

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 <i>Marine Chemical Ecology: Biodiversity Indicators and Development</i>
--

Coordonnateurs (rédacteurs de ce rapport) : Olivier THOMAS & Thierry PEREZ
Assistante de coordination : Maia FOURS
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 5 (1^{er} janvier – 30 Juin 2009)

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				Echantillonnages dans le sud de l'Espagne, Ceuta et Marseille
1.1 Travaux de taxonomie		12	06	12	En cours				Détermination des échantillons récoltés en 2007 et 2008, description d'espèces nouvelles. Base de données alimentée
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 acquis, 2008 partiellement
1.3 Résultats des screening biologiques				En cours	06				Résultats des tests d'activité biologique pour les échantillons 2007, et certains de 2008
1.3 Communication des résultats, caractérisation des métabolites			06	12	06				Pour certaines espèces modèles, échantillons 2007 et 2008
1.4 Protocole expérimental d'évaluation de la bioactivité		12							Achévé
1.4 Communication des résultats	04	10	En cours						Assemblée générale du 3 au 5 décembre 2008, communications dans congrès internationaux et publications scientifiques. Séminaire ANR-FRB mi-parcours
1.5 Marqueurs chimiotaxonomiques				12	En cours				Pour certaines éponges modèles
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							
3.1.1/3.1.2 Echantillonnages - Séries temporelles N°1, 2 & 3	06	12			06				Achévé

Délivrables obtenus sur le semestre écoulé	2007		2008		2009		2010		Commentaires
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	
3.1.3 Echantillonnages –Séries spatiales N°1 & 2		09	04		06				Achevé pour certaines espèces
3.1.1/3.1.2 Résultats - Séries temporelles N°1, 2 & 3		07	En cours						Pour plusieurs modèles
3.1.3 Résultats –Séries spatiales N°1 & 2			06	12					
3.2 Protocoles expérimentaux		11							
3.2 Résultats des protocoles			06						Résultats préliminaires
3.3 Développement des marqueurs génétiques					06				Faits pour deux espèces modèles, en cours d'achèvement pour la troisième. En développement pour une quatrième
3.3 Echantillonnage		En cours			06				
3.3 Structure génétique									
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					Premières valorisations du contenu de la base de données dans des rubriques accessibles au public
4.2.2 Tests préliminaires et évaluation finale de la fonctionnalité de la base de données			04						Base de données collaborative fonctionnelle.
4.1.2. Tests finaux des deux serveurs et procédures de sauvegarde; communication des procédures et de l'accessibilité du site ECIMAR.		11	04						Procédures et accessibilité au site CMS et à la base de données. Sauvegarde régulière des données.
4.3 Charte graphique et ergonomie		11		12	06				Amélioration de l'ergonomie – traductions anglais
4.4 Présentation au groupe ECIMAR des outils collaboratifs du site web		11	04	12	06				Accessibilité au contenu de la base de données
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 développements.					En cours				Statistiques sur la fréquentation du site internet

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.

- Mission d'échantillonnage dans le sud de l'Espagne (Cabo de Palos, Mazarron, la Herradura) et détroit de Gibraltar (Fin Juin 2009). Echantillonnages complémentaires à Marseille (Juillet 2009)
- Travaux de taxonomie. Description d'espèces nouvelles.

Objectif 1.2 : acquisition des signatures chimiques

- 483 signatures chimiques dans la BDD sur les 700 échantillons récoltés en 2007 et 2008.

Objectif 1.3 : isolement et caractérisation des métabolites secondaires

Objectif 1.4 : évaluation des activités biologiques

- Tests de cytotoxicité (cellules tumorales KB), inhibition de la FTPase et activité anti-paludisme.

Objectif 1.5 : méthode standardisée d'analyse des signatures chimiques pour étudier la variabilité intra et interspécifique et détermination de marqueurs chimiotaxonomiques. Application à plusieurs groupes taxonomiques

WP2 : Production de métabolites cibles

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

- Synthèse organique biomimétique d'un intermédiaire complexe vers la styloguanidine et la palau'amine, un composé clef de cette famille d'alcaloïdes bioactifs.
- Métabolisation de précurseurs radiomarqués en conditions expérimentales chez *Agelas oroides* (organismes in toto)
- Production d'ascididemnine, alcaloïde majoritaire du chromatotype bleu de *Cystodytes dellechiagei*, à partir d'extraits cellulaires

Objectif 2.2 : contribution microbienne à la production de métabolites

- Poursuite des travaux sur les bactéries associées à *Clathrina clathrus*, application de la DGGE pour une meilleure évaluation de la diversité bactérienne.
- Poursuite des travaux de séparation des bactéries et cyanobactéries symbiotiques pour la recherche de métabolites secondaires. Chez *Aplysina aerophoba*, les métabolites secondaires seraient bien contenus uniquement dans les cellules de l'éponge.

WP3 : Influence de facteurs biotiques et abiotiques

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

- Achèvement des échantillonnages mensuels. Poursuite des études de cycle de vie, de l'effort de reproduction et relation avec l'activité biologique. Traitement complet de trois séries d'échantillons (*Spongia officinalis*, *Oscarella tuberculata* et *O. lobularis*)

Objectif 3.2 : facteurs de stress et métabolites secondaires comme bioindicateurs

- Etude comparée à long terme des variations de bioactivité et expression de marqueurs de stress (*Spongia officinalis*)

Objectif 3.3 : relations génotype et chimiotype

- Marqueurs microsatellites opérationnels pour trois espèces modèles. Génotypage en cours. Développement d'une approche phylogéographique pour *Oscarella tuberculata*.

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

- Cf. Obj. 2.2

WP4 : Site Internet et base de données

- Amélioration de l'ergonomie du site internet, début de traduction en anglais. Valorisation du contenu de la BDD directement accessible depuis le CMS (liste des espèces traitées, liste des lieux de missions, etc.), et exportation de listes triées (mails, chercheurs, etc.). Fonction de comparaison de différentes signatures chimiques.

Ecarts « prévu-réalisé »

- WP1**
- Les travaux de taxonomie prennent beaucoup plus de temps que prévu.
 - Les missions au Maroc et en Tunisie n'ont finalement pas pu être réalisées pour des problèmes d'autorisation de prélèvements d'échantillons dans ces zones.
 - A cause d'un changement dans la situation administrative du partenaire 6-UA qui va développer une partie de ses activités à l'Université de Toulouse les tests antitumoraux ne seront réalisés qu'au semestre S6.

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

- Première assemblée générale du GDR BioChiMar qui inclut une grande partie des participants français d'ECIMAR et la plupart des acteurs scientifiques impliqués dans des recherches sur les produits naturels marins et biotoxines et d'écologie chimique marine. Intégration de nouvelles équipes de biologie et écologie marine (écologie évolutive notamment)
- Ecole thématique en écologie chimique EcoChiMar organisée par le partenaire 4-UPVD.
- Acquisition de l'ensemble des signatures chimiques des missions 2007 – 2008 et premiers tests cytotoxiques (3-ICSN) et antipaludiques (2-MNHN).
- Premières collaborations établies avec des industriels pour la valorisation des extraits et substances isolées (Galderma).
- Développement de la base de données et valorisations de son contenu sur le site internet www.ecimar.org.

