

Rapport d'avancement scientifique BIODIVERSITE EDITION 2006

- 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

- 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-obscur. 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.

• **Etat d'avancement SEMESTRE 6** (30 Juin – 31 décembre 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				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							
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							
1.4 Communication des résultats	04	10	En cours						Publications, et participation massive au 6th European Conference on Marine Natural Products, Portugal
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							
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				

Délivrables obtenus sur le semestre écoulé	2007		2008		2009		2010		Commentaires
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	
3.1.1/3.1.2 Résultats - Séries temporelles N°1, 2 & 3		07	En cours						Achévé pour plusieurs modèles
3.1.3 Résultats –Séries spatiales N°1 & 2			06	12	En cours				
3.2 Protocoles expérimentaux		11							
3.2 Résultats des protocoles			06			12			Résultats préliminaires
3.3 Développement des marqueurs génétiques						12			Achévé. Essais pour un nouveau modèle <i>O. tuberculata</i>
3.3 Echantillonnage					06				
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			Amélioration de l'ergonomie
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				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. Description d'espèces nouvelles.

Objectif 1.2 : acquisition des signatures chimiques

- Valorisation des signatures chimiques par des approches de métabolomiques.
- Application de méthodes mathématiques standardisées pour le traitement des signatures chimiques.

Objectif 1.3 : isolement et caractérisation des métabolites secondaires. Publications

Objectif 1.4 : évaluation des activités biologiques

- Bilan des tests d'activité biologique
- Tests de bioactivité pour des applications en dermatologie par la Sté Galderma

Objectif 1.5 : Etude chimio-systématique de deux groupes d'éponges

WP2 : Production de métabolites cibles

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

- Biosynthèse *de novo* de la proline dans les pyrrole-2-aminoimidazoles produits par *Agelas oroides* et interprétation des résultats.

Objectif 2.2 : contribution microbienne à la production de métabolites

- L'étude des associations microbiennes avec l'éponge *Clathrina clathrus* a permis d'obtenir des premiers résultats prometteurs dans ce domaine en vue de l'identification des organismes producteurs de métabolites secondaires bioactifs.

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

- Nouvel onglet activités biologiques
- Alimentation de la base de données en molécules et activités biologiques

Ecarts « prévu-réalisé »

Le principal écart est lié aux difficultés que rencontre le partenaire 6-UA pour la réalisation des tests biologiques avancés sur des molécules d'intérêt isolées dans le cadre du programme. Ce partenaire n'est aujourd'hui pas en mesure de réaliser cette partie du programme et nous allons envisager au cours du semestre S7 une réorientation de cette activité.

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

- Ecole thématique en écologie chimique EcoChiMar organisée par le partenaire 4-UPVD.
- Contrat de collaboration entre 1-UNS et la Sté Galderma pour des valorisations en dermatologie
- 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
Comité de pilotage	Sept 2009	Nice	Membres du CP	Lancement GDR, coordination ECIMAR avec autre programmes
Workshop bioinformatique (ECIMAR / BioChiMar)	27 Octobre 2009	Marseille	Membres ECIMAR, GDRs BioChiMar et Ecologie Chimique	Groupe de travail écologie chimique
Workshop ECIMAR PACA	28 Janvier 2010 ²	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)

WP1 : L'identification des métabolites secondaires responsables de la bioactivité mise en évidence sur les tests réalisés sur les extraits des organismes ECIMAR par les partenaires 2-MNHN et 3-ICSN sera poursuivie. Une réorientation des activités du partenaire 6-UA sera envisagée lors du prochain semestre car les tests biologiques avancés ne pourront être réalisés par ce partenaire pour des raisons personnelles. La description des espèces sera poursuivie.

WP2 : Les études en synthèse de pyrrole-2-aminoimidazoles bioactifs sera poursuivie. L'application de la méthodologie développée pour la biosynthèse sera appliquée pour des études cinétiques en vue d'obtenir une analyse de flux métabolique par mesure des concentrations en isotopomères en fonction du temps de métabolisation par l'éponge *Axinella damicornis*.

WP3 : Analyse des résultats en phylogénétique et publication des résultats sur les fluctuations de la production de métabolites en fonction de facteurs biotiques et abiotiques.

WP4 : décision sur l'avenir de la base de données ECIMAR et sur une extension vers la création de plusieurs satellites chez les différents partenaires.

B - DELIVRABLES ET RESULTATS OBTENUS

- **Délivrables ECIMAR obtenus dans le semestre S6**

(Publications, mémoires et thèses, communications à congrès, rapport technique, base de données, transfert de connaissance et vulgarisation scientifique. **En vert les publications et communications du semestre S6.**

Objectif	Titre	Auteurs	Equipes	Date	Contexte
Publications 2009					
WP3	Climate change effects on a miniature ocean: the highly diverse, highly impacted Mediterranean Sea	Lejeune C., Chevaldonné P., Pergent-Martini C., Boudouresque CF., Pérez T.	5-DIMAR	2010 (en ligne)	Trends in Ecology and Evolution
WP2	Biomimetically Inspired Short Access to the 2-Aminoimidazole-Fused Tetracyclic Core of Dibromoagelaspongin	S. Picon, E.-T. Huu Dau, M.-T. Martin, P. Retailleau, A. Zaparucha and A. Al-Mourabit	3-ICSN	2009	Organic Letters
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	2009	Journal of Natural Products
WP1	Parazoanthines: hydantoin alkaloids from the Mediterranean sea anemone <i>Parazoanthus axinellae</i>	Cachet N., Genta-Jouve G., Regalado E., Mokriani R., Amade P., Culioli G., Thomas O. P.	1-UNSA, 7-USTV	2009	Journal of Natural Products
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	Journal of Natural Products
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-Tabariés A., L. Dombrowsky, O. Bottzek, J.-F. Briand, Y. Blache	7-USTV	2009	Tetrahedron Letters
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
WP3	Characterization of polymorphic microsatellite markers for the endangered Mediterranean bath sponge <i>Spongia officinalis</i> L.,	Dailianis, T., Tsigenopoulos CS.	5/10-HCMR	2009	Conservation Genetics
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)
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	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	Marine fouling organisms and their use	Salta M., Chambers L.,	7-USTV	2009	Proceedings of

