UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉTUDE DU RÔLE DES IONS MÉTALLIQUES DANS LA FORMATION ET LES PROPRIÉTÉS MÉCANIQUES DES FIBRES DE BYSSUS POUR LE DÉVELOPPEMENT DE MATÉRIAUX BIOMIMÉTIQUES

MÉMOIRE PRÉSENTÉ COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR DAVID VERNON CHOKOUADEU YOUMSSI

OCTOBRE 2016

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.07-2011). 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.»

REMERCIEMENTS

Avant de vous présenter le contenu scientifique de ce mémoire, je tiens à remercier d'abord ma directrice, la professeure Isabelle Marcotte pour m'avoir intégré dans son laboratoire. Merci pour la bonne formation reçue sur une nouvelle technique d'analyse efficace, la résonance magnétique nucléaire de l'état solide. Bien que cette technique n'apparaisse pas dans ce manuscrit, elle constitue une corde de plus à mon arc et je suis persuadé de sa nécessité dans un futur proche. Merci de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un sujet fascinant et de m'avoir encadré de manière remarquable. Je n'oublie pas l'encadrement irréprochable reçu et de manière inlassable sur les techniques d'une bonne rédaction scientifique.

J'adresse mes remerciements également au professeur Christian Pellerin le cosuperviseur de ce projet pour ses précieux conseils sur les différentes méthodes d'approches. Pour l'accès à son équipement de laboratoire indispensable pour la mesure des propriétés mécaniques. Merci également pour la qualité pertinente de ses remarques.

Je remercie le professeur Rejean Tremblay pour sa franche collaboration dans mon travail et ses connaissances remarquables sur les moules.

J'exprime ma gratitude Alexandre Arnold pour sa disponibilité et l'encadrement technique reçue durant ma formation sur la résonance magnétique nucléaire de l'état solide. Merci également pour sa disponibilité et ses conseils. Frédéric Byette, l'initiateur de ce projet. Merci pour son aide et ses réponses à mes multiples questions. Merci également pour l'encadrement reçu sur le bon fonctionnement de l'équipement nécessaire pour les mesures de propriétés mécaniques.

Catherine Lanthier pour sa participation active durant son stage et la qualité de son travail.

Andrée Gravel, André Luiz Da Silva, Jean-Philippe Bourgouin, Maïwenn Beaugrand, Marwa Laadhari, Souryvanh Nirasay, Zeneib Bouhlel pour la bonne ambiance au bureau.

Enfin, je souhaite remercier le soutien financier sous forme de bourse octroyé par les Ressources Aquatiques Québec (RAQ) via le programme FONCER du Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG), le centre de recherche sur les nanomatériaux et l'énergie (NanoQAM) et puis la faculté des Sciences de l'Université du Québec à Montréal. DÉDICACE

À l'Eternel pour le don de la vie

TABLE DES MATIÈRES

LIST	TE DES FIGURES	viii
LIST	TE DES TABLEAUX	xi
LIST	TE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	xii
LIST	TE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS	xiv
RÉS	UMĖ	XV
CHA	APITRE I	1
INTI	RODUCTION GENERALE	1
1.1	Introduction	1
1.2	Byssus	2
1.3	Structure moléculaire du byssus	5
1.4	Objectifs de travail	19
1.5	Méthodologie	20
CHA	APITRE II	23
CON	ICEPTS THÉORIQUES DES TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES	23
2.1	Spectroscopie Ultraviolet-Visible (UV-Vis)	23
	2.1.1 Principe de la spectroscopie UV-Vis	23
	2.1.2 Transitions électroniques	25
	2.1.3 Instrument	26
2.2	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier	27
	2.2.1 Principe de l'infrarouge	28
	2.2.2 Fonctionnement du spectromètre	29
	2.2.3 Analyse des echantillons par transmission	29
2.3	Spectrométrie de masse à plasma couplé par induction (ICP-MS)	30
2.4	Titration calorimetrique isotherme (ITC)	31
2.5	Proprietés mécaniques	33

CHA EFF	PITRE I	II INDIVIDUAL METAL IONS ON THE MECHANICAL	38
PRO 3.1	PERTIES Résumé	S OF THE BLUE MUSSEL BYSSUS THREADS	38
3.2	Abstract	t	40
3.3	Introduc	tion	41
3.4	Materia	ls and Methods	42
	3.4.1 M	aterials	42
	3.4.2 M	ethods	42
	3.4.2.1	Byssal thread preparation	42
	3.4.2.2	Extraction of metals	43
	3.4.2.3	Incubation of metals	43
	3.4.3 Cl	haracterisation	43
	3.4.3.1	Byssus threads metal contents by ICP-MS	43
	3.4.3.2	Measurements of mechanical properties	44
3.5	Results	and Discussion	45
	3.5.1 M	etal ion extraction	45
	3.5.2 M	etal uptake	47
	3.5.3 M	echanical test of the distal region of the threads	55
3.6	Conclus	ion	60
3.7	Support	ing information	61
CHA	PITRE I	V	62
MET	THYLCA APOUND	TECHOL IN PRESENCE AND ABSENCE OF INORGANIC DS: A MODEL FOR THE STUDY OF THE INTERACTION OF	
DOF	A WITH	INORGANIC IONS IN BYSSAL THREADS	62
4.1	Avant-p	ropos	63
4.2	Résumé		65
4.3	Abstract	t	66
4.4	Introduc	ction	67
4.5	Materia	l and methods	68
	4.5.1 M	aterials	68
	4.5.2 In	strumental analyses	68

	4.5.2.1	UV-Visible spectroscopy (UV-Vis)	
	4.5.2.2	Isothermal Titration Calorimetry (ITC)	69
	4.5.2.3	Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy	70
4.6	Results	and discussion:	70
	4.6.1 U	V-Vis study of the formation of 4-methylcatechol-metal ion	complexes
	4.6.2 D	etermination of the affinity constant of the 4-MC/metal ion	complexes 77
	4.6.3 D	etermination of metal binding sites on 4-MC	
4.7	Conclu	sion	
CHA	PITRE	V	
CON	ICLUSI	ON ET PERSPECTIVES	
BIB	LIOGRA	PHIE	

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 La moule <i>Mytilus edulis</i> . (a) byssus (b) pied de la moule	3
Figure 1.2 Anatomie de <i>Mytilus edulis</i>	3
Figure 1.3 Rigidité (E) du byssus en fonction des portions	5
Figure 1.4 Schéma simplifié du byssus de la moule <i>Mytilus edulis</i> . (b) : Portions proximale et distale du byssus. (c) : Distribution illustrative des protéines long de la fibre.	le 6
Figure 1.5 A) Assemblage de 6+1 des PréCols en forme hexagonale et B) Ballot de PréCols en conformation banane .	e 7
Figure 1.6 Gradient de distribution des préCols, le long de la fibre. A) représente le premier modèle et B) le deuxième modèle. PréCol-D (noir), préCol-P (gris pâle) et préCol-NG (gris).	e 3 8
Figure 1.7 Modèle moléculaire simplifié illustrant l'assemblage des préCols dans l portion distale du byssus	a 9
Figure 1.8 Abondance relative des acides aminés dans chaque domaine spécifique la fibre de byssus de la moule <i>Mytilus edulis</i> . Mefp1 : <i>Mytilus edulis</i> foot protein 1, PCP : parois cellulaires de plantes	de 10
Figure 1.9 Séquence des tripeptides de collagène : A) préCol-P, et B) préCol-P	.12
Figure 1.10 Différentes adhésion et cohésions de la DOPA dans la moule	.14
Figure 1.11 4-méthylcatéchol avec sr : site réactif, snr : site non réactif et engagé d la liaison peptidique	lans 20
Figure 2.1 Schéma simplifié et illustratif de l'absorption d'une onde électro- magnétique du domaine UV-Vis par une molécule organique	24
Figure 2.2 Baisse de l'intensité du rayonnement incident après diffusion à travers u substance d'absorptivité molaire 3 (mol ⁻¹ cm ⁻¹ L), concentration molaire 3 (mol L ⁻¹) et une quye d'énaiseur l	$\frac{1}{24}$
Figure 2.3 Diagramme d'energie des différentes transitions électroniques et leurs notations.	

Figure 2.4 Schéma de principe d'un spectrophotomètre à double faisceau27
Figure 2.5 Schéma simplifié de la titration calorimetrique isotherme
Figure 2.6 Représentation d'une courbe de contrainte/déformation du byssus de Mytilus edulis (partie distale hydratée)
Figure 3.1 Effect of the EDTA treatment (0.2 M, pH 8.0) on the Fe, Ca and Zn concentration of native <i>M.edulis</i> byssal threads (distal section) obtained by ICP-MS.
Figure 3.2 Effect of a thorough rinsing step on the Fe, Zn and Ca uptake by <i>M. edulis</i> byssus threads (distal section) after EDTA treatment. Concentrations determined by ICP-MS. Inc_Fe, Inc_Zn and Inc_Ca refer to threads treated with 0.2 M EDTA then incubated respectively in 0.1M FeCl ₃ , ZnCl ₂ and CaCl ₂ aqueous solution
 Figure 3.3 (a) Profile of the Zn uptake (µg/g) by <i>M. edulis</i> byssal threads (distal part) as a function of pH and relative proportions (Zn : Fe) of the metals after EDTA treatment. Concentrations determined by ICP-MS. (b) Profile of the Fe uptake (µg/g) by <i>M. edulis</i> byssal threads (distal part) as a function of pH and relative proportions (Fe : Zn) of the metals after EDTA treatment49
Figure 3.4 Iron uptake by the distal section of <i>M. edulis</i> byssal threads determined by ICP-MS following different treatments. Native refers to untreated thread; EDTA to threads treated with 0.2 M EDTA, pH 8.0; Inc_Fe refers to threads treated with 0.2 M EDTA then incubated in 0.1M FeCl ₃ aqueous solution, pH<3; Inc_ASW refers to threads treated with 0.2 M EDTA then incubated in artificial sea water
Figure 3.5 Zinc uptake by the distal section of <i>M. edulis</i> byssal threads determined by ICP-MS following different treatments. Native refers to untreated thread; EDTA to threads treated with 0.2 M EDTA, pH 8.0; Inc_Zn refers to threads treated with 0.2 M EDTA then incubated in 0.1M ZnCl ₂ aqueous solution, pH 5.7; Inc_ASW refers to threads treated with 0.2 M EDTA then incubated in artificial sea water
Figure 3.6 Calcium uptake by the distal section of <i>M. edulis</i> byssal threads determined by ICP-MS following different treatments. Native refers to untreated thread; EDTA to threads treated with 0.2 M EDTA, pH 8.0; Inc_Fe refers to threads treated with 0.2 M EDTA then incubated in 0.1M CaCl ₂ aqueous solution pH 5.7; Inc_ASW refers to threads treated with 0.2 M EDTA then incubated in artificial sea water
Figure 3.7 Representative stress-strain curves for <i>M. edulis</i> byssal threads (distal section) with and without treatment with 0.2 M EDTA

Figure 3.8 Representative tensile tests for <i>M. edulis</i> byssal threads (distal section) after incubation with different inorganic ions at pH 8.0
Figure 3.9 Total concentration of inorganic ions determined by ICP-MS in the distal section of native and EDTA treated <i>M. edulis</i> byssal threads
Figure 4.1 Molécule de 3,4-dihydroxylphenylalanine (DOPA) avec sites réactifs63
Figure 4.2 La molécule 4-méthylcatéchol (4-MC) commercialisée. (*) Sites réactif. 64
Figure 4.3 Spectral changes accompanying various metal ion addition to 4-MC under aerobic conditions. Metal ion and 4-MC concentrations of 3.3 mMol were used in citrate HEPES buffer (pH 8.0) at 25 °C after 3 hours of incubation
Figure 4.4 Spectral changes accompanying various metal ion addition to 4-MC under aerobic conditions at 25 °C. (a) 4-MC in a citrate/HEPES buffer (pH 8), and to which (b) Zn ²⁺ , (c) Ca ²⁺ , and (d) Fe3 ⁺ ions are added at a concentration of 3.3 mM, as for 4-MC. Inset: plot of the absorbance at 337 nm as a function of time
Figure 4.5 Spectral changes accompanying various metal ion addition on 4-MC in aerobic conditions without buffer at 25°C. Each spectrum was taken after 180 min
Figure 4.6 ITC measurement of the mixing of 4-MC to (a) Fe ³⁺ , (b) Ca ²⁺ , and (c) Zn ²⁺ at pH 8 in a citrate-HEPES buffer, 25°C78
Figure 4.7 FTIR spectra taken in KBr pressed pellets of (a) 4-MC, (b) 4-MC/Fe ³⁺ (molar ratio 2 : 1), and (c) 4-MC/Fe ³⁺ (1 : 1)
Figure 4.8 FTIR spectra taken in KBr pressed pellets of (a) 4-MC, (b) 4-MC/Zn ²⁺ (molar ratio 2 : 1), and (c) 4-MC/Zn ²⁺ (1 : 1)
Figure 4.9 FTIR spectra taken in KBr pressed pellets of (a) 4-MC, (b) 4-MC/Ca ²⁺ (molar ratio 2 : 1), and (c) 4-MC/Ca ²⁺ (1 : 1)

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Proportion en éléments inorganique dans le byssus de Mytilus edulis (exprimée en pourcentage molaire du contenu total). Les valeurs entre parenthèses correspondent aux écarts-types (p <0,05)
Tableau 1.2 Comparaison des propriétés mécaniques de quelques matériaux
Table 3.1 Mechanical properties with standard deviation for M. edulis byssal threads (distal section) with and without treatment with 0.2 M EDTA.56
Table 3.2 Young modulus (MPa) with standard deviation of M. edulis byssal threads (distal section) after 0.2 M EDTA treatment with or without incubation in 0.1M solutions of selected inorganic ions
Table 3.3 Toughness (J·mm ⁻³) with standard deviation of <i>M. edulis</i> byssal threads (distal section) after 0.2 M EDTA treatment, and with or without incubation to 0.1M of selected inorganic ions
Table 4.1 Reaction intermediates assigned to absorption bands identified when 4-MC is in presence or absence of metal ions in citrate-HEPES buffer (pH 8)73
Table 4.2 ITC analyses of the thermodynamic parameters of 4-MC reacting with Fe ³⁺ , Ca ²⁺ and Zn ²⁺ at 25°C in the presence of citrate-HEPES buffer (pH 8)79

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

4-MC	4-méthylcatéchol
Ala	Alanine
Asn	Asparagine
Asp	(Aspartic acid)
ASW	Artificial sea water
ATR	(Attenuated total reflection)
CL	Cristal liquide
Cys	Cystéine
DOPA	3,4-dihydroxyphénylalanine
DTGS	(Deuterated TriGlycine Sulfate)
EDTA	(Ethylene Diamine Tetra Acetic acid)
EDX	(Energy Dispersive X-ray)
Eéle	Énergie électronique
Erot	Énergie rotationnelle
Et	Énergie totale
Evib	Énergie vibrationnelle
Gln	Glutamine
Glu	(Glutamic acid)
His	Histidine
Нур	Hydroxyproline
Ii	Intensité incidente
Inc	Incubation
IR	Infrarouge
Is	Intensité sortante
ITC	(Isothermal Titration Calorimetry)
Lys	Lysine
M.e	Mytilus edulis
MAP	(Mussel Adhesive Protein)
MCT	Mercure Cadmium Tellure
Mefp1	Mytilus edulis foot protein 1
NIR	(Near-infrared)
PréCol	Précollagène
Pro	Proline
RMN-ÉS	Résonance Magnétique Nucléaire de l'État Solide

Ser	Serine
Thr	Thréonine
Tyr	Tyrosine
UV-Vis	UltraViolet-Visible
XPS	(X-ray Photoelectron Spectroscopy)

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

A	Aire de la section transversale du byssus
c	Vitesse de la lumière dans le vide $(3x10^8 \text{m} \cdot \text{s}^{-1})$
Ē	Module de Young
F	Force appliquée (unité= N)
GHz	Gigahertz $(1x10^9 \text{ Hz})$
h	Constante de Planck (6.63x10 ⁻³⁴ m ² kg·s ⁻¹)
K	Constante d'affinité apparente (unité = M^{-1})
K app	Constante d'affinité réelle (unité = M^{-1})
K re	Kilohertz $(1 \times 10^3 \text{ Hz})$
	KiloJoules $(1 \times 10^3 \text{ J})$
Ka	Stability constant
mol 0/	Pourcentage molaire
moi 70	Nanomolaire (unité = 1×10^{-9} mol)
	absorptivité molaire (mol^{-1} cm ⁻¹ L)
p	Variation de l'enthalpie libre (unité = J)
ΔG	Variation de l'enthalpie (unité = I)
ΔΗ	Déformation
3	Detormation molaire (mol I^{-1})
θ	concentration molaite (mol L)
λ	Longueur d'onde (nm)
v	Frequence de radiation electromagnetique (unite = 112 ou s)
σ	Contrainte (unite = MPa)

RÉSUMÉ

Le byssus est un ensemble de fibres protéiques produites par les moules et qui leur permettent de se fixer sur des surfaces solides. Le rôle principal de ces fibres est de permettre au mollusque de résister à l'assaut constant des vagues grâce à leurs propriétés mécaniques telles que l'extensibilité et la rigidité provenant de leurs structure. Le byssus est majoritairement formé de collagène sous la forme de préCols à l'extrémité desquels se trouve une zone riche en histidines reliées entre elles par des liaisons de coordination avec les ions métalliques. L'ensemble est recouvert par une gaine principalement constituée de 3,4-dihydroxyphénylalanine (DOPA) liée à des ions métalliques pour assurer l'intégrité mécanique de cette enveloppe. La chimie du byssus ainsi que ses propriétés mécaniques constituent une source d'inspiration pour la conception de matériaux comme les adhésifs. Mais pour concevoir de meilleurs matériaux biomimétiques, il est judicieux de comprendre l'impact des ions métalliques sur les propriétés mécaniques du byssus. Les objectifs de ce projet étaient d'étudier le rôle des ions métalliques dans la formation et les propriétés mécaniques des fibres de byssus pour le développement de matériaux biomimétiques. Nous avons utilisé la spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif pour étudier l'intégration des ions cibles (Ca²⁺, Zn²⁺ et Fe³⁺) et les tests mécaniques en traction pour déterminer leur effet individuel sur les propriétés mécaniques de la portion distale des brins de byssus de Mytilus edulis. Ensuite, les spectroscopies UV-Visible et infrarouge à transformée de Fourier combinées à la calorimétrie de titration isotherme ont permis d'explorer l'interaction de chaque ion ciblé avec la molécule 3,4-dihydroxyphénylalanine. Les résultats révèlent que l'incubation des fibres natives dans une solution d'acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA) élimine les ions métalliques, entraîne une réduction du module d'élasticité de 70 % et que le Fe³⁺ et le Zn^{2+} se lient plus fortement à la fibre. Il est possible de réintégrer partiellement ces ions mais seule la réintégration partielle de l'ion de Fe3+ à pH 8 induit une augmentation de 34 % du module d'élasticité. Cela est due à la formation du complexes DOPA-Fe³⁺.

