HAL
open science

Diversité chimique et bactéries associées à Spongia officinalis, une éponge marine accumulatrice de métaux

Cléa Bauvais

To cite this version:

Cléa Bauvais. Diversité chimique et bactéries associées à Spongia officinalis, une éponge marine accumulatrice de métaux. Ecologie, Environnement. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. ⟨NNT : 2015PA066087⟩. ⟨tel-01483479⟩

HAL Id: tel-01483479

https://theses.hal.science/tel-01483479v1

Submitted on 6 Mar 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Autorisation HAL

HAL Authorization

Université Pierre et Marie Curie

Sciences de la Nature et de l'Homme : Evolution et Ecologie

Molècules de communication et adaptation des micro-organismes

Molècules de défense et de communication dans les écosystèmes microbiens

Diversité chimique et bactéries associées à *Spongia officinalis*, une éponge marine accumulatrice de métaux

Par Cléa Bauvais

Thèse de doctorat d'écologie chimique et microbienne

Dirigée par Marie-Lise Bourguet-Kondracki et Séverine Zirah

Présentée et soutenue publiquement le 4 mars 2015

Devant un jury composé de :

M.	Bernard Banaigs	Chargé de recherche, INSERM	Rapporteur
M.	David Pignol	Directeur de recherche, CEA	Rapporteur
Mme.	Claude Grison	Professeur, Université de Montpellier	Examinateur
M.	Fabien Joux	Maître de conférences, UPMC	Examinateur
M.	François Lallier	Professeur, UPMC	Examinateur
Mme.	Sylvie Dufour	Directeur de recherche, CNRS	Examinateur
Mme.	Séverine Zirah	Maître de conférences, MNHN	Co-directeur de thèse
Mme.	Marie-Lise Bourguet-Kondracki	Directeur de Recherche, CNRS	Co-directeur de thèse

A ma mère

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé dans l'unité "Molécules de Communication et Adaptations des Micro-organismes", UMR 7245 CNRS-MNHN au Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris.

Je souhaiterais tout d'abord remercier l'ensemble des membres du jury de m'avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail de thèse, en particulier Monsieur Bernard Banaigs, Chargé de recherche à l'INSERM (Laboratoire de Chimie des Biomolécules et de l'Environnement, Perpignan) et Monsieur David Pignol, Directeur de recherche au CEA (Laboratoire de Bioénergétique Cellulaire, Cadarache) pour en être les rapporteurs. Mes remerciements vont également à Madame Claude Grison, Professeur à l'Université de Montpellier, pour avoir suivi mes travaux de thèse pendant ses trois années et pour sa participation à ce jury de thèse. A Monsieur Fabien Joux, maître de conférences à l'Université Pierre et Marie Curie et Monsieur François Lallier, Professeur à l'Université Pierre et Marie Curie ainsi qu'à Madame Sylvie Dufour, directeur de recherche au CNRS, pour leur participation à ce jury de thèse.

Je voudrais remercier également Madame Sylvie Rebuffat, Professeur au MNHN et directrice de l'unité "Molécules de Communication et Adaptations des Micro-organismes", pour m'avoir permis d'effectuer ma thèse pendant ces trois années et m'avoir accueillie au sein de son unité.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à mes directrices de thèse, Mesdames Marie-Lise Bourguet-Kondracki et Séverine Zirah. Merci de m'avoir confié un si beau sujet, de m'avoir fait confiance, de m'avoir guidée, soutenue, conseillée, motivée et aidée tout au long de ces trois années de thèse, et un peu plus. Merci pour vos encouragements, votre compréhension, votre gentillesse, votre bienveillance, votre disponibilité (je ne compterais pas le nombre de fois où je suis venue toquer à votre porte pour une question idiote, un besoin d'avis ou un problème urgent).

Un grand merci à Monsieur Thierry Perez, pour nous avoir donné la chance de travailler sur son modèle d'étude *S. officinalis*, pour ses critiques toujours constructives, son recul et sa réflexion sur l'ensemble du travail.

Je remercie également Madame Isabelle Domart-Coulon, pour tout le travail de microscopie, sa motivation, son entousiasme. Merci pour toutes les discussions fructueuses et motivantes que nous avons, sans oublier les rires, les bonnes formules "c'est pas la honte d'être un épibionte", le kouglov et les clémentines.

Merci à Mesdames Virginie Chapon et Laurie Piette pour leur accueil au sein du "Laboratoire des Intéractions Protéine Métal" et de m'avoir formée à la technique de DGGE.

Merci à Monsieur Emmanuel Wafo et Madame Florence Chaspoul pour leur aide dans la mesure des concentrations métallique associées aux bactéries et à l'éponge *S. officinalis*.

Merci à Madame Jennyfer Miot pour son implication dans le travail de microscopie à balayage couplée à la microanalyse à rayon X.

Je tiens à remercier Régis Debruyne et Jose Utge pour leur implication dans le projet de séquençage des souches de *Pseudovibrio* sp. tolérantes aux métaux. Ainsi que Loic Ponger et Evelyne Duvernois-Berthet pour l'assemblage de ce génome.

Merci aux personnes qui ont contribué de près ou de loin aux résultats de cette thèse.

J'adresse mes remerciements aux étudiants qui ont contribué à ce travail, Bertille Bonnaud, Fanny Herrier et Guillaume Groshenry. Merci pour votre investissement dans le projet.

Je tiens à remercier Madame Arlette Longeon pour les nombreux échanges scientifiques que nous avons eues et pour m'avoir aidée, écoutée et conseillée tout au long de la thèse.

Je remercie mes collègues de bureau, Samuel Dupont, Johan Garderes pour les échanges scientifiques et les moments de décompression nécessaires.

Merci à Messieurs Arul Marie et Lionel Dubost pour leur aide en spectrométrie de masse. Je remercie également Messieur Alain Blond et Alexandre Deville pour leur aide précieuse dans la réalisation des expériences de RMN.

Je remercie tous les membres du laboratoire MCAM avec un remerciement tout particulier aux gestionnaires de l'unité Mesdames Catherine Pougault, Nora Ouache et Djana Mokhtari et Monsieur Brice Molinelle pour leur aide précieuse dans les démarches administratives.

Je voudrais remercier chaque personne de l'équipe que j'ai eu la chance et l'honneur de rencontrer et de découvrir tout au long de ces trois années de thèse. Que de souvenirs, de rire, de fous-rires, de réflexions scientifiques, de discussions (parfois emflammées), de blagues, de midis à thèmes, de sérieux et de folie…Il s'en est passé des choses en trois ans ! Plus que de simple collègues, j'ai rencontré de véritables amis.

Merci à Alison Besse d'avoir toujours un bon mot, un sourire, une chanson, une confidence joyeuse aussi bien dans les hauts que dans les bas de la vie.

Merci à Christine Maulay-Bailly pour toutes tes attentions, ta gentilesse, tes services, ta bonne humeur communicative. Merci pour ton écoute, ta patience, ton calme rassurant, ton côté maman que tout le monde aime. Merci de m'avoir gentillement nourrie pendant la fin de rédaction.

Merci à Manon Vandervennet, pour toutes ta gentillesse, pour toutes les discutions que nous avons eues et tes précieux conseils en microbiologie, merci d'avoir su dompter mes cheveux.

Merci à Carine Lombard, d'avoir toujours répondu avec le sourire à mes milliers de questions techniques, merci pour ton aide précieuse depuis le premier jour de la thèse.

Merci à Jean Peduzzi, chez qui j'ai rencontré un utopiste révolté, un amoureux de la science, avec qui j'ai beaucoup appris et ai encore beaucoup à apprendre.

Merci à Michel Cheminant pour toutes les discussions que nous avons pu avoir, merci pour tes conseils professionnels et personnels.

Merci à Alain Blond, Christophe Goulard et Alexandre Deville pour la pause café du midi, pour leur humour grinçant, leurs conseils techniques en matière de vélo.

Merci à Brice Molinelli pour tous les moments que nous avons partagé, pour tes connaissances illimité en cinéma, tes prises de position toujours franches, merci d'avoir été mon compagnon de ping-pong le jeudi midi.

Merci à Jean-Baptiste Rioux, pour tes conseils avisés sur les manips, nos points de vues assez semblables sur de nombreux sujets.

Je tiens également à remercier Adrienne Kish, Agathe Lecointe, Alyssa Carré-Mlouka, Fadoua Ghanmi, Hajer abdelkafi, Hélène Barreteau, Linh Mai Hoang, Nora Ouache, Séverine Amand et Messieurs Alexandre Ear, Jimmy Mevaere, Mehdi Zaghouani.

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus profonds et les plus sincères à ma famille pour leur présence et leur soutien tout au long de mes études.