	in antifouling bioassays	Briand J.-F., Blache Y., Wharton J.A., Wood R.J.K. & Stokes K.R.			EUROCORR 2009, Nice
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	Soumis (en revision)	Journal of Experimental Marine Biology and Ecology
Communications à congrès 2009					
WP1	Overview on Homoscleromorpha sponges diversity in the Mediterranean	Ereskovsky A., Ivanisevic J., Pérez T.	1-DIMAR	Jan. 2009	1 st Symposium for the conservation of coralligenous and other calcareous bioconstructions of the Mediterranean Sea, Tabarka, Tunisie (com. Orale)
ECIMAR	Biodiversité marine et médicament ; de l'écologie chimique à la pharmacochimie	B. Banaigs	4-UPVD	Fév. 2009	Académie nationale de Pharmacie, Paris (Conf. Invitée)
WP1	Synthèse et étude de relations structure-activité d'analogues terpéniques à visée antifouling	Sall C., M. Camps, L. Dombrowsky, Y. Blache	7-USTV	Avr. 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	Avr. 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	Avr. 2009	21ème Journée de la Société Chimique de France, Marseille
WP2	Toward the total synthesis of the immunosuppressive marine pyrrole-2-aminoimidazole palau'amine	Al-Mourabit A.	3-ICSN	Juil. 2009	6 th European Conference on Marine Natural Products, Porto, Portugal (conf. invitée)
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., Ereskovsky A., Becerro M., Perez T., Bourguet-Kondracki M.-L.	2-MNHN, 8-CEAB, 5-DIMAR	Juil. 2009	6 th European Conference on Marine Natural Products, Porto, Portugal (poster)
WP2	Biosynthesis of pyridoacridines in <i>C. dellechiajei</i> cell-free extracts.	Bry D., Bontemps N., Banaigs B.	4-UPVD	Juil. 2009	6 th European Conference on Marine Natural Products, Porto, Portugal (Comm. orale)
WP3	Relevant scale of chemical variation in <i>Aplysina aerophoba</i>	Becerro M., Sacristan-Soriano O., Majdi N., Banaigs B.	8-CEAB, 4-UPVD	Juil. 2009	6 th European Conference on Marine Natural Products, Porto, Portugal (Comm. orale)
WP3	Intraspecimen variability of natural products in the sponge <i>Aplysina aerophoba</i> .	Sacristan-Soriano O., Banaigs B., Becerro M.	8-CEAB, 4-UPVD	Juil. 2009	6 th European Conference on Marine Natural Products, Porto, Portugal (Comm. orale)
WP1	Algal diterpenoids as antifouling substances against a marine bacterial biofilm	Viano Y., Bonhomme D., Camps M., Briand J.-F., Ortalo-Magné A., Blache Y. & Culioli G.	7-USTV	Juil. 2009	6 th European Conference on Marine Natural Products, Porto, Portugal (Comm. orale)
WP1	Chemotaxonomy as valuable approach to study sponges of the family Irciniidae (Porifera, Dictyoceratida)	Abed C., Khalaf G., Bitar G., Thomas O.P., Mehiri M., Pérez T.	1-UNSA, 5-DIMAR, 5'UL	Juil. 2009	6 th European Conference on Marine Natural Products, Porto, Portugal (Comm. orale)
WP1	Pyrrole-2-aminoimidazoles alkaloids from <i>Axinella cf polypoides</i> sponge	Lejeune C., Gabant M., Martin M.T., Thoison O., Pérez T., Bitar G., Al-Mourabit A.	3-ICSN, 5-DIMAR, 5'UL	Juil. 2009	6 th European Conference on Marine Natural Products, Porto, Portugal (poster)
WP1, WP2	Chemiluminescent oxidative degradation of diketopiperazines and early precursors of marine pyrrole-2-aminoimidazole ; metabolites	Ermolenko L., Ratinaud C., Mazères S., Gabant M., Moriou C., Al-Mourabit A.	3-ICSN	Juil. 2009	6 th European Conference on Marine Natural Products, Porto, Portugal (poster)
WP1	¹ H HRMAS and LC-MS ⁿ as useful taxonomical tools for the discrimination	Jégou C., G. Culioli, N. Kervarec & V. Stiger-Pouvreau	7-USTV	Sept. 2009	European Society for Marine Biotechnology