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

Type	Date	Lieu	Participants	Objet
Réunion BDD	7 avril 2009	Nice	Membres ECIMAR	Structure de la BDD et du CMS
Réunion de lancement du GDR BioChiMar	10-11 mai 2009	Gif-sur-Yvette	Membres ECIMAR	Lancement GDR, coordination ECIMAR avec autre programmes
Réunion INEE CNRS	11-12 mai 2009	Rennes	T. Perez	Groupe de travail écologie chimique
Ecole Thématique EcoChiMar	06 juillet au 10 juillet 2009	Perpignan	Doctorants ECIMAR Plusieurs intervenants ECIMAR	Des métabolites dits secondaires: introduction à l'écologie chimique dans les écosystèmes marins

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

WP 1 : Travaux de taxonomie sur la campagne 2009. Poursuite de l'acquisition des signatures chimiques 2008, et études comparatives inter-sites et inter-annuelles. Préparation de l'extractothèque et démarrage des tests d'activité de composés purs pour les échantillons 2008 et 2009. En particulier, démarrage des tests biologiques des molécules isolées sur 3 lignées de cellules tumorales humaines pour déterminer le potentiel antitumoral (Cytotoxicité et sélectivité pour les tumeurs) (6-UA). Description d'espèces et isolement et caractérisation de molécules nouvelles. Valorisation des premiers marqueurs chimiotoxicologiques.

WP 2 : Poursuite des travaux de synthèse et de biosynthèse sur les modèles biologiques du programme. Application des différents protocoles expérimentaux à trois espèces modèles appartenant à trois phylums différents. Recherche sur l'expression des haloperoxydases. Isolement et culture de bactéries et cyanobactéries responsables de la production des métabolites secondaires bioactifs.

WP 3 : Poursuite du traitement des séries spatio-temporelles. Démarrage des travaux d'écologie chimique pour le gorgonaire *Paramuricea clavata*. Reproduction des expériences en aquarium. Génotypage.

WP 4 : Alimentation des modules relatifs à la chimiodiversité. Valorisation de la BDD à travers le site internet. Aide aux échanges de gros fichiers. Augmentation de la sécurité des documents sur le site. Recours aux webconférences pour améliorer la connectivité entre les laboratoires.

Management : Comité de pilotage. Réunion WP3 « Design expérimental et stratégie d'échantillonnage ». Participation aux activités du GDR BioChiMar. Participation aux actions du pôle de compétitivité Mer PACA. Participation importante à la 6th European Conference on Marine Natural Products, 19-23 Juillet 2009, Porto, Portugal.

B - DELIVRABLES ET RESULTATS OBTENUS

- **Délivrables ECIMAR obtenus dans le semestre S5**

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

N.B. : **A la demande de la FRB, nous indiquons dans ce tableau la liste des publications et communications réalisées depuis le début du programme. En vert les publications et communications du semestre S5.**

L'ensemble de ces livrables est disponible en format .pdf sur le site :

http://www.ecimar.org/cms/images/stories/report/tableaux_pour_rapport-s5_pour_web-2.pdf

Objectif	Titre	Auteurs	Equipes	Date	Contexte
<i>Publications depuis le début du programme</i>					
WP1	Five new sponge species (Porifera: Demospongiae) of subtropical or tropical affinities from the coast of Lebanon (eastern Mediterranean)	Vacelet J., Bitar G., Carteron S., Zibrowius H., Pérez T.	5-DIMAR	2007	Journal of the Marine Biological Association of UK
WP 1	Marine metabolites overcoming or circumventing multidrug resistance mediated by ATP-dependent transporters. A new hope for patient with tumors resistant to conventional chemotherapy	Barthomeuf C., Bourguet-Kondracki M.L., Kornprobst J.M.	2-MNHN, 6-UA	2008	Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry
WP1	<i>Phorbas topsenti</i> (Demospongiae, Poecilosclerida), new name for the Mediterranean ' <i>Phorbas paupertas</i> ', with description of a new <i>Phorbas</i> species	Vacelet J. & Pérez	5-DIMAR	2008	Zootaxa
WP2	Biosynthesis of bromopyrrole alkaloids in <i>Agelas oroides</i>	Cachet N., Thomas O. P., Al-Mourabit A., Oberhänsli F., Teysse J. L., Jeffrey R.	1-UNSA	2008	Planta Medica
WP2	Diterpenoids from the mediterranean brown alga <i>Dictyota</i> sp. evaluated as antifouling substances against a marine bacterial biofilm	Viano Y., D. Bonhomme, M. Camps, J.-F. Briand, A. Ortalo-Magné, Y. Blache, L. Piovetti, G. Culioli	7-USTV	2009 sous presse	J. Nat. Prod
WP1	Synthesis of a polyprenyl-type library containing 1,4-disubstituted-1,2,3-triazoles with anti-biofilm activities against <i>Pseudoalteromonas</i> sp.	Praud-Tabariès A., L. Dombrowsky, O. Bottzek, J.-F. Briand, Y. Blache	7-USTV	2009	Tetrahedron Lett.
WP 1, 3	My favourite animal : The homoscleromorph sponge <i>Oscarella lobularis</i> as model in evolutionary and developmental biology	Ereskovsky A.V., Borchiellini C., Gazave E., Ivanisevic J., Lapébie P., Pérez T., Renard-Deniel E., Vacelet J.	5-DIMAR	2009	BioEssays
WP 1	Halocytin and papillosin, two new antimicrobial peptides isolated from hemocytes of the solitary tunicate, <i>Halocynthia papillosa</i>	Galinier R., Roger E., Sautière P.-E., Banaigs B., Mitta G.	4-UPVD	2009	Journal of Peptide Research
WP 1, 3	Chemical bioactivity of sponges along an environmental gradient in a Mediterranean cave	Turon X, Marti R, Uriz MJ	8- CEAB	2009	Scientia Marina
WP1	Marine antifouling laboratory bioassays: an overview of their diversity	Briand J.-F.	7-USTV	2009	Biofouling
WP1	Novel 3-alkylpyridiniums from Haplosclerida marine sponges	Laville R., Amade P., Thomas O. P.	1-UNSA	2009	Pure and Applied Chemistry
WP 3	Isolation and characterization of microsatellite loci from the endangered Mediterranean sponge <i>Spongia agaricina</i> (Demospongiae: Dictyoceratida)	Noyer C, Agell G, Pascual M, Becerro MA	8/9-CEAB	2009	Conservation Genetics
ECIMAR	Biodiversité marine, source de diversité chimique, des métabolites pas si secondaires ...	Bourguet-Kondracki M. L. et Banaigs B	2-MNHN, 4-UPVD	Juil. 2009	Biofutur (n° spécial Biotechnologies marines)
WP3	Characterization of polymorphic microsatellite markers for the endangered Mediterranean bath sponge <i>Spongia officinalis</i> L.,	Dailianis, T., Tsigonopoulos CS.	5/10-HCMR	2009	Conservation Genetics
WP1	Overview on Homoscleromorpha sponges diversity in the Mediterranean	Ereskovsky A., Ivanisevic J., Pérez T.	1-UNSA, 5-DIMAR	Jan. 2009	Proceedings of the first symposium on coralligenous and other calcareous bioconstructions ,