Maman, je ne trouverais jamais les mots justes pour exprimer combien je te remercie de m'avoir soutenue, d'avoir cru en moi toutes ces années, d'avoir éveillé ma curiosité, mon appétit de découverte, d'avoir aiguisé mon sens critique, d'avoir fait de moi quelqu'un d'heureux et de libre. Merci d'avoir été une mère exceptionnelle que je garderais toujours dans mon cœur. Tu me manques.

Papa, merci pour ton soutien et ton amour, merci d'être toi, d'être là. Je pense à toi.

Julie, ma grande sœur, merci pour ton soutien, pour tout ce que tu m'apportes, merci de toujours veiller sur moi, pour les liens qui nous unissent.

Je voudrais remercier tout particulièrement Sarah, pour m'apporter tant de bonheur chaque jour, pour m'avoir soutenue pendant cette dernière année de thèse, d'avoir su me redonner le sourire dans les moments grave et de partager avec joie les moments heureux. Merci.

Je voudrais également remercier mes amies d'enfance, Anahi, Joséphine et Emilie D.. Merci à mes amis d'ici et d'ailleurs, Emilie F., Godelieve, Jean-Baptiste, Laura, Laure, Lorenzo et Sandrine.

Table des matières

Table des matières 1
Abréviations 7
Introduction générale 11
État de l'art 17
1. Les métaux dans le milieu marin 19
1.1. Les métaux 19
1.1.1. Généralités sur les métaux 19
1.1.2. Les Éléments-Traces Métalliques 19
1.2. Les métaux dans l'environnement 22
1.2.1. La pollution, une problématique contemporaine 22
1.2.2. Origine des pollutions métalliques marines 23
1.2.2.1. Cas du cuivre 23
1.2.2.2. Cas du nickel 23
1.2.2.3. Cas du plomb 24
1.2.2.4. Cas du zinc 24
1.3. Réponse des organismes marins exposés à une pollution métallique 25
1.3.1. Toxicité des métaux pour les systèmes biologiques 25
1.3.1.1. Cas du cuivre 25
1.3.1.2. Cas du nickel 26
1.3.1.3. Cas du plomb 26
1.3.1.4. Cas du zinc 26
1.3.2. Des organismes bioindicateurs et bioaccumulateurs de métaux 27
1.4. Les procédés de dépollution métallique 28
1.4.1. Les méthodes physico-chimiques 29
1.4.1.1. La précipitation chimique 29
1.4.1.2. L'échange d'ions 29
1.4.1.3. L'osmose inverse 30
1.4.2. La biodépollution 30
1.4.2.1. La phytoremédiation 30
1.4.2.2. La phycoremédiation 32
1.4.2.3. La bioremédiation 33
1.4.2.4. La zooremédiation 34
1.4.2.4.1. La zooremédiation par les mollusques bivalves 34
1.4.2.4.2. L'avenir de la zooremédiation : les Spongiaires ? 35
2. Bactéries marines tolérantes aux métaux 36
2.1. Communautés bactériennes des milieux marins riches en métaux 36

2.2. Réponse bactérienne à une exposition métallique ... 39
2.2.1. Systèmes d'import des métaux lourds ... 40
2.2.2. Toxicité des métaux lourds ... 41
2.2.3. Mécanismes de résistance ... 42
2.2.3.1. La séquestration ... 42
2.2.3.1.1. La séquestration intracellulaire ... 42
2.2.3.1.2. La séquestration extracellulaire ... 44
2.2.3.2. La conversion enzymatique ... 45
2.2.3.3. Les systèmes d'efflux ... 46
2.2.3.3.1. Les transporteurs primaires ... 47
2.2.3.3.2. Les transporteurs secondaires ... 47
2.3. Biorémédiation bactérienne ... 48
3. Présentation du modèle *S. officinalis* ... 50
3.1. Généralités sur les Spongiaires ... 50
3.2. La Démosponge *S. officinalis* et son habitat ... 52
3.3. Reproduction et cycle de vie chez *S. officinalis* ... 56
3.4. Organisation tissulaire et système aquifère ... 59
3.5. Une éponge filtreuse ... 60
3.6. Un outil de bioindication et de bioremédiation de pollution ... 61
3.6.1. Exposition à des micro-organismes pathogènes ... 61
3.6.2. Exposition aux métaux ... 62
3.6.2.1. Un bioindicateur de pollution métallique ... 62
3.6.2.2. Mécanismes de détoxification des métaux ... 63
3.6.2.2.1. Les granules de lépidocrocite ... 63
3.6.2.2.2. Les métallothionéines ... 64
3.6.3. Exposition aux polychlorobiphényles ... 64
3.6.4. Exposition aux agents tensio-actifs ... 65
3.7. *S. officinalis* comme source de molécules bio-actives ... 65
3.7.1. Terpènes ... 66
3.7.1.1. Terpènes de type furane ... 66
3.7.1.2. Sesterterpènes de type scalarane ... 69
3.7.1.3. Diterpènes ... 70
3.7.2. Stérols ... 73
3.7.2.1. Hydroxystérols ... 73
3.7.2.1.1. *Les trihydroxystérols* ... 73
3.7.2.1.2. Les tétrahydroxystérols ... 75
3.7.2.2. Sécostérols ... 75
3.7.2.3. Époxystérols ... 77
3.7.3. Acides gras ... 78
3.7.4. Autres composés ... 78

3.7.5. Bilan sur les molécules bioactives isolées chez *S.officinalis* ... 79

CHAPITRE 1 : Bactéries associées avec l'éponge marine* Spongia officinalis *et résistantes aux métaux ... 81

1. Résumé ... 83

2. Article ... 85

3. Matériel et méthodes complémentaires ... 111

3.1. Isolement des bactéries associées à *S. officinalis* et tolérantes aux métaux ... 111

3.2. Sélection des souches d'intérêt par amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD) ... 112

3.3. Analyse des séquences d'ADNr 16S des bandes du gel DGGE ... 113

3.4. Activités biologiques des souches bactériennes isolées ... 114

3.4.1. Mesure de l'activité antioxydante ... 114

3.4.2. Mesure de l'activité antimicrobienne ... 115

4. Résultats complémentaires ... 116

4.1. Sélection des souches d'intérêt par RAPD ... 116

4.2. Analyse phylogénétique des communautés bactériennes associées à *S. officinalis* ... 116

4.3. Activités biologiques des souches bactériennes isolées ... 120

4.3.1. Evaluation de l'activité antioxydante ... 120

4.3.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne ... 121

CHAPITRE 2 : Pseudovibrio sp., une bactérie associée à* Spongia officinalis *résistante au cuivre ... 123

1. Introduction ... 125

2. Matériel et Méthodes ... 128

2.1. La souche bactérienne *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 ... 128

2.2. Dosages ... 128

2.2.1. Dosage des métaux ... 128

2.2.1.1. ICP-MS ... 128

2.2.1.2. Dosage colorimétrique ... 128

2.2.2. Dosage des oses neutres ... 129

2.2.3. Dosage des protéines ... 129

2.2.3.1. Méthode de l'acide bicinchonique ... 129

2.2.3.2. Méthode de Bradford ... 129

2.3. Isolement des protéines et des polysaccharides extracellulaires ... 130

2.3.1. Production et extraction des substances exopolymériques (EPS) ... 130

2.3.2. Isolement des protéines et des polysaccharides à partir des EPS ... 131

2.4. Interactions des bactéries ou des EPS avec le cuivre ... 132

2.4.1. Interaction de *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 avec le cuivre ... 132

2.4.2. Interaction entre les EPS et le cuivre ... 132

2.5. Observations microscopiques de la souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 ... 133

2.5.1. Conditions de culture de la souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 ... 134

2.5.1.1. Culture en milieu liquide 134
2.5.1.2. Formation de biofilms 134
2.5.2. Fixation des échantillons 134
2.5.2.1. Culot bactériens 134
2.5.2.2. Biofilms sur lamelle 135
2.5.3. Lavage et déshydratation 135
2.5.4. Métallisation et observation microscopique 136
2.5.5. Protocole sans étapes de fixation, déshydratation 136
2.6. Séquençage du génome de *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 137
2.6.1. Préparation des échantillons à séquencer 137
2.6.1.1. Extraction de l'ADN génomique 137
2.6.1.2. Préparation de la librairie d'amplicons d'ADN génomique 137
2.6.1.2.1. Fragmentation de l'ADNg, réparation des extrémités et purification 137
2.6.1.2.2. Réparation des extrémités des fragments d'ADN 138
2.6.1.2.3. Ligation des adaptateurs 138
2.6.1.2.4. Amplification des fragments d'ADNg 139
2.6.1.2.5. Quantification de la librairie d'amplicons d'ADNg 139
2.6.1.3. Préparation de la matrice de séquençage 140
2.6.2. Séquençage du génome en Ion Torrent 141
2.6.3. Analyse des données de séquençage de l'ADNg 141
2.7. Caractérisation des protéines 142
2.7.1. Électrophorèse sur gel d'acrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) 142
2.7.2. Électrophorèse bidimentionelle 143
2.7.2.1. Préparation des échantillons à partir d'un culot bactérien 143
2.7.2.2. Précipitation des protéines 143
2.7.2.3. Dessalage des protéines 144
2.7.2.4. Electrophorèse bidimensionnelle 144
2.7.2.4.1. La focalisation isoélectrique 145
2.7.2.4.2. Electrophorèse SDS-PAGE 146
2.7.2.5. Analyse des gels 146
2.7.3. Digestion enzymatique et identification protéique 147
2.7.3.1. Digestion des protéines sur gel 147
2.7.3.2. Analyse par chromatographie liquide haute performance couplé à la spectrométrie de masse 148
3. Résultats et Discussion 149
3.1. Étude des substances polymériques extracellulaires (EPS) produites par *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 149
3.1.1. Production et extraction des EPS 150
3.1.2. Caractérisation des EPS 152
3.1.3. Identification de protéines des EPS associées au culot bactérien 154