Mots Clefs : Byssus, Propriétés mécaniques, Ion inorganique, DOPA, Mytilus edulis

CHAPITRE I

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 Introduction

Au cours des dernières années, le secteur industriel des polymères a manifesté un intérêt croissant pour les biopolymères, comme la soie et le collagène, car ils sont d'origine biologique et compatibles pour des applications biomédicales^[1,2]. De plus, leur caractère biodégradable affecte moins l'environnement contrairement aux polymères synthétisés à partir d'hydrocarbures. La biomasse marine étant riche en biopolymères comme les polysaccharides, les polypeptides et les phytohormones, il est intéressant de promouvoir l'utilisation de cette ressource.

Dans le cadre de ce projet, nous nous sommes intéressés au byssus, un biopolymère marin de la classe des protéines. Cette ressource naturelle provient des moules qui peuplent certains milieux marins. Dans notre cas, nous avons étudié le byssus d'une espèce très répandue au Canada - moule bleue (*Mytilus edulis*)^[3], un mollusque bivalve à la coquille noire-bleuâtre présent dans le golfe du Saint-Laurent^[4].

Au Canada environ 25,000 tonnes de moules sont produites annuellement^[5], mais quelques centaines de tonnes sont rejetées avant la commercialisation. Ces déchets sont des fibres de byssus riches en collagène et pourtant intéressants pour la conception de

biomatériaux^[6]. Récemment, au laboratoire Marcotte, un nouveau matériau à base de ces déchets a été conçu^[7]. Il s'agit des premiers films jamais préparés riches en collagène issu des fibres de byssus. Compte tenu de l'importance du collagène dans le domaine biomédical, sa présence dans les films suscite de nouveaux défis et rehausse le potentiel caché dans la fibre de byssus. Il est donc intéressant de valoriser ces déchets, car ils constituent une source facile d'approvisionnement en collagène. Dès lors, la moule n'est plus considérée comme une espèce marine limitée à sa grande valeur socio-économique d'environ 39M\$^[5], mais elle est également considérée comme une source pour la conception de matériaux.

1.2 Byssus

Le byssus est un assemblage de filaments extracellulaires de nature protéique et majoritairement constitué de collagène^[8,9]. Il permet à la moule de se fixer sur des surfaces ^[9] par une colle appelée plaque ^[8] et de résister aux forces imposées par les courants marins comme les vagues. Cette capacité de la plaque à adhérer aux supports est due à la substance adhésive majoritairement constituée d'une protéine polyphénolique^[10], la *Mytilus edulis foot protein 1*: (mefp1), que sécrète la moule.

Chez la moule bleue (*Mytilus edulis*), les fibres de byssus forment un faisceau constitué de 20 à 200 brins. Ils mesurent environ 2 à 4 cm de long avec un diamètre maximal de 100 μ m^[9,11]. Cependant, les valeurs ne sont pas toujours identiques. Garner *et al.*(2013) ont montré qu'en étudiant les moules *Mytilus edulis* du golfe du Maine, la croissance des moules et la dimension des fibres de byssus dépendaient des conditions environnementales, comme la température, la force des vagues et l'apport nutritif du milieu^[12].

Afin de rester attachée aux substrats, la moule renouvelle continuellement ses brins de byssus, car ils ont une durée de vie limitée d'environ 4 à 6 semaines^[13]. Pour ce faire, le byssus est produit à partir des protéines sécrétées dans le pied de la moule (figure 1.1) sous l'action du muscle rétracteur (figure 1.2).



Figure 1.1 La moule Mytilus edulis. (a) byssus (b) pied de la moule



Figure 1.2 Anatomie de Mytilus edulis (tiré de^[14] avec permission)

La complexité du procédé de production du byssus a été développée par Waite (1992) lorsqu'il a étudié la formation du byssus des moules. D'une manière générale, la moule étend son pied sur une surface solide et pendant près de 5 minutes^[15], elle sécrète une substance protéique par une glande phénolique^[10] située dans son pied. En 2014, Schmidt *et al.*^[16] ont suggéré que la substance protéique précurseure de la fibre de byssus fortement orientée était un cristal liquide (CL) acide (pH 5.5) présent dans les vésicules sécrétrices sous la phase smectique. Ceci faciliterait le procédé de moulage par injection grâce à des contractions musculaires^[17] du pied de la moule. Cependant, l'étape ultime réside dans la transition de la phase cristal liquide à une fibre solide semblable à un cristal liquide élastomère^[16]. Celle-ci s'opère lorsque la substance, après le moulage, entre en contact avec l'eau de mer (pH ~ 8). Chaque fibre ainsi moulée est recouverte d'une gaine protectrice contre d'éventuelles dégradations chimiques et bactériennes^[18].

Pour résister aux perturbations du milieu marin, le byssus possède des propriétés mécaniques exceptionnelles qui combinent à la fois rigidité et extensibilité^[19] variables sur toute sa longueur (figure 1.3). La portion proximale exhibe un comportement élastique similaire à un caoutchouc souple avec une capacité d'extension d'environ 200 % et un module de Young (E) de 50 MPa. Quant à la portion distale, elle exhibe plutôt le comportement rigide d'un nylon avec un module de Young d'environ 500 MPa.

Des études ont décrit le cœur fibreux de chaque brin de byssus comme étant une subdivision de quatre portions qui s'emboitent de manière continue et graduelle. Il s'agit d'abord d'une colonne qui est enfouie dans l'animal, suivie de la portion proximale, ensuite la portion distale et enfin de la plaque adhésive par laquelle la moule se fixe aux supports.

En ce qui concerne la morphologie, le byssus est constitué de deux parties. La première est la gaine connue sous l'appellation "cuticule", puis la deuxième partie est le cœur fibreux.



Figure 1.3 Rigidité (E) du byssus en fonction des portions (adaptée de ^[20] avec permission).

1.3 Structure moléculaire du byssus

Dans la fibre de byssus, les paquets d'hélices appelées préCols sont agencés sous forme de copolymères blocs dans la portion proximale (préCol-P), distale (préCol-D) ou préCol-NG (*non graded*) tout le long de la fibre (figure 1.4a). Chaque copolymère bloc possède dans son domaine central, un domaine de collagène. Ces blocs se différencient l'un de l'autre par des domaines flancs de séquences d'acides aminés analogues à l'élastine aux extrémités du préCol-P, à la fibroïne de soie dans le préCol-D (figure 1.4c) et enfin aux protéines de parois cellulaires végétales dans le preCol-NG.



Figure 1.4 Schéma simplifié du byssus de la moule *Mytilus edulis*^[20,21]. (b) : Portions proximale et distale du byssus (tiré de ^[22] avec permission). (c) : Distribution illustrative des protéines le long de la fibre.

La microscopie de force atomique a montré que dans le cœur de la fibre, les hélices de collagène sont regroupées en paquets $(6+1)^{[22]}$ en forme de banane avec une section transversale qui montre une surface hexagonale formée de sept disques (figure 1.5).



Figure 1.5 A) Assemblage de 6+1 des PréCols en forme hexagonale et B) Ballot de PréCols en conformation banane (adaptée de ^[20] avec permission).

Comme un matériau composite, le byssus tire profit de la présence de différents copolymères blocs dans sa structure pour exhiber de meilleures propriétés, car le préCol-P confère de l'élasticité, le préCol-D apporte la rigidité, tandis que le préCol-NG assure le rôle de médiateur entre l'élasticité et la rigidité. L'analyse détaillée de la composition et la structure de ces préCols sera faite dans les lignes suivantes.

Pour mieux comprendre la relation qui existe entre la structure moléculaire et les propriétés mécaniques du byssus, deux modèles moléculaires basés sur la distribution des préCols ont été proposés. Le premier modèle (A) suggère un arrangement alterné des préCols-D, -P et NG le long de la fibre tandis que dans le deuxième modèle (B), les préCols sont graduellement repartis en exhibant une prédominance par portions (figure 1.6).



Figure 1.6 Gradient de distribution des préCols, le long de la fibre (adaptée de ^[20] avec permission). A) représente le premier modèle et B) le deuxième modèle. PréCol-D (noir), préCol-P (gris pâle) et préCol-NG (gris).

D'après l'étude menée en 2004 par Waite *et al.*,^[20] le modèle moléculaire pouvant représenter de manière significative les propriétés mécaniques du byssus est une distribution continue et graduelle des préCols telle que présentée dans le modèle B (figure 1.6). Dans ce modèle, la distribution des acides aminés primaires varie d'un préCol à l'autre.

À l'extrémité de ces préCols se trouve un domaine riche en histidine qui interagit avec les ions des métaux de transition divalents comme le Zn, Cu et Ni^[23]. Ces interactions lient les différents blocs de préCols et assurent une bonne continuité dans le réseau fibreux comme l'illustre la figure 1.7.



Figure 1.7 Modèle moléculaire simplifié illustrant l'assemblage des préCols dans la portion distale du byssus (modifiée de ^[17]).

En plus des interactions di-3,4-dihydroxyphénylalanine (diDOPA) et ion métalliquehistidine qui lient les préCols, il existe également les ponts disulfures -S-S- qui s'établissent entre deux cystéines appartenant au collagène de préCols juxtaposés ^[24]. Mais seuls les préCols-D et NG peuvent employer ces liaisons disulfures car l'étude comparative entre le byssus de *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis* réalisée en 2002^[25] a révélé l'absence de cystéines (Cys) dans le préCol-P.

Bien que tous les préCol-P, -D, et -NG ont comme constituant commun le motif triple hélice $(Gly-X-Y)_n$ présent dans la structure naturelle du collagène, ils exhibent

néanmoins des différences comme la masse molaire des domaine préCol-P, -D et NG qui sont respectivement 95, 97 et 76 kDa ^[14].

Au niveau des domaines flancs des préCol-P et -D, ils contiennent majoritairement des glycines (Gly) et des alanines (Ala) avec respectivement un pourcentage molaire (mol %) de 50 et 60. Cependant dans le domaine flanc du préCol-P, en plus de la glycine et l'alanine, la proline (Pro), la serine (Ser), la valine (Val) et la phénylalanine (Phe) sont relativement abondantes.



Figure 1.8 Abondance relative des acides aminés dans chaque domaine spécifique de la fibre de byssus de la moule *Mytilus edulis* (tiré et modifié de ^[22] avec permission). Mefp1 : *Mytilus edulis* foot protein 1, PCP : parois cellulaires de plantes.

En dépit de cette faible différence en pourcentage molaire et de l'existence d'autres acides aminés, on note tout de même que la différence marquante entre ces domaines flancs est l'absence d'hydroxyproline (Hyp) dans le domaine flanc du préCol-D^[26]. Quant au préCol-NG, sa distribution n'est pas graduelle et son domaine flanc est plutôt constitué de longues chaînes de polyalanine et de motifs (X-Gly)_n répétitifs où X représente une leucine ou une alanine. Les différences en composition et organisation structurale suscitées confèrent à chaque domaine flanc une structure et des propriétés mécaniques spécifiques. Ainsi, tel que mentionné en 1.3, le domaine flanc du préCol-P a une structure similaire à l'élastine bovine qui confère de l'élasticité à la portion proximale du byssus tout comme l'élastine du coprs humain confère l'elasticité à la peau^[27]. Quant au domaine flanc du préCol-D riche en polyalanine bien organisé, il possède une structure semblable à celle de la soie d'araignée avec des feuillets- β antiparallèles qui contribuent à la rigidité de la fibre^[22]. Cependant, le domaine flanc du préCol-NG a une structure similaire à la paroi des cellules végétales avec des feuillets- β parallèles comme l'ont démontré Arnold *et al*^[22] par résonance magnétique nucléaire de l'état solide (RMN-ÉS).

Quant au bloc collagène de chaque préCol, l'étude réalisée en 1998 par Waite *et al.*^[26] a révélé que le Col-P qui est le bloc de collagène contenu dans le préCol-P mesure 128 nm de long. Il contient 146 tripeptides (Gly-X-Y) consécutifs similaires aux préCol-NG dans lesquels les symboles X et Y représentent n'importe quel acide aminé. Quant au préCol-D, il contient 175 tripeptides (Gly-X-Y) consécutifs. Ces préCols présentent également quelques divergences dans la composition des triplets. L'absence de la glycine dans la 11^e reprise du motif (Gly-X-Y) du Col-P et l'acide aminé X est plutôt une glycine dans le Col-D.

					0.00	0.5	Non-Disco	1000		No. of Concession, name		Add on the lot of the
	GGP	GTP	GNS	GPP	GQP	GLP	GAP	GQP	GRP	GST	• PP	GRL
	GNP	GPP	GQP	GNP	GRP	GSS	GRP	GGS	GQP	GGP	GRP	GTP
	GKP	GNR	GQP	GQP	GGP	GQP	GHP	GAG	GQP	GRN	GNP	GNP
	GKP	GTP	GHP	GTA	GSR	GMP	GTP	GTP	GQP	GIP	GTV	GGR
	GPR	GPA	GII	GLI	GPK	GNP	GEP	GNP	GAP	GGP	GST	GPQ
	GPQ	GPA	GGP	GAS	GGP	GDK	GAP	GTP	GGT	GPR	GPI	GPS
-	GPS	GAP	GDQ	GPQ	GGR	GTP	GLA	GKP	GPK	GLQ	GSN	GEV
	GPQ	GPS	GPA	GPQ	GPQ	GKN	GVK	GAA	GDQ	GAR	GPE	GKA
1	GPA	GPQ	GET	GPK	GPT	GAQ	GPA	GPA	GPS	GEQ	GPG	GER
	GGQ	GPQ	GAE	GPS	GPA	GPR	GPA	GSQ	GPS	GER	GEP	GAP
	GKK	GPN	GDR	GNQ	GSP	GAP	GKN	GAR	GNR	GSR	GSN	GSP
	GRS	GSP	GSR	GKP	GPQ	GPH	GPR	GLR	GSP	GQK	GPR	GDQ
4)	GAP	GVI		-						110103		
~										1		
				Contraction of the		CONCEPTION OF	1000					
	64 C											and a second
	GGP	GQP	GGP	GGP	GGP	GGP	GGP	GME	GGE	GGI	SG	P GT.
	GGP GGP	GQP GQP	GGP GGP	GGP GGP	GGP GGP	GGP GGP	GGP GGP	GMP	GGP	GGI	GGI	P GT • P GMP
	GGP GGP GGP	GQP GQP GGP	GGP GGP GGP	GGP GGP GGA	GGP GGP GGI	GGP GGP ••P	GGP GGP GMT	GMF GMP GPA	GGP GGP	GGI GGI GPA	GGI	P GT • GMP Q GPE
	GGP GGP GGP GEQ	GQP GQP GGP GPR	GGP GGP GGP GRT	GGP GGP GGA •PA	GGP GGP GGI GTP	GGP GGP ••P GPP	GGP GGP GMT GNP	GMP GMP GPA GEP	GGF GGP GPP GQG	GGI GGI GPA GAI	GGI GGI GGI GAI	P GT • P GMP 2 GPE P GAP
	GGP GGP GGP GEQ GHA	GQP GQP GGP GPR GKH	GGP GGP GGP GRT GTA	GGP GGP GGA •PA GAA	GGP GGP GGI GTP GKA	GGP GGP ••P GPP GRP	GGP GGP GMT GNP GPR	GMP GMP GPA GEP GQA	GGF GGP GPP GQG GAS	GGI GGI GPA GAI GSS	GGI GGI GP GAI GQI	P GT • C GMP Q GPE P GAP I GAS
	GGP GGP GGP GEQ GHA GAP	GQP GQP GGP GPR GKH GRP	GGP GGP GGP GRT GTA GNP	GGP GGP GGA •PA GAA GST	GGP GGI GGI GTP GKA GRP	GGP GGP GPP GRP GAT	GGP GGP GMT GNP GPR GDP	GMP GPA GEP GQA GRP	GGP GGP GQG GQG GAS GAT	GGI GGI GPA GAI GSS GTI	GGI GGI GP GAL GQI GRI	P GT • CGMP CGPE CGPE CGPS
	GGP GGP GEQ GHA GAP GAP	GQP GQP GGP GPR GKH GRP GNP	GGP GGP GRT GTA GNP GAP	GGP GGA •PA GAA GST GAL	GGP GGI GTP GKA GRP GAP	GGP GGP GPP GRP GAT GPR	GGP GMT GNP GPR GDP GSP	GMP GPA GEP GQA GRP GFV	GGP GGP GQG GQG GAS GAT GLP	GGI GGF GAF GAS GSS GTT GPF	GGI GGI GGI GAI GAI GAI GAI GAI GAI GAI	P GT • P GMP P GPE P GAP I GAS P GPS P GPS P GEP
	GGP GGP GEQ GHA GAP GAP GAP GNQ	GQP GQP GGP GPR GKH GRP GNP GPI	GGP GGP GRT GTA GNP GAP GGP	GGP GGA •PA GAA GST GAL GYP	GGP GGI GTP GKA GRP GAP GPR	GGP GGP GPP GRP GAT GPR GPQ	GGP GMT GNP GPR GDP GSP GPD	GMP GPA GPA GQA GQA GRP GFV GAM	GGF GGP GQG GQG GAS GAT GLP GPQ	GGI GGF GAF GSS GTT GPF GPC	GGI GGI GGI GAI GQI GQI GGI GDI	P GT • P GMP P GPE P GAP I GAS P GPS P GEP R GAP
	GGP GGP GEQ GHA GAP GAP GNQ GVP	GQP GQP GGP GPR GKH GRP GNP GPI GKQ	GGP GGP GRT GTA GNP GAP GGP GPV	GGP GGA •PA GAA GST GAL GYP GGQ	GGP GGI GTP GKA GRP GAP GPR GPA	GGP GGP GPP GRP GAT GPR GPQ GPR	GGP GMT GNP GPR GDP GSP GPD GPR	GMF GMP GPA GEP GQA GRP GFV GAM GDE	GGF GGP GQG GQG GAS GAT GLP GPQ GPV	GGI GGF GAF GAF GSS GTT GPF GPC	GGI GGI GGI GGI GGI GGI GGI GGI GGI GGI	P GT • O GMP Q GPE P GAP I GAS P GPS P GEP R GAP P GAR
	GGP GGP GEQ GHA GAP GAP GNQ GVP GAD	GQP GQP GGP GPR GRP GRP GNP GPI GKQ GKP	GGP GGP GRT GTA GNP GAP GGP GPV GDK	GGP GGA •PA GAA GST GAL GYP GGQ GPD	GGP GGI GTP GKA GRP GAP GPR GPA GET	GGP GGP GPP GRP GAT GPR GPR GPQ GPR	GGP GMT GNP GPR GDP GSP GPD GPR GPA	GMF GMP GPA GEP GQA GRP GFV GAM GDE GPK	GGF GGP GQG GAS GAS GAT GLP GPQ GPV GQV	GGI GGP GAP GAP GSS GTT GPF GPF GPK GDC	GGI GGI GGI GGI GGI GGI GGI GGI GGI GGI	P GT • O GMP O GPE O GAP I GAS O GPS O GPS O GEP O GAP O GAR O GAK
	GGP GGP GEQ GHA GAP GAP GNQ GVP GAD GET	GQP GQP GGP GRR GRP GRP GPI GKQ GKP GDQ	GGP GGP GRT GTA GNP GAP GGP GDK GAR	GGP GGA •PA GAA GST GAL GYP GGQ GPD GEA	GGP GGI GTP GKA GRP GAP GPR GPA GET GKA	GGP GGP GPP GRP GAT GPR GPQ GPR GPQ GEQ	GGP GMT GNP GPR GDP GPD GPD GPR GPA GPG	GMF GPA GPA GPA GQA GRP GFV GAM GDE GPK GIQ	GGF GGP GQG GAS GAT GLP GPQ GPV GPV GPV GPX	GGI GGP GAP GAP GSS GTT GPF GPC GPK GDC GPK	GRI GQF GQF GQF GQF GQF GQF GQF GQF GQF GQF	P GT • P GMP P GAP P GAP I GAS P GPS P GEP R GAP P GAR P GAK P GPA
	GGP GGP GEQ GHA GAP GAP GNQ GVP GAD GET GPA	GQP GQP GGP GRR GRP GNP GPI GKQ GKP GDQ GPL	GGP GGP GRT GTA GNP GAP GDV GDK GAR GPQ	GGP GGA •PA GAA GST GAL GYP GGQ GPD GEA GPM	GGP GGI GTP GKA GRP GPR GPR GPA GET GKA GER	GGP GGP GPP GRP GAT GPR GPQ GPR GPQ GEQ GPQ	GGP GMT GNP GPR GDP GSP GPD GPR GPA GPG GPT	GMP GPA GEP GQA GRP GFV GAM GDE GPK GIQ GSE	GGF GGP GQG GQG GAS GAT GLP GPQ GPV GPV GPK GPV	GGI GGP GAE GAE GF GP GP GP GP GP GP GP GP GP GP	GRI GRI GRI GRI GRI GRI GRI GRI GRI GRI	P GT • P GMP P GAP P GAP I GAS P GEP R GAP P GAR P GAR P GAK P GAK P GAK P GAK P GAK P GAX
	GGP GGP GEQ GHA GAP GAP GNQ GVP GAD GET GPA GDQ	GQP GQP GGP GPR GRP GNP GNP GNP GKQ GKQ GDQ GPL GAQ	GGP GGP GRT GTA GNP GAP GDV GDK GAR GPQ GDQ	GGP GGA •PA GAA GST GAL GYP GGQ GPD GEA GPM GAT	GGP GGI GTP GKA GRP GAP GPA GET GET GER GER GAD	GGP GGP GPP GRP GAT GPR GPQ GPR GPQ GPQ GPQ GKK	GGP GMT GNP GPR GDP GPD GPD GPR GPA GPG GPT GEP	GMP GPA GEP GQA GRP GFV GAM GDE GPK GIQ GSE GER	GGF GGP GQG GAS GAT GLP GPQ GPV GPV GPV GPV GPV GQV	GGI GGP GAP GAP GP GP GP GP GP GP GP GP GP GP GP GAP	GGI GGI GGI GGI GGI GGI GGI GGI GGI GGI	P GT • P GMP P GAP P GAP I GAS P GPS P GEP R GAP P GAR P GAR P GAR P GAR P GAR P GAR P GAR P GAS P GPS P G
	GGP GGP GEQ GHA GAP GAP GNQ GVP GAD GET GPA GDQ GPR	GQP GQP GGP GRP GRP GPI GRQ GKP GDQ GPL GAQ GDR	GGP GGP GRT GTA GNP GAP GDV GDK GAR GPQ GDQ GAK	GGP GGA •PA GAA GST GAL GYP GGQ GPD GEA GPM GAT GIQ	GGP GGI GTP GKA GRP GPR GPR GPA GET GET GER GER GAD GSR	GGP GGP GPP GRP GAT GPR GPQ GPR GPQ GPQ GPQ GRK GRP	GGP GMT GNP GPR GDP GPD GPD GPR GPA GPT GEP GEM	GMP GPA GEP GQA GRP GFV GAM GDE GPK GIQ GSE GER GER	GGF GGP GQG GAS GAT GLP GPQ GPV GPV GPV GPV GQQ GNR	GGI GGP GAP GAP GPC GPC GPC GPC GPC GAP GAP GAP GAP	GRI GGI GGI GGI GGI GGI GGI GGI GGI GGI	P GT • P GMP P GAP P GAP I GAS P GPS P GAR P GAP P GAR P
	GGP GGP GEQ GHA GAP GNQ GVP GAD GET GPA GDQ GPR GET	GQP GQP GGP GRP GRP GPI GRQ GPI GDQ GDQ GDQ GDR GDD	GGP GGP GRT GTA GNP GAP GDV GDK GAR GPQ GDQ GAK GNQ	GGP GGA •PA GAA GST GAL GYP GGQ GPD GEA GPM GAT GIQ GQR	GGP GGI GTP GKA GRP GPR GPA GPA GET GKA GET GAD GSR GEQ	GGP GGP GPP GAT GPR GPQ GPQ GPQ GPQ GPQ GRK GRP GAP	GGP GMT GNP GPR GPD GPD GPR GPA GPA GPT GEP GCM GVI	GMP GPA GEP GQA GRP GFV GAM GDE GPK GIQ GSE GER GER GRR	GGF GGP GQG GAS GAT GLP GPQ GPV GPV GPV GPV GPV GQQ GNR	GGI GGF GAF GAF GTT GPF GPC GPK GAF GAA GAA GSC	 SGI GGI GGI GQI GQI	P GT • O GMP O GPE P GAP H GAS P GPS P GPS P GAR P GAR P GAR P GAR P GAR P GAR P GAR P GPA C GSV 7 GRP 7 GPR

