

## La biocalcification chez le Corail rouge, *Corallium rubrum*. 2. Approches Biochimique et Physiologique

Denis ALLEMAND et Marie-Christine GRILLO

Centre Scientifique de Monaco, Laboratoire de Biologie Marine, Musée Océanographique, MC 98000 (Monaco)

Bien que le squelette du Corail rouge de Méditerranée (*Corallium rubrum*) représente sa valeur économique, il est surprenant de constater que son mode de formation n'a jamais été étudié. Afin de tenter de combler cette lacune, le but de notre travail est, par une approche multidisciplinaire, de comprendre les mécanismes de biocalcification chez cette espèce.

Une étude morphologique des tissus à l'origine de la formation des structures calcifiées est présentée dans la commission zoobenthos. Le présent rapport montre nos résultats préliminaires concernant la composition de la matrice organique des structures squelettiques, ainsi qu'une approche physiologique grâce à la mesure de la production d'acidité et de la cinétique d'absorption de calcium par la colonie.

Plusieurs octocoralliaires ont déjà servi de modèle biologique pour étudier la biocalcification (Kingsley et Watabe, 1983, 1989; Goldberg, 1988). Parmi ceux-ci, le Corail rouge présente l'originalité de posséder un axe central entièrement calcifié, alors que celui-ci est en grande partie constitué, chez la plupart des autres espèces, par une matrice cornée de nature protéique faiblement calcifiée (Kingsley et Watabe, 1983). Cette différence fournit donc matière à une étude comparative qui permettra de mieux comprendre les mécanismes cellulaires de la biocalcification et de son contrôle.

### ANALYSE BIOCHIMIQUE DES STRUCTURES CALCIFIEES.

En collaboration avec P. Simon (Musée d'anthropologie préhistorique de Monaco), nous avons montré, par diffractométrie à rayons X, que la phase minérale des deux types de structures calcifiées (spicules et squelette axial) est constituée de carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ) cristallisé sous la forme de calcite fibreuse. On note aussi la présence d'une faible quantité de magnésium.

Quel que soit le type de formation squelettique, il apparaît qu'elle possède toujours une phase organique (dite matrice organique) liée à la phase minérale, dont la proportion est cependant très variable (de 0,01 % à presque 20 %) (Weiner *et al.*, 1983). Cette matrice organique joue un rôle important dans le contrôle de la biocalcification (Lowenstam et Weiner, 1989). Il est cependant admis dans la littérature que le squelette du Corail rouge manque totalement de matrice organique (Bayer, 1964).

Les fractions squelettiques (spicules et axe) sont obtenues après savoir dissous les tissus (NaOH N). Elles sont ensuite décalcifiées (à l'acide acétique pH4 ou à l'EDTA 0,5M pH8). A ce stade, nous avons obtenu une fraction organique représentant de 0,5 (squelette axial) à 0,9 % (spicules) du poids initial du squelette. Cette matrice organique se présente sous deux formes (séparées par centrifugation 10 000 g):

- l'une insoluble représentant de 55 % (axe) à 59 % (spicules) de la fraction organique,
- l'autre soluble.

L'analyse de cette phase organique montre qu'elle est composée d'environ 70 % de carbohydrates, 25 % de protéines et 5 % de lipides.

Afin de déterminer le poids moléculaire des protéines des deux fractions, nous avons effectué une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu SDS. Il n'a pas été possible de colorer ces protéines de façon classique (coomassie, argent). Cette difficulté, signalée par Venkatesan *et al.* (1986) lors de l'isolation de la matrice organique des spicules d'Oursin (*Strongylocentrotus purpuratus*), a été contournée en réalisant une iodation des protéines. Il semblerait qu'une protéine de 50 kD soit présente dans les deux phases. La phase insoluble possède en outre une (des) protéine (s) de haut poids moléculaire (sup. à 300 kD).

La proportion de matrice organique trouvée dans les structures squelettiques du Corail est cependant très inférieure à celle d'autres Octocoralliaires pour lesquels des valeurs de 4 à 6 % dans les spicules ont été rapportées (Kingsley et Watabe, 1983; Goldberg, 1988). Les valeurs que nous avons trouvées se rapprochent beaucoup plus des coquilles de Mollusques (Cariolou et Morse, 1988) ou des pièces squelettiques d'Oursin (Weiner *et al.*, 1983).

