

Rapport d'avancement scientifique BIODIVERSITE EDITION 2006

1. Identification du projet

Acronyme du projet : **ECIMAR**

N° Projet : **ANR-06-BDIV-001-01 à 07**

Ecologie Chimique Marine : Indicateurs de Biodiversité et Valorisation
Marine Chemical Ecology: Biodiversity Indicators and Development

Coordonnateurs (rédacteurs de ce rapport) : Olivier THOMAS & Thierry PEREZ

Mail : **ecimar@unice.fr**

Tel : 04 92 07 61 34 (OT) & 04 91 04 16 29 (TP)

Durée du projet :

Date de début du projet : Janvier 2007

Date de fin du projet : Décembre 2010

Equipes Bénéficiaires :

Equipe N°	Nom Prénom du responsable scientifique de l'équipe	Organisme et unité* d'appartenance	Code postal / Ville
1	THOMAS Olivier	UMR 6001 CNRS – UNSA	06108 Nice
2	BOURGUET-KONDRACKI Marie-Lise	UMR 5154 CNRS - MNHN	75005 Paris
3	AL-MOURABIT Ali	UPR 2301 CNRS - ICSN	98198 Gif-sur-Yvette
4	BANAIGS Bernard	Université Perpignan	66860 Perpignan
5	PEREZ Thierry	UMR 6540 CNRS – Université de la Méditerranée	13007 Marseille
6	BARTHOMEUF Chantal	Université Auvergne	63001 Clermont-Ferrand
7	CULIOLI Gérald	Université Toulon	83957 Toulon

2. Résumé du projet

ECIMAR a pour but d'évaluer le potentiel que représente la biodiversité marine en terme de chimiodiversité et de mieux comprendre comment s'exprime et varie cette diversité chimique. Ce projet de recherche fédère systématiciens, biologistes et chimistes afin de constituer un réseau d'excellence d'étude et de valorisation de la chimiodiversité marine. L'intérêt n'est pas seulement de découvrir de nouveaux métabolites secondaires aux propriétés pharmacologiques intéressantes, il est aussi d'utiliser la chimiodiversité des organismes en tant qu'indicateur des modifications de l'environnement. Ainsi, les résultats attendus de ECIMAR sont : 1) un inventaire de la biodiversité et de la chimiodiversité d'une communauté modèle pouvant servir de référence pour suivre l'évolution d'un biotope soumis à diverses pressions environnementales, 2) d'identifier de nouveaux métabolites d'intérêt thérapeutique, 3) d'identifier de nouveaux précurseurs biosynthétiques, 4) d'identifier les facteurs contrôlant l'expression des métabolites secondaires et ceux à l'origine des fluctuations de cette expression, 5) de développer une base de données collaborative. ECIMAR se déroulera en Méditerranée afin de profiter des connaissances déjà acquises et de la maîtrise logistique des équipes en place. Elle concernera principalement les communautés benthiques de substrat dur et plus particulièrement des espèces caractéristiques du coralligène et des grottes semi-obscurées. La méthodologie comprendra le recensement, la récolte des espèces dominantes et la sélection d'espèces-cibles. Ces espèces seront identifiées et leur signature chimique sera enregistrée. De nouveaux métabolites secondaires "bioactifs" seront caractérisés. Les voies de biosynthèse de métabolites cibles seront étudiées par la recherche systématique de précurseurs hypothétiques dans des organismes sélectionnés et par synthèse organique biomimétique. L'influence des facteurs bio- et abiotiques sur la production des métabolites secondaires sera étudiée par différentes voies : relation expression de base/facteurs environnementaux, relation génotype/chimiotype, rôle des micro-organismes symbiotiques.

3. Etat d'avancement SEMESTRE 7 (1^{er} janvier – 30 Juin 2010)

N.B. 01 – 12 = Janvier à Décembre

Tableau des taches et des livrables du projet

Délivrables obtenus sur le semestre écoulé	2007		2008		2009		2010		Commentaires
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	
1.1 Protocole Standardisé d'échantillonnage		07							
1.1 Récolte des échantillons références	05 Ma	06 Ma 07 Ce	De 04 à 07 pour les sites Lb, Ma, Gr, Co, Es, Na	07, 12	06				Achévé
1.1 Travaux de taxonomie		12	06	12	En cours				Détermination des échantillons récoltés en 2008 et 2009, description d'espèces nouvelles. Base de données alimentée. Description d'espèces nouvelles
1.2 Protocole standardisé pour les analyses chimiques		12							Achévé
1.2 et 1.5 Rapport des résultats, analyse chimique comparative			06	12	En cours				Echantillons 2007 et 2008 acquis. 2009 en cours.
1.3 Résultats des screening biologiques						12			Bilan des premiers tests d'activité biologique.
1.3 Communication des résultats, caractérisation des métabolites			06	12	06	12			Caractérisation de nouvelles molécules et tests d'activité biologique
1.4 Protocole expérimental d'évaluation de la bioactivité		12							Achévé
1.4 Communication des résultats	04	10	En cours						Publications scientifiques
1.5 Marqueurs chimiotaxonomiques				12	En cours				Pour certaines éponges modèles, application de nouvelles méthodes de chimométrie
2.1.1 Publication des métabolites isolés	En cours								Alimentation base de données.
2.2.1 Protocole de fractionnement de cellules d'éponges et des symbiontes associés			06	12					Eubactéries et cyanobactéries d'éponges
3.1 Protocoles Analytiques de séries d'échantillons		07							Achévé
3.1.1/3.1.2 Echantillonnages - Séries temporelles N°1, 2 & 3	06	12			06	12			Achévé pour certains modèles. Poursuite d'une série pour le modèle gorgonaire
3.1.3 Echantillonnages –Séries spatiales N°1 & 2		09	04		06				Achévé
3.1.1/3.1.2 Résultats - Séries temporelles N°1, 2 & 3		07	En cours						Achévé pour plusieurs modèles