3.2. Quantification de la capacité de la souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 à détoxifier le cuivre 155
3.2.1. Mesure de l'accumulation du cuivre par la souche en culture 155
3.2.2. Adsorption du cuivre par les EPS 157
3.2.3. Observations microscopique de la souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 sous des conditions de stress métallique 157
3.3. Séquençage du génome de *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 161
3.3.1. Séquençage du génome par la technologie Ion Torrent 161
3.3.2. "Mapping" contre des génomes proches connus 162
3.3.3. Analyse de la qualité des données 163
3.3.4. Comparaison des librairies 163
3.3.5. Création d'une séquence concensus 164
3.3.6. Assemblage du génome de *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 167
3.4. Étude protéique de la réponse de *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 à un stress métallique 168
4. Conclusion 176
CHAPITRE 3 : Variabilité de l'expression des furanoterpènes chez* Spongia officinalis, *une éponge accumulatrice de métaux 179
1. Résumé 181
2. Article 183
Conclusions et perspectives 207
Références bibliographiques 215
Annexes i
1. Annexe 1 iii
2. Annexe 2 iv
3. Annexe 3 v
Table des illustrations vii
Table des tableaux ix

Abréviations

ABC :	ATP Binding Cassette
ADN :	Acide Désoxyribo Nucléique
ADNg	ADN génomique
AF	Acide Formique
α FeOOH :	Goéthite
ANOVA	ANalysis Of VAriance
APS	Acide périodique de Schiff
ATP :	Adénosine-5'-TriPhosphate
ATPase :	Adénosine TriPhosphatase
BCA	BiCinchoninic Acid
BLASTn	Basic Local Alignment Search Tool nucleotide
***bmtA* :**	Gène codant pour la métallothionéine
CARD-FISH	CAtalyzed Reporter Deposition - Fluorescent *In situ* Hybridization
CDF :	Cation Diffusion Facilitator
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CI_{50} :	Concentration Inhibitrice médiane
CL_{50} :	Concentration Létale médiane
CL_{100} :	Concentration totalement Létale
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CorA :	Protéine de transport du cobalt et du magnésium
CsoR	Copper-responsive transcriptional repressor
CtpV	Copper Transporter ATPase V
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DNase	Deoxyribonuclease
DO	Densité Optique
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DTT	Dithiothreitol
DW	Dry Weight
EDTA	Éthylène Diamine Tétra Acétique
EDX	Energy-dispersive X-ray

EPS	Substances Polymériques Extracellulaires
ESI-QUAD-TOF	Electrospray Ionisation-QUADrupole-Time-Of-Flight
ETM :	Eléments-Traces Métalliques
FT-IR	Fourier Transform-InfraRed spectroscopy
FXR :	Farnesoid X Receptor
γ FeOOH :	Lépidocrocite
GS-SG :	Disulfure de glutathion
HoxN :	High-affinity nickel-transport protein
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
HSP 70 :	Heat Shock Protein
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry
ISP	Ion Sphere Particle
ISP-NaCl	International Streptomyces Project-Sodium Chloride
qPCR	PCR quantitative
MB	Marine Broth
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
MEB-EDX	Microscopie Electronique à Balayage couplé à la microanalyse par Energie Dispersive de rayons X
MIT :	Metal Inorganic Transport
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
MIRA	Mimicking Intelligent Read Assembly
MS	Mass Spectrometry
MS/MS	Tandem mass spectrometry
NaPPi	Pyrophosphate de sodium
OMF :	Outer Membrane Factor
ORF	Open Reading Frame - Phase ouverte de lecture
OTU	Operational Taxonomic Unit
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCA	Principal Component Analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGM	Personal Genome Machine™
pH	Potentiel Hydrogène
PMF	Peptide Mass Fingerprinting

RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RNase	Ribonuclease
RND :	Resistance-Nodulation-Cell Division
rDNA	ribosomal DésoxyriboNucléic Acid
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
Rpm	Rotation Par Minute
rRNA	ribosomal RiboNucleic Acid
SDS	DodécylSulfate de Sodium
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SPAdes	St. Petersburg genome assembler
TAE	Tris, Acétate, EDTA
TEMED	TétraMéthylEthylèneDiamine
TMPA	Torrent Mapping Alignment Program
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
UV	UltraViolet
WHO	World Health Organization

Introduction générale

Introduction générale

Les Spongiaires, plus connus sous le nom d'éponges, représentent une composante majeure des communautés benthiques océaniques. Ce sont des organismes sessiles capables de filtrer activement l'eau de mer environnante. Chez une grande majorité des Spongiaires, la filtration permet de capter les micro-organismes et particules en suspension dans l'eau de mer qui sont ensuite phagocytés afin d'assurer leur nutrition (Vogel, 1977). En plus des éléments essentiels à leur nutrition, les Spongiaires filtrent et concentrent dans leurs tissus les composés toxiques du milieu comme les métaux. Ainsi, plusieurs études ont proposé d'utiliser les Spongiaires comme bioindicateurs de pollution métalliques, et notamment notre modèle d'étude, l'éponge de toilette *Spongia officinalis* (Pérez *et al.*, 2005).

Ces organismes sont également connus pour héberger dans leurs tissus une communauté microbienne diversifiée et abondante, composée de champignons, de micro-algues, d'archées et de bactéries, qui chez certaines Démosponges peut représenter jusqu'à 40% de leur volume (Hentschel *et al.*, 2006).

La résistance des bactéries associées aux éponges et l'influence de ces métaux sur les communautés bactériennes associées aux éponges ont encore été peu étudiées. Toutefois, les communautés microbiennes associées aux éponges ont été proposées comme bioindicateurs de contamination métallique dans les environnements marins (Selvin *et al.*, 2009). Ces communautés seraient en partie responsables de l'accumulation des métaux par l'éponge (Pan *et al.*, 2011), comme en atteste l'étude de la résistance métallique de nombreuses bactéries isolées de Spongiaires ou plus généralement d'invertébrés marins colonisant des environnements pollués (Matyar *et al.*, 2008; Selvin *et al.*, 2009; Sabdono *et al.*, 2012).

Afin de pallier les effets toxiques des métaux, les bactéries ont développé des mécanismes cellulaires de régulation de leur homéostasie (Nies, 1999), qui résulte de la coordination des systèmes de prise en charge, de stockage et de sécrétion des métaux lourds (Lloyd, 2002).

Au cours des dernières décennies, les éponges marines sont apparues comme une riche source de métabolites secondaires bio-actifs d'une grande diversité chimique (stérols, terpénoïdes, alcaloïdes, macrolides, peptides…) et présentant une large gamme de propriétés biologiques et pharmacologiques telles que des activités cytotoxiques, anti-tumorales,

antivirales ou antimicrobiennes (Wang, 2006; Blunt *et al.*, 2014). Les molécules responsables de ces activités permettent aux éponges de survivre dans les environnements compétitifs que représentent les écosystèmes marins en intervenant dans les mécanismes de défense et de communication (Thakur and Müller, 2004). Mais, aucune étude n'a été menée à ce jour sur le lien entre cette diversité chimique et les paramètres environnementaux comme la pollution métallique.

D'autre part, les éponges marines abritent des communautés microbiennes abondantes et diversifiées, qui peuvent contribuer de façon significative au métabolisme et à la défense de leur hôte (Wilkinson and Garrone, 1980; Taylor *et al.*, 2007). En effet, dans de nombreux cas, la production des molécules bio-actives isolées des éponges a pu être attribuée aux bactéries qui leur sont associées (Moore, 2005; Thomas *et al.*, 2010a). L'étude de ces molécules a conduit à une meilleure compréhension, bien qu'encore incomplète, des mécanismes de communication entre les éponges et leurs micro-organismes associés.