Figure 1.9 Séquence des tripeptides de collagène : A) préCol-P, et B) préCol-P (tirée de ^[26] avec permission).

La partie fibreuse est entourée d'une gaine protectrice plus rigide que le cœur de la fibre ^[28]. La proteine mefp1 dont elle est constituée est non structurée et a une masse d'environ 110 à 115 kDa ^[11,14,22]. Cette protéine soluble en milieu acide est constituée d'une répétition de 85 hexapeptides (Ala-Lys-Pro-Tyr-Hyp-Lys) et décapeptides (Ala-

Lys-Pro-Ser-Tyr-Hyp-Hyp-Thr-DOPA-Lys), la DOPA etant issue de l'hydroxylation post-traductionnelle de la tyrosine.

La DOPA contenue dans ces protéines a plusieurs rôles. Dans la mefp1, elle se lie aux ions des métaux de transition comme Fe³⁺ pour former des complexes ion métalliquecatécholates qui contribuent à la rigidification et l'élasticité de la gaine.^[28] Dans la mefp3, la DOPA joue un rôle clé dans la fixation des pieds de moules aux supports solides^[29]. En fait, la DOPA peut egalement former des liaisons diDOPA et interagir avec les acides aminés ou autres groupes fonctionnels voisins comme les aminés dans le but de stabiliser l'adhésion de la plaque au support.^[30] La figure 1.10 ci-dessous illustre les différentes réactions dans lesquelles intervient la DOPA.



Figure 1.10 Différentes adhésion et cohésions de la DOPA dans la moule (tirée de ^[30] avec permission).

Récemment, la proportion totale de la DOPA et d'acides aminés présents dans le byssus de *Mytilus edulis* ont été déterminées par notre groupe de recherche ainsi que les ions inorganiques^[31]. La DOPA et l'histidine sont connues pour leur capacité à influencer les propriétés mécaniques du byssus, car elles se lient avec les ions inorganiques. Ces deux molécules intéressantes représentent respectivement 0,5 et 3,0 % de la teneur

totale en acides aminés présent dans le byssus, mais les acides aminés les plus abondants sont la glycine, l'alanine et la proline (figure 1.8)^[31].

Dans le byssus de *Mytilus edulis*, les ions inorganiques présents sont subdivisés en 3 groupes. Le groupe A comprend les éléments les plus abondants avec un pourcentage au moins égal à 2 % du contenu total. Le groupe B concerne les éléments ayant une abondance entre 0.01 à 2 % tandis que dans le groupe C, il s'agit des éléments ayant une abondance inférieure à 0.01 %. Les différents éléments inorganiques detectés sont regroupés dans le tableau 1.1.

Tableau 1.1 Proportion en éléments inorganique dans le byssus de *Mytilus edulis* (exprimée en pourcentage molaire du contenu total). Les valeurs entre parenthèses correspondent aux écarts-types (p < 0.05). (Adapté avec permission)^[31].

					gro	upe A					
В		Fe		Al	N	⁄lg	Ca		Mr	1	K
2.0		18.0		8.0	1	0.0	20.0)	40.0	0	2.0
(0.1)		(1.0)		(1.0)	(1	.0)	(3.0)	(5.0))	(0.2)
					gro	oupe B					
Ti	V	Cr		Ni	Cu	Zn	Sn		Sr	Mo	Ba
0.20	1.1	0.1		1.1	0.2	4.00	0.00	8	0.1	0.1	0.04
(0.05)	(0.1)	(0.01)	(0.07)	(0.03)	(0.02)	(0.00	6)	(0.01)	(0.01)	(0.002)
					gro	oupe C					
Be	Co	As	Se	Ag	Cd	Sb	Pb	U	Rb	TI	Hg
				2	c10 ⁻³					2	×10 ⁻⁵
1.1	27	11	7	14	1.0	3.0	6	33	4.5	4	12
(0.1)	(1)	(1)	(1)	(8)	(0.1)	(0.2)	(1)	(3)	(0.5)) (2)	(9)

Les études réalisées par Holten-Andersen *et al.*^[32] puis Schmitt *et al.*^[23] ont montré que les ions des éléments fer, zinc, cuivre et nickel se liaient à des acides aminés comme la

DOPA majoritairement concentrée dans la gaine, et l'histidine présente dans le cœur de la fibre. Ces interactions jouent un rôle important au niveau des propriétés mécaniques globales résultant d'une part de la gaine et d'autre part du cœur fibreux. En fait, les liaisons de coordination qui se forment entre la DOPA et les ions métalliques permettent de rigidifier la gaine du byssus. Schmitt *et al.*^[33] ont montré que le fer, l'aluminium et le vanadium interagissent avec la DOPA afin de contribuer à cette rigidification. Mais parmi ces éléments, le fer contribue plus à la rigidité que l'aluminium et bien plus que le vanadium. Quant à l'histidine, elle établit des liaisons sacrificielles avec les ions zinc, cuivre et nickel qui rigidifient plutôt le cœur du byssus et modulent son aptitude d'auto-guérison. En fait, lorsque le byssus est soumis à une contrainte externe, la fibre s'étire et les liaisons sacrificielles se rompent. Mais lorsque la contrainte est levée, les liaisons sacrificielles se reconstituent. On parle ainsi de liaisons sacrificielles réversibles.

La complexité de la structure du byssus telle que précédemment décrite montre que ce matériau naturel se présente comme un matériau composite. L'étude réalisée en 2002 sur les fibres protéiques^[34] a révélé que la résistance et l'extensibilité du byssus étaient uniquement surpassées par celles de la soie d'araignée. Cependant cette étude révèle également que la ténacité du byssus est tout de même comparable à celle des fibres synthétiques de Kevlar ^[34] et de carbone bien connues et largement utilisées dans l'industrie textile, pneumatique, aéronautique ou balistique.

Matériau	Module E _{init} (GPa)	Force σ_{max} (GPa)	Extensibilité _{Emax}	Ténacité (MJ·m ⁻³)
Élastine (ligament de bovin)	0.0011	0.002	1.5	1.6
Collagène (tendon de mammifère)	1.2	0.12	0.13	6
Byssus, portion distale (M.californianus)	0.87	0.075	1.09	45
Byssus, portion proximale (M.californianus)	0.016	0.035	2.0	35
Fil de trame (A. diadematus)	10	1.1	0.3	160
Kevlar	130	3.6	0.027	50
Fibre de carbone	300	4	0.013	25

Tableau 1.2 Comparaison des propriétés mécaniques de quelques matériaux^[34].

Dès lors, la haute ténacité de ce système biologique a attiré l'attention des scientifiques et suscité des recherches afin d'explorer la relation qui existe entre sa structure et ses propriétés mécaniques^[8,17,20,35]. De plus, les différents procédés chimiques présents dans le byssus sont devenus également des sources d'inspiration pour la conception des matériaux biomimétiques comme les adhésifs. En effet, Lee *et al.*(2007) se sont inspirés de la chimie présente dans la plaque du byssus pour synthétiser une colle adhésive capable de faire prise sur des surfaces sèches ou mouillées^[36]. En 2013, d'autres scientifiques comme Barrett *et al.* ont synthétisé des gels et hydrogels^[37–39] en s'inspirant de l'interaction entre les ions métalliques et l'histidine ou les catéchols comme la DOPA présents dans le byssus de la moule. Ces matériaux ont des applications potentielles dans le domaine biomédical. Nous pouvons également citer le revêtement multifonctionnel à base de polymères dendritiques synthétisés par Wei *et* *al.*^[40] ainsi que des peptides synthétiques ayant des capacités d'auto-guérison^[16]. Enfin, Byette *et al.*^[7] ont récemment fabriqué les films auto-assemblés sensibles au pH environnant et exhibant des capacités d'auto-assemblage. Contrairement aux autres matériaux précédemment cités qui s'inspiraient uniquement de la chimie du byssus, le nouveau matériau fabriqué au laboratoire Marcotte intègre, dans sa composition, des protéines d'hydrolysées et extraites directement des fils d'ancrage de la moule.

Parmi les matériaux susmentionnés et dont la liste est non exhaustive, il ressort que le pH environnant influence indirectement les propriétés fonctionnelles desdits matériaux en agissant particulièrement sur l'interaction entre la protéine et l'ion métallique. En effet, à une valeur de pH ciblée, ces interactions réticulent le réseau moléculaire du matériau en formant des complexes. Ces complexes modifient la structure moléculaire et modulent les propriétés mécaniques et dynamiques du matériau^[41]. Ce constat nous montre que la performance fonctionnelle d'un biomatériau inspiré du byssus dépend entre autres des ions métalliques présents. Ce point de vue est également soutenu par les travaux réalisés sur le byssus natif qui révèlent une baisse de la rigidité de la fibre en l'absence d'ions métalliques [32]. En fait, Holten-Andersen et al. [32] ont montré que l'utilisation d'un agent chélatant comme l'acide éthylène-diamine-tétraacétique (EDTA) permet d'extraire les ions des éléments inorganiques Fe et Ca contenus dans la mefp1 de la gaine. Ils ont aussi montré que l'extraction de ces ions qui forment des complexes avec la DOPA, entraine 50 % de perte de rigidité de la gaine. Il est donc évident que l'absence de ions métalliques fragilise le réseau moléculaire de la gaine et son intégrité mécanique.

1.4 Objectifs de travail

Les résultats obtenus des travaux effectués en 2013 par Séguin-Heine *et al.*^[42] ont montré que les propriétés mécaniques du byssus sont influencées par les ions métalliques présents. Les auteurs ont également montré qu'il existe des ions métalliques comme Mo et Ca dont la variation de proportion esr en lien avec la résistance de la fibre. À cette liste, on pourrait également ajouter les ions métalliques $Fe^{[32]}$ et $Zn^{[16]}$ tel que vu précédemment. Mais bien que la présence de ces ions métalliques influence la rigidité de la fibre, leurs contributions individuelles à la performance mécanique de la fibre restent non explorées.

Ce projet a donc pour but général d'approfondir nos connaissances sur l'implication des ions métalliques dans le mécanisme d'assemblage moléculaire des fibres de byssus et leur influence sur les propriétés mécaniques. Il s'agit d'une recherche fondamentale pouvant contribuer au design de matériaux biomimétiques.

Pour ce faire, l'hypothèse de notre recherche repose sur le fait que la proportion des ions métalliques dans la fibre serait sélective.

Donc plus spécifiquement, nous avons exploré :

- La contribution sur les performances mécaniques des fibres de byssus de M.
 edulis, d'ions divalents (Zn²⁺, Ca²⁺) et multivalent (Fe³⁺).
- La sélectivité d'intégration de ces ions inorganiques par des fibres de M. edulis.
- L'interaction des ions métalliques avec les catéchols (DOPA) contenus dans la cuticule. Pour ce faire, nous avons utilisé la molécule 4-méthylcatéchol afin d'orienter ces interactions sur les sites hydroxyle (OH) de manière similaire à ce qui se passe sur la DOPA dans le byssus.



Figure 1.11 4-méthylcatéchol avec sr : site réactif, snr : site non réactif et engagé dans la liaison peptidique.

1.5 Méthodologie

Pour mieux comprendre l'implication des ions métalliques dans le mécanisme d'assemblage moléculaire des fibres de byssus de *M. edulis* lui conférant ses propriétés mécaniques, la contribution de chaque métal sur les performances mécaniques des fibres a été étudiée de la manière suivante :

La démarche consiste à utiliser une solution d'EDTA pour éliminer le maximum de ions métalliques de la fibre de byssus de *M.edulis*. Ensuite, nous avons intégré séparément les ions de différentes valences en incubant les fibres dans des solutions de Ca^{2+} , Zn^{2+} ou Fe^{3+} . Leurs concentrations dans la fibre ont été mesurées par ICP-MS (spectrométrie de masse à plasma couplé par induction). Le choix des ions fer et zinc se justifie par leur influence connue sur les propriétés mécaniques du byssus. Quant à l'ion calcium, il a été choisi car il compte parmi les ions divalents les plus abondants dans le byssus et l'eau de mer.

La contribution de chaque ion sur les propriétés mécaniques de la fibre a été évaluée à l'aide d'un l'instrument d'étude des matériaux en traction (instron). Cet instrument permet d'obtenir des courbes de contrainte-déformation à partir desquelles il est possible d'extraire des informations sur les propriétés mécaniques des fibres comme le module d'élasticité, la contrainte à la rupture, la déformation ultime et l'énergie à la
rupture. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux des fibres de byssus partiellement dépourvues d'ions inorganiques.

Quant à la sélectivité d'intégration des ions inorganiques par la fibre, la raison d'être de cette étape repose sur l'hypothèse suivante : la fibre intégrerait les ions de manière sélective pour une performance mécanique maximale qui serait l'effet d'une combinaison d'ions présents. Pour vérifier cette assertion, les fibres traitées préalablement à l'EDTA ont été incubées dans une solution contenant un mélange d'ions choisis afin de vérifier si l'intégration est sélective. La concentration totale d'ions insérés dans la fibre a été determinée par ICP-MS.

Voici les mélanges d'ions étudiés :

- Fer et calcium, car Holten-Andersen *et al.*^[32] ont montré en 2009 que l'extraction de ces ions diminue de 50 % la rigidité de la gaine du byssus de *Mytilus galloprovincialis*.
- Fer et zinc, car Vaccaro *et al.*^[43] ont montré que l'élimination du zinc, cuivre et fer dans *Mytilus galloprovincialis* a un effet négatif sur les propriétés mécaniques de la fibre.

À propos de l'étude à faire concernant les ions métalliques qui interagissent avec les catéchols contenus dans la cuticule, nous avons utilisé les techniques d'analyse comme la spectroscopie ultraviolet-visible, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier et la calorimétrie de titration isotherme (ITC). Les deux premières techniques permettent de suivre les modifications survenues à l'échelle moléculaire tandis que la troisième technique permet d'accéder aux paramètres thermodynamiques liés à ces modifications. La démarche consiste à analyser la molécule 4-méthylcatéchol en absence/présence de chaque ion cible (Ca²⁺, Zn²⁺, Fe³⁺) afin d'identifier les modifications dues à chaque ion.

