

Protocole standardisé (échantillonnage, EC, CIC)

Tache 1.1 – Echantillonnage et identification

A) Protocole d'échantillonnage

Pour chaque mission ECIMAR au moins un des trois plongeurs scientifiques (Philippe Amade, Thierry Perez, Bernard Banaigs) devra participer pour appliquer la méthodologie détaillée ci-dessous :

- préparation au préalable des sacs plastiques numérotés (une vingtaine par binôme de plongeurs),
- point GPS du site de plongée (station),
- sous l'eau repérer les différentes espèces représentatives du site (photo grand angle) et commencer l'échantillonnage. Le correspondant local du site ECIMAR devra fournir une liste des espèces déjà référencées, et donc susceptibles d'être récoltées, le plus tôt possible. Inclure les spongiaires, les ascidies, les bryozoaires et les cnidaires,
- chaque espèce collectée fera l'objet d'une ou plusieurs photos sous-marines. Au sortir de l'eau et le plus tôt possible, les sacs des échantillons sont vidés d'une grande partie de l'eau et conservés dans une glacière refroidie.

A terre chaque échantillon est traité comme suit :

- codification du spécimen récolté : ex **070516Ma1-05 (DateSiteStation-Numéro)**

070516 correspondant à la date (yy/mm/dd)


Ma pour Marseille (l'un des 5 sites atelier)

: le n° de la station dans ce site (1, 2 ou 3)

: le n° de l'échantillon récolté

- pour chaque spécimen : 1 morceau du spécimen coupé au scalpel dans un flacon de verre de 20 mL contenant de l'éthanol pour conservation sur le site, 1 morceau du spécimen coupé au scalpel dans un flacon de verre de 20 mL contenant de l'éthanol pour identification taxonomique et le reste dans un sac plastique placé au congélateur à - 20 °C.

Sur chacun de ces 3 échantillons présence de la même étiquette (du type de celle proposée ci-dessous) avec le code noté au crayon en bois et agrafé ou scotché. Possibilité de rajouter la taxonomie des espèces collectées si connue.

	Site: Ma	Station id (1 to ..):
Date : yy/mm/dd	Taxon ?	Sample id (01 to...)

- parallèlement création d'un tableau (cf fichier Excel établi lors de la mission préparatoire du 16 mai 2007 à Marseille) regroupant le code de chaque échantillon associé à l'identification et à l'abondance de l'espèce.
- les échantillons congelés sont ensuite lyophilisés par les partenaires 1-UNSA et 5-DIMAR.

B) Destination des échantillons

Echantillons taxonomie : un échantillon est conservé par l'organisateur de la récolte qui crée une collection de références. Le deuxième échantillon est réservé pour son éventuel envoi à un spécialiste pour détermination.

Echantillons chimie : la totalité des échantillons lyophilisés est envoyée au correspondant chimiste préalablement identifié.

C) Identification

- tous les échantillons pour la collection de référence seront fixés dans l'éthanol à 95 %.
- pour la taxonomie de certains groupes, et en supplément aux spécimens fixés dans l'alcool, une procédure particulière sera "si possible" adoptée :

• Pour les éponges Homoscleromorpha (genre *Oscarella* en particulier) : l'identification des espèces de ce groupe nécessite le plus souvent une observation au niveau cytologique. Pour cela, fixer de tout petits morceaux (< 3 mm de côté) au glutaraldéhyde 2%. Les solutions et le matériel pour préparer le fixateur à 2% (tampon cacodylate, solution mère de Gluta 10 ou 25%) seront fournis avant la mission. Conserver les échantillons dans la Gluta et au frais jusqu'à l'envoi au spécialiste.

• pour les ascidies : mettre l'échantillon récolté (avec un peu de substrat si possible), dans un bocal rempli d'eau de mer. Le laisser s'épanouir. Idéalement, l'anesthésier en le mettant au congélateur jusqu'à formation d'une couche superficielle de glace. Transférer l'échantillon dans le fixateur (formol tamponné ou dilué à l'eau de mer 7-10 %). Le passer enfin dans du formol 4 % (tamponné ou dilué à l'eau de mer). Pratiquement, l'anesthésie au congélateur peut être remplacée par l'ajout de quelques cristaux de menthol dans le bocal rempli d'eau de mer et fixation comme précédemment après 2-3 heures de repos.