La Démosponge *S. officinalis* bénéficie de certaines propriétés fondamentales des bio-indicateurs de pollution proposés par Rainbow et Phillips (Rainbow and Phillips, 1993). Espèce caractéristique des hotspots de biodiversité, elle est largement distribuée sur les fonds rocheux méditerranéens. *S. officinalis* tolère de larges fluctuations physico-chimiques et peut coloniser à la fois des sites pollués et non pollués. *S. officinalis* est, par ailleurs, facile à récolter et à identifier et ses tissus se régénèrent en quelques mois.

De plus, cette espèce possède un système aquifère sophistiqué qui lui confère d'importantes propriétés de filtration. Plusieurs études ont démontré les capacités de *S. officinalis* à accumuler efficacement les polluants, et en particulier les métaux, aussi bien sous forme particulaire que dissoute. Cette propriété pourrait être due à la structure de son tissu, en particulier aux fibres de spongine (Verdenal *et al.*, 1990) ou à son abondant microbiote associé.

Dans ce contexte, notre objectif a été de caractériser pour la première fois la diversité chimique et les bactéries associées à l'éponge marine accumulatrice de métaux *Spongia officinalis*.

La première partie de cette thèse présentera l'**état de l'art** sur les métaux en milieu marin, leurs effets sur les macro- et micro-organismes des environnements pollués, les systèmes de résistance mis en place par ces organismes ainsi que les stratégies de remédiation

développées pour dépolluer les milieux contaminés et limiter les effets néfastes sur les environnements et la santé humaine. Enfin, une synthèse bibliographique pluridisciplinaire des caractéristiques structurales, physiologiques, microbiologiques, chimiques du modèle d'étude *S. officinalis* est présentée.

La seconde partie concerne les travaux réalisés et s'articule en trois chapitres. Le **Chapitre 1** développera l'étude de la communauté bactérienne associée à l'éponge *S. officinalis* récoltée dans un environnement pollué en métaux par la combinaison d'approches moléculaire (DGGE, CARD-FISH) et culturale.

Le **Chapitre 2** portera sur la compréhension des mécanismes d'accumulation et/ou de résistance vis-à-vis des métaux d'une souche de *Pseudovibrio* sp. isolée de *S. officinalis* pour sa tolérance au cuivre par des approches combinées de protéogénomique (électrophorèse bidimensionnelle et spectrométrie de masse, séquençage du génome) et de microscopie (microscopie électronique à balayage couplée à une analyse élémentaire EDX).

Le **Chapitre 3** rapportera la diversité chimique associée à l'éponge *S. officinalis*, sa variabilité spatiale et temporelle ainsi que la recherche de marqueurs de stress par couplage d'analyse chromatographique et de spectrométrie de masse (LC-MS, LC-MS/MS).

Le manuscrit se terminera par un chapitre intitulé **Conclusions et perspectives** qui permettront de mettre en perspective l'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de cette thèse.

État de l’art

État de l'art

1. Les métaux dans le milieu marin

1.1. Les métaux

1.1.1. Généralités sur les métaux

Les métaux sont des éléments chimiques issus, le plus souvent, d'un minerai et caractérisés par une forte conductivité thermique et électrique, des caractéristiques de dureté et de malléabilité, une capacité à se combiner avec d'autres éléments pour former des alliages. Les métaux portent un à trois électrons sur leur couche périphérique. Ils perdent facilement leurs électrons de valence pour former des cations en milieu aqueux, ont une faible électronégativité et sont de bons agents réducteurs.

1.1.2. Les Éléments-Traces Métalliques

Les métaux dits lourds dont la dénomination a évolué vers la notion d'éléments-traces métalliques (ETM) (Duffus, 2009) sont au nombre de cinquante-trois. Ils sont définis comme les éléments métalliques naturels, métaux ou métalloïdes, ayant une masse volumique supérieur à 5 $g.cm^{-3}$ et sont généralement associés à une toxicité (Nies, 1999) (Figure 1).

La plupart des ETM sont des éléments de transition, qui possèdent des orbitales incomplètes et peuvent donc se complexer pour compléter leurs orbitales. Ils sont présents à l'état de traces dans les sols, les sédiments, les eaux de surface ainsi que les organismes vivants. Ils sont biologiquement ou chimiquement non dégradables et s'accumulent donc de façon irréversible dans les écosystèmes marins pour atteindre des niveaux toxiques pour les organismes vivants.

Les ETM se répartissent en deux catégories. D'une part, les métaux dits essentiels qui, à faible concentration, sont indispensables pour de nombreux mécanismes cellulaires mais qui, à forte concentration, dans le milieu extra- ou intracellulaire, deviennent toxiques comme que le chrome, le cuivre, le nickel, le sélénium et le zinc (Rainbow, 2002). D'autre part, les

métaux dits toxiques qui ne participent pas aux mécanismes cellulaires et ont des effets toxiques même à faible concentration comme l'antimoine, l'arsenic, le béryllium, le cadmium, le mercure et le plomb. Les organismes doivent finement réguler l'import et l'efflux des métaux afin d'assurer leur homéostasie dans les cellules et de limiter leurs effets toxiques.

Vingt-deux de ces ETM sont définis au titre d'éléments traces et peuvent être organisés en quatre classes en fonction de leurs concentrations naturelles utilisées comme valeur de référence dans l'eau de mer (Weast *et al.*, 1984) (Figure 1) :

- Les métaux les plus fréquents dont les concentrations sont compris entre 0,1 et 1 µM (fer, molybdène et zinc).
- Les métaux moins fréquents dont les concentrations sont comprises entre 10 et 100 nM (arsenic, cuivre, étain, manganèse, nickel, uranium et vanadium).
- Les métaux rares dont les concentrations sont compris entre 1 et 10 nM (antimoine, argent, cobalt et cérium).
- Les métaux très rares dont les concentrations sont inférieurs à 1 nM (cadmium, chrome, gallium, mercure, plomb, thorium, tungstène et zirconium).
- Les trente-et-un métaux de concentrations très inférieures à 1 nM ne sont pas considérés comme des éléments traces car ils n'ont aucune utilité biologique ou toxicité intrinsèque.

Le bon fonctionnement des systèmes biologiques nécessite ces éléments traces aux concentrations que l'on retrouve dans un litre d'eau de mer (Nies, 1999). Ceux-ci n'en restent pas moins dangereux car leur toxicité se développe par bioaccumulation le long de la chaîne alimentaire et impacte dangereusement la santé humaine.

La toxicité des métaux lourds n'est plus à démontrer (Di Benedetto, 1997; Järup, 2003). Le plomb provoque des troubles du système nerveux, des affections du foie et des reins, le cadmium des affections respiratoires et des troubles rénaux (Juberg *et al.*, 1997). Le mercure est connu depuis l'Antiquité pour ses effets toxiques principalement au niveau du système nerveux, du sang ou de la moelle osseuse (Zahir *et al.*, 2005). Le chrome initie le développement de cancers, de troubles dermatologiques ou d'anémie (Martin and Griswold, 2009). Le nickel est à l'origine de maladies respiratoires, d'asthme, de malformations congénitales et de cancers (Denkhaus and Salnikow, 2002). Il est donc nécessaire de

réglementer les teneurs en métaux lourds des eaux destinées à la consommation humaine ainsi que les rejets industriels dans l'environnement.