					RAC/SPA Publ., Tunis
WP3	In vitro effects of metal pollution on Mediterranean sponges: species-specific inhibition of 2',5'-oligoadenylate synthetase.	Saby E., Justesen J., Kelve M., Uriz MJ.	8- CEAB	Sous presse	Aquatic Toxicology
WP3	2'-phosphodiesterase and 2',5'-oligoadenylate synthetase activities in the lowest metazoans, sponge [Porifera].	Saby E., Poulsen JB., Justesen J., Kelve M., Uriz MJ.	8- CEAB	Sous presse	Biochimie
WP1	New modified aminoacids, Axiphenylalaninium A and Axityrosinium A, from the Mediterranean Marine Sponge <i>Axinella polypoides</i>	Gabant M, Martin MT, Boury-Esnault N, Pérez T, Al-Mourabit A	3-ICSN, 5-DIMAR	Sous presse	Journal of Natural Products
WP1	Parazoanthines: hydantoin alkaloids from the Mediterranean sea anemone <i>Parazoanthus axinellae</i>	Cachet N., Genta-Jouve G., Regalado E., Mokrini R., Amade P., Culioli G., Thomas O. P.	1-UNSA	Soumis	Journal of Natural Product
WP2	Biosynthetic pathways of sponge secondary metabolites	Genta-Jouve G., Thomas O. P.	1-UNSA	Soumis	Open Marine Biology Journal
WP1	The synthesis of six meroterpenes and evaluation of their biological activities on two bacteria strains, sea urchin eggs and on human cancer and healthy cells is reported.	Simon-Levert A., Soulière L., Menniti C., Genevière A.M., Barthomeuf C., Banaigs B., Witczak A.	4-UPVD	Soumis	Marine Drugs
Communications à congrès depuis le début du programme					
WP1, WP2	Pyrrole-2-Aminoimidazole Marine Metabolites: Isolation and Biomimetic Synthesis Convergence	Al-Mourabit A., Vergne C., Pérez T., Martin M.T., Adeline M.T.	3-ICSN, 5-DIMAR	mars 2007	Conférence invitée 233rd American Chemical Society National Meeting
WP1, WP3	Marine organisms and secondary metabolites: from chemical ecology to biotechnology	Banaigs B.	4-UPVD	juin 2007	4th International Symposium Cosm'ing 07, St Malo
WP3.2	Sponge chemical defences in stress conditions: the case study of the last disease outbreak observed in the NW mediterranean	Thomas O.P., Sarrazin S., Ivanisevic J., Amade P., Pérez T	1-UNSA, 5-DIMAR	septembre 2007	Sept 5th European Conference on Marine Natural Products
WP1, WP3.1	Secondary metabolism of the sponge group Homoscleromorpha : diversity and variation of its expression in relation with biotic and abiotic factors	Ivanisevic J., Thomas O., Pérez T.	1-UNSA, 5-DIMAR	septembre 2007	Sept 5th European Conference on Marine Natural Products
WP2	Marine Pyrrole-2-Aminoimidazole Metabolites : from the Biomimetic Synthesis to the Important Chemiluminescent Diketopiperazines	Al-Mourabit A.	3-ICSN	Septembre 2007	Conférence invitée 5th European Conference on Marine Natural Products
WP1	Pyridoacridine alkaloids within purple morphs of <i>Cystodytes</i> spp. (Ascidacea: Polycitoridae)	Bontemps-Subielos N., Simon-Levert A., Lopez-Legentil S., Banaigs B.	4-UPVD	septembre 2007	5th European Conference on Marine Natural Products
Tout ECIMAR	ECIMAR: Ecologie chimique Marine: indicateurs de biodiversité et valorisation	Amade P. & De Vaugelas J.	1-UNSA	décembre 2007	5E Journées de l'Institut Français de la Biodiversité (Poster)
ECIMAR	Métabolites d'intérêt isolés d'éponges méditerranéennes et de leurs bactéries associées	Roué M., Longeon A. and Bourguet-Kondracki M.-L.	2-MNHN	09 janvier 2008	Poster pour les Journée AERES MNHN Paris
ECIMAR	Marine Natural Products: The French case and the ECIMAR program	Thomas O.	1-UNSA	10-14 mars 2008	1er Encuentro internacional en biotecnología Medellín, Colombie
WP1	Isolation of simple indole derivatives from the mediterranean gorgonian <i>Paramuricea clavata</i>	Pérez N., Mokrini R., Pérez T., Culioli G.	5-DIMAR, 7-USTV	17-18 avril 2008	4èmes Journées franco-italiennes de chimie
ECIMAR	Bioactive marine natural products; from ecology to pharmacology.	Simon-Levert A., Banaigs B.	4-UPVD	28-30 mai 2008	Communication orale aux 22èmes Journées Franco-Belges de Pharmacochimie à Caen

