

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 :

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 : Juin 2011

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 8 (1^{er} juillet – 31 décembre 2010)

N.B. 01 – 12 = Janvier à Décembre

Tableau des taches et des livrables du projet

Délivrables obtenus sur le semestre écoulé	2007		2008		2009		2010		Commentaires
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	
1.1 Protocole Standardisé d'échantillonnage		07							
1.1 Récolte des échantillons références	05 Ma	06 Ma 07 Ce	De 04 à 07 pour les sites Lb, Ma, Gr, Co, Es, Na	07, 12	06	12			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.
1.2 Protocole standardisé pour les analyses chimiques		12							Achévé
1.2 et 1.5 Rapport des résultats, analyse chimique comparative			06	12	En cours				Echantillons 2007 et 2008 acquis. 2009 en cours.
1.3 Résultats des screening biologiques						12	En cours		Bilan des premiers tests d'activité biologique. Tests biologiques du partenaire 6 en cours.
1.3 Communication des résultats, caractérisation des métabolites			06	12	06	12	En cours		Caractérisation de nouvelles molécules et tests d'activité biologique
1.4 Protocole expérimental d'évaluation de la bioactivité		12							Achévé
1.4 Communication des résultats	04	10	En cours						Publications scientifiques
1.5 Marqueurs chimiotaxonomiques				12	En cours				Plusieurs travaux réalisés, parfois en cours de publication, et d'autres en cours d'exploitation
2.1.1 Publication des métabolites isolés	En cours								Alimentation base de données au fur et à mesure des nouvelles caractérisations
2.2.1 Protocole de fractionnement de cellules d'éponges et des symbiontes associés			06	12					Eubactéries et cyanobactéries d'éponges
3.1 Protocoles Analytiques de séries d'échantillons		07							Achévé
3.1.1/3.1.2 Echantillonnages - Séries temporelles N°1, 2 & 3	06	12			06	12		12	Achévé pour tous les modèle
3.1.3 Echantillonnages –Séries spatiales N°1 & 2		09	04		06				Achévé

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	06	12	En cours		
3.2 Protocoles expérimentaux		11							Achévé
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				Achévé
3.3 Structure génétique					En cours				Achévé pour <i>Spongia</i> spp. Analyses préliminaires pour <i>Aplysina</i> spp.
3.4 Protocoles expérimentaux		11							
3.4 Résultats	En cours								
4.1.1 Page web temporaire et présentation de l'architecture de la base de données.		09							http://www.ecimar.org
4.2.1 Données préliminaires et information accessible via la base de données en ligne.			04	12					
4.2.2 Tests préliminaires et évaluation finale de la fonctionnalité de la base de données			04						
4.1.2. Tests finaux des deux serveurs et procédures de sauvegarde; communication des procédures et de l'accessibilité du site ECIMAR.		11	04						
4.3 Charte graphique et ergonomie		11		12	06	12	06		Achévé
4.4 Présentation au groupe ECIMAR des outils collaboratifs du site web		11	04	12	06				Achévé
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 : taxonomie et publication d'une espèce nouvelle.
 Objectif 1.2 : acquisition des signatures chimiques : Valorisation des approches de métabolomiques.
 Objectif 1.3 : isolement et caractérisation des métabolites secondaires : nouvelles molécules ; publications.
 Objectif 1.4 : évaluation des activités biologiques : Isolement de structures prometteuses en quantité pour tests supplémentaires.
 Objectif 1.5 : Publication de la chimio-systématique des Homoscleromorphes, nouvelle étude d'éponges du du genre *Hexadella*, proposition de l'emploi des signatures chimiques comme nouvel outil taxonomique.

WP2 : Production de métabolites cibles

- Objectif 2.1 : étude des processus synthétiques et biosynthétiques de métabolites cibles : Détermination de la voie de biosynthèse de l'oroidine produit par l'éponge *Agelas oroides* par des expériences *in vivo*.

WP3 : Influence de facteurs biotiques et abiotiques

- Objectif 3.1 : niveau de base d'expression des métabolites secondaires : Validation des techniques de dosage et approches métabolomiques. Variations temporelles du métabolisme secondaire et relation avec le métabolisme primaire. Mise en évidence de phénotypes métaboliques reliés au cycle de vie et à la toxicité naturelle d'un organisme. Test de la théorie ODT. Etude de la fonction biologique de certains composés.
 Objectif 3.2 : facteurs de stress et métabolites secondaires comme bioindicateurs : Etudes in-situ d'interactions inter-spécifiques, compétition pour l'espace et épibiose.
 Objectif 3.3 : relations génotype et chimiotype : Structures génétiques et phylogéographie (*Aplysina* spp. *Spongia* spp).
 Objectif 3.4 : influence de la symbiose sur la production de métabolites secondaires

WP4 : Site Internet et base de données

Construction et alimentation de la partie chimie et molécules de la base de données.

Ecarts « prévu-réalisé »

Nous avons reçu l'autorisation de poursuivre le programme sur le premier semestre 2011. Les travaux du partenaire 6 seront réalisés durant ce semestre.
 Principaux faits marquants du semestre y compris les difficultés éventuelles rencontrées et actions envisagées/engagées pour les surmonter
 Soutenance de trois thèses de doctorat (3-ICSN, 4-UPVD, 4/8-CEAB). Participation massive à des congrès internationaux. Publications des résultats.
 Utilisation des données obtenues dans le cadre d'un projet européen BAMMBO accepté pour financement au FP7 KBBE 2010 (1-UNSA)
 Problème de réalisation des tests par le partenaire UA-6. Ils seront effectués au semestre supplémentaire S9.

Actions de coordination du projet

Type	Date	Lieu	Participants	Objet
Assemblée générale – Colloque de restitution	20-22 Octobre 2010	Marseille	Participants ECIMAR et invités	Présentation des résultats et perspectives, discussion des suites à donner à ECIMAR

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

Le dernier semestre du programme sera consacré à la réalisation de tests d'activité et de rédaction d'articles sur les résultats obtenus. Soutenance de quatre thèses de doctorat (1-UNSA/5-DIMAR ; 1-UNSA/3-ICSN ; 2-MNHN). Des missions d'échantillonnage en Afrique du Nord (Algérie et Tunisie) sont prévues dans le programme de collaboration internationale ARCUS méditerranée et Région PACA.
 Un bilan d'ECIMAR sera effectué lors de l'AG du GDR BioChiMar avec les différents membres du comité de pilotage.