Délivrables obtenus sur le semestre écoulé	2007		2008		2009		2010		Commentaires
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	
3.1.3 Résultats –Séries spatiales N°1 & 2			06	12	06	12	En cours		
3.2 Protocoles expérimentaux		11							Achevé
3.2 Résultats des protocoles			06			12			Résultats préliminaires
3.3 Développement des marqueurs génétiques						12			Achevé. Essais pour un nouveau modèle <i>O. tuberculata</i>
3.3 Echantillonnage					06				Achevé
3.3 Structure génétique					En cours				Pour <i>Spongia</i> spp. et <i>Aplysina cavernicola</i>
3.4 Protocoles expérimentaux		11							
3.4 Résultats	En cours								
4.1.1 Page web temporaire et présentation de l'architecture de la base de données.		09							http://www.ecimar.org
4.2.1 Données préliminaires et information accessible via la base de données en ligne.			04	12					
4.2.2 Tests préliminaires et évaluation finale de la fonctionnalité de la base de données			04						
4.1.2. Tests finaux des deux serveurs et procédures de sauvegarde; communication des procédures et de l'accessibilité du site ECIMAR.		11	04						
4.3 Charte graphique et ergonomie		11		12	06	12	06		Achevé
4.4 Présentation au groupe ECIMAR des outils collaboratifs du site web		11	04	12	06				Achevé
4.5 Données brutes, résultats et discussion au sein de la base de données	En cours								Suivi des échantillons dans leurs phases de traitement et mise en commun des données brutes.
4.6 Evaluation finale du site internet ECIMAR ; rapports et suggestions de futurs développement.					En cours				Réflexion sur le devenir de la BDD et du site ECIMAR. Transposition de l'outil de l'échelle des laboratoires à celle du GDR BioChiMar

A - DESCRIPTION DES TRAVAUX EFFECTUES ET CONFORMITE DE L'AVANCEMENT AUX PREVISIONS, PRINCIPAUX FAITS MARQUANTS, DIFFICULTES RENCONTREES ET SOLUTIONS DE REMPLACEMENT ENVISAGEES

WP1 : Evaluation de la chimio diversité au sein des communautés benthiques de substrat dur en Méditerranée

Objectif 1.1 : échantillonnage et identification des espèces.

- Travaux de taxonomie et publications des résultats sur espèces nouvelles.

Objectif 1.2 : acquisition des signatures chimiques

- Valorisation des signatures chimiques par des approches de métabolomiques et publication.

Objectif 1.3 : isolement et caractérisation des métabolites secondaires.

- Isolement et caractérisation structurale de nouvelles molécules. Publication des résultats

Objectif 1.4 : évaluation des activités biologiques

- Isolement de structures prometteuses en quantité pour tests supplémentaires
- Contrat de collaboration avec la Sté Galderma avec thèse CIFRE

Objectif 1.5 : Etude chimio-systématique d'un nouveau groupe de spongiaire *Hexadella*

WP2 : Production de métabolites cibles

Objectif 2.1 : étude des processus synthétiques et biosynthétiques de métabolites cibles

- Production enzymatique de l'ascididémnine par l'ascidie *Cystodytes* en extraits acellulaires
- Cinétique de la production de l'oroidine par l'éponge *Axinella damicornis* par métabolisation de la ¹⁴C-proline *in vivo*.

WP3 : Influence de facteurs biotiques et abiotiques

Objectif 3.1 : niveau de base d'expression des métabolites secondaires

- Valorisation des séries à long terme pour une meilleure compréhension des facteurs à l'origine des variations intra-spécifiques

Objectif 3.2 : facteurs de stress et métabolites secondaires comme bioindicateurs

- Expérience de thermotolérance avec le zoanthaire *Parazoanthus axinellae*, producteur d'une nouvelle famille chimique, les parazoanthines

Objectif 3.3 : relations génotype et chimiotype

- Application des marqueurs génétiques aux études de génétique des populations (*Aplysina cavernicola*, *Spongia* spp) et de phylogéographie du genre *Oscarella*.

Objectif 3.4 : influence de la symbiose sur la production de métabolites secondaires

WP4 : Site Internet et base de données

Visualisation de la base de donnée par le cms

Ecarts « prévu-réalisé »

A cause d'un changement de situation professionnelle le partenaire 6 n'a pas été en mesure de réaliser les tests d'activités prévus initialement. Un engagement a été pris pour les réaliser au cours du dernier semestre sur une partie des échantillons.

Principaux faits marquants du semestre y compris les difficultés éventuelles rencontrées et actions envisagées/engagées pour les surmonter

Utilisation des données obtenues dans le cadre d'un projet européen BAMMBO accepté pour financement au FP7 KBBE 2010 (1-UNSA) sur la production durable de métabolites bioactifs produits par des spongiaires méditerranéens.

Pour la poursuite du travail de valorisation en dermatologie par GALDERMA un contrat de collaboration et une bourse CIFRE ont été signés entre cette entreprise et le partenaire 1-UNSA. Le travail de valorisation commencera avec le début de la thèse en octobre 2010.

Problème de réalisation des tests par le partenaire UA-6. Ils devront être effectués au semestre S8

Actions de coordination du projet (séminaires, groupes de travail, réunions transversales, outils d'interface)

Type	Date	Lieu	Participants	Objet
Groupe de Travail	7-8 Juin 2010	Nantes	Participants ECIMAR	Discussion fin de programme et extension au GDR BioChiMar
Workshop ECIMAR PACA	28 Janvier 2010	Toulon	O. Thomas, G. Culioli, Y Blache, A. Ortalo-Magne, J.F. Briand, P. Chevaldonné, T. Pérez + doctorants	Bilan d'une thèse achevée en 2009, et état d'avancement de 4 doctorants (2 ^{ème} et 3 ^{ème} année)

Perspectives semestre suivant (poursuite des objectifs ou éventuelle réorientation proposée)

Le dernier semestre du programme sera essentiellement consacré à la réalisation de tests d'activité pour la valorisation des molécules isolées mais aussi et surtout à la publication des résultats obtenus au cours des 4 années.