ECIMAR	Les Produits Naturels Marins : de la Pharmacologie à l'Ecologie	Amade P.	1-UNSA	18 juin 2008	Conférence invitée Colloque "La chimie et la mer". Institut des
WP2	Novel 3-alkylpyridiniums from Haplosclerida marine sponges	Thomas O.	1-UNSA	15 juillet 2008	Com. Orale. IUPAC conference on biodiversity and Marine Natural Products – Charlottetown, Canada
WP2	Isolation and biomimetic synthesis of alkaloids from <i>Parazoanthus axinellae</i>	Mehiri M.	1-UNSA	17 juillet 2008	Com. Orale. IUPAC conference on biodiversity and Marine Natural Products – Charlottetown, Canada
WP2	Biosynthesis of bromopyrrole alkaloids in <i>Agelas oroides</i>	Cachet N., Thomas O. P., Al-Mourabit A., Oberhänsli F., Teyssié J. L., Jeffrey R.	1-UNSA	3-8 août 2008	Poster. 7th Joint Meeting on Natural Products, Athènes, Grèce
ECIMAR	Chemodiversity of the Mediterranean Sea : the ECIMAR network	Thomas O.	1-UNSA	2 août 2008	Symposium on Biotechnology – Bogota Colombie
WP1 & 3	Chemical defense of marine organisms against biofouling explored with an adhesion bacteria bioassay	Camps M., Dombrowsky L., Viano Y., Blache Y., Briand J.-F.	7-USTV	septembre 2008	13 th France-Japan Oceanography Symposium, Marseille, France
WP 3	Experimental study of the relationship between natural products and endosymbiont bacteria in the sponge <i>Aplysina aerophoba</i>	Sacristan-Soriano O, Becerro MA	8/9 CEAB	9-13 septembre	Poster XV Simposio Ibérico de Biología Marina. Funchal (Madeira)
WP3	Concentrations of natural products are associated with certain bacterial types in the sponge <i>Aplysina aerophoba</i>	Sacristán-Soriano O, Banaigs B, Casamayor EO, Becerro MA	8/9 CEAB	7-12 septembre	43rd European Marine Biology Symposium, Azores (Portugal)
ECIMAR	Bactéries associées à l'éponge calcaire <i>Clathrina clathrus</i>	Roué M., Domart-Coulon I., Bourguet-Kondracki M.-L.	2-MNHN	09-10 octobre 2008	Poster. Journées de l'école doctorale InterBio Paris
WP 1	Quel bioessai pour évaluer l'activité antifouling ?	Camps M., Dombrowsky L., Culioli G., Blache Y. & Briand J.-F.	7-USTV	novembre 2008	3 ^{èmes} Journées Scientifiques Euroméditerranéennes, Toulon, France
WP3	Les cyanobactéries symbiontes d'éponges participent-elles à la protection de leur hôte contre le biofouling ?	Bendaoud A., Ortalo-Magne A., Dombrowsky L., Blache Y. & Briand J.-F.	7-USTV	novembre 2008	3 ^{èmes} Journées Scientifiques Euroméditerranéennes, Toulon, France
WP1, WP3	Assessing the Mediterranean biodiversity and effects of environmental changes: secondary metabolites as bioindicators	Pérez T., J. Ivanisevic, N. Pérez, G. Culioli, O. Thomas	1-UNSA, 5-DIMAR, 7-USTV	novembre 2008	Conférence invitée - 1 st Euro-Mediterranean Conference on Marine Natural Products (EMCMNP-I), Sharm El Sheikh, Egypte
WP2	Pyrrrole-2-Aminoimidazole Metabolites from Sponges: What's behind structures and Reactivity	A. AL-Mourabit	3-ICSN	novembre 2008	Conférence invitée - 1st Euro-Mediterranean Conference on Marine Natural Products (EMCMNP-I), Sharm El Sheikh, Egypte)
WP1, WP3	Secondary metabolism of the sponge group Homoscleromorpha : diversity and variation of its expression in relation to biotic and abiotic factors.	Ivanisevic J., Thomas O., Ereskovsky A.V., Pérez T.	1-UNSA, 5-DIMAR	novembre 2008	Com. orale. World Conference on Marine Biodiversity, 11-15 November 2008, Valence, Espagne
WP1, WP2, WP3	New alkaloids from two Mediterranean cnidarians	Thomas O.P, Cachet N., Culioli G., Mokrini R., Pérez T., Mehiri M.	1-UNSA, 5-DIMAR, 7-USTV	novembre 2008	Com. orale. World Conference on Marine Biodiversity, 11-15 November 2008, Valence, Espagne
WP2, WP3	Genetic and bacterial diversity of the endangered sponge <i>Spongia agaricina</i>	Noyer C., Becerro M.A., Uriz M.J., McKenzie D.	8- CEAB	novembre 2008	Com. orale. World Conference on Marine Biodiversity, 11-15 November 2008, Valence, Espagne
WP1	Overview on Homoscleromorpha sponges diversity in the Mediterranean	Ereskovsky A., Ivanisevic J., Pérez T.	1-DIMAR	janvier 2009	1 st Symposium for the conservation of coralligenous and other calcareous bioconstructions of the Mediterranean Sea, Tabarka, Tunisie
ECIMAR	Biodiversité marine et médicament ; de l'écologie chimique à la pharmacochimie	B. Banaigs	4-UPVD	6 février 2009	Conférence invitée Académie nationale de Pharmacie, Paris

WP1, WP3	Study of the bacteria associated with <i>Clathrina clathrus</i> and evaluation of their contribution to secondary metabolism	Roué M, Domart-Coulon I, Bourguet-Kondracki M-L	2-MNHN	mars 2009	Com. Orale. Séminaire hebdomadaire CEAB, Blanes, Espagne.
WP1	Synthèse et étude de relations structure-activité d'analogues terpéniques à visée antifouling	Sall C., M. Camps, L. Dombrowsky, Y. Blache	7-USTV	avril 2009	21ème Journée de la Société Chimique de France, Marseille
WP1	Des composés diterpéniques d'origine marine en tant qu'inhibiteurs de biofilms bactériens	Viano Y., D. Bonhomme, M. Camps, J.-F. Briand, A. Ortalo-Magné, L. Piovetti, Y. Blache, G. Culioli	7-USTV	avril 2009	21ème Journée de la Société Chimique de France, Marseille
WP1	Caractérisation chimique de la gorgone méditerranéenne <i>Paramuricea clavata</i>	Pérez N., G. Culioli, T. Perez, Y. Blache	7-USTV	avril 2009	21ème Journée de la Société Chimique de France, Marseille
Documents techniques et Rapports – S5					
WP1	Impact de la nature des substrats immergés sur la structure de la communauté des biofilms	Djeridi, I.	7-USTV	juin 2009	Rapport de Master 2 Recherche Océanographie, Spécialité « Biologie, Ecologie Marine »
WP3	Analyse chimique de gorgones méditerranéennes et caractérisation structurale de métabolite bioactifs	Louis L.	7-USTV	mai 2009	Rapport de Master 1 « Analyse et Contrôle Lyon »
WP3	Mise au point d'une méthode de quantification de métabolites secondaires d'éponge	Maxime Szablewski	4-UPVD	juin 2009	Rapport de stage M1. Master Biologie Chimie Environnement (spécialité Molécules Bioactives)
WP3	Expression des métabolites secondaires produits par deux éponges méditerranéennes : <i>Aplysina aerophoba</i> et <i>Aplysina cavernicola</i>	Mélanie Legendre	4-UPVD	juin 2009	Rapport de stage DUT Génie de l'Environnement 2ème
WP3	Etude phénologique d'éponges du genre <i>Oscarella</i> : relation avec le métabolite secondaire, et influence des changements environnementaux	Maude Dubois	5-DIMAR	juin 2009	Rapport de Master 2 Recherche Biologie et Ecologie Marines
Site Web et base de données – S5					
BDD	Développement de l'entité « Activité biologique »	J. de Vaugelas & D. Garcia	1-UNSA	7 avril 2009	Développement de la structure de la BDD
CMS	Installation du module de traduction des articles en anglais	J. de Vaugelas & D. Garcia	1-UNSA	7 avril 2009	Valorisation et mise à jour du CMS
Transfert des connaissances / Actions pôle mer PACA – S5					
ECIMAR	Présentation du programme ECIMAR ; état d'avancement	O. Thomas et T. Perez	ECIMAR	5 et 6 mars 2009	Séminaire de suivi du programme ANR Biodiversité
WP1	NMR & LC-MSn analysis of marine natural products	Culioli G.	7-USTV	avril 2009	Mission AUF, Conférence à l'Université d'Hanoi (Vietnam)
WP3	20000 molécules sous les mers	Banaigs B.	4-UPVD	mars 2009	Séminaire DIMAR, Centre d'Océanologie de Marseille
WP1	Biofouling en milieu marin	Briand J.-F.	7-USTV	mai 2009	Séminaire DIMAR, Centre d'Océanologie de Marseille
WP1, WP3	Biology and chemical defense of ascidians	Turon X.	8-CEAB	juin 2009	Conférence invitée : Master Biodiversité Animale, Université de Barcelona

- **Présentation des résultats ECIMAR obtenus dans le semestre S5**

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 espèces récoltées lors des missions 2007-2008 est poursuivie essentiellement par l'équipe 5-DIMAR. Sur les 900 échantillons actuellement inscrits dans la base de données (# 250 espèces), il reste environ 40% de détermination à réaliser. Ces travaux se concentrent actuellement sur les organismes qui ont donné des résultats prometteurs de chimie et/ou d'activités biologiques, ou pour des groupes taxonomiques étudiés en chimiosystématique (Éponges Homoscleromorpha, Halichondrida, Dictyoceratida).