Le chapitre II sera consacré à la méthode expérimentale et décrit le principe et le fonctionnement des instruments utilisés. Le chapitre III présentera l'effet individuel des ions métalliques sur les propriétés mécaniques du byssus de la moule bleue. Quant au chapitre IV, il présentera l'étude de l'interaction de quelques ions métalliques avec la DOPA majoritairement présente dans la gaine. Enfin, le chapitre V présente la conclusion générale de ce projet et les perspectives.

CHAPITRE II

CONCEPTS THÉORIQUES DES TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

2.1 Spectroscopie Ultraviolet-Visible (UV-Vis)

2.1.1 Principe de la spectroscopie UV-Vis

La technique d'analyse par spectroscopie UV-Vis exploite les fréquences dont les longueurs d'onde s'étendent de 10 nm à 400 nm pour l'ultraviolet (UV), puis de 400 à 800 nm, la région du spectre dans laquelle l'absorption des radiations par une molécule donne des couleurs visibles à l'œil nu.

Dans le domaine UV-Vis, l'interaction d'une onde électromagnétique avec la matière se fait particulièrement avec les électrons de valence engagés dans les liaisons des molécules. Lorsqu'une onde électromagnétique caractérisée par une longueur d'onde λ , une fréquence v et une énergie irradie une molécule, cette dernière l'absorbe à condition qu'il existe dans la molécule, une transition électronique requérant cette énergie. L'énergie associée à cette transition est appelée énergie électronique $E_{éle}$. La transition entre deux niveaux électroniques s'effectue par une absorption. L'absorption décrit le passage d'un électron de valence d'une orbitale à l'état fondamental (faible énergie E_0) vers une orbitale énergiquement plus élevée E_1 dite état excité^[44].



Figure 2.1 Schéma simplifié et illustratif de l'absorption d'une onde électromagnétique du domaine UV-Vis par une molécule organique.

Concrètement, la mesure quantitative de l'absorption d'un rayonnement monochromatique par la matière est expliquée par la loi de Beer-Lambert. Celle-ci tient compte de l'intensité incidente I_i du rayonnement sur la substance de concentration molaire C et l'intensité sortante I_s après le parcours optique l.



Figure 2.2 Baisse de l'intensité du rayonnement incident après diffusion à travers une substance d'absorptivité molaire β (mol⁻¹ cm⁻¹ L), concentration molaire θ (mol L⁻¹) et une cuve d'épaiseur *l*.

L'intensité du rayonnement sortant est exponentiellement atténuée et s'exprime de la manière suivante

$$I_s = I_i e^{-\beta l \theta} \tag{2.1}$$

Cette équation peut se réécrire comme suit :

$$Log(I_i / I_s) = \beta l \Theta = -Log T$$
 (2.2)

où l'absorbance (A) ou densité optique

$$(A) = Log(I_i / I_s) \tag{2.3}$$

La transmittance (T) est le rapport de l'intensité sortant par rapport à l'incidente et le pourcentage de transmittance est donnée par la relation suivante :

% transmittance (% T) = 100
$$\frac{I_s}{I_i}$$
 (2.4)

A et T sont des grandeurs sans dimension.

La loi de Beer-Lambert précédemment établie dans les équations 2.1 à 2.3 est largement exploitée pour déterminer la concentration d'une molecule ou sa pureté dans un mélange.

2.1.2 Transitions électroniques

L'absorption des photons est liée à la présence des chromophores dans une molécule (HO-, C=C, C=O, C=C, C=N C=N). Le diagramme d'énergie ci-dessous présente les principales transitions électroniques rencontrées dans la plupart des molécules organiques.



Figure 2.3 Diagramme d'energie des différentes transitions électroniques et leurs notations.

Dans le cadre de ce projet, nous sommes intéressés aux les transitions électroniques des chromophores (C=C, C=O et C-O) de la molécule 4-méthylcatéchol.

2.1.3 Instrument

L'appareil utilisé pour les analyses UV-Vis est un spectromètre à double faisceau dont le principe de fonctionnement est indiqué dans le schéma de la figure 2.4. On distingue cinq éléments importants à savoir : une source lumineuse, un monochromateur suivi d'un dispositif de dispersion, puis le compartiment de la cellule et enfin le détecteur^[45]. Pour couvrir le domaine 190 nm à 800 nm, la source lumineuse est constituée de deux lampes : une lampe à décharge au deutérium exploitée dans le domaine 190 à 400 nm, puis une lampe à filament de tungstène dans le domaine allant de 350 à 800 nm.



Figure 2.4 Schéma de principe d'un spectrophotomètre à double faisceau ^[45]

Le monochromateur est un dispositif constitué d'une fente d'entrée et une fente de sortie, entre lesquelles se trouve un système dispersif (réseau). Le monochromateur permet de filtrer les rayonnements polychromatiques de la source afin d'obtenir des radiations monochromatiques d'intérêt. Celles-ci sont ensuite séparées en deux par le diviseur de faisceau et pendant que l'un traverse le compartiment contenant la cuve de référence, l'autre traverse la cuve contenant l'échantillon à analyser. L'ensemble des faisceaux émergeants des cuves sont captés par le détecteur et les signaux sont transférés au système de traitement des données. La procédure et les paramètres utilisés dans cette technique pour l'analyse des échantillons seront présentés dans la section 4.5 du chapitre IV.

2.2 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Le rayonnement infrarouge (IR) fut découvert en 1800 par Frédéric Wilhelm Hershel^[46]. Cette technique d'analyse permet obtenir des informations sur la structure

moléculaire (liaisons chimiques, fonctions chimiques) de composés ayant une variation du moment dipolaire électrique^[47].

2.2.1 Principe de l'infrarouge

Le principe de cette technique repose sur l'absorption d'un quantum d'énergie hv qui perturbe la structure interne du composé (niveaux électroniques, angles et longueurs de liaison). Le quantum d'énergie absorbée provoque des mouvements de vibration pouvant être modélisés en s'inspirant des oscillateurs harmoniques. La fréquence de vibration est alors donnée par la loi de Hooke :

$$v_{vib} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}; \ \mu = \left(\frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2}\right)$$
 (2.5)

Où : k (N.m⁻¹) est la constante de raideur du ressort qui constitue l'oscillateur harmonique; μ : la masse réduite du système harmonique; m_1 et m_2 représentent la masse des atomes impliqués dans la liaison chimique.

L'énergie associée à ce système harmonique est donnée par l'expression ci-dessous :

$$\Delta E_{vib} = h\nu(V + \frac{1}{2}) \tag{2.6}$$

Où : h est la constant de Planck (6,63x10⁻³⁴ J s); υ la fréquence (Hz) et V le nombre quantique de vibration. Dans l'état non excité V = 0

La large bande spectrale de l'infrarouge est subdivisée en trois domaines à savoir : le proche infrarouge : 0,8 - 2,5 μ m (12500 à 4000 cm⁻¹) caractéristique des mouvements harmoniques d'une liaison au sein des composés. Le moyen infrarouge 2,5 - 50 μ m

(4000 à 200 cm⁻¹) cible les modes de vibrations fondementaux et l'infrarouge lointain, et 50 - 1000 μ m (200 à 10 cm⁻¹) concerne les mouvements de rotation^[48].

2.2.2 Fonctionnement du spectromètre

Ce spectromètre est constitué de cinq parties principales, à savoir :

- Une source lumineuse qui émet sur une large gamme du domaine infrarouge, afin de faciliter les mesures d'absorption de l'échantillon sur une grande plage énergétique.
- L'interféromètre de Michelson qui permet de générer les interférences.
- Un compartiment permettant de fixer différents types de porte-échantillons en fonction de la méthode d'analyse à utiliser (transmission ou réflexion totale atténuée).
- Des détecteurs ou capteurs photosensibles : DTGS (Deuterated Tri-glycine Sulfate) un détecteur pyroélectrique ou MCT (Mercure Cadmium Tellure) un détecteur photoélectrique.
- Le module de traitement des données pour afficher le spectre.

2.2.3 Analyse des echantillons par transmission

Cette méthode consiste faire passer un faisceau infrarouge à travers l'échantillon porté par un support généralement transparent à l'infrarouge comme le bromure de potassium (KBr), séléniure de zinc (ZnSe), fluorure de calcium (CaF₂) ou fluorure de baryum (BaF₂). Puis, on mesure la fraction d'énergie lumineuse ayant traversé l'échantillon en exploitant la formule de la transmittance ainsi que son pourcentage % T précédemment défini par l'équation 2.4. Dans ce projet, les analyses en infrarouge sont réalisées suivant la méthode par transmission et la procédure utilisée pour l'analyse des échantillons sera présentée dans la section 4.5 du chapitre IV.

2.3 Spectrométrie de masse à plasma couplé par induction (ICP-MS)

L'ICP-MS est une méthode d'analyse instrumentale qui permet de séparer, identifier et quantifier en quelques minutes 50 à 70 ions inorganiques d'un composé en fonction de leur rapport masse/charge (m/z)^[49]. Cette technique d'analyse combine à la fois une torche à plasma *(Inductif Coupled Plasma)* et un spectromètre de masse (MS). La limite de détection de la spectrométrie de masse à plasma couplé par induction est de l'ordre du ng L⁻¹. Le principe de fonctionnement de cet instrument repose sur l'ionisation des constituants à l'aide d'une torche à plasma et l'identification de ces ions à l'aide d'un spectromètre de masse quadripôle.

Dans le cadre de ce travail, l'ICP-MS a permis la détermination de la concentration des ions inorganiques d'intérêt dans les brins de byssus. Cette analyse se fait en quatre phases essentielles à savoir : introduction et nébulisation de l'echantillon, puis ionisation, phase de séparation en masse et enfin la détection. L'échantillon à analyser sous forme de solution est introduit dans la zone de vaporisation où le nébuliseur la transforme en un aérosol dans un jet d'argon. Ensuite, l'aérosol de fines gouttelettes est acheminé dans un plasma généré par couplage inductif dans un flux d'argon à haute température (6 000 à 10 000 K) ^[50] qui permet de dissocier, atomiser et ioniser les ions inorganiques présent dans l'échantillon. Ces différents ions chargés positivement traversent ensuite l'analyseur à quadripôle où ils sont séparés en fonction de leur masse (m) et de leur charge (z) puis captés par le détecteur.

2.4 Titration calorimetrique isotherme (ITC)

1

La calorimétrie de titration isotherme est une technique d'analyse physico-chimique réalisée à température constante. Elle permet d'étudier l'interaction entre deux molécules en milieu liquide sans utiliser un marqueur. Cette technique consiste à mesurer la chaleur mise en jeu dans une interaction moléculaire et à déterminer les paramètres thermodynamiques associés comme la constante d'association à l'équilibre (K_a) , la stechiométrique de la réaction (n), l'enthalpie (ΔH) et l'entropie (ΔS) .

Considérons l'ion inorganique (M), le ligand (L) et K_a la constante d'association liée à la formation du complexe (ML). À l'équilibre, l'équation de la réaction est la suivante :

$$M + L \xrightarrow{\kappa_a} ML \tag{2.7}$$

Les équations suivantes liées à la rélation 2.7 permettent de déduire la constante d'association (K_a), l'enthalpie (Δ H) et l'entropie (Δ S).

$K_a = [ML]/[M][L]$	(2.8)

```
\Delta G = -RT ln K_a \tag{2.9}
```

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \tag{2.10}$$

L'ITC est exploitée dans plusieurs domaines comme la biologie cellulaire, la biochimie ou la chimie. Les interactions principalement étudiées sont des liaisons formées entre les protéines^[51] ou dans une métalloprotéine^[52,53]. Pour étudier l'interaction entre les ions inorganiques présentés au chapitre IV, nous avons utilisé l'appareil MicroCal VP-ITC et les expériences ont eu lieu *in vitro* dans des conditions bien définies pour enregistrer facilement les moindres changements thermiques.



L'appareil est constitué de trois parties essentielles comme l'illustre la figure 2.5

Figure 2.5 Schéma simplifié de la titration calorimetrique isotherme [54]

- La seringue d'injection : elle contient de préférence la molécule ayant le plus petit poids moléculaire. Ce dispositif permet d'introduire des volumes précis de son contenu dans la cellule qui contient le ligand. Dans notre projet, les ions inorganiques d'intérêt étaient dans la seringue tandis que le 4-méthylcatéchol (le ligand) était dans la cellule.
- Les cellules : la cellule de référence contient l'eau ou la solution tampon qui sert également de solvant pour les échantillons à analyser. La deuxième cellule contient l'échantillon (4-méthylcatéchol) utilisé dans le cadre de ce projet. Pour détecter la chaleur absorbée ou dégagée de chaque cellule, des détecteurs sont fixés. Ceux-ci déterminent la différence de chaleur entre les cellules et permettent de mieux apprécier la chaleur exacte impliquée dans l'interaction moléculaire. Mais pour mesurer rigoureusement la différence de température entre les deux cellules, ces derniers sont contenus dans un calorimètre. Ce compartiment adiabatique permet de maintenir de manière constante et rigoureuse la température interne provenant des cellules.

• Le dispositif d'acquisition et de traitement des données permet d'enregistrer les signaux caractéristiques de la chaleur mise en jeu lors de l'injection de l'ion inorganique dans le ligand. Les données enregistrées sont numérisées par un logiciel et traitées avec différents modèles mathématiques permettant d'établir la meilleure courbe de simulation. Enfin, ces courbes sont exploitées pour déterminer les paramètres thermodynamiques d'intérêt comme l'enthalpie et la constante d'affinité.

La procédure expérimentale pour l'analyse des échantillons sera présentée dans la section 4.5 du chapitre IV.

2.5 Proprietés mécaniques

Plusieurs méthodes peuvent être exploitées pour étudier les propriétés mécaniques des biomatériaux. Dans le cas de la fibre de byssus, le choix de la méthode est guidé par les paramètres recherchés et les conditions de mesure à savoir :

- Lors de la mesure, la fibre doit être hydratée ou immergée, comme dans le milieu naturel.
- La méthode doit être assez sensible pour appliquer une petite déformation et mesurer une faible contrainte.
- La morphologie (longueur et diamètre) de la fibre doit permettre de s'insérer facilement dans l'instrument et faciliter les mesures.

Les méthodes communément utilisées pour déterminer les paramètres mécaniques des fibres biologiques sont (1) les tests mécaniques en traction, (2) l'analyse mécanique dynamique ou DMA (*Dynamic Mechanical Analysis*), et (3) l'indentation.

Les tests mécaniques en traction sont une méthode réalisée en mode statique^[18] et à température constante, tandis que la méthode DMA (*Dynamic Mechanical Analysis*) permet de réaliser des mesures dans un intervalle de température. La particularité de cette méthode repose sur sa capacité à réaliser des mesures en mode dynamique et d'accéder à la température de transition vitreuse (Tg)^[3] qui rend compte du degré de réticulation du réseau moléculaire. Ces deux méthodes sont limitées à l'usage des échantillons ayant une morphologie leur permettant d'être fixés et maintenus entre les pinces de l'instrument. Lorsque le matériau à étudier est trop fin et difficile à maintenir entre les pinces, la méthode par indentation via un microscope à force atomique (AFM, *Atomic Force Microscopy*) est une méthode appropriée^[55–57]. Dans le cadre de notre projet, les propriétés mécaniques des fibres étudiées au chapitre III sont mesureés réalisées par des tests mécaniques en traction et les paramètres recherchés sont : la contrainte et l'élongation à la rupture, le module Young et l'énergie totale absorbée [9,58].

• Contrainte (σ)

Lorsqu'une fibre subit une traction, une tension se propage le long de la fibre en sollicitant toutes les molécules présentes dans la fibre. La dissipation partielle de cette tension interne permet à la fibre de résister à la tension externe avant de se rompre. En considérant la tension appliquée par unité de surface de la fibre, on définit la contrainte (σ) et la relation mathématique s'écrit de la manière suivante ^[59]:

$$\sigma = \frac{F}{s} \tag{2.11}$$

où F est la tension appliquée longitudinalement sur la fibre exprimée en Newton, et S représente la surface de la fibre qu'on assimile à un cylindre parfait avec D_0 représentant le diamètre.

$$S = \pi \left(\frac{D_0}{2}\right)^2 \tag{2.12}$$

En introduissant l'expression de la surface (équation 2.12) dans l'équation (2.11), on obtient la formule détaillée de la contrainte qui est une grandeur exprimée en Pascal (*Pa*).

$$\sigma = \left(\frac{4F}{\pi D_c^2}\right) \tag{2.13}$$

Élongation (ε)

Sous l'action d'une traction longitudinale, la fibre subit des modifications morphologiques. La déformation subie dans la même direction que la tension appliquée est la déformation linéaire ou l'élongation. En effet, la traction étire la fibre et cette dernière acquiert une longueur *l* différente de sa longueur initiale l_0 . L'élongation est donc définie comme étant la variation de longueur (Δl) par rapport à sa longueur initiale. Cette grandeur peut être quantifiée en appliquant la formule suivante ^[59]:

$$\varepsilon = \left(\frac{l - l_0}{l_0}\right) \tag{2.14}$$

où, *lo* est la longueur initiale de la fibre, *l* la longueur sous l'effet de la tension. L'élongation est une grandeur sans dimension et elle peut également s'exprimer en pourcentage.

$$\varepsilon (\%) = 100 \left(\frac{l-l_0}{l_0}\right) \tag{2.15}$$

• Module de Young (E)

Un matériau est dit élastique lorsqu'il reprend sa forme primitive lorsqu'on supprime les forces qui le sollicitent^[60]. Le module de Young ou d'élasticité longitudinale est le

coefficient de proportionnalité qui relie la déformation à la contrainte appliquée dans le domaine du comportement élastique linéaire du matériau. Cette relation est décrite par la loi de Hooke :

$$\sigma = E \cdot \varepsilon \tag{2.16}$$

où E représente la pente, σ la contrainte et ε la déformation linéaire. Le module de Young est une grandeur qui s'exprime en Pascal.

La figure 2.6 ci-dessous présente six points essentiels observés lorsqu'on effectue des tests mécaniques en traction sur une fibre de byssus.

- Domaine élastique linéaire : c'est dans ce domaine que s'applique la loi de Hooke, car la fibre a un comportement réversible.
- Domaine élastique non linéaire : la fibre s'étire sous l'action d'une contrainte, mais elle ne retrouve pas totalement sa longueur initiale lorsque la contrainte est supprimée.
- Domaine plastique : dans ce domaine, la fibre s'étire sous l'action d'une contrainte et ne se rétracte plus lorsque la contrainte est levée.
- Énergie absorbée représente l'énergie totale qu'absorbe la fibre soumise à une contrainte jusqu'à sa rupture.
- σ_r: La contrainte maximale qui peut être exercée sur la fibre sans qu'elle ne rompe.
- ε_r: L'élongation maximale que peut atteindre la fibre lorsqu'elle est soumise à une contrainte.



Figure 2.6 Représentation d'une courbe de contrainte/déformation du byssus de *Mytilus edulis* (partie distale hydratée).