Dans le cadre d'un nouveau partenariat établi avec la Croatie de nouveaux échantillons de l'Adriatique viendront alimenter les précédentes données.

Enfin un colloque de restitution des résultats du programme ANR est prévue à Marseille du 20 au 22 octobre 2010

B - DELIVRABLES ET RESULTATS OBTENUS

- **Délivrables ECIMAR obtenus dans le semestre S7**

(Publications, mémoires et thèses, communications à congrès, rapport technique, base de données, transfert de connaissance et vulgarisation scientifique.

Objectif	Titre	Auteurs	Equipes	Date	Contexte
Publications 2010					
WP3	In situ investigation of <i>Spongia officinalis</i> (Demospongiae) diet: coupling flow cytometry and stable isotope analysis	Topçu N.E., Pérez T., Gregori G., Harmelin-Vivien M	5-DIMAR	2010	Journal of Experimental Marine Biology and Ecology
WP1, WP2	Cellular Localization of Clathridimine, an Antimicrobial 2-Aminoimidazole Alkaloid Produced by the Mediterranean Calcareous Sponge <i>Clathrina clathrus</i>	Roué, M.; Domart-Coulon, I.; Ereskovsky, A.; Djediat, C.; Pérez, T.; Bourguet-Kondracki, M.L.	2-MNHN, 5-DIMAR	Sous presse	Journal of Natural Products
WP1, WP3	Metabolic fingerprinting as indicator of biodiversity: an attempt to elucidate inter-specific relationships among Homoscleromorpha sponges	Ivanisevic, Thomas O.P., Lejeune C., Chevaldonné P. Pérez T.	1-UNSA, 5-DIMAR	En revision	Metabolomics
WP3	Patterns of chemical diversity in the Mediterranean sponge <i>Spongia agaricina</i>	Noyer C., Thomas O. P., Becerro M.	1-UNSA, 8-CEAB	Soumis	Marine Biology
WP1, WP3	Oscarella balibaloï, a new sponge species (Homoscleromorpha: Plakinidae) from the Western Mediterranean Sea: cytological description, reproductive cycle and ecology	Pérez T., Ivanisevic J., Dubois M., Pedel L., Thomas O. P., Tokina D., Ereskovsky A.V.	1-UNSA, 5-DIMAR	Soumis	Marine Ecology
Communications à congrès 2010					
WP1, WP2, WP3	Plusieurs communications orales		1, 2, 3, 4, 5, 7	Juin 2010	Journées du GDR Biochimar, Nantes, France
WP2	Contribution de la flore microbienne associée à la diversité chimique de l'éponge <i>Clathrina clathrus</i>	Roué M., Domart-Coulon I., Bourguet-Kondracki M.L.	2-MNHN	Mai 2010	Journée scientifique de la FRE 3206 Paris, France
WP2, WP3	Photosynthetic symbionts of the Mediterranean sponge <i>Petrosia ficiformis</i> : Characterization and implication in the prevention of fouling	Bendaoud A., Briand J.-F., Ortalo-Magné A., Dombrowsky L., Pérez T., Barani A., Grégori G. & Blache Y	5-DIMAR, 7-USTV	Juillet 2010	15 th International Congress on Marine Corrosion and Fouling, Newcastle, UK
WP 1	A reliable marine antifouling bioassay based on <i>in vitro</i> adhesion: comparison of the response of five pioneer bacteria	Camps M., Briand J.-F., Dombrowsky L., Culioli G., Bazire A. & Blache Y.	7-USTV	Juillet 2010	15 th International Congress on Marine Corrosion and Fouling, Newcastle, UK
Transfert des connaissances / Actions pôle mer PACA – S7					
ECIMAR		O. Thomas, Culioli G.	1-UNSA, 7-USTV	Juin 2010	Pôle Mer PACA
Documents et Rapports – S6					
WP 3	Ecologie chimique des éponges du genre <i>Oscarella</i> (Porifera, Homoscleromorpha) : définition des facteurs clé expliquant la variation naturelle de bioactivité	Pedel Laura	5-DIMAR	Juin 2010	Master 2, Centre d'Océanologie de Marseille

- **Présentation des résultats ECIMAR obtenus dans le semestre S7**

WP1 : Evaluation de la chimiodiversité des communautés benthiques de substrat dur de Méditerranée

Responsables : Marie-Lise Bourguet-Kondracki (2-MNHN) et Bernard Banaigs (4-UPVD)

1.1 Echantillonnage et identification des espèces récoltées

L'identification des différentes espèces de spongiaires récoltées se poursuit par le partenaire 5-DIMAR. Plus de 80% des espèces récoltées sont maintenant identifiées.

1.2 Evaluation de la chimiodiversité

L'ensemble des signatures chimiques de la mission Ceuta 2009 a été réalisé et placé sur le site www.ecimar.org. Quelques signatures de la mission Marseille 2009 restent à effectuer.

1.3 Isolement et caractérisation de métabolites bioactifs

La caractérisation du métabolome d'espèces sélectionnées pour leurs structures originales et/ou bioactivités s'est poursuivie.

- La carte d'identité chimique du corail *Astroides calycularis* (Ceuta) est maintenant terminée. Deux familles de molécules dont une seule avait été décrite (Aplysinopsine) ont été identifiées dans ce corail et un travail de comparaison chimique avec le corail océanique *Tabastrea aurea* est en cours de réalisation (1-UNSA, Figure 1). Un chapitre d'ouvrage sera rédigé à cet effet.