B - DELIVRABLES ET RESULTATS OBTENUS

- **Délivrables ECIMAR obtenus dans le semestre S8**

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

Objectif	Titre	Auteurs	Equipes	Date	Contexte
<i>Publications 2010, et en cours</i>					
WP3	Quantitative comparison of bacterial communities in two Mediterranean sponges	Noyer C., Hamilton A., Sacristan-Soriano O. and Becerro M. A.	8-CEAB	2010	Symbiosis
WP3	The biodiversity of the Mediterranean sea: estimates, patterns and threats	Coll M et 39 auteurs (X Turon parmi eux)	8-CEAB	2010	PLoS One
WP1, WP2, WP3	Characterization and localization of a hybrid non-ribosomal peptide synthetase and polyketide synthase gene from the toxic dinoflagellate <i>Karenia brevis</i>	López-Legentil S, Song BK, DeTure M, Baden DG	8-CEAB	2010	Marine Biotechnology
WP3	Climate change effects on a miniature ocean: the highly diverse, highly impacted Mediterranean Sea	Lejeusne C., Chevaldonné P., Pergent-Martini C., Boudouresque CF., Pérez T.	5-DIMAR	2010	Trends in Ecology and Evolution
WP3	In situ investigation of <i>Spongia officinalis</i> (Demospongiae) particle feeding: coupling flow cytometry and stable isotope analysis	Topçu N.E., Pérez T., Gregori G., Harmelin-Vivien M	5-DIMAR	2010	Journal of Experimental Marine Biology and Ecology
WP1, WP2	Cellular Localization of Clathridimine, an Antimicrobial 2-Aminoimidazole Alkaloid Produced by the Mediterranean Calcareous Sponge <i>Clathrina clathrus</i>	Roué, M.; Domart-Coulon, I.; Ereskovsky, A.; Djediat, C.; Pérez, T.; Bourguet-Kondracki, M.L.	2-MNHN, 5-DIMAR	2010	Journal of Natural Products
WP1, WP3	Oscarella balibaloï, a new sponge species (Homoscleromorpha: Plakinidae) from the Western Mediterranean Sea: cytological description, reproductive cycle and ecology	Pérez T., Ivanisevic J., Dubois M., Pedel L., Thomas O. P., Tokina D., Ereskovsky A.V.	1-UNSA, 5-DIMAR	En ligne 2011	Marine Ecology
WP1, WP3	Metabolic fingerprinting as indicator of biodiversity: an attempt to elucidate inter-specific relationships among Homoscleromorpha sponges	Ivanisevic, Thomas O.P., Lejeusne C., Chevaldonné P. Pérez T.	1-UNSA, 5-DIMAR	En ligne 2011	Metabolomics
WP2	Biomimetic synthesis of marine pyrrole-2-aminoimidazole and guanidinium alkaloids,	J. Appenzeller et A. Al-Mourabit,	3-ICSN	2011	Editor E. Poupon and B. Nay of Wiley-VCH « Biomimetic Organic Chemistry »
WP3	Exploring the links between natural products and bacterial assemblages in the sponge <i>Aplysina aerophoba</i>	Sacristán-Soriano O., Banaigs B., Casamayor E., Becerro M. A.	8-CEAB 4-UPVD	2011	Applied and Environmental Microbiology
WP1	New pyridoacridine alkaloids from the purple morph of the ascidian <i>Cystodytes dellechiaiei</i>	Bry D., Banaigs B., Long C. and Bontemps N.	4-UPVD	Sous presse	Tetrahedron Letters
WP1, WP2, WP3	Patterns of chemical diversity in the Mediterranean sponge <i>Spongia lamella</i>	Noyer C., Thomas O. P. and Becerro M. A.	8-CEAB	Sous presse	PLoS one
WP2	Biosynthesis, Asymmetric Synthesis, and Pharmacology Including Cellular Targets of the Pyrrole-2-Aminoimidazole Marine Alkaloids	A. Al-Mourabit, M. A. Zancanella, S. Tilvi, and. Romo, D.	3-ICSN	Sous presse	Natural Products Report
WP1	Citharoxazole from the Mediterranean Deep-Sea Sponge <i>Latrunculia</i> (Biannulata) citharistae	Genta-Jouve G., Francezon N., Puissant A., Auberger P., Vacelet J., Pérez T., Fontana A., Al Mourabit A, Thomas O. P.	1-UNSA, 3-ICSN, 5-DIMAR	Soumis	Magnetic Resonance in Chemistry

WP2	Revisiting Oroidin Biosynthesis	Genta-Jouve G., Cachet N., ... Al Mourabit A, Thomas O. P.	1-UNSA, 3-ICSN	Soumis	Chemical Communications
WP1, WP2, WP3	Linking diversities in the Mediterranean sponge <i>Spongia lamella</i>	Noyer C. and Becerro M. A.	8-CEAB	Soumis	Hydrobiologia
WP1, WP3	Diversity and spatial distribution of sponge-associated bacteria in <i>Spongia lamella</i>	Noyer C., Casamayor E. O., Hamilton A. and Becerro M. A.	8-CEAB	Soumis	Applied and Environmental Microbiology
WP3	Population genetics of the bath sponge <i>Spongia lamella</i> in the Western Mediterranean Sea	Noyer C., Perez-Portela R. and Becerro M. A.	8-CEAB	Soumis	Conservation Genetics
WP1, WP3	Lysophospholipids in the Mediterranean sponge <i>Oscarella tuberculata</i> : seasonal variability and putative biological role	Ivanisevic J., Pérez T., Barnathan G., Thomas O. P.	1-UNSA, 5-DIMAR	Soumis	Journal of Chemical Ecology
Communications à congrès –S8					
WP1	A reliable marine antifouling bioassay based on <i>in vitro</i> adhesion: comparison of the response of five pioneer bacteria	Camps M., Briand J.-F., Dombrowsky L., Culioli G., Bazire A. & Blache Y.	7-USTV	26-29 Juillet 2010	Communication orale 15 th International Congress on Marine Corrosion and Fouling, Newcastle, UK
WP1	Drugs from the sea: Reality or dream ?	Thomas O. P.	1-UNSA	30-31 Aout 2010	Communication orale Les rendez-vous de Concarneau EuropaBio Blue Technology
WP2, WP3	Photosynthetic symbionts of the Mediterranean sponge <i>Petrosia ficiformis</i> : Characterization and implication in the prevention of fouling	Bendaoud A., Briand J.-F., Ortalo-Magné A., Dombrowsky L., Pérez T., Barani A., Grégori G. & Blache Y.	5-DIMAR 7-USTV	26-29 Juillet 2010	Poster 15 th International Congress on Marine Corrosion and Fouling, Newcastle, UK
WP1, WP3	Variability in the production of alkaloids by the red gorgonian <i>Paramuricea clavata</i> .	Pérez N., Culioli G., Pérez T., Thomas O., Blache Y.	1-UNSA 5-DIMAR 7-USTV	1-4 Août 2010	Communication orale 26th annual meeting of the International Society of Chemical Ecology, Tours, France
WP1, WP3	Metabolic fingerprinting as an indicator of biodiversity: towards understanding inter-specific relationships among <i>Homoscleromorpha</i> sponges	Ivanisevic I. Thomas O., Lejeune C., Chévaldonné P., Pérez T.	1-UNSA 5-DIMAR	1-4 Août 2010	Communication orale 26th annual meeting of the International Society of Chemical Ecology, Tours, France
WP1, WP3	Etude des fluctuations de l'expression métabolique de la gorgone rouge méditerranéenne <i>Paramuricea clavata</i> .	Pérez N., Culioli G., Pérez T., Thomas O., Blache Y.	1-UNSA 5-DIMAR 7-USTV	2-4 septembre 2010	Communication orale Colloque Ecologie 2010Montpellier, France
WP3	Bioactivity and secondary metabolite variation in relation to biotic and abiotic factors: chemical ecology study of a new Mediterranean <i>Oscarella</i> species (Porifera, Homoscleromorpha).	Ivanisevic J., Thomas O.P., Pédel L., Ereskovsky A., Pérez T.	1-UNSA 5-DIMAR	2-4 septembre 2010	Communication orale Colloque Ecologie 2010Montpellier, France
WP1, WP2, WP3	Médiateurs chimiques d'une ascidie méditerranéenne	D. Bry, S. Lopez-Legentil, A. Simon-Levert, X. Turon, N. Bontemps, B. Banaigs	8-CEAB 4-UPVD	2-4 septembre 2010	Communication orale Colloque Ecologie 2010Montpellier
WP1, WP2, WP3	Temporal and intraindividual variation of secondary metabolites in sponges : avarol production in <i>Dysidea avara</i>	De Caralt S, Bry D, Bontemps N, Turon X, Uriz MJ, Banaigs B	8-CEAB 4-UPVD	6-10 September 2010	Poster XVI Iberian Symposium of Marine Biology Alicante, Spain
WP3	Ascidian-Cyanobacteria symbiosis	López-Legentil S, Song BK, Pawlik JR, Turon X	8-CEAB	6-10 September	Poster XVI Iberian Symposium of Marine Biology Alicante, Spain
WP3	Sponge islands in an algal sea: associated fauna of two Mediterranean sponges	Abdo D. A., Sacristan-Soriano O. and Becerro M. A.	8-CEAB	20-24 Septembre 2010	Communication orale 2010 World Sponge Conference Girona, Spain
WP1, WP2, WP3	Genetic, bacterial, and chemical diversity of the Mediterranean sponge <i>Spongia lamella</i>	Noyer C., Hamilton A., Thomas O. P. and Becerro M. A.	8-CEAB	20-24 Septembre 2010	Poster 2010 World Sponge Conference Girona, Spain