CHAPITRE III

EFFECT OF INDIVIDUAL METAL IONS ON THE MECHANICAL PROPERTIES OF THE BLUE MUSSEL BYSSUS THREADS

Manuscript in preparation

David Vernon Chokouadeu Youmssi¹, Catherine Lanthier¹, Réjean Tremblay², Christian Pellerin^{3*} & Isabelle Marcotte^{1*}

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

²Institut des Science de la Mer, Université du Québec à Rimouski, 310 allée des

Ursulines, Rimouski, Québec, G5L 3A1 Canada

³Département de chimie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-Ville,

Montréal, Québec, H3C 3J7 Canada

*Corresponding authors : marcotte.isabelle@uqam.ca & c.pellerin@umontreal.ca

Isabelle Marcotte et Christian Pellerin étaient les leaders du projet. Ils ont contribué à l'analyse des données et à la rédaction du manuscrit. Réjean Tremblay était un collaborateur au projet. Il a fourni des byssus de *Mytilus edulis* et a été impliqué dans l'analyse des données. Catherine Lanthier était une étudiante au baccalauréat en chimie qui a participé à la collecte des données et à leur analyse. J'ai réalisé les expériences montrées dans ce chapitre, participé à leur analyse et à la rédaction de ce manuscrit.

3.1 Résumé

Dans ce travail, l'ICP-MS et les tests mécaniques en traction ont été exploités pour étudier l'intégration des ions métalliques et leur effet sur les propriétés mécaniques des brins de byssus de la moule bleue, *Mytilus edulis*. Notre travail porte sur la partie distale du byssus et les ions qui nous intéressent sont Ca²⁺, Zn²⁺ et Fe³⁺. L'analyse des ions métalliques par ICP-MS révèle que l'incubation des fibres natives dans une solution d'acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA 0,2 M) élimine partiellement les ions métalliques et entraîne une réduction du module d'élasticité de 70 %. On note également qu'il est possible de réintégrer partiellement les ions métalliques dans les fibres, et que le Fe³⁺ et le Zn²⁺ se lient plus fortement. Nous avons mesuré la variation du module d'élasticité après traitement de la fibre à différents pH entre 3 et 8, avec ou sans restauration des ions métalliques. Nos résultats montrent que le pH a un effet sur les propriétés mécaniques mesurées, optimales à pH de 8, similaire au pH marin. Le traitement au Fe³⁺ à pH 8 induit une augmentation de 34 % du module d'élasticité. Nous concluons que la formation de complexes Fe³⁺-catécholate contribue plus à la rigidité et la ténacité aux fibres de byssus, par rapport aux liens Zn²⁺-histidines.

Mots-clés: byssus, *Mytilus edulis*, section distale, ions métalliques, propriétés mécaniques.

3.2 Abstract

In this work, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) and mechanical tensile tests have been exploited to study the integration of metals and their effect on the mechanical properties of the byssal threads from the blue mussel Mytilus edulis. Our work focuses on the distal portion of byssal threads and the studied ions are Ca^{2+} , Zn^{2+} and Fe^{3+} . The metal analysis revealed that incubation of native byssal thread in a solution of ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA 0.2 M) partially removes metals and lowers the elastic modulus by 70 %. We also note that it is possible to partially reintegrate metal ions in the threads, in which the Fe³⁺ and Zn²⁺ bind more strongly. We measured the variation of the elasticity modulus after treating the threads at different pH values between 3 and 8, with or without reintegration of metals. Our results show that the pH has an effect on the measured mechanical properties which were optimum at pH 8, similar to the marine pH. The addition of Fe³⁺ at pH 8.0 induced an increase of 34 % of the elastic modulus over that of a fiber treated without iron at the same pH. We conclude that the formation of catecholate-Fe³⁺ complexes contributes more to stiffness and toughness of the byssal thread, compared to Zn^{2+} histidine bonds.

Keywords: byssus, *Mytilus edulis*, distal section, metallic ions, mechanical properties.

3.3 Introduction

Research on the composition of mussel byssus is well documented^[14] and has shown that the thread core is made of blocks of copolymer-like collagenous proteins known as preCols^[21]. PreCol-P exists in the proximal part of the fiber close to the animal, while preCol-D is found in the distal section ended by the plaque that glues the animal to surfaces. PreCol-NG is non-graded along the threads. Each preCol is made of collagen flanked by domains similar to elastin in preCol-P, to silk in preCol-D, and plant cell wall in preCol-NG ^[26]. The flanking domains are ended by histidine-rich regions. The fibers are covered by a thin protective cuticle whose role is to prevent propagation of micro-fractures induced by external forces such as marine waves^[56].

In seawater mussels, through their filtration feeding process, accumulate metals which arise from natural or anthropogenic sources^[61,62]. These metals reach the byssal glands where they are co-injected with different proteins to form a thread through an extrusion-molding process^[63]. Metals influence the functional integrity of the threads because they act as crosslinkers which stabilise the molecular architecture^[17,23,35,41]. More precisely, studies have shown that the histidines in the thread core coordinate with transition metal ions like $Zn^{2+[26]}$. Also, the 3,4-dihydroxyphenylalanines (DOPA) abundant in the cuticle^[35] form a complex of exceptionally high stability^[32,64] with Fe³⁺ in a pH-dependent manner. Indeed, Holten-Andersen *et al.*^[56] showed that iron binds to DOPA and modulate the mechanical integrity of the cuticle. Zinc and iron are thus important for the byssal threads structure. Calcium is another element abundant in sea water, and a recent study on the byssus of *Pinctada fucata* showed that Ca²⁺ ions stabilise the β-sheet structure of the byssal proteins^[65].

Considering the concentration and importance of these ions in the molecular organization of byssus threads, the objective of our work was to determine the

contribution of Zn^{2+} , Fe^{3+} and Ca^{2+} on the mechanical properties of the distal section of *M. edulis* threads. For this purpose, the fibers were incubated in ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) to remove all metals, then incubated in metal ion solutions. Stress-strain measurements were used to determine the mechanical properties of the threads as a function of the metal of interest. The concentration of metals in the threads was determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS).

3.4 Materials and Methods

3.4.1 Materials

Byssi were kindly provided by La Moule du Large Inc.(Magdalen Islands QC, Canada). We used deionized water and the following chemical reagents (ACS Grade) purchased from Sigma Aldrich: EDTA.Na₂•2H₂O, FeCl₃•6H₂O, ZnCl₂ and CaCl₂•6H₂O. The chloride salt of each metal ion was used to prepare 0.1 M aqueous solutions.

3.4.2 Methods

3.4.2.1 Byssal thread preparation

Byssus threads were cleaned from seashell, fish debris, algae and washed thoroughly with distilled water, then deionized water. The distal section of the threads was cut under a stereomicroscope (Zeiss Stemi 2000-C), then dried and stored in a tightly closed plastic bag at 4 °C until needed.

3.4.2.2 Extraction of metals

A 0.2 M EDTA solution was prepared using deionized water, and the pH was adjusted to 8.0 using a 10 M NaOH solution. About 30-35 mg of distal thread *M. edulis* were incubated in 0.2 M EDTA at pH 8.0 at room temperature for 24 h without stirring. The solution was then filtered and the threads rinsed with deionized water three times. Treated byssus threads were dried at 40 °C (12-24 h) and stored in a sealed container prior to ICP-MS analysis.

3.4.2.3 Incubation of metals

Using the chloride salt of Fe³⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, 0.1 M solutions were prepared using deionized water. About 30-35 mg of EDTA-treated byssus threads were soaked in the chosen inorganic ion solution at the optimum pH value to ensure predominant speciation for each metal: Fe³⁺ at pH<3, Ca²⁺ and Zn ²⁺ at pH 5.5-5.8. After 24 h incubation, threads were filtered and rinsed three times with deionized water, then dried in an oven at 40 °C (12-24h) and stored in a sealed container prior to ICP-MS analysis.

3.4.3 Characterisation

3.4.3.1 Byssus threads metal contents by ICP-MS

Five pools containing an average of 35 mg of dry distal sections were prepared for each treatment. The threads of each pool were digested with a mixture of concentrated HNO₃ (1 : 16 %) and H₂O₂ (2 : 30 %) placed in a water bath for 2-3 h at 70°C until complete

digestion. The volume was adjusted to 15 mL with a 1 % HNO₃ solution and the concentrations of a large range of elements were analyzed by an Agilent 7500c (New Castle, DE, USA) ICP-MS in normal mode and with a micro-nebulizer. The following elements were analysed: Ag, Al, As, B, Ba, Be, Ca, Cd, Cu, Co, Cr, Cs, Fe, Ga, Ge, Hg, In, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, TI, Se, Sr, Rb, U, V and Zn. All the results obtained were expressed in µg/g.

3.4.3.2 Measurements of mechanical properties

Prior to mechanical measurements, an optical microscope (Axioskop 40, Carl Zeiss, Göttingen, Germany) associated to an image analysis software was used to estimate the diameter of each thread. Threads were assumed to have a circular shape in order to easily calculate the surface of the cross section. Then, native, EDTA-treated, and metal-incubated threads were tested using an Instron 5465 mechanical testing frame (Norwood, MA, USA) equipped with a 50 N load cell and a BioPuls bath filled with distilled water. The ends of each threads were sandwiched between two square plastic cardstock, attached with cyanoacrylate glue, and mounted between the apparatus jaws before applying a constant extension rate of 5 mm·min⁻¹. During tensile testing, the threads were hydrated by submersion in distilled fresh water at 22°C.

$$\sigma = \frac{F}{A} \tag{3.1}$$

Where the breaking force (F) is expressed in Newton and A is the cross-sectional area of the distal thread section determined using:

$$4 = \pi (\frac{D_0}{2})^2 \tag{3.2}$$

where D_0 is the average initial diameter of the distal thread section. Therefore,

$$\sigma = \left(\frac{4xF}{\pi D_0^2}\right) \tag{3.3}$$

the strain (ε) expressed in percentage was determined by using the following equation:

$$\varepsilon = \frac{(l-l_0)}{l_0} \tag{3.4}$$

where l is the extension of the thread during tensile loading and l_0 is the initial length of the thread prior to experiment. Young's modulus, also known as material stiffness (*E*), expressed in Pascal was calculated from the slope of the linear portion typically between 2 and 5 % strain of the stress/strain curve.

$$E = \frac{\sigma}{c} \tag{3.5}$$

3.5 Results and Discussion

3.5.1 Metal ion extraction

0

To understand the effect and evaluate the contribution of Fe³⁺, Zn²⁺ and Ca²⁺ to the mechanical properties of *M. edulis* threads, the distal sections were first treated with an EDTA solution, of 0.2 M at pH 8 for 24 h to ensure maximum chelation and extraction of metals. Results for Fe³⁺, Ca²⁺ and Zn²⁺ are shown in figure 3.1. The concentration of iron and zinc ions in the native thread are respectively 236 (50) and 50 (13) μ g/g and the corresponding ratio [Fe]/[Zn] of 4.7 is similar to 6.1 or 6.6 obtained by Jaworski *et al.*,^[66] with *M. galloprovincialis*. The initial concentration of Fe³⁺ and Ca²⁺ is similar and significantly different from Zn, as observed in native byssal threads of *M.edulis* by

Bouhlel *et al.*^[31]. ICP-MS data showed that the EDTA treatment removes about 35 % of the total inorganic ions (see supporting information). The metal ions extracted from the byssus threads using EDTA follows the pattern $Ca^{2+} > Zn^{2+} > Fe^{3+}$, with a 98 % decrease in calcium and 95 % in zinc. In contrast, only 44 % of iron was removed from the threads by EDTA. These results suggest that iron is more retained into the threads in contrast to calcium and zinc, but that the chelating agent could penetrate into the byssus thread core to dissociate the zinc ions bound to histidines (His). Consistently, Holten-Andersen *et al.*^[32] have shown that EDTA can penetrate the cuticle of *M. galloprovincialis* to remove Fe³⁺ and Ca²⁺.



Figure 3.1 Effect of the EDTA treatment (0.2 M, pH 8.0) on the Fe, Ca and Zn concentration of native *M.edulis* byssal threads (distal section) obtained by ICP-MS.

3.5.2 Metal uptake

To better understand the integration of metal ions into byssus threads, we have first explored the effect of a thorough washing step after incubation in a metal ion solution. This was done using strong stirring during the 24 hour rinsing step with deionized water. The metal concentration was significantly different and follows the pattern Fe \gg Zn > Ca (figure 3.2). Calcium was almost completely leached out of the threads following the rinsing step. This result indicates that Ca²⁺ is bound to the protein network *via* much weaker interactions as compared to iron and zinc cations, such as electrostatic interactions with the carboxylate group of amino acids such as Asp or Glu^[7], compared to the coordination covalent bond (Fe-O) and (Zn-N) with amino acids providing O or N-donors. Calcium ions rarely bind to N or S, and form weaker and ionic bonds to O than Zn^[67].



Figure 3.2 Effect of a thorough rinsing step on the Fe, Zn and Ca uptake by *M. edulis* byssus threads (distal section) after EDTA treatment. Concentrations determined by ICP-MS. Inc_Fe, Inc_Zn and Inc_Ca refer to threads treated with 0.2 M EDTA then incubated respectively in 0.1M FeCl₃, ZnCl₂ and CaCl₂ aqueous solution.

Since iron and zinc are more tightly integrated into the byssus threads as shown in figure 3.2, we explored the possibility of a competition phenomenon on the integration of these metals. For this purpose, the byssus threads were treated with 0.2 M EDTA to ensure metal removal, and then incubated at pH 8 close to that of seawater. Then, the threads were placed in solutions containing different Fe³⁺ and Zn²⁺ proportions, and a pH gradient was applied which covers the best conditions for each metal speciation. Threads were rinsed for 24 hours with deionized water under stirring prior to concentration measurements by ICP-MS. Figure 3.3(a) shows that when the pH decreases from 5 to 3, zinc is restored only slightly and consistently, regardless of the concentration used for incubation. Under increasing pH (3 to 5), zinc appears to set into the byssus thread a linear way as a function of the available zinc concentration in the solution. Nonetheless, this study reveals that the reintegration of zinc and iron in the byssal threads is pH-dependent, and is optimal when the incubation starts at low pH. Furthermore, these results suggest that there is no competition between zinc and iron, but a concomitant uptake phenomenon. Indeed figure 3.3(b) shows that despite the variation of zinc proportion inversely to that of iron, a high level of iron uptake occurs in the threads. Zinc ions are also integrated no matter the presence of iron ions, indicating that Fe and Zn have different binding sites in the byssus threads. These results are in agreement with the affinity of zinc ions for the histidine-rich regions in the threads^[17,23,68]. It is also consistent with the work of Holten-Andersen et al. who showed a preferential binding of Fe to DOPA, especially in the cuticle^[32,56]. So we can conclude that Fe^{3+} is not at maximal concentration in native byssus.



Figure 3.3 (a) Profile of the Zn uptake $(\mu g/g)$ by *M. edulis* byssal threads (distal part) as a function of pH and relative proportions (Zn : Fe) of the metals after EDTA treatment. Concentrations determined by ICP-MS. (b) Profile of the Fe uptake $(\mu g/g)$ by *M. edulis* byssal threads (distal part) as a function of pH and relative proportions (Fe : Zn) of the metals after EDTA treatment.

Figures 3.4 to 3.6 show the metal profile of *M.edulis* distal section without stirring during the rinsing step, after incubation with Fe^{3+} , Ca^{2+} and Zn^{2+} . Threads were also treated with EDTA prior to metal ion incubation. The contribution of Fe, Zn and Ca to the mechanical properties of the byssus distal section were then individually evaluated. To avoid the effect of a strong rinsing step on the metal ion concentration, a rinsing step was performed without stirring.

Figure 3.4 shows that when byssus threads are incubated in 0.1M FeCl₃ at pH 2.0, iron is accumulated more than 50 times more than in the native ones. This result indicates that the amount of iron ions found in the threads depends on the speciation and their availability in the aqueous environment. Indeed, the concentration of iron species in seawater is typically low $(0.01-1 \text{ nM})^{[22]}$, much lower than the 0.1M of Fe³⁺ used in our experiment medium. This low concentration of iron ion is consistent with previously published values for *M. edulis*^[62] and *M. galloprovincialis*^[66]. To verify this hypothesis, we compared the concentration of iron obtained when EDTA-treated byssal threads were incubated in artificial sea water (ASW). A concentration 142(30) µg/g similar to that of EDTA-treated fibers was found 131(12) µg/g. This can be explained by the fact that ASW does not contain iron; therefore, the iron concentration detected in the thread comes from the residual concentration left after the EDTA treatment.



Figure 3.4 Iron uptake by the distal section of *M. edulis* byssal threads determined by ICP-MS following different treatments. Native refers to untreated thread; EDTA to threads treated with 0.2 M EDTA, pH 8.0; Inc_Fe refers to threads treated with 0.2 M EDTA then incubated in 0.1M FeCl₃ aqueous solution, pH<3; Inc_ASW refers to threads treated with 0.2 M EDTA then incubated then incubated in artificial sea water.

In native *M. edulis* threads, reports indicate that zinc concentration is always lower than iron's^[62,66]. Here, native threads have an average concentration of 50 (13) μ g/g, similarly to previously published work on *M. edulis* ^[62] and *M. galloprovincialis* ^[66]. As in native threads, zinc also accumulates in byssus thread (figure 3.5) following incubation in a 0.1 M zinc solution, but at a concentration about 9 times lower than that of iron, but on average nearly 30 times higher than the value determined in native threads. Again, this result indicates that the thread integrates Zn²⁺ ions as a function of their availability. As observed for iron, the concentration of zinc detected after EDTA treatment is similar to the one in ASW in which there is no zinc as previously observed with thorough washing. Interestingly, as noted in figure 3.1 EDTA more efficiently complexes zinc than iron, suggesting a tighter binding of Fe^{3+} ions than Zn^{2+} in the threads.



Figure 3.5 Zinc uptake by the distal section of *M. edulis* byssal threads determined by ICP-MS following different treatments. Native refers to untreated thread; EDTA to threads treated with 0.2 M EDTA, pH 8.0; Inc_Zn refers to threads treated with 0.2 M EDTA then incubated in 0.1M ZnCl₂ aqueous solution, pH 5.7; Inc_ASW refers to threads treated with 0.2 M EDTA then incubated in artificial sea water.

When the byssal threads are gently washed, figure 3.6 shows that the concentration of calcium uptake in the byssus thread is very similar to the concentration in the native byssus thread. However, the concentration of calcium ion integrated after incubation in ASW is about 4 times lower than in the native thread but not the same after EDTA treatment. So this indicate that calcium and other metals do not simply diffuse in byssus from seawater but must also be intergrated during its formation. Here again, this could be explained by the low concentration of Ca²⁺ in ASW 60 (8) μ g/g as compared to the

incubation solution (0.1M). As observed with Zn^{2+} , the concentration of Ca^{2+} in the threads after the EDTA treatment is very low, suggesting weaker bond to the byssus proteins.

The availability of each metal ion in the solution is an important parameter to explain the difference in metal concentration accumulated by the threads after incubation in the presence of a chosen metal. However, each metal solution used for incubation had the same concentration (0.1M), but lead to different levels accumulated in the threads. Thus, the variation between the concentrations of these metals also depends on other parameters, such as the abundance of amino acid residues with which these metals interact, as well as the affinity constant which governs and maintains this protein-metal interaction.



Figure 3.6 Calcium uptake by the distal section of *M. edulis* byssal threads determined by ICP-MS following different treatments. Native refers to untreated thread; EDTA to threads treated with 0.2 M EDTA, pH 8.0; Inc_Fe refers to threads treated with 0.2 M EDTA then incubated in 0.1M CaCl₂ aqueous solution pH 5.7; Inc_ASW refers to threads treated with 0.2 M EDTA then incubated in artificial sea water.

