance naturelle et rapport gyromagnétique de quelques noyaux (tableau modifié de [22])

Noyau	Abondance naturelle (%)	Spin (I)	γ (10^7 rad T $^{-1}$ s $^{-1}$)
${}^1_1\text{H}$	99,99	$\frac{1}{2}$	26,75
${}^{12}_6\text{C}$	98,9	0	-
${}^{13}_6\text{C}$	1,1	$\frac{1}{2}$	6,73
${}^{14}_7\text{N}$	99,6	1	1,93
${}^{15}_7\text{N}$	0,4	$\frac{1}{2}$	-2,71
${}^{31}_{15}\text{P}$	100	$\frac{1}{2}$	10,84

Le spin du noyau est une sorte de moment angulaire (\vec{I}) qui peut être symbolisé par un vecteur qui pointe dans la direction de l'axe autour duquel il tourne. Il existe $2I+1$ états de spins (niveaux d'énergie) entre $+I$ et $-I$ où $I = m\hbar$ [23]. \hbar est la constante de Planck divisée par 2π et m est le nombre quantique magnétique qui définit donc le nombre d'états de spin qu'un noyau peut adopter dans le champ magnétique B_0 [23]. Puisque le noyau est constitué de particules chargées, un moment magnétique ($\vec{\mu}$) est associé à \vec{I} [24] :

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{I} \quad (2.1)$$

Le rapport gyromagnétique (γ) est une constante propre à chaque noyau qui relie $\bar{\mu}$ à \bar{I} [24]. Lorsque le noyau est en présence d'un champ magnétique, le spin précesse à une fréquence précise appelée fréquence de Larmor (ω).

$$\omega = \gamma B_0 \quad (2.2)$$

Ainsi, plus γ est élevé et plus \bar{I} va précesser rapidement autour de B_0 . La fréquence de Larmor ne dépend que du champ magnétique et du rapport gyromagnétique. Ainsi, chaque noyau possède une fréquence de Larmor propre dans un champ magnétique donné.

2.1.2 Effet Zeeman

Le moment magnétique permet au noyau d'interagir avec un champ magnétique externe. Sans celui-ci, les $2I+1$ états de spins sont dégénérés. Par contre, en présence de B_0 , il y a levée de la dégénérescence et chacun des états de spins ont une énergie particulière (fig. 2.1).

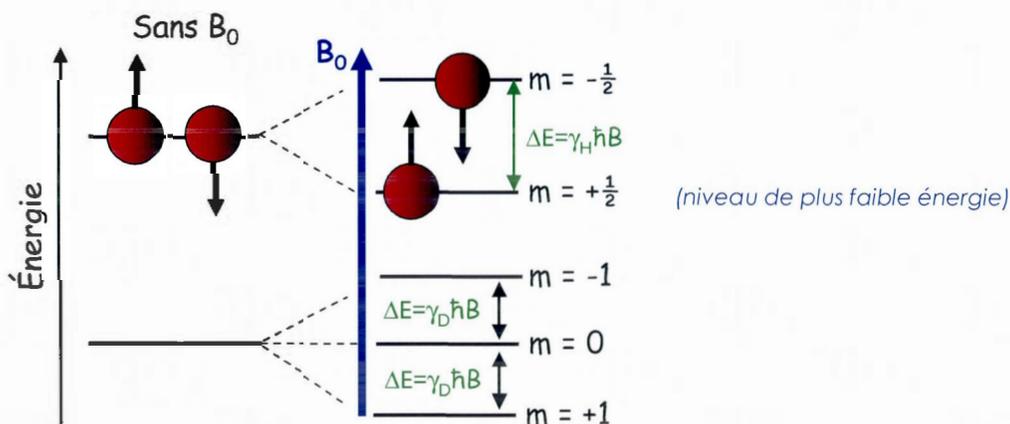


Figure 2.1 Levée de la dégénérescence des niveaux d'énergie en présence d'un champ magnétique B_0 pour un noyau de $I=1/2$ et $I=1$ [22]

C'est le B_0 qui est à l'origine de l'effet Zeeman. L'énergie (E) propre de chacun des états de spin peut être calculée selon l'équation 2.3 [23].

$$E = -m \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (2.3)$$

où h est la constante de Planck. L'énergie d'un état de spin est directement proportionnelle à γ et B_0 . Les différents niveaux d'énergie E sont donc séparés par

$$\Delta E = h\nu = \hbar\gamma B \quad (2.4)$$

Où $\hbar = h/2\pi$ et ν est la fréquence de radiation électromagnétique. En effet, une transition entre deux niveaux d'énergie peut être induite à l'aide d'un champ de radiofréquences (RF). Puisque γ est différent pour chaque noyau, la fréquence de résonance ν l'est également. Il est ainsi possible d'exciter sélectivement un noyau avec une radiation électromagnétique particulière. C'est cette propriété qui est à la base de la résonance magnétique nucléaire.

2.1.3 RMN en solution et de l'état solide

Les molécules d'un liquide sont mobiles et peuvent donc rapidement prendre toutes les orientations. Le spectre de RMN d'une solution présente donc des pics fins dits « isotropes » (δ_{iso}) qui sont une moyenne de toutes les orientations adoptées par les molécules dans la solution [25]. Au contraire, dans un solide, les mouvements moléculaires sont lents et le spectre obtenu tient donc compte de toutes les orientations de la molécule et donc du noyau étudié [25]. En effet, les interactions ayant une dépendance orientationnelle contribueront alors à élargir les spectres. Il s'agit alors de pics anisotropes. Ces interactions seront discutées plus en détail dans les sections qui suivent.

2.2 Interactions en jeux lors d'une analyse de RMN

2.2.1 Déplacement chimique

Le déplacement chimique est une donnée très importante en RMN car il donne de l'information sur l'environnement du noyau (ainsi que sur la distribution locale des électrons), c'est-à-dire sa position dans la molécule. Deux noyaux identiques qui n'ont pas le même environnement n'auront pas le même déplacement chimique. Cette variation est due au nuage électronique autour du noyau ainsi qu'aux électrons qui forment les liens entre les différents atomes. Les électrons qui bougent dans les orbitales électroniques autour du noyau forment un champ magnétique appelé champ magnétique induit (B_{ind}) qui peut augmenter (blindage) ou diminuer (déblindage) la force de B_0 [26]. Ainsi, le champ magnétique ressenti par le noyau (B_{eff}) n'est pas seulement celui de la bobine (B_0), mais la somme de B_0 et du champ magnétique induit par le nuage électronique (équation 2.5 [23])

$$B_{\text{eff}} = B_0 + B_{\text{ind}} \quad (2.5)$$

B_{ind} est proportionnel à B_0 et est habituellement de l'ordre de 10^{-4} par rapport à B_0 [23]. Puisque que la fréquence de Larmor (ω_i) varie selon le champ magnétique ressenti par le noyau, celle-ci variera selon l'emplacement du noyau dans la molécule et donnera donc des informations à propos de l'environnement du noyau atomique [23].

$$\omega_i = \gamma B_0 (1 - \sigma_i) \quad (2.6)$$

où σ_i est la constante de blindage [26]. La valeur de σ_i dépend de l'orientation par rapport au champ magnétique, comme discuté à la section suivante.

2.2.2 Anisotropie de déplacement chimique

Puisque le nuage électronique n'est pas uniforme autour du noyau, chaque orientation, dans le cas d'un solide, a une fréquence de résonance propre et ceci se traduit, sur le spectre, par des pics de plusieurs kHz de largeur qui regroupent tous les pics fins reliés à toutes les orientations possibles du noyau. La fréquence de résonance ($\omega(\alpha, \beta)$) pour un spin $\frac{1}{2}$ dans un champ magnétique B_0 est décrite par l'équation suivante [25] :

$$\omega(\alpha, \beta) = \gamma \beta_1 \left[\delta_{iso} + \delta \left(\frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} - \eta \frac{\sin^2 \beta \cos 2\theta}{2} \right) \right] \quad (2.7)$$

α et β sont l'orientation du tenseur d'anisotropie avec le champ magnétique B_0 . δ_{iso} représente le déplacement chimique isotrope et δ l'anisotropie de déplacement chimique. La fréquence de résonance d'un spin a une dépendance orientationnelle dans le champ magnétique selon un facteur $3 \cos^2 \beta - 1$. L'anisotropie de déplacement chimique n'existe qu'en RMN de l'état solide (RMN-ÉS) puisque dans un liquide, il y a un effet de moyenne, comme discuté au paragraphe 2.1.2. L'orientation du nuage électronique étant importante en RMN-ÉS dû aux mouvements lents des molécules, σ_i (équation 2.6) est remplacé par $\overline{\sigma}$ qui est le tenseur de blindage (fig. 2.2). L'orientation d'un noyau dans le champ magnétique peut donc être déterminée par les axes principaux σ_{11} , σ_{22} et σ_{33} du tenseur $\overline{\sigma}$. Le tenseur de blindage $\overline{\sigma}$ représenté sous la forme d'une matrice peut être diagonalisé à l'aide d'un système de coordonnées approprié (fig. 2.2). Le tenseur aura donc des éléments seulement sur sa diagonale et pourra être caractérisé uniquement par ces éléments principaux [27].

$$\begin{bmatrix} \sigma_{11} & \sigma_{12} & \sigma_{13} \\ \sigma_{21} & \sigma_{22} & \sigma_{23} \\ \sigma_{31} & \sigma_{32} & \sigma_{33} \end{bmatrix} \xrightarrow{\text{Diagonalisation}} \begin{bmatrix} \sigma_{11} & & \\ & \sigma_{22} & \\ & & \sigma_{33} \end{bmatrix}$$

Figure 2.2 Matrice de tenseur $\overline{\sigma}$ et diagonalisation

2.2.3 Couplage scalaire

Le couplage scalaire est l'interaction qui a lieu entre deux spins, à travers les liens électroniques. Ce couplage est à l'origine de la multiplicité des pics sur les spectres de RMN en solution. La distance, en Hz, entre les pics d'un multiplet est appelée constante de couplage (J). Comparativement à d'autres interactions, la valeur de J ne dépend pas de B_0 [26]. Si le couplage a lieu entre deux noyaux différents, il s'agit de couplage hétéronucléaire. S'il a lieu entre deux mêmes isotopes, il s'agit de couplage homonucléaire. Les couplages observés sont habituellement les J^2 (couplage géminal) et J^3 (couplage vicinal) car ils ont une magnitude qui dépasse 1 Hz. Il s'agit de l'interaction entre deux noyaux qui sont séparés par deux ou trois liaisons respectivement. Le couplage J^3 est celui qui permet d'obtenir le plus d'information à propos de la structure tridimensionnelle d'une molécule. En effet, la relation de Karplus permet de déterminer l'angle dièdre entre deux ^1H vicinaux à partir de leur constante de couplage J^3 . Il est ainsi possible de déterminer, par exemple si un lien double est cis ou trans. Le couplage scalaire est une interaction très faible (quelques Hz) qui n'est pas observée en RMN-ÉS car dominée par le couplage dipolaire (de l'ordre du kHz).

2.2.4 Couplage dipolaire

Le couplage dipolaire est l'interaction entre deux spins à travers l'espace. Il peut être homo- ou hétéronucléaire. Sur un spectre, ceci se traduit en une séparation des pics. Pour des noyaux A et B hétéronucléaires, le couplage dipolaire se calcule avec l'équation suivante [26]:

$$\omega_D = \pm \frac{1}{2} \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{h\gamma_A\gamma_B}{r_{AB}^3} \left(\frac{3\cos^2\theta - 1}{2} \right) \quad (2.8)$$

où r est la distance entre les deux noyaux et θ est l'angle entre le vecteur internucléaire et le vecteur de B_0 (fig. 2.3).

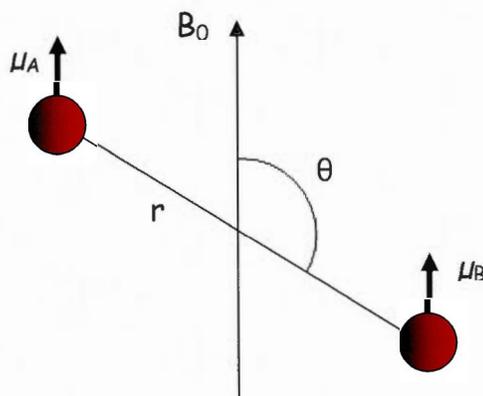


Figure 2.3 Angle θ entre B_0 et le vecteur internucléaire des noyaux A et B lors d'un couplage dipolaire

Le signe \pm indique un éclatement des pics d'une largeur $2\omega_D$. La séparation sera maximale pour $\theta=0^\circ$, donc $\bar{\mu}$ parallèle à B_0 , et minimale pour $\theta=54,7^\circ$. ω_D dépend donc de l'orientation des noyaux par rapport au champ magnétique, mais il est indépendant de B_0 , tel que démontré par l'équation 2.8. Le couplage dipolaire est aussi dépendant de la distance entre les noyaux. En connaissant le couplage dipolaire, il est ainsi possible de déterminer la distance entre les noyaux [23].

Le couplage dipolaire dans un liquide est moyenné par le mouvement rapide des molécules de $\theta = 0^\circ$ à $\theta = 90^\circ$ proportionnellement à l'échelle de temps de la RMN [26]. L'effet du couplage dipolaire n'est donc habituellement pas visible sur un spectre en solution, contrairement à l'étude des solides. Par contre, dans certaines expériences de RMN en solution comme le NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy), le couplage dipolaire est exploité pour déterminer la distance entre des noyaux.

2.2.5 Couplage électrique quadripolaire

Le couplage électrique quadripolaire est l'interaction entre le moment quadripolaire du noyau et son gradient de champ électrique. Il a lieu seulement pour les noyaux de spin supérieur ou égal à 1 car ceux-ci ont une distribution électrique de charge non uniforme autour du noyau [24]. En effet, elle est plutôt de forme ovale, donc anisotrope. Lorsqu'un tel noyau est placé dans champ électrostatique avec un gradient non nul, les extrémités de son nuage électronique peuvent être plus près des régions de plus haut potentiel pour certaines orientations et plus près des régions de potentiel plus bas pour d'autres orientations. Il y a donc une énergie électrostatique particulière reliée à chaque orientation du noyau [23]. Sur le spectre, ceci se traduit en une séparation des pics (fig. 2.4).

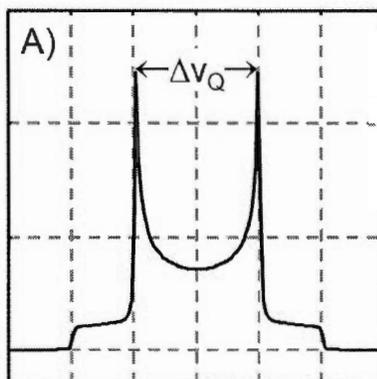


Figure 2.4 : Doublet causé par le couplage électrique quadripolaire [22]

L'interaction quadripolaire électrique est donnée par l'équation suivante [23] :

$$\Delta\nu = \frac{3e^2qQ}{4hI(2I-1)}(3\cos^2\theta - 1) \quad (2.9)$$

Où $\Delta\nu$ est appelé *l'écart quadripolaire* et est la distance entre les doublets, e est la charge de l'électron, q est le moment électrique quadripolaire et est une mesure du taux de déviation de la distribution électrique de charge par rapport à une distribution sphérique. Q est le gradient de champ électrostatique [23]. Le couplage quadripolaire est très fort et domine le spectre en RMN-ÉS. Par contre, il n'est pas visible sur les

spectres de RMN en solution car il est moyenné par la réorientation rapide des molécules. Puisque le couplage électrique quadripolaire dépend de l'orientation de la molécule dans le champ magnétique, il peut donc être utilisée, par exemple, pour des mesures de réorientation dans les polymères [22]. Ce type de noyaux n'a pas été étudié dans le cadre de ce travail.

2.3 Techniques pour augmenter la résolution et la sensibilité

Particulièrement en RMN de l'état solide, le manque de résolution dû aux pics larges ainsi que le manque de sensibilité dû à la faible abondance naturelle ou à un faible γ de plusieurs noyaux couramment étudiés sont des problèmes importants. Cependant, la rotation à l'angle magique, le transfert de polarisation et le découplage sont des techniques qui peuvent significativement améliorer la qualité des spectres.

2.3.1 Rotation à l'angle magique

La rotation à l'angle (*magic-angle spinning*, MAS), consiste à faire tourner l'échantillon à un angle de $54,7^\circ$ à des vitesses de l'ordre du kHz. Ceci a pour effet de moyenniser toutes les interactions qui dépendent de l'orientation dans un échantillon solide. En effet, en remplaçant β par $57,4^\circ$ dans l'équation 2.7, on n'obtient que la fréquence isotrope. Similairement dans l'équation 2.8, D_{AX} devient égal à zéro pour la majorité des couplages dipolaires [26]. Ainsi, le spectre présentera une série de pics étroits, semblables à ceux obtenus lors de l'analyse d'une solution, séparés cependant par la fréquence de rotation. Pour éliminer l'effet d'une interaction, il faut faire tourner l'échantillon plus vite que la largeur de cet effet. Par contre, des barrières techniques limitent la vitesse de rotation, et, dans le cas du couplage $^1\text{H}-^1\text{H}$, ce dernier ne peut être complètement moyenné.

2.3.2 Polarisation croisée

La polarisation croisée (*cross polarization*, CP) permet le transfert de la polarisation d'un noyau sensible ayant un γ élevé, comme l'hydrogène ou le fluor, vers un noyau dit «insensible», qui a un γ faible, comme le carbone ou l'azote (voir tableau 2.1) [6]. Le transfert de polarisation entre les deux noyaux se fait par le couplage dipolaire. Le gain dépend de l'équation suivante [26]:

$$\gamma_S/\gamma_I = \text{facteur de gain} \quad (2.10)$$

où γ_S est le rapport gyromagnétique du noyau sensible et γ_I celui du noyau insensible. Ainsi, dans le cas de l'hydrogène et de l'azote-15 par exemple, le gain est augmenté d'un facteur 9 (tableau 2.1) [26]. Le rapport signal sur bruit (S/B) du spectre est donc également augmenté. La séquence d'impulsion est présentée à la figure 2.5 pour une expérience de RMN ^{13}C unidimensionnelle (1D).

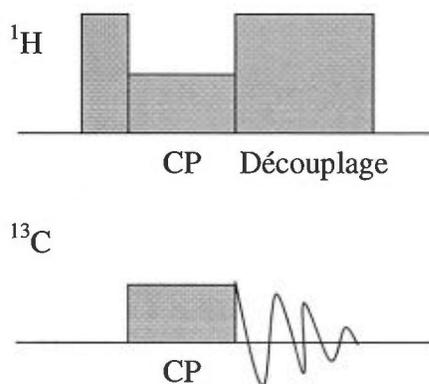


Figure 2.5 Séquence d'impulsions de la polarisation croisée

Le transfert de polarisation a lieu lorsque la condition de Hartmann-Hahn est satisfaite, soit:

$$\omega_S = \omega_I \quad (2.11)$$

avec $\omega_S = \gamma_S B_S$ et $\omega_I = \gamma_I B_I$ (2.12)

où B_S et B_I sont les champs de radiofréquence appliqués sur les noyaux sensible et insensible, respectivement. Lorsque la condition est satisfaite, les deux noyaux ont la même fréquence de résonance [28]. Ils peuvent donc s'échanger de la magnétisation [28]. Lorsque la polarisation croisée est réalisée en MAS, un nouveau terme s'ajoute à l'équation 2.11 [27]

$$\omega_S = \omega_I \pm n \omega_r \quad (2.13)$$

où n est un nombre entier et ω_r est la fréquence de rotation de l'échantillon. L'ajout de ce terme signifie que la condition variera avec la vitesse de rotation de l'échantillon.

Le temps d'attente d_1 entre deux analyses permet la relaxation des noyaux (fig. 2.5). Par contre, il est seulement nécessaire que le noyau sensible ait complètement relaxé. Ainsi, le délai entre les analyses est diminué car les noyaux avec de forts γ relaxent habituellement plus rapidement que ceux avec de faibles γ dans les échantillons solides [26].

2.3.3 RINEPT

Le RINEPT (*Refocused Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer*) est une séquence d'impulsions développée pour le transfert de polarisation d'un noyau très sensible vers un noyau peu sensible, originalement pour la RMN en solution. Par contre, elle est utilisée en RMN de l'état solide pour cibler les zones mobiles d'un matériau. Contrairement à la polarisation croisée, le transfert de polarisation se fait via les couplages scalaires (J) [29]. La séquence d'impulsions est présentée à la figure 2.6.

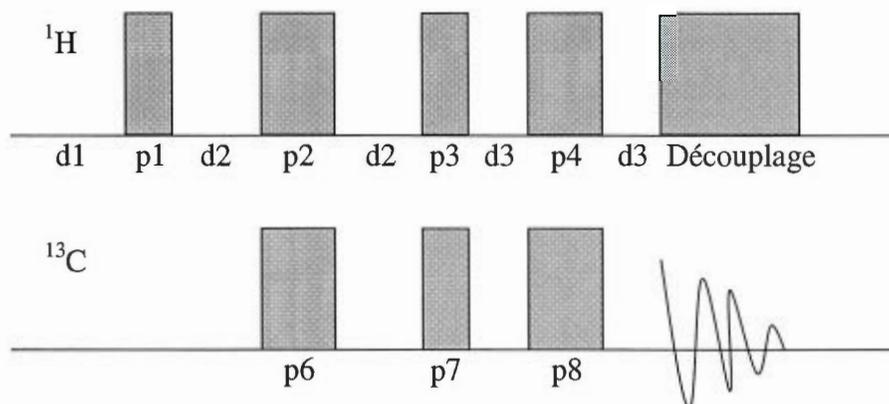


Figure 2.6 Séquence d'impulsions du RINEPT [29]

L'optimisation du délai d3 est proportionnelle à la constante de couplage $J^{1\text{H}-^{13}\text{C}}$ et au nombre de protons couplés au carbone (n) et sa valeur est donnée par l'équation suivante:

$$d3_{opt} = (\pi J)^{-1} \arcsin(n)^{-1/2} \quad (2.14)$$

La constante de couplage $J^{1\text{H}-^{13}\text{C}}$ est relativement indépendante de l'environnement. Comme pour les autres techniques de transfert de polarisation, le temps d'attente entre deux analyses dépend du temps de relaxation du proton, qui est le noyau sensible, et non du noyau observé, qui est habituellement plus long.

2.3.4 Découplage

La technique de découplage consiste à appliquer un champ de radiofréquences constant sur le ^1H pendant toute l'acquisition du signal du noyau observé - le ^{13}C dans le cas de notre étude. Ceci sature le signal du ^1H et élimine le couplage hétéronucléaire $^{13}\text{C}-^1\text{H}$, donc les multiplets [23]. Le spectre est ainsi plus simple à analyser. Aussi, il y a une amélioration du rapport S/B car l'intensité des multiplets est sommée dans un singulet. Un effet secondaire du découplage est l'effet NOE, qui est une méthode de transfert de polarisation du ^1H vers le ^{13}C . Il permet d'augmenter

l'intensité des pics du noyau observé. Par contre, dans le cadre d'un découplage, l'effet NOE est très subtil.

2.4 Analyse de la dynamique d'un matériau

L'analyse de la dynamique moléculaire d'un matériau se fait de plusieurs façons. Elle peut se faire directement sur un spectre en mesurant la largeur des pics. Elle peut également être réalisée en comparant le spectre de différentes expériences qui ciblent chacune spécifiquement les zones mobiles ou rigides du matériau. Finalement, elle peut se faire en mesurant les temps de relaxation du matériau.

2.4.1 Largeur des pics

La largeur des pics est un bon indice de la mobilité de la structure moléculaire d'un matériau. Un pic large est relié à une zone rigide alors qu'un pic étroit est associé à zone mobile. En effet, dans les zones mobiles d'un solide, les molécules bougent plus rapidement et le spectre présente des pics plus fins, les interactions ayant une dépendance orientationnelle étant partiellement moyennisées. Au contraire, dans les zones rigides, les molécules bougent lentement et le spectre présente des pics larges anisotropes.

2.4.2 Comparaison CP / DP / RINEPT

La séquence la plus simple en RMN est l'impulsion directe (*direct pulse*, DP). Il s'agit d'appliquer une impulsion de 90° sur le noyau analysé et ensuite faire l'acquisition du signal (figure 2.7). Il peut y avoir ou non un découplage des protons.

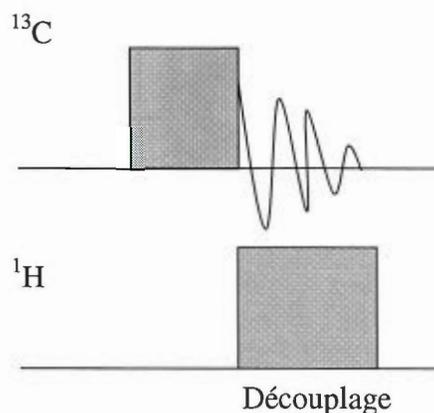


Figure 2.7 Séquence d'impulsions d'une expérience DP en ^{13}C avec découplage des protons

La DP n'est pas discriminante en ce qui concerne la dynamique moléculaire d'un matériau, mais n'utilise aucune stratégie pour augmenter le signal des noyaux insensibles. Comme discuté à la section 2.3.2, la CP et le RINEPT permettent d'augmenter l'intensité du signal par le transfert de polarisation du proton vers le carbone, par les couplages dipolaire et scalaire, respectivement. Pour le CP, le transfert de polarisation sera donc plus efficace pour les régions rigides. En effet, si deux molécules sont mobiles, le transfert de polarisation ne peut se faire efficacement. Au contraire, le RINEPT est une technique développée pour des expériences en solution et se fait via le couplage scalaire. Ainsi, cette expérience cible spécifiquement les parties mobiles d'un matériau. La comparaison du spectre DP, CP et RINEPT d'un matériau donne donc de l'information sur sa dynamique.

2.4.3 WISE

Compte tenu de la grandeur des couplages dipolaires homonucléaires, un spectre de proton (^1H) standard d'un échantillon solide est très large car constitué d'une superposition de pics. Leur corrélation avec la structure du matériau analysé est difficile à faire [30]. Peu d'informations sur la mobilité d'un matériel solide peuvent donc être tirées d'un spectre RMN ^1H de l'état solide. Le WISE (*wideline separation*)

est une expérience 2D avec une dimension (directe) en ^{13}C et une dimension (indirecte) en ^1H . Pour chaque pic de ^{13}C résolu, il y a un spectre associé en proton d'une largeur déterminée causée par le couplage dipolaire entre ce ^{13}C et le proton à proximité [31]. Les pics larges sont dus à des protons qui ont une faible mobilité et les pics étroits, à ceux qui ont une grande mobilité. Ainsi, une expérience WISE permet de comparer la mobilité des différents atomes de ^{13}C d'un matériau. La séquence d'impulsion du WISE est très semblable à celle de la polarisation croisée (fig.2.8) [31].

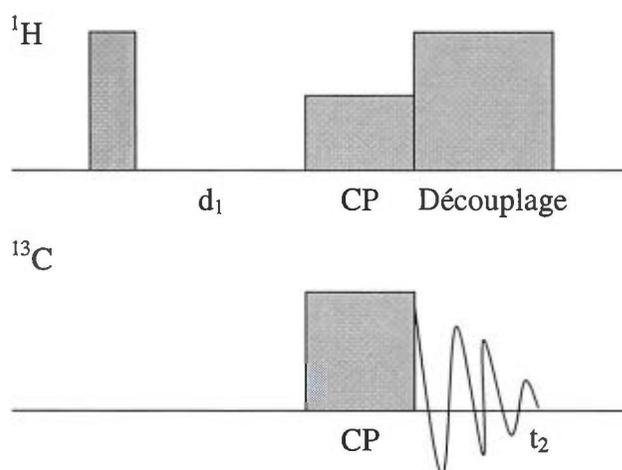


Figure 2.8 Séquence d'impulsion d'une expérience WISE

Seule une période d'évolution d_1 est ajoutée entre la première impulsion de 90° et le transfert de polarisation. C'est l'incrément de d_1 et du temps d'acquisition en ^{13}C (d_2) qui va créer la seconde dimension. Pendant le temps d_1 , la magnétisation de la partie rigide décroît plus rapidement que celle de la partie mobile [31]. Par contre, pendant le transfert de polarisation, la magnétisation de la partie mobile décroît plus rapidement que celle de la partie rigide.

2.4.4 Temps de relaxation T_2

La relaxation est le principe par lequel les noyaux retournent à leur état naturel d'équilibre après l'excitation par le champ de RF. Plusieurs mécanismes de relaxation sont utilisés pour retourner à l'état d'équilibre. L'un d'entre eux est la relaxation transverse (T_2). Lorsque le champ de RF est appliqué, les spins nucléaires précessent tous à une certaine fréquence de Larmor. Lorsque l'impulsion est terminée, ceux-ci continuent de précesser. Par contre, ils se dérèglent peu à peu jusqu'à être complètement incohérents. La séquence d'impulsion est présentée à la figure 2.9.

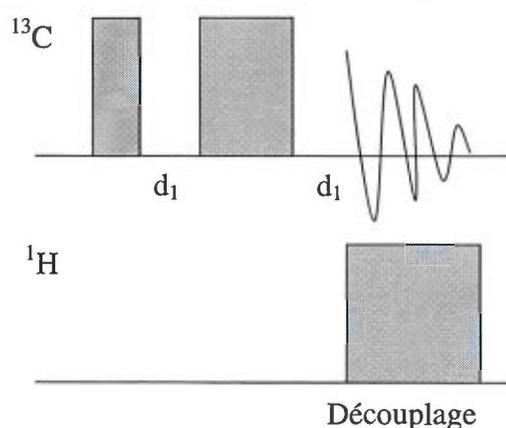


Figure 2.9 Séquence d'impulsion d'une expérience T_2 en ^{13}C

Il s'agit d'un écho de Hahn avec un découplage en ^1H lors de l'acquisition. d représente le délai entre les impulsions qu'il faut varier pour déterminer la valeur de T_2 . Il y a un lien direct entre le temps de relaxation T_2 et la structure d'un matériau [29]. En effet, T_2 est influencé par plusieurs facteurs, dont la température, la viscosité, la cristallinité et la taille de la molécule étudiée [23]. La valeur de T_2 d'un noyau est inversement proportionnelle à la largeur à mi-hauteur ($\nu_{1/2}$) du pic correspondant dans le spectre de RMN (fig. 2.10).

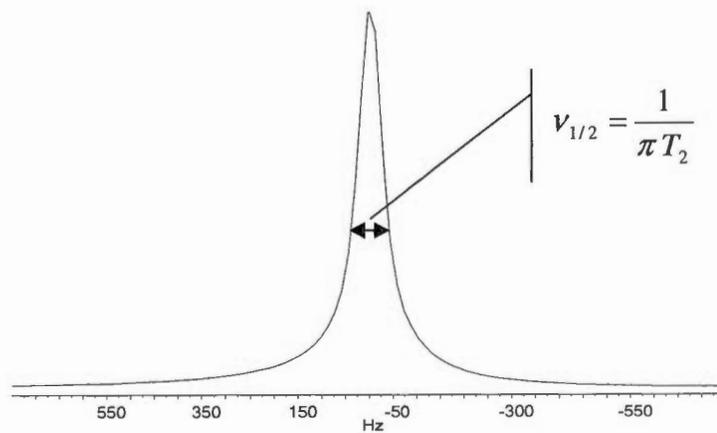


Figure 2.10 Détermination de T_2 à partir de la largeur à mi-hauteur ($\nu_{1/2}$) d'un pic

2.4.5 Résumé des expériences de RMN

Les expériences DP, CP RINEPT, T_2 et WISE ont été utilisées au chapitre IV pour l'analyse de la structure et de la dynamique des fibres de byssus. Le tableau 2.2 présente un résumé de ces techniques.

Tableau 2.2 : Résumé des expériences de RMN pour l'étude de la structure et de la dynamique des matériaux

Expérience de RMN	Informations obtenues	Paramètres mesurés	Dimension	Noyaux observés
Polarisation croisé	<ul style="list-style-type: none"> · Information structurale des zones rigides · Augmente la sensibilité par transfert de polarisation basé sur le couplage dipolaire 	<ul style="list-style-type: none"> · Déplacement chimique · Largeur des pics 	1D	^{13}C
RINEPT	<ul style="list-style-type: none"> · Information structurale des zones mobiles · Augmente la sensibilité par transfert de polarisation basé sur le couplage scalaire 	<ul style="list-style-type: none"> · Déplacement chimique · Largeur des pics 	1D	^{13}C
DP	<ul style="list-style-type: none"> · Information structurale et dynamique sans discrimination de la rigidité 	<ul style="list-style-type: none"> · Déplacement chimique · Largeur des pics 	1D	^{13}C
T_2	<ul style="list-style-type: none"> · Information sur la dynamique par relaxation de la magnétisation des noyaux 	<ul style="list-style-type: none"> · Déplacement chimique · Largeur des pics 	1D	^{13}C
WISE	<ul style="list-style-type: none"> · Information sur la dynamique de chaque pic de ^{13}C résolu 	<ul style="list-style-type: none"> · Déplacement chimique dans la dimension ^{13}C · Largeur des pics dans la dimension ^1H 	2D	^1H et ^{13}C

2.5 Propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques des brins de byssus sont déterminées à l'aide d'un analyseur mécanique dynamique (*dynamic mechanical analysis*, DMA) qui mesure la force externe nécessaire pour étirer le matériau d'une longueur donnée. Les paramètres calculés sont la force à la rupture, la contrainte à la rupture, la déformation à la rupture ainsi que le module initial.