	of brown algae belonging to the <i>Cystoseira</i> genus				Conference, Concarneau (Comm. Orale)
WP1, WP3	Co-cultures of marine invertebrate cells with their associated bacteria	Roué M., Pichon D., Pernice M., Bourguet-Kondracki M.-L., Domart-Coulon I.	2-MNHN	Sept.2009	European Society for Marine Biotechnology Conference, Concarneau (Comm. Orale)
WP1	Natural products as potential biocides in antifouling coatings	Culioli G., A. Ortalo-Magné, S.P. Dennington, L. Chambers & Y. Blache	7-USTV	Sept. 2009	EUROCORR 2009, Nice (Comm. orale)
WP1	Marine fouling organisms and their use in antifouling bioassays	Salta M., Chambers L., Briand J.-F., Blache Y., Wharton J.A., Wood R.J.K. & Stokes K.R.	7-USTV	Sept. 2009	EUROCORR 2009, Nice (Comm. orale)
WP1, WP2, WP3	Antifouling activities of MAPIEM	Bressy C., Briand J.-F., Carriere P., Culioli G., Dombrowsky L., Perrin F.-X., Praud-Tabaries A., Ortalo-Magné A., Tanguy B., Bottzeck O., Blache Y. & Margaillan A	7-USTV	Sept. 2009	EUROCORR 2009, Nice (Comm. orale)
WP1	Biofilms bactériens <i>in vitro</i> utilisés comme bioessais antifouling	Camps M., Dombrowsky L., Blache Y. & Briand J.-F.	7-USTV	Sept.2009	3 ^{ème} Colloque d'Ecologie Microbienne, Lyon (Comm. orale)
WP1, WP2, WP3	Symbiontes photosynthétiques de Spongiaires : Isolement, mise en culture et production de métabolites actifs en antifouling	Bendaoud A., Ortalo-Magne A., Camps M., Dombrowsky L., Barani A., Gregori G., Perez T., Blache Y. & Briand J.-F	7-USTV	Sept. 2009	3 ^{ème} Colloque d'Ecologie Microbienne, Lyon (poster)
WP1	Molécules bio-actives isolées d'éponges méditerranéennes	Roué M., Domart-Coulon I., Bourguet-Kondracki M.-L.	2-MNHN	Oct.2009	Journées de rentrée de l'école doctorale IViv, Paris, France (Comm. orale)
WP1, WP3	Reliability of a marine antifouling assay based on in vitro bacterial adhesion	Briand J.-F., Camps M., Dombrowsky L., Bazire A. & Blache Y.	7-USTV	Nov. 2009	5th ASM Conference on Biofilms, Cancun, Mexico (poster)
Transfert des connaissances / Actions pôle mer PACA – S6					
ECIMAR / BioChiMar	Ecologie Chimique Marine : indicateurs de biodiversité et valorisation	Pérez T.	5-DIMAR	Oct. 2009	Assemblée Générale du GDR CNRS « Ecologie Chimique », Université de Provence, Marseille (Conf. invitée)
WP1, WP3	“Isolement et caractérisation structurale de substances naturelles marines : Application à des fins chimiotaxonomiques et écologiques”	Culioli G.	7-USTV	Nov. 2009	Conférence de l'école doctorale, Université de Bretagne Occidentale & Institut Universitaire Européen de la Mer, Brest (Conf. invitée)

Documents et Rapports – S6

WP1,2 et 3	Métabolites secondaires d'invertébrés marins et biosynthèse in vivo d'alcaloïdes d'Agelas Oroïdes	Cachet N.	1-UNSA	2009	Thèse en chimie de l'Université de Nice
------------	---	-----------	--------	------	---

- **Présentation des résultats ECIMAR obtenus dans le semestre S6**

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.

1.2 Evaluation de la chimiodiversité

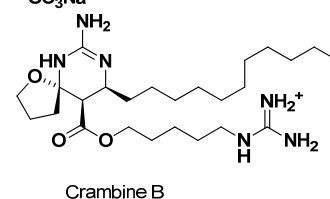
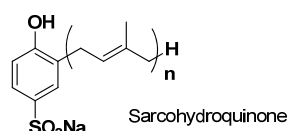
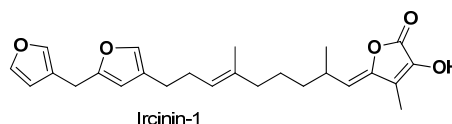
Les signatures chimiques de l'ensemble des échantillons récoltés du cnidaire *Parazoanthus axinellae* et des différentes espèces d'Irciinidae et d'Homoscleromorpha ont été obtenues et permettent d'obtenir des résultats valorisables en termes de chimiotaxonomie (1-UNSA).

Les signatures chimiques de l'échantillonnage des trois chromotypes (vert, bleu et violet) de *Cystodytes dellechiaiei*, réalisé en juin 2009 à Cabo de Palos (Espagne), ont été enregistrées (4-UPVD). La présence des 3 variétés chromatiques sur un même site et à la même saison permet de comparer les empreintes en s'exonérant d'éventuelles variations, temporelle ou géographique, de l'expression des métabolites secondaires. L'analyse de ces empreintes confirme l'existence de 3 chémotypes associés aux 3 chromotypes. De même les signatures chimiques des ascidies du genre *Aplidium* (18 échantillons) récoltés en Corse, à Marseille ou à Ceuta, permettent de distinguer 3 chémotypes au sein de ce genre.