WP1, WP2, WP3	Variability of natural products in the sponge <i>Aplysina aerophoba</i> over a two-year survey	Sacristan-Soriano O., Banaigs B. and Becerro M. A.	8-CEAB 4-UPVD	20-24 September 2010	Poster 2010 World Sponge Conference Girona, Spain
WP2, WP3	Photosynthetic symbionts of the Mediterranean sponge <i>Petrosia ficiformis</i> : characterization and implication in the prevention of fouling.	Bendaoud A., Briand J.F., Ortalo-Magne A., Dombrowsky L., Perez T., Barani A., Gregori G., Blache Y.	5-DIMAR 7-USTV	20-24 September 2010	Communication orale 2010 World Sponge Conference Girona, Spain
WP3	Bioactivity and secondary metabolite variation in relation to biotic and abiotic factors: chemical ecology study of a new Mediterranean <i>Oscarella</i> species (Porifera, Homoscleromorpha).	Ivanisevic J., Thomas O.P., Pédel L., Ereskovsky A., Dubois M., Pérez T.	1-UNSA 5-DIMAR	20-24 September 2010	Communication orale 2010 World Sponge Conference Girona, Spain
WP1, WP3	Metabolic fingerprinting as an indicator of biodiversity: towards understanding inter-specific relationships among Homoscleromorpha sponges.	Ivanisevic J., Thomas O., Lejeune C., Chevaldonne P., Perez T.	1-UNSA 5-DIMAR	20-24 September 2010	Poster 2010 World Sponge Conference Girona, Spain
WP3	Temperature effects in reproduction of Mediterranean sponges	Ereskovsky A., Pérez T.	5-DIMAR	20-24 September 2010	Poster 2010 World Sponge Conference Girona, Spain
WP2, WP3	Chemical and microbial investigations of the calcareous mediterranean sponge <i>Clathrina clathrus</i>	Roue M., Domart-Coulon I., Ereskovsky A., Pérez T., Bourguet-Kondracki M.L.	2-MNHN 5-DIMAR	20-24 September 2010	Poster 2010 World Sponge Conference Girona, Spain
WP2	Biosynthetic study of the PIA key member oroidin	Genta-Jouve G., Cachet N., Jeffree R., Teyssié J.-L., Al Mourabit A., Thomas, O. P.	1-UNSA 3-ICSN	20-24 September 2010	Communication orale 2010 World Sponge Conference, Girona, Spain
WP2	Toward the total synthesis of the immunosuppressive palau'amine	Al-Mourabit A.	3-ICSN	6-10 October 2010	Conférence invitée 11th Eurasia Conference on Chemical Sciences (EuAsC2S-11), Jordan
WP1, WP2	Bacterial and chemical diversity in calcareous sponges: ecological approaches	Bourguet-Kondracki M-L.	2-MNHN	Novembre 2010	Communication orale Taiwan-France Conference "Biodiversity and Ecophysiology of Marine Organisms", Keelung, Taiwan
Documents techniques, Thèses et Rapports – S8					
WP1, WP2	Etudes chimique et bactérienne de l'éponge <i>Phorbis tenacior</i>	Fanny Descarréga	2-MNHN	Septembre 2010	Rapport de Technicien Supérieur de la Mer, Filière Génie Biologique et Productions Marines.
WP1, WP3	Alcaloïdes isoxazoliques chez deux espèces d'éponges Méditerranéennes : <i>Aplysina aerophoba</i> et <i>Aplysina cavernicola</i> .	Charline Brissard	4-UPVD	Septembre 2010	Rapport de Master 2, UPVD
WP1, WP2	Métabolites d'éponges marines de la famille de la Palau'amine : isolement et synthèse biomimétique	Clarisse Lejeune	3-ICSN	Novembre 2010	Thèse de doctorat, U. Paris XI
WP1, WP2, WP3	Relationship between genetic, bacterial and chemical diversity of the Mediterranean sponge <i>Spongia agaricina</i>	Charlotte Noyer	8-CEAB	Décembre 2010	Thèse de doctorat, U. Barcelone
WP1, WP2	Métabolites secondaires d'invertébrés marins : empreintes chimiques, caractérisation structurale et biosynthèse	Delphine Bry	4-UPVD	Décembre 2010	Thèse de doctorat, UPVD
Transfert des connaissances / Actions pôle mer PACA – S8					
WP1 et WP2	Production durable d'actifs marins pour une valorisation en thérapeutique. D'ECIMAR à BAMMBO.	Olivier P. Thomas	1-UNSA, 7-USTV	Décembre 2010	Réunion Thème 4 à Toulon
WP1, WP2, WP3	Sponges: ancient animals, new challenges	Maria Uriz, Mikel Becerro, Manuel Maldonado, Xavier Turon	8-CEAB	Septembre 2010	Organization of the VIII World Sponge Conference

- **Présentation des résultats ECIMAR obtenus dans le semestre S8**

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

Le volet échantillonnage est terminé. Un suivi temporel de quelques espèces a été réalisé pour les études liées au WP2.

1.2 Evaluation de la chimiodiversité

Les derniers profils chimiques ont été réalisés et sont accessibles dans la base de données ECIMAR.

1.3 Isolement et caractérisation de métabolites bioactifs

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

- L'étude chimique de cultures liquides de la souche bactérienne *Pseudoalteromonas* sp. 1Cc-11, que nous avons trouvé associée de façon persistante avec l'éponge *Clathrina clathrus*, a été finalisée (2-MNHN). Les trois dicétopipérazines précédemment isolées ont été identifiées. Leurs configurations absolues ont été déterminées après hydrolyse acide et analyse comparative par HPLC chirale. Nous avons pu identifier les dicétopipérazines isolées de *Pseudoalteromonas* sp. comme étant les cyclo-(L-Pro-Gly), cyclo-[(trans-L-hydroxy-Pro)- L-Leu] et cyclo-[(trans-L-hydroxy-Pro)- L-Phe] (Figure 1).



Figure 1. Dicétopipérazines isolées de *Pseudoalteromonas* sp associé à *Clathrina clathrus*

Cette étude chimique a également conduit à l'isolement des glycérolipides précédemment isolés de *C. clathrus*. Aucun des composés isolés de la souche *Pseudoalteromonas* sp. 1CC-11 a révélé une activité antimicrobienne.

- La carte d'identité chimique des trois chromatypes, bleu, vert et violet, de l'ascidie *Cystodytes dellechiajei* a été établie (4-UPVD). Au bilan, une vingtaine de pyridoacridines ont été caractérisées dont trois nouvelles dans le chromatype violet, la *N*-déacétylshermilamine B, la 13-didéméthylaminocycloshermilamine D et la déméthyldéoxyamphimédine.

La déméthyldéoxyamphimédine est une pyridoacridine angulaire, régioisomère de l'ascididémine. La structure a été confirmée par transformation chimique à partir de la styelsamine B (schéma 1).