Tache 1.2 – Acquisition de l'empreinte chimique (EC)

A) Obtention et devenir des extraits

- matériel biologique lyophilisé réduit en poudre, pesé et conservé au congélateur à – 20°C,
- extraction de **2 g** environ (pesé exactement) de matériel biologique avec CH₂Cl₂/MeOH (1/1 ; 3 x 20mL, ultrasons 3 x 10 min), filtration sur coton, évaporation en présence de silice C18 (~ 1 g pour dépôt solide),

- extraction sur phase solide [cartouche SPE Phenomenex Strata C18-E, v = 12 mL, 2 g de silice] en chambre à vide :

1) conditionnement de la cartouche ; 10 mL CH₂Cl₂/MeOH 1/2 (lavage/activation) + 10 mL H₂O

2) dépôt solide de l'extrait et lavage par 10 mL d'eau MilliQ (élimination du sel). Laisser les cartouches 15 min environ sous vide pour éliminer l'eau résiduelle

3) élution par 9 mL de mélange CH₂Cl₂/MeOH 1/1, compléter à 10 mL dans une fiole jaugée.

⇒ **obtention de l'extrait organique (extrait A identifié 070516Ma1-05A)**

- les 10 mL d'extrait obtenu sont séparés en 3 :

1) 1 mL dans vial (filtration sur filtre seringue 0,2 µM) pour passeur d'échantillon pour l'analyse "maison" (cf conditions ci-dessous) identifié **070516Ma1-05A1**

2) 1 mL dans vial pour passeur d'échantillon à envoyer à Ali Al Mourabit (3-ICSN) pour analyse LC/MS identifié **070516Ma1-05A2**

3) évaporation, lyophilisation et pesée du restant (8 mL) identifié **070516Ma1-05A3**

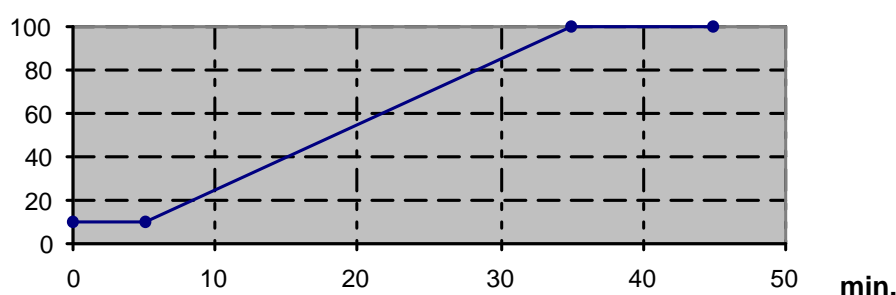
20 mg de cet extrait sont envoyés à l'ICSN (partenaire 3-ICSN) pour mise en plaque 96 puits (dans le DMSO). A partir de cette plaque mère seront préparées des plaques filles pour les différents tests biologiques.

Stockage des extraits obtenus à – 20°C.

A noter que tous ces extraits devront être préparés dès réception des échantillons lyophilisés et envoyés (A2 et A3) groupés afin faciliter la tâche du partenaire 3-ICSN ; les plaques mères ne pouvant, par exemple, être préparées qu'une fois réunis 80 extraits. Il faut raisonner en "campagne", campagne de récolte, de préparation des extraits, d'analyses (CCM, HPLC, LC/MS) et de tests, pour tout ce qui concerne cette partie acquisition de l'empreinte chimique et tests biologiques des extraits.