2.5.1 Contrainte

Pour deux byssus de diamètres différents, celui qui a un diamètre plus élevé aura également une force plus élevée. La contrainte est alors utilisée complémentirement à la force, car elle tient compte de la section du byssus. De ce fait, la valeur obtenue est indépendante du diamètre. La contrainte est la force interne qui distribue la force externe tout au long de la fibre entre les deux points d'étirement [32]. Mathématiquement, elle est définie comme l'intensité d'une force qui agit sur un élément de surface unitaire [33]. En connaissant la force, il est possible de calculer la contrainte à l'aide de l'équation 2.15 [33].

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (2.15)$$

où σ est la contrainte, F est la force exercée et A est l'aire de la section transversale. La section est calculée à partir de l'équation 2.16 :

$$A = \pi r^2 \quad (2.16)$$

r est le rayon du byssus déterminé par microscopie optique. La contrainte possède des unités de pression et est généralement exprimée en MPa.

2.5.2 Déformation

La déformation peut être définie comme le changement de forme ou de grandeur d'un élément sous l'effet d'une traction ou d'une compression [32-33]. La déformation linéaire (ε) du matériau analysé est calculée à l'aide de l'équation 2.17 [33].

$$\varepsilon = \frac{\Delta l}{l_0} \quad (2.17)$$

où l_0 est la longueur initiale du matériau et Δl est la variation de la longueur du matériau à partir de la longueur initiale. La déformation n'a pas de dimension. Elle est souvent représentée en %, comme c'est le cas dans ce travail. La déformation à la rupture est celle obtenue lorsque le matériau est scindé en deux parties distinctes.

2.5.3 Module initial

Le module initial (E), aussi appelé module de Young, est un coefficient de proportionnalité qui permet de relier la contrainte à la déformation dans le domaine élastique [33].

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} \quad (2.18)$$

Le module initial a une dimension de pression. Il peut aussi être déterminé en calculant la pente de la première partie linéaire du graphique contrainte/déformation. Ce graphique permet de caractériser les types de matériaux analysés, comme un matériau rigide/mou, ductile/fragile, tenace/faible, etc. [32]. La figure 2.11 présente le graphique contrainte/déformation d'un byssus complet (partie proximale et distale) de *M. edulis* hydraté.

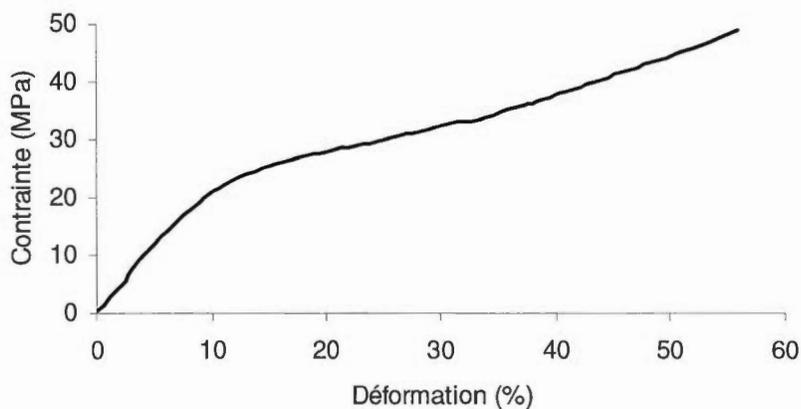


Figure 2.11 Graphique contrainte/déformation d'un brin de byssus complet de *M. edulis* hydraté

Le coefficient de Poisson (ν) est défini comme la contraction qui a lieu perpendiculairement à une force de traction (axiale) exercée sur un matériau [33]. Il est calculé à partir de l'équation 2.19 [33].

$$\nu = -\frac{\varepsilon_A}{\varepsilon_L} \quad (2.19)$$

Avec $\varepsilon_A = \frac{dA}{A}$ et $\varepsilon_L = \frac{\Delta l}{l}$

Puisque la variation de longueur des brins de byssus est plus importante que la variation en largeur, le coefficient de poisson peut être approximé à 0,00 – 0,25. Il est donc négligeable et l'équation 2.17 convient au système.

2.6 Analyses statistiques

Plusieurs tests statistiques ont été utilisés aux chapitres III et IV. Voici une description de ceux-ci.

2.6.1 Analyse canonique de redondance

L'analyse canonique de redondance (RDA) est un test statistique développé par le Pr. Pierre Legendre de l'Université de Montréal [34]. La RDA est un test multivarié basé sur l'utilisation d'une matrice de variables réponses Y (variables à expliquer) et d'une matrice de variables explicatives X [34]. Au chapitre III, les variables explicatives sont le site et la saison et les variables réponses sont les propriétés mécaniques des byssus ainsi que leur teneur en métaux. Au chapitre IV, les variables explicatives sont les tissus et les variables réponses sont leur teneur en métaux. La RDA recherche la combinaison de variables X qui expliquent le mieux la variation des variables Y. Pour ce faire, un processus d'ordination sous contrainte est effectué, où chacune des variables Y sont régressées sur les variables X [34]. Les résultats de ces calculs peuvent être représentés sur un diagramme de double projection, comme présenté aux chapitres IV et V, où chacun des axes représente une combinaison linéaire de chacune des variables explicatives. Ce diagramme présente les corrélations entre les variables réponses et explicatives selon l'angle entre les vecteurs.

2.6.2 Test t

Le test t, aussi appelé test student, est utilisé dans trois principaux cas, soit pour comparer une moyenne à une valeur type, pour comparer deux moyennes ou dans le cas d'un test apparié [35]. Lors de la comparaison des moyennes, ce test prend également en compte la variance des moyennes des populations. Lorsqu'elle n'est pas

connue, elle peut être supposée à l'aide du test t [35]. Dans toutes les situations, le test est basé sur la distribution t. Plus le nombre d'individus d'un échantillon est élevé, et plus la distribution t est comparable à une distribution normale [36]. Dans le cadre de cette recherche, le test t a été utilisé pour comparer deux moyennes dont la variance était connue [35]. Le test d'hypothèse était le suivant. Hypothèse nulle : les deux moyennes sont comparables ($H_0 : \mu_1 = \mu_2$). Hypothèse alternative : il y a une différence significative entre les deux moyennes ($H_1 : \mu_1 \neq \mu_2$) [35]. La formule suivante a été utilisée pour les analyses statistiques [35] :

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\sigma_1^2/n_1 + \sigma_2^2/n_2}} \quad (2.20)$$

où $\bar{X}_1, \bar{X}_2, \sigma_1, \sigma_2, n_1$ et n_2 sont respectivement la moyenne, l'écart type et le nombre d'individu des échantillons 1 et 2 [35]. Si le t calculé est dans la limite des valeurs critiques, l'hypothèse nulle (H_0) n'est pas rejetée et il n'y a donc statistiquement pas de différence significative entre les deux moyennes [35]. Pour chaque test t, un risque α de faire une erreur de type I est associé. Cette erreur survient lorsque l'hypothèse nulle est rejetée alors qu'elle devrait être acceptée [35].

2.6.3 Analyse de la variance

L'analyse de la variance (ANOVA) permet d'utiliser un seul test pour comparer l'effet d'une variable dépendante sur plusieurs moyennes [36]. Ceci rend l'analyse plus simple et un seul risque de faire une erreur de type I est associé à l'ensemble de l'analyse [35]. Les données de chacune des moyennes doivent avoir une distribution normale pour être analysées. Pour l'analyse de trois populations, le test d'hypothèse est donc $H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$ et $H_1 : \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$. S'il y a une différence entre les moyennes, le test ne permet pas de déterminer laquelle est significativement différente. Ainsi, si une seule moyenne n'est pas comparable aux autres, l'hypothèse

nulle sera rejetée. L'ANOVA permet de déterminer s'il y a une différence entre les moyennes en utilisant une estimation de la variance [36]. Pour ce faire la variance inter-population (S_1^2) est divisée par la variance intra-population (S_2^2).

$$f = \frac{S_1^2}{S_2^2} \quad (2.21)$$

Si la valeur de f calculée est à l'intérieur des limites de f critique, l'hypothèse nulle ne peut être rejetée.

2.6.4 Test Tukey

Le test Tukey est utilisé en complémentarité avec le test ANOVA, dans le cas du rejet de l'hypothèse nulle, pour déterminer quelle moyenne est significativement différente des autres, c'est-à-dire pour des tests post-hoc. Ce test est basé sur la loi de l'étendue studentisée [37]

$$q = \frac{\bar{y}_{\max} - \bar{y}_{\min}}{s / \sqrt{n}} \quad (2.22)$$

où y_{\max} et y_{\min} sont respectivement la plus grande et la plus petite valeur de moyenne. Ainsi, si une valeur de q critique est déterminée en comparant la moyenne maximale et la moyenne minimale, $|\bar{y}_{\max} - \bar{y}_{\min}|$, ceci indique qu'il y a une différence significative entre les deux et que toutes les autres paires de moyennes qui ont une différence égale ou supérieure à cette valeur critique de q sont également significativement différentes [37]. Le test Tukey est semblable au test student t , mais le risque α de faire une erreur de type I est diminué. En effet, un seul risque d'erreur de type I est associé à l'ensemble du test, comparativement au test t où une erreur est associée à chacune des comparaisons [37]. Les tests de student et de Tukey ont été utilisés pour faire les analyses de comparaisons multiples.

2.7 Analyses chromatographiques

2.7.1 Chromatographie liquide haute performance

La chromatographie liquide haute performance (CLHP) est utilisée pour séparer, identifier et quantifier les composés d'une solution. À l'aide d'un solvant, ou mélange de solvant, appelé phase mobile, la solution est éluée sur une phase stationnaire où il y a séparation des analytes selon son affinité pour les deux phases. Il existe principalement quatre types de CLHP : chromatographie de partage, d'adsorption, par échange d'ions et d'exclusion [38]. Pour les analyses d'acides aminés et d'enrichissement en ^{13}C présentés au chapitre V, la chromatographie de partage à phase inversée a été utilisée. Pour ce type de chromatographie, la phase stationnaire est constituée de grande chaînes hydrocarbonées alignées parallèlement les une aux autres, ce qui la rend non polaire [38]. Une phase mobile polaire comme l'eau, le méthanol ou l'acétonitrile est alors utilisée. Elle peut être isocratique, lorsqu'elle est constante tout au long de l'analyse, ou avec un gradient lorsqu'il y a plus d'un éluant et que leur concentration varie dans la phase mobile [38]. En plus de la composition des phases mobile et stationnaire, plusieurs paramètres peuvent faire varier l'éluion des analytes, dont le volume d'échantillon injecté, la température de la colonne et la vitesse de la phase mobile. Pour l'analyse des acides aminés dans le byssus, un détecteur UV a été utilisé alors que pour l'analyse du taux de marquage en ^{13}C , un ICP-MS a été employé (voir section 2.7.2). Plusieurs autres modes de détection peuvent être utilisés, dont électrochimique, indice de réfraction et conductivité. Le choix du détecteur dépend de la nature de l'échantillon [38].

2.7.2 Spectrométrie de masse par torche au plasma

La spectrométrie de masse est une méthode analytique qui permet de séparation des composés selon leur ratio masse/charge (m/z). Pour être analysé, un composé doit donc être chargé. Plusieurs sources d'ionisation peuvent être utilisées,

dont par impact électronique, par ionisation chimique, par désorption et ionisation laser assistée par matrice et par électro-nébulisation (électrospray) [39]. Le choix de la source utilisée dépend de l'énergie nécessaire pour ioniser l'analyte ainsi que sa nature physicochimique. Pour les analyses de métaux et métalloïdes des chapitres III et IV, le plasma à couplage inductif (ICP) a été utilisé. Il s'agit d'un plasma créé par couplage inductif dans un flux d'argon où les atomes s'entrechoquent et se heurtent pour former des ions et des électrons, suite à des décharges Tesla [39]. L'échantillon était introduit sous forme d'aérosol à l'aide d'un micro-nébulisateur dans ce plasma auto-entretenu qui atteint une température de 10 000K [39]. À cette température, les molécules sont rapidement désolvatées, atomisées puis ionisées pour former majoritairement des ions positifs monochargés qui seront ensuite introduits dans l'analyseur [39]. Puisque les composés sont majoritairement ionisés positivement et monochargés, il n'est pas possible de déterminer le taux d'oxydation des métaux.

Les ions traversent ensuite l'analyseur où ils seront séparés selon leur masse. Il existe plusieurs analyseurs dont le quadripôle, la trappe ionique, l'orbitrap et l'analyseur à temps de vol [39]. L'analyseur utilisé dépend de la source d'ionisation ainsi que des caractéristiques nécessaires à l'analyse, soit la vitesse de balayage, la résolution et la limite et l'exactitude des masses [39]. Le quadripôle a été utilisé pour les analyses de métaux et métalloïdes. Il s'agit de quatre électrodes parallèles sur lesquels une tension alternative est appliquée. Un ion qui voyage entre ces barres est donc soumis à un champ magnétique oscillant [39]. Seulement ceux qui ont le bon rapport m/z à un champ donné auront une trajectoire assez stable pour traverser le quadripôle et se rendre au détecteur..

CHAPITRE III

IMPACT OF OPEN-SEA HABITAT ON BYSSUS ATTACHMENT OF SUSPENSION-CULTURED BLUE MUSSELS (MYTILUS EDULIS)

Marc-Olivier Seguin-Heine¹, Andrée-Anne Lachance², Bertrand Genard²,
Bruno Myrand³, Christian Pellerin⁴, Isabelle Marcotte¹ & Réjean Tremblay^{2*}

¹ Département de chimie, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succursale
Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8.

² Institut des Science de la Mer, Université du Québec à Rimouski, 310 allée des
Ursulines, Rimouski (Québec) Canada, G5L 3A1.

³ Merinov, 107-125 chemin du Parc, Cap-aux-Meules (Québec) Canada, G4T 1B3.

⁴ Département de chimie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-Ville,
Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

* Corresponding author: Phone (418) 723-1986 (# 1705); Fax (418) 724-1842;

E-mail: rejean_tremblay@uqar.ca

Contribution de l'auteur principal

Cet article a été soumis au journal *Aquaculture* le 15 avril 2013 et porte le numéro de soumission : AQUA-D-13-00533. Les expériences de propriétés mécaniques des brins de byssus individuels ainsi que la détermination de leur teneur en métaux ont été réalisées par Marc-Olivier S. Heine. Les analyses statistiques ont été réalisées par Marc-Olivier S. Heine sous la supervision du stagiaire postdoctoral Bertrand Genard. Les expériences sur les forces d'attachement et les paramètres biologiques ont été réalisées par Andrée-Anne Lachance. Une participation active de Marc-Olivier S. Heine à l'écriture de toutes les sections de l'article a été soutenue par une contribution appréciée et essentielle des co-auteurs, en particulier les Professeurs Isabelle Marcotte et Réjean Tremblay, au niveau de l'argumentation scientifique ainsi que de la qualité linguistique.

3.1 Résumé

La culture de la moule en suspension dans des systèmes ouverts, comme en mer, est bien développée. Par contre, dans certains environnements, les boudins de moules sont soumis à des conditions océanographiques générant une énergie importante qui peut augmenter le décrochage. Dans cette étude, nous comparons l'efficacité de la culture des moules en mer (système ouvert) et en lagune (système semi-fermé). La force d'attachement, l'indice de condition, les propriétés mécaniques des brins de byssus individuels et la concentration en métaux des fibres des moules élevées en mer et en lagune sont analysés, ainsi que la caractérisation environnementale des deux sites. La ponte se produit un mois plus tôt en mer comparativement en lagune et ceci serait relié à la différence de température et de disponibilité en nourriture entre les deux sites. La force d'attachement des moules en mer est plus faible, mais les brins de byssus sont plus gros et ont une force plus élevée, comparativement à celles de la lagune. Ainsi, la faible force d'attachement

semble être reliée à une plus faible production de byssus. L'ensemble des résultats suggère que l'élevage en mer est une bonne alternative à la culture des moules en lagune.

Mots clés: Indice de condition des moules, force d'attachement, propriétés mécaniques, brins de byssus, concentration en métaux des filaments.

3.2 Abstract

Offshore and open-sea suspension-culture of mussels is largely in development but, in this particular environment, sleeved mussels are submitted to high-energy oceanographic conditions which could increase fall-offs. In this study, we compared the performance of open-sea mussel culture to culture in a lagoon environment. Byssus attachment strength, condition index, mechanical properties of individual byssal threads, metal content of the filaments for mussels from both open-sea and semi-closed lagoon sites were monitored as well as the environmental characteristics of these sites. The spawning event occurred approximately one month earlier for mussels in the open-sea than in the lagoon, probably due to a difference in temperature and food availability. The attachment strength of the mussels was weaker in the open-sea, even if individual threads were bigger and stronger than in the lagoon. This lower attachment strength seems related to a lower production of threads. Altogether, our results show that the open-sea site would be a suitable environment for the development of mussels' culture.

Key words: Mussel condition index, attachment strength, mechanical properties, byssal threads, metal content of filaments.

3.3 Introduction

Throughout the world, the development of mussels culture has been established almost exclusively in protected near-shore waters [40-41] or in estuarine habitats [42-44] and it is mainly achieved through off-bottom culture techniques like rafts, pole racks and longline systems [45]. However, near-shore bivalve culture is faced with social, environmental, economic, and resource constraints [46-47]. As suspension-cultured mussels have shown rapid growth in some offshore environments, this alternative is at the brink of becoming a new commercially viable aquaculture production area [48-50]. Offshore aquaculture has been defined as being “exposed to substantial oceanic conditions” such as large waves and storms, and this label has been attributed to open-sea bivalve cultures located at some distance from shore like in large bays and coastal inlets [51]. In both cases, sleeved mussels suspended on offshore or open-sea longlines are submitted to high-energy oceanographic conditions [46].

Several environmental and biological factors are determinant for a productive mussel culture site. In particular, water temperature and food availability (quality and quantity) can both have an important influence on the mussel physiology and could lead, for example, to a better growth and, thus, to a higher condition index [52-56].

Since mussels are attached on sleeves by their byssus, the productivity of cultured mussels can also be related to the strength and the number of byssal threads produced [57]. A weak attachment strength of the byssus could lead to fall-offs from the sleeves during strong winds and/or harvesting and, consequently, result in a decrease of the commercial yield [17,58-60]. Important fall-offs have been reported by mussel growers in Magdalen Islands’ lagoons during summer [17,59] - a period of lower attachment strength related to spawning and higher temperature [19,61]. Although the impact of these factors has already been studied in the lagoon, their effect has not been addressed in the open sea.

The high-performance byssal threads can be separated in two main parts. The proximal part, close to the mussel body, is very extensible and has an irregular surface while the distal part, glued to the substrate via the plaque, is very stiff and smooth. Each byssal thread is composed of three collagen-rich proteins called PreCols [2]. PreCol-P is mostly found in the proximal part whereas PreCol-D dominates in the distal part. Finally, PreCol-NG (non-graded) is uniformly present along the thread. All PreCols are made of a central collagen block flanked by a particular protein domain, i.e., similar (according to sequence homologies) to elastin in PreCol-P, to fibroin in PreCol-D and to plant cell wall in PreCol-NG [3]. Each flanking domain is ended by a section rich in histidine and DOPA (3,4-dihydroxyphenylalanine) [3]. The link between the PreCols is made by disulfide crosslinks, DOPA complexes with transition metal ions, as well as di-DOPA covalent crosslinks [1]. A previous study has shown that the byssus' strength varies with its metal content [3].

In this study, we have tested the hypothesis that mussels in the high-energy open sea waters have higher attachment strength related to changes in mechanical properties of individual byssal threads. More specifically, we have monitored some biological parameters and the byssal attachment strength for mussels grown in the open sea location of Baie de Plaisance and the semi-enclosed House Harbour lagoon of Magdalen Islands as well as the environmental characteristics of both sites. The second objective was to examine the mechanical properties of individual byssal threads produced by cultured mussels from the lagoon and open sea as a function of seasons. The metal content of the threads was also determined since it may have an impact on their mechanical properties.

3.4 Materials and methods

3.4.1 Sites

The experiments took place in Magdalen Islands, southern Gulf of St-Lawrence, Canada, (47°25'N, 61°50'W), more specifically in the House Harbour lagoon and the Baie de Plaisance (Figure 3.1). In this area, *M. edulis* accounts for nearly 100% of the mussel populations [40,62]. The physical characteristics of these two sites are different. House Harbour lagoon is connected to the open sea by a narrow channel. The maximum depth of the experimental site in the lagoon is approximately 6 m. The maximum tidal amplitude is only about 0.5 m and the tidal current velocities are relatively low ($<0.05 \text{ m s}^{-1}$), while the wind is very important for the mixing of the water column [63-64]. The site in Baie de Plaisance is deeper (19 m) and is directly exposed to winds and wave effects, so that the mean current velocity near bottom is approximately 7 cm s^{-1} between July and October [50].

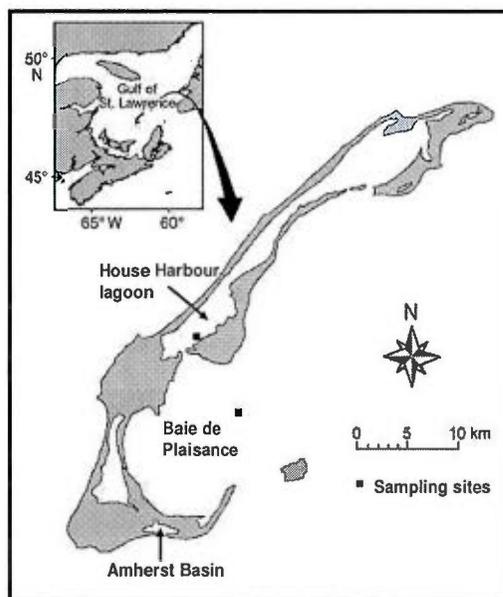


Figure 3.1 Map of the studied area: Magdalen Islands in the Gulf of St. Lawrence showing the sampling sites in House Harbour lagoon and Baie de Plaisance. Amherst Basin is the site of origin of the mussels.

3.4.2 Mussel sampling

Mussel seeds came from the commercial spat collection site in Amherst Basin (Figure 3.1). Mussel's spat was sleeved in mesh tubes and suspended on longlines at both experimental sites (lagoon and open sea) for two different years. In May 2005, sleeves with two-year-old mussels grown in each environment for about 18 months were cut into sections of approximately 0.6 m. These experimental sections (hereafter referred to as "sleeves") were left at their growing sites on a submerged longline kept at about 2 m from the surface in the lagoon and 8 m in the open sea site. Sampling of sleeves was conducted weekly in the lagoon and bimonthly in the open sea, from the end of May to mid-October 2005. At each sampling, three sleeves were randomly harvested from the longline in a given experimental site, carefully brought back to the laboratory, and held vertically in a flow-through tank supplied with seawater pumped from the lagoon until the attachment strength was measured (within 24 h).

For the study of individual byssal thread characteristics, two-year-old mussels were randomly sampled from sleeves at each site (lagoon and open sea), their byssus cut carefully and transferred into four cages (15 mussels per cage) suspended on longline at their respective sites. Such cages were prepared in autumn (October 2010) and summer (July 2011). Mussels from cages were retrieved one month later for both seasons.

3.4.3 Environmental data

The temperature was measured at the sleeves level (2 and 8 m from the surface in the lagoon and in open sea, respectively) using a Hobo thermograph (Onset, Pocasset, MA, USA). Three 2 L water samples were taken with a Niskin bottle at the sleeves level at both sites. Seawater was kept in cool conditions in the dark until filtration within the same day through washed and pre-weighed GF/C filters according to Aminot and Chaussepied (1983) to get the total particulate matter

(TPM) and the particulate inorganic matter (PIM) [65]. The seston component used in the present study was the particulate organic matter (POM) calculated by subtracting PIM from TPM.

3.4.4 Attachment strength and biological measurements

The mussel attachment strength was measured on 30 mussels from sleeves for each sampling date (10 mussels per sleeve) using the method detailed in Lachance et al., (2008) [19]. Morphometric measurements were done on each experimental mussel with a caliper. Mussels were then dissected into different parts (gonads, remaining tissues and shell) and weighed. Each section was dried for 72 h at 70°C and re-weighed. The condition index was calculated as the dry weight of the whole tissues divided by the shell dry weight. The gonad index was calculated as the dry gonads weight divided by the whole body weight (the sum of the dry weights of the gonads and remaining tissues).

3.4.5 Mechanical properties of individual byssal threads

From each experimental cage sampled, whole byssal threads with both proximal and distal parts were carefully removed from six mussels, air dried and kept in a refrigerator until further analysis. The threads were glued between two plastic pieces and placed between the two grips of a dynamic mechanical thermal analyser (DMTA V, Rheometric Scientific, Piscataway, NJ, USA). Force analyses were performed at room temperature in artificial sea water [21]. The force (F) is the load supported by a material under deformation and is directly determined by DMTA. The stress σ corresponds to the resistance of the thread against the applied load and is obtained by dividing the force by the cross section area (A) of the thread:

$$\sigma = F/A \quad (3.1)$$

where $A = \pi(d/2)^2$. The diameter d of the byssus was measured at six different points and the mean value was used.

The strain (ϵ) characterizes the deformation of the thread under stress, and, thus, its extensibility. It is calculated as follows:

$$\epsilon = (L-L_0)/L_0 \quad (3.2)$$

where L_0 is the initial length of the thread and L is its length under stress. The ultimate force (F), stress (σ) and strain (ϵ) values were determined at the rupture point of the individual byssus threads.

The modulus indicates how the experimental material resists to deformation (stiffness) under strain. It was obtained by plotting the stress-strain curve of the thread and calculating the slope of the 5–10% strain range. A crosshead speed of 5 mm min^{-1} was applied until rupture of the byssus.

3.4.6 Byssus metal content

Threads from six mussels were collected from each cage and separated into proximal and distal sections. These byssal sections were pooled by cage and hydrolyzed in a mixture of concentrated HNO_3 and H_2O_2 ($\geq 30\%$) at 90°C until complete digestion (i.e. for 2h). The volume was adjusted to 5 ml with a 1% HNO_3 solution. The multivalent metal concentration was determined using an Agilent 7500c (New Castle, DE, USA) inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS) in normal mode and with a micro-nebulizer.

3.4.7 Statistical analysis

All statistical analyses were performed using Systat 11 (Systat Software), except for the canonical redundancy analysis (RDA) which was performed as a form of MANOVA on R-language package *rdaTest* [34]. Data were log-transformed when needed to satisfy test conditions. Two-way factorial ANOVAs with date and site as

main factors were conducted to evaluate the variation during the sampling period of abiotic parameters (temperature and organic seston) and to compare these parameters between the open-sea and lagoon sites. Partially hierarchical ANOVAs were conducted with date, site, their interaction and sleeve (nested in date and site) as factors, to determine the variation of biotic parameters during the sampling period (mussels attachment strength, gonad index, condition index, shell length and shell weight/shell volume) and to compare these parameters between the two sites. For these analyses, only data obtained from the same sampling date at both sites were used (bimonthly sampling, $n = 9$). T-tests with sequential Bonferroni correction were more appropriate than a complete multiple *post hoc* comparison table to evaluate the differences between successive dates. Data about mussels from the lagoon partly come from Lachance et al., (2008) [19].

RDA was performed to estimate the sites (lagoon and open sea) and time (October and July) effect on metal concentrations and mechanical properties of byssal threads with the use of pooled data by cage as replicate. This method allows an estimation of the fraction of variation in response variables (metal concentrations and mechanical properties of byssal threads) attributable to the explanatory variables (site and time). This method can be described as a series of multiple regressions followed by a principal component analysis where each response variable, Y , is regressed on the matrix corresponding to the explanatory variables, X . More precisely, matrices for site and time effects were coded using orthogonal dummy variables, and an ordination biplot (Z-plot type) was generated from the RDA results using the `plotRDA` function [66]. The biplot displays both differences between cages and correlations between the response and explanatory variables. The main features of a correlation biplot are the following: (1) Projecting an object at right angle on a response (X) or explanatory (Y) variable approximates the value of the object along that variable; (2) the angles between variables (from sets X and Y) in the biplot reflect their correlations. In order to evaluate changes in metal concentration between the proximal and distal parts of byssal threads simultaneously to site and time effects,

a forward selection of these explanatory variables was performed using the 'packfor' R-language package (Packfor: forward selection with permutation. R package v. 0.0-7; <http://biomserv.univ-lyon1.fr/dray/Software.html#packfor>), retaining the explanatory variables with $p < 0.05$ after Monte Carlo permutation tests (nperm 9999) for subsequent RDA.

3.5 Results

3.5.1 Environmental characteristics

Water temperature was significantly higher in House Harbor lagoon until the end September although there are missing data from Baie de Plaisance at the beginning of the sampling period (Figure 3.2-A). The temperature pattern was similar for both sites with a significant increase in early summer (just observed for the lagoon due to missing data at the open sea site). The mean temperature during the warmest period in summer (from 25 July to 22 August) was 17.1°C and 21.9°C in open-sea and in the lagoon, respectively. It was followed by a decrease in the fall. The POM concentration showed significant date and site interaction (Table 3.1). The POM concentration in open sea was higher in early summer, with a significant increase at this time, while concentration in the lagoon increased significantly in late summer (Figure 3.2-B).

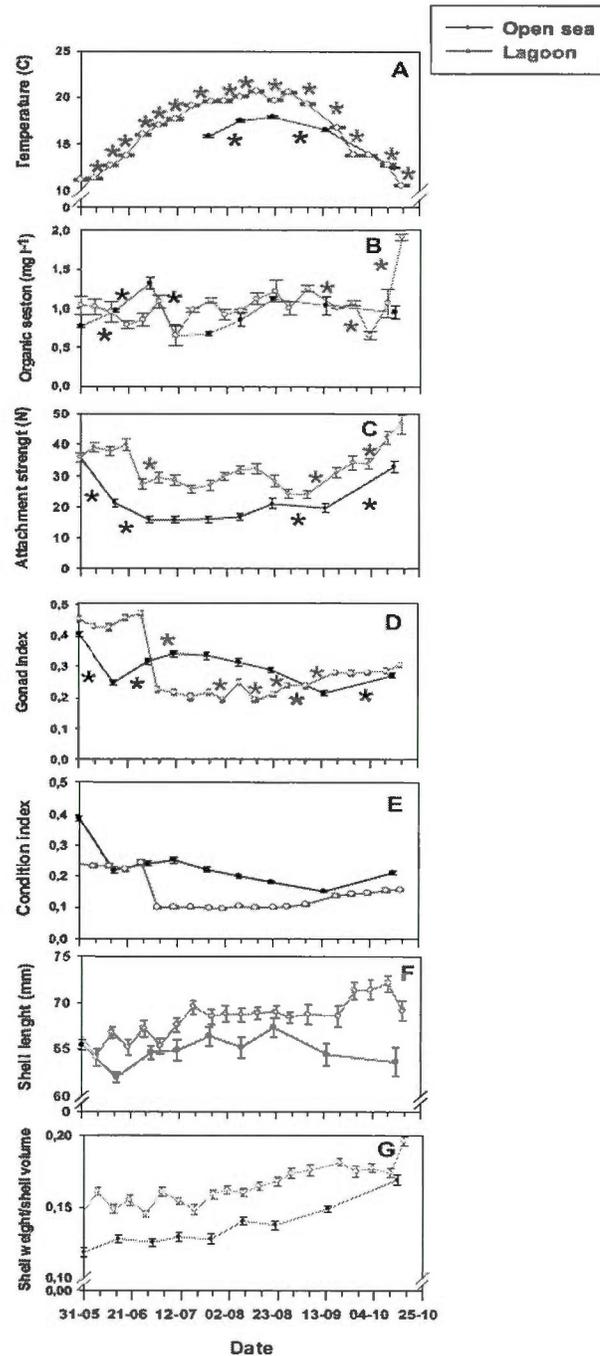


Figure 3.2 Variation of different parameters in the two aquaculture sites: open-sea (black lines) and lagoon (grey lines). Sampling dates were separated by 7 days for the lagoon site and 14 days for the open-sea site. Asterisks represent significant differences between two successive dates as revealed by a T-test.

Table 3.1 ANOVAs (Two-way and partially hierarchical) conducted with each parameter as dependent variable and date, site, their interaction and sleeve (nested in date and site, for biotic parameters) as factors. For these analyses, only values taken from the same sampling dates from both sites were used (n= 532)

Source	df	MS	F	p
Log-temperature				
Date	4	1.63	3102	<0.001
Site	1	0.26	491	<0.001
Date X Site	4	0.13	253	<0.001
Error	230	0.001		
Organic seston				
Date	8	0.18	6.4	<0.001
Site	1	0.03	1.03	0.32
Date X Site	8	0.09	3.35	0.01
Error	35	0.03		
Log-attachment strength				
Date	8	3.15	15.5	<0.001
Site	1	26.9	132	<0.001
Date X Site	8	0.68	3.03	0.06
Sleeve (DateSite)	36	0.20	1.92	0.01
Error	478	0.11		
Gonad index				
Date	8	0.24	65	<0.001
Site	1	0.01	2.63	0.11
Date X Site	8	0.19	51.7	<0.001
Sleeve (DateSite)	36	0.004	1.65	0.011
Error	478	0.002		
Condition index				
Date	8	0.191	79.4	<0.001
Site	1	0.665	277	<0.001
Date X Site	8	0.056	23.3	<0.001
Sleeve (DateSite)	36	0.002	2.36	<0.001
Error	478	0.001		
Shell length				
Date	8	71.6	1.94	0.084
Site	1	1580	42.7	<0.001
Date X Site	8	60.1	1.62	0.15
Sleeve (DateSite)	36	37.1	1.61	0.016
Error	478	22.9		
Shell weight/shell volume				
Date	8	0.01	17.7	<0.001
Site	1	0.08	131	<0.001
Date X Site	8	0.001	1.65	0.15
Sleeve (DateSite)	36	0.001	2.09	<0.001
Error	478	0.001		

3.5.2 Mussels' performance

Parameters related to spawning (gonad and condition index) showed significant date and site interactions while all others characteristics, i.e., mussels' attachment strength, shell length, and shell weight/volume ratio, were significantly different among both sites. Of all measured parameters, only shell length showed no significant time effect (Table 3.1). Mussels' attachment strength was significantly higher at the lagoon site over all the sampling period (Table 3.1; Figure 3.2-C). There are temporal variations in attachment strength at both sites. Indeed, the attachment strength showed a drastic decrease at the beginning of the sampling period in open sea site (May 31), and this was three weeks earlier than in the lagoon (June 20) (Figure 3.2-C). The attachment strength was weaker during the summer at both sites and increased at the end of the sampling period. The decrease in attachment strength in early summer was similar for both sites with a significant drop of 40% in open sea (from 35.9 ± 1.4 to 21.2 ± 1.3 N, $p < 0.001$) and 32% in the lagoon (from 39.9 ± 2.0 to 27.3 ± 1.7 N, $p < 0.001$).