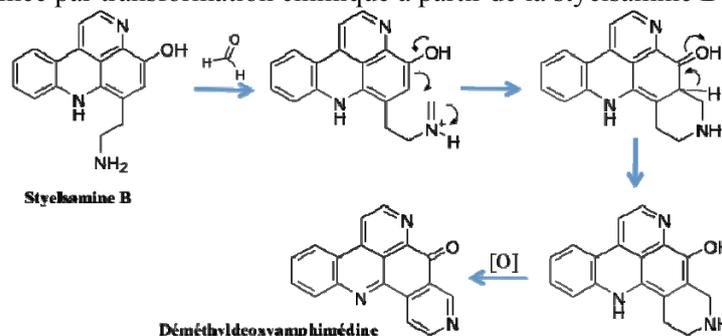


Schéma 1. Conversion chimique de la styelsamine B en déméthyldéoxyamphimédine

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

- De nouvelles saponines triterpéniques ont été isolées d'une éponge de Ceuta en cours d'identification (figure 2) (Publication en préparation). Cette espèce absente des côtes française n'est présente que dans la zone de transition qu'est le détroit de Gibraltar. Ces molécules sont connues pour être des marqueurs taxonomiques de l'ordre Astrophorida.

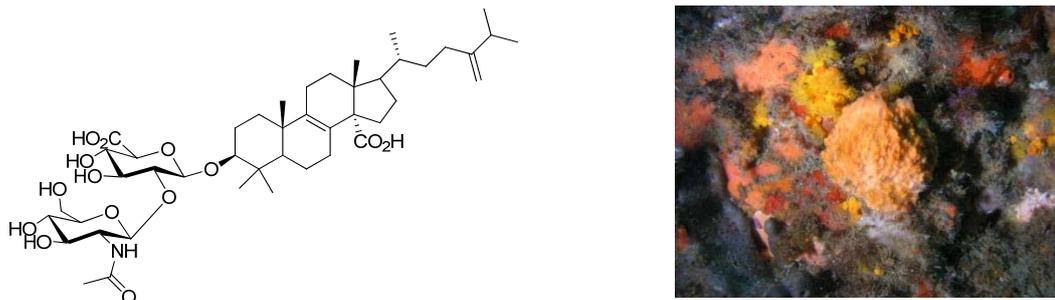


Figure 2. Saponines isolées d'une éponge massive de Ceuta

1.4 Evaluation des activités biologiques

Ce volet a été particulièrement développé au cours de ce semestre en particulier pour les activités antibiofilm.

- Les activités anti-adhésion vis-à-vis de plusieurs biofilms de bactéries marines (D41 : *Pseudoalteromonas* sp., TC8 : *Pseudoalteromonas* sp., 4M6 : α -Protéobactérie [Rhodobactérie]) ont été évaluées pour les composés isolés de *Paramuricea clavata* et *Savalia savaglia* (7-USTV). Concernant les molécules isolées de *P. clavata*, seules trois molécules ont présenté une activité antiadhésion supérieure à 70% à 500 μ M sur la souche D41. Parmi ces trois composés, la 2-bromo-N-méthyltryptamine est une molécule particulièrement intéressante car elle présente une bonne activité vis-à-vis des trois souches testées. Cependant, son activité antibiofilm n'a pu être évaluée à cause des faibles quantités disponibles de cette molécule. Des travaux de synthèse sont ainsi envisagés. Par contre, les EC_{50} de la bufoténine ($EC_{50} = 40 \pm 15 \mu$ M) et de la 1,3,7-triméthylisoguanine ($EC_{50} = 35 \pm 20 \mu$ M) sont semblables et présentent une activité en antiadhésion supérieure à celle de la majorité des biocides organiques commerciaux utilisés dans le domaine de l'antifouling (Seanine, Préventol,...) mais inférieure à celle du TBTO ($EC_{50} \approx 10 \mu$ M). Les métabolites secondaires précédemment isolés du zoanthaire *Savalia savaglia* ont montré qu'ils étaient plus actifs que ceux issus de *P. clavata* puisque, à l'exception de la zooanémone, tous les produits testés témoignent d'une forte activité à 500 μ M sur, au minimum, deux des trois souches utilisées. La 3'-bromotyrosine, de part la simplicité de sa structure et les valeurs d'inhibition obtenues sur l'ensemble des souches, semble prometteuse pour une utilisation en tant qu'agent antibiofilm. Des travaux d'étude des relations structure/activité sont envisagés sur des analogues synthétiques et commerciaux de ce composé.

1.5 Métabolites secondaires et marqueurs chimio taxonomiques ou environnementaux

- Après nos premières applications à la classification des éponges, nous avons proposé l'utilisation systématique des signatures métaboliques pour des descriptions d'espèces nouvelles parmi lesquelles les caractères morphologiques traditionnels sont absents (Pérez et al. 2011), pour mettre en évidence des divergences chimiques parmi différents morphotypes (cas du zoanthaire *Parazoanthus axinellae*) et dans certains cas mettre en évidence des espèces cryptiques (cas des éponges *Hexadella* avec la description en cours de deux espèces nouvelles).

WP 2 : Production des métabolites cibles

Responsable : Ali AL-MOURABIT (3-ICSN)

2.1 Processus synthétiques et biosynthétiques de métabolites cibles

• Dans le but de les préparer pour en étudier les propriétés biologiques, la synthèse biomimétique des alcaloïdes de type pyrrole-2-aminoimidazoles (3-ICSN) a permis, pour la première fois, l'accès à des molécules de type nagélamides inhibitrices de kinases. C'est une dimérisation de l'oroidine admise comme précurseur universel des pyrrole-2-aminoimidazoles (Schéma 2). La mise en œuvre de la réaction a permis de vérifier le bien fondé de notre hypothèse de biogénèse. Il est important de remarquer que le monomère constitutif de ces molécules n'est autre que l'oroidine qui fait l'objet d'études biosynthétiques par marquage radioactif *in vivo* avec le partenaire 1-UNSA. Les efforts de synthèse biomimétique et de biosynthèse continuent conjointement.

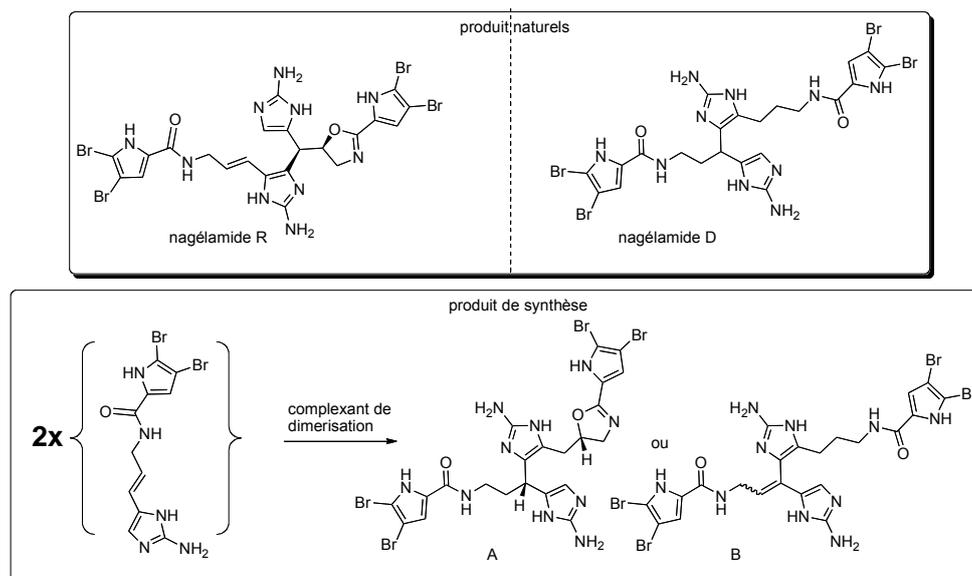


Schéma 2 : Dimérisation de l'oroidine en nagélamide.