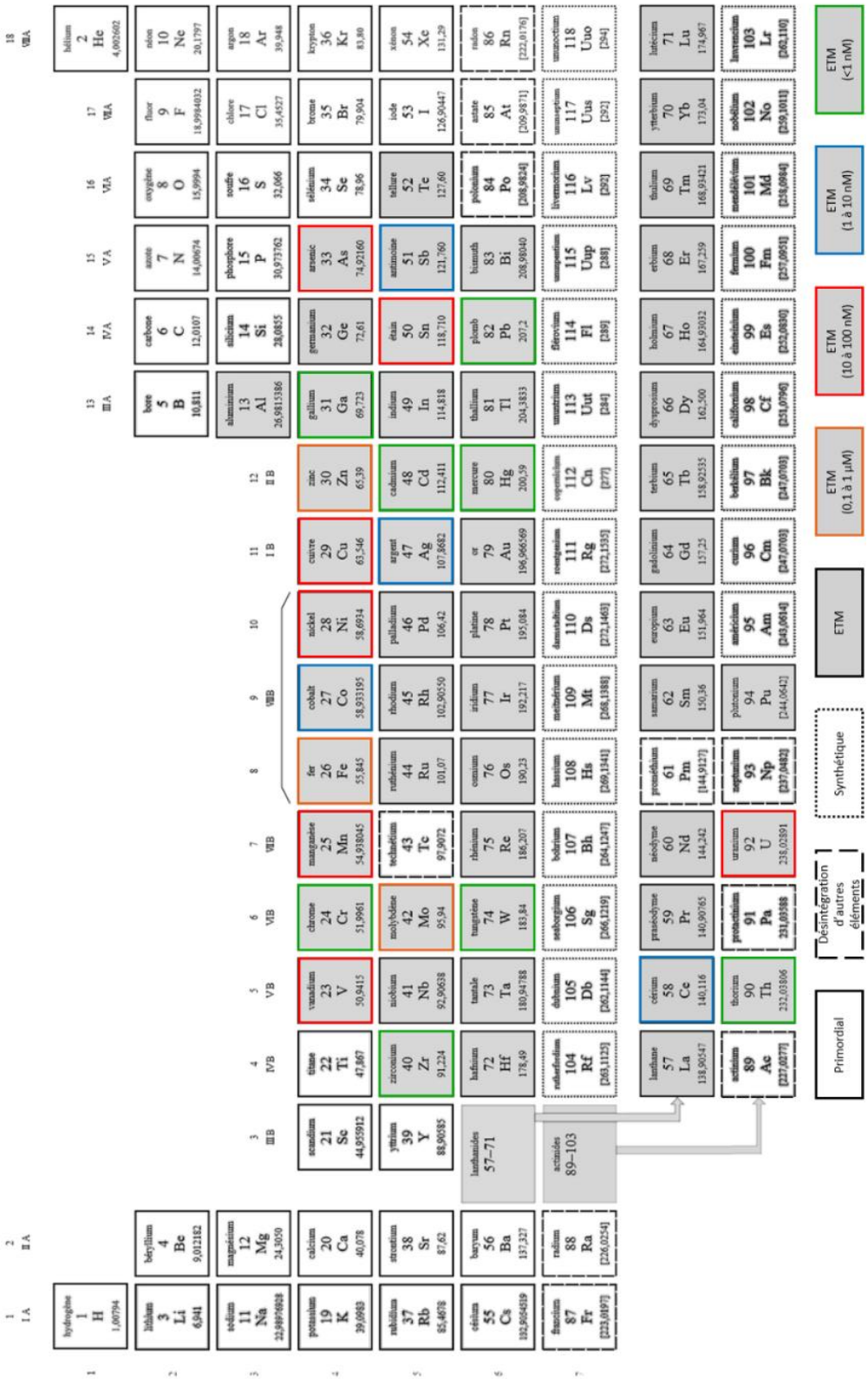


Figure 1 : Tableau de Mendeleïev. Les cinquante-trois ETM définis comme les métaux métalliques naturels, métaux ou métalloïdes, ayant une masse volumique supérieur à 5 g.cm^{-3} sont représentés en gris. Les métaux les plus fréquents sont encadrés en orange, les métaux moins fréquents en rouge, les métaux rares en bleu et les métaux très rares en vert.

Les normes françaises en termes de qualité de l'eau attendue pour la consommation humaine ont été adoptées par le décret N°2001-1220 du 20 déc. 2001, en application de la directive européenne 98/83/CE du Conseil du 3 novembre 1998, disponible dans le code de la santé publique des articles L. 1321-1 à R. 1321-63 (Eaux destinées à la consommation humaine à l'exclusion des eaux minérales naturelles). Elles sont rappelées dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Récapitulatif des normes françaises sur la qualité des eaux de consommation adoptées en 2001 pour les principaux éléments traces métalliques présentant un danger pour la santé humaine. Les métaux les plus fréquents sont écrits en orange, les moins fréquents en rouge, les rares en bleu et les très rares en vert. NM : Non mentionnée

Elément Trace Métallique	**Norme ($mg.L^{-1}$)**
Fer	0,2
Molybdène	NM
Zinc	NM
Arsenic	0,01
Cuivre	2
Etain	NM
Manganèse	0,05
Nickel	0,02
Uranium	NM
Antimoine	0,005
Argent	NM
Cadmium	0,005
Chrome	0,05
Mercure	0,001
Plomb	0,01

1.2. Les métaux dans l'environnement

1.2.1. La pollution, une problématique contemporaine

Les problèmes actuels de pollution, et plus particulièrement de pollution marine, ont pour origine la façon dont les sociétés humaines se sont développées depuis le XIXème siècle et surtout leurs méthodes de production d'énergie. En effet depuis plus de 100 ans, la plupart des écosystèmes subissent des modifications importantes liées aux activités anthropogéniques (agriculture, industrialisation, déforestation, urbanisation…) à cause de l'augmentation constante de la croissance démographique et économique.

Il aura fallu de longues années pour que nos sociétés prennent conscience que ces pollutions affectent la santé des écosystèmes et par conséquent la santé humaine. Au cours des dernières décennies, comprendre et réguler l'équilibre et la biodiversité des écosystèmes est devenu l'un des enjeux majeurs sur les plans écologique, politique et économique.

1.2.2. Origine des pollutions métalliques marines

Une pollution se définit par l'introduction de substances toxiques dans un écosystème naturel incapable de les dégrader et dont l'équilibre se trouve affecté de façon réversible ou irréversible (Hill, 2004).

Les pollutions métalliques marines auraient principalement une origine terrestre. Ces polluants peuvent être naturellement présents dans l'environnement et parvenir jusqu'aux mers par le lessivage des sols et l'érosion mécanique ou chimique des roches (Nisbet and Fowler, 1995). Ils peuvent aussi être le produit des activités anthropiques liés aux rejets industriels, agricoles, urbains ou miniers et être transportés par les fleuves, l'air, le drainage des terres ou les rejets volontaires (Goldberg, 1995; Hill, 2004). Les métaux représentent l'un des polluants les plus persistants dans l'eau, qui s'accumule le long de la chaîne alimentaire et peut provoquer des risques à la fois écologiques et sanitaires.

1.2.2.1. Cas du cuivre

Principalement utilisé en agriculture et dans l'industrie, le cuivre a fait l'objet d'une utilisation intensive dans les peintures antifouling pour les coques de navires (Katranitsas *et al.*, 2003; Schiff *et al.*, 2004) en remplacement du toxique tributylétain depuis les années 1980 (Claisse and Alzieu, 1993) (Figure 2).

1.2.2.2. Cas du nickel

Le nickel en milieu marin a principalement une origine anthropique puisqu'il provient de la combustion du pétrole et du charbon, de la production industrielle d'acier, de batterie ou d'alliage et de l'épandage agricole dont les déchets se retrouvent dans les eaux usées et les stations d'épuration. Dans l'environnement, le nickel est majoritairement présent sous forme divalente et se complexe donc avec les ligands inorganiques dissous comme les chlorures, hydroxydes ou les carbonates (Figure 2).

1.2.2.3. Cas du plomb

Jusque dans les années 1980, le plomb a été utilisé comme antidétonant dans l'essence. Du fait de son interdiction, sa concentration dans le milieu marin a diminué d'un facteur 2 (Nicolas *et al.*, 1994). A l'heure actuelle, le plomb est principalement utilisé dans l'industrie comme matière active des accumulateurs, en cristallerie et verrerie technique, ou comme stabilisant pour les plastiques (Figure 2).

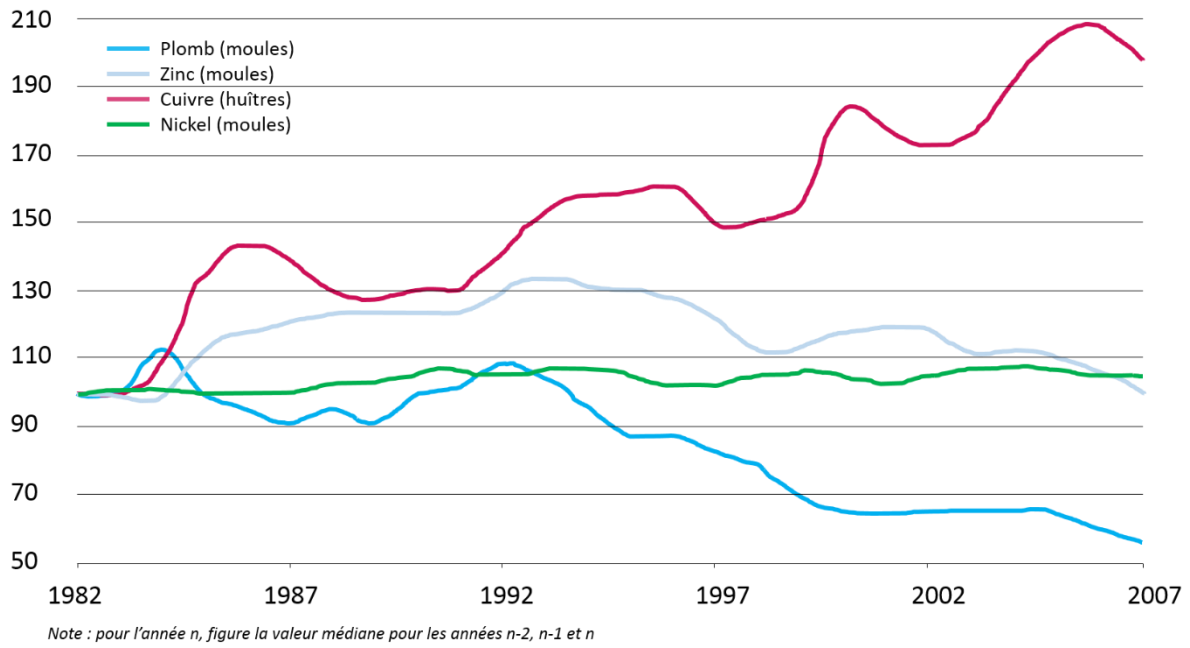


Figure 2 : Évolution temporelle de la concentration des éléments traces métalliques (Cu, Ni, Pb, Zn) dans le milieu marin. Les concentrations ont été mesurées chez des organismes marins bioindicateurs de pollution métallique, les huîtres et les moules. La valeur de 100 correspond à la concentration de référence mesurée en 1982. Source : Ifremer-RNO, 2009. Traitements : SOeS (Observatoire du littoral).