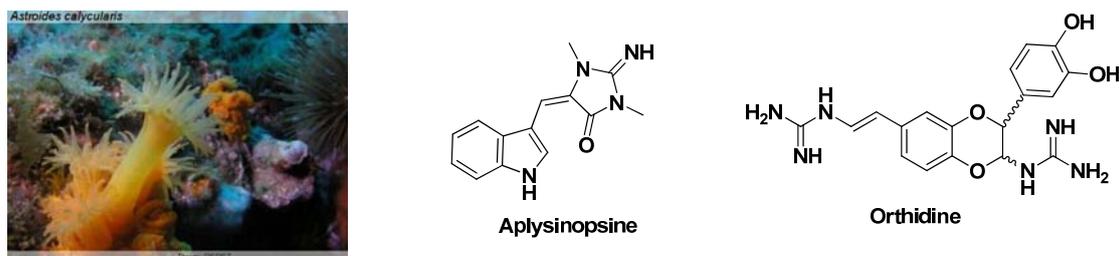


Figure 1. Alcaloïdes présents dans le corail *A. calycularis*

- A partir de l'extrait brut de l'éponge calcaire *Clathrina clathrus*, trois épidoxystérols, précédemment isolés de plusieurs Démospouges, et deux monoglycérides ont été complètement caractérisés (2-MNHN, Figure 2). L'évaluation de leurs activités antimicrobiennes est en cours.

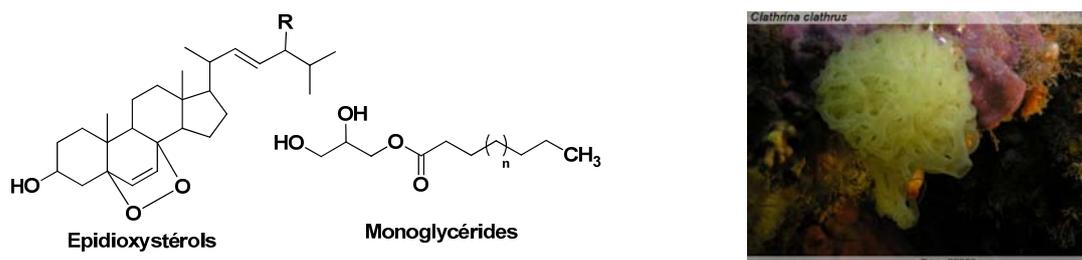


Figure 2. Composés lipidiques de l'éponge calcaire *C. Clathrus*

D'autre part, l'étude chimique de la souche bactérienne cultivable *Pseudoalteromonas citrea*, isolée de cette même éponge, et ayant montré une bioactivité contre *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*, a été entreprise. Le 4-hydroxybenzaldéhyde, précédemment isolé d'une bactérie marine *Chromobacter* sp., et l'indole 3-carboxaldéhyde déjà connu chez l'éponge *Dysidea etherya*, trois dicétopipérazines ainsi que cinq autres composés en cours de caractérisation structurale ont été isolés (2-MNHN). Leurs activités antimicrobiennes seront prochainement évaluées.

- A partir des fractions peu polaires du zoanthaire *Savalia savaglia* plusieurs cérides ont été isolés en quantité importante, leur caractérisation structurale se poursuit (7-USTV).

- Le profilage métabolique de l'ascidie *Cystodytes dellechiaiei* se poursuit (4-UPVD) La caractérisation des pyridoacridines nouvelles isolées du chromotype vert, les cystodimines A et B, mentionnées dans un rapport précédent, ont fait l'objet d'un article (*J. Nat. Prod.*, 2010, 73, 1044-1048). Dans ce chromotype vert, nous avons également isolé la dihydroxyascididimine (DB11) et la déhydroxyascididimine (DB10). L'évaluation de l'activité cytotoxique de ces pyridoacridines sera effectuée prochainement avec celle de nouveaux composés minoritaires en cours d'étude.

1.4 Evaluation des activités biologiques

- Dans le but de trouver des molécules pouvant être impliquées dans la défense chimique contre le biofouling de l'éponge *Petrosia ficiformis*, des tests d'activité anti-adhésion ont été réalisés sur deux souches de bactéries marines pionnières *Pseudoalteromonas* spp. (D41 isolée à Brest et TC8 isolée à Toulon). Pour pallier les problèmes d'adsorption aspécifique du marqueur bactérien initialement utilisé (DAPI), un autre marqueur d'ADN des bactéries a été validé et utilisé (SytoRed 61). Outre une bien meilleure spécificité, la quantification s'est faite par lecture directe sans étape d'extraction par un solvant. Les deux extraits avec et sans cyanobactéries sont actifs et l'extrait brut sans cyanobactérie a révélé une meilleure activité. Les résultats obtenus vont être affinés lors du prochain semestre. L'étude du profil chimique de cyanobactéries isolées de *P. ficiformis* par tri en cytométrie en flux devrait apporter prochainement des réponses quant à l'origine des molécules isolées. De plus, une différence de sensibilité des souches en fonction des molécules a été observée, ceci renforce l'obligation de travailler sur plusieurs souches (7-USTV).

1.5 Métabolites secondaires et marqueurs chimio taxonomiques ou environnementaux

- Les alcaloïdes indoliques se sont révélés être des composés majoritaires (environ 40 à 50 % des extraits) de l'espèce *Paramuricea clavata*, ce qui la distingue des autres gorgones, principalement très riches en terpènes (stéroïdes et diterpènes) (7-USTV).