• Alors que la proline avait été mise en évidence comme précurseur de la partie pyrrole de l'oroidine précédemment, l'origine de la partie aminoimidazole restait soumise à plusieurs hypothèses. Le même protocole sur l'éponge *Axinella damicornis*, utilisant des précurseurs acides aminés radiomarqués au ^{14}C a mis en évidence une métabolisation importante de la lysine en oroidine. L'ornithine et l'arginine conduisant à une oroidine plus faiblement marquée pourrait s'expliquer par le cycle de l'urée liant ces différents acides aminés à la proline alors que l'histidine ne conduit à aucun marquage significatif et l'exclut donc de la biosynthèse de ce métabolite secondaire (Figure 3). Notre étude suggère pour la première fois par une expérience *in vivo* que la lysine est précurseur de la partie aminimidazole de l'oroidine.

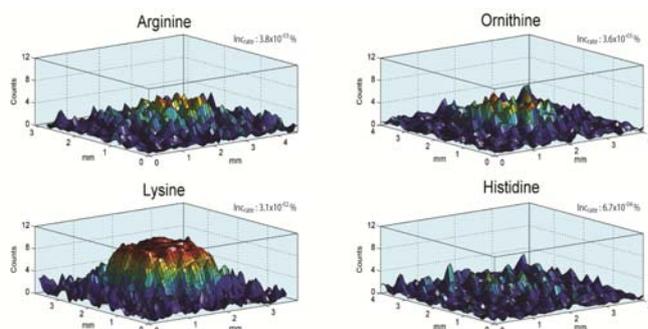


Figure 3. Autoradiographie au beta imager d'une même quantité d'oroidine déposée sur une plaque d'HPTLC en utilisant 4 précurseurs acides aminés radiomarqués. La lysine est l'acide aminé conduisant à un marquage nettement plus significatif.

• Selon la nouvelle hypothèse biosynthétique générale proposée par le partenaire 4-UPVD pour les pyridoacridines, l'assemblage de quatre précurseurs (tryptophane, tyrosine, kynuramine et

dopaquinone) permettraient la formation d'intermédiaires biosynthétiques polycycliques centraux dont les styelsamines isolées par ce même partenaire. Ces dernières présentent la réactivité requise pour se condenser avec la cystéine, la cytamine ou l'homo-sérine et donner les groupes penta- et hexacycliques présent dans l'un et/ou l'autres des trois chromatopes de l'ascidie *Cystotydes dellechiajei*. Cette hypothèse associée aux signatures chimiques établies dans le WP1 ont ensuite été mises en application pour aborder des expériences de biosynthèse sur des extraits acellulaires de l'ascidie *C. dellechiajei*. Après la mise au point de la méthode de quantification optimale par HPLC, l'incubation de l'extrait acellulaire a permis d'observer une nette augmentation de la production du métabolite majoritaire du chromatope bleu, l'ascididémnine. Les expériences utilisant l'incubation de l'extrait acellulaire du chromatope violet ont conduits à la production de styelsamine D. Ce résultat est particulièrement intéressant puisqu'il ouvre la voie à des recherches sur l'origine de la production de ces métabolites, leurs précurseurs et les systèmes enzymatiques.

2.2 Contribution microbienne à la production de métabolites

- Travaux réalisés sur l'éponge calcaire *Clathrina clathrus* et ses bactéries associées

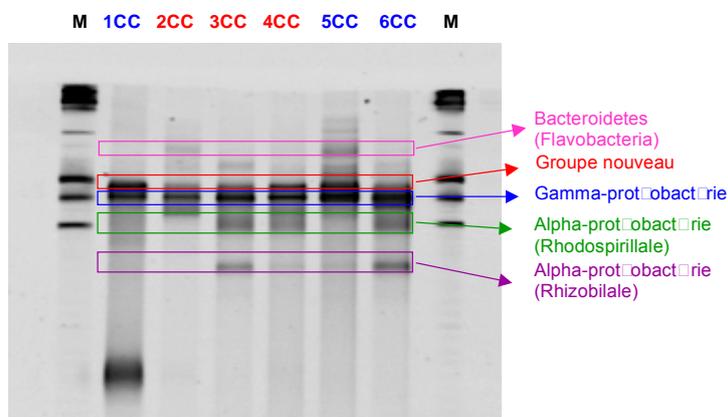
Les études réalisées par le partenaire 2-MNHN sur la contribution des bactéries associées à la production des métabolites secondaires isolés de *C. clathrus* ont suivi deux approches en parallèle : une approche culture-dépendante et une approche culture-indépendante.

- La première approche consistait à séparer les cellules d'éponges des bactéries par centrifugations différentielles et à rechercher la localisation cellulaire des composés antimicrobiens. La détection des glycérolipides dans la fraction bactérienne, suggère leur possible origine microbienne.

- La deuxième approche a consisté à isoler et identifier la flore bactérienne cultivable associée à l'éponge. Les résultats ont révélé que la flore bactérienne cultivable était dominée par les Gamma-protéobactéries comme c'est souvent le cas lors du développement d'approches culture-dépendantes chez les spongiaires. Parmi ces Gamma-protéobactéries, le groupe des Altéromonadales domine avec notamment le genre *Pseudoalteromonas* auquel nous nous sommes intéressés d'un point de vue chimique. On retrouve également parmi la flore bactérienne cultivable associée des Alpha-protéobactéries appartenant au genre *Pseudovibrio* considéré par de nombreux auteurs comme étant un membre important voire spécifique de la communauté microbienne associée aux éponges.

- Par ailleurs, les expériences de DGGE (collaboration avec l'équipe 4/8-CEAB), visant à caractériser les souches dominantes de la flore totale, réalisés sur 6 échantillons de *C. clathrus* ont été analysés. Le faible nombre de bandes observées tend à indiquer que nous sommes en présence d'une éponge qualifiée de « Low Microbial Abundance Sponge ». Nous avons par affiliation phylogénétique des bandes de DGGE excisées pu identifier cinq groupes (Figure 4). Les pourcentages de similitude de séquences étant aux alentours de 92%, nous n'avons pu identifier ces bactéries que jusqu'à l'ordre. Une bande de DGGE cependant n'a pas pu être affiliée phylogénétiquement puisque la séquence du gène de l'ARNr 16S présente 85% de similarités de séquence avec à la fois des Firmicutes et des Protéobactéries, suggérant l'existence d'un nouveau groupe bactérien au sein du mésophyle de *C. clathrus*.

Figure 4. Diversité phylogénétique des membres dominant de la flore bactérienne associée à *C. clathrus*. Gel de DGGE réalisé à partir de 3 échantillons de *C. clathrus* collectés en automne (bleu : 1CC, 5CC et 6CC) et 3 échantillons de *C. clathrus* collectés en été (rouge : 2CC, 3CC et 4CC).