According to a recent interspecies comparison, the proportion of amino acids residues expressed in molar % of total amino acids content in M. edulis varies as follows: 0.5 % DOPA, 3.0 % Histidine (His), 4.5 % Aspartic acid/asparagine (Asp/Asn), and 6.0 % glutamic acid/glutamine (Glu/Gln)^[31]. Schmitt et al.,^[23] showed that zinc metal ions mostly bind to His in byssus thread, while DOPA interacts with Fe^[32,64,69]. As for Ca^[32,67], it would also bind to DOPA^[32] as well as to Asp and Glu^[67]. The metal abundance does not follow the proportion of amino acid residues. The high amount of iron accumulated in the treated byssus threads despite the low concentration of DOPA can be explained by the high affinity constant (log K_s~ 37- 43)^[32,64] of the DOPA-Fe complex. The uptake of metal ions by the byssal threads follows this sequence: Ca2+ < $Zn^{2+} \ll Fe^{3+}$. Correspondingly, the logarithm of the stability constants for the mono, bis, and tris-catechol complexes follows this trend: Ca²⁺ (8 for mono- to bis) ^[21,32] < $7n^{2+}$ (9.90 for mono, 17.4 for bis) < Fe³⁺ (20.0 for mono, 34.7 for bis, 43.8 for tris)^[32,70,71]. When compared to the affinity with H⁺ (13.0 for mono, 9.23 for bis), the stability of the complexes made with calcium is lower, which would at least partly explain the leaching out by a thorough rinsing of the threads with acidic deionized water (pH~5). As for the higher uptake of zinc as compared to calcium, which has the same valence, it would depend on the nature of the interactions. Zinc ions make coordination bonds with His nitrogen atom and electrostatic interactions with Asp and Glu through the carbonyl oxygen while calcium ions interact electrostatically with Asp or and Glu. Since coordination covalent bonds are stronger than the electrostatic interactions, this justify the fact that despite the lowest proportion of His compared to Asp and Glu, zinc ion uptake is higher than calcium.

3.5.3 Mechanical test of the distal region of the threads

To assess the contribution of the metal ions of interest (Fe³⁺, Zn²⁺ and Ca²⁺) on the mechanical properties of the distal section of *M. edulis* byssal threads, three states were compared: native, EDTA-treated and metal-incubated threads. First, we have examined the effect of a 0.2 M EDTA treatment for 24 h which showed a 35 ± 9 % decrease in total inorganic elements, as determined by ICP-MS. The results are compiled in Table 3.1, and typical stress-strain curves are displayed in figure 3.7. The incubation of native threads in EDTA resulted in a 70 % reduction of the elastic modulus due to the chelation and removal of inorganic ions. The profile on figure 3.7 shows significant impact of EDTA treatment on the mechanical properties of the byssal threads. In fact, the thoughness and ultimate stress decrease respectively form 129 to 58 MPa and 30 (10) to 21 (4) J.mm⁻³. Since the strain at break is not affected, this means that the total energy the fiber can absorb before rupture has decreased because the fiber network is fragilised and half of the initial stress is enough to break the fiber after EDTA treatment. In a similar manner, Holten-Andersen et al. [32] showed that an EDTA treatment reduces the cuticle hardness by 50%. They showed that Fe^{3+} and Ca^{2+} are mainly found in the cuticle of the thread, while Schmit et al.^[23] showed that Zn is localized in preCol His-rich domains where they form bonds with histidine. The removal of Zn²⁺ binding to the imidazole group of His in the flanking domains of preCol-D then reduces the thread stiffness. Therefore, partial removal of Ca2+, Zn2+ and Fe3+ weakens the protein network which is less crosslinked and will poorly dissipate an applied stress.

	Native thread (distal section)	Treated thread (EDTA 0.2M)
Young modulus (MPa)	470 (70)	140 (7)
Ultimate Tensile Stress (MPa)	100 (30)	61 (8)
Toughness (J·mm ⁻³)	30 (10)	21 (4)



Figure 3.7 Representative stress-strain curves for *M. edulis* byssal threads (distal section) with and without treatment with 0.2 M EDTA.

The contribution of metals to the mechanical properties of *M. edulis* threads (distal section) was explored by comparing the Young modulus, toughness, stress- and strainat-break values following individual incubation with different metal ions. Waite *et* al.^[55] reported that the behaviour of the mussel thread to an applied stress depends on many factors like metals and pH. Therefore, to investigate the contribution of each

Table 3.1 Mechanical properties with standard deviation for *M. edulis* byssal threads (distal section) with and without treatment with 0.2 M EDTA.
metal ions, we first isolated the effect of pH. For this purpose *M. edulis* threads, after EDTA treatment, were submitted to a pH of 3.0, 5.6 and 8.0 at room temperature (~22 °C) for 24 h prior to mechanical testing. Table 3.2 shows an increase of 13 % in the Young modulus of the byssus threads with the increase of pH, for the EDTA-treated threads. The modulus increase may be caused by the auto-oxidation of catechols. In fact, McDowell et al.,^[72] mentioned that catechol (DOPA) can react with intermediary compounds like semi-quinone to form diDOPA which generates covalent cross-links in the byssal plaques. From their study, we suggest that the diDOPA cross-linking increases would densify the protein network and increase the Young modulus.

Table 3.2 Young modulus (MPa) with standard deviation of *M. edulis* byssal threads (distal section) after 0.2 M EDTA treatment with or without incubation in 0.1M solutions of selected inorganic ions.

	pH		
	3.0	5.6	8.0
EDTA-treated	141 (8)	190 (20)	200 (30)
Ca ²⁺	150 (20)	180 (40)	220 (30)
Zn ²⁺	160 (50)	190 (50)	260 (50)
Fe ³⁺	220 (30)	250 (30)	360 (20)



Figure 3.8 Representative tensile tests for *M. edulis* byssal threads (distal section) after incubation with different inorganic ions at pH 8.0.

As s an increase of modulus with increasing pH was observed for threads treated with EDTA. A similar increase was observed when further incubated in the presence of metal ions. Table 3.2 shows that the distal thread has the greatest Young modulus when incubated with Fe³⁺. Its also shows that Ca²⁺ and Zn²⁺ do not increase the Young modulus of the byssal threads, except for Zn²⁺ treatment at pH 8.0. The 13 % increase could be explained by the fact that His-Zn interactions can take place at pH above the His pKa of 6.5. As discussed by Schmitt *et al.*^[23], Zn²⁺ has a key role in the byssus organization. Under strain, β -sheets in the preCoLs can unfold, providing hidden length once sacrificial bonds formed between histidine and zinc ion are ruptured^[35]. As for Ca²⁺, these ions are more abundant in the cuticle where they complex with DOPA. Under stress, the stability between DOPA semiquinone and Ca²⁺ is disrupted since the stability constant is low (Ks = 8).

Unlike Ca^{2+} and Zn^{2+} , the addition of multivalent ions Fe^{3+} at pH 8.0 induced a 34 % increase of the elastic modulus as compared to the EDTA-treated fiber at the same pH value. This is most likely due to cross-links by catecholate- Fe^{3+} complexes that provide stiffness and toughness to the byssus fibers. At pH<5, Fe^{3+} coordinates with DOPA to form a Fe-DOPA monocomplex but it is also known that Fe^{3+} induces DOPA dimerisation in diDOPA^[73]. At pH 6-8, Xu^[41] showed the formation of a bis/tris Fe-DOPA complex with a stability constant Ks~40^[32]. The crosslinking of the network through Fe-DOPA coordination bonds would also be responsible for the high value of the ultimate stress displayed in figure 3.8. Table 3.3 also shows that Fe^{3+} is the only metal ion that significantly modulates the total energy that the thread can absorb before breaking under a load. Since the Fe-DOPA complex is function of pH and tris Fe-DOPA is more stable, this could explain the fact that the network crosslinked through the tris Fe-DOPA complex and its affinity constant at pH 8 exhibit the highest toughness.

	pH		
	3.0	5.6	8.0
EDTA-treated	20 (10)	29 (9)	24 (6)
Ca ²⁺	20 (10)	32 (4)	32 (9)
Zn ²⁺	27 (6)	31 (9)	30 (10)
Fe ³⁺	27 (7)	40 (10)	100 (40)

Table 3.3 Toughness (J-mm⁻³) with standard deviation of M. *edulis* byssal threads (distal section) after 0.2 M EDTA treatment, and with or without incubation to 0.1M of selected inorganic ions.

3.6 Conclusion

Our study revealed that, metal ions have different interaction in byssal thread. Iron ions Fe^{3+} form a complex with DOPA while zinc ions form a complex with histidine present in the fiber core. As for Ca²⁺, we could not obtain evidence that it interacts either with DOPA or histidine. The complexes form in the byssal thread differently modulate its mechanical properties and their contribution on the strength of the distal byssal thread follows the pattern; $Fe^{3+} >> Zn^{2+} > Ca^{2+}$. This study also showed that, even after an intense leaching, iron ions are more tightly bound in byssal thread and mostly contribute to the byssal thread strength. This study also showed that the pH modulates the mechanical behaviour of the byssal threads notably the elastic modulus which increases as the pH increases. The highest elastic modulus is obtained when the threads are treated at a pH of 8.0 similar to seawater. In contrast to Zn^{2+} , the addition of Fe^{3+} at pH 8.0 induces the highest total thoughess, the energy that the thread can absorb before breaking under a load. This is due to crosslinking by more stable catecholate- Fe^{3+} complexes that provide stiffness and toughness to the byssal threads.

The authors would like to thank M. Babin (UQAR) for support with ICP-MS analysis, as well as F. Byette (Université de Montréal) and Dr. A.A. Arnold for technical support and enlightening discussions. C.L. is grateful to the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada, and D.V.C.Y. to the Centre Québécois sur les Matériaux Fonctionnels (CQMF), the Réseau Aquaculture Québec (RAQ) and to Université du Québec à Montréal, for the award of scholarships. This work was supported by the Fonds de recherche du Québec sur la Nature et les Technologies (FRQNT team grant).

3.7 Supporting information

	S#1	S#2	E#3	E#4	E#5	AV	SD
Native	962.04	2045.77	933.91	787.60	1.197	894.51	93.66
EDTA treatment	709.21	2087.33	561.46	548.36	512.81	582.96	86.64

S#1: Sample N	°1, AV: .	Average, SD:	Standard	Deviation
---------------	-----------	--------------	----------	-----------



Figure 3.9 Total concentration of inorganic ions determined by ICP-MS in the distal section of native and EDTA treated *M. edulis* byssal threads.

CHAPITRE IV

METHYLCATECHOL IN PRESENCE AND ABSENCE OF INORGANIC COMPOUNDS: A MODEL FOR THE STUDY OF THE INTERACTION OF DOPA WITH INORGANIC IONS IN BYSSAL THREADS

Manuscript in preparation

David Vernon Chokouadeu Youmssi¹, Catherine Lanthier¹, Christian Pellerin^{2*} & Isabelle Marcotte^{1*}

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

²Département de chimie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, H3C 3J7 Canada

*Corresponding authors : marcotte.isabelle@uqam.ca & c.pellerin@umontreal.ca

Isabelle Marcotte et Christian Pellerin étaient les leaders du projet. Ils ont contribué à l'analyse des données et à la rédaction du manuscrit. Catherine Lanthier était une étudiante au baccalauréat en chimie qui a participé à la collecte des données et à leur analyse. J'ai réalisé les expériences montrées dans ce chapitre, participé à leur analyse et à la rédaction de ce manuscrit.

4.8 Avant-propos

La recherche effectuée dans ce chapitre 4 s'inscrit dans un processus réflexif. Le but ultime sera d'utiliser la résonance magnétique nucléaire de l'état solide (RMN-ÉS) pour explorer les interactions DOPA-ions inorganiques présents dans la fibre de byssus. En fait, la faible proportion de la DOPA dans le byssus et la difficulté à le marquer constituent un véritable problème quant au suivi des interactions DOPA-ions inorganiques. Face à ce problème, notre méthodologie consiste à trouver une molécule capable de mimer l'interaction des ions avec la DOPA présente dans la fibre de byssus. En effet, la molécule de DOPA commercialisée (figure 4.1) ne peut être utilisée pour cette étude car elle dispose de quatre sites susceptibles de réagir avec les ions inorganiques.



Figure 4.10 Molécule de 3,4-dihydroxylphenylalanine (DOPA) avec sites réactifs*.

Dans le byssus, les DOPA font partie de la chaîne polypeptidique, et l'interaction des métaux avec cet acide aminé est essentiellement orientée vers les groupements OH. Pour s'affranchir de cette difficulté ainsi que des interactions électrostatiques, nous avons opté pour l'utilisation du 4-méthylcatéchol qui offre les mêmes sites d'interaction avec les ions inorganiques.



Figure 4.11 La molécule 4-méthylcatéchol (4-MC) commercialisée. (*) Sites réactif.

Pour s'affranchir de cette difficulté ainsi que des interactions électrostatiques, nous avons opté pour l'utilisation du 4-méthylcatéchol qui offre les mêmes sites d'interaction avec les ions inorganiques, tel que montré à la figure 4.1.

4.9 Résumé

Dans ce travail, les spectroscopies UV-visible et infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) combinées à la calorimétrie de titration isotherme (ITC) sont exploitées pour montrer que la 3,4-dihydroxyphénylalanine (DOPA) contenue dans la cuticule peut former un complexe avec des ions inorganiques. Pour ce faire, une molécule partiellement modèle de DOPA, le 4-méthylcatéchol, a été utilisée. Parmi les ions étudiés, les resultats obtenus n'ont pas pu démontrer une interaction entre le calcium (Ca²⁺) ou le zinc (Zn²⁺) et la molécule DOPA. Seul l'ion Fe³⁺ interagit significativement avec le 4-MC. L'absorbance observée à 560 nm par UV-visible est caractéristique du complexe bis-catécholate de Fe³⁺. Ce complexe est formé par l'interaction du Fe³⁺ avec l'oxygène du groupe hydroxyle du catéchol et le transfert de charge entre ces deux atomes génère la liaison Fe-O qui présente une bande de vibration autour de 831 cm⁻¹. Ce complexe présente une forte affinité (K_{re} = 10^{41} M⁻¹) qui justifie sa stabilité et sa contribution à la dureté de la cuticule.

4.10 Abstract

In this work, UV-Visible spectroscopy and Fourier transform infrared (FTIR) are combined with isothermal titration calorimetry (ITC) to show that 3,4dihydroxyphenylalanine (DOPA) contained in the cuticle can complex with inorganic ions. For this purpose, we used 4-methylcatechol (4-MC) as a model molecule for DOPA. Among the studied ions, our results could not demonstrate an interaction between calcium ion (Ca²⁺) or zinc ion (Zn²⁺) with DOPA. Only iron ion (Fe³⁺) interacts significantly with 4-MC. The absorbance observed at 560 nm by UV-Visible spectroscopy is characteristic of iron (Fe³⁺) bis-catecholate complex. This complex is formed by the interaction of Fe³⁺ with the oxygen of the hydroxyl group of the catechol and the charge transfer between these two atoms generates the Fe-O bond which has a vibration band around 831 cm⁻¹ detected by FTIR. The high affinity (K_{re} = 10⁴¹ M⁻¹) of this complex justifies its stability and its contribution to the hardness of the cuticle.

4.11 Introduction

A byssus thread has an external coating called cuticle which exhibits hardness, stiffness and extensibility^[32] necessary to protect the fiber against microcracking propagation when a moderate load induced by waves from marine environment is applied. The cuticle has a high proportion of 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine (DOPA) derived from the post-traductional modification of tyrosine. DOPA is reported to significantly modulate the mechanical properties of the cuticle because of its ability to form DOPAmetal complexes in the presence of metal ions^[32,74].

In the core of each thread, there are proteins known as preCollagen (preCols), namely preCol-D, preCol-P and preCol-NG^[21]. Each of them is made of collagen flanked by silk-like (preCol-D), elastin-like (preCol-P) or plant cell wall-like (preCol-NG) domains. the assembly of the preCols. This is done through complexation between the imidazole of histidine (His) and a transition metal ion to generate sacrificial (reversible) bonds^[16,68] which contribute to the mechanical behavior of the threads. When the byssus is subjected to an external stress like a tensile load, the fiber stretches until a critical load at which the sacrificial bonds begin to rupture. When the applied stress is removed, the coordination bonds between metal and histidine are restored^[17].

Since DOPA and histidines are implicated in the complexation process of the byssus proteins with metal ions, the absence of metal ions can greatly affect the integrity of the fiber under tension. This was shown in a previous study (chapter 3) where the removal of metals from byssus threads using a treatment with ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) led to weaker mechanical properties such as the Young modulus and toughness.

Considering the important role of DOPA in the macromolecular organization of the byssus fibers and their mechanical properties, we have thus investigated the ability of these ions to complex with DOPA. To avoid the metal ions interacting with the free carboxylate or amine groups of this amino acid, 4-methycatechol in presence and absence of metal ions was employed as model for the study of the interaction of DOPA with metal ions

4.12 Material and methods

4.12.1 Materials

4-Methylcatechol (4-MC) was purchased from Sigma Aldrich (Mississauga, ON, Canada) along with trisodium citrate dehydrate (citrate), 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES), and all metal chloride salts of analytical grade: FeCl₃•6H₂O, ZnCl₂ and CaCl₂•6H₂O

4.12.2 Instrumental analyses

4.12.2.1 UV-Visible spectroscopy (UV-Vis)

An equimolar quantity of each metal salt and 4-MC (3.3 mmol) was mixed with a citrate-HEPES buffer (100 mM citrate, 50 mM HEPES) at a pH of 8.0 adjusted with 10 M NaOH. All aqueous solutions were freshly prepared using deionized water. The UV-Vis spectra were recorded using a Perkin-Elmer UV-Vis-NIR spectrophotometer in connection with the UV WinLab Software. The UV-Vis spectrum was scanned from 250 to 700 nm using a quartz cuvette with an optical path length of 1.0 cm. A scanning

speed of 266.75 nm/min was used with an interval of 1.00 nm. Blank experiments were performed against reference solutions containing appropriate amounts of citrate-HEPES buffer in the absence of metals ions. All the experiments were carried out in aerobic conditions at room temperature.

4.12.2.2 Isothermal Titration Calorimetry (ITC)

The ITC measurements were performed at $25 \pm 1^{\circ}$ C on a MicroCal VP-ITC device. A solution with a concentration of 0.22 mM of 4-MC was prepared in a citrate-HEPES buffer (100 mM citrate, 50 mM HEPES) at a pH of 8.0 adjusted with 10 M NaOH. The metal ion solutions were obtained by dissolving FeCl₃.6H₂O, ZnCl₂, or CaCl₂ to obtain a concentration of 3.3 mM. Before each analysis, all solutions were degassed during 5-10 min using a MicroCal Thermovacum pump. This is an important step to remove the maximum amount of oxygen present in each solution and which are responsible of undesirable artifacts.

1.4 mL of 0.22 mM 4-MC was introduced into the cell and titration was done automatically with the sequence of a first injection of 2 μ L then 29 injections of 8.3 μ L of 3.3 mM of the inorganic ion solution contains in the syringe. An interval of 260 s between each injection was allowed for the reaction to reach equilibrium. Data were automatically collected and analyzed using the model ONE SET SITE of Origin 8.0 software provided by MicroCal Inc.