- Au cours de ce semestre, nous avons appliqué notre savoir-faire en chimio- taxonomie à la révision systématique des éponges du genre *Hexadella* (Demospongiae, Verongida) en collaboration avec le laboratoire de Biologie Marine de l'Université de Ghent (Stage de Master 2 Céline Allewaert, 5-DIMAR, 4-UPVD, Figure 3). En effet, des études phylogénétiques récentes avaient montré une biodiversité insoupçonnée au sein de ce groupe. Des individus d'*H. pruvoti* semblaient former deux lignées distinctes. Dans le même temps, *H. ravovitzai* révélait deux haplotypes différents. Il était alors nécessaire de rechercher des marqueurs morphologiques et/ou chimiques pour supporter ces résultats. En complétant le panel d'échantillons par une campagne organisée à Marseille, et en corrélant séquences d'ADN, cytologie, chimie et bioactivité, nous avons réussi à démontrer qu'il y a bien 4 espèces dans nos échantillons dont deux sont des espèces cryptiques à décrire.

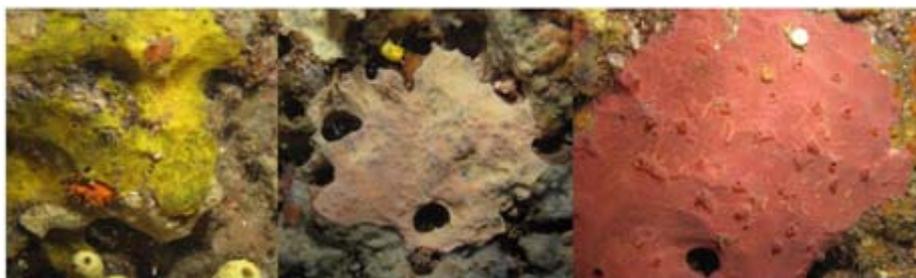


Figure 3 : Révision systématique des éponges du genre *Hexadella*.

WP 2 : Production des métabolites cibles

Responsable : Ali AL-MOURABIT (3-ICSN)

2.1 Processus synthétiques et biosynthétiques de métabolites cibles

Le travail de synthèse biomimétique dans la famille des pyrrole-2-aminoimidazoles produits par les spongiaires Axinellidae et Agelasidae (3-ICSN) a permis de progresser dans l'hypothèse de biosynthèse qui a postulé une réaction cascade aboutissant à des molécules complexes (Schéma 1). La mise en œuvre de la réaction a permis de vérifier l'intérêt du réarrangement proposé, mais le contrôle stéréochimique semble difficile à maîtriser. Un intermédiaire très proche du produit naturel a néanmoins été obtenu. Les efforts de synthèse pour préparer le produit naturel continuent.

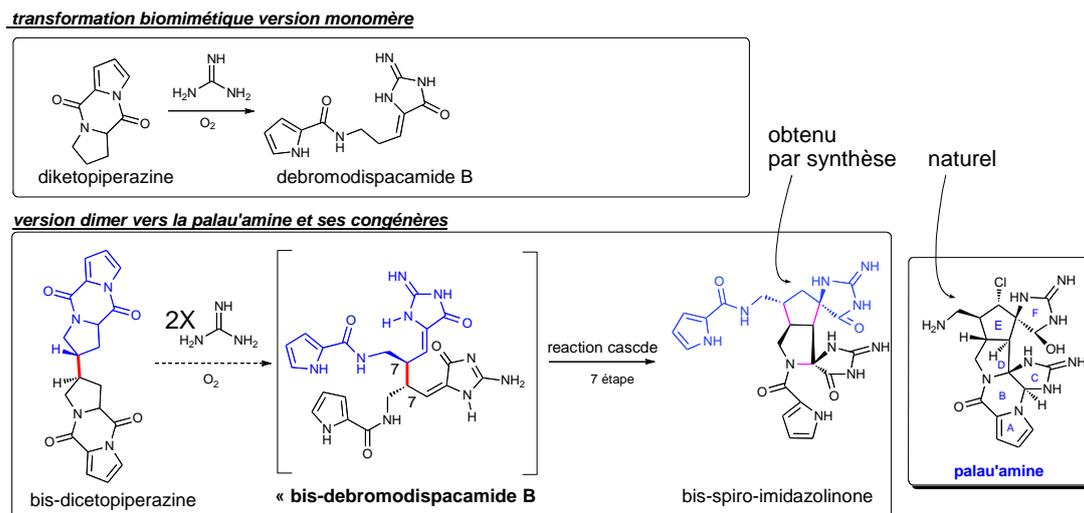


Schéma 1 : Synthèse biomimétique du cœur de la palau'amine.

- Les hypothèses de biogenèse qui sont à la base de ces synthèses sont relayées par des études de biosynthèse sur les organismes vivants maintenus en aquarium (*in vivo*). La métabolisation de la proline en oroidine a également été prouvée chez *Axinella damicornis*, plus facile à travailler que *Agelas oroides*, en utilisant des précurseurs marqués ^{14}C (1-UNSA, 3-ICSN). Des données cinétiques de production de cette molécule ont pu être obtenues grâce à ces expériences qui montrent une vitesse de production en moyenne plus rapide que celles décrites dans la littérature pour spongiaires.
- Le deuxième volet de cette étude concerne l'ascidie *Cystodytes dellechiajei* (4-UPVD). La production *in vitro* en extraits acellulaires, d'ascididimine, alcaloïde majoritaire du chromatotype bleu de l'ascidie *Cystodytes dellechiajei*, mise en évidence lors des semestres précédents a été confirmée. Il a été démontré que la production d'ascididimine *in vitro* était due à un processus enzymatique. L'optimisation de certains paramètres a ensuite permis de tripler la concentration d'ascididimine produite (Figure 4).