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

Etant donné que le métabolisme secondaire peut être en compétition avec le métabolisme primaire pour les précurseurs chimiques (substrats, co-facteurs), les métabolites secondaires sont généralement considérés comme résultant d'un coûteux compromis au niveau biochimique (McClintock & Baker 2001). La théorie de l'ODT est des modèle d'allocation d'énergie les plus connus dans lequel l'allocation aux défenses est réalisée de manière à maximiser la fitness des organismes et en relation avec des fonctions biologiques primaires telles que la croissance, le maintien de l'homéostasie et la reproduction. Ces fonctions biologiques primaires sont principalement déterminées par des fluctuations saisonnières de paramètres environnementaux (voir plus haut). Ainsi, on pouvait supposer que la bioactivité de mes modèles d'éponges et leur production de métabolites secondaires varieraient en fonction d'un compromis avec les fonctions biologiques primaires, ou en réponse à des facteurs biotiques ou abiotiques. Nous avons évalué l'influence de la température, du cycle de vie et de la présence de compétiteurs pour l'espace, et testé la théorie ODT en utilisant la bioactivité de l'éponge comme indicateur du métabolisme secondaire, et l'effort de reproduction comme indicateur du métabolisme primaire. Les variations temporelles de ces deux indicateurs métaboliques à fort coût énergétique sur la durée du programme ECIMAR sur trois éponges *Oscarella*. La bioactivité des extraits bruts a montré une variation significative au cours du temps, et la température n'apparaît pas comme le facteur qui explique le plus cette variabilité. Une diminution importante de la bioactivité généralement observée en période d'embryogénèse et de développement larvaire. L'analyse des signatures métaboliques a révélé une variation des métabolites majoritaires et a ainsi permis la distinction de phénotypes métaboliques relié à des gammes de bioactivité (Fig. 5). Un phénotype semble plus exprimé lorsqu'*Oscarella* est en compétition avec d'autres éponges. Il semblerait donc que l'optimisation de l'allocation des ressources, clairement observée pendant la période de reproduction et probablement influencée par l'interaction de facteurs biotiques et abiotiques, détermine la variation de bioactivité observée (1-UNSA, 5-DIMAR).

Dans le cas d'*O. tuberculata*, nous avons décrit deux lysosphospholipides, un lyso-PAF ("platelet activating factor") et un lysophosphorylethanolamine C20:2, des molécules connues pour être des molécules de signal importantes chez les métazoaires. Les LPL sont largement distribués chez les invertébrés marins, mais leur rôle physiologique a rarement été étudié (Ivanisevic et al. soumis). L'étude des variations saisonnières des deux composés a été entamée pour mieux comprendre le rôle des LPL dans le cycle de vie de l'éponge. Les niveaux d'expression des deux composés se sont avérés corrélés dans le temps, avec de forts niveaux d'expression en été et les plus faibles en hiver. Un plus fort niveau d'expression des LPL a été détecté dans les éponges en reproduction, et particulièrement dans les femelles lors du pic de reproduction, à savoir pendant le développement larvaire. Ces composés sont beaucoup plus faiblement exprimés chez les males, et encore moins dans les éponges hors reproduction. Ces résultats indiquent un rôle évident de ces LPL dans le fonctionnement du système reproducteur et dans le développement larvaire, et suggèrent qu'ils jouent le rôle de médiateurs dans les processus d'embryogénèse et de morphogénèse de l'éponge. Ces molécules, dont les variations d'expression ne suivent pas l'ODT, semblent avoir un rôle plus physiologique qu'écologique (1-UNSA, 5-DIMAR).

Dans le cadre de l'évaluation des fluctuations de l'expression métabolique de *P. clavata*, une méthode chromatographique complète a été mise au point afin de doser les principaux métabolites polaires produits en proportions importantes par cet organisme marin.

Pour cela, différentes études ont été menées et ont consisté en :

- l'optimisation de la méthodologie d'extraction (sélection et optimisation des volumes des solvants utilisés, optimisation du débit d'extraction,...),
- l'optimisation de la méthode chromatographique (sélection d'une colonne adaptée aux produits polaires, utilisation et optimisation d'un gradient ternaire,...)

- la validation de la méthode chromatographique (détermination du domaine de linéarité, de la limite de détection (LOD), ...).

Produits	Domaine de linéarité ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	r^2	LOD ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	Reproductibilité (RSD%)
Diméthylisoguanine	20 - 200	0,999	3,1	10,4	3,5
Bufoténine	10 - 100	0,997	2,3	7,5	3,6
Triméthylisoguanine	25 - 250	0,998	2,5	8,2	3,2
N-Méthyltryptamine	10 - 100	0,986	3,0	9,8	2,6
2-bromo-N-méthyltryptamine	5 - 75	0,992	1,0	2,4	4,4

Cette méthode a ensuite été utilisée afin d'étudier l'influence de différents paramètres sur la production métabolique de *P. clavata* : variation à micro-échelle (variation intra- et intercoloniale), variation avec la profondeur et influence de la compétition (cf. WP 3.2).

Les résultats obtenus tendent à montrer que l'effet sur la production métabolique diffère selon le paramètre testé. Ainsi, la taille des colonies semble influencer la production de métabolites tels que la diméthylisoguanine ou la triméthylisoguanine qui sont des produits de dégradation de l'ADN. La taille des colonies étant directement corrélée à l'âge des gorgones, il semble logique que la quantité de produits de dégradation de l'ADN soit plus importante dans les colonies de grandes tailles. A l'inverse, la profondeur semble plutôt influencer la production majoritaire de métabolites indoliques.

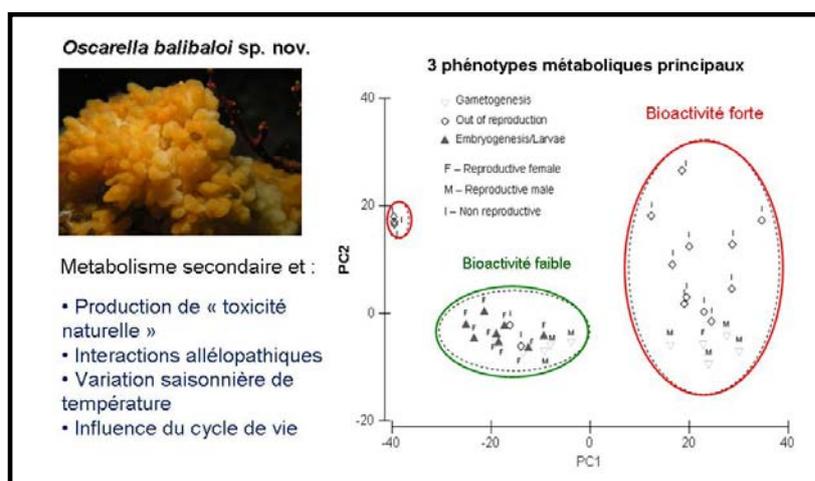


Figure 5 : Variation saisonnière du métabolisme secondaire de l'éponge *Oscarella balibaloï* Pérez et al. 2011 en relation avec le cycle de reproduction. Alors que la composition qualitative du métabolome de l'éponge est très stable, le suivi des niveaux d'expressions selon une approche métabolomique montre l'existence de trois phénotypes métaboliques : deux à bioactivité élevée, correspondant à des éponges males à faible effort de reproduction ou à des individus non reproductifs, et un à faible bioactivité correspondant aux éponges à fort effort de reproduction, majoritairement femelles. Un phénotype à forte bioactivité correspond à des individus que l'on trouve majoritairement associés à l'éponge *Aplysina cavernicola*.

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

La méthode de dosage des métabolites majoritaires de *P. clavata* a permis de tester l'influence du stress provoquée par la colonisation du zoanthaire *Savalia savaglia*, une espèce dont le cycle de vie passe obligatoirement par une installation sur une gorgone vivante, sa colonisation et progressive jusqu'à la mort de la colonie hôte. La présence du zoanthaire compétiteur *S. savaglia* était donc supposée provoquer une diminution de la *fitness* de *P. clavata*. A proximité des zones de nécroses on a observé chez *P. clavata* une diminution (i) du rendement d'extraction (ii) de la proportion des métabolites dosés dans l'extrait (voire une disparition dans le cas de la triméthylisoguanine). Cette observation laisse supposer un détournement de la machinerie cellulaire au profit de métabolites de défense ou tout simplement du métabolisme primaire. Néanmoins, lors des analyses chromatographiques effectuées il n'a pas été possible de mettre en évidence des mécanismes de défense chez *P. clavata* car, soit la gorgone ne synthétise pas de composés spécifiques de défense suite

à une agression par *S. savaglia*, soit ceux-ci ne sont pas détectables avec la méthode chromatographique utilisée (hors gamme de polarité, sensibilité de la méthode insuffisante).