Suite aux résultats prometteurs obtenus pendant les deux premières années du programme, de nouveaux échantillonnages ont été organisés dans les sites visités en 2007 : Détroit de Gibraltar (Ceuta) et Marseille (Juin

2009). Au cours de ces deux missions, plus de 200 échantillons ont été récoltés de manière à compléter la collection et obtenir suffisamment de biomasse pour parfaire les analyses chimiques et reproduire certains tests d'activités biologiques sur des molécules purifiées. Une autre mission complémentaire a été réalisée dans le sud de l'Espagne (Cabo de Palos) pour cibler particulièrement certaines espèces d'ascidies.

1.2 Evaluation de la chimiodiversité

- Acquisition des signatures chimiques

Actuellement, 539 signatures chimiques sont enregistrées dans la base de données. 379 signatures chimiques, provenant essentiellement des campagnes 2008 à Marseille et en Grèce sont venues enrichir les 160 signatures précédemment sauvegardées. L'ensemble des données a été inséré dans la base de données ECIMAR (www.ecimar.org), ce qui permet des comparaisons aisées. Ces signatures sont considérées comme des indicateurs du « métabolome » des organismes étudiés. Les dernières signatures de la mission Banyuls 2008 sont en cours d'acquisition ce qui finalisera le traitement des missions 2007-2008.

D'une manière générale, les variations observées, lorsqu'elles existent, témoignent d'une différence géographique. Certaines espèces d'éponges non encore identifiées ont révélé des empreintes chimiques (2-MNHN) proches d'espèces déjà connues, et pourraient apporter une aide à la taxonomie. A titre d'exemple, l'identification d'un bryzoaire correspondant va être réexaminée au vu de la comparaison de son empreinte chimique avec d'autres espèces proches. Des résultats similaires ont été obtenus par les autres partenaires chimistes : 1-UNSA sur les spongiaires Dictyoceratida et Haplosclerida, 3-ICSN sur les Halichondrida, 4-UPVD sur *Aplysina* et les ascidies du genre *Aplidium* et *Cystodytes*, et enfin le partenaire 7-USTV sur les bryzoaires mais aussi les gorgonaires des genres *Paramuricea* et *Eunicella*.

- L'empreinte chimique des cyanobactéries (*Synechococcus*) isolées par cytométrie en flux de l'éponge *Petrosia ficiformis* (7-USTV), a montré un pic majoritaire observé également dans la signature chimique de l'éponge entière ce qui laisse supposer leur implication dans la production des métabolites.

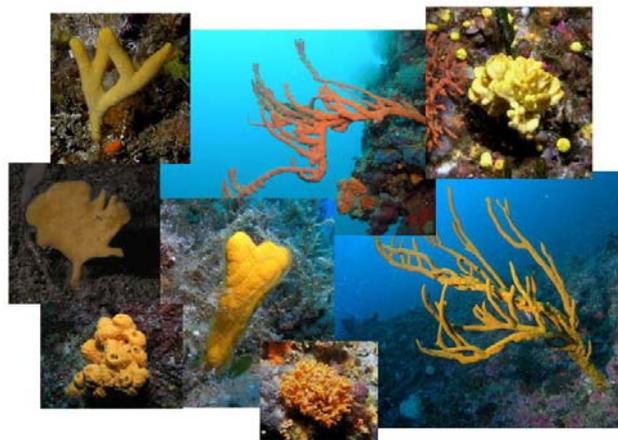


Figure 1 : Eponges Halichondrida faisant l'objet d'un effort particulier pour la résolution de leur statut taxonomique. Ce groupe inclut les éponges de l'ensemble polyphylétique des Axinellidae dont des représentants ont été prélevés tout autour de la Méditerranée.

1.3 Isolement et caractérisation de métabolites bioactifs

L'analyse des signatures chimiques nous a incités à concentrer l'effort sur la caractérisation du métabolome d'espèces modèles du WP2 et WP3, ou offrant un potentiel de structures originales et/ou bioactives. A titre d'exemple :

- Des furanoterpènes connus ont été isolés et caractérisés de différentes éponges Dictyoceratida : furospongine, niténine en particulier des éponges *Spongia officinalis* et *S. agaricina* (1-UNSA, 5-DIMAR et 8-CEAB). Cette caractérisation a permis de réaliser des analyses comparées sur ces organismes (lien avec le WP3). Dans le groupe des Haplosclerida les éponges *Reniera mucosa* et *R. fulva* ont fourni d'autres familles de terpènes ainsi que des composés polyacétyléniques. Certains composés nouveaux sont en cours de caractérisation. Une éponge du genre *Haliclona* récoltée dans le détroit de Gibraltar ayant montré une activité cytotoxique intéressante, l'isolement des composés bioactifs a été entrepris. Un nouveau phospholipide est en cours de caractérisation et serait responsable de l'activité biologique de l'extrait (1-UNSA).
- De l'éponge *Clathrina clathrus* (2-MNHN), a été isolé et identifié, en plus de la clathridine et de son complexe zinc déjà décrits, un nouvel analogue appelé clathridimine qui ne diffère de la clathridine que par le remplacement d'un carbonyle par une imine au niveau du noyau imidazole. L'isolement des composés minoritaires se poursuit.
- Plusieurs échantillons d'éponges du genre *Phorbas* (2-MNHN) ont été analysés et ont permis l'isolement, en plus de deux stérols et deux dérivés bromés pour lesquels les analyses spectrales sont en

cours, de la 1-hexadécyl-*sn*-glycérol-3-phosphoryl-choline, précédemment isolée d'un cnidaire, qui a révélé une très forte inhibition de croissance de la souche FcB1 de *Plasmodium falciparum*. Des études complémentaires se poursuivent pour affiner les résultats obtenus.

- De la gorgone *Eunicella cavolini* (7-USTV) a été isolé le 11 α -acétoxypregn-4,20-èn-3-one, déjà décrit dans la littérature mais pour lequel une correction des données structurales a été relevée.
- L'étude chimique des extraits du zoanthaire *Savalia savaglia* a conduit à l'isolement de deux bétaines, l'homarine et la zooanemonine. Ces deux composés sont largement répandus au sein des invertébrés marins (7-USTV).

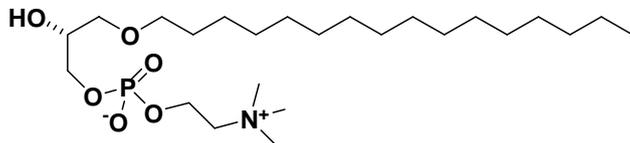


Figure 2 : Phospholipide isolé de plusieurs éponges du genre *Phorbis* inhibant la croissance de la souche FcB1 de *Plasmodium falciparum*.