1.2.2.4. Cas du zinc

Le zinc est naturellement présent dans l'environnement sous forme de sulfure. Ses sources anthropiques sont principalement la métallurgie lors de la fabrication d'alliages, de pigments, de piles électriques ou lors de la combustion de bois ou de charbon et les épandages agricoles. Par ailleurs, on le retrouve fortement concentré dans les zones portuaires soumises à la dissolution des peintures antirouille et des anodes qui protègent les coques de bateaux (INERIS, 2010) (Figure 2).

1.3. Réponse des organismes marins exposés à une pollution métallique

1.3.1. Toxicité des métaux pour les systèmes biologiques

En milieu marin, les organismes sont exposés à de multiples sources de pollution métallique liées aux courants marins, à la voie trophique ou au transfert vertical. Les métaux peuvent avoir des effets néfastes sur les organismes même à de très faibles concentrations.

Les ETM sont incorporés par les invertébrés marins au travers des systèmes de transport des cellules membranaires par plusieurs biais dont le transport médié par une protéine membranaire, les canaux membranaires, la diffusion passive ou l'endocytose (Simkiss and Taylor, 1995). Une fois passé la membrane cellulaire, les ETM ont la capacité de se lier à des protéines cytosoliques non diffusibles qui portent des atomes et groupements affins pour ce métal. Celles-ci jouent donc un rôle crucial sur leur biodisponibilité dans la colonne d'eau et leur incorporation dans les tissus des organismes. En effet, bien que la concentration interne totale en métaux soit supérieure à celle du milieu externe, les métaux peuvent continuer à entrer passivement dans les cellules.

Les métaux ne sont pas dégradables biologiquement et restent donc métaboliquement biodisponibles jusqu'à ce que la physiologie de l'organisme intervienne pour les excréter ou les détoxifier en les complexant à des molécules de forte affinité et dont ils ne peuvent se détacher (Mason and Jenkins, 1995).

Les ETM ont une forte affinité pour le soufre, le phosphate et les carboxyles et se fixent donc sur les protéines ayant des acides aminés soufrés, ce qui les empêche de remplir leur rôle métabolique normal (Nieboer and Richardson, 1980; Rainbow, 2002). Les métaux, non excrétés ou non détoxifiés, provoquent alors des perturbations biochimiques et physiologiques et peuvent avoir des impacts sur les fonctions biologiques tels que l'immunité, le métabolisme, la perméabilité membranaire, la reproduction, le développement embryonnaire ou l'homéostasie, ce qui entraîne des conséquences sur la croissance et la survie des organismes et des populations (Calabrese *et al.*, 1977; Rainbow, 2002).

1.3.1.1. Cas du cuivre

La toxicité du cuivre en milieu marin dépend de sa forme chimique et de son état d'oxydation. A faible concentration, le cuivre est un élément essentiel pour les organismes. Chez certaines espèces comme les mollusques, il participe au transport de l'oxygène *via*

l'hémocyanine qui contient deux atomes de cuivre dans son site actif (Salvato *et al.*, 1998). Le cuivre a un effet léthal sur les larves d'*Ostrea edulis* (CL_{50} à 48h de 1-3 µg.L^{-1}) (Connor, 1972).

1.3.1.2. Cas du nickel

Le nickel, très faiblement absorbé par les organismes, est un élément essentiel à faible concentration. Il intervient dans la biosynthèse de l'hydrogénase et de la monoxyde de carbone déshydrogénase et est utilisé comme cofacteur par des enzymes telles que l'urease ou la ferredoxin hydrogénase. Sa toxicité pour les organismes marins est considérée comme relativement faible. Sa concentration dans les organismes filtreurs a peu varié depuis qu'il est mesuré (Commissariat général au développement durable, 2011).

Des études de toxicité ont été réalisées sur les huîtres *Crassostrea virginica* (Calabrese *et al.*, 1973) et *Mercenaria mercenaria* (Calabrese and Nelson, 1974). Le nickel a un effet léthal sur ces organismes, leurs CL_{50} à 48h sont respectivement de 1,8 et 0,31 mg.L^{-1} et leurs CL_{100} à 48h respectivement de 3 et 0,6 mg.L^{-1}.

1.3.1.3. Cas du plomb

La toxicité du plomb à de faibles concentrations n'est plus à démontrer depuis de nombreuses années. Il ralentit par exemple la croissance chez le phytoplancton à partir de 0,5 µg.L^{-1} (Chiffoleau *et al.*, 2011) et a un effet léthal sur le développement des larves de mollusques comme *Crassostrea virginica* (CL_{50} à 48 h de 2,45 mg.L^{-1}) (Calabrese *et al.*, 1973).

1.3.1.4. Cas du zinc

Le zinc présente une toxicité importante pour les organismes marins, en particulier les mollusques bivalves. Il a été démontré que le chlorure de zinc avait un effet léthal sur les larves véligères de *Crassostrea virginica* (à 48 h CL_{50} = 310 µg.L^{-1} et CL_{100} = 500 µg.L^{-1}) (Calabrese *et al.*, 1973) et que le sulfate de zinc a un effet léthal sur les jeunes larves de *Mercenaria mercenaria* (à 48 h CL_{100} = 250 µg.L^{-1}) (Calabrese and Nelson, 1974).

1.3.2. Des organismes bioindicateurs et bioaccumulateurs de métaux

Lorsqu'un écosystème est perturbé par un polluant, comme les métaux, ou une altération des conditions environnementales, certaines espèces ou communauté d'espèces peuvent être affectées et ainsi refléter l'état de leur écosystème soumis à ce stress (Webster *et al.*, 2001). La mesure des différents paramètres biologiques de ces organismes bioindicateurs permet principallement de caractériser les effets physiologiques provoqués par l'exposition à un perturbateur et de biosurveiller les écosystèmes marins (Kaiser, 2001).

Les bioaccumulateurs sont des organismes capables d'accumuler spécifiquement certains contaminants dans des proportions supérieures à leur environnement. Cette bioaccumulation résulte de deux processus, la bioconcentration c'est-à-dire, le transfert direct des contaminants du milieu (eau de mer, sédiments) vers les tissus et les organes et la bioamplification qui correspond au transfert des substances métalliques le long de la chaîne alimentaire (Gray, 2002). Les organismes bioaccumulateurs permettent d'évaluer et de suivre l'état des écosystèmes contaminés par des polluants présents et toxiques à de faibles concentrations (Kaiser, 2001).

Les organismes de la macrofaune benthique, illustrés par les Spongiaires, certains Cnidaires, les Echinodermes, les Polychètes, les Mollusques et certains poissons, sont considérés comme de bons bioindicateurs et bioaccumulateurs de métaux en raison de leur mode de vie sédentaire, leur résistance aux métaux, leur abondance le long des côtes, leur taille facilitant leur collecte et leur mode de nutrition (Rainbow and Phillips, 1993).

Les Spongiaires sont un exemple majeur de bioindicateurs de pollution métallique. Ils représentent l'un des principaux groupes marins benthiques et ont un rôle écologique clé dans de nombreuses communautés des récifs coralliens. Ce sont des organismes sessiles et des filtreurs actifs connus pour accumuler les métaux aussi bien sous forme dissoute que particulaire (Pan *et al.*, 2011; Mayzel *et al.*, 2014). La concentration en métaux dans les tissus dépend de l'espèce métallique étudiée (Patel *et al.*, 1985). Ces concentrations reflèteraient différents niveaux de contamination environnementale. Par exemple, dans des conditions de laboratoire contrôlées, l'éponge *Halichondria panicea* accumule le cuivre, le zinc et le cadmium proportionnellement aux concentrations de la colonne d'eau (Hansen *et al.*, 1995). Les Spongiaires ont développé des mécanismes physiologiques qui leur permettent de s'adapter et de survivre à de larges gammes de concentrations métalliques. Certains auteurs ont proposé que certaines espèces de Spongiaires maintiendraient d'importantes

concentrations intracellulaires en métaux comme mécanisme de défense contre la prédation et le biofouling (Webster *et al.*, 2001).