The gonad index showed an important decrease on May 31 in the Baie de Plaisance, about one month earlier than in the House Harbour lagoon (Figure 3.2-D), and then stayed at low values during the summer. However, the gonad index showed a small increase in the open sea site during the summer, so that it reached higher values than in the lagoon site during this period (Figure 3.2-D). The condition index pattern was quite similar to the gonad index (Figure 3.2-E). The increase in mussels shell length followed the same pattern at both sites over time but values were higher in House Harbour lagoon (Table 3.1; Figure 3.2-F). The shell weight of mussels from both sites was standardized according to shell density due to the significant difference in shell length and, thus, their volume. The shell weight was significantly higher for the mussels grown in the lagoon although it increased slowly but significantly at both sites during the sampling period (Table 3.1; Figure 3.2-G).

3.5.3 Mechanical properties and metal content of individual byssal threads

Before RDA, packfor selection metal showed that the concentrations of the different metals did not change significantly between the proximal and distal parts of the threads (Table 3.2), and that only the collection site and season explained significantly a fraction of overall variance. Thus, to establish relationships with mechanical properties in relation to sites and seasons, metal concentration values obtained from proximal and distal parts of the threads were averaged and submitted to a RDA. The RDA results showed that the mechanical properties and metals content of the byssal threads varied significantly between mussels grown in the two sites and collected at two different seasons ($p=0.001$; Figure 3.3). We observed that the force of individual byssal threads was higher for mussels in Baie de Plaisance than in House Harbor lagoon and weaker in the summer than in the autumn (Figure 3.4-A). The RDA also revealed that byssal threads' diameter significantly varies, but only in relation to the culture site with higher values for mussels grown in the open sea (Figure 3.4-B). The stress measurement - estimating the byssal thread resistance - was independent of the site but affected by the season with more resistant threads in November, as evidenced in Figure 3.4-C. Finally the extensibility of the filaments, estimated by the strain measurement, as well as the stiffness, determined from the modulus, were not influenced by the location and seasonal factors. Concerning metals concentration, results revealed that the concentration of each metal was greater in the summer than in the autumn, except for Mo and Ca for which concentrations were higher in the autumn (Figure 3.3). However, the total metal ion content did not change with the site and season (see the mean sum in Figure 3.3). The presence of uranium and lead ions could also be detected in the byssus filaments as shown in Table 3.2.

Table 3.2 Multivalent metal ions concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry byssus) for proximal (A) and distal parts (B) of byssus sampled on mussels grown in two sites and seasons

A					
Metal	Oxidation	Season		Site	
		November	August	Open sea	Lagoon
Mg	2+	7500 \pm 500	11000 \pm 3000	9000 \pm 3000	9000 \pm 2000
Ca	2+	6900 \pm 800	2300 \pm 600	4100 \pm 800	5000 \pm 1000
Sr	2+	61 \pm 4	140 \pm 30	120 \pm 30	90 \pm 20
Mo	6+	210 \pm 70	0.12 \pm 0.09	180 \pm 70	20 \pm 10
B	3+	37 \pm 1	380 \pm 80	300 \pm 100	160 \pm 60
Al	3+	160 \pm 10	900 \pm 100	700 \pm 200	380 \pm 90
V	5+	28 \pm 2	100 \pm 20	60 \pm 20	60 \pm 10
Mn	7+	25 \pm 3	300 \pm 90	300 \pm 100	50 \pm 20
Fe	3+	380 \pm 50	1800 \pm 200	1300 \pm 400	800 \pm 100
Ni	2+	14 \pm 1	80 \pm 10	40 \pm 10	50 \pm 10
Cu	2+	19 \pm 1	100 \pm 10	60 \pm 20	56 \pm 20
Zn	2+	33 \pm 4	420 \pm 70	300 \pm 100	180 \pm 80
Pb	4+	6 \pm 2	25 \pm 8	30 \pm 8	5 \pm 1
U	6+	3.2 \pm 0.5	29 \pm 6	10 \pm 4	20 \pm 9
Mean sum		15000 \pm 1000	18000 \pm 4000	17000 \pm 3000	17000 \pm 2000

B					
Metal	Oxidation	Season		Site	
		November	August	Open sea	Lagoon
Mg	2+	6500 \pm 700	14000 \pm 4000	10000 \pm 3000	10000 \pm 3000
Ca	2+	5600 \pm 800	2500 \pm 400	3500 \pm 600	5000 \pm 1000
Sr	2+	51 \pm 6	170 \pm 30	120 \pm 30	100 \pm 30
Mo	6+	400 \pm 100	1.1 \pm 0.4	400 \pm 100	40 \pm 10
B	3+	79 \pm 6	800 \pm 100	400 \pm 100	400 \pm 200
Al	3+	180 \pm 10	1000 \pm 100	700 \pm 200	500 \pm 100
V	5+	43 \pm 3	190 \pm 30	100 \pm 20	140 \pm 40
Mn	7+	35 \pm 6	500 \pm 100	400 \pm 100	130 \pm 50
Fe	3+	410 \pm 50	1900 \pm 200	1400 \pm 400	900 \pm 200
Ni	2+	8.4 \pm 0.6	84 \pm 8	40 \pm 10	50 \pm 20
Cu	2+	20 \pm 3	116 \pm 8	70 \pm 20	70 \pm 20
Zn	2+	26 \pm 3	390 \pm 40	250 \pm 90	170 \pm 60
Pb	4+	12 \pm 4	30 \pm 7	33 \pm 7	10 \pm 2
U	6+	3.7 \pm 0.4	50 \pm 10	14 \pm 4	40 \pm 10
Mean sum		13000 \pm 1000	22000 \pm 4000	17000 \pm 4000	18000 \pm 3000

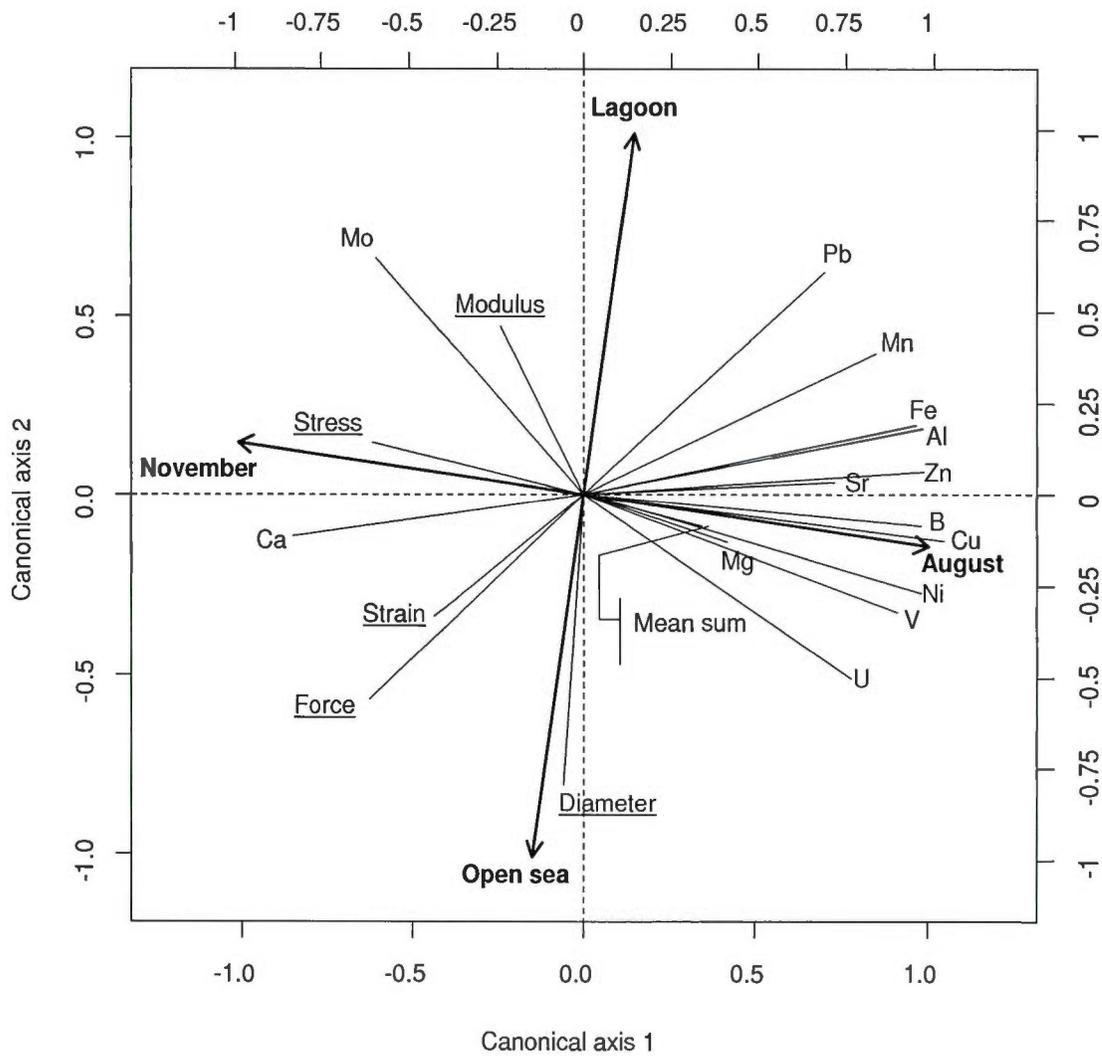


Figure 3.3 Ordination biplot resulting of redundancy analysis (RDA) representing the significant ($p = 0.001$) effect of season and site (arrows) on mechanical properties (underlined names) and multivalent metal (normal names) concentration of byssus. Lines represent response variables.

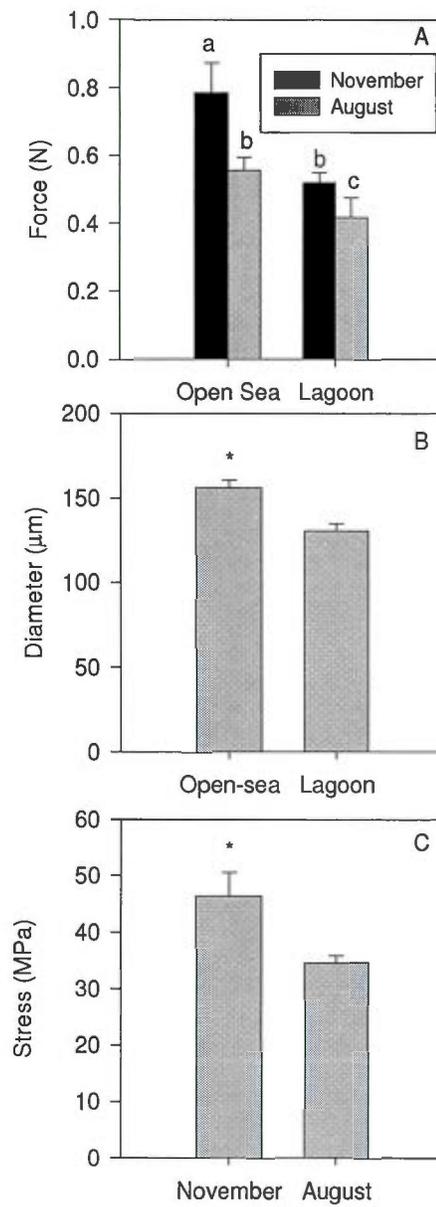


Figure 3.4 Variation of individual byssal force at break (A), diameter (B), and stress at break (C) with respect to the two experimental sites and seasons. Different letters or * indicate significant differences at $p < 0.05$.

3.6 Discussion

3.6.1 Mussels' performance

The measurement of various biological parameters allowed us to compare the mussels' performance in the open sea and in the lagoon sites as a function of the season. The seasonal pattern of the gonad index showed site-related differences: a significant and rapid decline occurred in both sites but it took place almost one month earlier at the open sea site (May 31 vs. June 27 in the lagoon). This decrease corresponds to a massive spawning and it usually occurs at this period for cultured mussels in the Magdalen Islands [59]. This different spawning period between the two sites may be related to a difference in temperature and food availability since these two factors influence the timing of the spawning in bivalves [52,67-68]. In the open-sea site, a significant increase in organic seston happened simultaneously to the spawning event. In the lagoon, however, the organic seston concentration was relatively stable during the spawning period which was possibly related to a temperature increase above 15°C on June 27.

Another difference among the two sites is a notable increase in the gonad index value at the Baie de Plaisance site just after the spawning event, while it remained at a low level for mussels cultured in the lagoon. It thus appears that mussels at the open sea site invested more energy in the gonads' build-up or accumulated more energetic reserves just after the spawning, which could be possibly related to different trophic conditions not estimated by total organic seston. Indeed previous studies showed that bivalves usually accumulate energetic reserves - mostly in their gonads - when food is abundant [69-70]. As condition index had similar pattern than gonad index, it could also be possible that mussels at the lagoon site, in contrast to those cultivated in Baie de Plaisance, invested more energy to produce heavier and longer shells rather than investing energy into the gonads. Indeed mussels had significantly longer and heavier shells in the lagoon than in open sea. Both the

condition and the gonad index showed an overall similar pattern due to the important contribution of the gonads to the condition index value, i.e. about 50% of the total tissue mass [59,71]. Thus, the higher values found for mussels in Baie de Plaisance could be related to the higher gonads' weight during the summer, and mostly to their lighter shell. Bourque et al. (2007) observed the same pattern over a 3-year study: a lighter (= thinner) shell for a given shell length in the mussels from the Baie de Plaisance compared to the lagoon [50]. This difference in thickness could be explained by a defense mechanism against predators which would be at closer range in the lagoon compared to the open sea culture site. Such response against predators has been previously demonstrated in bivalves [72-75].

3.6.2 Site effect on byssus properties

The mussels' attachment strength was significantly higher in the lagoon than in the open sea over all the sampling period whatever the mussels' physiological condition. According to our observations, it would be mainly caused by the higher byssogenesis in mussels grown in House Harbor lagoon, rather than by an increase in individual filament strength because the force-at-break was higher for mussels grown in Baie de Plaisance. This higher strength for byssal threads secreted by the mussels in the open sea can be explained by their larger thread diameter.

The higher thread production by mussels in the lagoon and the difference in individual thread strength can be related to several factors. First, the water temperature was 3°C higher in the lagoon than in the open sea site. Previous studies have shown that high temperature can increase byssal thread production and, thus, the attachment strength [76-78]. It was also suggested that higher water temperatures, like those occurring during the summer, could accelerate the decay of the threads and, consequently, decrease the attachment strength [10,19]. Therefore, the faster filament degradation for mussels grown in the lagoon site during the summer could possibly be compensated by an increased thread production by the mollusks.

Another factor which could explain the difference in the attachment strength is the higher proximity of predators, such as common crabs or sea stars, in the semi-enclosed shallow lagoon compared to the deeper open sea site. It has been shown that mussels can attach themselves more firmly to the substrate by increasing their byssal thread production in response to the presence of predators [72-73,79-80]. Finally, seawater turbulence does not appear to be an important factor explaining the different attachment strength, as suggested by Lachance et al. (2008) [19]. Indeed, in our study, differences of attachment strength observed between mussels cultivated in House Harbor lagoon and the Baie de Plaisance could not be related to turbulence because the values measured in the typically more turbulent autumnal period were $< 1 \text{ J m}^{-3}$ in the lagoon compared about 5 J m^{-3} in the open-sea at 8 m below the surface [19]. Thus, our results suggest that mussels grown in the open sea could be more vulnerable to fall-offs due to a lower attachment strength compared to the mussels from the lagoon, particularly when they are submitted to dislodging force, such as stronger winds and waves, or when harvested by cultivators.

3.6.3 Season effect on byssus properties

The seasonal pattern for the attachment strength was similar in the lagoon and open sea sites, with lower values during the summer and higher values in spring and autumn. Again, these seasonal differences could be partially explained by byssogenesis as Lachance et al. (2011) showed that mussels suspended in a lagoon produced about 80 threads per week in autumn compared to < 60 in the summer [19]. The force of the individual threads is certainly another explaining factor since their strength was greater in autumn. This greater force cannot be explained by the threads diameter as no seasonal effects have been observed. We thus hypothesize that a change in the byssus strength can be ascribed to changes in the molecular structure of the fibers. The higher temperature in the lagoon during summer season could have an

effect on the degradation of the byssal threads' properties in the summer when compared to the cooler spring and fall.

Stress measurements, which estimate the resistance of the entire thread (core + sheath), significantly changed with seasons and could be ascribed to a modification in the molecular structure possibly related to the multivalent metal ion composition. The higher accumulation of Mo and Ca in the byssal threads produced in autumn could lead to an increase of their resistance. However, Mo concentration was less than 2% of the total metal content in byssal threads compared to about 30% for Ca in autumn. Therefore, the higher thread resistance and attachment strength of mussels would be mainly related to the Ca concentration. These results are in agreement with Holten-Andersen et al. (2009) who investigated the variation in mechanical properties of byssal threads as a function of their multivalent ions' concentration by chelating them with an EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid) buffer [12]. They showed that Ca represents 90% of all metal ions in *M. galloprovincialis* byssal threads, and that the total chelation of Ca and Fe in the thread cuticle induced a 50% decrease in hardness. Also using metal chelation with EDTA, Vaccaro et al. (2001) showed that the elimination of Zn, Cu and Fe from whole *M. galloprovincialis* byssus filaments had a negative impact on their mechanical properties, while they succeeded to re-increase their modulus by placing the treated filaments in sea water [81]. This could be attributed to an integration of metal ions from the sea water into the byssal thread structure or to molecular structure reorganization. Indeed, cohesion between the PreCols is not solely ensured by DOPA- or histidine-metal links. The PreCol assembly also involves disulfide bridges between cysteine residues in PreCol-D and -NG and by diDOPA cross-links [1]. The packing of the PreCols can also influence the mechanical properties of the threads [1]. Therefore all these structural mechanisms in the thread could compensate for the seasonal changes in metal content.

While metal ion selectivity for mussel thread formation is possible at certain times of the year, specific metal ions, such as Ca, could be replaced by others when they are less available in the environment. Indeed, we observed that although the individual metal ion concentration varies seasonally, the total metal content in the byssal threads does not change significantly. However, different metal ions do not have the same effect on the DOPA crosslinking. Using a solution of mefp-1 abundant in the thread cuticle, Hedlund et al. (2009) have shown that, in contrast to Cu^{2+} , Mn^{2+} cannot form DOPA-metal ion-DOPA links nor induce DOPA oxidation into quinones to form di-DOPA crosslinks [82]. Therefore, the subtle balance between the byssal structure and metal ion content could explain the changes in the mechanical properties observed between seasons.

Finally, a possible relationship between the spawning and the rapid decline in mussels attachment strength in the lagoon has been previously suggested by Lachance et al., (2008) as these two events occurred almost simultaneously [19]. The same pattern was observed in this study with the mussels in the open sea. There was an abrupt 40% decline in attachment strength occurring at the same time as a 30% decrease in the gonad index (spawning). This latter observation is in accordance with the hypothesis that spawning influences the attachment strength of mussels, because such stressful event for the mussels could weaken the fibers. Such a rapid decline in mussels' attachment strength could be related to the break-off of their own byssal threads or an acceleration of threads' decay when mussels spawn. This could also be related to a slowdown in new threads production needed to compensate the decay of the old threads [76,83].

3.7 Conclusion

Differences in environmental conditions were found among both experimental sites, with a higher temperature in the lagoon and a difference in the timing of the organic seston peak. Mussels grown in these sites also showed different

characteristics mainly related to these environmental differences. The attachment strength was weaker in the open sea although the individual threads were bigger and stronger. This lower attachment strength seems related to a lower threads production. The spawning event occurred approximately one month earlier for mussels in Baie de Plaisance, probably due to a difference in temperature and food availability. The condition index followed the same pattern as the gonad index and was higher in the open sea. This was mainly related to the lighter shells of the mussels grown at this site. Therefore, shells' weight was higher in the lagoon, possibly due to the closer proximity of the predators. Altogether, our results show that the open sea site would be a suitable environment for the development of mussel culture. Werstink et al. (2006) estimated that approximately 24,000 ha would be potentially available for suspension culture in Baie de Plaisance [84]. However, future growers should be aware of the higher vulnerability of mussels to fall-off from sleeves as compared to the lagoon due to lower attachment strength.

3.8 Acknowledgements

The authors would like to thank the staff of the Centre Maricole des Îles-de-la-Madeleine (now MERINOV) as well as P. Bourret and S. Belvin for their field support and to Dr J.-M. Sévigny for insightful comments on this manuscript. We also thank M. Fournier (Moules de Culture des Îles Inc.) and C. Vigneau (La Moule du Large Inc.) for providing mussels sleeves. We are grateful to the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada, the Réseau Aquaculture Québec (RAQ), the Ministère des Pêches et Océans Canada (MPO), the Programme Coopératif de Recherche et Développement en Aquaculture (PCRDA) and the Société de Développement de l'Industrie Maricole (SODIM) for their financial support.

CHAPITRE IV

ACCUMULATION PRÉFÉRENTIELLE EN MÉTAUX SELON LE SITE ET LA SAISON DANS QUATRE TISSUS DE *MYTILUS EDULIS*

4.1 Objectifs

Nous avons discuté, au chapitre précédent, que les propriétés mécaniques des brins de byssus variaient selon la saison et le site. Nous avons vu que les variations saisonnières des propriétés mécaniques observées étaient en corrélation avec les variations de la composition en métaux des brins byssaux. Pour mieux comprendre la dynamique d'incorporation de ces différents métaux, ce chapitre traite des variations de composition en fonction des mêmes paramètres de saisons (août et novembre) et de sites (lagune et en mer) dans quatre tissus de la moule, soit les branchies, le manteau, la glande digestive ainsi que le byssus, qui a été subdivisé en ses parties proximale et distale.

Le byssus est un tissu particulier de la moule et peut être classé séparément pour plusieurs raisons. En effet, il est un tissu externe mort, insensible à la douleur et qui peut être régénéré rapidement [85]. De plus, il représente une finalité pour les métaux qui le compose, car ceux-ci ne peuvent revenir dans le métabolisme de la moule. Ainsi, elle peut donc l'utiliser pour s'épurer des métaux potentiellement toxiques. L'origine des métaux dans les brins de byssus sera également discutée pour déterminer s'ils proviennent du métabolisme de la moule, via la filtration ou la

digestion, ou directement de l'eau environnante lors du passage de l'état liquide, produit par les glandes byssales, à l'état solide.

4.2 Matériel & méthode

4.2.1 Échantillonnage

Des moules de deux ans produites en culture en suspension dans la lagune de Havre-aux-Maisons et en mer, au site de la Baie de Plaisance ont été récoltées et leur byssus coupé. Elles ont ensuite été transférées dans quatre cages (15 moules par cage) qui ont été suspendues sur les lignes de culture à chacun des sites respectifs. Des cages ont été préparées en octobre 2010 et juillet 2011 et récoltées un mois plus tard. Ces analyses proviennent de la même expérience que celle présentée au chapitre II.

4.2.2 Concentration en métaux dans les tissus

Les analyses ont été effectuées sur 6 des 15 moules récoltées aléatoirement. Le manteau, les branchies, la glande digestive et le byssus des six moules par cage ont été disséqués et combinés afin de faire une analyse par cage. Ainsi, dans cette expérience, la cage étant la plus petite unité où le traitement était appliqué, elle était considérée comme échantillon ($n=4$). Les chairs ont été séchées 72 h à 70 °C avant d'être digérées durant 2 heures dans une solution de HNO_3 et H_2O_2 de grade Trace Select à 90 °C. Les byssus ont été coupés pour séparer la partie proximale de la partie distale et ont été digérés selon la même méthode. Toute la verrerie ayant servi à l'analyse des métaux a été lavée à l'acide nitrique 10% puis rincée avec de l'eau nanopure pour éviter la contamination. La concentration en métaux des tissus a été déterminée par spectrométrie de masse par torche à plasma (ICP-MS) Agilent 7500c en mode normal avec micro-nébuliseur (New Castle, DE, USA). La calibration s'est faite à l'aide de deux courbes, A et B, contenant sept points. La courbe A contenait B,

Fe, Zn et Se aux concentrations de 200, 100, 50, 25; 12,5; 6,25 et 3,125 ng/ml; Al, V, As, Ba, Pb aux concentrations de 80; 40; 20; 10; 5; 2,5 et 1,25 ng/ml; Cr, Ni et Cu aux concentrations de 40; 20; 10; 5; 2,5; 1,25 et 0,625 ng/ml; Mn, Co, Ti et U aux concentrations de 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 et 0,3125 ng/ml. La courbe B contenait Ca et Mo aux concentrations de 5000; 2500; 1250; 625; 312,5; 156,25 et 78,125; Mg, Sr, Rb aux concentrations de 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 et 15,625 ng/ml.

4.2.3 Analyses statistiques

Les analyses de redondance canonique (RDA), de variance (ANOVA) et *a posteriori* de Tukey ont été effectuées sur R-language package rdaTest [34]. Les RDA ont été réalisées sur les valeurs de pourcentage relatif en métaux pour estimer l'effet des tissus (section proximale et distale du byssus, manteau, branchies et glande digestive), du site (lagune et mer) et de la saison (juillet et octobre). Les analyses ANOVA suivies de tests de comparaisons multiples *a posteriori* de Tukey ont été réalisées sur les métaux obtenus pour les trois tissus et les deux sections de byssus de moules pour chacune des saisons. Les résultats des deux sites ont été combinés à chaque date lors de cette analyse.

4.3 Résultats et discussion

L'analyse RDA a montré que la composition en métaux des différents tissus et sections de byssus était significativement influencée par la saison ($p < 0,001$) et le tissu ($p < 0,001$), mais pas par le site. Ainsi, seulement la représentation graphique sous forme RDA des variations des concentrations en métaux pour les branchies, le manteau, la glande digestive ainsi que les parties proximale et distale des brins de byssus pour chaque saison est présentée aux figures 4.1 et 4.2. Les concentrations étaient systématiquement plus élevées pour le mois d'août dans chacun des tissus, comparativement à novembre (Tableau 4.1). La concentration totale en métaux dans

la section proximale du byssus était 53 % supérieure en août. Cette augmentation représentait 46 % dans la section distale du byssus, 22 % dans les branchies, 15 % dans le manteau et 23 % dans la glande digestive. Pour favoriser la comparaison de la composition en métaux en fonction de la saison et du tissu malgré les concentrations systématiquement plus élevées en août, le pourcentage relatif a été utilisé. Les valeurs du tableau 4.1 sont donc présentées sous forme de pourcentage relatif, soit la concentration d'un métal ou métalloïde dans le tissu par rapport à la concentration totale en métaux ou métalloïde dans le tissu pour une saison. Toutefois, les sommes totales représentent la somme de tous les métaux pour un tissu et une saison particulière et sont présentées en ppm, soit en microgramme de métaux par gramme de tissus.

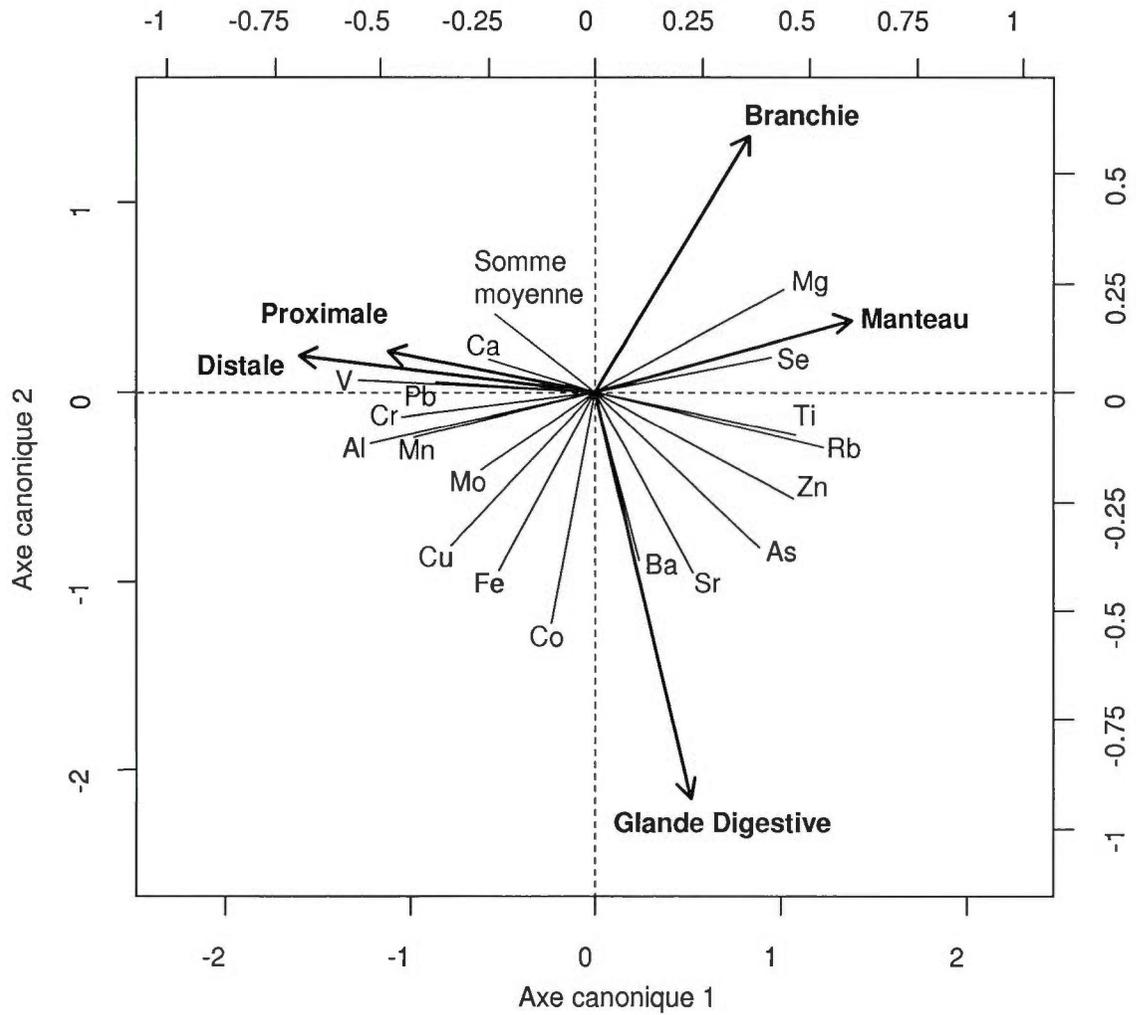


Figure 4.1 Ordination selon deux axes de l'analyse de redondance (RDA) représentant l'effet significatif des cinq tissus sur le pourcentage relatif en métaux pour le mois de novembre 2010

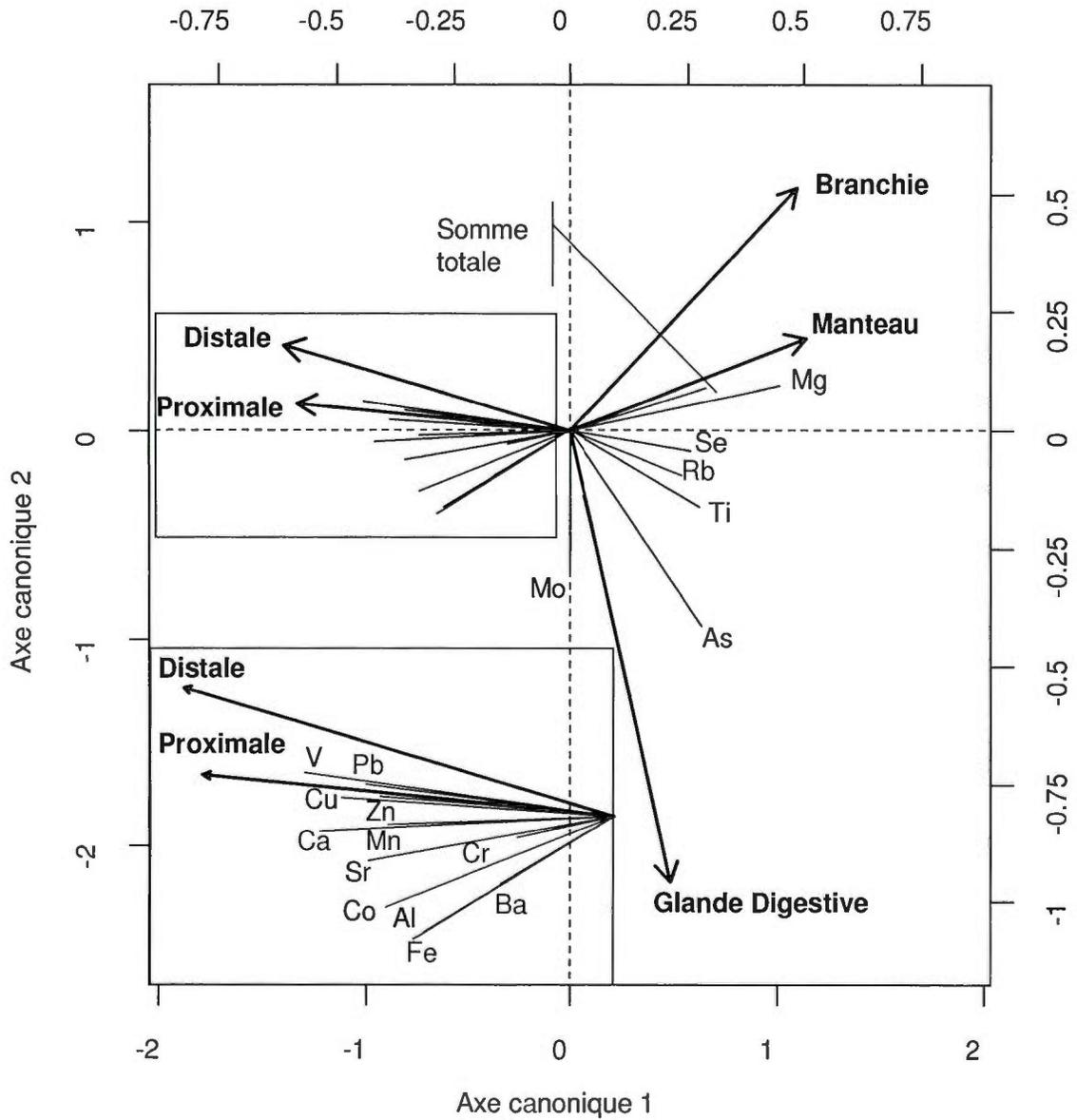


Figure 4.2 Ordination selon deux axes de l'analyse de redondance (RDA) représentant l'effet significatif des cinq tissus sur le pourcentage relatif en métaux pour le mois d'août 2011

Tableau 4.1 Composition en métaux des différents tissus de moules récoltées en novembre 2010 et août 2011, exprimé en % de métaux totaux \pm erreur standard. La somme totale représente l'addition de chaque concentration en ppm. Les lettres différentes indiquent des différences significatives à $p < 0,05$ suite au test *a posteriori* des MANOVA. Les métaux qui présentent le plus de variations ont été mis gras.