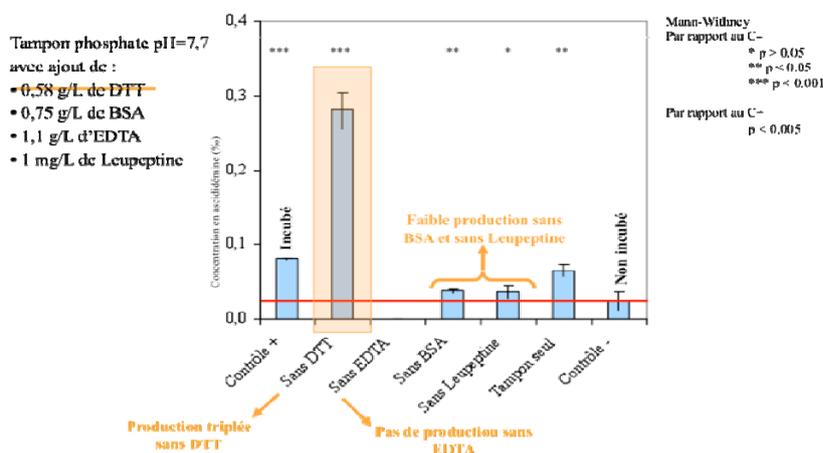


Figure 4 : Optimisation de la production d'ascididimine par *C. dellechiajei* *in vitro*. Influence de la solution tampon.

2.2 Contribution microbienne à la production de métabolites

La flore microbienne cultivable associée à l'éponge *Clathrina clathrus* a été identifiée. L'affiliation phylogénétique de 66 souches cultivables de différents échantillons de *Clathrina clathrus*, prélevés sur 3 ans, a été réalisée par séquençage du gène codant l'ARN ribosomal 16S. Elles se répartissent en 4 grands groupes bactériens : Gamma-protéobactéries (84%), Alpha-protéobactéries (13%), Actinobactéries (1,5 %) et Firmicutes (1,5%). Les Gamma-protéobactéries comprennent des Altéromonadales (46%) dont la souche *Pseudoalteromonas citrea* pour laquelle une étude chimique est en cours, des Vibrionales (37%), des Pseudomonadales (15%) et des Océanospirillales (7%).

WP 3 : Influence des facteurs biotiques et abiotiques sur la production de métabolites secondaires

Responsable : T. Pérez (5-DIMAR)

3.1 Obtenir des niveaux de base d'expression de métabolites secondaires en conditions naturelles

- Durant ce semestre, nous avons réalisé le traitement de deux années de suivis d'une espèce découverte au démarrage du programme (5-DIMAR, 1-UNSA). Cette nouvelle espèce d'*Oscarella* se développe surtout dans les grottes semi-obscurées et le coralligène. A ce jour, elle a été répertoriée sur les côtes Provençales et la Corse ainsi qu'au sud de l'Espagne et en Croatie. *Oscarella* sp. nov. semble être une bonne compétitrice pour l'espace, souvent observée en épibiose sur des espèces d'éponges massives, des gorgones et des bryozoaires. L'analyse d'une série photographique de 2002 à 2007 a révélé une forte dynamique de croissance. Les variations temporelles de deux indicateurs métaboliques à fort coût énergétique, la bioactivité et l'effort reproducteur, ont ainsi été étudiées de 2007 à 2009. *Oscarella* sp. nov. est une espèce gonochorique, ovovivipare, avec un pic de reproduction au printemps (avril-juin). La bioactivité des extraits bruts a montré une variation significative au cours du temps, et nous avons tenté de les expliquer en corrélant la bioactivité à d'autres facteurs (effort reproducteur, type de substrat, température, saison, expression des métabolites secondaires). Une diminution importante de la bioactivité a été observée au printemps, ce qui correspond à la période d'embryogénèse et de développement larvaire. L'analyse des signatures métaboliques a révélé une variation des métabolites majoritaires et a ainsi permis la distinction de phénotypes métaboliques (Figure 5). Il semblerait que l'optimisation de l'allocation des ressources, clairement observée pendant la période de reproduction et probablement influencée par l'interaction de facteurs biotiques et abiotiques, détermine la variation de bioactivité observée.

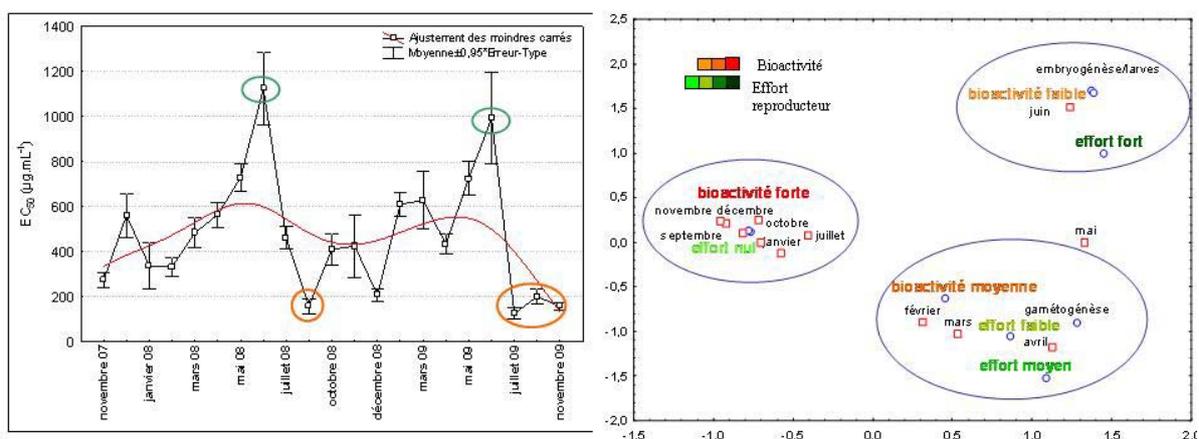


Figure 5 : Variation dans le temps de l'activité de la nouvelle *Oscarella*. Les activités les plus faibles sont observées alors que l'éponge est en phase d'embryogénèse.