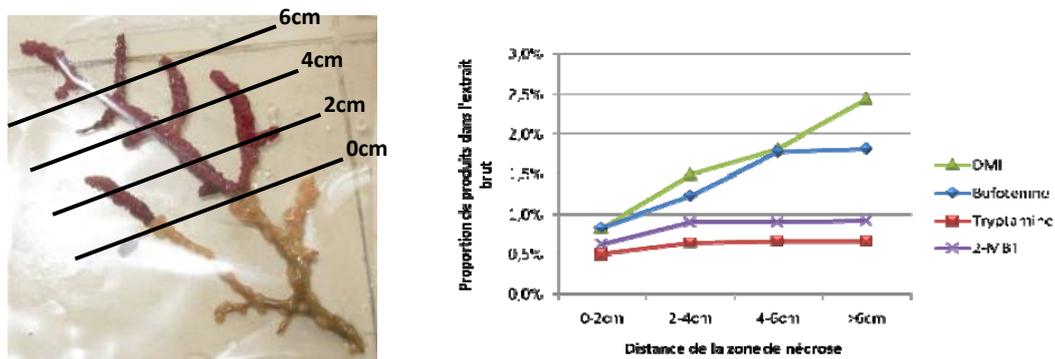


Figure 6 : Etude d'un gradient d'expression des métabolites secondaires de *P. clavata* en compétition avec le zoanthaire *S. savaglia*.

De la même manière, la compétition entre l'éponge *Dysidea avara* et plusieurs types d'organismes a été étudiée au cours de ce semestre (4/8-CEAB). Cette éponge produit un composé majoritaire, l'avarol qui fait l'objet d'un intérêt particulier pour la pharmacologie. Il s'avère que les individus en contact avec d'autres organismes benthiques sur-expriment ce composé. Par ailleurs, ce composé semble plus exprimé lorsque la compétition est avec des macroalgues que lorsqu'elle est avec d'autres invertébrés benthiques. Les variations saisonnières du niveau d'expression de l'avarol ne sont pas corrélées avec le cycle de vie de l'éponge, ce qui indique que la production de cette molécule de défense ne suit pas la théorie de l'ODT.

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

L'étude de la structuration génétique et de la phylogéographie des *Aplysina* (Verongida, Aplysinidae ; marqueurs mtCOI, 18S ADNr, ITS) en région Méditerranée-Atlantique a permis de montrer la validité de l'espèce *Aplysina cavernicola* par rapport à sa congénère *A. aerophoba*, bien qu'il soit possible que ces deux espèces récemment divergées s'hybrident encore, notamment en Adriatique et Mer Egée (5-DIMAR). On a également mis en évidence l'existence d'au moins une espèce nouvelle d'*Aplysina* sur les côtes atlantiques du Pays Basque, au Portugal et à Madère. Il est également possible qu'un taxon supplémentaire d'*Aplysina* soit présent dans les eaux libanaises. L'étude d'un minisatellite développé simultanément aux microsattellites est venue corroborer l'existence des différents taxons d'*Aplysina* en Méditerranée et proche Atlantique. L'analyse des signatures métaboliques (4-UPVD) est congruente avec ces résultats au niveau phylogéographique. Pour *A. cavernicola*, une banque enrichie en microsattellites (financée par le réseau d'excellence européen Marine Genomics) a été criblée (47 clones positifs séquencés, 31 paires d'amorces dessinées et testées). Le post-doctorat de C. Lejeune a permis de tester le polymorphisme des microsattellites et ainsi de déterminer combien de locus pourraient être utilisés pour des études au niveau populationnel. Sur les 31 paires d'amorces testées, 17 ont présenté une amplification correcte sur des individus issus de populations échantillonnées dans l'ensemble de l'aire de répartition des *Aplysina* de Méditerranée et du proche Atlantique. Au total 6 locus ont présenté un niveau de polymorphisme satisfaisant avec des possibilités d'amplification croisée des différentes espèces d'*Aplysina*. Malheureusement, certains locus présentaient un déséquilibre de liaison entre eux, ne permettant au final que l'utilisation de trois d'entre eux (Ac28, Ac39, Ac45b). Ces locus polymorphes ont donc été utilisés pour génotyper un grand nombre d'individus et ainsi caractériser les structures génétiques des populations des espèces d'*Aplysina* à l'échelle de la Méditerranée. L'amplification croisée des différents taxons d'*Aplysina* a permis de confirmer les résultats des autres marqueurs et valider la séparation des *Aplysina* de Méditerranée en

au moins 3 espèces dont *A. cavernicola*, *A. aerophoba* et *Aplysina* n. sp. (qui pourrait ultérieurement être scindée en deux taxons, un en Atlantique et l'autre au Liban). Pour ces dernières, le faible nombre d'individus récolté n'a permis de pousser plus avant l'étude la structuration génétique. Par ailleurs, nous manquons pour le moment d'échantillons d'Atlantique pour effectuer les signatures chimiques, et achever à la description du (des) nouveau(x) taxon(s). Il faut noter, qu'à l'exception des formes de croissance qui varient, les caractères morphologiques traditionnels de cet ensemble d'espèces sont très similaires.

Au sein des populations d'*Aplysina cavernicola*, les différentes analyses ont pu montrer l'existence d'une structuration intra-spécifique avec l'existence d'au moins 4 groupes génétiques: un groupe Ceuta nettement différencié des trois autres groupes, Méditerranée nord-occidentale (MNO regroupant Catalogne, Provence et Ligurie), Corse et Croatie (Fig. 7). De la même façon, on retrouve aussi une structuration intra-spécifique chez *Aplysina aerophoba*, avec là aussi l'existence de 4 entités génétiques, dont celle atlantique (Madère) est également la plus différenciée des autres (MNO, Corse et Méditerranée orientale groupant Croatie et Liban).

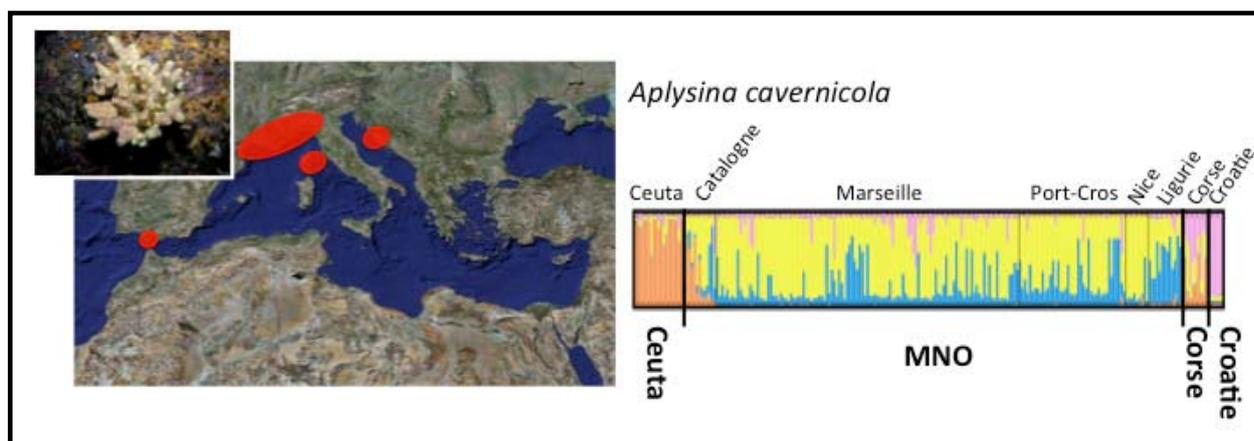


Figure 7 : Identification des différentes entités génétiques intra-spécifiques d'*Aplysina cavernicola*. Localisation géographique (à gauche) et structure populationnelle inférée par le logiciel STRUCTURE (à droite). Chaque individu est représenté par une barre verticale divisée en K segments de couleurs (ici K=4) représentant chacun la proportion d'appartenance de l'individu à chacun de ces K segments. Les sites d'échantillonnages sont mentionnés au-dessus, et les entités géographiques auxquelles elles appartiennent au-dessous.