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 :

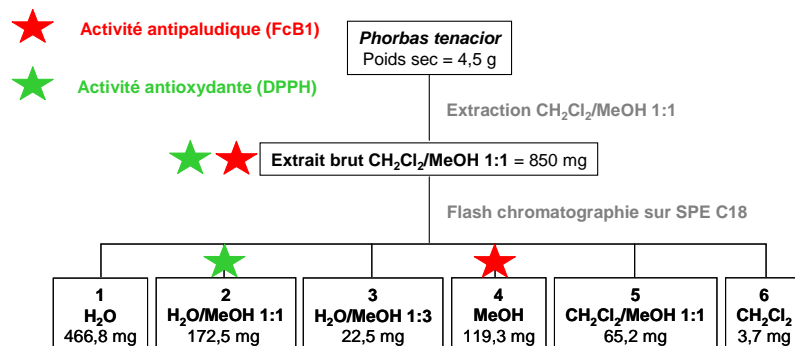
- Les composés principaux produits par les éponges de la famille des Irciinidae (*Sarcotragus* et *Ircinia*) se sont avérés être deux familles bien distinctes de molécules (Sarcohydroquinone et ircinines) possédant toutes des propriétés biologiques valorisables (1-UNSA et 5-DIMAR). En lien avec des travaux sur le WP2 le recensement des composés principaux produits par l'éponge *Axinella damicornis* a permis de mettre en évidence un ensemble de molécules déjà connues dans ce genre mais également la Z-oroidine qui n'avait jusqu'à présent pas été isolée du milieu naturel (1-UNSA et 3-ICSN). Enfin les extraits de l'éponge *Crambe crambe* montrant une cytotoxicité notable nous avons entrepris l'isolement et la caractérisation des composés de cette éponge. Une dizaine d'alcaloïdes bioactifs de la famille des crambines et crambescidines ont ainsi pu être isolés et caractérisés. Ils sont actuellement en phase d'évaluation biologique.



- L'espèce *Petrosia ficiformis*, dont l'étude, en relation avec le WP2, concerne le rôle des cyanobactéries associées dans le métabolisme secondaire, a fait l'objet d'une recherche de molécules aux propriétés antifoulings (7-USTV). Les extraits lipidiques de *P. ficiformis* avec et sans cyanobactéries ont été étudiés pour leur composition chimique. Plusieurs fractions présentant une activité antifouling ont été purifiées. L'une d'entre elles a permis l'isolement de trois polyacétylènes dont la Pétrrocortyne A, déjà connue chez le genre *Petrosia*. L'analyse structurale d'autres composés de cette famille est en cours. Des travaux similaires réalisés sur une autre fraction de l'extrait avec cyanobactéries ont pu mettre en évidence la présence de triterpènes connus.

- L'étude du zoanthaire *Savalia savaglia* (7-USTV), connu pour coloniser les axes de gorgones, a conduit à la caractérisation de sept composés dont deux ecdystéroïdes déjà connus chez l'espèce : la gerardiastérone et l'ecdystérone. Les cinq autres composés ont été isolés pour la première fois dans cette espèce : l'homarine, la zooanémone, la sérotonine, un dérivé bromé de la tyrosine et la 5,6-dibromotryptamine. 3 composés nouveaux de type alcaloïde indolique ont également pu être caractérisés de la gorgone *Paramuricea clavata*.

• L'étude de l'extrait brut antiplasmodial de *Phorbas tenacior* a été poursuivie (2-MNHN). Les travaux précédents avaient conduit à l'isolement du lysophospholipide 1-hexadécyl-sn-glycérol-3-phosphoryl-choline de formule brute $C_{24}H_{53}NO_6P$. Celui-ci ayant montré une activité antiplasmodiale modérée, nous avons repris l'étude chimique de l'extrait brut *P. tenacior* afin d'isoler d'autres molécules à activité antimalarique. De plus, une activité antioxydante intéressante (test au DPPH) a également été mise en évidence. Les molécules responsables des deux activités sont différentes car issues de fractions de polarité éloignées.



Première étape du fractionnement bio-guidé de *P. tenacior*.

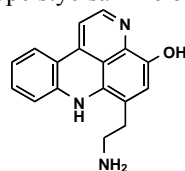
Par ailleurs les extraits des trois espèces *Phorbas tenacior*, *P. topsenti* et *P. ficticius* présentent une activité antioxydante intéressante. L'étude chimique de l'extrait brut de *P. topsenti* (2-MNHN) a conduit à l'isolement de quatre molécules antioxydantes dont trois connues: la taurine et les deux carotènes astaxanthine et adonirubine.

• Le profilage métabolique de l'ascidie *Cystodytes dellechiajei* se poursuit (4-UPVD) avec un double objectif :

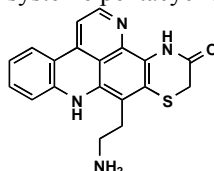
- caractériser de nouvelles pyridoacridines minoritaires, intermédiaires biosynthétiques potentiels (cf figure dans le WP2.1),

- compléter le travail de structure-cytotoxicité entrepris dans cette famille d'alcaloïdes polyaromatiques (WP1.4).

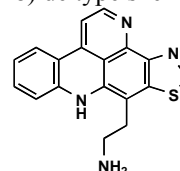
Dans le chromatype violet, en plus des pyridoacridines connues les shermilamine B et kuanoniamine D, leurs analogues déacétylés et des styelsamines C et D, deux alcaloïdes nouveaux, les composés DB7 et DB8 ont été caractérisés. Ces 2 composés ont la particularité d'avoir la chaîne éthylamine cyclisée sur un système tétracyclique (DB7) de type styelsamine ou sur un système pentacyclique (DB8) de type shermilamine.