### CINETIQUE D'ABSORPTION DE $^{45}\text{Ca}$ PAR UNE COLONIE.

Nous avons suivi l'incorporation de  $^{45}\text{Ca}$  dans les différents compartiments d'une colonie de Corail rouge (tissus, squelette axial, spicules) de 30 minutes à 24 heures. L'équilibre isotopique est atteint dans les tissus en 5 heures environ. A partir de ce moment, on peut estimer que les RAS se sont égalisées entre le calcium tissulaire et le calcium dans l'eau de mer. Le dépôt de calcium dans les structures squelettiques peut alors être calculé (les valeurs de flux de  $^{45}\text{Ca}$  sont calculées par rapport à la quantité de protéines tissulaires de la colonie ou du morceau de colonie étudié):

tissus:	4,96 +/- 0,69 nmol Ca (soit 198 ng Ca)/ 24h. mg protéine.
squelette:	6,20 +/- 1,45 nmol Ca (soit 248 ng Ca)/ 24h. mg protéine.
Spicules:	17,10 +/- 3,90 nmolCa (soit 684 ng Ca)/ 24h. mg protéine.

Ces résultats montrent que les spicules sont le siège d'une intense activité de calcification. Afin de déterminer si l'activité de calcification était homogène dans l'ensemble de la colonie, nous avons mesuré la répartition du  $^{45}\text{Ca}$  dans les différents compartiments de l'apex à la base de la colonie. Nos résultats ne montrent que de faibles différences (non significatives) en ce qui concerne le calcium absorbé par les tissus ou déposés sur le squelette axial. Par contre, les spicules présents dans les zones apicales et basales présentent une activité de calcification variant d'un facteur 2 par rapport à la zone médiane de la colonie. La quantité de spicules par rapport à la quantité de protéines reste cependant constante dans toute la colonie. Cette répartition suggère que les zones basales et apicales de la colonie sont le siège d'une spiculogénèse intense. Par contre, la formation de l'axe central est constante de la base à l'apex de la colonie. Kingsley et Watabe (1989) ont montré, chez *Leptogorgia virgulata*, une répartition similaire de l'absorption de  $^{45}\text{Ca}$  au niveau des spicules et des tissus.

Nous avons d'autre part étudié les mécanismes de transport de calcium. Celui-ci est saturable, et possède une affinité pour le calcium ( $K_m$ ) de l'ordre de 6 mM.

### EVOLUTION DE L'EXCRETION D' $\text{H}^+$ PAR UNE COLONIE.

Afin de mesurer l'activité métabolique générale d'une colonie de Corail, nous avons mesuré son excrétion globale d'acide sur des périodes de temps variables. Nos résultats montrent que la production de  $\text{H}^+$  n'est pas constante dans le temps. Elle évolue autour d'une valeur moyenne de 0,15  $\mu\text{equiv}$   $\text{H}^+$ /30 min. pour une colonie d'environ 50 polypes, mais peut être totalement nulle sur des périodes de temps variable de quelques minutes à plus d'une heure. Cette production de  $\text{H}^+$  est fonction du nombre de polypes ouverts. Ces résultats suggèrent que l'activité métabolique du Corail est variable dans le temps, sans que l'on puisse cependant en dégager un cycle net. Il faut donc s'attendre à ce que la calcification présente aussi de telles variations.

Les résultats préliminaires présentés ici permettent d'esquisser un premier modèle de la biocalcification chez le Corail rouge (*Corallium rubrum*).

### REFERENCES

- BAYER F.M. (1964). Bull. Mar.Sci. Gulf & Caribb. 14: 465-478.  
 CARIOLOU M.A., MORSE D.E. (1988). J. Comp. Physiol. B. 157: 717-729.  
 GOLDBERG W.M. (1988). Histochem. 89: 163-170.  
 KINGSLEY R.J., WATABE N. (1983). Comp. Biochem. Physiol. 76B: 443-447.  
 KINGSLEY R.J., WATABE N. (1989). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 133: 57-65.  
 LOWENSTAM H.A., WEINER S. (1989). On Biomineralization. Oxford University Press.  
 VENKATESAN M, SIMPSON R.T. (1986). Exp. Cell. Res. 166: 259-264.  
 WEINER S., TRAUB W., LOWENSTAM M.A. (1983). Organic matrix in calcified exoskeletons. in: Biomineralization and biological metal accumulation. Westbroek P. et De Jong E.W. eds., Reidel Publishing Company, pp 205-224.