- Dans le cadre de la mise en œuvre du dosage chromatographique des alcaloïdes majoritaires de la gorgone *Paramuricea clavata* en vue d'une observation du rôle de différents facteurs sur leur production, une optimisation des conditions d'extraction et de préparation des échantillons a été effectuée. Plusieurs protocoles d'extraction ont été utilisés dans le but non seulement de cibler les composés d'intérêt mais également afin de limiter les quantités de sels présentes dans les échantillons à analyser. En ce qui concerne les solvants d'extraction, il s'avère que les alcaloïdes étudiés ne sont pas extraits lorsque l'eau est utilisée seule (cf. chromatogramme **a**). Par contre, à l'issue de cette première étape, une seconde extraction réalisée avec un mélange MeOH/CH₂Cl₂ (1:1, v/v) permet d'obtenir l'ensemble des métabolites à doser. En fait une première extraction au MeOH seul donne des résultats comparables à ceux obtenus à partir de l'extraction au MeOH/CH₂Cl₂ définie dans le protocole ECIMAR (chromatogramme **b**) tout en présentant l'intérêt de ne pas extraire une proportion trop importante de composés de plus faible polarité que ceux étudiés (Figure 6)

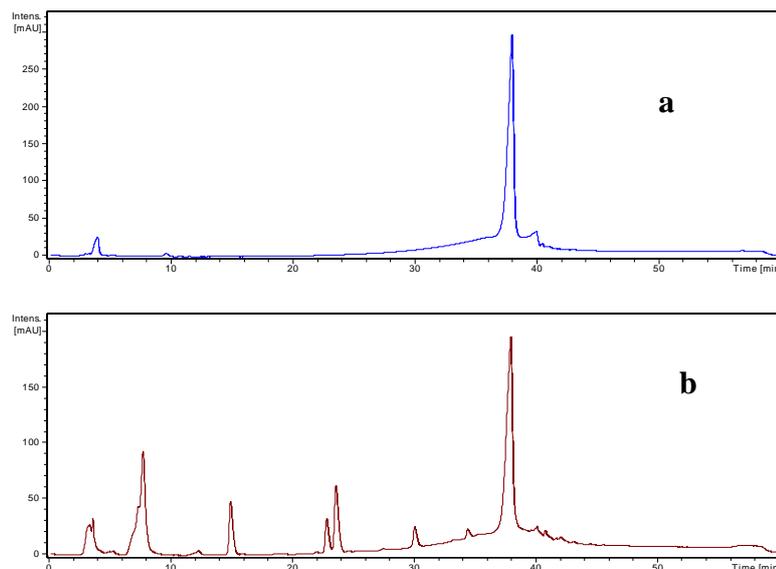


Figure 6. Comparaison des profils HPLC-UV d'extraction suivi le solvant utilisé pour la gorgone *Paramuricea clavata*.

Au niveau de la préparation des échantillons préalablement à leur analyse par HPLC, le bilan des différents essais effectués sur SPE en modifiant les solvants d'élution, les volumes utilisés et les débit appliqués indique que l'élimination des sels résiduels est optimale en réalisant un rinçage avec 3 mL d'eau (au lieu des 10 mL prévus dans le cadre du protocole initialement défini) et en utilisant le débit d'élution le plus faible possible.

3.2 Influence d'un stress aigu sur le métabolisme secondaire et pertinence de certains métabolites comme bioindicateurs

Une approche expérimentale a été développée avec *Parazoanthus axinellae*. Au cours de cette série d'expériences simulant des conditions de stress rencontrées dans la nature, une combinaison de mesures du niveau de l'activité des polypes du zoanthaire jusqu'à l'expression de leur toxicité naturelle ont été évaluées. Les résultats de ces mesures sont en cours d'analyse.

3.3 Etudier la relation entre génotype et chimiotype par des approches combinant phylogéographie, génétique des populations et chimie des produits naturels marins

Les études de la structuration génétique des éponges des genres *Spongia*, *Hipposongia* et *Aplysina* sont toujours en progrès à l'aide des marqueurs microsatellites développés au cours des semestres précédents (5-DIMAR, 9-CEAB, 10-HCMR).

3.4 Influence de la symbiose sur la production de métabolites secondaires

- Au cours des différentes missions du programme ECIMAR, des récoltes de *P. ficiformis* ont été effectuées : elles permettent une couverture géographique globale relativement bonne du bassin méditerranéen (France, Espagne, Ceuta, Tunisie, Liban, Grèce, Croatie). Ces échantillons ont été fixés

dans de l'éthanol afin de les conserver pour les analyses moléculaires. Dans le but d'identifier les cyanobactéries symbiontes de *P. ficiformis* et d'évaluer leur diversité taxonomique, le séquençage de deux marqueurs moléculaires, qui sont les gènes codants pour la sous-unité ribosomale 16S (ADNr 16S) et l'espaceur transcrit interne (ITS), va être réalisé. Cette technique nécessite au préalable une étape d'extraction, d'amplification par PCR (réaction de polymérisation en chaîne) de l'ADN des symbiontes avec des amorces spécifiques à la classe des cyanobactéries ; et enfin le clonage des amplicons à séquencer. Une seule espèce est actuellement décrite dans la littérature (*Synechococcus spongiarum*) mais sur des échantillons provenant uniquement de Marseille (France) et de Gènes (Italie). De plus, une étude similaire sur les cyanobactéries symbiontes d'autres groupes d'éponges en Australie a permis de mettre en évidence une diversité plus importante que celle initialement décrite.

La figure 7 ci-dessous représente une partie des amplicons en cours de traitement. Sur ce profil d'ADNr 16S, on voit que tous les échantillons sont positifs pour la présence d'amplicons de cyanobactéries. Les trois échantillons d'éponge de fond de grotte sensés être dépourvus de symbiontes photosynthétiques, semblent cependant également montrer une bande au même niveau que les échantillons possédant des *Synechococcus*. Ce résultat est probablement un artéfact dû au fait que la spécificité des primers utilisés n'est pas totale et peut éventuellement permettre d'amplifier des séquences de bactéries hétérotrophes. Le séquençage en cours devrait aussi nous apporter une réponse quant à la validité de cette hypothèse.