	Août					Novembre				
	Proximale	Distale	Branchies	Manteau	G. digestive	Proximale	Distale	Branchies	Manteau	G. digestive
B (%)	0,8 \pm 0,2 ^b	1,3 \pm 0,2 ^a	0,08 \pm 0,01 ^c	0,086 \pm 0,005 ^c	0,110 \pm 0,005 ^c	0,48 \pm 0,03	1,01 \pm 0,09	nd	nd	nd
Al (%)	3 \pm 1 ^a	2,0 \pm 0,5 ^{ab}	0,11 \pm 0,06 ^b	0,012 \pm 0,008 ^b	2,26 \pm 0,05 ^{ab}	2,1 \pm 0,2 ^a	2,4 \pm 0,3 ^a	0,022 \pm 0,009 ^c	0,007 \pm 0,005 ^c	1,0 \pm 0,2 ^b
Ti (%)	0,02 \pm 0,02 ^{bc}	0,02 \pm 0,01 ^c	0,05 \pm 0,02 ^{ac}	0,12 \pm 0,03 ^a	0,11 \pm 0,03 ^{ab}	0,10 \pm 0,02 ^c	0,09 \pm 0,02 ^c	0,23 \pm 0,02 ^c	0,69 \pm 0,07 ^a	0,39 \pm 0,03 ^b
V (%)	0,24 \pm 0,05 ^a	0,36 \pm 0,08 ^a	0,0012 \pm 0,0002 ^b	0,00082 \pm 0,00003 ^b	0,033 \pm 0,005 ^b	0,36 \pm 0,03 ^b	0,55 \pm 0,06 ^a	0,0082 \pm 0,0005 ^c	0,009 \pm 0,001 ^c	0,061 \pm 0,004 ^c
Cr (%)	0,03 \pm 0,02 ^a	0,013 \pm 0,003 ^a	0,006 \pm 0,005 ^a	0,009 \pm 0,006 ^a	0,013 \pm 0,007 ^a	0,034 \pm 0,002 ^{ab}	0,044 \pm 0,003 ^a	0,019 \pm 0,002 ^c	0,021 \pm 0,004 ^c	0,026 \pm 0,002 ^{bc}
Mn (%)	0,7 \pm 0,3 ^{ab}	0,9 \pm 0,3 ^a	0,022 \pm 0,002 ^b	0,026 \pm 0,002 ^b	0,26 \pm 0,05 ^{ab}	0,32 \pm 0,04 ^{ab}	0,42 \pm 0,06 ^a	0,13 \pm 0,01 ^c	0,17 \pm 0,02 ^c	0,24 \pm 0,02 ^{bc}
Fe (%)	5 \pm 2 ^a	4,0 \pm 0,9 ^{ab}	0,4 \pm 0,1 ^b	0,37 \pm 0,04 ^b	4 \pm 1 ^{ab}	5,0 \pm 0,7 ^{ab}	5,4 \pm 0,8 ^a	1,8 \pm 0,2 ^c	2,6 \pm 0,3 ^{bc}	7,2 \pm 0,8 ^a
Co (%)	0,025 \pm 0,008 ^a	0,019 \pm 0,006 ^{ab}	0,0008 \pm 0,0002 ^b	0,00051 \pm 0,00007 ^b	0,015 \pm 0,003 ^{ab}	0,019 \pm 0,001 ^b	0,012 \pm 0,001 ^b	0,0047 \pm 0,0006 ^c	0,0036 \pm 0,0008 ^c	0,037 \pm 0,003 ^a
Ni (%)	0,18 \pm 0,04	0,20 \pm 0,07	0,0003 \pm 0,0002	nd	0,047 \pm 0,002	0,18 \pm 0,02 ^a	0,11 \pm 0,01 ^b	0,0087 \pm 0,0007 ^c	0,003 \pm 0,002 ^c	0,13 \pm 0,02 ^b
Cu (%)	0,25 \pm 0,05 ^a	0,27 \pm 0,09 ^a	0,022 \pm 0,009 ^b	0,025 \pm 0,002 ^b	0,06 \pm 0,01 ^b	0,24 \pm 0,01 ^a	0,25 \pm 0,03 ^a	0,075 \pm 0,006 ^c	0,14 \pm 0,01 ^b	0,26 \pm 0,02 ^a
Zn (%)	1,0 \pm 0,3 ^a	0,9 \pm 0,2 ^{ab}	0,24 \pm 0,07 ^c	0,24 \pm 0,01 ^c	0,33 \pm 0,02 ^{bc}	0,43 \pm 0,06 ^a	0,33 \pm 0,04 ^a	0,76 \pm 0,07 ^a	1,3 \pm 0,1 ^b	1,3 \pm 0,1 ^b
As (%)	0,011 \pm 0,003 ^c	0,009 \pm 0,002 ^c	0,028 \pm 0,009 ^{bc}	0,044 \pm 0,003 ^b	0,01 \pm 0,01 ^a	0,027 \pm 0,003 ^c	0,028 \pm 0,003 ^c	0,15 \pm 0,02 ^c	0,32 \pm 0,04 ^b	0,48 \pm 0,07 ^a
Se (%)	0,0013 \pm 0,0006 ^b	0,002 \pm 0,0007 ^b	0,05 \pm 0,02 ^a	0,018 \pm 0,002 ^{ab}	0,034 \pm 0,008 ^{ab}	0,015 \pm 0,002 ^b	0,015 \pm 0,005 ^b	0,166 \pm 0,009 ^a	0,11 \pm 0,04 ^a	0,100 \pm 0,008 ^a
Ba (%)	0,025 \pm 0,009 ^a	0,031 \pm 0,009 ^a	0,015 \pm 0,009 ^a	0,006 \pm 0,002 ^a	0,03 \pm 0,01 ^a	0,013 \pm 0,004 ^b	0,03 \pm 0,01 ^b	0,020 \pm 0,004 ^b	0,023 \pm 0,003 ^b	0,14 \pm 0,04 ^a
Pb (%)	0,06 \pm 0,02 ^a	0,06 \pm 0,02 ^{ab}	0,003 \pm 0,006 ^c	0,0091 \pm 0,0002 ^c	0,008 \pm 0,002 ^{bc}	0,08 \pm 0,02 ^{ab}	0,14 \pm 0,05 ^a	0,008 \pm 0,001 ^b	0,005 \pm 0,001 ^b	0,018 \pm 0,001 ^b
U (%)	0,059 \pm 0,009	0,09 \pm 0,03	nd	nd	nd	0,041 \pm 0,006	0,050 \pm 0,009	nd	nd	nd
Mg (%)	73 \pm 3 ^c	73 \pm 3 ^c	92 \pm 1 ^{ab}	92,7 \pm 0,3 ^a	82 \pm 2 ^{bc}	47 \pm 1 ^b	47 \pm 1 ^b	58,9 \pm 0,7 ^a	58 \pm 2 ^a	50 \pm 1 ^b
Ca (%)	14 \pm 2 ^{ab}	16 \pm 1 ^a	6 \pm 1 ^c	5,7 \pm 0,3 ^c	9,1 \pm 0,7 ^{bc}	42 \pm 1 ^a	39 \pm 1 ^{ab}	36,8 \pm 0,6 ^{ab}	36 \pm 2 ^b	35 \pm 1 ^b
Rb (%)	0,010 \pm 0,009 ^{ab}	0,002 \pm 0,008 ^b	0,012 \pm 0,001 ^{ab}	0,023 \pm 0,004 ^a	0,018 \pm 0,002 ^{ab}	0,01 \pm 0,001 ^d	0,013 \pm 0,001 ^d	0,079 \pm 0,006 ^c	0,18 \pm 0,01 ^a	0,122 \pm 0,009 ^b
Sr (%)	1,0 \pm 0,2 ^a	1,1 \pm 0,1 ^a	0,56 \pm 0,01 ^b	0,58 \pm 0,02 ^b	0,80 \pm 0,03 ^{ab}	0,380 \pm 0,009 ^b	0,36 \pm 0,01 ^b	0,410 \pm 0,007 ^b	0,39 \pm 0,02 ^b	0,52 \pm 0,02 ^a
Mo (%)	0,0009 \pm 0,0007 ^b	0,006 \pm 0,002 ^{ab}	0,0008 \pm 0,0002 ^b	0,00062 \pm 0,00009 ^b	0,017 \pm 0,008 ^a	1,5 \pm 0,5 ^{ab}	3 \pm 1 ^a	0,4 \pm 0,2 ^b	0,27 \pm 0,09 ^b	2,3 \pm 0,6 ^{ab}
Somme totale (ppm)	118000 \pm 4000	143000 \pm 4000	357000 \pm 7000	186000 \pm 2000	215000 \pm 3000	62200 \pm 300	66400 \pm 800	77200 \pm 900	28600 \pm 200	49000 \pm 500

Les mois de juillet et août représentent la période de la ponte chez *M. edulis* de la région des Îles-de-la-Madeleine [19,86]. Bien que nous ayons démontré au chapitre II que la ponte en mer est plus tardive, il est très probable qu'entre la récolte et la mise en cage en juillet et l'échantillonnage en août, les moules aient pondu. De plus, le stress des manipulations (dissection, variation de température, etc.) en juillet, alors que les moules sont matures, a certainement favorisé la ponte, comme largement démontré en laboratoire [87-88]. Il est connu qu'au moment de la ponte, la concentration en métaux dans les tissus est plus élevée [89]. Ceci est relié au fait que la masse de la moule diminue beaucoup pendant cette période, en raison du relâchement des gamètes dans l'eau. Ainsi, il y a plus de métaux et métalloïdes par masse de tissus. Chez la moule mature, les gamètes représentent près de 50% de la masse totale des tissus [71]. La somme totale en métaux et métalloïdes des chairs systématiquement plus élevée en août comparativement à novembre pourrait donc être principalement causée par l'effet de la ponte (tab 4.1).

Il n'y avait pas de différence significative de pourcentage relatif en métaux et métalloïdes entre les parties proximale et distale du byssus, à l'exception d'une faible variation du bore en août et du vanadium et du nickel en novembre (tab. 4.1). Les lettres en exposant dans le tableau 3.2 indiquent les différences significatives à $p < 0,05$ suite au test *a posteriori* des MANOVA. Waite et al. ont étudié la concentration en Al, Si, P, S, K, Ca, Ti, Mn, Fe, Cu et Zn sur les brins de byssus de *Dreissena polymorpha* et *Dreissena bugensis* par spectroscopie PIXE (émission de photons X induite par particules) et ont également conclu qu'il n'y avait pas de différence de concentration de ces métaux entre la partie proximale et distale [90]. Le fer, le cuivre et le zinc sont connus pour être les principaux agents de réticulation dans le byssus et jouer un rôle important pour les propriétés mécaniques du byssus [2,81]. Par contre, le pourcentage relatif en fer était constant dans le byssus entre les saisons (tab 4.1). Il y a une forte variation saisonnière du pourcentage relatif en molybdène dans le byssus, dont l'état d'oxydation varie entre II et VI dans l'eau de mer [91]. Cette augmentation se ferait au détriment d'autres métaux comme Al, Ti, Mn, Co, Ni, Ba et Sr. En effet, à l'été, le

pourcentage relatif total de ces éléments était de 11,12 % dans le byssus (parties proximale et distale) comparativement à 7,26 % en automne. Cela constitue une diminution de 3,38 % qui se compare bien avec l'augmentation de 4,49 % observée pour le molybdène entre l'été et l'automne.

La répartition des métaux et métalloïdes dans les différents tissus était souvent significative entre les deux saisons (fig. 4.1, 4.2). Ceci concorde avec les résultats obtenus au chapitre III qui montrent que les propriétés mécaniques des brins de byssus variaient significativement selon la saison. En novembre, le bore n'était retrouvé que dans le byssus alors qu'en août il était contenu dans tous les tissus. En novembre, la somme totale des métaux et métalloïdes était plus élevée dans le byssus et les branchies comparativement au manteau et à la glande digestive. Par contre, en août, ils étaient répartis plus uniformément entre le byssus, le manteau et la glande digestive (fig. 4.2). Ceci est possiblement dû au métabolisme des moules plus élevé au mois d'août lors de la production de gamètes. Certains métaux et métalloïdes associés à un tissu particulier en août étaient associés à un autre en novembre. Par exemple, le barium et le strontium étaient associés à la glande digestive en novembre alors qu'ils étaient associés à la glande digestive ainsi qu'au byssus en août. Le fer et le cuivre qui étaient plus élevés dans le byssus en août, l'étaient dans le byssus et également dans la glande digestive en novembre. Le cobalt était plus élevé dans le byssus en août et dans la glande digestive en novembre. Inversement, le molybdène était plus élevé dans la glande digestive en août et dans le byssus en novembre. La concentration en métaux et métalloïdes dans chaque tissu dépendait de leur mode d'absorption dans l'organisme ainsi que de leur redistribution. Ils peuvent être absorbés directement par les tissus en contact avec l'eau comme le pied, le byssus et le manteau, être absorbés par la voie gastro-intestinale via les métaux présents dans la nourriture, ou être assimilés par les branchies via la ventilation [92]. Il y a également une redistribution des métaux à l'intérieur de l'organisme à l'aide de processus métaboliques [92].

Les trois métaux qui ont le plus grand pourcentage relatif dans le byssus étaient le magnésium, le calcium et le fer (tab. 4.2). En août, le troisième métal le plus abondant dans les branchies et le manteau était le strontium avec une très faible concentration (0,6%) comparativement à celle du fer (4-5 %) (tab. 4.2). Le calcium est principalement retrouvé dans la gaine et représente plus de 90% du contenu inorganique du byssus [12]. Comme discuté au chapitre III, Holten-Andersen et *al.* ont montré que la chélation du calcium et du fer diminuait de 50 % la solidité des brins de byssus de *M. galloprovincialis*. Le pourcentage relatif de calcium et de magnésium variait beaucoup entre les saisons, mais leur somme était constante à environ 90%, autant dans le byssus que dans les chairs. Le magnésium prédominait toujours dans le byssus et les chairs, peu importe la saison. Toutefois, son pourcentage relatif diminuait en automne au profit du calcium, et ce, autant dans le byssus que dans les chairs. Ainsi, le calcium peut être substitué par le magnésium dans la réticulation des PréCols.

Tableau 4.2 Métaux retrouvés en plus grande concentration dans les tissus de la moule pour chacune des saisons. Le pourcentage relatif aux métaux totaux est indiqué entre parenthèses.

Saison	Tissus	Métaux		
Août	Byssus Proximale	Mg (73)	Ca (14)	Fe (5)
	Byssus Distale	Mg (73)	Ca (16)	Fe (4)
	Branchie	Mg (92)	Ca (6)	Sr (0,56)
	Manteau	Mg (93)	Ca (6)	Sr (0,58)
	Glande digestive	Mg (82)	Ca (9)	Fe (4)
Novembre	Byssus Proximale	Mg (47)	Ca (42)	Fe (5)
	Byssus Distale	Mg (47)	Ca (39)	Fe (5)
	Branchie	Mg (59)	Ca (37)	Fe (2)
	Manteau	Mg (58)	Ca (36)	Fe (3)
	Glande digestive	Mg (50)	Ca (35)	Fe (7)

Le byssus contenait des métaux lourds toxiques qui n'étaient pas retrouvés dans les chairs, soit l'uranium et le bore en novembre, ou faiblement comme le plomb et le cuivre. Ainsi, en raison de ses caractéristiques particulières, le byssus pourrait servir à détoxifier l'organisme en employant certains contaminants comme agent de réticulation. L'arsenic, qui est retrouvé en concentration plus élevée dans les chairs comparativement au byssus, semble faire exception à cette règle. Par contre, il est toxique seulement lorsqu'il est sous forme trivalente, comme dans l'arsenic inorganique, l'acide monométhylarsonique (MMA^{III}) et l'acide diméthylarsinique (DMA^{V}), mais pas sous forme d'organoarsenic, comme régulièrement retrouvé dans la nature [93]. Dans la moule, l'arsenic est sous forme d'arsénobétaïne et de deux arsenosucres [93]. L'arsénobétaïne est connue pour ne pas être toxique chez l'homme, car elle est relâchée dans l'urine sans être métabolisé. Par contre, peu d'informations sont connues à propos de la toxicité des sucres d'arsenic chez l'homme, à l'exception du fait qu'ils sont métabolisés en DMA^{V} à 67%, en diméthylarsinoyle éthanol à 5 % et en oxyde de triméthyl arsonique à 0,5 % [93]. Jha et *al.* ont étudié l'accumulation et la détoxification du ^{68}Ni , qui peut avoir des effets toxiques chez *Mytilus edulis* [92]. Ils ont conclu que l'accumulation du ^{68}Ni se faisait majoritairement dans le byssus et que ce dernier était la principale voie d'élimination des métaux [92]. Pour les deux saisons, la majorité des métaux et métalloïdes sont retrouvés en même concentration dans la glande digestive et dans le byssus (ab. 4.1). Ainsi, ces deux constats laissent à penser que les métaux et métalloïdes retrouvés dans le byssus provenaient du métabolisme de la moule via la ventilation ou la digestion et n'étaient pas intégrés directement à partir de l'eau environnante lors de la formation du filament. Ceci concorde avec les travaux de George 1976 qui conclut que les métaux dans le byssus proviennent des glandes qui sont dans le pied de la moule [85,94]. De plus, s'ils étaient absorbés directement de l'eau, il y aurait une différence de concentration entre les deux parties du byssus. En effet, la partie distale aurait une concentration plus importante, car elle est toujours en contact avec l'eau, comparativement à la partie proximale qui est protégée dans la moule [90].

4.4 Conclusion

Il y avait une variation significative de la concentration en métaux et métalloïdes dans les chairs et le byssus de la moule *M. edulis* en août comparativement à novembre. Celle-ci serait principalement expliquée par le relâchement des gamètes lors de la ponte en août, ce qui fait significativement diminuer la masse de la moule et donc augmenter la quantité de métaux par masse de tissus. La répartition des métaux et métalloïdes dans les cinq tissus était également différente d'une saison à l'autre. En novembre, les métaux et métalloïdes étaient regroupés dans le byssus et un peu dans le manteau et la glande digestive. Par contre, en août, ils étaient répartis plus uniformément entre le byssus, le manteau et la glande digestive. En août, le calcium dans le byssus est substitué par le magnésium et inversement en novembre. La moule semble avoir le pouvoir de gérer sélectivement l'accumulation et la redistribution de certains métaux et métalloïdes dans son organisme. Ceux servant à la réticulation du byssus semblent provenir de l'organisme et non pas de l'absorption via l'eau ambiante lors de la formation de la fibre. Le byssus est un tissu particulier qui semble avoir le pouvoir de décontaminer le système de la moule en utilisant des métaux toxiques comme agent de réticulation. La toxicité d'un élément est dépendante de son état d'oxydation. Par exemple, l'arsenic est toxique seulement sous forme III. Par contre, un composé toxique pour l'homme ne l'est pas nécessairement pour la moule.

CHAPITRE V

ÉTUDE COMPARATIVE DE L'EFFET DE L'HYDRATATION SUR LES FILS D'ANCRAGE DES MOULES *M. EDULIS* ET *X. SECURIS* PAR RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE

5.1 Introduction et objectifs

Les moules *Mytilus edulis* et *Xenostrobus securis* produisent du byssus essentiel à leur survie. Elles vivent toutes deux en eau salée dans des régions intertidales, c'est-à-dire exposées à l'eau et à l'air selon les cycles de marée, mais proviennent de régions différentes. Les *M. edulis* utilisées pour cette recherche ont été récoltées aux Îles-de-la-Madeleine, au Québec. Ce sont les moules les plus répandues au Canada et vendues dans le secteur alimentaire. *X. securis* est une espèce envahissante provenant de Ria de Vigo, au nord-ouest de l'Espagne [20]. Elles sont originaires des eaux salées de la Nouvelle-Zélande et de l'Australie [20].

Les brins de byssus de ces deux moules ont la même morphologie. En effet, ils ont tous les deux une partie proximale rugueuse et une partie distale lisse (fig.5.1). Par contre, chez *X. securis*, le byssus a un diamètre variant entre 20 et 400 μm et la partie proximale représente environ 10% de la fibre alors que chez *M. edulis* le diamètre est de 100 μm et la partie distale représente 30 à 40% de la fibre [1,20]. La structure moléculaire du byssus de *M. edulis*, décrite au chapitre I, est bien documentée, contrairement à celle de *X. securis* qui est encore mal connue.

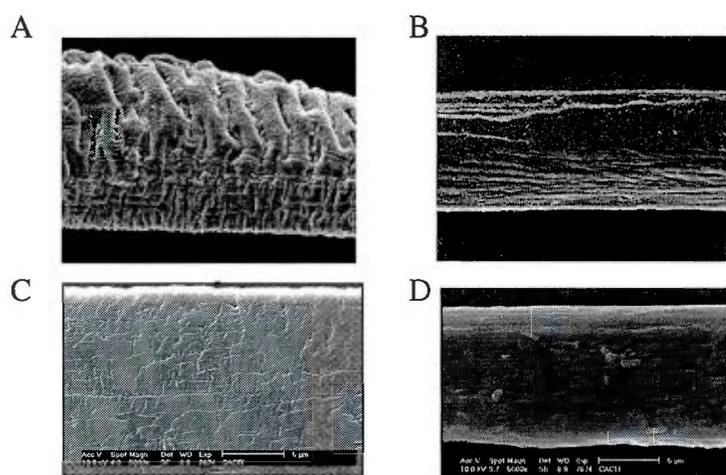


Figure 5.1 Images de microscopie électronique de *M. edulis* parties A) proximale et B) distale [9], et de *X. securis* parties C) proximale et D) distale [20]

Les byssi de ces deux genres de moules ont des forces d'attachement très différentes. En effet, pour *M. edulis* liée à un boudin de polypropylène en milieu naturel en présence d'une vitesse de courant variant entre 4 et 6 cm s⁻¹, la force d'attachement varie entre 27,3 et 40,0 N entre mai et octobre [19]. Pour *X. securis* liée à un boudin de nylon en milieu fermé avec une vitesse de courant de 5 cm s⁻¹, la force d'attachement est de 3,5 N [20].

Le byssus de la moule bleue et de la moule envahissante ont des comportements très différents selon l'hydratation. En effet, un filament de byssus de *M. edulis* déshydraté possède un module de Young de 4 à 5 fois plus élevé et une extensibilité de 2 à 4 fois plus faible comparativement à un fil hydraté [21]. Lorsqu'il est étiré, le brin de byssus de *X. securis* s'effiloche de façon non uniforme comme une gomme à mâcher [20]. Par contre, lorsqu'il est déshydraté, il se rompt avec une coupure nette, comme les fibres de *M. edulis*.

En plus de modifier les propriétés mécaniques des fibres de byssus, on sait que l'hydratation a un effet sur la structure et la dynamique moléculaire du collagène, de l'élastine et de la fibroïne de soie [95]. Or, les fibres byssales de *M. edulis* sont

composées à 42% de collagène et à 22% de fibroïne de soie, d'élastine et de protéines semblables aux parois cellulaires de plantes [9]. La composition et la structure du byssus de *X. securis* sont par contre peu documentées. Puisque ces moules résident en zones intertidales périodiquement immergées ou exposées à l'air, il est important de vérifier et comprendre les variations des propriétés mécaniques, structurales et dynamiques de leurs fibres d'ancrage. Le but premier de ce chapitre est donc d'étudier de façon préliminaire l'effet de l'hydratation sur la dynamique moléculaire des brins de byssus de ces deux types de moules. Le second objectif est de comparer la structure moléculaire du byssus de *X. securis* et *M. edulis*. Une analyse de la composition en acides aminés a donc été réalisée sur le byssus des deux genres de moule. Des expériences de RMN-ÉS unidimensionnelle (1D) en ^{13}C et bidimensionnelle (2D) ^1H - ^{13}C sur les fibres hydratées et déshydratées ont été réalisées. Plus spécifiquement, des expériences 1D de type *direct pulse* (DP), avec polarisation croisée (CP) et RINEPT en ^{13}C ont été menées pour caractériser les différences structurales ainsi que la dynamique moléculaire des fibres de byssus de la moule bleue et de l'espèce envahissante. Elles ont été complétées par des expériences de *wideline separation* (WISE) et la mesure du temps de relaxation transversale (T_2).

5.2 Matériel & méthodes

Avant la récolte des byssus, les *M. edulis* ont été transférées dans des bassins à Rimouski à l'Institut des Sciences de la Mer où elles ont été nourries avec des microalgues marquées au ^{13}C pour obtenir du byssus enrichi en ^{13}C (environ 2% de marquage) [96]. Les *X. securis* proviennent de l'estuaire Ria de Vigo en Espagne et leur byssus n'a pas été enrichi en ^{13}C .

5.2.1 Enrichissement en ^{13}C des byssus

Les byssus ont été enrichis en ^{13}C en nourrissant, pendant 2 jours, 12 moules *M. edulis* avec des algues *Nannochloropsis oculata* enrichies en ^{13}C . Durant cette période, l'aquarium a été placé en mode recirculation pour assurer l'oxygénation de l'eau. Par la suite, les moules ont continué d'être nourries avec des algues non enrichies et le byssus a été récolté tous les deux jours pendant 15 jours. Les algues ont été marquées en ^{13}C en les plaçant dans un milieu d'eau de mer à 20°C avec illumination continue et nourries avec du bicarbonate de sodium ($\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$) pendant 10 jours [96]. Le milieu de culture était scellé et purgé avec de l'azote gazeux pour éliminer le dioxyde de carbone atmosphérique [96]. Après ce délai, le milieu de culture a été autoclavé et une solution permettant la croissance des algues a été ajoutée [96]. Les algues étaient données comme nourriture aux moules après une période de culture de 10 jours. Un taux d'enrichissement moyen estimé à 2 % a été déterminé selon la méthode publiée par Leblanc et al. [96]. La glycine, l'alanine et la proline, qui sont les acides aminés les plus abondants dans le byssus, sont marquées à 10,4 %, 7,7 % et 6,2 %, respectivement. Pour l'analyse du taux de marquage, les byssus sont hydrolysés dans une solution de chlorure d'hydrogène (HCl) 6N et dérivés avec le carbamate de 6-aminoquinolyl N-hydroxysuccinimidyl (AQC) pour former des composés qui ont le même profil de fragmentation en spectrométrie de masse en tandem. Les précurseurs sont analysés par chromatographie liquide couplé à un QTRAP 5500 triple quadripôle hybride avec une trappe à ion linéaire (LC/MS/MS).

5.2.2 Analyse d'acides aminés

Les analyses en acides aminés ont été réalisées au HSC Advanced Protein Technology Centre à Toronto, Ontario. Les brins de byssus ont subi une digestion acide et l'hydrolysate a été dérivé avec une solution de méthanol: eau: triéthylamine: isothiocyanate de phényle (PITC) (7:1:1:1). Les échantillons ont été injectés sur une

colonne Waters Acquity UPLC BEH C18 (2.1 X 100 mm) d'un système Waters Acquity UPLC utilisant le gradient : 0,00 min 0% B ; 4,40 min 46% B Curve 5 (Waters Gradient); 5,00 min 100% B ; 6,20 min 0% B avec un débit de 0,500 uL/min. La phase mobile A est une solution d'acétate de sodium 0,14 M avec 0,05% triéthylamine à pH 0,6 et 6% d'acétonitrile. La phase mobile B est une solution 60% d'acétonitrile dans l'eau. Un détecteur UV pour une longueur d'onde de 254 nm a été utilisé. Les analyses en acides aminés des fibres de *X. securis* ont été réalisées en triplicata. Les analyses des fibres de *M. edulis* ont été réalisées en duplicata à l'exception du DOPA dont l'analyse n'a été réalisée que sur un seul échantillon.

5.2.3 Expériences de RMN

Les échantillons étudiés par RMN consistaient en un ensemble de brins de byssus d'environ 20 mg dont la plaque et la colonne ont été coupées. Pour les échantillons déshydratés, ceux-ci ont été lyophilisés quatre jours avant d'être insérés dans un rotor de 4 mm. Pour les échantillons hydratés, ils ont été insérés dans le rotor avec un surplus d'eau puis scellés. Les rotors ont été pesés et un spectre de ^1H a été réalisé avant et après chaque expérience pour s'assurer que l'échantillon restait hydraté. Pour les échantillons déshydratés, ils ont été lyophilisés pendant 24h avant d'être insérés dans le rotor. Les expériences de RMN-ÉS ont été réalisées avec un spectromètre 600 MHz Varian Inova Unity (Agilent, Santa Clara, États-Unis). Une sonde de 4 mm double résonance HX a été employée avec rotation à l'angle magique de l'échantillon à une fréquence de 12,5 kHz (DP, CP, RINEPT et T_2) ou 7,5 kHz (WISE). Pour toutes les expériences, l'acquisition a été réalisée en même temps qu'un découplage TPPM (*two-pulse phase-modulated*) de 87,5 kHz des protons [97]. La température de la sonde a été maintenue à 13°C soit une température estimée maximale de l'échantillon de 24°C due à la rotation de l'échantillon. Le pic le plus déblindé de l'adamantane est utilisé comme référence à 38,23 ppm correspondant à un déplacement chimique de 0 ppm pour le TMS (tétraméthylsilane) [98]. Les

expériences de CP ont été réalisées avec un temps de contact de 1 ms et des champs de radio fréquences de 75 et 87,5 kHz sur le ^{13}C et le ^1H respectivement (correspondant à $\omega_{1\text{H}} = \omega_{^{13}\text{C}} + \omega_r$). Les expériences de RINEPT ont été effectuées avec un délai (d3) de 1 ms pour permettre le transfert de polarisation. Les expériences de T_2 ont été réalisées avec des délais (d_1) de 80, 160, 240, 400, 560, 720, 960 et 1520 μs . Les expériences de CP, DP, RINEPT, WISE et T_2 ont été réalisées une fois pour les échantillons hydratés et déshydratés. Les données présentées pour les analyses WISE proviennent des 20 acides aminés présents dans le byssus. Les données présentées pour les analyses T_2 proviennent d'un pic pour le carbonyle et de deux pics pour les $\text{C}\alpha$ et les carbones de la chaîne latérale. Peu de pics ont été utilisés pour l'analyse, car il était difficile de trouver des pics présents sur les 32 spectres qui constituent l'expérience T_2 sur les deux fibres hydratées et déshydratées, en abondance naturelle.

5.3 Résultats et Discussion

5.3.1 Analyses en acides aminés

Dans un premier temps, nous avons déterminé la composition en acides aminés des fibres de byssus de *M. edulis* et *X. securis* car elle est déterminante sur la structure moléculaire des fibres protéiques [99].