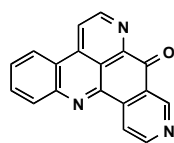
styelsamine D



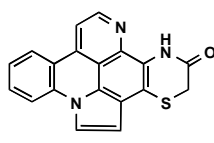
deAcshermilamine B



deAckuanoniamine D



DB7



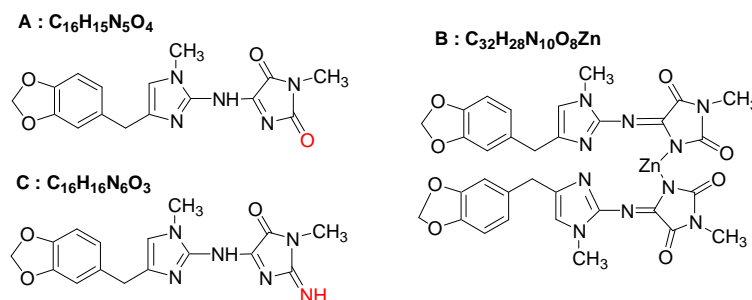
DB8

1.4 Evaluation des activités biologiques

• L'activité hémolytique du lysophospholipide 1-hexadécyl-sn-glycérol-3-phosphoryl-choline que nous avons isolé de *P. tenacior* et qui s'est révélé un composé à activité antimalarique modérée ($CI_{50} = 11 \mu M$), a été évalué (2-MNHN). Ce composé avait précédemment été isolé du cnidaire *Solandaria secunda* et avait été décrit comme possédant des propriétés hémolytiques sur des globules rouges de lapin (Fusetani *et al.*, 1985, Comp. Biochem. Physiol). Afin de vérifier ce point, nous avons mesuré l'activité hémolytique de ce composé sur globules rouges humains. Les résultats obtenus indiquent que ce composé est très faiblement hémolytique à la concentration maximale testée ($100 \mu g/mL$) et pas du tout en dessous de $12.5 \mu g/mL$. Il en résulte que l'action de cette molécule sur le globule rouge parasite serait bien dirigée vers le parasite et non la cellule hôte. Les investigations se poursuivent afin de préciser l'activité de ce composé.

• L'évaluation antimicrobienne de la clathridine et de ses deux analogues structuraux isolés de *Clathrina clathrus* a été réalisée. Nous avons ainsi pu attribuer l'activité anti-*S. aureus* mise en évidence dans l'extrait brut

au complexe zinc de la clathridine, l'activité dirigée contre *E. coli* à la clathridimine et enfin l'activité antifongique contre *C. albicans* à la clathridine et à la clathridimine.

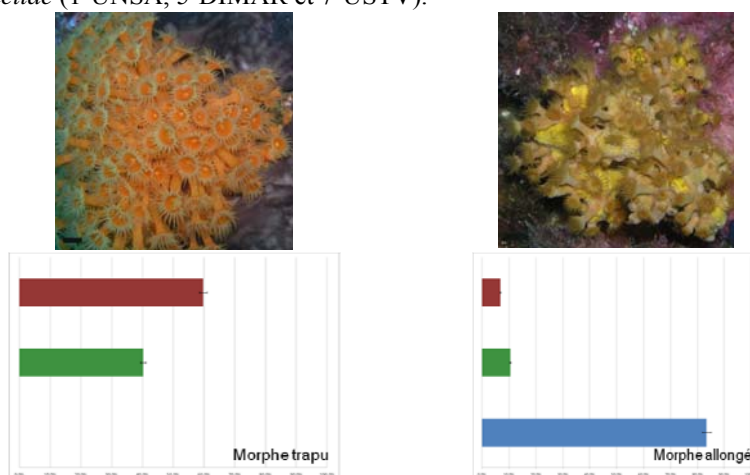


Structures de la clathridine (A), de son complexe zinc (B) et d'un nouvel analogue, la clathridimine (C)

- Des extraits de *Petrosia ficiformis* avec et sans cyanobactéries, 19 fractions ont été testées pour leur activité en antiadhésion vis-à-vis d'un biofilm bactérien de *Pseudoalteromonas* sp. Cinq fractions de l'éponge avec cyanobactéries et trois fractions de l'éponge sans cyanobactéries ont témoigné d'une activité en anti-adhésion significative. Ces fractions ont également été testées pour leur activité antibactérienne vis-à-vis de la même souche. Aucune inhibition de croissance significative n'a été constatée. Leurs purifications se poursuivent. (7-USTV).
- Applications en dermatologie. La phase de valorisation des premiers résultats sur les criblages d'activités débute en particulier avec une valorisation possible en dermatologie. **Un Accord de Transfert de Matériel** a été signé entre le partenaire 1-UNSA et la société Galderma (Sophia Antipolis). Après un criblage sur différentes cibles des principaux extraits de ce partenaire, plusieurs éponges ont été sélectionnées pour des études plus avancées en lien avec l'entreprise Galderma.

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). Un échantillonnage conséquent a été réalisé pour transposer ce nouveau savoir-faire aux gorgonaires de Méditerranée (5-DIMAR ; 7-USTV). L'utilisation de logiciels de traitement de données HPLC-MS et d'analyse statistique (Mzmine et R) a permis d'affiner les classifications à partir des données chimiques ce qui a conduit à une classification pour la famille des Irciinidae, une classification pour le groupe des Homoscleromorpha et la distinction entre deux morphotypes de petites anémones jusqu'à présent classées dans une seule espèce *Parazoanthus axinellae* (1-UNSA, 5-DIMAR et 7-USTV).