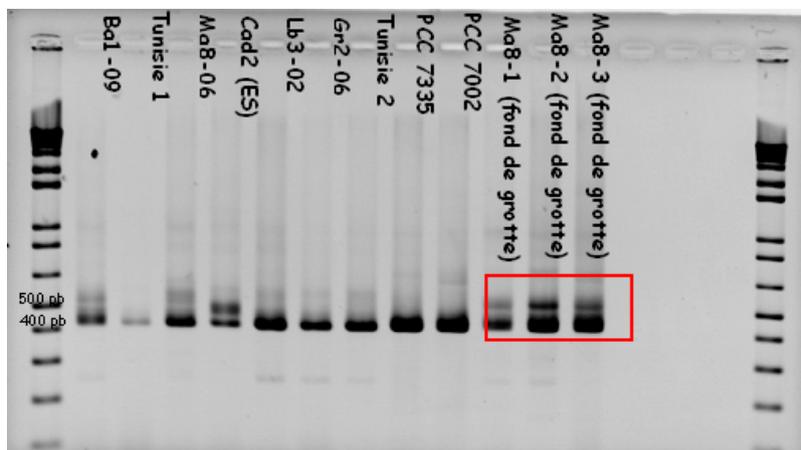


Figure 7 : Profil de migration électrophorétique de l'ADNr 16S amplifié par PCR sur gel d'agarose 1,5% coloré au bromure d'éthidium des échantillons de *P. ficiformis* :

Des PCR préliminaires à partir d'amorces ITS ont aussi déjà montré des résultats positifs et seront donc poursuivis par les étapes de clonage-séquençage pour préciser la diversité cyanobactérienne associée à *P. ficiformis* en méditerranée. On peut déjà noter que le profil est différent pour plusieurs échantillons ce qui va dans le sens de plusieurs « espèces ».

WP 4 : Base de Données collaborative

Responsable : J. de Vaugelas (1-UNSA)

L'utilisation de la base de données pour le portail visible au public est maintenant en place pour les parties biodiversité et sites étudiés (Figure 8)

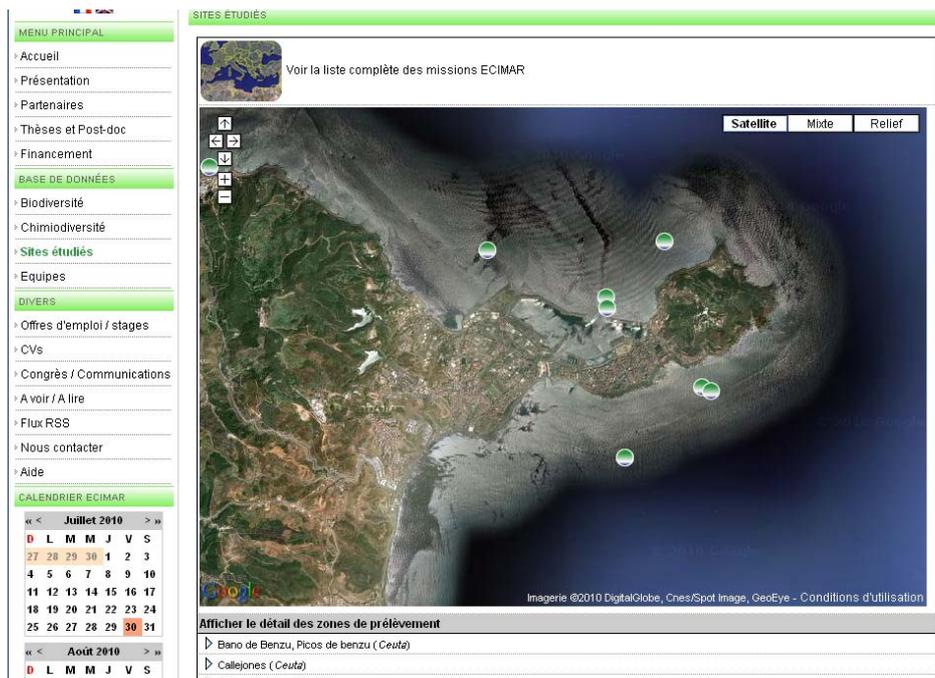


Figure 8. Partie publique (cms) du site ECIMAR : www.ecimar.org

C – AUTRES COMMENTAIRES : Aspects non scientifiques

Liste des CDD en cours :

Unité d'accueil	Nom	Prénom	Niveau de recrutement	Date de recrutement	Durée du contrat (en mois)
1-UNSA	Genta-Jouve	Grégory	Doctorant	01/09/2008	36 mois
2-MNHN	Roué	Mélanie	AI CNRS 70%	01/09/2007	36 mois
3-ICSN	Lejeune	Clarisse	Doctorante	01/09/2007	36 mois
4-UPVD	Bry	Delphine	Doctorante	01/10/2007	36 mois
5- DIMAR	Ivanisevic	Julijana	IE CNRS	01/07/2008	24 mois
8/9 - CEAB	Saby	Emily	Marie Curie pre-doct/contracte project	01/07/2008	14 mois
7-USTV	Pénez	Nicolas	Doctorant	01/10/2008	18 mois
8/9- CEAB	López-Legentil	Susanna	Post-Doctorant, gouvernement espagnol.	01/11/2008	60 mois

Commentaires particuliers du coordonnateur

Des discussions concernant l'aspect juridique du traitement des échantillons provenant d'Espagne, de Grèce et du Liban seront traitées dans le prochain rapport.