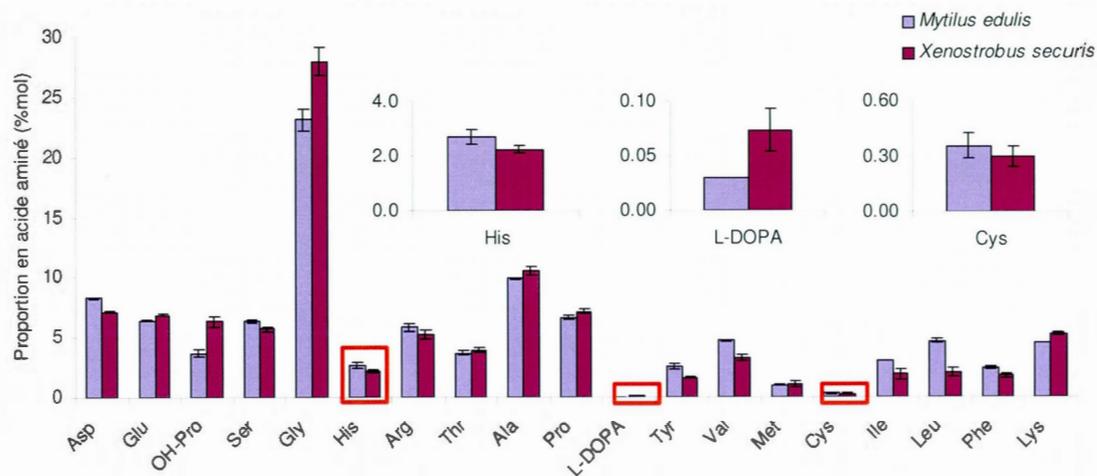


Figure 5.2 Proportion des différents acides aminés dans les fibres de byssus de *M. edulis* et *X. securis*

Tel que montré à la figure 5.2, la proportion des acides aminés majoritaires, hormis la glycine, est semblable pour les fibres d'ancrage des deux types de moules, ce qui suggère que le contenu en collagène est similaire [9]. Les acides aminés présentant la plus grande différence de proportion entre les deux byssus sont la L-DOPA (59%), la leucine (55%), l'hydroxyproline (42%), la tyrosine (38%) et l'isoleucine (37%). L'isoleucine et la leucine étant retrouvées surtout dans la protéine semblable aux parois cellulaires de plantes contenue dans le PréCol-NG, il est possible que les fibres de *X. securis* en contiennent peu [9]. Aussi, les brins de byssus de *X. securis* contiennent une proportion plus élevée de DOPA (59%) qui est impliquée dans la réticulation des fibres. Les résultats suggèrent que les deux byssus ont une stratégie de réticulation différente, ce qui pourrait expliquer la force d'attachement différente du byssus des deux moules. Par contre, une différence de la structure moléculaire des fibres pourrait également expliquer ces variations des forces d'attachement.

5.3.2 Analyses DP, CP et RINEPT

Les expériences de DP, CP et RINEPT ont été réalisées sur les fibres de byssus hydratées et déshydratées de *M. edulis* et *X. securis* pour déterminer l'effet de l'hydratation sur la dynamique moléculaire ainsi que les ressemblances structurales. Les parties peu mobiles de la structure des fibres ont une intensité plus élevée sur les spectres CP, alors que les parties plus mobiles ont une intensité plus élevée sur les spectres RINEPT, tel que discuté au Chapitre II. Les spectres DP ne font pas de distinction d'intensité selon la mobilité.

Les figures 5.3 et 5.4 présentent les spectres obtenus avec CP, DP et RINEPT sur des fibres de byssus hydratées et déshydratées de *M. edulis* et *X. securis*, respectivement. Les pics entre 10 et 40 ppm sont associés aux carbones des chaînes latérales. Les pics entre 40 et 70 ppm sont associés aux C α du squelette protéique et ceux à 170 ppm aux carbonyles [100]. Dans les spectres de CP et DP hydratés et déshydratés, le déplacement chimique des pics est inchangé. Il est donc possible de conclure que la déshydratation ne dénature pas la structure des protéines des byssus et que la conformation de la triple hélice du collagène reste la même. Ceci est soutenu par la présence des pics à 42,7 ppm, 49,6 ppm et 59,8 ppm pour les brins de byssus hydratés et déshydratés des deux moules, qui sont respectivement le C α de la glycine, de l'alanine et de la proline et qui sont associés à la structure en triple hélice du collagène dans le byssus de *M. edulis* [9]. Les spectres de CP et DP des fibres hydratées de *M. edulis* et *X. securis* présentent des pics plus fins que ceux des brins déshydratés (fig. 5.3-5.4). Ceci suggère que l'hydratation augmente la mobilité moléculaire au sein de la structure du byssus. L'hydratation augmente également la résolution. En effet, elle entraîne l'apparition de trois petits pics sur le pic principal du carbonyle pour *M. edulis* et *X. securis*, qui sont absents sur le spectre déshydraté.

Le spectre de RINEPT du byssus de *M. edulis* hydraté ne présente pas de pic carbonyle à 170 ppm car il n'y a pas de proton directement lié à ce carbone (fig. 5.3 F). Les pics entre 115-140 ppm sont reliés au signal du rotor dû au

faible marquage de l'échantillon. Les deux pics les plus intenses sont le C $_{\alpha}$ de la Gly à 43,4 ppm, qui est retrouvé dans l'hélice 3_1 (Ala-Gly-Gly) $_n$ du collagène ou dans une partie désordonnée, et le C $_{\beta}$ de l'Ala à 17,2 ppm qui est également retrouvé dans le collagène [9]. Le spectre RINEPT du byssus de *M. edulis* déshydraté ne présente aucun pic car la structure n'est pas assez mobile pour être détectée (fig. 5.3-E). Le spectre de RINEPT du byssus de *X. securis* déshydraté présente un très faible signal (fig. 5.4-E). Ceci peut être attribué au fait que la partie proximale, qui est la plus mobile, représente seulement 10% de la fibre chez *X. securis* [20]. Ainsi, puisque la partie la plus mobile est en faible quantité et que ces fibres ne sont pas enrichies en ^{13}C , il est fort possible qu'elle ne soit pas détectable. Une analyse 2D permettrait de confirmer la similitude des deux fibres. Par contre, le matériau doit nécessairement être enrichi pour faire ce type d'analyse.

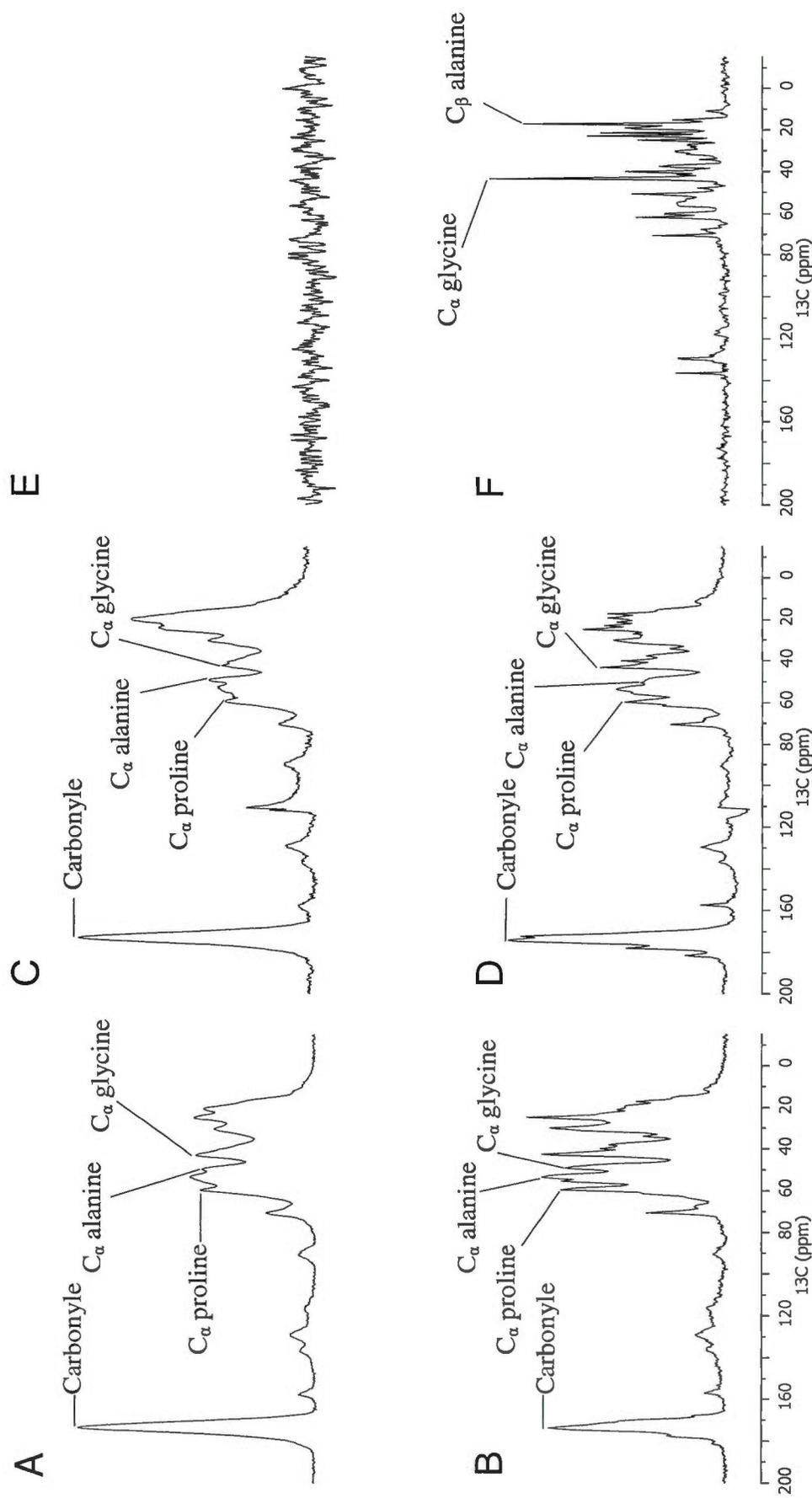


Figure 5.3 Spectres de RMN-ÉS du byssus de *M. edulis* avec CP sur des fibres A) déshydratées et B) hydratées; avec DP sur des fibres C) déshydratées et D) hydratées; RINEPT sur des fibres E) déshydratées et F) hydratées. Les spectres obtenus par DP présentés ont subi une soustraction du signal du rotor.

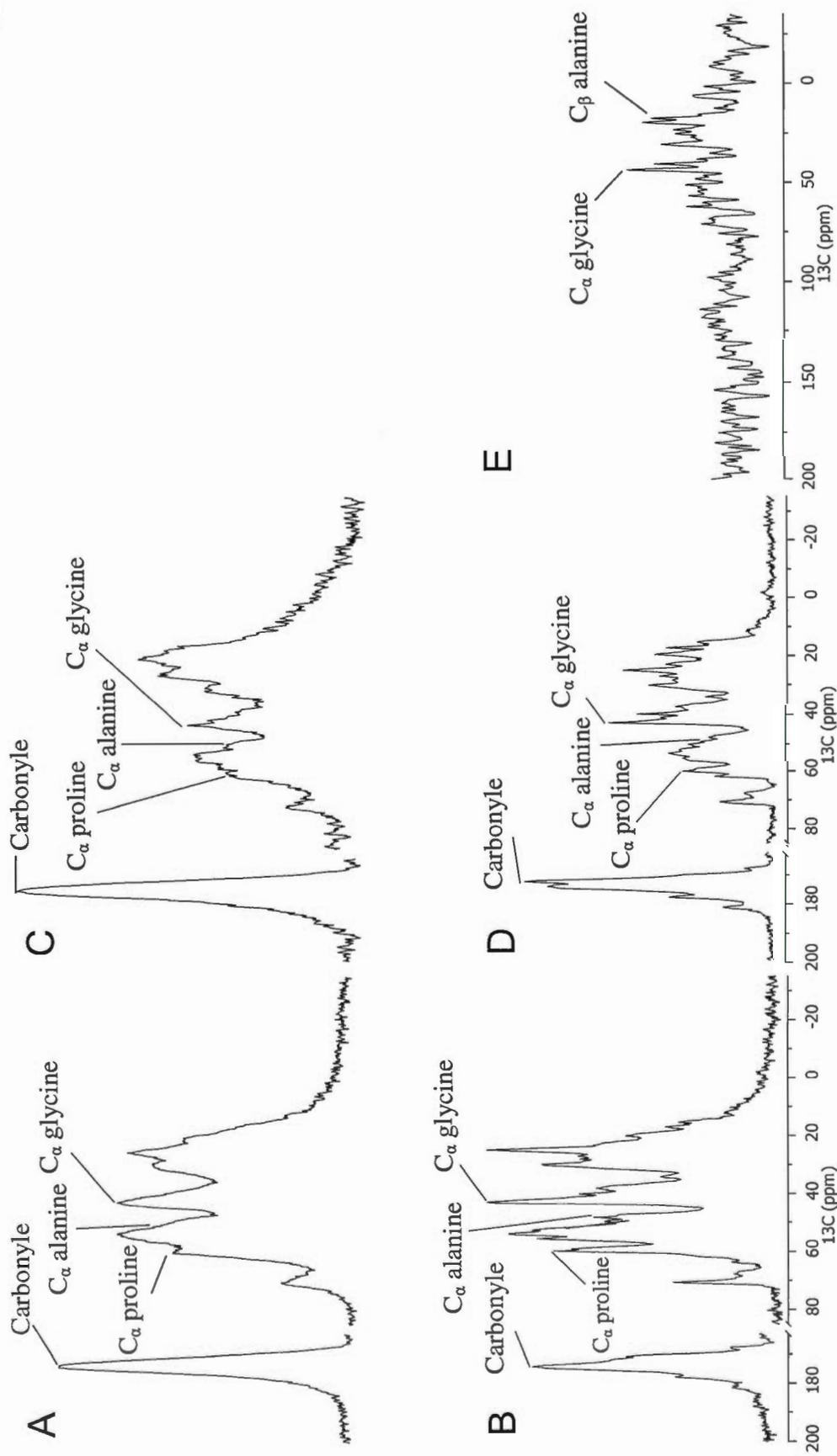


Figure 5.4 Spectres de RMN-ÉS du byssus de *X. securis* avec CP sur des fibres A) déshydratées et B) hydratées; avec DP sur des fibres C) déshydratées et D) hydratées; RINEPT sur des fibres E) hydratées. La coupure entre 90 et 160 ppm permet d'éliminer le signal du rotor.

5.3.3 Analyses WISE

Les expériences de WISE sont un outil excellent pour relier structure et mobilité dans une protéine. Le spectre WISE du byssus de *M. edulis* hydraté est présenté à la figure 5.5. Des spectres WISE, non présentés ici, ont également été réalisés sur la fibre déshydratée ainsi que sur le byssus hydraté et déshydraté de *X. securis*. La mobilité est déterminée en comparant la largeur à mi-hauteur des bandes du spectre ^1H associées à chacun des pics du spectre ^{13}C (fig. 5.5). La largeur moyenne des bandes ^1H du spectre WISE est 26 kHz pour le byssus hydraté de *M. edulis* et 38 kHz pour le déshydraté (fig. 5.5 – 5.6). Elle est de 28 kHz pour les fibres hydratées de *X. securis* et 37 kHz pour celles déshydratées (fig. 5.7 – 5.8). Ces largeurs de bande ^1H des fibres déshydratées sont caractéristiques d'un système organique rigide et signifient qu'il n'y a pas de mouvement des chaînes latérales à l'échelle de temps de la RMN [101].

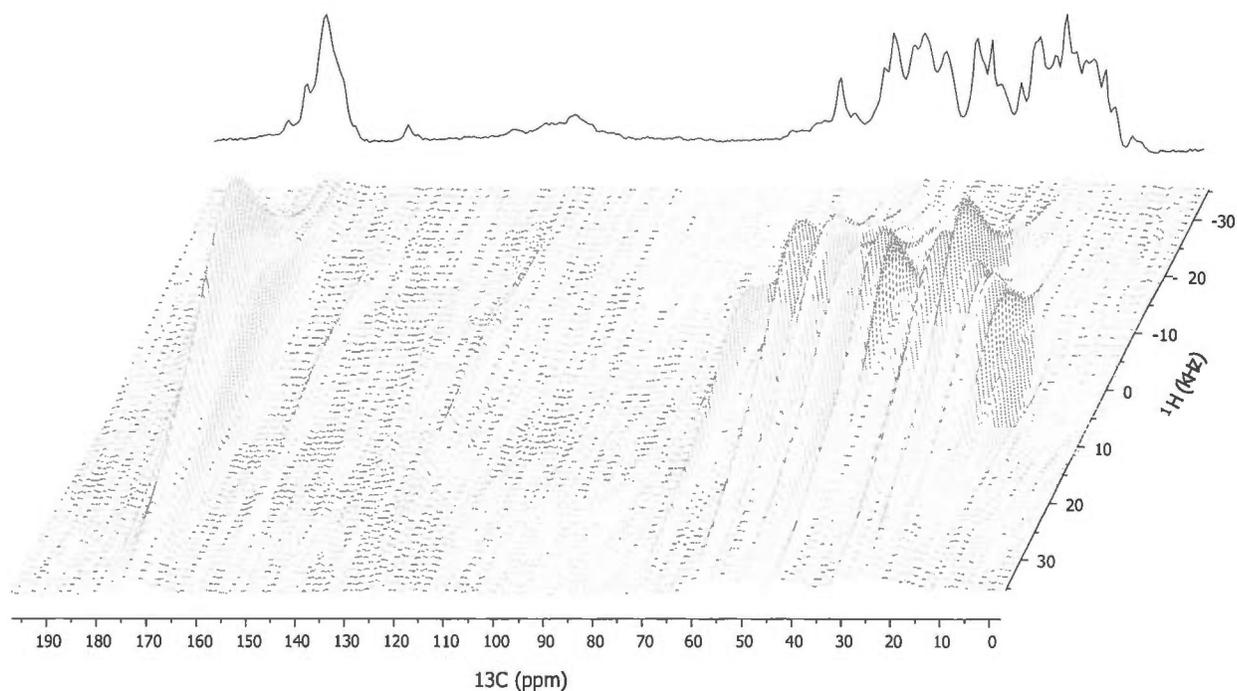


Figure 5.5 Spectre WISE du byssus hydraté de *Mytilus edulis*

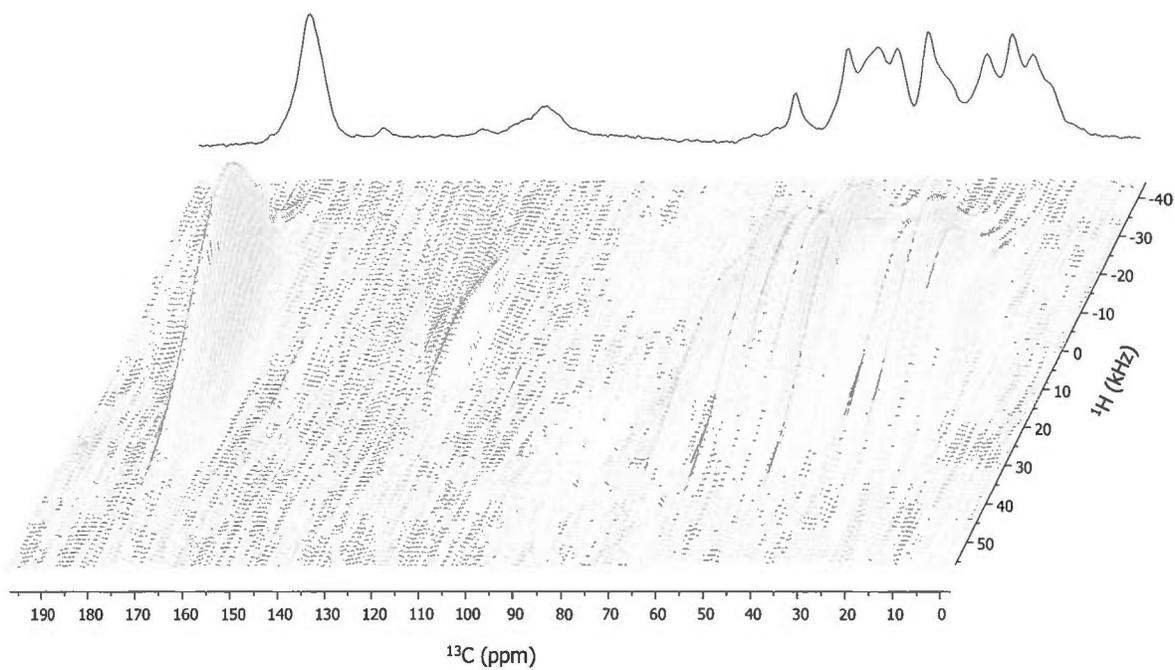


Figure 5.6 Spectre WISE du byssus déhydraté de *Mytilus edulis*

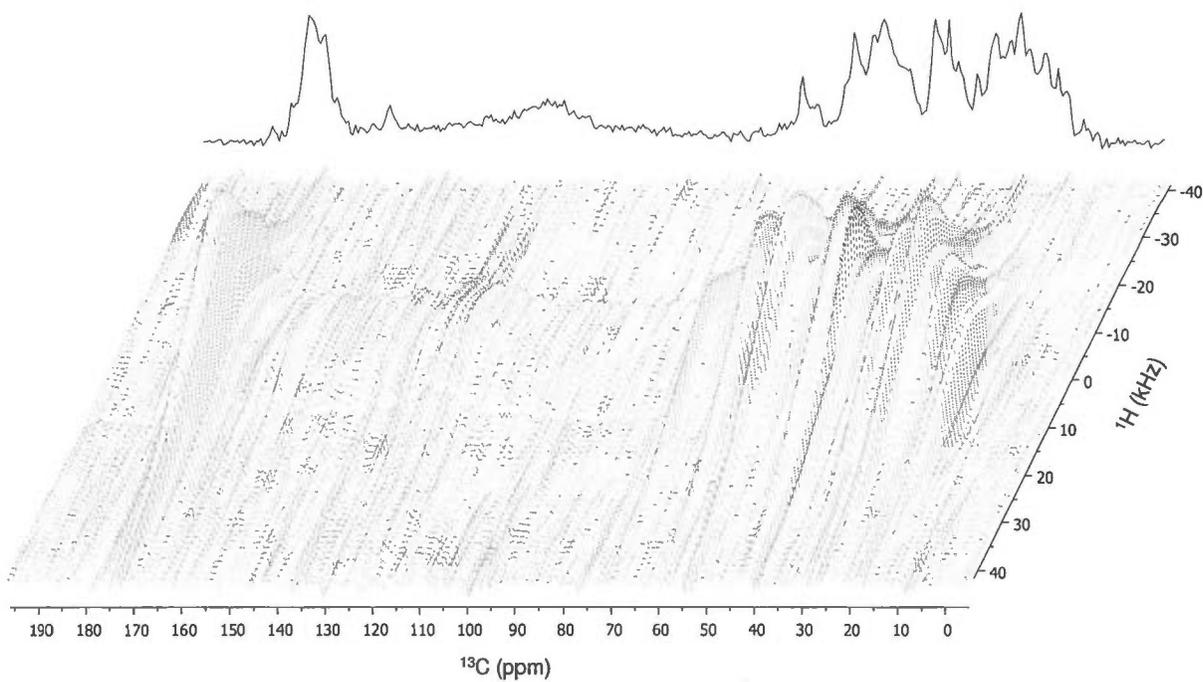


Figure 5.7 Spectre WISE du byssus hydraté de *Xenostrobus securis*

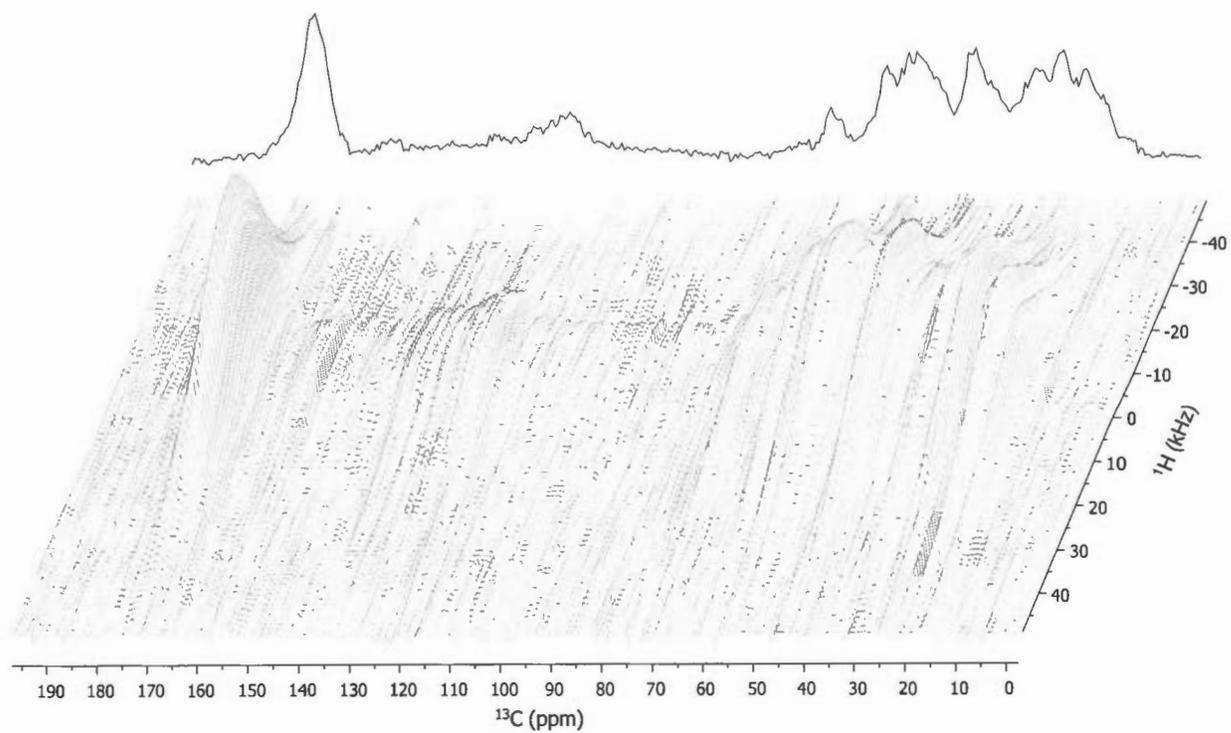


Figure 5.8 Spectre WISE du byssus déshydraté de *Xenostrobus securis*

Chacune des bandes ^1H pour les deux genres de moules est plus large pour le byssus déshydraté comparativement à celui hydraté (fig. 5.9). Cela confirme que la structure est plus mobile lorsqu'hydratée.

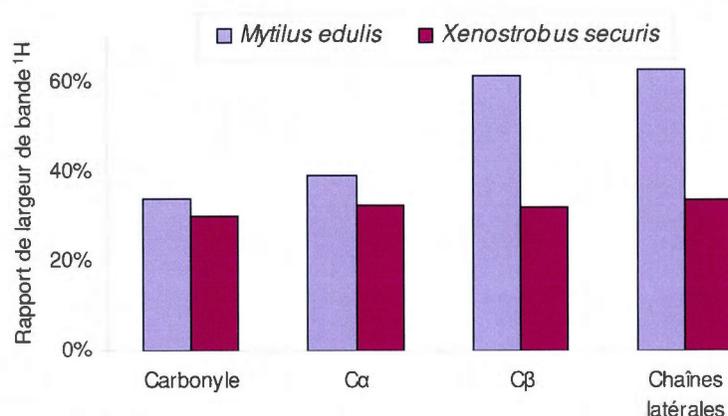


Figure 5.9 Différence de largeur à mi-hauteur des bandes ^1H liées aux carbones des acides aminés du byssus hydraté et déshydraté de *Mytilus edulis* et de *Xenostrobus securis*.

Pour les fibres de *X. securis*, l'augmentation de la mobilité est uniforme pour toute la structure avec une augmentation qui varie de 30%, pour le carbonyle, à 34 %, pour les carbones de la chaîne latérale (fig. 5.9). Il n'y a pas de différence due à l'hydratation entre les acides aminés polaires et non polaires. Pour les fibres de *M. edulis*, la différence de mobilité est plus importante pour les C β et les carbones de la chaîne latérale (61-63 %), comparativement à ceux du squelette (carbonyle et C α) (34-39 %) (fig. 5.9). Ainsi, l'effet de l'hydratation est plus prononcé pour les chaînes latérales, comparativement aux carbones du squelette. L'étude de cet effet doit être approfondie.

5.3.4 Analyses de T_2

Alors que le couplage dipolaire ^1H - ^1H d'une expérience WISE fournit de l'information qualitative sur la mobilité de la structure moléculaire du matériau, le temps de relaxation longitudinal (T_2) permet de quantifier cette mobilité. Ainsi, T_2 est une mesure de la dynamique de la structure du matériau à l'échelle de la milliseconde (ms) et est inversement proportionnel à la largeur d'un pic donné sur un spectre de RMN.

Pour *M. edulis*, la valeur de T_2 est plus faible pour le byssus hydraté, comparativement à celui déshydraté (fig. 5.10-A). Cette différence est la plus prononcée pour les carbonyles, devant les C_α et les carbones des chaînes latérales dont les variations sont cependant dans la barre d'erreur expérimentale. Une diminution de la valeur de T_2 dans l'élastine hydratée a également été observée par Yao et coll. [100]. Les temps de relaxation observés pour le byssus sont de l'ordre de la ms, comme observé par Yao et coll. [100]. Pour *X. securis*, le carbonyle présente aussi un T_2 plus court pour le byssus hydraté (fig. 5.10 B). Les T_2 des C_α et des chaînes latérales présentent des variations négligeables. Une diminution de la valeur de T_2 avec l'hydratation suggère une augmentation des mouvements de faible fréquence et de grande amplitude variant entre l'ordre de la micro et de la milliseconde [100]. Sur les spectres de RMN-ÉS avec DP en ^{13}C de *M. edulis*, les pics plus étroits pour les fibres hydratées suggèrent un T_2 plus grand, alors que les valeurs mesurées présentent un T_2 plus court, comparativement aux fibres déshydratées. La largeur des pics observée n'est donc pas réellement proportionnelle à T_2 . Par exemple, le pic des carbonyles des fibres de *M. edulis* déshydratées a une largeur de 903 Hz, ce qui correspond à un T_2 de 0,36 ms, alors que le T_2 mesuré donne une valeur de 3,8 ms. Ceci laisse à penser que l'élargissement des pics avec la déshydratation est dû à d'autres effets comme une distribution de conformations (structure désordonnée) dans la fibre déshydratée.

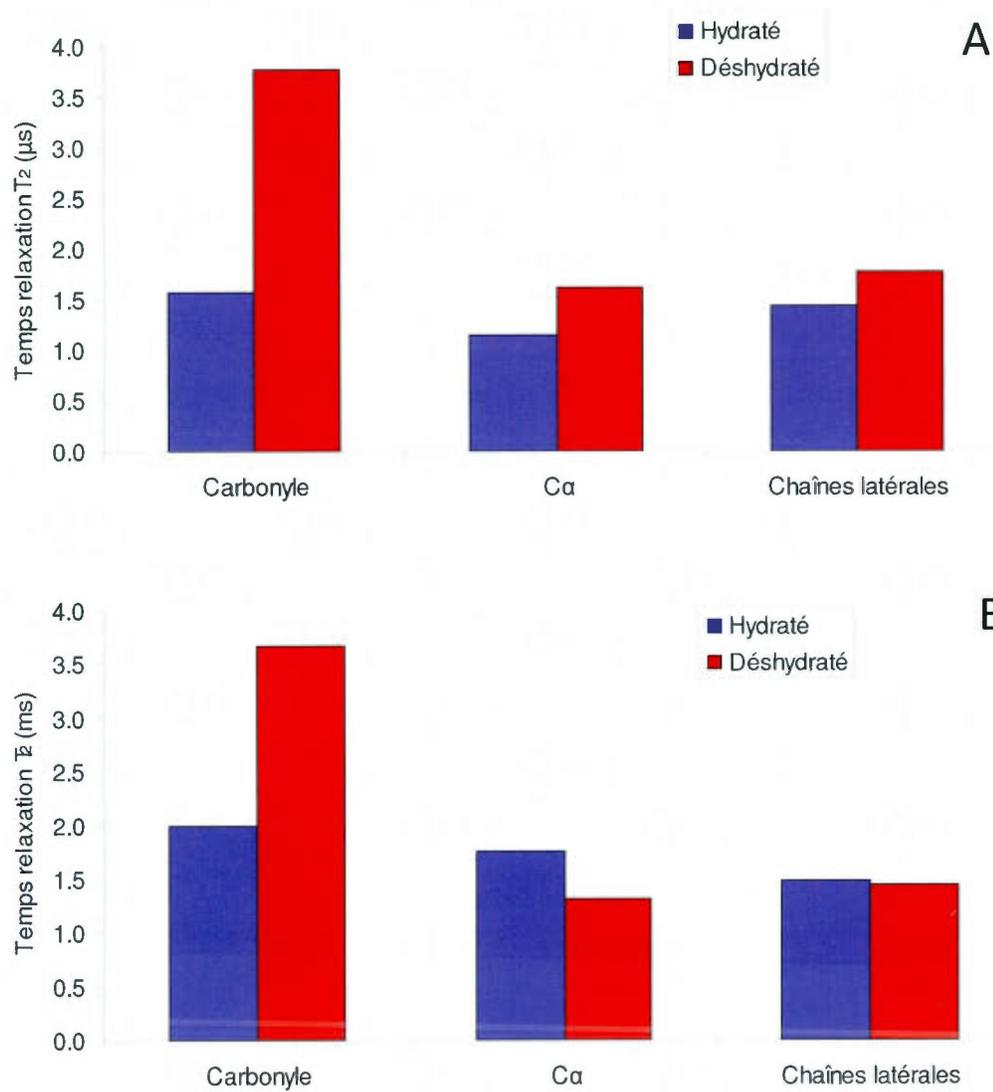


Figure 5.10 Temps de relaxation T_2 du byssus hydraté et déshydraté de (A) *M. edulis* et (B) *X. securis*.