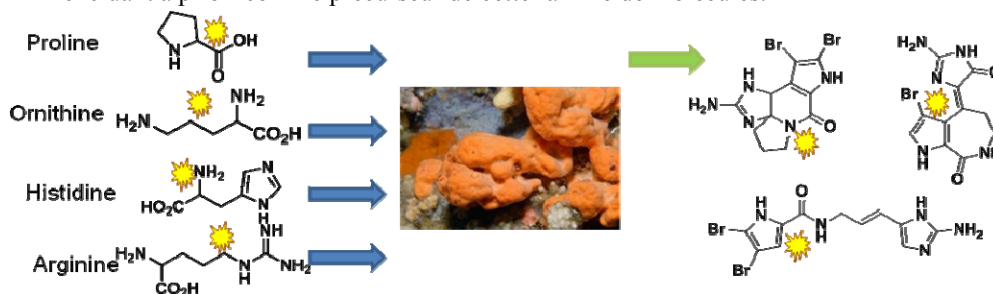
Distinction chimique de deux morphes du cnidaire *Parazoanthus axinellae* avec la mise en évidence des parazoanthines (en bleu dans le seul morphe allongé) avec peu de variation géographique et temporelle

WP 2 : Production des métabolites cibles

Responsable : Ali AL-MOURABIT (3-ICSN)

2.1 Processus synthétiques et biosynthétiques de métabolites cibles

Lors du semestre précédent nous avons validé un nouveau protocole pour l'étude de la biosynthèse de métabolites secondaires produits par des éponges en aquarium *in vivo* (1-UNSA et 3-ICSN). Cette étude sur l'organisme entier permet de contourner les problèmes de l'étude des chemins biosynthétiques liés à la culture de micro-organismes souvent responsables de cette biosynthèse et ne nécessite qu'une faible quantité de précurseur radioactif. Le résultat le plus marquant de l'application de cette méthode à *Agelas oroides*, qui produit une grande quantité d'alcaloïdes de type Pyrrole-2-AminoImidazoles (P2AI), est la métabolisation significative de la proline dans l'ensemble de ces composés avec des taux d'incorporation différents. Ce résultat a permis de valider notre méthode et nous a également permis d'observer que la métabolisation observée de l'histidine ne conduisait pas aux P2AI l'excluant a priori comme précurseur de cette famille de molécules.



La proline comme seul acide aminé précurseur des P2AI produits par l'éponge *Agelas oroides*

Ces résultats sont en contradiction avec ceux précédemment obtenus par une équipe canadienne et permettent de soutenir des hypothèses biosynthétiques formulées par le partenaire 3-ICSN sur la base d'expériences en chimie biomimétiques. Une analyse de flux métabolique basée sur l'utilisation de précurseurs isotopiquement enrichis nous permettra de valider ces hypothèses.

Nous avons pu identifier la styelsamine D dans les 3 chromotypes, violet, bleu et vert de l'ascidie *Cystodytes dellechiaiei* (4-UPVD). Cette pyridoacridine n'avait jamais été décrite dans les chromotypes vert et bleu, et c'est pour l'instant la seule molécule isolée commune aux 3 chromotypes. Sa présence conforte l'hypothèse d'une voie de biosynthèse commune pour les molécules appartenant aux 3 chromotypes. Sur ce motif construit à partir des 2 blocs, tryptophane et tyrosine, vient ensuite se greffer un 3^{ème} bloc spécifique à chaque chromotype ; les pyridoacridines des chromotypes vert et bleu perdant ensuite (ou parallèlement) la chaîne éthylamine. A noter que les alcaloïdes minoritaires nouveaux caractérisés dans le cadre du WP1.3 s'intègrent parfaitement dans le schéma de biosynthèse avancé.

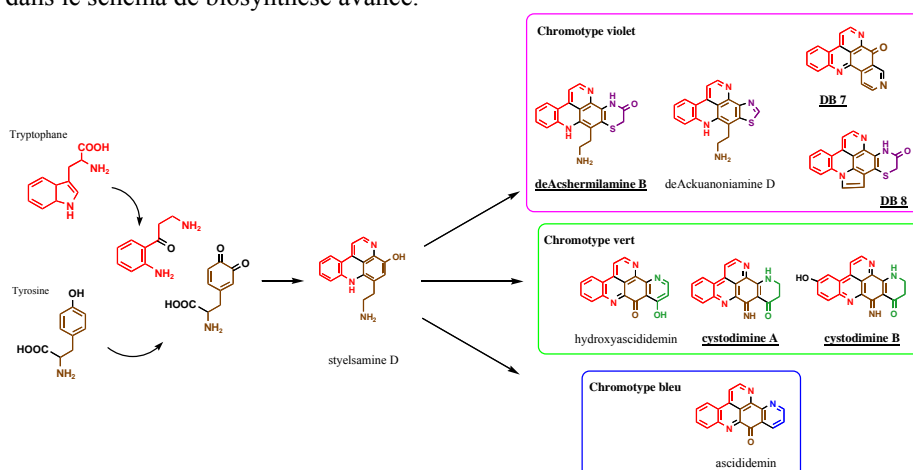


Schéma simplifié de biosynthèse proposé pour les pyridoacridines des 3 chromotypes de *Cystodytes dellechiaiei*.

Les noms de composés notés en gras et soulignés sont les composés nouveaux caractérisés lors de cette étude.