1.4 Evaluation des activités biologiques

- Activités cytotoxique et antipaludique

137 extraits bruts préparés par les différents partenaires ont été testés à l'ICSN sur cellules tumorales KB pour évaluer leur cytotoxicité et leur activité inhibitrice de FTPase. Des tests d'inhibition de la croissance *in vitro* de deux souches distinctes de *P. falciparum* ont été réalisés au MNHN. Pour les tests antipaludiques, la méthode utilisée est celle de Desjardins (tests en plaques 96 puits sur 48h avec mesure d'hypoxanthine incorporée entre 24h et 48h). Les deux souches testées sont FcB1 (sensibilité moyenne à la chloroquine, CI_{50} ~30nM) et K1 (résistante à la chloroquine). Les résultats obtenus montrent une bonne corrélation entre les réplicats et entre les deux dilutions (10 et 1 μ g/mL), et aucune différence notable n'a été remarquée entre les deux souches testées.

6 extraits ont montré de fortes cytotoxicités sur cellules KB. 8 extraits ont présenté des inhibitions de croissance importantes sur les 2 souches de *P. falciparum*, aux deux concentrations testées. Une vingtaine d'extraits a également montré une bioactivité intéressante sur au moins une des trois cibles.

- Activité anti-adhésion

Si le prégnane isolé de *E. cavolini* a été testé sans succès vis-à-vis du biofilm de la bactérie marine *Pseudoalteromonas* sp., certaines fractions apolaires de *P. ficiformis* ont montré une activité intéressante (résultats en cours) (7-USTV).

1.5 Métabolites secondaires et marqueurs chimio taxonomiques ou environnementaux

L'approche chimio-taxonomique développée lors des semestres précédents est toujours principalement appliquée à deux groupes d'éponges : (i) l'ensemble monophylétique des Homoscleromorpha (Plakinidae) pour aider au positionnement dans la classification d'espèces pour lesquelles les caractères morphologiques sont rares (1-UNSA ; 5-DIMAR) ; (ii) l'ensemble polyphylétique des Axinellidae pour lequel les caractères chimiques sont bien congruents avec les hypothèses actuelles de phylogénie moléculaire (3-ICSN, 5-DIMAR). Au cours de ce semestre, l'essentiel du travail a porté sur le développement de méthodes d'analyses multivariées à appliquer aux données chromatographiques de manière à élaborer des classifications comparables à celles obtenues sur les données moléculaires ou morphologiques. Ces classifications obtenues, il est alors possible d'identifier des marqueurs chimiques « synapomorphiques ». Sur ce thème, plusieurs communications seront réalisées dans les prochains congrès internationaux (Juillet 2009) et trois articles sont en préparation. Durant ce semestre, cette approche a été étendue à un autre groupe de spongiaires, les Dictyoceratida (1-UNSA, 5-DIMAR), et un échantillonnage conséquent a été réalisé pour transposer ce nouveau savoir-faire aux gorgonaires de Méditerranée (5-DIMAR ; 7-USTV).

WP 2 : Production des métabolites cibles

Responsable : Ali AL-MOURABIT (3-ICSN)

2.1 Processus synthétiques et biosynthétiques de métabolites cibles

- L'isolement de la tribromostyloguanidine d'*Axinella polypoides* des côtes libanaises constitue le premier dimère de type pyrrole-2-aminoimidazole isolé d'une éponge Méditerranéenne. C'est un métabolite qui fait partie d'une classe d'alcoïdes particulièrement intéressante sur le plan biologique et chimique. La synthèse chimique biomimétique de cette famille de molécule de type pyrrole-2-aminoimidazole présente un enjeu très important puisque le milieu naturel ne peut fournir les quantités nécessaires pour les études pharmacologiques requises. C'est dans ce contexte que la synthèse biomimétique (3-ICSN) a été entreprise. Les efforts en synthèse organique ont permis la découverte d'une réaction en cascade permettant la préparation d'un intermédiaire complexe vers la styloguanidine et la palau'amine, un composé clef de cette famille de composés bioactifs.

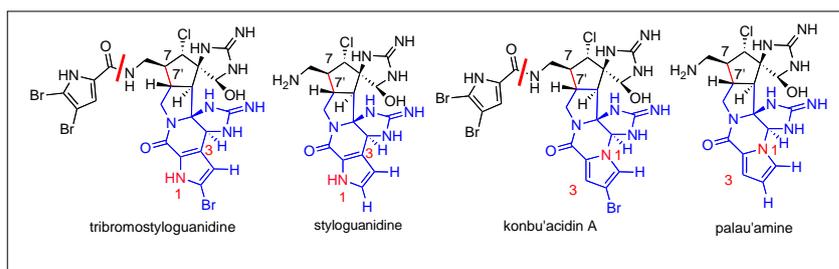


Figure 3 : Structures de dimères bioactifs dans la famille des pyrrole-2-aminoimidazole

- Le protocole pour l'étude de la biosynthèse *in vivo* utilisant comme détecteur un RadioTLC (1-UNSA, 3-ICSN, collaboration AIEA) est maintenant au point. Cette méthode s'avère très efficace pour suivre la métabolisation de différents acides aminés radiomarqués en ^{14}C . Ce protocole a permis de mettre en évidence la métabolisation de deux acides aminés, l'histidine et la proline, par les éponge *Agelas oroides* et *Axinella damicornis*. L'ornithine et l'arginine, deux autres précurseurs hypothétiques, n'ont pas montré de métabolisation aussi importante. L'identification des métabolites par HPLC-MS est en cours et constituera la première mise en évidence d'un chemin biosynthétique *in vivo* dans ce groupe d'éponge.
- Par ailleurs, la biosynthèse des pyridoacridines des chromotypes bleu et violet de l'ascidie *Cystodytes dellechiajei* sur broyat cellulaire est en cours d'étude (4-UPVD). La production *in vitro* d'ascididimine, alcaloïde majoritaire du chromotype bleu, a été obtenue et confirmée. Par contre, pour l'instant, aucune production de shermilamine B et kuanoniamine D, pyridoacridines majoritaires du chromotype violet n'a été observée. L'étude est poursuivie sur le chromotype vert.