3.4 Influence de la symbiose sur la production de métabolites secondaires

Les analyses moléculaires (séquençage des gènes codant pour la sous-unité ribosomale 16S / ADN_r 16S et des séquences intergéniques 16S-23S / ITS) des différents échantillons de *P. ficiformis* provenant des missions du programme ECIMAR sont toujours en cours. Le but initial de cette étude phylogéographique est de confirmer l'identification spécifique des cyanobactéries présentes chez *Petrosia* (*Synechococcus feldmanii*) déjà décrite dans la littérature par Usher *et al.* (2004). Cette étude est réalisée sur une vingtaine d'échantillons provenant de l'ensemble du bassin méditerranéen et collectés lors des différentes missions ECIMAR alors que l'étude d'Usher *et al.* (2004) ne contenait qu'un seul échantillon prélevé à Marseille. Pour affiner les relations phylogéographiques, en accord avec les précédents travaux d'Erwin et Thacker (2008) portant sur d'autres modèles d'éponges tropicales, l'utilisation d'un deuxième marqueur moléculaire (ITS) sera certainement nécessaire.

Durant ce semestre, des problèmes ont tout d'abord été rencontrés lors du clonage, une des étapes clé précédant le séquençage, et sont probablement dus à la mauvaise conservation des cellules compétentes. Ceci pourrait expliquer le faible rendement obtenu (13%) en comparaison de celui prévu par le kit utilisé (> 90%). Dans un second temps, afin de pallier à ces problèmes, de nouvelles amplifications par PCR ont été effectuées. Ces expérimentations ont conduit à l'obtention de gels dépourvus de bandes ou bien présentant des « smear » : ceci est en accord avec une probable dégradation de nos différents extraits d'ADN.

Par la suite, le changement de tous les composés du *mix* PCR, notamment les primers et la Taq polymérase, n'a pas permis l'obtention de meilleurs résultats. Les extractions d'ADN des différents

échantillons d'ECIMAR ont donc été à nouveau réalisées. Face à des résultats similaires, la Taq et le programme PCR (adapté à chaque Taq) utilisés ont été modifiés : (i) changement de l'enzyme pour une autre Taq haute fidélité (TAKARA), utilisée à l'Institut Pasteur sur leurs souches de *Synechococcus*, (ii) utilisation d'une quantité d'ADN plus importante et d'une température d'hybridation de 60°C plus proche de la température d'hybridation théorique des primers. Les derniers résultats ont été concluants car trois des quatre échantillons testés ont été positifs à la présence de cyanobactéries en comparaison aux témoins positifs (deux souches de *Synechococcus* de la collection Pasteur) amplifiés en même temps que nos échantillons. L'amplification de l'ensemble des échantillons dans ces nouvelles conditions est en cours.

Parallèlement à ces études de biologie moléculaire, nous avons voulu nous assurer que les principaux métabolites secondaires isolés à partir de *P. ficiformis* n'avaient pas une origine cyanobactérienne, l'intérêt plus large étant d'évaluer l'implication potentielle contre le biofouling des symbiontes photosynthétiques de l'éponge étudiée.

De ce fait, un tri des cellules de cyanobactéries symbiontes de *P. ficiformis* a été réalisé durant trois jours. Plus de 13 millions de cellules ont été récupérées dans de l'eau de mer stérile. Cette solution contenant les cyanobactéries a été lyophilisée (320 mg), puis extraite suivant le protocole standardisé ECIMAR (obtention de 35,3 mg d'extrait organique).

Cet échantillon, ainsi que plusieurs autres obtenus à partir de différentes parties de l'éponge (cœur, surface), ont été analysés en CLHP à triple détection (MS, DAD, ELSD). Les résultats montrent que les métabolites issus des cellules de cyanobactéries sont localisés dans la partie du chromatogramme correspondant aux produits polaires. Ainsi, les composés majoritaires de l'extrait total de *P. ficiformis* (polyacétylènes, stérols) ne semblent pas avoir une origine cyanobactérienne : ces résultats sont en accord avec le fait que ces composés sont présents dans plusieurs autres espèces de *Petrosia* pour lesquelles la présence de cyanobactéries n'a pas été mise en évidence.

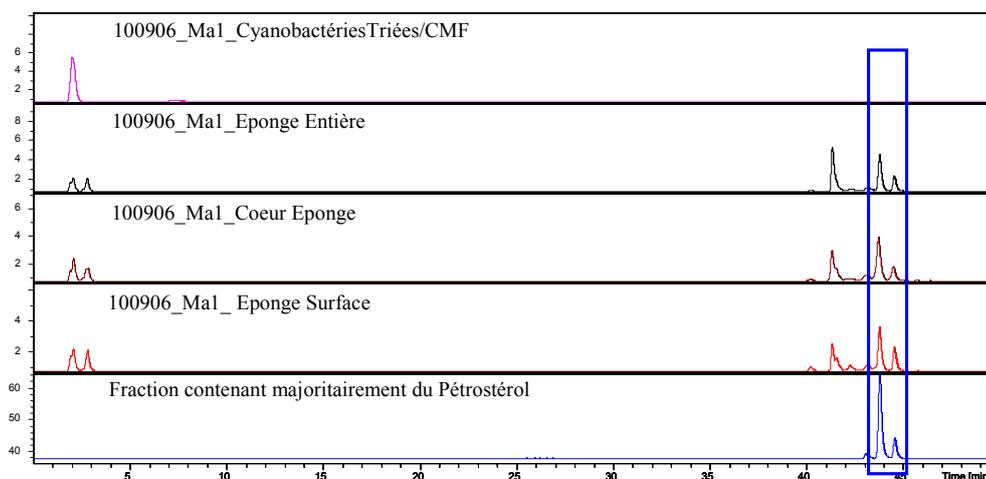


Figure 8 : Chromatogrammes ELSD de *P. ficiformis* (surface, cœur et éponge entière), cyanobactéries triées par CMF et de la fraction contenant majoritairement du Pétrostérol.

WP 4 : Base de Données collaborative

Responsable : J. de Vaugelas (I-UNSA)

Les molécules isolées ont été rentrées dans la base de données. Lors du dernier semestre la base de données possédant les données chimiques sera en partie visible dans le cms du site www.ecimar.org et sera liée aux différents organismes.

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
7-USTV	Pénez	Nicolas	Doctorant	01/10/2008	18 mois
8/9- CEAB	López- Legentil	Susanna	Post-Doctorant, gouvernement espagnol.	01/11/2008	60 mois

Commentaires particuliers du coordonnateur

Plusieurs étudiants sont arrivés ou arrivent en fin de thèse de doctorat. Trois thèses ont été soutenues au cours du semestre, et quatre autres devraient être soutenues durant le prochain semestre (Thèses Ivanisevic, Genta-Jouve et Roué programmées).

La transposition des approches développées dans le cadre d'ECIMAR se poursuit notamment au sein du GDR BioChiMar. En particulier, un projet de recherche ERA-NET Biome a été déposé "Diversity and functioning of coastal marine biomes under siege: implications of seaweed proliferations across three oceans" (coordination IRD, implication partenaires 1-UNSA, 5-DIMAR).