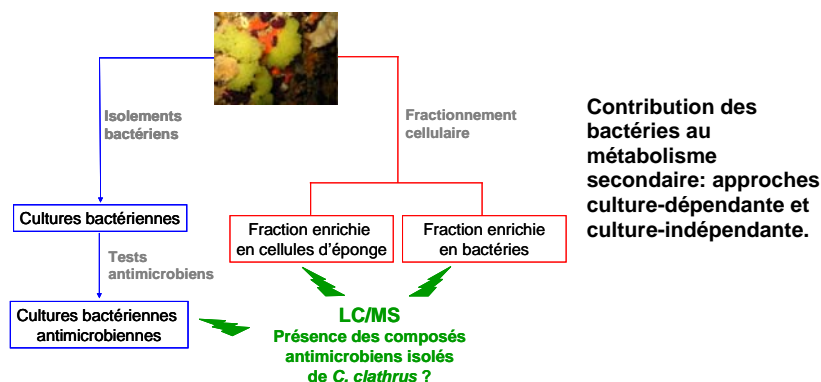
2.2 Contribution microbienne à la production de métabolites

Contribution des bactéries associées au métabolisme secondaire de *C. clathrus*

Les résultats obtenus le semestre précédent lors de l'étude microbiologique de *C. clathrus* suggéraient l'existence d'une association étroite entre un morphotype bactérien spiralé et la surface de certaines cellules de *C. clathrus* dont le type cellulaire reste à définir. Ces observations nous ont conduits à nous interroger sur la contribution de ces bactéries à la production des métabolites antimicrobiens. A partir d'un même échantillon de *C. clathrus* nous avons développé en parallèle 2 approches, afin de rechercher les métabolites d'intérêt

(clathridine, complexe zinc et clathridimine) par LC/MS dans les extraits $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MEOH}$ 1:1 obtenus, c'est à dire :

- une approche culture-dépendante consistant à isoler la flore bactérienne cultivable associée à *C. clathrus*.
- une approche culture-indépendante consistant à séparer les cellules d'éponges des bactéries par centrifugations différentielles.



L'approche culture-dépendante a conduit à l'isolement de 86 souches bactériennes qui ont toutes été testées contre *S. aureus*, *E. coli* et *C. albicans*. 11 d'entre elles, soit environ 13 %, se sont révélées actives contre *S. aureus*. Sur ces 11 souches, 9 sont également actives contre *C. albicans*. L'une d'entre elles a également montré une activité contre *E. coli*. L'affiliation phylogénétique de ces souches actives est en cours et leurs cultures ont été entreprises. L'approche culture-indépendante a permis d'obtenir par sédimentations différentielles des culots de cellules denses, de cellules légères et de bactéries. Nous avons exploré la comparaison des signatures chimiques de ces différentes fractions. La clathridine a été localisée dans la fraction de cellules denses d'éponge. Le complexe zinc, présent en faible quantité, a quant à lui, pu être localisé dans la fraction correspondant au milieu; ce composé est donc extracellulaire.

De plus, nous avons montré, par coloration au DAPI, la présence de bactéries spiralées, dans la fraction de cellules denses. Nous avons donc réalisé une expérience de digestion enzymatique ménagée (trypsinolyse) de cette fraction afin de séparer les cellules des bactéries qui y seraient attachées. **Nous avons ainsi pu mettre en évidence que la clathridine était bien produite par les cellules denses de *C. clathrus* et non par les bactéries associées à la surface de ces cellules.** La recherche par LC/MS des métabolites d'intérêt dans les extraits $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MEOH}$ 1:1 des différentes fractions est en cours. Elle devrait confirmer les résultats obtenus par comparaison des signatures chimiques.

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 achevé le traitement de deux séries temporelles pour les espèces *Oscarella tuberculata* et *O. lobularis*, et entamé le traitement d'une série pour une troisième espèce de ce genre, qui se trouve être nouvelle pour la science (description en cours). Parallèlement, la constitution d'une série temporelle pour la gorgone *Paramuricea clavata* se poursuit, avec dans le même temps la mise au point des techniques de dosage des composés majoritaires de cette espèce.
- L'analyse de tous les échantillons de *C. clathrus* prélevés à ce jour est en cours afin d'établir l'origine de la variation de production de la clathridimine, composé nouveau, encore jamais décrit dans la littérature. La comparaison des signatures chimiques de 4 échantillons différents de *C. clathrus* récoltés en automne à Marseille et cet été sur la Costa Blanca en Espagne a montré des différences importantes. Si les échantillons de Marseille contiennent de la clathridimine et de la clathridine en quantités égales et importantes, les échantillons d'Espagne ne contiennent pas de clathridimine (Figure 8). Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer ces variations. La recherche des facteurs influençant ces variations géographiques et/ou saisonnières est en cours. L'étude de l'échantillonnage saisonnier de *Clathrina clathrus* réalisé à Marseille se poursuit.
- Pour ce sous-objectif, comme pour les suivants, nous évaluons actuellement l'apport potentiel des approches de métabolomiques, qui permettraient d'étudier plus globalement les effets de différentes variables environnementales sur le métabolisme secondaire, parfois même sans avoir une identification précise des métabolites secondaires impactés.