Les Spongiaires peuvent ainsi refléter de façon directe les niveaux de contamination métallique environnementale à la fois par mesure des concentrations en métaux dans leurs tissus et de façon indirecte par l'observation des réponses physiologiques qui s'en suivent comme la reproduction, la morphologie ou la croissance (Cebrian *et al.*, 2003).

1.4. Les procédés de dépollution métallique

Les émissions métalliques dans les sols, dans l'air représentent de sérieux dangers pour la santé et l'environnement. Limiter leurs effets toxiques apparait comme un enjeu majeur de société et nécessite la mise en place par les pouvoirs publics et les sociétés privées de traitements appropriés à l'échelle locale et internationale.

La dépollution consiste à éliminer une pollution d'un site contaminé afin de rétablir une qualité écologique et sanitaire équivalente à l'état antérieur à la pollution. Les techniques de dépollution doivent répondre à un ensemble de critère définis en 1994 par le Laboratoire Central des Ponts et Chaussées :

- Retrait ou neutralisation des matières incriminées,
- Utilisation *a minima* sur les ressources mises en œuvre (eau, air, énergie…),
- Absence d'émissions secondaires contenant des polluants ou de nouvelles substances toxiques,
- Taux de recyclage du matériau traité important,
- Minimisation de la quantité et du danger potentiel des matières résiduelles.

Le traitement des eaux polluées par des métaux peut être réalisé par des procédés physico-chimiques classiques *ex situ* incluant la précipitation, l'échange d'ions, l'osmose inverse, l'adsorption, l'électrodialyse ou la nanofiltration (Fu and Wang, 2011), auxquels s'ajoutent les procédés biologiques *in situ* comme la phytoremédiation (Vavasseur *et al.*, 2003), la bioremédiation (Lovley and Coates, 1997; Gadd, 2000) et la zooremédiation (Gifford, Dunstan, *et al.*, 2006).

1.4.1. Les méthodes physico-chimiques

1.4.1.1. La précipitation chimique

Cette méthode est largement utilisée dans l'industrie. Après ajustement du pH du milieu à des conditions basiques, des réactifs de précipitation (sulfures, carbonates, phosphates,…) ou des agents de coagulation-floculation (chlorure ferrique, hydroxyde d'aluminium) sont ajoutés à un milieu liquide contenant des métaux sous forme dissoute. Ils forment alors des précipités solides et insolubles qui peuvent ensuite être facilement extraits de la phase liquide par des méthodes physiques comme la sédimentation ou la filtration (Muchie and Akpor, 2010; Fu and Wang, 2011).

Le traitement des eaux par précipitation est un processus simple et peu coûteux mais qui nécessite une grande quantité de réactifs chimiques et conduit à une importante production de boues à traiter.

1.4.1.2. L'échange d'ions

L'échange d'ions est un procédé physique de purification des eaux usées industrielles riches en ETM mis au point par Hamon et Thomas-Bouil en 1990. La cinétique de dépollution très rapide de cette méthode permet de traiter efficacement une grande quantité de déchets (Kang *et al.*, 2004). Cette méthode agit par l'intermédiaire d'une phase solide immobile, ou résine qui va échanger ses cations avec les métaux de même charge de la phase aqueuse (Kurniawan *et al.*, 2006).

Les résines peuvent être soit de nature minérale comme les zéolithes clinoptilolithes composés de silicates, (Blanchard *et al.*, 1984; Alvarez-Ayuso *et al.*, 2003), soit des polymères de synthèse avec des groupements sulfoniques acides ($-SO_3H$) ou des groupements carboxyliques acides ($-COOH$) (Fu and Wang, 2011). Les métaux sont échangés pour les ions hydrogènes selon le processus suivant :

$$\underset{\text{(Résine)}}{nR-SO_3H} + \underset{\text{(Solution)}}{M^{n+}} \leftrightarrow \underset{\text{(Résine)}}{(R-SO_3^-)_nM^{n+}} + \underset{\text{(Solution)}}{nH^+}$$

$$\underset{\text{(Résine)}}{nR-COOH} + \underset{\text{(Solution)}}{M^{n+}} \leftrightarrow \underset{\text{(Résine)}}{(R-COO^-)_nM^{n+}} + \underset{\text{(Solution)}}{nH^+}$$

1.4.1.3. L'osmose inverse

L'osmose inverse est une technique qui permet de retenir sur une membrane semi-perméable les métaux, les contaminants ioniques et les composés organiques dissous contenus dans la phase aqueuse qui traverse cette membrane par l'application d'une pression hydrostatique (Volesky, 2003; Pawlak *et al.*, 2006). Ce filtre moléculaire aspécifique permet de récupérer 99% des minéraux dissous. La législation environnementale imposant des normes de plus en plus strictes, la taille des pores de la membrane a été fixée à 10^{-4} µm (Bohdziewicz *et al.*, 1999).

1.4.2. La biodépollution

La biodépollution regroupe un ensemble de méthodes biologiques visant à éliminer, dégrader ou stabiliser les polluants contenus dans les sols, les sédiments ou des effluents liquides. Elles s'appuient sur le métabolisme de certains micro-organismes et macro-organismes et leur capacité à dégrader la matière organique. Ces approches biotechnologiques sont des alternatives aux méthodes physico-chimiques classiques.

1.4.2.1. La phytoremédiation

La phytoremédiation est une méthode qui consiste à utiliser les végétaux, herbacées, plantes, arbustes, arbres, comme outils de dépollution (Raskin *et al.*, 1997; McCutcheon and Schnoor, 2003; Pilon-Smits, 2005). En effet, de par leur immobilité, les végétaux sont soumis à de nombreuses pressions de leur environnement et ont développé des adaptations variées au cours de leur évolution. Le principal système de défense contre les changements géochimiques locaux est la mise en place de systèmes biochimiques et enzymatiques. La phytoremédiation peut être catégorisée en cinq domaines différents (Figure 3).

La phytoextraction ou phytoaccumulation consiste à utiliser la capacité des plantes à extraire et concentrer les métaux dans les tissus aériens sans impliquer leur dégradation. Il est donc nécessaire de récolter et d'incinérer ces parties aériennes à la fin du processus (Arthur *et al.*, 2005; Guillaume Losfeld *et al.*, 2012). Par exemple, chez la Brassicacée *Thlaspi caerulescens* aussi connue sous le nom de tabouret bleu, le zinc est séquestré sous forme soluble préférentiellement dans des vacuoles des cellules épidermales. Il peut représenter jusqu'à 1,7% de la masse sèche des feuilles (Frey *et al.*, 2000).

La phytodégradation utilise la capacité des plantes à détoxifier les polluants en molécules moins toxiques par voies métaboliques mais elle ne s'applique pas aux métaux (Muchie and Akpor, 2010).

La phytostabilisation repose sur la capacité des plantes à réduire la mobilité et la biodisponibilité des polluants pour limiter leur dispersion dans l'environnement. Les racines de la plante absorbent les polluants et les conservent au niveau de la rhizosphère (Cunningham and Berti, 2000; Jadia and Fulekar, 2009).

La phytovolatilisation utilise les végétaux pour extraire les polluants d'un milieu contaminé, comme le sélénium ou le mercure. Les contaminants sont ensuite relargués dans l'atmosphère par évapotranspiration (Robinson *et al.*, 2006).

Enfin, la rhizodégradation correspond à l'accumulation et la dégradation des polluants par l'action conjointe des racines et de leurs micro-organismes associés c'est-à-dire par la rhizosphère (Lone *et al.*, 2008). Cette méthode n'est pas adaptée à la dépollution métallique.

La biomasse produite lors des traitement de phytoremediation est récoltée, traitée et peut être valorisée (valorisation énergétique, en métallurgie ou en biosynthèse). Par exemple, la biomasse des plantes hyperaccumulatrice de nickel, *Psychotria douarrei* et *Geissois pruinosa*, récoltées de sols miniers de Nouvelle Calédonie, est valorisée. Le nickel extrait est utilisé comme catalyseur acide de Lewis dans des réactions de chimie organique qui permettent de former des molécules à haute valeur ajouté (Guillaume Losfeld *et al.*, 2012). La biomasse de la plante hyperaccumulatrice de zinc, *Thlaspi caerulescens*, permet de récolter du zinc qui sert à la préparation de réactif de Lucas. Ce réactif est alors utilisé dans la chloration d'alcools tertiaires, secondaires et primaires (G. Losfeld *et al.*, 2012).