5.4 Conclusion

Des différences de concentration pour les acides aminés responsables de la réticulation des PréCols laissent présumer qu'il y a une différence dans la stratégie d'assemblage du byssus des deux genres de moule. Par contre, la composition du collagène semble être la même pour les deux fibres. Les analyses de CP, DP et RINEPT suggèrent qu'il n'y a pas de différences structurales entre le byssus des deux genres de moule et que la déshydratation ne dénature pas le collagène des fibres. Ces analyses ont également montré que l'hydratation augmente la mobilité de la structure moléculaire des deux byssus. Selon les expériences WISE, l'augmentation de la mobilité est uniforme pour les fibres de *X. securis*, mais pas pour celles de *M. edulis*. En effet, elle est plus élevée pour les carbones des chaînes latérales comparativement à ceux du squelette. Les mesures de T_2 des carbonyles des fibres hydratées et déshydratées sont similaires pour les deux espèces. Une diminution de T_2 avec l'hydratation suggère une augmentation des mouvements de l'ordre de la micro- à la milliseconde. L'élargissement des pics causé par la déshydratation des fibres serait explicable par un plus grand désordre structural.

CHAPITRE VI

CONCLUSION

Le byssus est une fibre naturelle très complexe et encore mal connue, tant au niveau de la variation de ses propriétés mécaniques, de son accumulation préférentielle en métaux selon l'environnement, que de l'effet de l'hydratation sur sa structure. Le premier projet de recherche développé dans ce mémoire était l'étude de la variation des propriétés mécaniques des brins de byssus individuels selon le site et la saison ainsi que la corrélation avec leur teneur en métaux et métalloïdes. Il a été conclu que la force des brins variait significativement selon le site et la saison alors que la contrainte à la rupture variait seulement selon la saison. La variation de la force, selon le site, est due à un diamètre plus élevé des brins de byssus des moules du large, alors qu'elle est explicable par une différence dans la composition ou la structure de la fibre selon la saison. Ceci concorde avec la variation significative de la contrainte à la rupture seulement selon la saison. Plus précisément, cette différence de la force selon la saison serait due à une variation de la teneur en métaux qui assure la réticulation des PréCols dans le byssus. La concentration en métaux et métalloïdes des byssus a donc également été mesurée pour chacune des saisons et sites. Elle varie significativement selon la saison, mais pas selon le site. Par contre, contrairement à ce qui est attendu, la concentration des métaux et métalloïdes est maximale en août, à l'exception du molybdène et du calcium, alors que la force y est minimale. Ceci peut être expliqué par le pouvoir de réticulation avec les DOPA qui varie pour chacun des métaux, ainsi que leur capacité à les oxyder en *o*-quinone pour former des liens di-

DOPA. Aussi, la biodisponibilité peut expliquer cette différence, car bien que la concentration de chacun de métaux et métalloïdes varie d'une saison à l'autre, la somme totale reste constante. De plus, le mois d'août est le moment de la ponte chez les moules. Ainsi, la gestion des métaux et métalloïdes dans l'organisme peut être modifiée à ce moment-là.

Pour bien comprendre la gestion de ceux-ci dans l'organisme de la moule, la concentration en métaux et métalloïdes dans les branchies, le manteau, la glande digestive ainsi que les parties proximale et distale des brins de byssus a été déterminée. Il y a une différence significative de la concentration selon les tissus et la saison, mais pas selon le site. L'augmentation systématique de la concentration en août par rapport à novembre dans les chairs est reliée à la ponte et plus précisément au relâchement des gamètes qui entraîne une perte de masse rapide et significative. Le magnésium et le calcium sont les métaux retrouvés en plus grande concentration dans le byssus et les chairs. Le calcium est connu pour jouer un rôle important dans les propriétés mécaniques du byssus et c'est également ce que nous avons remarqué au chapitre III [81]. Le pourcentage relatif de ces deux éléments dans le byssus varie beaucoup entre les saisons, mais leur somme reste constante à environ 90 %. Il a été conclu que les métaux et métalloïdes qui forment le byssus proviennent des tissus de la moule et ne sont pas intégrés directement à partir de l'eau. Le byssus semble être utilisé pour détoxifier l'organisme de la moule. En effet, il utilise des métaux toxiques, comme l'uranium et le plomb, comme agent de réticulation. Par contre, pour plusieurs métaux, la toxicité dépend de leur taux d'oxydation. Il serait donc intéressant de déterminer le taux d'oxydation des métaux dans les chairs ainsi que leur toxicité respective pour la moule.

L'effet de l'hydratation sur la dynamique moléculaire du byssus des moules *X. securis* et *M. edulis* ainsi que leurs ressemblances structurales a été étudié. Nous avons déterminé que les deux byssi ont une proportion semblable en acides aminés majoritaires, à l'exception de la glycine, ce qui suggère qu'ils ont un contenu en collagène similaire. Les fibres de byssus de *X. securis* contiennent une plus grande

proportion en DOPA. Ainsi, les deux fibres auraient une stratégie de réticulation différente, ce qui expliquerait la différence de force d'attachement rapportée dans la littérature. Les expériences de RMN unidimensionnelles de CP, DP et RINEPT ont permis de constater que les filaments de byssus des deux genres de moules ont une structure semblable et que l'hydratation augmente la dynamique moléculaire. La déshydratation ne semble pas dénaturer les protéines, y compris la triple hélice du collagène. Le spectre RINEPT du byssus de *M. edulis* déshydraté ne présente pas de signaux car sa structure n'est pas assez mobile pour être détectée. Les expériences bidimensionnelles WISE ont montré que cette augmentation de la mobilité avec l'hydratation est uniforme pour toute la structure du byssus de *X. securis*. Par contre, pour *M. edulis*, elle est plus importante pour les carbones des chaînes latérales, comparativement à ceux du squelette. Les largeurs de bandes ^1H pour les deux byssus déshydratés sont caractéristiques d'une structure rigide et sans mouvement des chaînes latérales. Finalement, le temps de relaxation T_2 des carbonyles est plus faible pour le byssus hydraté des deux moules. Cette augmentation indique des mouvements moléculaires amples et rapides. La valeur de T_2 des fibres n'est pas proportionnelle à la largeur des pics des spectres, ce qui laisse à penser qu'il y aurait une augmentation du désordre de la structure moléculaire lors de la déshydratation des fibres. Il serait maintenant intéressant de réaliser des expériences 2D en ^{13}C - ^{13}C et ^{15}N - ^{13}C pour mieux comprendre la structure des fibres de *X. securis*. Par contre, pour réaliser ce type d'analyses, il est impératif d'enrichir la fibre en ^{13}C et ^{15}N . Pour mieux comprendre l'effet de la déshydratation, celle-ci pourrait être réalisée directement dans l'appareil pour la suivre étape par étape, et ainsi obtenir un spectre RMN pour plusieurs taux d'hydratation des fibres.

Le magnésium des fibres étant substitué en partie par le calcium à l'été, il serait intéressant de déterminer si les propriétés mécaniques de biomatériaux à base de byssus sont modifiées en les réticulant avec du calcium et du magnésium. De plus, déterminer l'état d'oxydation des métaux dans les tissus permettrait de mieux comprendre leur toxicité ainsi que leur rôle dans l'organisme. Par contre, un composé

peut être toxique pour l'homme sans l'être pour la moule. Ainsi, des travaux pourraient également porter sur la toxicité de composés contenant des métaux lourds chez la moule. Cette étude ouvre la porte vers des recherches pour mieux comprendre les effets toxiques de certains composés chez la moule, ainsi que mieux déterminer la structure et les propriétés mécaniques de biomatériaux à base de byssus.

ANNEXE A

AUTRE CONTRIBUTION SCIENTIFIQUE EFFECTUÉE DANS LE CADRE DU STAGE DE MAÎTRISE

- A.1 Résumé long publié dans Aquaculture Association of Canada Special Publication (2012) Numéro 20, 59-62

- A.2 Article publié dans Biomacromolecules (2013) Volume 14, 132-141

Contenu en métaux et marquage isotopique au ¹³C du byssus de la moule bleue, *Mytilus edulis*



M.-O. Séguin Heine¹, A. A. Arnold¹, A. Leblanc¹, L. Sleno¹, B. Myrand², R. Tremblay^{3*} & I. Marcotte^{1*}

¹Département de Chimie, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succ. Centre-Ville, Montréal (Québec), H3C 3P8, Canada

²MERINOV, Centre d'innovation de l'aquaculture et des pêches du Québec, 107-125 chemin du Parc, Cap-aux-Meules (Québec), G4T 1B3, Canada

³Institut des sciences de la mer de Rimouski (ISMER), Université du Québec à Rimouski, 310 allée des Ursulines, Rimouski (Québec), G5L 3A1, Canada, courriel: Rejean_Tremblay@uqar.qc.ca

*Auteurs de correspondance

Résumé

Pour éviter d'être emportée par les vagues ou les marées, la moule produit du byssus lui permettant de se lier à un substrat solide comme un rocher. Le byssus est un filament protéinique présentant des propriétés mécaniques intéressantes. En effet, la partie du byssus près de la moule, appelée partie proximale, est rugueuse et extensible à 200%¹. La partie la plus éloignée de la moule, appelée partie distale, est quant à elle lisse et rigide². Sa limite d'extension est d'environ 15% et son module de Young est de 500 MPa¹⁻². Pour mieux comprendre la structure moléculaire du byssus de la moule bleue lui conférant ses propriétés mécaniques exceptionnelles, la concentration en métaux a d'abord été déterminée. Nos résultats montrent que le byssus contient une grande concentration de fer et de calcium, et que la majorité des métaux présents sont trivalents. Une méthode de marquage du byssus au carbone-13 (¹³C) a également été réalisée pour déterminer la structure moléculaire du byssus par résonance magnétique nucléaire de l'état solide (RMN-ÉS). Cette étape est importante car seul l'isotope ¹³C du carbone est détectable par RMN. Le marquage s'est fait en nourrissant les moules avec des algues marquées au ¹³C.

Introduction

Les moules s'ancrent aux surfaces solides grâce à une série de fils appelée byssus dont les propriétés mécaniques particulières leur permettent de subir une forte déformation sans se casser. Il est connu que le byssus est formé de protéines riches en collagène appelées PréCol P (dans la partie proximale), PréCol D (distale) et PréCol NG (tout le long de la fibre)¹. Chaque PréCol est constitué d'un bloc central de collagène, flanqués de domaines qui seraient semblables à de l'élastine pour le PréCol-P, à de la fibroïne de soie pour le PréCol-D, et aux parois cellulaires des plantes pour le PréCol-NG¹. À l'extrémité de ces domaines particuliers se

trouve un bloc d'histidine¹. Les différents PréCols seraient reliés entre eux au niveau des histidines, par des métaux, principalement le fer.

Pour mieux comprendre la structure du byssus, nous avons tout d'abord étudié le contenu en métaux des fibres byssales de la moule bleue *Mytilus edulis* par spectrométrie de masse par torche à plasma (*inductively coupled plasma mass spectrometry*, ICP-MS). Afin d'obtenir des détails sur l'organisation moléculaire du byssus, nous avons utilisé la RMN-ÉS bidimensionnelle du carbone-13. Cette technique de choix permet d'identifier les domaines conformationnels dans lesquels se trouvent les différents acides aminés constituant la

fibre. Le ^{13}C est le seul isotope détectable par RMN car le spin (I) de son noyau est non nul ($I = \frac{1}{2}$). Puisque l'abondance naturelle du ^{13}C n'est que de 1,1%, il faut donc enrichir le byssus en ^{13}C afin de l'analyser de façon efficace par RMN-ÉS. Nous avons donc établi un protocole d'assimilation en ^{13}C pour *M. edulis* au moyen de microalgues commerciales *Chlorella* enrichies en ^{13}C .

Matériel et méthodes

Analyses des métaux

Des moules ont été mises à l'eau dans des cages aux Îles-de-la-Madeleine pendant un mois en octobre 2010. La composition en métaux de la partie proximale et distale du byssus a été déterminée ainsi que celle du manteau, des branchies et de la glande digestive. Le byssus a été hydrolysé dans une solution de HNO_3 et de H_2O_2 à 60°C pendant environ 1h. L'analyse a été réalisée par spectrométrie de masse par torche à plasma (ICP-MS) avec un Agilent 7500c avec micro-nébuliseur.

Marquage isotopique du byssus

Pour marquer le byssus, des moules ont été nourries avec un mélange d'algues, soient *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis oculata*, *Pavlova lutheri* et des *Chlorella* commerciales marquées au ^{13}C (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA). Puisque *Chlorella* est une algue d'eau dou-

ce, nous avons observé qu'elle doit obligatoirement être mélangée à des algues d'eau de mer pour être assimilée. Les moules sont nourries pendant 2 jours avec le mélange d'algues. Après cette période d'assimilation, les moules sont placées dans un second aquarium et nourries avec des algues non marquées. Les byssus ont été récoltés et analysés aux deux jours pendant 30 jours. Le pourcentage de marquage a été déterminé par spectrométrie de masse³. Pour ce faire, le byssus est d'abord hydrolysé dans une solution de HCl 6N à 110°C pendant 24h. Le HCl est ensuite évaporé. Les acides aminés sont dérivés à l'aide du 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) avant d'être analysés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplée à un spectromètre de masse à triple quadripôle (MS/MS).

Résultats et Discussion

Analyse des métaux

La concentration en métaux du manteau, des branchies, de la glande digestive et des parties proximale et distale du byssus de la moule bleue déterminée par ICP-MS est présentée dans le Tableau 1.

Les résultats montrent que la majorité des métaux présents dans le byssus de *M. edulis* sont trivalents

Tableau 1. Concentration, en ppm, de différents métaux dans le manteau, les branchies, la glande digestive ainsi que les parties proximale et distale du byssus de la moule bleue, *Mytilus edulis*

Métal	Concentration (ppm) dans les tissus				
	Manteau	Branchies	Glande digestive	Byssus-Proximal	Byssus-Distal
Ca	1312 ± 301	3837 ± 1192	2735 ± 1196	3739 ± 1057	3441 ± 666
B	< 0,01	< 0,01	< 0,01	84,1 ± 14,4	37,9 ± 3,6
Al	0,2 ± 0,4	10,7 ± 18,2	97,2 ± 83,1	215,4 ± 62,2	185,0 ± 50,4
Ti	24,3 ± 4,5	20,3 ± 1,8	23,1 ± 3,1	7,8 ± 4,9	8,5 ± 4,7
V	0,3 ± 0,1	0,9 ± 0,2	4,0 ± 1,1	44,4 ± 8,8	27,8 ± 8,0
Mn	5,40 ± 1,5	11,5 ± 2,0	16,8 ± 6,4	38,3 ± 16,5	27,1 ± 11,2
Fe	84,0 ± 16,7	183 ± 60	584 ± 342	530 ± 276	446 ± 235
Ni	0,1 ± 0,1	0,9 ± 0,2	7,5 ± 1,9	8,6 ± 1,5	14,3 ± 3,1
As	11,0 ± 2,5	13 ± 2	26,2 ± 10,6	3 ± 1	2,3 ± 0,8
Pb	0,20 ± 0,08	1,0 ± 0,7	1,3 ± 0,4	16,4 ± 22,3	8,1 ± 13,4
U	< 0,01	< 0,01	0,02 ± 0,03	4 ± 1	3 ± 1

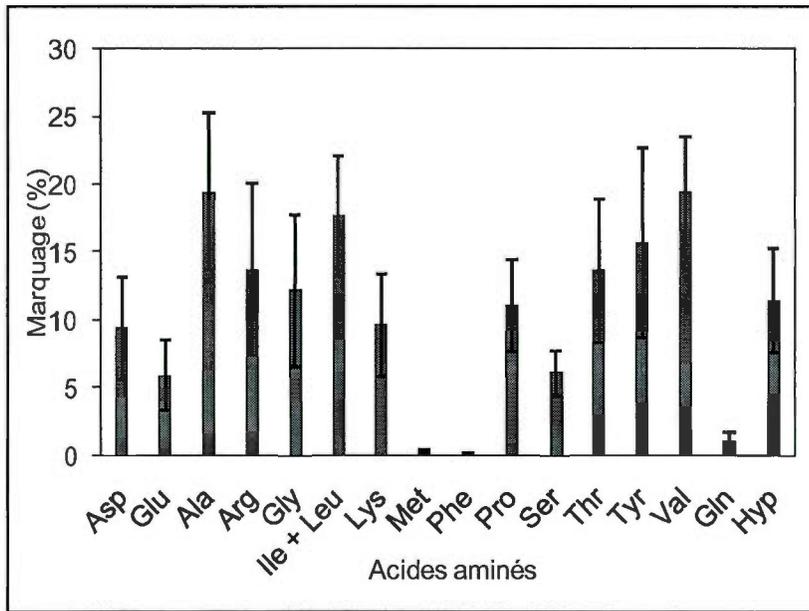


Figure 1. Pourcentage de marquage des acides aminés du byssus. 2 jours d'alimentation et récolte 5 jours plus tard. Seuls les acides aminés complètement marqués sont considérés.

(B, Al, Ti, V, Mn, Fe, Ni). En particulier, une grande concentration en fer et calcium est retrouvée dans le byssus, en accord avec la littérature et le rôle du Fe⁺³ dans la structure du byssus⁴. Les fibres montrent également la présence d'uranium et de plomb qui sont par contre retrouvés en très faible quantité dans les autres tissus. Il serait donc possible de supposer que la moule utilise son byssus pour se décontaminer. Par contre, ceci n'est pas applicable à l'arsenic qui est en plus grande quantité dans les autres tissus comparativement au byssus. Enfin, les métaux suivants dans les fibres: Al, V, Fe, Ni et Cu semblent provenir de la nourriture de l'animal (via la glande digestive) plutôt que l'eau puisqu'ils sont en faible concentration dans les branchies et le manteau.

Marquage isotopique du byssus

Le marquage isotopique optimal du byssus de *M. edulis* a été obtenu 5 jours après la fin de la période d'alimentation en algues enrichies au ¹³C. La Figure 1 présente le pourcentage de marquage en ¹³C des acides aminés 5 jours après la période d'alimentation.

Le pourcentage de marquage prend seulement en compte les acides aminés complètement marqués, c'est-à-dire ceux dont tous les carbones sont des ¹³C. Afin d'obtenir de l'information structurale sur les protéines par RMN, tous les carbones des

acides aminés doivent être des ¹³C. Nos résultats obtenus avec le protocole d'enrichissement isotopique du byssus montrent que la majorité des acides aminés essentiels à la moule sont marqués au ¹³C, i.e. Thr, Val, Met, Ile, Phe, Lys, His, Arg, Trp et Pro⁵. Les acides aminés les plus marqués sont l'alanine et la valine à près de 20%.

L'enrichissement en ¹³C obtenu pour le byssus de *M. edulis* permet de raccourcir les analyses de RMN d'un facteur 4 comparativement à un byssus non marqué. Cette diminution du temps d'analyse offre donc la possibilité d'effectuer des expériences de RMN bidimensionnelles qui peuvent donner des informations sur la structure moléculaire et la dynamique de la fibre.

Conclusion

Plusieurs métaux se retrouvent dans le byssus de la moule bleue, le fer et le calcium étant les plus concentrés. Nous vérifions actuellement la corrélation entre la concentration en métaux et les propriétés mécaniques du byssus. Les spectres de RMN-¹³C 2D obtenus grâce au marquage isotopique atteint par le protocole d'assimilation développé dans nos laboratoires permettra d'avoir plus d'information sur l'organisation moléculaire de la fibre.

Remerciements

Soutien financier et technique: CRSNG, FCI, RAQ, Merinov, Moules de Culture des Îles Inc., N. Gauthier et J.-B. Nadalini.

Références

1. Harrington MJ, Waite JH. 2007. Holdfast heroics: comparing the molecular and mechanical properties of *Mytilus californianus* byssal threads. *J. Exp. Biol.* 210: 4307-4318.
2. Hagenau A, Scheidh HA, Sperpell L, Huster D, Scheibel T. 2009. Structural analysis of proteinaceous components in byssal threads of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Macromol. Biosci.* 9: 162-168.
3. Mitrea N, LeBlanc A, St-Onge M, Sleno L. 2010. Assessing covalent binding of reactive drug metabolites by complete protein digestion and LC-MS analysis. *Bioanalysis.* 2: 1211-1221.
4. Holten-Andersen N, Mates TE, Toprak MS, Stucky GD, Zok FW, Waite JH. 2009. Metals and the integrity of a biological coating: the cuticle of mussel byssus. *Langmuir.* 25: 3323-3326.
5. Brown MR. 1991. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 145: 79-99

Solid-State NMR Structure Determination of Whole Anchoring Threads from the Blue Mussel *Mytilus edulis*

Alexandre A. Arnold,[†] Frédéric Byette,[‡] Marc-Olivier Séguin-Heine,[†] André LeBlanc,[†] Lekha Sleno,[†] Réjean Tremblay,[§] Christian Pellerin,[‡] and Isabelle Marcotte^{*,†}

[†]Department of Chemistry, Université du Québec à Montréal, P.O. Box 8888, Downtown Station, Montreal, Canada H3C 3P8

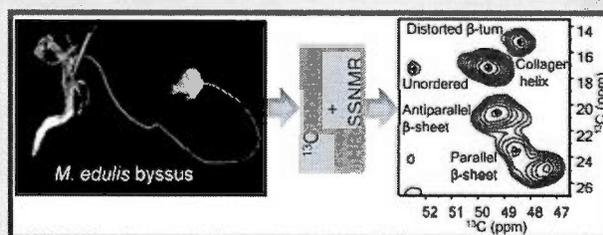
[‡]Department of Chemistry, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Downtown Station, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

[§]Institut des Sciences de la Mer de Rimouski, Université du Québec à Rimouski, 310 allée des Ursulines, Rimouski, Canada G5L 3A1

Supporting Information

ABSTRACT: The molecular structure of the blue mussel *Mytilus edulis* whole anchoring threads was studied by two-dimensional ¹³C solid-state NMR on fully labeled fibers. This unique material proves to be well ordered at a molecular level despite its heterogeneous composition as evidenced by the narrow measured linewidths below 1.5 ppm. The spectra are dominated by residues in collagen environments, as determined from chemical shift analysis, and a complete two-dimensional assignment (including minor amino acids)

was possible. The best agreement between predicted and experimental backbone chemical shifts was obtained for collagen helices with torsion angles (−75°, +150°). The abundant glycine and alanine residues can be resolved in up to five different structural environments. Alanine peaks could be assigned to collagen triple-helices, β-sheets (parallel and antiparallel), β-turns, and unordered structures. The use of ATR-FTIR microscopy confirmed the presence of these structural environments and enabled their location in the core of the thread (collagen helices and antiparallel β-sheets) or its cuticle (unordered structures). The approach should enable characterization at the molecular level of a wide range of byssus macroscopic properties.



INTRODUCTION

In the marine environment, the settlement ability of mussels depends on the secretion of byssus promoting attachment to surfaces. The mechanical properties of these beard-like collagenous fibers are tuned to the pressure of the animals' environment. Mussels usually reside in intertidal rocky zones where current, tides, and waves are a major threat of dislodgment.^{1–3} The water movement can exert acceleration, lift, and drag forces that depend on the season and exposition of the shore. Therefore, under such conditions, sessile organisms like mussels need reliable holdfasts to ensure their survival.

Byssus filaments are formed in the groove located in a retractile organ of the mussel called “foot” by a process similar to the injection-molding of polymers. This processing differs from the formation of dragline silk, which is spun through a spinneret.⁴ The mussel's byssus is composed of a stem that supports 20–60 threads⁵ (Figure 1a). Each thread can be divided into three distinct regions, that is, an initial corrugated and elastic proximal part (Figure 1b) followed by a smooth and stiff distal segment (Figure 1c) ending with the plaque that glues the animal to the substrate.

Byssal threads have an extensibility close to that of elastin and are six times tougher than tendons.^{6–8} They are complex biopolymers essentially composed of proteins (95% by weight).⁹ The fiber core is composed of three pepsin-resistant proteins called PreCol-P, PreCol-D, and PreCol-NG,⁷ as

illustrated in Figure 1d. Each of these proteins is composed of a collagen center-flanked by elastin-like (PreCol-P), silk-like (PreCol-D), or plant cell wall-like (PCW) (PreCol-NG) regions according to sequence homologies. These flanking regions are preceded and followed by histidine-rich domains. In addition, the Precols are initiated by short signal peptide sequences and the collagen domains are followed by acidic patches. The preCols are gradually distributed along the fiber. While PreCol-P concentration is maximal near the stem and disappears at the middle of the byssus, PreCol-D progressively increases from the stem up to the plaque. The PreCol-NG concentration is constant along the fiber,⁷ but its relative amount with respect to the other PreCols is not known. According to the primary amino acid sequence of the byssal proteins, PreCols account for 92–96% of the distal region and 66–72% of the proximal region.^{9,10}

Atomic force microscopy (AFM) studies showed that the collagen core of the fiber is composed of 6 + 1 collagen helices that form banana-shaped bundles in byssal threads of *Mytilus galloprovincialis*.¹¹ These central bent collagen domains are assembled to form the fiber via metal cross-linking of adjacent histidine-rich domains.¹² The remaining fiber is made of thread

Received: September 22, 2012

Revised: October 28, 2012

Published: November 19, 2012

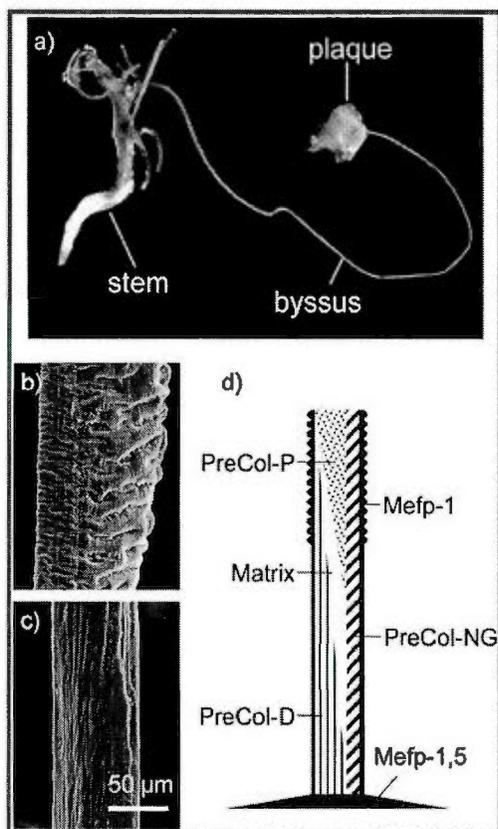


Figure 1. *Mytilus edulis* whole byssus, including stem and plaque (a), proximal part (b), and distal part (c). Schematics of protein distribution along the thread (d).

matrix proteins PTMP-1 (proximal)¹³ and TMP (distal).¹⁴ Finally, the fiber is coated by a 2–5 μm thick cuticle composed of the protein mefp-1 (*Mytilus edulis* foot protein), which is rich in dihydroxyphenylalanine residues (DOPA). Metal cross-linking of DOPA residues further enhances the toughness of the byssal threads.¹⁵

The molecular structure of the byssus protein domains in the core and coating needs to be ascertained experimentally. Furthermore, the molecular organization of the byssus that confers its outstanding mechanical properties is still not well understood. In this work, we have thus applied high-resolution solid-state nuclear magnetic resonance (SS-NMR) spectroscopy to characterize the byssus proteins at a molecular level. To do so, we have established a labeling protocol to obtain ¹³C-enriched byssus by feeding blue mussels *Mytilus edulis* with isotopically labeled microalgae, the main food source for this species. One-dimensional SS-NMR has been previously employed to study single cross-linking mechanisms in byssal threads by specific labeling¹⁶ or to address the dynamics in unlabeled material.¹⁷ In contrast to these studies that provide general information about the byssus structure, ¹³C-labeled byssal threads allow us to study the molecular environment of each amino-acid residue in the whole threads. The SS-NMR results are complemented by FTIR microscopy experiments allowing structural elements in the core and the coating of the byssal threads to be distinguished.

MATERIALS AND METHODS

Byssus Labeling and Isotope Enrichment Determination. A nonspecific ¹³C labeling of the byssal proteins was achieved by feeding the mussels with commercially available uniformly ¹³C-labeled (98%+) lyophilized freshwater algae *Chlorella vulgaris* (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Andover, U.S.A.). Five mussels *Mytilus edulis* of 62.2 ± 3.8 mm from Magdalen Islands (Quebec, Canada) were kept in 40 L seawater tanks at 16 °C. They were fed a daily mixture of 0.24 g of *C. vulgaris* mixed with 20000 cells mL⁻¹ (total of 0.059 mg) of marine phytoplankton mixture composed of *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana*, and *Pavlova lutheri* algae (1:1:1) for two days. During this labeling period, the water tanks were placed in recirculating mode with bubbling to ensure water oxygenation and 70% of the water volume was replaced each day with water at 16 °C filtered on 1 μm filters. After this initial feeding period, the mussels were placed in demountable pierced plastic spheres suspended in 180 L tanks and fed 50 mL of Nutrocéan cocktail per day. Byssus threads were severed from the stem on a daily basis. To improve byssal production, a starfish and a crab were placed at the bottom of the tank.

Labeling efficiency and kinetics were determined by mass spectrometry following the protocol of LeBlanc et al.¹⁸ The percentage of labeling was determined by dividing the area of the fully labeled peak (ex: MH⁺ + ¹³C₂ for glycine, MH⁺ + ¹³C₃ for alanine, etc.) and dividing by the sum of all possibilities (MH⁺, MH⁺ + ¹³C₁, MH⁺ + ¹³C₂ for glycine). The results are shown in Supporting Information, Figure S1. The isotopic enrichment peaked five days after the 48 h of ¹³C-*Chlorella* feeding. Average full labeling percentages varied between 2.4% for serine and 9.1% for valine. The most abundant amino acids were fully labeled at 6.0% (glycine and proline) and 8.1% (alanine).

Solid-State NMR and Chemical Shift Prediction. All spectra were recorded at the National Ultra-high-field NMR Facility for Solids in Ottawa (Canada) on a Bruker (Milton, ON, Canada) Avance II spectrometer operating at frequency of 899.95 MHz for ¹H and 226.35 MHz for ¹³C using a triple resonance 4 mm HCN magic-angle spinning (MAS) probe and a spinning frequency of 15 kHz. All spectra were initiated by a 2 ms long ramped cross-polarization with radio frequency fields of 50 kHz on ¹³C and 65 kHz on ¹H with a 15% ramp. ¹³C homonuclear recoupling was performed under dipolar-assisted rotary resonance (DARR)¹⁹ conditions during mixing times of 20, 50, and 150 ms. The signal was finally detected under ¹H decoupling using TPPM at 100 kHz.²⁰ A 3 s recycle delay was used and 48 scans were accumulated for each of the 256 increments in the indirect dimension. The temperature was maintained at 1 °C resulting in an approximate sample temperature of 15 °C due to sample spinning. Samples consisted of whole byssal threads from which the stem and the plaque were severed and were rinsed in nanopure water before measurement. Note that the use of nanopure water instead of seawater (which high salt content could interfere with the NMR measurement) has been shown to only have a minor effect on byssal threads.²¹ Approximately 20 mg of hydrated byssal threads were packed in a 4 mm sealed rotor with an excess of water resulting in equal masses of water and dry byssus in the rotor. Samples were weighted before and after the NMR experiments to ensure that they remained fully hydrated throughout the study. Spectra processing and peak assignment were carried-out using the NMR Pipe package.²² All spectra were externally referenced with respect to TMS by setting adamantane's downfield peak at 38.23 ppm. Type I rat tendon collagen was purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada) and used without further purification.

Chemical shift prediction of collagen regions was performed by first creating a fictitious protein composed of all central collagen domains of the three PreCols as determined by Waite et al.⁷ or proteins corresponding to the isolated silk-like or plant cell wall-like flanking domains. These fictitious proteins were first generated in an extended conformation and then the desired torsion angles were imposed and the corresponding PDB files generated using dedicated scripts from the Xplor suite. These last files constituted the input to the ShiftX program, which predicts chemical shifts from atomic coordinates.²³ A statistical analysis of the ShiftX results was then carried out using

dedicated Matlab scripts in order to determine the most abundant chemical shifts (Supporting Information, Figure S2).

Infrared Microscopy Imaging of Individually Sectioned Byssus Threads. Byssus distal parts were manually split along the longitudinal direction under a reflection microscope and subsequently fixed on a glass slide. FTIR spectroscopy analyses of the cross sections were performed in attenuated total reflectance (ATR) mode using a germanium hemispherical internal reflection element (IRE). The IRE was fixed to a Varian UMA 600 microscope coupled to a Digilab FTS 7000 FTIR (Randolph, MA) equipped with a 32×32 pixels ($1.4 \mu\text{m}/\text{pixel}$) focal plane array detector. Both background and sample acquisitions consisted of 512 scans with a 4 cm^{-1} spectral resolution. To emphasize spectral differences between the sheath and the core of the fiber, the resulting ATR-FTIR image was processed using Matlab to represent spatial variation of the peak position of the amide I band. Finally, Grams AI software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) was employed to average 40 spectra of each region (core and sheath). Results were smoothed using a 9 point Savitzky-Golay algorithm, and the secondary structure components within the amide I band in both regions were determined using peak fitting techniques. Characteristic spectra and peak fitting examples are given as Supporting Information, Figures S3 and S4.