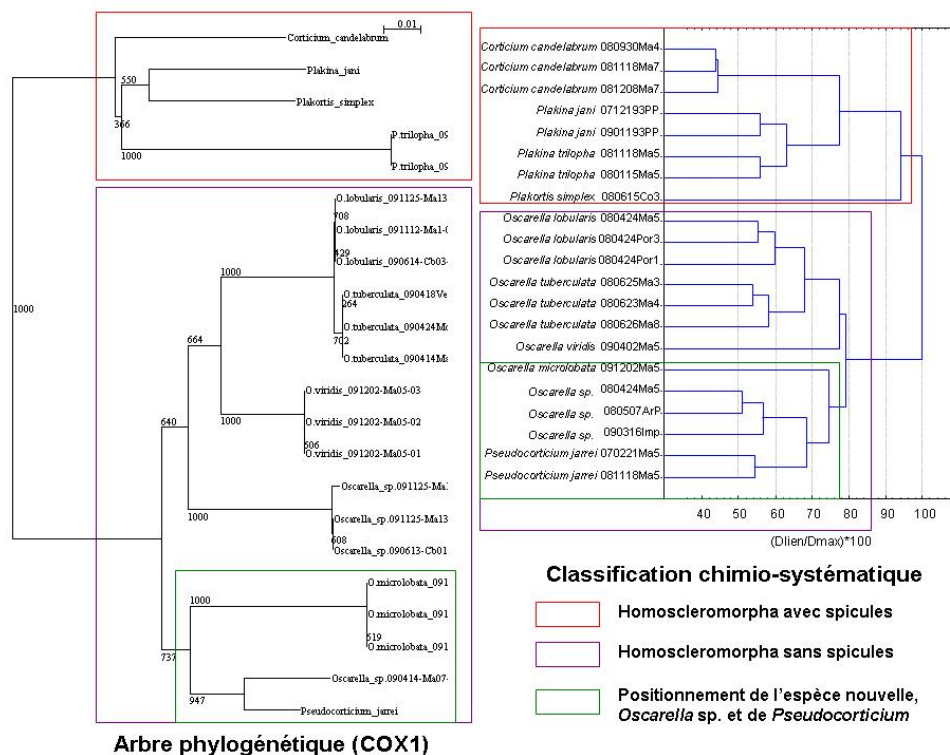
3.2 Influence d'un stress aigu sur le métabolisme secondaire et pertinence de certains métabolites comme bioindicateurs

Deux approches ont été conduites conjointement de manière à approfondir nos connaissances sur les effets d'un facteur de stress sur le métabolisme secondaire.

- Approche expérimentale : Nous avons procédé à une nouvelle série d'expériences de thermotolérance sur un nouveau modèle biologique, sensible au réchauffement des eaux en conditions naturelles, et dont on vient d'acquérir une bonne connaissance des métabolites secondaires majoritaires : *Parazoanthus axinellae*. Au cours de cette série d'expériences simulant des conditions de stress rencontrées dans la nature, on a réalisé une combinaison de mesures du niveau de l'activité des polypes du zoanthaire jusqu'à l'expression de leur toxicité naturelle. Les résultats de ces mesures sont en cours d'analyse.
- Approche *in situ* : pour des modèles dont on connaît les niveaux de base d'expression de la toxicité naturelle ou de certains métabolites secondaires, on s'est intéressé à l'influence de compétiteurs pour l'espace. Ce travail a été entamé pour l'éponge *Oscarella* sp. que l'on trouve le plus souvent en compétition avec d'autres invertébrés benthiques (Eponges, gorgones et bryozoaires ; stage de Master en cours) et pour la gorgone *Paramuricea clavata* colonisée par le zoanthaire *Savalia savaglia*. Avec cette approche, nous cherchons à voir s'il existe des patrons d'expression de métabolites secondaires variables en fonction de la nature de la compétition.

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*, *Hippospongia* et *Aplysina* sont en cours à l'aide des marqueurs microsatellites développés au cours des semestres précédents (5-DIMAR, 9-CEAB, 10-HCMR).
- Durant ce semestre, nous avons entamé pour les éponges du genre *Oscarella* l'étude d'une portion peu usitée de la cytochrome oxydase I (marqueur mitochondrial) potentiellement plus polymorphe que celle habituellement utilisée pour ce gène (Erpenbeck et al., 2006; Lopez-Legentil and Pawlik, 2009). Le polymorphisme ne s'est pas révélé suffisant pour caractériser la structure des populations, mais une corrélation des analyses de chimie avec des études de phylogénie et phylogéographie de cet ensemble a pu être réalisée. Cette approche permet de valider pour le groupe des Homoscleromorpha la chimio-systématique établie lors du semestre précédent (lien avec le WP1.5) et permet de reposer la question de la validité de la classification actuelle de ce groupe.



Confrontation des classifications moléculaires et chimiosystématiques pour les éponges Homoscleromorpha. Deux clades distincts sont mis en évidence, relançant l'hypothèse de deux familles distinctes dans ce groupe au lieu d'une seule. La position de l'éponge *Pseudocorticium* au sein des *Oscarella* est également énigmatique.

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 (1-UNSA)*

La base de données a été enrichies par de nouveaux onglets ayant trait aux activités biologiques des extraits et composés purs isolés. Les méthodes d'exportation des données en tableau excel permettent maintenant une utilisation optimale de cette base. L'association entre les sites de récoltes, les organismes prélevés et les molécules isolées a également été développée.

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
5-DIMAR	Lejeusne	Christophe	Post-Doctorant Université de Nice	01/10/2008	11 mois + 3 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 (Direction WP B. B. Banaigs). Un projet ANR Jeunes Chercheurs et un projet européen ont été déposés par 1-UNSA pour poursuivre la partie WP2 sur les études biosynthétiques de métabolites bioactifs produits par des éponges méditerranéennes.

Le comité de pilotage du programme se réunira au cours du semestre S7 pour envisager une solution à la non-réalisation des travaux du partenaire 6-UA.