2.2 Contribution microbienne à la production de métabolites

- Des coupes histologiques d'un échantillon de l'éponge calcaire *C. clathrus* avaient permis d'observer la présence de bactéries diverses et abondantes dans le mésohyle avec deux morphotypes principaux: des bactéries spiralées, courtes et épaisses et des bacilles très fins et longs. Ces premiers résultats obtenus en coloration de Gram et par hybridation *in situ* avec une sonde eubactérienne ont été confirmés en microscopie électronique (2-MNHN, 5-DIMAR). La description des deux morphotypes prépondérants est en cours. L'observation fréquente de la localisation des bactéries spiralées à proximité de cellules d'éponges et les résultats en microscopie électronique à transmission d'une expérience de réaggrégation spontanée d'une suspension dissociée de *C. clathrus* suggèrent une association entre le morphotype spiralé et certaines cellules de *C. clathrus*. De plus, l'action de la trypsine sur une fraction enrichie en cellules denses de *C. clathrus*, suivie de centrifugations différentielles, a permis de séparer les cellules des bactéries qui y sont attachées. Nous avons ainsi pu observer, après coloration au DAPI, un enrichissement d'environ 30% du culot bactérien en bactéries de type spiralé. L'ensemble de ces résultats conforte l'hypothèse d'une association entre les bactéries de type spiralé et certaines cellules de *C. clathrus* dont le type cellulaire reste à définir. L'isolement de la flore bactérienne cultivable a été entrepris par étalements des différentes fractions obtenues lors des expériences de fractionnement cellulaire. Les affiliations phylogénétiques des souches ainsi isolées sont en cours afin de vérifier si nous sommes parvenus à cultiver le morphotype spiralé. Parallèlement à l'affiliation phylogénétique de la flore bactérienne cultivable, des expériences de DGGE ont été réalisées sur 6 échantillons de *C. clathrus* de manière à mieux évaluer la diversité bactérienne de cette éponge (collaboration avec 8-CEAB).
- Lors de l'étude des micro-organismes associés à l'éponge *Petrosia ficiformis*, après optimisation et séparation par cytométrie en flux (CMF), deux tentatives de mise en culture ont été réalisées avec les cellules de *Synechococcus* spp. triées. La présence de cyanobactéries a été constatée pendant la première semaine de mise en culture mais aucune croissance n'a été observée, ceci est probablement lié à la faible concentration des microorganismes dans les milieux liquides et solides utilisés. D'autre part, cette technique a permis de montrer la présence de deux populations de cyanobactéries qui peuvent être distinguées en fonction de la fluorescence (phycoérythrine et chlorophylle a) et de la taille des cellules. Le séquençage de l'ARN ribosomal 16S permettra de confirmer la présence d'une ou plusieurs espèces de *Synechococcus* spp. chez *Petrosia ficiformis* (expérience en cours de réalisation). Des photos de *Synechococcus* spp. ont été prises en microscopies optique et électronique à transmission permettant de mettre en évidence la forme spiralée caractéristique des thylacoïdes.
- En suivant le protocole expérimental développé pour l'étude du rôle des microorganismes symbiotiques dans la biosynthèse des alcaloïdes bromés chez *Aplysina aerophoba* [cf S3], nous avons obtenu deux culots cellulaires correspondant à deux sous-populations microbiennes symbiotiques de *A. aerophoba*: une cyanobactérie, *Synechococcus* sp. et les bactéries. Avec ces culots nous avons pu préparer des micro-extraits et obtenir les signatures chimiques que nous avons comparées à la signature de l'association symbiotique éponge-microorganismes. Cette comparaison montre que les alcaloïdes bromés ne sont présents ni dans les bactéries ni

dans la cyanobactérie. Le stockage de ces métabolites secondaires semble donc se faire dans les cellules de l'éponge.

N.B. : une partie des travaux réalisés ici relèvent également du WP3.4 « Influence de la symbiose sur la production de métabolites secondaires », mais par soucis de lisibilité tout a été regroupé dans cette rubrique.

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

- Pour la plupart des espèces étudiées dans cet objectif, les échantillonnages ont été stoppés à la fin de l'année 2008 ou le seront après l'été 2009. Le Tableau I présente l'état d'avancement du traitement des différentes séries et les informations attendues. Pour la grande majorité des espèces prélevées, l'étude du cycle de vie a été réalisée avec la collaboration d'A. Ereskovsky (programme PHENOMED). Pour certaines d'entre elles, les fluctuations de l'expression de certains métabolites ciblés ou de l'activité biologique évaluée par le test Microtox ont été mises en relation avec les grandes phases du cycle de reproduction et/ou les fluctuations naturelles de température.

- Le principal fait marquant de ce semestre concerne l'achèvement du traitement de deux séries temporelles pour les espèces *Oscarella tuberculata* et *O. lobularis* (Stage de Master M. Dubois), et le démarrage du traitement d'une série pour une troisième espèce de ce genre, qui se trouve être nouvelle pour la science (description en cours). Nous avons ainsi étudié le cycle de vie de ces espèces d'éponge et la variation de deux indicateurs du métabolisme, l'effort reproducteur et la bioactivité, à coût énergétique élevé. Les deux espèces « sœurs », *Oscarella lobularis* et *O. tuberculata*, ont un cycle de vie saisonnier avec un pic annuel de reproduction en période estivale (mi-juin à mi-septembre pour *O. tuberculata* et mi-juillet à mi-septembre pour *O. lobularis*). L'effort reproducteur semble être conditionné par la fluctuation naturelle de la température des eaux. Les extraits bruts des deux espèces se sont révélés bioactifs, *O. tuberculata* 3 à 4 fois plus active que *O. lobularis*, probablement du à la diversité chimique des métabolites secondaires produites par chacune des espèces (cf. rapports précédents). Une variation de la bioactivité au cours du temps a été observée chez les deux espèces et mise en corrélation avec le cycle de vie, l'effort reproducteur et la température des eaux. Une tendance à la diminution de la bioactivité et donc des capacités de défense a été observée en période d'embryogenèse et développement larvaire, mais aussi durant un phénomène de « remaniement tissulaire ». Une corrélation négative a été également mise en évidence entre la bioactivité et la température des eaux. Il apparaît donc que l'optimisation de l'allocation des ressources, probablement influencée par les facteurs biotiques et abiotiques, conditionne la variation de la bioactivité observée.

Parallèlement à ces séries obtenues pour des spongiaires, un prélèvement dans l'espace et dans le temps a été démarré pour la gorgone *Paramuricea clavata* de manière à conforter les résultats préliminaires obtenus en 2008 (variation de l'activité et de l'expression de métabolites sur un gradient bathymétrique) et à tester l'influence des variations saisonnières de température et de la composition de la flore microbienne (collaboration ANR Medchange) sur le métabolisme de cette espèce sensible aux anomalies climatiques.

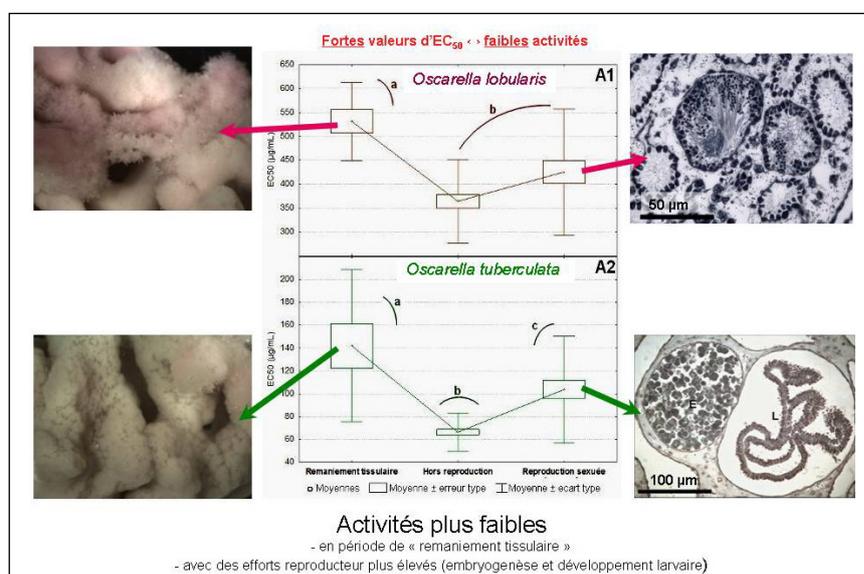


Figure 4 : Variation de la bioactivité de deux éponges *Oscarella* en fonction de différentes phases du cycle de vie. A gauche, des illustrations de période de remaniement tissulaires, combinant nécroses et régénération de l'éponge. A droite en haut, une illustration de la spermatogénèse et en bas à droite des embryons. La bioactivité la plus importante est observée hors période de reproduction.