RESULTS

Relative Occurrence of the Amino Acid Residues in Specific Domains. The primary sequence of *M. edulis* byssus proteins has been reported by Waite and co-workers;⁷ therefore, we have first evaluated the possibility of resolving various environments of the byssus threads using the relative occurrence of each amino acid residue within a specific domain (collagen, silk-type, matrix, etc.). This sequence analysis was also carried out to facilitate the NMR resonances assignment. The calculation, which is detailed in Supporting Information, is based on the established model,⁹ relative lengths of proximal and distal parts,^{10,24} and considers an average thread thickness of $100 \mu\text{m}$ and a cuticle thickness of $4 \mu\text{m}$. The results are reported in Table 1. Finally, if the PCW contribution is assumed to be 10%, the relative occurrence of each amino acid type in a given domain can be calculated and the result is shown in Figure 2a.

Table 1. Estimation of the Relative Proportions of Protein Domains in the Byssus of *M. edulis*

byssus domain	proportion (%)
collagen	42
signal	2
histidine	11
acidic	3
flanking	22
cuticle proteins	<15
thread matrix proteins	<5

Solid-State NMR of Whole Byssal Threads. To enrich the mussel byssus with ^{13}C and increase the signal-to-noise of the NMR spectra, a feeding protocol was developed using a mixture of labeled and unlabeled microalgae. The uptake of ^{13}C -enriched food by the mollusks allowed reaching maximum labeling levels of 9% in the byssus depending on the amino acid residues (Supporting Information). Because of the high collagen content of the byssus, we have first compared the cross-polarization spectra of ^{13}C -labeled byssus and natural abundance rat tendon collagen (Figure 2B). As can be seen from the superposition, the one-dimensional (1D) spectrum of byssal threads is very similar to that of collagen. However, some

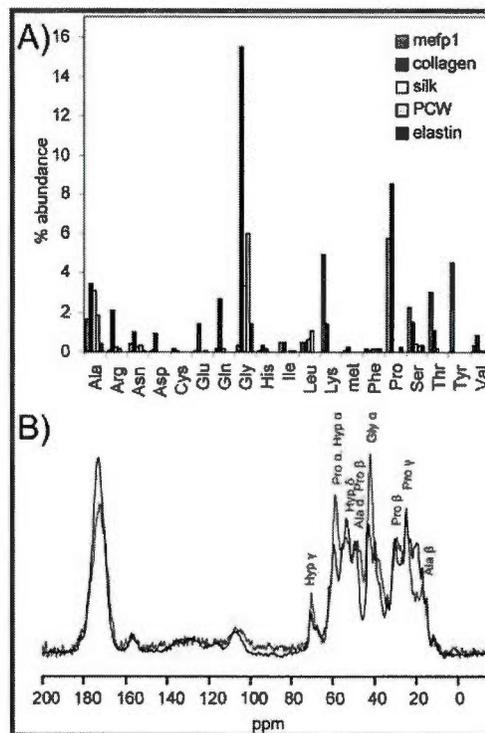


Figure 2. Calculated amino acid relative abundance in each type of specific domain for byssus threads (histidine-rich and matrix domains are excluded for clarity). Cross-polarization ^{13}C spectra of hydrated byssal threads (black) and type I rat tendon collagen (red), contact time of 2 ms, and 10 kHz spinning frequency.

resonances have different intensities such as those conventionally assigned in collagen to Gly C_{ω} , Pro C_{ω} , and Hyp C_{α} and C_{γ} .²⁵ These intensity differences can be explained by the relative abundance of each of these amino acids in the two materials and cannot be related to different labeling levels because the peak intensities are similar on the natural abundance spectra of labeled and unlabeled byssus (not shown). Figure 2B shows additional resonances for the byssus when compared to collagen; therefore, differences in resonance intensities for collagen-related residues due to resonance overlap cannot be ruled out. A multidimensional approach was thus necessary to first resolve and unambiguously assign the resonances for each amino acid type and to second assign each of these resonances to a specific byssus domain. Once the resonances are assigned, their chemical shift values can be interpreted in terms of structure.²⁶

The ^{13}C -labeling levels attained with our enrichment protocol enabled the acquisition of high-resolution 2D ^{13}C NMR spectra. More specifically, ^{13}C - ^{13}C correlation spectra were recorded using a DARR sequence at a MAS frequency of 15 kHz on a 900 MHz spectrometer. Considering the maximum byssus labeling level of 9% and the relatively short mixing times (20, 50, and 150 ms), the spectra are dominated by intraresidue spin correlations and can thus be used for assignment. This is confirmed by the fact that no additional crosspeaks could be detected when the mixing time was increased. As shown in Figure 3, the spectra present an excellent resolution with full widths at half height below 1.5 ppm. No notable increase in resolution was observed between spectra acquired at 14.1 (not shown) and 21.2 T. The observed

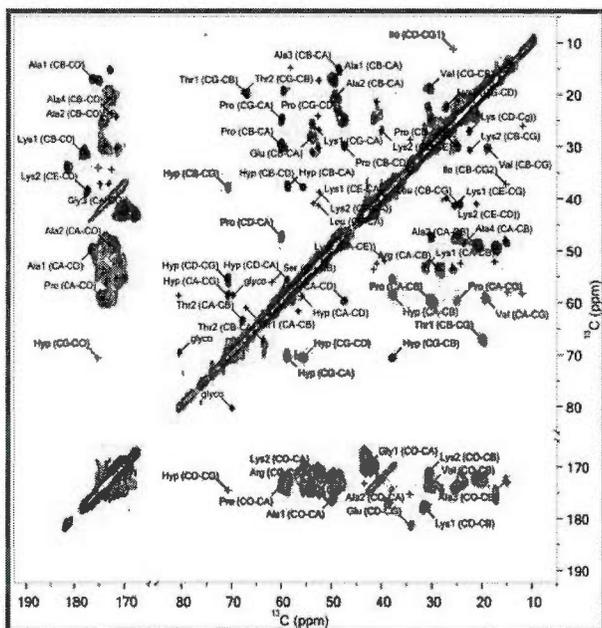


Figure 3. ^{13}C – ^{13}C dipolar correlation spectra obtained with 50 ms DARR at 15 kHz MAS showing the assignment of main peaks.

linewidths are therefore inhomogeneous and most likely result from a small distribution in isotropic chemical shifts. Indeed, linewidths in the 1.5–2.5 ppm range are characteristic of well-ordered noncrystalline solids;²⁷ the presence of large conformational distributions can thus be ruled out.

Interestingly, chemical shift correlations were detected in the region from 70 to 110 ppm, a chemical range which is classically assigned to glycosylated moieties or polysaccharides. To our knowledge, only the thread matrix protein PTMP1 has been reported to be glycosylated.¹³

Because of the high spectral resolution, connectivities within the spin systems of the dominant amino acid residues could be unambiguously assigned. Tables 2 and 3 list the experimental backbone chemical shift values compared to the closest literature values. They also include the chemical shift predictions performed with the program ShiftX²³ using a fictitious protein composed of the central collagen domains of the three PreCols⁷ or proteins corresponding to the silk-like or PCW-like flanking domains. An average chemical shift difference $\Delta\delta_{\text{lit}}$ to the literature or predicted chemical shift values $\Delta\delta_{\text{pred}}$ is also provided. $\Delta\delta_{\text{lit}}$ is defined as

$$\Delta\delta_{\text{lit}} = [|(\delta C_{\alpha}^{\text{exp}} - \delta C_{\alpha}^{\text{lit}})| + |(\delta C_{\beta}^{\text{exp}} - \delta C_{\beta}^{\text{lit}})| + |(\delta \text{CO}^{\text{exp}} - \delta \text{CO}^{\text{lit}})|] / 3$$

First, the observed chemical shifts for the most intense glycine, alanine, and proline peaks reported in Table 2 are close to those previously assigned to polyglycine 3_1 -helices,²⁸ collagen tendon,²⁹ and (Pro-Ala-Gly)_n triple helices,²⁹ respectively. They also show very good agreement with the peak positions predicted for a collagen triple helix, as detailed below. Interestingly, the difference between the chemical shifts of prolines' C_{β} and C_{γ} is 5.1 ppm, indicating that these residues are in the *trans*-conformation,³⁰ as expected in a collagen triple-helix. The only existing ^{13}C chemical shift literature values of hydroxyproline,²⁹ which were obtained for (Hyp)_n 3_1 -helices, strongly deviate ($\Delta\delta_{\text{lit}} = 1.4$ ppm) from our experimental data.

Our Hyp chemical shifts, however, are in very close agreement to those obtained for a mefp-1 model peptide solubilized in DMSO whose structure was identified as a left-handed polyproline II (PPII) helix,³¹ a folding closely related to collagen triple helices.³²

The remaining byssus spin systems could be identified as belonging to arginine, glutamic acid, valine, isoleucine, serine, lysine, threonine, and leucine residues, as detailed in Table 2. Due to the lack of 2D NMR spectra of solid collagen in the literature, there is, to our knowledge, no unambiguous assignment for the resonances of its minor amino acids. To confirm the assignment of the byssus cross peaks and refine the structure of the collagen domains by specifying their dihedral angles, we have thus proceeded to chemical shift predictions using the software ShiftX.²³ This was done by varying torsion angle pairs for the fictitious collagen protein. This approach is becoming widespread and its accuracy has been tested in the solid state.³³ An excellent agreement ($\Delta\delta_{\text{pred}} \leq 0.5$ ppm) was obtained for Gly, Ala, Pro, Arg, Glu, Val, and Ile (C_{ω} , C_{β} , C') for a torsion angle pair (Φ, Ψ) of ($-75^{\circ}, +150^{\circ}$) expected for a collagen triple helix.³⁴ A good agreement was obtained for C_{α} and C_{β} carbons of serine with the same dihedral angles, but the carbonyl resonance could not be detected. In all cases, the strongest deviation between experimental and predicted chemical shifts was for CO resonances, but it should be noted that the accuracy of ShiftX predictions is lower for carbonyls.²³

Stronger deviations ($\Delta\delta_{\text{pred}} \geq 1.0$ ppm) from the ideal collagen triple helix prediction are observed for lysine, threonine, and leucine. Interestingly, both lysine and threonine are more abundant in the coating of the byssus and leucine residues are mostly found in PCW and silk-like domains, as compared to collagen (Figure 3a). These amino acids will thus be examined individually, but the most abundant amino acid residues will first be explored.

As expected from the primary sequence analysis of *M. edulis* byssus, the 2D ^{13}C NMR spectrum is dominated by residues from collagen, the most abundant protein in the anchoring threads. Remarkably, glycines can be resolved in up to three environments. By comparison to literature values, the three pairs of Gly chemical shifts can be assigned to (Gly)_n or (Ala-Gly-Gly)_n 3_1 -helices as well as collagen fibrils (see Table 3). The second and third most abundant structural elements for glycine in the mussel byssus, namely, PCW and silk-like domains, are therefore apparently not detected. However, this could be due to spectral overlap, indeed, due to the small variation of glycine chemical shifts with structure,³⁵ the experimental values could also be consistent with β -sheet and even random-coil values (Table 3). Indeed, literature chemical shifts for glycines in an ideal β -strand or random coil are reported to be (43.3, 170.6 ppm) and (43.6, 172.0 ppm),³⁶ respectively, and would thus not be resolvable from the dominant collagen peaks at (42.7, 169.9 ppm) and (43.4, 171.9 ppm) considering the observed line widths.

More structural information can be gained, however, from alanine's carbons, which have a much stronger chemical shift dependence upon structure. Five different alanines could be detected on the byssus high-resolution spectrum as seen from the C_{α} – C_{β} cross peaks shown in Figure 4 (chemical shifts reported in Table 3). A cross peak (Ala2) almost as intense as Ala1 assigned to the collagen triple helix corresponds to a spin system with chemical shift values of (49.2, 20.7, 172.7 ppm). These fall extremely close to those reported for spider dragline

Table 2. Experimental Backbone ^{13}C Chemical Shifts (δ), Best Agreement to Literature Values (lit.), Predicted Chemical Shift (ShiftX), Average Chemical Shift Difference to the Literature ($\Delta\delta_{\text{lit}}$) or Predicted ($\Delta\delta_{\text{pred}}$) Values for Backbone Resonances in a Collagen Triple Helix^a

residue	atom	δ	lit.	$\Delta\delta_{\text{lit}}$	structural motif related to the literature values	Shift X (-75,+150)	$\Delta\delta_{\text{pred}}$
Gly1	C α	42.7	42.9	0.6	(Gly) _n 3 ₁ helix ²⁶	42.5	0.2
	C'	169.9	168.9			170.0	
Ala1	C α	49.6	50.3	0.8	collagen tendon ²⁷	49.7	0.2
	C β	17.2	16.4			17.3	
	C'	176.2				175.9	
Pro	C α	59.8	59.6	0.5	(Pro-Ala-Gly) _n triple helix ²⁷	59.8	0.3
	C β	30.1	29.5			30.3	
	C'	173.9	173.1			174.7	
Hyp	C α	58.7	58.3	0.2	model decapeptide PPII helix ²⁹	n.a.	n.a.
	C β	37.8	37.8				
	C'	174.9					
Arg	C α	53.7	54.5	0.4	random coil ³⁴	53.7	0.3
	C β	28.3	28.7			28.5	
	C'	174.2	174.1			174.8	
Glu	C α	54.0	55.0	0.6		53.6	0.4
	C β	28.4	28.3			28.6	
	C'	175.3	174.5			174.8	
Val	C α	59.3	60.1	0.7		59.1	0.5
	C β	30.4	30.8			30.5	
	C'	173.5	173.7			174.6	
Ile	C α	58.1	59.1	0.7		58.7	0.6
	C β	37.2	36.7			36.8	
	C'	173.1	173.6			173.9	
Ser	C α	56.4	56.5	0.2		55.5	0.7
	C β	61.7	62.1			62.2	
	C'	n.a.	172.6			172.6	
Lys1	C α	53.6	54.7	1.7		54.5	1.2
	C β	31.4	30.9			31.5	
	C'	178.0	174.4			175.3	
Lys2	C α	52.4	54.7	1.9		54.5	2.4
	C β	30.5	30.9			31.5	
	C'	171.3	174.4			175.3	
Thr1	C α	61.0	59.7	1.2		59.8	1.1
	C β	67.0	68.2			66.0	
	C'	n.a.	172.8			172.7	
Thr2	C α	63.4	63.7	0.5	α -helix ³⁴		
	C β	67.7	67.0				
	C'	n.a.	174.0				
Leu	C α	52.6	52.2	1.0	β -sheet ³⁴	52.6	1.0
	C β	41.1	41.9			39.5	
	C'	171.7	173.7			173.3	

^aAll values in ppm. Only dominant glycine and alanine peaks are reported, their less intense resonances are listed in Table 3.

silk (49.2, 20.9, 172.6 ppm),³⁷ which forms antiparallel β -sheets. The best agreement between predicted and experimental chemical shifts is, in this case, obtained for a torsion angle pair (Φ, Ψ) of (-140°, +170°), yielding chemical shifts of (48.8, 20.6, 172.6 ppm), which compare well to standard values (48.6, 20.6, 173.7 ppm) for antiparallel β -sheets (-142°, +145°).²⁹ As reported by Asakura et al.,³⁸ parallel and antiparallel β -sheets cannot be unambiguously distinguished from ^{13}C chemical shifts solely. However, differences in T_1 longitudinal relaxation times have been reported between parallel and antiparallel β -sheets with T_1 values being consistently shorter in antiparallel structures.^{37,38} Holland et al.³⁷ reported T_1 values of 690 and 1040 ms for antiparallel and parallel β -sheets in silk, respectively. We measured a T_1 value of 670 ms (at a field of 14.1 T) for alanine C β (20.7 ppm), which

would support the presence of antiparallel β -sheet structures. To further confirm this result, FTIR microscopy experiments were carried out and will be described later in the corresponding section.

The third and fourth most intense alanine C α -C β cross peaks have chemical shifts of (48.2, 15.2, 172.8 ppm) for Ala3 and (48.6, 23.6, 172.8 ppm) for Ala4. According to literature values, Ala3's set of chemical shifts could be assigned to collagen triple helices³⁹ or β -turns also reported in silk,⁴⁰ with a $\Delta\delta_{\text{lit}}$ value of 0.9 in both cases. Ala4 chemical shift values are in excellent agreement ($\Delta\delta_{\text{lit}} = 0.3$) with alanines also found in spider dragline silk and assigned to parallel β -sheets.³⁷ No relaxation measurements could be performed to confirm this assignment due to strong spectral overlap. Finally, the least intense peak (Ala5) belongs to the chemical shift triplet (52.1,

Table 3. Experimental Backbone ^{13}C Chemical Shifts (δ), Best Agreement to Literature Values (lit.), Predicted Chemical Shift (ShiftX), Average Chemical Shift Difference to the Literature ($\Delta\delta_{\text{lit}}$) or Predicted ($\Delta\delta_{\text{pred}}$) Values for Glycine and Alanine Residues^a

residue	atom	δ	lit.	$\Delta\delta_{\text{lit}}$	structural motif	Shift X ^b	(Φ, Ψ)	$\Delta\delta_{\text{pred}}$
Gly1	C α	42.7	42.9	0.6	(Gly) _n 3 ₁ helix ²⁶	42.5	(-75,150)	0.2
	C'	169.9	168.9	0.8	β -sheet ³⁴	170.0		
			43.3			170.6		
Gly2	C α	43.4	43.0	0.3	(Ala-Gly-Gly) _n 3 ₁ helix ²⁷	43.3	(-75,150)	0.1
	C'	171.9	172.1	0.2	unordered ³⁴	172.0		
			43.6			172.0		
Gly3	C α	43.3	43.3	0.2	collagen fibril ²⁷			
	C'	167.8	167.4					
Ala1	C α	49.6	50.3	0.7	tendon collagen ²⁷	49.7	(-75,150)	0.2
	C β	17.2	16.4			17.3		
	C'	176.2				175.9		
Ala2	C α	49.2	49.2	0.1	antiparallel β -sheet ³⁵	48.8	(-140,170)	0.2
	C β	20.7	20.9			20.6		
	C'	172.7	172.6			172.6		
Ala3	C α	48.3	48.3	0.9	collagen triple helix ³⁷			
	C β	15.2	17.6					
	C'	172.8	173.1	0.9	distorted β -turn ⁴⁴			
Ala4	C α	48.6	48.7	0.3	parallel β -sheet ³⁵			
	C β	23.6	23.3					
	C'	172.8	172.2					
Ala5	C α	52.3	51.0	0.6	unordered ³⁴			
	C β	17.4	17.1					
	C'	175.4	175.6					

^aAll values in ppm. ^bThe chemical shift predictions for glycine residues with (Φ, Ψ) = (-75,150) are best described by a bimodal distribution yielding two (C α , C') pairs (Supporting Information, Figure S2).

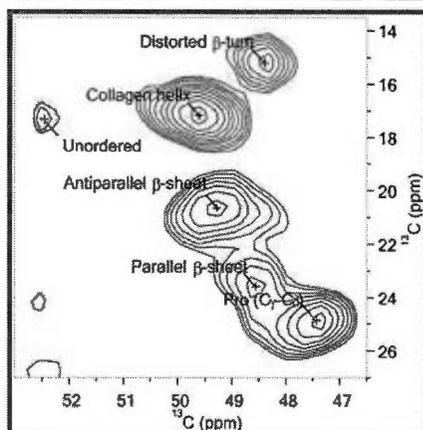


Figure 4. Alanine C α -C β cross peaks assigned to collagen triple helices, antiparallel or parallel β -sheets, distorted β -turns, and unordered structures.

17.1, 175.6 ppm) whose values are in good agreement with an unstructured environment (51.0, 17.2, 175.8 ppm) with $\Delta\delta_{\text{lit}}$ value of 0.6.

We then individually examined the case of the minor amino acids which are also abundant in other domains than collagen, namely, serine, threonine, lysine, and leucine. According to our relative abundance estimation (Figure 2a), serine residues are almost as abundant in the coating as in collagen regions. Only

one type of serine could be detected with chemical shifts (56.4, 61.7 ppm, CO undetected) falling closer to the random coil values (56.5, 62.1 ppm) than to those predicted by ShiftX (55.5, 62.2 ppm) for a collagen triple helix. The experimental values are, however, very close to both types of structure (unordered or collagen helix).

As shown in Figure 2a, both threonine and lysine should be more abundant in the coating than in collagen domains. Correspondingly, two different spin systems were detected for both amino acid types (Table 2). In the case of threonine, Thr1 and Thr2 have chemical shifts of (63.4, 67.7 ppm) and (61.0, 67.0 ppm). The latter falls closer to the predicted values (59.6, 66.3 ppm) for collagen, and its lower intensity is also consistent with this assignment. Thr1 chemical shifts are closer to α -helix values (63.7, 67.0 ppm).³⁶ However, threonine carbonyl chemical shifts could not be assigned and definite structural interpretation is therefore not possible. The two sets of lysines that could be detected have rather unusual backbone chemical shifts. The most intense triplet Lys1 (53.6, 31.4, 178.0 ppm) falls closer to the predicted chemical shifts for the ideal collagen helix at (54.5, 31.5, 175.3 ppm) than to any other structure, while Lys2 chemical shifts (52.4, 30.5, 171.3 ppm) do not match closely those of any well-defined structural environment. The chemical shifts assigned to leucine's spin system (52.6, 41.1, 171.7 ppm) are just as close to those predicted for (Φ, Ψ) = (-75°, +150°) at (52.6, 39.5, 173.3 ppm) than to β -sheets' ideal values (52.2, 41.9, 173.7 ppm).³⁶ Indeed $\Delta\delta_{\text{pred}}$ and $\Delta\delta_{\text{lit}}$

are both 1 ppm. According to our relative abundance estimation, leucine would be more abundant in the PCW environment closely followed by silk-type domains and collagen.

In summary, serine, threonine, and lysine residues, which are expected to be abundant in the threads' coating, are ambiguous and indicate that the *mefp-1* protein of the coating would thus be unstructured. Interestingly, this result is further supported by the fifth alanine peak with chemical shifts of (52.3, 17.4, 175.4 ppm), which is also in good agreement with those expected for an unordered protein.³⁶ To further establish the structure of the cuticle, the latter was studied by infrared microscopy.

Infrared Microscopy Imaging of Individually Sectioned Byssus Threads. Previous work on infrared characterization of the byssus was performed on whole byssal threads in transmission mode and therefore could not discriminate the cuticle from the core.^{17,21} In contrast to the transmission mode, ATR is based on the application of an evanescent wave at the surface of the sample. The depth of penetration may be varied with the incidence angle of the source beam and the refractive index of the ATR element used. Nevertheless, the penetration will never exceed a few micrometers, thus, providing information about the surface of a sample rather than the bulk. However, by cutting the byssus along its long axis, the core and the sheath of the threads can be independently imaged.

As seen in Figure 5, FTIR microimaging of the byssus core and sheath shows different amide I band maxima as a function of the mapping position. Averaged FTIR spectra of the amide I band of the cuticle and core are indeed shifted by 6 cm^{-1} , from 1637 to 1631 cm^{-1} , respectively (Figure 5B,C). In addition, the spectrum of the core also exhibits shoulders at 1695 and 1652 cm^{-1} . Peak fitting applied to the amide I band of the core evidence strong contributions of components located at 1625 and 1695 cm^{-1} . These bands are attributable to antiparallel β -sheets secondary structures⁴¹ and, thus, strongly support the solid-state NMR results obtained by analysis of the alanine chemical shifts. A shoulder is also detected around 1260 cm^{-1} in the amide III region of the core spectrum (Supporting Information). This band, which is present in the silk fibroin spectrum, is known to arise from antiparallel β -sheet conformation.⁴² As shown in Table 4, this conformation accounts for the relative amount of 37%. The next most abundant secondary structure comes from a component located at 1652 cm^{-1} , with a contribution percentage of 30%. This band can either be assigned to collagen triple helix, the PG II and PP II helices that are structurally similar to collagen, or to α -helical structures. Because it is well-known that byssal threads are made of aligned PreCol block copolymers, which comprise central collagen-like domains, the most plausible assignment for this abundant type of structure is the collagen triple helix, in excellent agreement with our NMR results. To unambiguously confirm the presence of collagen in the core, bands around 1030 and 1079 cm^{-1} , as well as bands in the amide III region located about 1204 , 1236 , 1280 , and 1338 cm^{-1} can all be observed in the spectrum (Supporting Information).^{43,44} Nevertheless, minor contributions from other types of structures cannot be excluded and the remainder of the core would mostly be made of β -turns and 3_1 -helices, aggregates, and some unstructured zones.

As shown in Figure 5B,C, the amide I band maximum of the byssus cuticle is located around 1637 cm^{-1} . Curve fitting on the

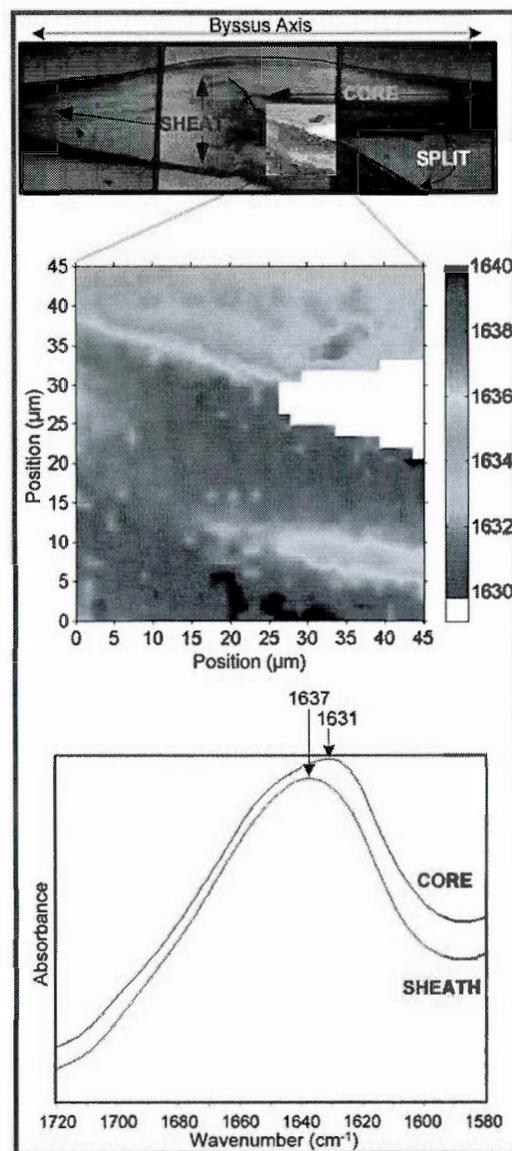


Figure 5. Micrograph of a longitudinally split byssus thread imaged by ATR-FTIR microscopy (top), resulting infrared color map showing the spatial variation of the maximum of amide I band (middle), and infrared spectra in the amide I range for the core and sheath (bottom).

Table 4. Relative Amount of Secondary Structure, As Determined by Peak Fitting Analysis of the Amide I Bands of the Byssus Core and Sheath^a

	band (cm^{-1})	% contribution	
		core	sheath
antiparallel β -sheet	1625/1695	37	19
β -turn/ 3_1 -helix	1684/1670	18	31
collagen/ α -helix	1652	30	9
unordered/parallel β -sheet	1639	9	34
aggregates	1609	7	8

^aThe estimated error on the contribution percentage is 5%.

amide I band averaged spectrum in this region indicates a high contribution of a component located around 1640 cm^{-1} . Unordered or random coil proteins and β -helix (parallel β -

sheets) are possible molecular structures, which may absorb around this wave number.^{41,43} However, according to the NMR analysis of the amino acid residues abundantly found in the byssus cuticle such as serine, threonine, and lysine, the thread mefp-1 would most likely be unstructured. Other structures present in the sheath spectrum include aggregated strands, antiparallel β -sheets, and collagen triple helix or α -helix. Even though a germanium ATR element with a high refractive index was employed to limit the penetration depth, the possibility that structures occurring in the core could contribute to the overall cuticle spectrum cannot be excluded. Indeed, a considerable load must be applied on the sample to obtain a satisfactory signal, thus, compressing the thread and reducing its thickness. This could explain the minor detection of the dominant structural elements from the core (antiparallel β -sheets and collagen triple helices) in the sheath spectrum. It could also explain the presence of collagen bands near 1030, 1204, and 1280 cm^{-1} , which appear as poorly resolved shoulders or with a lower intensity. It is also possible that defects in the sheath allow the partial detection of the core. On the other hand, because little is known about the definitive protein conformation in the byssus sheath, the presence of small amounts of other conformational domains cannot be ruled out.

DISCUSSION

Mussel byssal threads are high performance protein fibers which combine extensibility and tensile strength. In this work, we have explored the molecular organization responsible for the outstanding mechanical properties of "sea silk" by recording, for the first time, 2D high-resolution ^{13}C SS-NMR spectra on fully labeled threads. This was enabled by a ^{13}C enrichment protocol developed by our group with the blue mussel *Mytilus edulis*. Up to 9% labeling was achieved using a mixture of freshwater ^{13}C -labeled *Chlorella* and saltwater microalgae as part of the normal diet of *M. edulis*. Chemical shift analysis was combined to chemical shift predictions to assign the resonances arising from several amino acid residues. This allowed us to confirm, refine, or propose a structural organization in several domains in the byssus biofibers, as presented in Figure 4.

First by analyzing the conformation-dependent chemical shifts of the dominant peaks, our results confirm that the collagen triple helix is the prevailing conformation in which amino acids are found in the material. An excellent agreement was obtained between experimental and predicted chemical shifts for the main byssus amino acids (glycine, alanine, proline) and most of the minor ones (arginine, glutamic acid, valine, isoleucine) using a single set of torsion angles of $(\Phi, \Psi) = (-75^\circ, +150^\circ)$ corresponding to an ideal collagen triple-helix.³⁴ Moreover, ^{13}C linewidths were below 1.5 ppm. Therefore, our results indicate that this complex biopolymer is surprisingly well ordered at a molecular level. This high degree of molecular order is consistent with the model of a material that possesses several specialized environments (collagen, silk-like, elastin-like, etc.) in order to perform the paradoxical task of both toughness and shock absorption. In contrast, spider silk comprises only two main environments to perform somewhat similar tasks and is characterized by a lower degree of molecular order.³⁵ The presence of collagen triple helices in the byssus core was also confirmed by ATR-FTIR spectroscopy. It is interesting to remark that defects in the collagen sequences of *M. edulis* threads, that is, one glycine deletion in (Gly-Xaa-Yaa) triads for Pre-Col P and NG, as well

as two glycine deletions and one incomplete triad for PreCol-D),⁷ which should induce kinks in the structure,¹¹ only induce minor structural perturbations in the otherwise well-ordered collagen regions.

In addition to proving the collagenous nature of the byssus and allowing a refinement of its structure, the 2D ^{13}C SS-NMR spectrum allowed identifying alanines in five different conformational environments, thus, improving the structural model of the byssus. Alanine is the second most abundant amino acid in this material. It has a strong ^{13}C chemical shift variation according to conformation which is well documented in the literature. The chemical shift analysis of alanine peaks particularly allowed us to gain an insight on the structure of noncollagenous environments in the byssal threads. Although the cross peak intensity in multidimensional SS-NMR is not related in a straightforward manner to the abundance of a given nucleus, the relative intensities of the peaks in combination with the obtained structural information can qualitatively be used to assign them to the different environments in the byssal threads. According to our relative abundance estimation, the second most intense alanine cross peaks (Ala2) correspond to silk-like domains. Their chemical shifts and relaxation properties are strongly indicative of antiparallel β -sheets, the presence of which was confirmed by FTIR, and located in the core of the thread. We thus conclude that the β -sheets in the silk-like flanking domains are antiparallel. Interestingly, antiparallel β -sheets are known to provide higher stiffness and strength than their parallel counterpart;⁴⁴ therefore, their presence would contribute to the exceptional mechanical properties of the byssal threads.