B) Analyses des extraits A

- analyses HPLC/DAD/ELSD (extraits A1) sur colonne Phenomenex Gemini C6-Phenyl (250 x 3 mm, 5 μ , d=0,5 mL/min)
 - conditions d'analyse 1 : H₂O/CH₃CN
 - conditions d'analyse 2 : H₂O/CH₃CN + 1% Ac. formique
- injection : 20 μ L des extraits A1, T colonne = 30° C (si saturation en détection UV, refaire les analyses en injectant 10 ou 5 μ L)
- gradient d'élution :



⇒ chromatogrammes ELSD + UV 205, 254, 280 nm (extraits du chromatogramme 3D enregistré entre 200 et 600 nm)

- analyses HPLC/MS (extraits A2) dans les mêmes conditions que précédemment (conditions d'analyse 2). Ces analyses seront effectuées par le partenaire 3-ICSN.

⇒ chromatogrammes LC/MS

C) Test de stabilité biologique et chimique pour les espèces cibles (WP3)

Ce test devra être fait uniquement sur les espèces cibles en préalable à un suivi analytique (séries géographiques et/ou temporelles) par le partenaire "chimiste" en charge de l'espèce (ex : *Spongia officinalis*, *S. agaricina*, *Aplysina aerophoba*, *Cystodytes dellechiajei*, *Agelas oroïdes*,...).

- cinétique de dégradation biologique (ex : prélèvement 070516Ma1-05 divisé en 4) :
 1. 070516Ma1-05 lyophilisé extraction analyse des extraits A à t₀
 2. 070516Ma1-05 lyophilisé stockage -20° C pendant 1 semaine extraction analyse à t₁
 3. 070516Ma1-05 lyophilisé stockage -20° C pendant 1 mois extraction analyse à t₂
 4. 070516Ma1-05 lyophilisé stockage -20° C pendant 2 mois extraction analyse à t₃
- cinétique de dégradation chimique (extraits 070516Ma1-05A divisés en 4)
 1. extrait analyse à t₀
 2. extrait stockage -20° C pendant 1 semaine analyse à t₁
 3. extrait stockage -20° C pendant 1 mois analyse à t₂
 4. extrait stockage -20° C pendant 2 mois analyse à t₃

D) Caractérisation du niveau de base de l'expression des métabolites secondaires pour les espèces cibles
(WP3)

Prélèvement d'une dizaine d'échantillons d'une même espèce sur un site donné ⇒ extractions séparées ⇒ solutions A ⇒ analyses HPLC des différents extraits ⇒ comparaison des chromatogrammes ⇒ variabilité ?

Refaire la manip avec des prélèvements effectués une semaine après.

Tache 1.3 – Isolement et caractérisation de nouveaux métabolites secondaires (CIC)

Fractionnement bio- et/ou chimioguidé (en fonction des espèces) :

- extrait préparé en suivant le protocole défini pour l'acquisition de l'empreinte chimique,
- flash chromatographie sur cartouches C18 : lavage avec H₂O pour se débarrasser des sels puis récupération de 5 fractions (H₂O/MeOH 1/1, H₂O/MeOH 1/3, MeOH 100%, MeOH/CH₂Cl₂ 1/1, CH₂Cl₂ 100%).

- la suite du fractionnement et de la purification est à adapter par chaque partenaire en fonction des espèces étudiées et/ou de la famille chimique.

Tache 1.4 – Évaluation de l'activité biologique (2-MNHN, 3-ICSN, 4-UPVD, 6-UA, 7-USTV)

- Préparation des échantillons pour les tests envisagés (à définir avec les différents "testeurs") :

- 2-MNHN - Activité antimicrobienne (antibactérienne et antifongique)
- Activité anti-inflammatoire (anti-PLA₂, anti-élastase)
- Activité antipaludique

- 3-ICSN - Activité cytotoxique (lignées cellulaires KB)
- Activité anti-cholinestérase
- Activité vis-à-vis de la farnesyl transférase

- 4-UPVD - Activité antibactérienne (bactéries marines)
- Activité anti-oxydante (β-carotène/CCM, DPPH/CCM)

6-UA - Activité antiproliférative sur lignées tumorales humaines versus cellules normales, uniquement sur produits purs (**tests sur composés purs**)

- 7-USTV - Activité anti-salissure sur bactéries et micro-organismes photosynthétiques.