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

Dans cette partie, on teste essentiellement l'effet d'un stress thermique sur le métabolisme secondaire. Les premières démonstrations d'une inhibition de l'expression de certains métabolites de l'éponge *S. officinalis* en conditions de stress demandaient de conduire le même type d'expérience à plus long terme. Durant ce semestre, une série de 4 années d'échantillons a été traitée. En plus de l'étude du cycle de vie de cette espèce commerciale, nous avons étudié en parallèle l'expression du marqueur de stress HSP 70 et les fluctuations de la bioactivité d'extraits bruts. Les analyses des données brutes obtenues à la suite de cette expérience à long terme sont en cours d'analyse.

Tableau 1 : Etat d'avancement du traitement des différentes séries d'échantillons dans le cadre du WP3

Espèces	WP	Séries	Cycle de vie	Bioactivité	Expression de métabolites IIaires	Autres paramètres	Partenaires impliqués
<i>Spongia officinalis</i>	WP3.1, 3.2	Temporelle / spatiale	Effectué	Effectué	Partiellement effectué	Marqueurs de stress (HSP) et marqueurs génétiques (effectués)	5-DIMAR, 1-UNSA, 10-HCMR
<i>Spongia agaricina</i>	WP 3.3, 3.4	Spatiale	-	-	Effectué	Marqueurs génétiques et diversité bactérienne par DGGE (effectués)	1-UNSA, 8-CEAB
<i>Oscarella tuberculata</i>	WP3.1, WP3.3	Temporelle / spatiale	Effectué	Effectué	En cours	Marqueurs génétiques (en développement)	5-DIMAR, 1-UNSA
<i>Oscarella lobularis</i>	WP3.1	Temporelle	Effectué	Effectué	En cours	-	5-DIMAR, 1-UNSA
<i>Oscarella sp. nov.</i>	WP3.1	Temporelle	En cours	En cours	A faire	-	5-DIMAR, 1-UNSA
<i>Corticium candelabrum</i>	WP3.1	Temporelle	En cours	A faire	A faire	-	5-DIMAR, 4-UPVD, 8-CEAB
<i>Aplysina cavernicola</i>	WP3.1, WP3.3	Temporelle / spatiale	En cours	A faire	En cours	Marqueurs génétiques (en cours)	5-DIMAR, 4-UPVD
<i>Aplysina aerophoba</i>	WP3.1, WP3.3, WP3.4	Temporelle	-	En cours	En cours	Diversité bactérienne	4-UPVD, 8-CEAB
<i>Agelas oroides</i>	WP3.1	Temporelle	En cours	A faire	A faire	-	5-DIMAR, 3-ICSN
<i>Clathrina clathrus</i>	WP3.4	Temporelle	-	En cours	En cours	Diversité bactérienne	5-DIMAR, 2-MNHN
<i>Paramuricea clavata</i>	WP3.1, WP3.2	Temporelle / spatiale	-	En cours	En cours	Diversité bactérienne (coll. M. Bally, Medchange)	5-DIMAR, 7-USTV

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

- La structuration génétique et la phylogéographie des spongiaires restent mal connues en raison du faible degré de polymorphisme des marqueurs génétiques habituellement utilisés (en particulier les marqueurs mitochondriaux). Des études récentes ont permis de mettre en évidence une portion peu usitée de la cytochrome oxydase I (marqueur mitochondrial) potentiellement plus polymorphe que celle habituellement utilisée (Erpenbeck et al., 2006; Lopez-Legentil and Pawlik, 2009). Ce marqueur est en cours de test d'amplification et de polymorphisme pour *Aplysina cavernicola* et *Oscarella tuberculata*. En cas de polymorphisme suffisant, la phylogéographie et la structuration génétique de ces espèces pourront être évaluées dans un premier temps puis comparées aux patrons de diversité chimique dans un second temps.

- Dans le même temps, les travaux de génétique des populations se poursuivent.

- Pour *Aplysina cavernicola*, entre 3 et 6 locus microsatellites vont être utilisés pour génotyper un grand nombre d'individus et ainsi caractériser les structures génétiques des populations à l'échelle du bassin occidental de la Méditerranée, mais aussi évaluer la connectivité (flux de gène) entre les populations étudiées. Cette structuration génétique sera ensuite comparée aux patrons de diversité chimique aux niveaux populationnel et individuel (génotypage et chimiotypage simultanés de différents individus). En outre, un minisatellite développé parallèlement aux microsatellites a été utilisé afin de mieux comprendre les aspects phylogéographiques de l'éponge *Aplysina cavernicola*. Un important échantillonnage a été entrepris en ce sens pour l'ensemble de la Méditerranée (missions ECIMAR) et au niveau local (en particulier la région de Marseille ; 5-DIMAR). L'analyse du polymorphisme de longueur de ce minisatellite est en cours et devrait permettre sous peu d'inférer

des hypothèses phylogéographiques pour *Aplysina cavernicola* voire l'ensemble des *Aplysina* présentes en Méditerranée.

- Pour *Spongia officinalis*, le développement des marqueurs microsatellites a été achevé et publié sous la forme d'une note technique dans le journal *Conservation Genetics*. Ce travail a permis de valider la pertinence de 10 marqueurs, dont le polymorphisme a été évalué sur 30 individus de Crète. Le génotypage d'échantillons provenant du pourtour Méditerranéen est en cours.

3.4 : Influence de la symbiose sur la production de métabolites secondaires

Cf. WP2.2

WP 4 : Base de Données collaborative

Responsable : J. de Vaugelas (I-UNSA)

Au cours de ce semestre plusieurs améliorations de l'ergonomie de l'interface et de fonctionnalités ont été développées. Le menu principal du site internet a été modifié pour mettre en valeur l'accès à la base de données pour les visiteurs extérieurs. Les premières traductions en anglais du site internet ont été mises en ligne. Le bloc « Base de Données » a été individualisé de manière à mettre en évidence les liens de « valorisation » de la BDD : liens vers les parties biodiversité, chimiodiversité et sites étudiés. Dans la base de données, l'entité "activité biologique" de manière à regrouper les résultats des différents tests effectués en 2008. Ces activités sont liées aux signatures chimiques des échantillons. Enfin un champ "molécule" est prévu pour associer une activité biologique à une molécule. Les utilisateurs autorisés peuvent désormais télécharger les documents (photos, signatures chimiques) dans leur plus haute résolution. Un module spécifique a été développé pour comparer une série de signatures chimiques (comparaisons inter et intra-spécifiques). Les espèces identifiées alimentent maintenant une liste à menu déroulant visible dans la partie grand-public. Cette liste donne accès à des fiches d'espèces qui regroupent déjà les informations écologiques disponibles, et prochainement des données de chimie.

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	Pérez	Nicolas	Doctorant	01/10/2008	18 mois
5-DIMAR	Lejeusne	Christophe	Post-Doctorant Université de Nice	01/10/2008	11 mois
8/9- CEAB	López-Legentil	Susanna	Post-Doctorant, gouvernement espagnol.	01/11/2008	60 mois

Commentaires particuliers du coordonnateur

Certains partenaires d'ECIMAR font maintenant partie des GDR BioChiMar (Coordination A. Al Mourabit) et GDRI Récifs coralliens.