The third most intense alanine chemical shift set (Ala3) can be assigned to collagen helices but is also consistent with distorted β -turns similar to those observed in silk.⁴⁵ Because of the presence of antiparallel β -sheets in byssal threads, as shown by both high-resolution SS-NMR and ATR-FTIR spectroscopy, we see the occurrence of β -turns as a reasonable hypothesis. β -Turns would link two adjacent β -strands in a crystallite, linking (i-i+3) residues as opposed to (i-i+2) in the case of γ -turns, resulting in a larger spacing between β -strands to accommodate amino acids with bulkier side chains such as arginine or glutamine within the β -sheet.⁷

The best agreement between literature values and experimental chemical shifts for Ala4 cross peaks is obtained for parallel β -sheets. Although the β -sheet nature is unambiguous, the parallel directionality would need additional proof since our FTIR results only reveal a small contribution of parallel β -sheets (9% in core and 34% in sheath) also assignable to unordered protein. According to the composition profile of the byssal threads (Figure 3a), 20% of the alanines would be located in PCW flanking domains. Therefore, Ala4 can most likely be attributed to alanines in PCW. Similarly, leucine residues that are expected to be more abundant in a PCW environment also show a reasonably good agreement with a β -sheet structure. The β -sheet nature of the PCW environment is also supported by recently published FTIR results.²¹

Finally, investigation of the less intense alanine cross peak (Ala5), as well as serine, threonine, and lysine chemical shifts, gives strong insights into the conformation of the byssus cuticle. Indeed, lysine and threonine are more abundant in the coating, while serine is equally found in the mefp-1 coating and collagen domains. While serine chemical shifts are in good agreement with random coil values, they are also compatible with their presence in collagen helices. More interestingly,

threonine and lysine chemical shifts only poorly agree with those of well characterized secondary structures. The unusual chemical shifts of lysine residues cannot a priori be due to the presence of hydroxylysine because no lysyl oxidase activity or aldehyde-derived cross-links have been detected in the byssus.⁷ Although one of the threonine (C_{α} - C_{β}) pairs falls close to α -helix chemical shifts, this assignment is not only incomplete (CO resonances could not be detected or assigned) but is also the single case which would reveal the presence of α -helices. We, therefore, consider it to be ambiguous. Overall, the inconsistency in structural assignments for residues in the byssal thread sheath is likely to indicate an unstructured nature. This would further be supported by Ala5 which chemical shifts are close to published random coil values.³⁶ The SS-NMR results are confirmed by the ATR-FTIR microscopy spectra, indicating a dominant contribution of unstructured protein in the sheath. Dynamic light scattering studies of the mefp-1 in physiological conditions concluded that the structure resembled a random coil structure consisting of helical and turned segments.⁴⁶

Our SS-NMR study could not confirm the presence of an elastin-like domain in the byssal threads for several reasons. First, this collagen flanking domain is mainly found in the proximal part and would represent less than 10% of all domains. Moreover, it is rich in Gly residues whose ¹³C chemical shifts are not a good protein conformation probe. Additionally, elastin has no defined secondary structure;⁴⁷ therefore, the chemical shifts of Gly in the elastin domains would be similar to those in the cuticle. Finally, it is interesting to compare our result with recently published data on cartilage, also obtained by SS-NMR.⁴⁸ The mechanical properties of this material stem from the association of highly mobile glycosaminoglycans and less mobile collagen. A direct analogy with the case of byssal threads would hint to differences in mobility between the PreCols and, if highly mobile regions are present, as might be expected for the elastin-like regions, their signal intensity would further be attenuated.

A small number of amino acids could not be detected due to their very low abundance in the material (cysteine, methionine, phenylalanine, histidine, DOPA, and tyrosine) or moderately low abundance (glutamine, asparagine, and aspartic acid).⁴⁹ In the latter case, spectral overlap cannot be entirely ruled out. An improvement in labeling efficiency is necessary to enable the detection of DOPA, tyrosine, and histidine, which is crucial for the understanding of byssal fiber formation. A better labeling should also allow the detection of inter-residue contacts, thus, providing a tool to study the supramolecular organization of the fiber such as interhelical cross-links. Interestingly, even at this moderate level of labeling, the presence of glycoproteins or polysaccharides in whole byssal threads could be detected.

The overall portrait of whole byssal threads which emerges from our data is one of a fiber composed of extremely specialized well ordered environments. Whereas domains of nearly ideal collagen triple helices confer toughness to the threads as is the case in other biological superstructures like tendons, heart valves, and bones, stiffness is provided by silk-like regions, which adopt a structure surprisingly similar to the antiparallel β -sheets found in spider dragline silk. The core of the fiber is finally coated by a globally unordered extensible and self-healing cuticle, which confers the required elasticity to the threads.

CONCLUSION

We have described, for the first time, a multidimensional SS-NMR study of nonspecifically ¹³C-labeled byssal threads. The 2D SS-NMR spectra complemented by ATR-FTIR spectroscopy data allowed us to refine the current structural model of these high-performance mussel anchoring fibers. The collagen triple helices were shown to be well-ordered environments with regular (Φ, Ψ) torsion angles of ($-75^{\circ}, +150^{\circ}$). The silk-like flanking domains found in PreCol-D consist of antiparallel β -sheets with most probably β -turns linking β -strands. The β -sheet structure of the PCW regions in the PreCol-NG was confirmed and would be comprised of parallel β -sheets. Our results indicate that the coating of the byssal threads is mostly unordered. Interestingly, the presence of a non-negligible part of glycosylated proteins or polysaccharides could be ascertained.

In addition to improving the fundamental understanding of natural protein fibers, these results pave the way for a molecular level evaluation of various byssal fiber macroscopic properties. The study of important structural mechanisms such as DOPA cross-linking or histidine complexation will require an increase in isotopic labeling. Improved labeling strategies are currently being developed for this purpose.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Details of amino acid relative abundance calculation, complete amino acid specific isotopic enrichment data, examples of chemical shift prediction results, full ¹³C chemical shift assignment of residues in collagen domains, and examples of FTIR spectra with corresponding curve fitting. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: marcotte.isabelle@uqam.ca.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

F.B. is grateful to the Fonds de Recherche du Québec - Nature et Technologies (FRQNT) and to the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) Strategic Training Initiative in Chemical Biology for the award of scholarships. M.-O.S.-H. would like to acknowledge the Réseau Aquaculture Québec (RAQ) and the Université du Québec à Montréal for the award of scholarships. The authors would like to thank A. Siemer (University of Southern California), B. Genard (ISMER), and B. Myrand (Merinov) for insightful discussions. Access to the 900 MHz NMR spectrometer was provided by the National Ultrahigh-Field NMR Facility for Solids (Ottawa, Canada) funded by the Canada Foundation for Innovation (CFI), the Ontario Innovation Trust, Recherche Québec, the National Research Council of Canada, and Bruker BioSpin and is managed by the University of Ottawa. The Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) is acknowledged for a major resources support grant. Dr. V. Tersikh is thanked for technical support. This work was supported by a strategic research grant of the NSERC. I.M. and R.T. are members of the RAQ and the Centre Québécois sur les Matériaux Fonctionnels (CQMF).

■ REFERENCES

- (1) Carrington, E.; Moeser; Dimond; Mello; Boller. *Limnol. Oceanogr.* 2009, 54, 978–986.
- (2) Lachance; Myrand, B.; Tremblay, R.; Koutitonsky; Carrington, E. *Aquat. Biol.* 2008, 2, 119–129.
- (3) Moeser; Leba; Carrington. *J. Exp. Biol.* 2006, 209, 881–890.
- (4) Simmons; Michal, C.; Jelinsky, L. *Science* 1996, 271, 84–87.
- (5) Bell, E. C.; Gosline, J. M. *Mar. Ecol.: Prog. Ser.* 1997, 159, 197–208.
- (6) Bell, E. C.; Gosline, J. M. *J. Exp. Biol.* 1996, 199, 1005–1017.
- (7) Waite, H. J.; Qin, X.-X.; Coyne, K. J. *Matrix Biol.* 1998, 17, 93–106.
- (8) Gosline, J. M.; Lillie, M.; Carrington, E.; Guerette, P.; Ortlepp, C.; Savage, K. *Phil. Trans. R. Soc., B* 2002, 357, 121–132.
- (9) Waite, H. J.; Vaccaro, E.; Sun, C.; Lucas, J. M. *Philos. Trans. R. Soc., B* 2002, 357, 143–153.
- (10) Lucas, J. M.; Vaccaro, E.; Waite, H. J. *J. Exp. Biol.* 2002, 205, 1807–1817.
- (11) Hassenkam, T.; Gutschmann, T.; Hansma, P.; Sagert, J.; Waite, H. J. *Biomacromolecules* 2004, 5, 1351–1355.
- (12) Harrington, M. J.; Gupta, H. S.; Fratzl, P.; Waite, H. J. *J. Struct. Biol.* 2009, 167, 47–54.
- (13) Sun, C.; Lucas, J. M.; Waite, H. J. *Biomacromolecules* 2002, 3, 1240–1248.
- (14) Sagert, J.; Waite, H. J. *J. Exp. Biol.* 2009, 212, 2224–2236.
- (15) Harrington, M. J.; Masic, A.; Holten-Andersen, N.; Waite, H. J.; Fratzl, P. *Science* 2010, 328, 216–220.
- (16) McDowell, L. M.; Burzio, L. A.; Waite, H. J.; Schaefer, J. J. *Biol. Chem.* 1999, 274 (29), 20293–20295.
- (17) Hagenau, A.; Scheidt, H. A.; Serpell, L.; Huster, D.; Scheibel, T. *Macromol. Biosci.* 2009, 9, 162–168.
- (18) LeBlanc, A.; Arnold, A. A.; Genard, B.; Nadalini, J.-B.; Séguin-Heine, M.-O.; Marcotte, I.; Tremblay, R.; Sleno, L. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2012, 26 (10), 1165–1174.
- (19) Takegoshi, K.; Nakamura, S.; Terao, T. *Chem. Phys. Lett.* 2001, 344, 631–637.
- (20) Bennett, A. E.; Rienstra, C. M.; Auger, M.; Lakshmi, K. V.; Griffin, R. G. *J. Chem. Phys.* 1995, 103, 6951–6958.
- (21) Hagenau, A.; Papadopoulos, P.; Kremer, F.; Scheibel, T. *J. Struct. Biol.* 2011, 175 (3), 339–347.
- (22) Delaglio, F.; Grzesiek, S.; Vuister, G. W.; Zhu, G.; Pfeifer, J.; Bax, A. *J. Biomol. NMR* 1995, 6, 277–293.
- (23) Neal, S.; Nip, A. M.; Zhang, H.; Wishart, D. S. *J. Biomol. NMR* 2003, 26, 215–240.
- (24) Mascolo, J. M.; Waite, H. J. *J. Exp. Zool.* 1986, 240, 1–7.
- (25) Saitô, H.; Yokoi, M. *J. Biochem.* 1992, 111, 376–382.
- (26) Saitô, H.; Ando, L.; Ramamoorthy, A. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 2010, 57, 181–228.
- (27) Tycko, R. *Q. Rev. Biophys.* 2006, 39 (1), 1–55.
- (28) Kricheldorf, H. R.; Müller, D. *Macromolecules* 1983, 16, 615–623.
- (29) Saitô, H.; Tabeta, R.; Shoji, A.; Ozaki, T.; Ando, I.; Miyata, T. *Biopolymers* 1984, 23, 2279–2297.
- (30) Sarkar, S. K.; Torchia, D. A.; Kopple, K. D.; Vanderhart, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* 1984, 106, 3328–3331.
- (31) Kanyalkar, M.; Srivastava, S.; Coutinho, E. *Biomaterials* 2002, 23, 389–396.
- (32) Bella, J.; Liu, J.; Kramer, R.; Brodsky, B.; Berman, H. M. *J. Mol. Biol.* 2006, 362, 298–311.
- (33) Seidel, K.; Eitzkorn, M.; Schneider, R.; Ader, C.; Baldus, M. *Solid State Nucl. Magn. Reson.* 2009, 35, 235–242.
- (34) Gautieri, A.; Vesentini, S.; Redaelli, A.; Buehler, J. *Nano Lett.* 2011, 11, 757–766.
- (35) Marcotte, I.; Van Beek, J. D.; Meier, B. H. *Macromolecules* 2007, 40, 1995–2001.
- (36) Zhang, H.; Neal, S.; Wishart, D. S. *J. Biomol. NMR* 2003, 25, 173–195.
- (37) Holland, G. P.; Creager, M. S.; Jenkins, J. E.; Lewis, R. V.; Yarger, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 9871–9877.
- (38) Asakura, T.; Okonogi, M.; Nakazawa, Y.; Yamauchi, K. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 6231–6238.
- (39) Saitô, H. *Magn. Reson. Chem.* 1986, 24, 835–852.
- (40) Asakura, T.; Ashida, J.; Yamane, T.; Kameda, T.; Nakazawa, Y.; Ohgo, K.; Komatsu, K. *J. Mol. Biol.* 2001, 306, 291–305.
- (41) Jackson, M.; Mantsch, H. H. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1995, 30 (2), 95–120.
- (42) Byette, F.; Bouchard, F.; Pellerin, C.; Paquin, J.; Marcotte, I.; Mateescu, M. *Polym. Bull.* 2011, 67 (1), 159–175.
- (43) Khurana, R.; Fink, A. L. *Biophys. J.* 2000, 78 (2), 994–1000.
- (44) Xiao, S.; Stacklies, W.; Cetinkaya, M.; Markert, B.; Gräter, F. *Biophys. J.* 2009, 96, 3997–4005.
- (45) Asakura, T.; Yao, J. *Protein Sci.* 2002, 11, 2706–2713.
- (46) Haemers, S.; Van Der Leeden, M. C.; Frens, G. *Biomaterials* 2005, 26, 1231–1236.
- (47) Debelles, L.; Tamburro, A. M. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1999, 31, 261–272.
- (48) Xu, J.; Zhu, P.; Morris, M. D.; Ramamoorthy, A. *J. Phys. Chem. B* 2011, 115, 9948–9954.
- (49) Qin, X.-X.; Waite, H. J. *J. Exp. Biol.* 1995, 198, 633–644.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J.H. Waite, E. Vaccaro, C. Sun & J.M. Lucas (2002) Elastomeric gradients: a hedge against stress concentration in marine holdfast?, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B357*, 143-153.
- [2] J.H. Waite, X.-X. Qin & K.J. Coyne (1998) The peculiar collagens of mussel byssus, *Matrix Biol. 17*, 93-106.
- [3] M.J. Harrington & H. Waite (2007) Holdfast heroics: comparing the molecular and mechanical properties of *Mytilus californianus* byssal threads, *J. Exp. Biol. 210*, 4307-4318.
- [4] J.M. Lucas, E. Vacaro & J.H. Waite (2002) A molecular, morphometric and mechanical comparison of the structural elements of byssus from *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*, *J. Exp. Biol. 205*, 1807-1817.
- [5] J. Gosline, M. Lillie, E. Carrington, P. Guerette, C. Ortlepp & K. Savage (2002) Elastic proteins: biological roles and mechanical properties, *Philos. Trans. R. Soc., B 357*, 121-132.
- [6] T. Hassenkam, T. Gutschmann, P. Hansma, J. Sagert & J.H. Waite (2004) Giant bent-core Mesogens in the thread forming process of marine mussels, *Biomacromolecules 5*, 1351-1355.
- [7] M.J. Harrington & J.H. Waite (2008) pH-dependent locking of giant mesogens in fibers drawn from mussel byssal collagens, *Biomacromolecules 9*, 1480-1486.
- [8] X. Qin & J.H. Waite (1995) Exotic collagen gradients in the byssus of the mussel *Mytilus edulis*, *J. exp. biol. 198*, 633-644.
- [9] A.A. Arnold, F. Byette, M.-O.S. Heine, A. LeBlanc, L. Sleno, R. Tremblay, C. Pellerin & I. Marcotte (2013) Solid-state NMR structure determination of whole anchoring threads from the blue mussel *Mytilus edulis*, *Biomacromolecules 14*, 132-141.
- [10] E. Carrington (2002) The ecomechanics of mussel attachment: from molecules to ecosystems, *Integr. Comp. Biol. 42*, 846-852.

- [11] M.J. Harrington, A. Masic, N. Holten-Andersen, J.H. Waite & P. Fratzl (2010) Iron-clad fibers: a metal-based biological strategy for hard flexible coatings, *Science* 328, 216-220.
- [12] N. Holten-Andersen, T.E. Mates, M.S. Toprak, G.D. Stucky, F.W. Zok & J.H. Waite (2009) Metal and Integrity of a Biological Coating: The cuticle of mussel byssus, *Langmuir* 25, 3323-3326.
- [13] C. Sun & J.H. Waite (2005) Mapping chemical gradients within and along a fibrous structural tissue, mussel byssal threads, *J. Biol. Chem.* 280, 39332-39336.
- [14] J.H. Waite (1983) Evidence for a repeating 3,4-dihydroxyphenylalanine- and hydroxyproline-containing decapeptide in the adhesive protein of the mussel, *Mytilus edulis* L., *J. Biol. Chem.* 258, 2911-2915.
- [15] C.W. McKindsey, P. Archambault, M.D. Callier & F. Olivier (2011) Influence of suspended and off-bottom mussel culture on the sea bottom and benthic habitats: a review, *Can. J. Zool.* 89, 622-646.
- [16] P.e.O. Canada (2006) (access date Avril, 2012).
- [17] F. Bourque & B. Myrand. (2006) Rapport de R-D No. 152, MAPAQ, DIT, Gaspé.
- [18] P. Cranford, M. Dowd, J. Grant, B. Hargrave & S. McGladdery. (2003) (FaO Science, Ed.).
- [19] A.A. Lachance, B. Myrand, R. Tremblay, V. Koutitonsky & E. Carrington (2008) Biotic and abiotic factors influencing attachment strength of blue mussels *Mytilus edulis* in suspended culture, *Aquat. Biol.* 2, 119-129.
- [20] J.M.F. Babarro & M. Lassudrie (2011) Ecophysiological responses of invasive and indigenous mytilids in the Ria de Vigo (NW Spain), *Aquat. Living Resour.* 24, 303-315.
- [21] A. Hagenau, P. Papadopoulos, F. Kremer & T. Scheibel (2011) Mussel collagen molecules with silk-like domains as load-bearing elements in distal byssal threads, *J. Struct. Biol.* 175, 339-347.
- [22] I. Marcotte. (2011) in *Note de cours CHI7180* UQAM.
- [23] R.S. Macomber (1998) *A complete introduction to modern NMR spectroscopy*, New York, Wiley-Interscience, 382 pages.

- [24] P.J. Hore (2001) *Nuclear magnetic resonance*, Oxford, Oxford science, 90 pages.
- [25] C. Dybowski & R.L. Lichter (1987) *NMR spectroscopy techniques*, New York, Marcel Dekker, Inc., 373 pages.
- [26] T.C. Pochapsky & S.S. Pochapsky (2007) *NMR for physical and biological scientists*, New York, Garland science, 372 pages.
- [27] C.A. Fyfe (1983) *Solid state NMR for chemists*, Guelph, C.F.C. Press, 593 pages.
- [28] R.L. Lichter & C.R. Dybowski (1987) *NMR spectroscopy techniques*, New York, Marcel Dekker Inc., 373 pages.
- [29] S. Berger & S. Braun (2004) *200 and more NMR experiments*, Federal Republic of Germanie, Wiley-VCH, 838 pages.
- [30] K. Schmidt-Rohr & H.W. Spiess (1996) *Multidimensional solid-state NMR and polymers*, Londres, Academic Press Inc., 478 pages.
- [31] K. Schmidt-Rohr, J. Clauss & H.W. Spiess (1992) Correlation of structure, mobility, and morphological information in heterogeneous polymer materials by two-dimensional widelie-separation nmr spectroscopy, *Macromolecules* 25, 3273-3277.
- [32] J.M.B. Brown (1973) *Introductory solid mechanics*, London, John Wiley & Sons, 434 pages.
- [33] A. Samikian (1994) *Analyse et calcul des structures*, Boucherville, Gaëtan Morin, 580 pages.
- [34] P. Legendre & M.J. Anderson (1999) Distance-based redundancy analysis: testing multispecies responses in multifactorial ecological experiments, *Ecol. Monogr.* 69, 1-24.
- [35] A.D. Rickmers & H.N. Todd (1967) *Statistics an introduction*, New York, McGraw-Hill inc., 585 pages.
- [36] N. Gunawickrama (2007) *Controlled laboratory experiments: desing and data analysis an aquatic toxicology perspective*, Kuala Terengganu, Penerbit, 61 pages.
- [37] W. Mendenhall & T. Sincich (2007) *Statistics for engineering and the sciences*, New Jersey, 5e ed.; Pearson Prentice Hall, 1060 pages.

- [38] D.A. Skoog, D.M. West & F.J. Holler (2002) *Chimie Analytique*, Bruxelles, Édition De Boeck Université, 870 pages.
- [39] E.d. Hoffmann & V. Stroobant (2005) *Spectrométrie de masse*, Paris, 3e ed.; Dundo, 425 pages.
- [40] B. Myrand, R. Tremblay & J.-M. Sévigny (2009) Impact of suspension culture using mesh sleeves on genetic characteristics of *Mytilus edulis* L. in Canada, *Aquaculture* 291, 147-153.
- [41] A. Pérez Camacho, R. González & J. Fuentes (1991) Mussel culture in Galicia (N.W. Spain), *Aquaculture* 94, 263-278.
- [42] N. LeBlanc, T. Landry, H. Stryhn, R. Tremblay, M. McNiven & J. Davidson (2005) The effect of high air and water temperature on juvenile *Mytilus edulis* in Prince Edward Island, Canada, *Aquaculture* 243, 185-194.
- [43] A. Drapeau, L.A. Comeau, T. Landry, H. Stryhn & J. Davidson (2006) Association between longline design and mussel productivity in Prince Edward Island, Canada, *Aquaculture* 261, 879-889.
- [44] R.W. Penney, M.J. Hart & N. Templeman (2002) Comparative growth of cultured blue mussels, *Mytilus edulis*, *M. trossulus* and their hybrids, in naturally occurring mixed-species stocks, *Aquacult. Res.* 33, 693-702.
- [45] R.W. Hickman (1992) *Mussel cultivation*, In: The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and culture, (E Gosling ed.), Developments in aquaculture and fisheries science, 25. Elsevier, Amsterdam, pp. 465-510.
- [46] D. Cheney, R. Langan, K. Heasman, B. Friedman & J. Davis (2010) Shellfish culture in the open ocean: Lessons learned for offshore expansion, *Mar. Technol. Soc. J.* 44, 55-67.
- [47] L. Hamouda, K.W. Hipel & D.M. Kilgour (2004) Shellfish conflict in Caynes sound: A strategic perspective, *Environ. Manage.* 34, 474-486.
- [48] M. Brenner, C. Buchholz, O. Heemken, B.H. Buck & A. Koehler (2012) Health and growth performance of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.) from two hanging cultivation sites in the German Bight: a nearshore-offshore comparison, *Aquacult. Int.* 20, 751-778.
- [49] B. Buck (2007) Experimental trials on the feasibility of offshore seed production of the mussel *Mytilus edulis* in the German Bight: installation, technical requirements and environmental conditions, *Helgol. mar. res.* 61, 87-101.

- [50] F. Bourque, B. Myrand & G. Tita (2007) Development of open-sea mussel culture in Îles-de-la-Madeleine: Four years later, *AAC Spec. Publ.* 12, 40-43.
- [51] C. Stevens, D. Plew, N. Hartstein & D. Fredriksson (2008) The physics of open-water shellfish aquaculture, *Aquacult. Eng.* 38, 145-160.
- [52] M. Narváez, L. Freitas, M. Guevara, J. Mendoza, H. Guderley, C.J. Lodeiros & G. Salazar (2008) Food availability and reproduction affects lipid and fatty acid composition of the brown mussel, *Perna perna*, raised in suspension culture, *Comp. Biochem. Physiol.* 149B, 293-302.
- [53] A.P. Camacho, U. Labarta & R. Beiras (1995) Growth of mussels (*Mytilus edulis galloprovincialis*) on cultivation rafts: influence of seed source, cultivation site and phytoplankton availability, *Aquaculture* 138, 349-362.
- [54] J.G. Helson, S. Pledger & J.P.A. Gardner (2007) Does differential particulate food supply explain the presence of mussels in Wellington Harbour (New Zealand) and their absence on neighbouring Cook Strait shores?, *Est. Coast. Shelf Sci.* 72, 223-234.
- [55] P. Garen, S. Robert & S. Bougrier (2004) Comparison of growth of mussel, *Mytilus edulis*, on longline, pole and bottom culture sites in the Pertuis Breton, France, *Aquaculture* 232, 511-524.
- [56] R. Filgueira, R. Rosland & J. Grant (2011) A comparison of scope for growth (SFG) and dynamic energy budget (DEB) models applied to the blue mussel (*Mytilus edulis*), *J. Sea Res.* 66, 403-410.
- [57] M. Brenner & B.H. Buck (2010) Attachment properties of blue mussel (*Mytilus edulis* L.) byssus threads on culture-based artificial collector substrates, *Aquacult. Eng.* 42, 128-139.
- [58] G.J. Inglis & N. Gust (2003) Potential indirect effects of shellfish culture on the reproductive success of benthic predators, *J. App. Ecol.* 40, 1077-1089.
- [59] A. Mallet & B. Myrand (1995) *The culture of the blue mussel in Atlantic Canada*, In: Cold water aquaculture in Atlantic Canada, (AD Bogen ed.). CIRRD, Univ. Moncton, NB, Canada, pp. 257-298.
- [60] A.L. Mallet & C.E. Carver (1991) An assessment of strategies for growing mussels in suspended culture, *J. Shellfish Res.* 10, 471-477.
- [61] A.-A. Lachance, R. Hennebicq, B. Myrand, J.-M. Sévigny, E. Kraffe, Y. Marty, I. Marcotte & R. Tremblay (2011) Biochemical and genetic characteristics of

- suspension-cultured mussels (*Mytilus edulis*) in relation to byssal thread production and losses by fall-off, *Aquat. living resour.* 24, 283-293.
- [62] R. Tremblay, B. Myrand & J.-M. Sevigny (1998) Genetic characterization of wild and suspension-cultured blue mussels (*Mytilus edulis* Linneaus, 1758) in the Magdalen Islands (southern Gulf of St. Lawrence, Canada), *J. Shellfish Res.* 17, 1191-1202.
- [63] V.G. Koutitonsky, N. Navarro & D. Booth (2002) Descriptive physical oceanography of Great-Entry lagoon, gulf of St. Lawrence, *Est. Coast. Shelf Sci.* 54, 833-847.
- [64] V.G. Koutitonsky & G. Tita (2006) Temps de renouvellement des eaux dans la lagune de Grande-Entrée aux Iles-de-la-Madeleine, *Cahier d'information no 151, MAPAQ*, 73 p.
- [65] A. Aminot & M. Chaussepied (1983) *Manuel des analyses chimiques en milieu marin*, Paris, 395 pages.
- [66] P. Legendre & L. Legendre (2012) Complex ecological data sets, *Developments in environmental modelling* 24, 1-990.
- [67] L.E. Petes, B.A. Menge & A.L. Harris (2008) Intertidal mussels exhibit energetic trade-offs between reproduction and stress resistance, *Ecol. Monogr.* 78, 387-402.
- [68] A. Rodriguez-Rua, M.A. Prado, Z. Romero & M. Bruzon (2003) The gametogenic cycle of *Scrobicularia plana* (da Costa, 1778) (Mollusc: Bivalve) in Guadalquivir estuary (Cadiz, SW Spain)., *Aquaculture* 217, 157-166.
- [69] A.J.S. Hawkins & B.L. Bayne (1992) *Physiology interrelations, and the regulation of production*, In: *The mussel Mytilus: Ecology, physiology, genetics and culture* (E Gosling ed.), *Developments in aquaculture and fisheries science*, 25. Elsevier, Amsterdam, pp. 171-212.
- [70] D.I. Zandee, J.H. Kluytmans, W. Zurburg & H. Pieters (1980) Seasonal variations in biochemical composition of *Mytilus edulis* with reference to energy metabolism and gametogenesis, *Neth. J. Sea Res.* 14, 1-29.
- [71] N. Kautsky (1982) Quantitative studies on gonad cycle, fecundity, reproductive output and recruitment in a Baltic *Mytilus edulis* population, *Mar. Biol.* 68, 143-160.

- [72] S.M.M. Fässler & M.J. Kaiser (2008) Phylogenetically mediated anti-predator responses in bivalve molluscs, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 363, 217-225.
- [73] R. Nagarajan, S.E.G. Lea & J.D. Goss-Custard (2006) Seasonal variations in mussel, *Mytilus edulis* L. shell thickness and strength and their ecological implications, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 339, 241-250.
- [74] P.K.S. Shin, C.C. Liu, Z.X. Liu & S.G. Cheung (2008) Marine mussels *Brachidontes variabilis* selected smaller places of refuge and enhanced byssus production upon exposure to conspecific and heterospecific cues, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 361, 16-20.
- [75] N. Kautsky, K. Johannesson & M. Tedengren (1990) Genotypic and phenotypic differences between Baltic and North Sea populations of *Mytilus edulis* evaluated through reciprocal transplantations. I. Growth and morphology, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 59, 203-210.
- [76] C.Y. Lee, S.S.L. Lim & M.D. Owen (1990) The rate and strength of byssal reattachment by blue mussels (*Mytilus edulis* L.), *Can. J. Zool.* 68, 2005-2009.
- [77] N.I. Selin & E.E. Vekhova (2004) Effects of environmental factors on byssal thread formation in some members of the family *Mytilidae* from the Sea of Japan, *Russ. J. Mar. Biol.* 30, 306-313.
- [78] G.A. Young (1985) Byssus-thread formation by the mussel *Mytilus edulis*: effect of environmental factors, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 24, 261-271.
- [79] I.M. Côté (1995) Effects of predatory crab effluent on byssus production in mussels, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 188, 233-241.
- [80] S.G. Cheung, P.Y. Tong, K.M. Yip & P.K.S. Shin (2004) Chemical cues from predators and damaged conspecifics affect byssus production in the green-lipped mussel *Perna viridis*, *Mar. Behav. Physiol.* 37, 127-135.
- [81] E. Vaccaro & J.H. Waite (2001) Yield and post-yield behavior of mussel byssal thread: □ A self-healing biomolecular material, *Biomacromolecules* 2, 906-911.
- [82] J. Hedlund, M. Andersson, C. Fant, R. Bitton, H. Bianco-Peled, H. Elwing & M. Berglin (2009) Change of colloidal and surface properties of mytilus edulis foot protein 1 in the presence of an oxidation (NaIO₄) or a complex-binding (Cu²⁺) agent, *Biomacromolecules* 10, 845-849.
- [83] R. Mahéo (1970) Étude de la pose et de l'activité de sécrétion du byssus de *Mytilus edulis* L., *Cah. Biol. Mar.* 11, 475-483.

- [84] G. Werstink, G. Tita & J. Wilson (2006) Applying GIS and the analytic hierarchy process on seafarming spatial assessments in the Magdalen Islands (Quebec, Canada), *AAC Spec. Publ.* 10, 58-60.
- [85] T.L. Coombs & P.J. Keller (1981) *Mytilus* byssal thread as an environmental marker for metals, *Aquat. Toxicol.* 1, 291-300.
- [86] B. Myrand, H. Guderley & J.H. Himmelman (2000) Reproduction and summer mortality of blue mussels *Mytilus edulis* in the Magdalen Island, southern Gulf of St. Lawrence, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 197, 193-207.
- [87] F. Pernet, R. Tremblay, C. Langdon & E. Bourget (2004) Effect of additions of dietary triacylglycerol microspheres on growth, survival, and settlement of mussel (*Mytilus sp.*) larvae, *Mar. Biol.* 144, 693-703.
- [88] N. Rayssac, F. Pernet, O. Lacasse & R. Tremblay (2010) Temperature effect on survival, growth, and triacylglycerol content during the early ontogeny of *Mytilus edulis* and *M. trossulus*, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 417, 183-191.
- [89] E.N. Chernova (2010) Changes in trace metal concentrations in the tissues of the white sea mussel *Mytilus edulis* over the reproductive cycle, *Russ. J. Mar. Biol.* 36, 63-69.
- [90] C.P. Swann, T. Adewole & J.H. Waite (1998) Preferential manganese accumulation in dreissenid byssal threads, *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.* 119, 755-759.
- [91] A. Koschinsky & J.R. Hein (2003) Uptake of elements from seawater by ferromanganese crusts: Solid-phase associations and seawater speciation, *Mar. Geol.* 198, 331-351.
- [92] G.E. Millward, S. Kadam & A.N. Jha (2012) Tissue-specific assimilation, depuration and toxicity of nickel in *Mytilus edulis*, *Environ. Pollut.* 162, 406-412.
- [93] X.C. Le, X. Lu & X.-F. Li (2004) Peer reviewed: arsenic speciation, *Analytical Chemistry* 76, 26 A-33 A.
- [94] S.G. George, B.J.S. Pirie & T.L. Coombs (1976) The kinetics of accumulation and excretion of ferric hydroxine in *Mytilus edulis* (L.) and its distribution in the tissues, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 23, 71-84.

- [95] D. Reichert, O. Pascui, E.R. deAzevedo, T.J. Bonagamba, K. Arnold & D. Huster (2004) A solid-state NMR study of the fast and slow dynamics of collagen fibrils at varying hydration levels, *Magn. Reson. Chem.* 42, 276-284.
- [96] A. LeBlanc, A.A. Arnold, B. Genard, J.-B. Nadalini, M.-O.S. Heine, I. Marcotte, R. Tremblay & L. Slenczo (2012) Determination of isotopic labeling of proteins by precursor ion scanning liquid chromatography/tandem mass spectrometry of derivatized amino acids applied to nuclear magnetic resonance studies, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 26, 1165-1174.
- [97] A.E. Bennett, C.M. Rienstra, M. Auger, K.V. Lakshmi & R.G. Griffin (1995) Heteronuclear decoupling in rotating solids, *J. Chem. Phys.* 103, 6951-6958.
- [98] C.R. Morcombe & K.W. Zilm (2003) Chemical shift referencing in MAS solid state NMR, *J. Magn. Reson.* 162, 479-486.
- [99] A.A. Arnold & I. Marcotte (2009) Studying natural structural protein fibers by solid-state nuclear magnetic resonance, *Concepts Magn. Reson.* 34A, 24-47.
- [100] X.L. Yao, V.P. Conticello & M. Hong (2004) Investigation of the dynamics of an elastin-mimetic polypeptide using solid-state NMR, *Magn. Reson. Chem.* 42, 267-275.
- [101] G.P. Holland, R.V. Lewis & J.L. Yarger (2004) WISE NMR characterization of nanoscale heterogeneity and mobility in supercontracted *Nephila clavipes* spider dragline silk, *J. Am. Chem. Soc.* 126, 5867-5872.