With this non-linear curve, the following parameters were extracted: the enthalpy (Δ H) and the affinity constant (K) related to the interaction of the metal ion to 4-MC. These parameters represent the thermodynamic behavior of the metal-4-MC complex system. The enthalpy (Δ H) characterizes the energy involved in the reactions which are

typically from the formation of hydrogen bonds, electrostatic interactions and van der Waals forces. The Gibbs free energy (ΔG) of the interaction that binds 4-MC to the metal ion, but it also defines the spontaneity of the reaction was derived from the affinity constant (K).

4.12.2.3 Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy

To identify the site on 4-MC on which the metal ions bind, we prepared different mixtures with 4-MC/metal molar ratios of 2:1 and 1:1 in deionized water. Solutions were purged with liquid nitrogen and maintained in the refrigerator 4 °C for 30 min. The mixture was then, heated at 60°C until slow and total evaporation. The 4-MC/Fe complexes were prepared in an optimal pH condition of 2.1-2.3 to ensure the predominance of Fe³⁺, while 4-MC/Zn and 4-MC/Ca were prepared in an optimal pH condition of 2.1-2.3 to ensure the predominance of Fe³⁺, while 4-MC/Zn and 4-MC/Ca were prepared in an optimal pH condition of 2.1-2.3 to ensure the predominance of Fe³⁺, while 4-MC/Zn and 4-MC/Ca were prepared in an optimal pH condition of 2.1-2.3 to ensure the predominance of Fe³⁺, while 4-MC : Zn and 4-MC : Zn and 4-MC : Ca were synthesized at pH 4.5-5.5.

Prior to FTIR analysis, the solid complexes were dried under vacuum at 60 °C in the presence of anhydrous calcium sulfate to ensure optimal dehydration. to eliminate the maximum of water molecules. Infrared spectra of the complexes were acquired in the spectral window of 4000 to 400 cm⁻¹ using a Nicolet 6700 FTIR spectrometer equipped with a diamond ATR accessory. Spectra were recorded with a resolution of 4 cm⁻¹ and using 32 scans. To better investigate the ligand-metal interaction, we focused in the 1500 to 400 cm⁻¹ range.

4.13 Results and discussion:

4.13.1 UV-Vis study of the formation of 4-methylcatechol-metal ion complexes

The formation of 4-MC/metal ion complexes was followed by UV-Vis spectroscopy. In this regard, 4-MC was studied in the absence and presence of Fe³⁺, Ca²⁺ and Zn²⁺, as shown in figure 4.3. This method allows distinguishing organic ligands like phenols or 4-MC from the metallo-complex and free metal ions in solution. Indeed, the combination of unsaturated ring bonds and alcohol functions present in 4-MC induces an absorption maximum at 280 nm in the UV region of the spectrum figure 4.3. The free metal ions in solution like Fe³⁺ as well as Zn²⁺ and Ca²⁺ do not absorb in the visible range 400 - 700 nm. These aqueous solutions were colorless, except Fe³⁺ solution which was yellow because the electronic transition in its partially filled *d* orbitals interacts with water molecules to form a complex.

Whenever there is a transition metal ion, the coordination to a ligand is responsible for color changes due to the electronic configuration change of the d orbitals, and then the color of metal ion changes can be used as a tool to determine the coordination. The 4-MC solution in citrate-HEPES buffer (pH 8.0) was slightly red and can go autoxidation. This phenomenon generates reactive species such as semiquinone, and in the presence of metal ions such as Mg^{2+} , Zn^{2+} or Fe^{3+} they are differently stabilized through complexation^[75,76]. When 4-MC and the chloride salt of each metal were mixed in citrate-HEPES buffer (pH 8.0), all colored solutions showed well resolved absorption bands in both UV and visible region as shown figure 4.3.



Figure 4.12 Spectral changes accompanying various metal ion addition to 4-MC under aerobic conditions. Metal ion and 4-MC concentrations of 3.3 mMol were used in citrate HEPES buffer (pH 8.0) at 25 °C after 3 hours of incubation.

The 4-MC spectrum in the absence of metal ion shows three well-identified absorption bands. The band observed at 280 nm is attributed to the $\pi \rightarrow \pi^*$ transition of the aromatic ring of the non-complexed fraction of 4-MC. The shoulder at 337 nm suggests a modification of the catechol conjugated system due to its oxidation which generates quinone in aerobic conditions^[77,78]. The $\pi \rightarrow \pi^*$ transition previously in 4-MC is extended to the oxygen by mesomerism in quinone which causes a shift of the band from 280 nm to 337 nm.

The same absorption bands are observed for 4-MC under aerobic conditions and in the presence of metal ions Zn^{2+} and Ca^{2+} . However, addition of Fe³⁺ to 4-MC solution resulted in the formation of blue species with greatly different UV-Vis spectra with an absorption band at 560 nm as shown in figure 4.3 and summarized in Table 4.1. It is

well know that the formation of an iron (III)-catecholate complex and its stoichiometry depends on the pH value. Since electronic spectra of iron-catecholates at pH 6-7 show a bis(catecholate)iron(III) complex {Fe(cat)₂} with an absorption band in the range of $561-586 \text{ nm}^{[77,79]}$, our result is in good agreement with Perron *et al.*^[77,79] and suggest that 4-MC participates in the coordination with ferric ions. Thus, the absorption band obtained at 560 nm can be assigned to a charge transfer «interaction» band induced by the complex formation.

	λ (nm)	λ (nm)	λ (nm)	λ (nm)
4-MC	280	305-400	450-500	-
4-MC : Zn	280	305-400	450-500	-
4-MC : Ca	280	305-400	450-500	-
4-MC : Fe	280	305-400		560
structure assigned	ОН		HO CH ₃ CH ₃ CH ₃ OH	Charge transfer ^[77,80]

Table 4.4 Reaction intermediates assigned to absorption bands identified when 4-MC is in presence or absence of metal ions in citrate-HEPES buffer (pH 8).

UV-Vis spectroscopy was also used to identify the intermediate compound generated by the oxidation of 4-MC in the presence and absence of metal. To investigate the effect of metal ion on the oxidation rate of 4-MC and in particular the formation of semiquinone/quinone - the first intermediate species formed - the absorption band at 337 nm was followed as a function of time after mixing 4-MC with the various metal chloride salts.







Figure 4.13 Spectral changes accompanying various metal ion addition to 4-MC under aerobic conditions at 25 °C. (a) 4-MC in a citrate/HEPES buffer (pH 8), and to which (b) Zn^{2+} , (c) Ca^{2+} , and (d) Fe3⁺ ions are added at a concentration of 3.3 mM, as for 4-MC. Inset: plot of the absorbance at 337 nm as a function of time.

By focusing on the absorption band of quinone, we determined the slope of the straight line characteristic of the influence amplitude of inorganics ions in the its formation rate. This influence decreased in the following order: Zn, Ca and Fe as shown in figure 4.4. Therefore, the metal ions modulate the oxidation of 4-MC to quinone in the inverse order: Fe > Ca > Zn. This result is in agreement with a previous study published by Bowness *et al.* in 1953^[82] on the effect of metals like zinc on DOPA-melanin and which showed that the extent of the effect was smaller with Ca than Zn. This is also supported by previous work on catecholate oxidation^[73,75] which showed through electron spin resonance spectroscopy that zinc stabilizes the semi quinone, and although the transitional phase of the complex formed is short, it is nevertheless comparatively longer than the one with calcium.

Since dicatechol is formed by reacting with semi quinone, then considering that zinc in comparison to calcium stabilizes the semi quinone and delays the formation of the dicatechol (450-500 nm), therefore we postulate that the absorbance of dicatechol to be small when zinc is added. The result obtained in figure 4.5 effectively confirms the detection of less dicatechol in the medium in presence of zinc.



Figure 4.14 Spectral changes accompanying various metal ion addition on 4-MC in aerobic conditions without buffer at 25°C. Each spectrum was taken after 180 min.

4.13.2 Determination of the affinity constant of the 4-MC/metal ion complexes

To determine the thermodynamic parameters of the interaction of 4-MC with metal ions, ITC was used. Figure 4.3 shows a comparison of the reaction profile of 4-MC in the absence or presence of metal ions after buffer effect subtraction. It appears that an exothermic reaction takes place between 4-MC and Fe³⁺ whereas in the presence of Ca²⁺ and Zn²⁺, an endothermic reaction is monitored but the heat change is less significant for calcium. The amplitude of the enthalpy associated to the interaction of each metal with 4-MC decreases according to the following order Fe > Ca, Zn.



Figure 4.15 ITC measurement of the mixing of 4-MC to (a) Fe^{3+} , (b) Ca^{2+} , and (c) Zn^{2+} at pH 8 in a citrate-HEPES buffer, 25°C.

The best representative curve fit of the raw data and thermodynamic parameters of the reaction studied were extracted and are compiled in table 4.2. Because the instrument provides an apparent affinity constant (Kapp), it is necessary to calculate the real affinity constant (Kre) by taking into account the pH value (8.0) and buffer (100 mM citrate -50 mM HEPES). The buffer was used to solubilize iron and zinc chloride at pH 8 to prevent the formation of iron and zinc hydroxides. However, the formation of complexes such as $Fe(citrate)_2^{3-[83]}$, $Ca(citrate)_2^{4-[84-86]}$ and $Zn(citrate)_2^{4-}$ with small stability constant compared to that of 4-MC and the corresponding metal is expected. The equation used to extract the real affinity constant is derived from a work done on the phenolic acid interaction between Fe^{3+} in the presence of citrate^[53]:

$$K_{real} = K_{app} (1 + K_{Ion_Cit^{3-}} [Cit^{3-}]^2 (1 + K_{a1} [H^+] + \beta [H^+]^2)^3$$
(4.6)

$$\beta = [1/(K_{a1} * K_{a2})] \tag{4.7}$$

where Kapp represents the apparent affinity constant provided by the ITC instrument, Kre the real constant affinity between the metal ion considered and 4-MC, Kcit-ion (the binding constant of citrate to the free metal ion)

	ΔH (cal)	ΔS (cal/mol/deg)	K app (M ⁻¹)	K re(M ⁻¹) experimental	K re (M ⁻¹) Litterature ^[32]
Fe ³⁺	-1050 (192)	12.5 (1.2)	3300 (811)	[6.6 (1.6)]10 ⁴¹	10 ³⁷ - 10 ⁴⁰
Ca ²⁺	131 (34)	14.3 (0.4)	1085 (242)	[3.5 (0.8)]10 ²⁵	10 ⁷ - 10 ¹⁰
Zn ²⁺	-	-	-	-	

Table 4.5 ITC analyses of the thermodynamic parameters of 4-MC reacting with Fe³⁺, Ca^{2+} and Zn^{2+} at 25°C in the presence of citrate-HEPES buffer (pH 8).

Values in brackets are standard deviation.

real affinity constant of cathechol K $_{re}$ (M⁻¹) pk_{a1}=9.1^[74], 9.37^[87]; pk_{a2}= 14^[74] 13.7^[87]; Log K_{Citrate-Fe} = 19.12^[83]; Log K_{Citrate-Ca} = 3.3^[85]

The summary of ITC results in Table 4.2 above show that the reaction between 4-MC and Fe³⁺ is exothermic while that with calcium showed no significant thermal process because no enthalpy change was noticed. It was impossible to extract thermodynamic data from the interaction of 4-MC with zinc because the enthalpy change involved in the titration was fast. According to the principle of Berthelot and Matignon, an exothermic reaction ($\Delta H < 0$) with an associated entropy ($\Delta S > 0$) induces a favorable reaction whereas the combination ($\Delta H > 0$) and ($\Delta S > 0$) gives rise to an endothermic equilibrium. In our study, the ion-dipole interaction involving the transition metal Fe³⁺ and the hydroxyl function of 4-MC is a favorable reaction leading to the formation of a complex as supported by UV-Vis spectroscopy (figure 4.5). From our experiment, the real affinity constant (K_{re}) of the complex 4-MC : Fe is 10⁴¹ M⁻¹, in accordance with the value (10³⁷-10⁴⁰) determined by Holten-Andersen *et al.*^[32] between Fe³⁺ and DOPA in the cuticle of *Mytilus galloprovincialis* byssal threads.

The calculated K_{re} of the 4-MC : Ca complex is 10^{25} M⁻¹ and greater than the value $(10^{10}$ M⁻¹) reported by Holten-Andersen *et al.*^[32]. This difference needs to be explored. Nevertheless, our work shows that the affinity of the inorganic ions for 4-MC follows this pattern: Fe > Ca.

4.13.3 Determination of metal binding sites on 4-MC

The UV-Vis spectroscopy analysis showed that 4-MC undergoes autooxidation to generate intermediate species such as quinones or can form a stable complex with Fe^{3+} . Although this technique did not identify a stable complex with Ca^{2+} and Zn^{2+} , this does not necessarily exclude interactions between 4-MC and the divalent metal ions. Spectroscopic analyses by electron spin resonance^[75,76,88] showed that divalent ions like Zn^{2+} and Ca^{2+} interact with semi-quinones to form a transient complex.

Studies by infrared spectroscopy have shown that inorganic ions such as Ca^{2+} , Ba^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} and Fe^{3+} are able to interact with the oxygen of the hydroxyl group of aromatic organic compounds such as lignin^[89], tannins^[90] or catechol^[91,92] to form complexes. Dougherty^[93] showed that in a gaseous medium, the positive charge of monovalent metal ions interacts with electron delocalized in the aromatic rings to form a non-covalent cation- π . Therefore, infrared spectroscopy was exploited for the purpose of observing such interaction. We focused our analysis in the spectral window 1600 to 1000 cm⁻¹, which covers the vibration frequency of CO, C=C, =C-H bond. In addition, in the spectral window from 1000 to 450 cm⁻¹, we looked for a vibration frequency of Metal-Oxygen (MO) bond between the selected metal ions (Fe³⁺, Ca²⁺, Zn²⁺) and the oxygen of the OH group.

The FTIR spectrum of 4-MC in figure 4.4a shows the v_{C-O} vibration assigned to the region 1120-1000 cm⁻¹ while the deformation of the bond =CH in the plane is assigned to 1050-1020 cm⁻¹ and out of the plane at 840-770 cm⁻¹. Figures 4.4 - 4.6 show the effects of Fe³⁺, Ca²⁺ and Zn²⁺ on the FTIR spectrum of 4-MC.



Figure 4.16 FTIR spectra taken in KBr pressed pellets of (a) 4-MC, (b) 4-MC/Fe³⁺ (molar ratio 2 : 1), and (c) 4-MC/Fe³⁺ (1 : 1).



Figure 4.17 FTIR spectra taken in KBr pressed pellets of (a) 4-MC, (b) 4-MC/ Zn^{2+} (molar ratio 2 : 1), and (c) 4-MC/ Zn^{2+} (1 : 1).



Figure 4.18 FTIR spectra taken in KBr pressed pellets of (a) 4-MC, (b) 4-MC/Ca²⁺ (molar ratio 2 : 1), and (c) 4-MC/Ca²⁺ (1 : 1).

Our results show that iron perturbs the 4-MC spectrum as a function of the molar ratio (Figure 4.8). We note the appearance of a new band at 1095 cm⁻¹ assigned to the C-O stretching^[94] for 4-MC/Fe complex. In addition, we note new and less intense bands at 874 and 831 cm⁻¹ which, when compared to the literature (789 - 841 cm⁻¹)^[95,96], can be assigned to the Fe-O bond, although other studies report these bands in the range 514 - 630 cm^{-1[96–99]}. Because these new bands can only be observed in the spectra of 4-MC in presence Fe³⁺ the metal ion, this result confirms the coordination with 4-MC to form a 4-MC/Fe complex through a charge transfer between the metal ion and the oxygen of the OH group of 4-MC.

The presence of Zn^{2+} only lead to minor changes in the 4-MC spectrum in figure 4.9. The vibration frequency of the C-O bond at 1112 cm⁻¹ is modified in presence of the metal ion. We also note the appearance of a shoulder at 1096 cm⁻¹ and a new band at 1062 cm^{-1[94]}. A new but not intense band appears at 872 cm⁻¹ but could be assign to the Zn-O bond which, according to the literature, would be expected between 789 - 846 cm^{-1[95]} and also in range 500 - 390 cm^{-1 [100-103]}. Altogether, the spectra do not provide enough evidence for the formation of a 4-MC/Zn complex through Zn-O bond. Therefore, the spectral changes are most likely due to a modification of the ionic strength as the molar ratio of Zn^{2+} increases. Finally, the introduction of calcium ions at different molar ratios in the 4-MC solution does not induce significant changes on the FTIR spectrum (Figure 4.10). Therefore, the FTIR analysis confirms that only Fe (III) significantly modifies the 4-MC spectrum by the formation of a 4-MC/Fe complex through the formation of a Fe-O bond.

4.14 Conclusion

In this study, we have used 4-MC as a model molecule of DOPA found in byssal thread proteins to study the interaction with inorganic ions. Among the investigated ions, Fe^{3+} is the only one which significantly interacts with 4-MC. A strong complex with a high affinity constant ($K_{re} = 10^{41} M^{-1}$) is formed between Fe^{3+} and the oxygen of the hydroxyl group of the catechol to form the Fe-O coordination bond and this complex absorbs at 560 nm. Therefore, our results confirm that in *Mytilus eduli*, DOPA interacts with Fe^{3+} and forms a network of crosslinks which is responsible of the hardness and extensibility of the cuticle which covers byssus threads.

CHAPITRE V

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans la première partie de ce travail, l'ICP-MS et les tests mécaniques en traction ont permis d'étudier les effets des ions métalliques sur les propriétés mécaniques de la partie distale du byssus de la moule bleue. L'analyse ICP-MS a révélé qu'une solution d'éthylène diamine tétra acétate (EDTA 0,2 M pH 8,0) élimine partiellement les ions métalliques dans le byssus, mais qu'il est également possible de restaurer partiellement ces ions métalliques même lorsque le byssus est séparé de la moule. Cette restauration dépend de paramètres tels que la disponibilité et la nature des ions métalliques, mais également du pH environnant. Lorsque les fibres sont traitées avec différents ions métalliques et pH, les tests mécaniques par traction révèlent que le pH est un paramètre qui module les propriétés mécaniques du byssus. Lorsque le pH 5,5 - comme dans le pied de la moule - évolue à 8,0 comme dans le milieu marin, le module d'élasticité des fibres de byssus augmente également. Cependant, en présence des ions Fe³⁺ particulièrement et à pH 8,0, le module d'élasticité augmente de manière significative et se rapproche de la valeur de la fibre native.

La spectroscopie UV-Vis, FTIR et l'ITC ont montré que le méthylcatéchol qui mime le cycle aromatique de la DOPA, interagirait exclusivement avec les ions Fe³⁺. Cette interaction de nature exothermique provient de la formation d'un complexe bis (catécholate) de fer (III) [Fe(cat)₂] d'une constante d'affinité $K_{re} = 10^{41} M^{-1}$. Ce complexe absorbe à 560 nm et l'analyse FTIR a permis d'identifier qu'il s'agit d'un transfert d'électron entre l'ion Fe³⁺ et l'atome d'oxygène du catéchol qui forme la liaison (Fe-O).

Après études et analyses des résultats obtenus, ce projet nous a permis de comprendre que dans le processus d'assemblage moléculaire du byssus, la DOPA interagit majoritairement avec l'ion Fe³⁺ et forme un complexe catécholate de fer qui contribue à l'intégrité mécanique de la cuticule particulièrement.

Bien que nous ayons pu établir le lien entre la structure et les propriétés mécaniques, nous suggérons deux techniques pouvant également apporter des informations pertinentes :

- L'utilisation du spectromètre des rayons X (EDX) permettrait d'obtenir des informations sur la composition qualitative et quantitative des ions métalliques dans le cœur ou la gaine du byssus. Ensuite, l'utilisation de l'XPS permettrait d'étudier les interactions avec les cations métalliques. Ces renseignements permettront de savoir si la réaction de complexation a lieu dans la gaine où se retrouve majoritairement la DOPA.
- La détermination de la température de transition vitreuse avant et après insertion des ions métalliques ciblés. Cette étape permettra de définir le profil de réticulation du réseau fibreux et de faire un lien avec la modification de propriétés mécaniques.

Malgré le résultat significatif obtenu dans ce projet qui montre la prédominance de l'interaction des ions fer avec la DOPA, il reste néanmoins des zones d'ombre à éclaircir, car en présence des ions inorganiques, la DOPA et l'histidine sont capables de générer des complexes qui contribuent aux propriétés mécaniques du byssus. Mais puisque nous n'avons pas étudié l'interaction des ions inorganiques avec l'histidine, nous suggérons que celle-ci soit faite afin de comparer la contribution des complexes

provenant de ces deux constituants. Les résultats obtenus de toutes les analyses qui précèdent permettront d'avoir une appréciation globale de la relation structurepropriétés mécaniques du byssus en présence des ions métalliques ciblés.

Une étude comparative de la constante d'affinité des complexes ion métallique-DOPA et ion métallique-His permettrait de mieux apprécier la contribution de chacun sur les propriétés mécaniques du byssus natif. Cette étude comparative servirait également de base à la conception et la prédiction des propriétés mécaniques de nouveaux matériaux.

En évaluant la contribution des ions métalliques sur les propriétés du byssus, nous avons travaillé à une concentration identique pour chaque ion métallique. Mais parmi les questions à se poser, il y a celle de la concentration des ions métalliques. La concentration en ion métallique a-t-elle un impact significatif sur les propriétés du byssus ? Si oui, quelle serait la concentration limite pour chaque ion métallique si l'on veut obtenir des propriétés identiques à celles présentes dans les différentes portions du byssus ? La réponse à cette question permettrait de faire varier le ratio ion métallique-DOPA et ou ion métallique-His dans les matériaux biomimétiques afin d'atteindre les propriétés escomptées.

Enfin, le byssus intègre dans sa structure des portions exhibant une composition similaire à trois matériaux naturels, à savoir la paroi d'une cellule végétale, l'élastine et la soie. En tenant compte du fait que les résultats des travaux sur la soie d'araignée ouvrent des fenêtres dans le domaine biomédical^[1,2,104–112], il serait intéressant d'étudier de plus près le byssus. La structure complexe du byssus qui combine en son sein trois matériaux naturels sera-t-elle largement exploitée dans le domaine du génie tissulaire et de la vectorisation des principes actifs ? Si oui, alors, un pays comme le Canada qui commercialise la moule pourrait également valoriser les déchets (byssus) de cette ressource naturelle maritime.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] C. Vepari, D. L. Kaplan, Prog. Polym. Sci. 2007, 32, 991-1007.
- [2] E. Wenk, H. P. Merkle, L. Meinel, J. Controlled Release 2011, 150, 128-141.
- [3] N. Aldred, T. Wills, D. N. Williams, A. S. Clare, J. R. Soc. Interface 2007, 4, 1159–1167.
- [4] A.-A. Lachance, R. Hennebicq, B. Myrand, J.-M. Sévigny, E. Kraffe, Y. Marty, I. Marcotte, R. Tremblay, *Aquat. Living Resour.* 2011, 24, 283–293.
- [5] Minister of Industry, Aquaculture Statistics, Ottawa, 2012, p. 26.
- [6] W. Friess, Eur. J. Pharm. Biopharm. 1998, 45, 113-136.
- [7] F. Byette, C. Pellerin, I. Marcotte, J. Mater. Chem. B 2014, 2, 6378-6386.
- [8] A. Hagenau, H. A. Scheidt, L. Serpell, D. Huster, T. Scheibel, Macromol. Biosci. 2009, 9, 162–168.
- [9] E. Bell, J. Gosline, J. Exp. Biol. 1996, 199, 1005–1017.
- [10] M. Kanyalkar, S. Srivastava, E. Coutinho, Biomaterials 2002, 23, 389-396.
- [11] C. Sun, J. H. Waite, J. Biol. Chem. 2005, 280, 39332-39336.
- [12] Y. L. Garner, M. K. Litvaitis, J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2013, 446, 52-56.
- [13] A. Lachance, B. Myrand, R. Tremblay, V. Koutitonsky, E. Carrington, Aquat. Biol. 2008, 2, 119-129.
- [14] H. G. Silverman, F. F. Roberto, in *Biol. Adhes. Syst.* (Eds.: J. von Byern, I. Grunwald), Springer Vienna, Vienna, 2010, pp. 273–283.
- [15] K. J. Coyne, X. X. Qin, J. H. Waite, Science 1997, 277, 1830-1832.
- [16] S. Schmidt, A. Reinecke, F. Wojcik, D. Pussak, L. Hartmann, M. J. Harrington, *Biomacromolecules* 2014, 15, 1644–1652.
- [17] M. J. Harrington, J. H. Waite, J. Exp. Biol. 2007, 210, 4307–4318.
- [18] S. L. Brazee, E. Carrington, Biol. Bull. 2006, 211, 263-274.
- [19] A. Hagenau, P. Papadopoulos, F. Kremer, T. Scheibel, J. Struct. Biol. 2011, 175, 339–347.
- [20] J. H. Waite, H. C. Lichtenegger, G. D. Stucky, P. Hansma, *Biochemistry (Mosc.)* 2004, 43, 7653–7662.
- [21] J. H. Waite, E. Vaccaro, C. Sun, J. M. Lucas, Phil. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 2002, 357, 143–153.
- [22] A. A. Arnold, F. Byette, M.-O. Séguin-Heine, A. LeBlanc, L. Sleno, R. Tremblay, C. Pellerin, I. Marcotte, *Biomacromolecules* 2013, 14, 132-141.
- [23] C. N. Z. Schmitt, Y. Politi, A. Reinecke, M. J. Harrington, Biomacromolecules 2015, 16, 2852–2861.

- [24] E. Carrington, Integr. Comp. Biol. 2002, 42, 846-852.
- [25] J. M. Lucas, E. Vaccaro, J. H. Waite, J. Exp. Biol. 2002, 205, 1807-1817.
- [26] J. Waite, X. Qin, K. J. Coyne, Matrix Biol. 1998, 17, 93-106.
- [27] A. A. Arnold, I. Marcotte, Concepts Magn. Reson. Part A 2009, 34A, 24-47.
- [28] M. J. Harrington, A. Masic, N. Holten-Andersen, J. H. Waite, P. Fratzl, Science 2010, 328, 216–220.
- [29] Q. Lin, D. Gourdon, C. Sun, N. Holten-Andersen, T. H. Anderson, J. H. Waite, J. N. Israelachvili, Proc. Natl. Acad. Sci. 2007, 104, 3782–3786.
- [30] S. Hermínio, R. Costa, 2011.
- [31] Z. Bouhlel, B. Genard, N. Ibrahim, E. Carrington, J.M.F Babarro, A. Lok A.V, A. Flores, C. Pellerin, R. Tremblay, I. Marcotte, J. Exp. Biol. (submitted).
- [32] N. Holten-Andersen, T. E. Mates, M. S. Toprak, G. D. Stucky, F. W. Zok, J. H. Waite, *Langmuir* 2009, 25, 3323–3326.
- [33] C. N. Z. Schmitt, A. Winter, L. Bertinetti, A. Masic, P. Strauch, M. J. Harrington, J. R. Soc. Interface 2015, 12, 20150466.
- [34] J. Gosline, M. Lillie, E. Carrington, P. Guerette, C. Ortlepp, K. Savage, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2002, 357, 121–132.
- [35] E. Degtyar, M. J. Harrington, Y. Politi, P. Fratzl, Angew. Chem. Int. Ed. 2014, 2-21.
- [36] H. Lee, B. P. Lee, P. B. Messersmith, Nature 2007, 448, 338-341.
- [37] D. G. Barrett, D. E. Fullenkamp, L. He, N. Holten-Andersen, K. Y. C. Lee, P. B. Messersmith, Adv. Funct. Mater. 2013, 23, 1111–1119.
- [38] D. E. Fullenkamp, L. He, D. G. Barrett, W. R. Burghardt, P. B. Messersmith, Macromolecules 2013, 46, 1167–1174.
- [39] M. Krogsgaard, A. Andersen, H. Birkedal, Chem Commun 2014, 50, 13278– 13281.
- [40] Q. Wei, K. Achazi, H. Liebe, A. Schulz, P.-L. M. Noeske, I. Grunwald, R. Haag, Angew. Chem. Int. Ed. 2014, 11650–11655.
- [41] Z. Xu, Sci. Rep. 2013, 3, 1–7.
- [42] M.-O. Séguin Heine, 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 de maitrise, Université du Québec à Montréal, 2013.
- [43] E. Vaccaro, J. H. Waite, Biomacromolecules 2001, 2, 906-911.
- [44] A. W. Johnson, *Invitation à la chimie organique*, De Boeck Université, Paris; Bruxelles, 2003.
- [45] S. Degallaix, B. Ilschner, M. Boussuge, *Caractérisation expérimentale des matériaux*, Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne, 2007.
- [46] J. Keirsse, Spectroscopie infrarouge déportée : mise au point d'un biocapteur pour l'imagerie métabolique et la sécurité microbiologique, Université Rennes 1, 2003.
- [47] E. Biémont, Spectroscopie moléculaire : structures moléculaires et analyse spectrale, De Boeck, Bruxelles, 2008.

- [48] A. I. Vogel, J. Mendham, J. Toullec, M. Mottet, *Analyse chimique quantitative de Vogel*, De Boeck, Bruxelles, **2006**.
- [49] J. C. Diaz Rosado, Study and development of the laser induced breakdown spectroscopy (libs) for the realization of field measurements : application to analysis on-line of metals in liquids, Université Paris Sud Paris XI, 2013.
- [50] E. de Hoffmann, V. Stroobant, *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, J. Wiley, Hoboken, NJ, **2007**.
- [51] A. Velazquez-Campoy, S. A. Leavitt, E. Freire, *Protein-Protein Interact.* Methods Appl. 2004, 35-54.
- [52] D. E. Wilcox, Inorganica Chim. Acta 2008, 361, 857-867.
- [53] S. Yang, G. Bai, L. Chen, Q. Shen, X. Diao, G. Zhao, Food Chem. 2014, 157, 302–309.
- [54] S. Milev, Gen. Electr. 2013, 9.
- [55] J. H. Waite, C. C. Broomell, J. Exp. Biol. 2012, 215, 873-883.
- [56] N. Holten-Andersen, N. Slack, F. Zok, J. Herbert Waite, in MRS Proc., Cambridge Univ Press, 2004, pp. R3-7.
- [57] J. H. Waite, Integr. Comp. Biol. 2002, 42, 1172-1180.
- [58] T. Pearce, M. LaBarbera, J. Exp. Biol. 2009, 212, 1442–1448.
- [59] J. P. Mercier, W. Kurz, G. Zambelli, *Introduction à la science des matériaux*, Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne, **1999**.
- [60] C. Massonnet, S. Cescotto, *Mécanique des matériaux*, De Boeck-Wesmael, Bruxelles, **1994**.
- [61] S. B. Woźniak, D. Stramski, M. Stramska, R. A. Reynolds, V. M. Wright, E. Y. Miksic, M. Cichocka, A. M. Cieplak, J. Geophys. Res. 2010, 115.
- [62] M.-O. Seguin-Heine, A.-A. Lachance, B. Genard, B. Myrand, C. Pellerin, I. Marcotte, R. Tremblay, Aquaculture 2014, 426–427, 189–196.
- [63] J. H. Waite, in Struct. Cell. Synth. Assem. Biopolym. (Ed.: S.T. Case), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1992, pp. 27–54.
- [64] H. Zeng, D. S. Hwang, J. N. Israelachvili, J. H. Waite, Proc. Natl. Acad. Sci. 2010, 107, 12850–12853.
- [65] C. Liu, S. Li, J. Huang, Y. Liu, G. Jia, L. Xie, R. Zhang, Sci. Rep. 2015, 5, 15018.
- [66] J. S. Jaworski, J. Karasiński, E. Bulska, J. M. F. Babarro, Int. J. Environ. Anal. Chem. 2015, 95, 657-664.
- [67] M. M. Harding, M. W. Nowicki, M. D. Walkinshaw, Crystallogr. Rev. 2010, 16, 247–302.
- [68] L. Zhou, S. Li, Y. Su, X. Yi, A. Zheng, F. Deng, J. Phys. Chem. B 2013, 117, 8954–8965.
- [69] S. Das, D. R. Miller, Y. Kaufman, N. R. Martinez Rodriguez, A. Pallaoro, M. J. Harrington, M. Gylys, J. N. Israelachvili, J. H. Waite, *Biomacromolecules* 2015, 16, 1002–1008.
- [70] A. E. Martell, R. M. Smith, Critical Stability Constants : First supplement. led, Springer US, 1982.
- [71] A. E. Martell, R. M. Smith, Other Organic Ligands. led, Springer US, 1997.

- [72] L. M. McDowell, L. A. Burzio, J. H. Waite, J. Schaefer, J. Biol. Chem. 1999, 274, 20293–20295.
- [73] A. V. Lebedev, M. V. Ivanova, A. A. Timoshin, E. K. Ruuge, *ChemPhysChem* 2007, 8, 1863–1869.
- [74] J. Yang, M. A. Cohen Stuart, M. Kamperman, Chem Soc Rev 2014, 43, 8271– 8298.
- [75] B. Kalyanaraman, C. C. Felix, R. C. Sealy, Environ. Health Perspect. 1985, 64, 185.
- [76] E. D. Tzika, V. Papadimitriou, T. G. Sotiroudis, A. Xenakis, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2008, 110, 149–157.
- [77] M. J. Sever, J. J. Wilker, Dalton Trans. 2004, 1061-1072.
- [78] L. A. Burzio, J. H. Waite, Biochemistry (Mosc.) 2000, 39, 11147-11153.
- [79] N. R. Perron, J. N. Hodges, M. Jenkins, J. L. Brumaghim, Inorg. Chem. 2008, 47, 6153-6161.
- [80] P. Sánchez, N. Gálvez, E. Colacio, E. Miñones, J. M. Domínguez-Vera, Dalton Trans. 2005, 811.
- [81] J. Cabanes, F. García-Cánovas, F. García-Carmona, Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol. 1987, 914, 190–197.
- [82] J. M. Bowness, R. A. Morton, Biochem. J. 1953, 53, 620-626.
- [83] C. Liu, J. M. Zachara, Y. A. Gorby, J. E. Szecsody, C. F. Brown, *Environ. Sci. Technol.* 2001, 35, 1385–1393.
- [84] R. P. Singh, Y. D. Yeboah, E. R. Pambid, P. Debayle, J. Chem. Eng. Data 1991, 36, 52-54.
- [85] J. L. Meyer, Anal. Biochem. 1974, 62, 295-300.
- [86] J. Muus, H. Lebel, On Complex Calcium Citrate, Levin & Munksgaard, 1936.
- [87] N. Slabbert, in Plant Polyphenols, Springer, 1992, pp. 421-436.
- [88] B Kalyanaraman, P. I. Premovic, R. C. Sealy, J. Biol. Chem. 1987, 262, 11080– 11087.
- [89] H. A. Shnawa, Mater. Sci. Appl. 2011, 2, 692-699.
- [90] H. A. Shnawa, M. N. Khalaf, Y. Jahani, A. A. H. Taobi, Mater. Sci. Appl. 2015, 6, 360–372.
- [91] M. Butler, P. A. Mañez, G. M. Cabrera, P. Maître, J. Phys. Chem. A 2014, 118, 4942–4954.
- [92] J. J. Wilker, Curr. Opin. Chem. Biol. 2010, 14, 276-283.
- [93] D. A. Dougherty, J. Nutr. 2007, 137, 1504S-1508S.
- [94] H. Elhaes, N. M. Elkashef, F. K. Abdel-Gawad, A. M. Shaban, M. Ibrahim, J. Comput. Theor. Nanosci. 2014, 11, 1081-1085.
- [95] M. A. Qadir, M. Ahmed, A. Ahmad, S. Naz, S. A. A. S. Tirmazi, R. Khan, I. Hussain, R. Waseem, *Global Veterinaria* 2014, 12, 858–861.
- [96] A. U. Gehring, A. M. Hofmeister, Clays Clay Miner. 1994, 42, 409-415.
- [97] E.-M. Mosoarca, R. Tudose, W. Linert, O. Costisor, Chem. Bull. "POLITEHNICA" Univ 2006, 51, 1-2.
- [98] B. J. Saikia, G. Parthasarathy, J. Mod. Phys. 2010, 1, 206-210.

- [99] P. Cambier, Clay Miner. 1986, 21, 191–200.
- [100] E. J. Waheed, J. Al-Nahrain Univ. Sci. 2012, 15, 1-10.
- [101] N. Ban Z, J. Al-Nahrain Univ. Sci. 2014, 17, 167-172.
- [102] N. S. Rao, M. V. B. Rao, Am. J. Mater. Sci. 2015, 5, 66-68.
- [103] Y. Yang, Y. Yang, H. Wu, S. Guo, CrystEngComm 2013, 15, 2608-2615.
- [104] F. P. Seib, D. L. Kaplan, Biomaterials 2012, 33, 8442-8450.
- [105] B. Marelli, A. Alessandrino, S. Farè, G. Freddi, D. Mantovani, M. C. Tanzi, Acta Biomater. 2010, 6, 4019–4026.
- [106] K. A. Karve, E. S. Gil, S. P. McCarthy, D. L. Kaplan, J. Membr. Sci. 2011, 383, 44-49.
- [107] N. A. Guziewicz, A. J. Massetti, B. J. Perez-Ramirez, D. L. Kaplan, *Biomaterials* 2013, 34, 7766–7775.
- [108] S. Hofmann, C. T. Wong Po Foo, F. Rossetti, M. Textor, G. Vunjak-Novakovic, D. L. Kaplan, H. P. Merkle, L. Meinel, J. Controlled Release 2006, 111, 219– 227.
- [109] B. Kundu, R. Rajkhowa, S. C. Kundu, X. Wang, Adv. Drug Deliv. Rev. 2013, 65, 457–470.
- [110] B. Kundu, N. E. Kurland, S. Bano, C. Patra, F. B. Engel, V. K. Yadavalli, S. C. Kundu, Prog. Polym. Sci. 2014, 39, 251–267.
- [111] B. An, T. M. DesRochers, G. Qin, X. Xia, G. Thiagarajan, B. Brodsky, D. L. Kaplan, *Biomaterials* 2013, 34, 402–412.
- [112] J. Zhang, E. Pritchard, X. Hu, T. Valentin, B. Panilaitis, F. G. Omenetto, D. L. Kaplan, Proc. Natl. Acad. Sci. 2012, 109, 11981–11986.