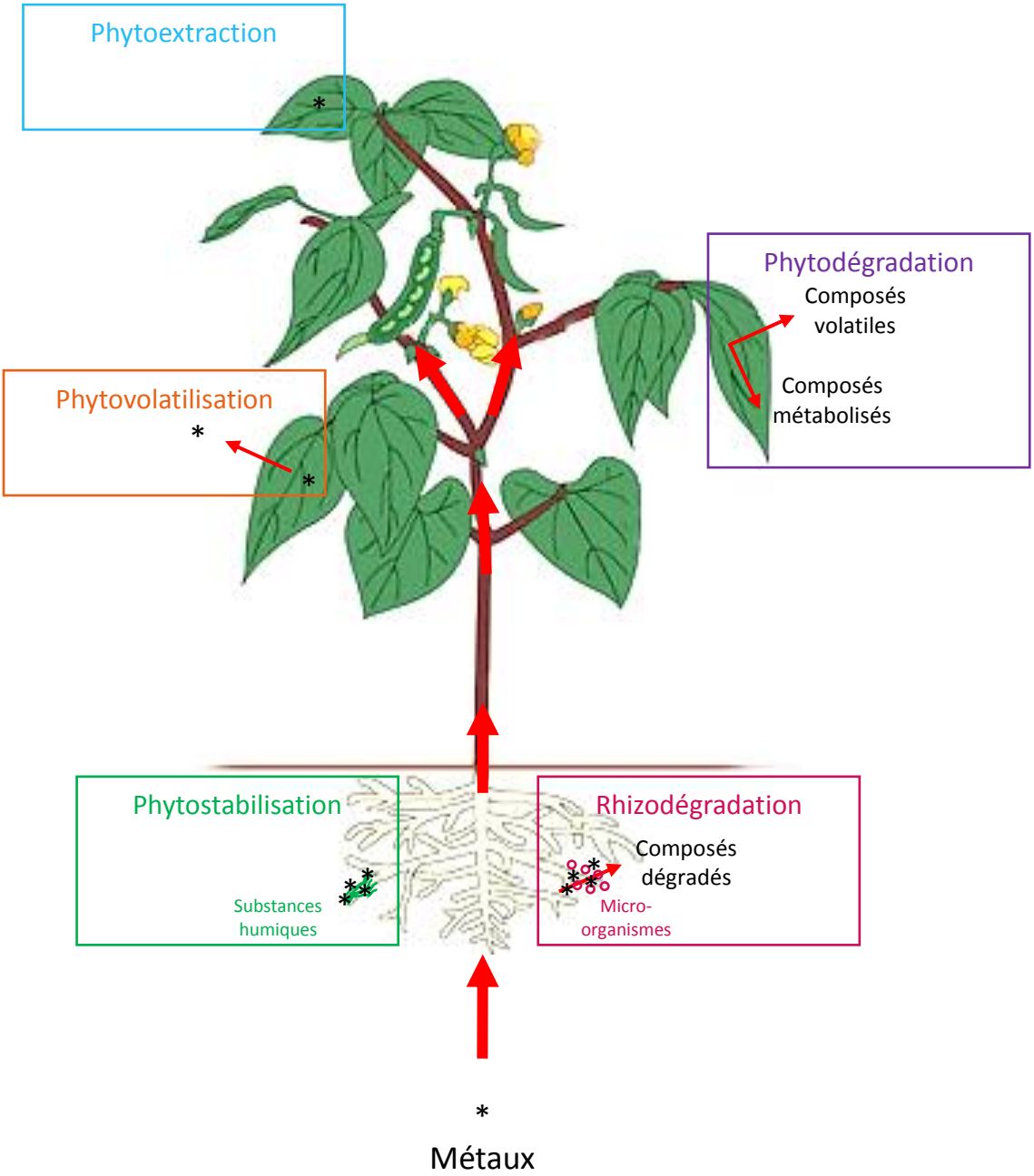


Figure 3 : Illustration des cinq principaux mécanismes de phytodépollution que sont la phytoextraction, la phytodégradation, la phytostabilisation, la phytovolatilisation et la rhizodégradation. Modifiée d'après http://www.infovisual.info/01/003_fr.html

1.4.2.2. La phycoremédiation

La phycoremédiation correspond à l'utilisation de la biomasse algale comme vecteur de sorption des métaux. Les algues marines sont facilement disponibles en grande quantité pour le développement de matériaux biosorbants. La biosorption des métaux par les algues a principalement été attribuée à la présence d'alginates, polysaccharides caractérisés par un

faible rapport acide mannuronique / acide guluronique. Elle est favorisée par la porosité des parois cellulaires. L'échange d'ions serait le principal mécanisme mis en place dans la biosorption (Fourest and Volesky, 1997; Figueira *et al.*, 2000). La plupart des algues, et notamment les algues brunes, ont la propriété d'accumuler les métaux lourds, comme les plantes terrestres. Par exemple, certaines espèces des genres *Durvillaea*, *Laminaria*, *Ecklonia* et *Homosira* sont capables d'adsorber le cadmium (Figueira *et al.*, 2000). L'algue brune *Sargassum* sp., collectée dans la baie de Naples, est capable de fixer l'uranium (Yang and Volesky, 1999). L'algue rouge *Laurencia obtusa*, les algues brunes *Sargassum asperifolium*, *Cystoseira trinode* et *Turbinaria decurrens* récoltées sur une plage de la Mer Rouge dans la région égyptienne de Hurghada sont capables de séquestrer le chrome, le cobalt, le nickel, le cuivre et le cadmium avec des niveaux d'accumulation dépendant à la fois du biosorbant et de l'espèce métallique à traiter (Hamdy, 2000).

De nouvelles techniques de dépollution innovantes découlent des propriétés des algues marines à accumuler les métaux. Par exemple, AlgaSORB est une colonne chromatographique composée de polyélectrolytes cationiques, poly (*N*-xylène-*N*,*N'* dicyclohexyl éthylène diamine dibromide) qui sont associés de façon électrostatique avec un biofilm de l'algue *Spirogyras* sp. immobilisé sur gel de silice. Ce système est utilisé pour isoler le cuivre (II) à partir d'échantillons aqueux contaminés (Singh and Prasad, 2000).

1.4.2.3. La bioremédiation

La biorémédiation englobe toutes les techniques qui utilisent le potentiel métabolique des micro-organismes, en particulier des bactéries, pour traiter *in situ* ou *ex situ* les sols, les boues, les sédiments ou effluents liquides contaminés. Cette technique permet d'augmenter la biodégradation des polluants soit par innoculation de souches bactériennes ou fongiques spécifiques, soit par biostimulation de l'activité de dégradation des populations microbiennes environnementales, par exemple, par un apport de nutriments au milieu (Boopathy, 2000). Le développement de l'engineering moléculaire permet d'utiliser les capacités de détoxification des souches bactériennes pour créer des outils de détection et de biorémédiation des métaux dans les environnements pollués (Lloyd, 2002). Ce point sera détaillé dans le paragraphe 2.3.

1.4.2.4. La zooremédiation

Les connaissances sur les capacités bioremédiatrices des animaux sont encore peu explorées à cause de problèmes d'éthique et des intérêts économiques et commerciaux que représentent les organismes aquatiques comme produits de consommation humaine.

Un certain nombre d'organismes aquatiques ont pourtant été décrits pour leurs propriétés d'hyperaccumulation, de stabilisation, de dégradation et de résistance aux métaux (Gifford, Dunstan, *et al.*, 2006). Ces organismes doivent par ailleurs avec une valeure économique pour financer en retour la remédiation. Un intérêt croissant a été porté aux mollusques bivalves comme les huîtres perlières (Gifford *et al.*, 2004, 2005; Gifford, Macfarlane, *et al.*, 2006) ou les moules (Jana and Das, 1997; Gifford *et al.*, 2004) et mollusques gastéropodes (Hossain and Aditya, 2013) pour leur capacité à accumuler et dépolluer les métaux toxiques (Tableau 2).

Tableau 2 : Quelques exemples de capacité d'accumulation métallique chez des organismes marins.

Classe	Espèce	Métal	Accumulation ($mg.kg^{-1}$)	Référence
Mollusques bivalves	*Crassostrea virginica*	cuivre	2013	Olivier *et al.*, 2001
	Mytilus edulis	plomb	506	Bourgoin, 1990
	Pinctada albina albina	cadmium	108	Francesconi, 1989
	Crassostrea rhizophorae	aluminium	2240	Sbriz *et al.*, 1998
	Crassostrea virginica	zinc	9077	Olivier *et al.*, 2001
	Lamellidens marginalis	cadmium	> 500	Jana and Das, 1997
Démosponge	*Halichondria panicea*	cadmium	271	Hansen *et al.*, 1995

1.4.2.4.1. La zooremédiation par les mollusques bivalves

De nombreuses espèces de bivalves filtreurs agissent comme des biocapteurs métalliques (de Lafontaine *et al.*, 2000). Les métaux sont incorporés à la fois dans les tissus par absorption et dans leur squelette externe lors du processus de biominéralisation (Lingard *et al.*, 1992). Cette biominéralisation permet la séquestration des métaux dans la coquille des mollusques bivalves et limite leur incorporation dans les tissus. Elle pourrait être une forme de détoxification des métaux afin d'en atténuer les effets toxiques sur le métabolisme de ces organismes (Bertine and Goldberg, 1972). Les capacités d'absorption et de séquestration des métaux dépendent de nombreux facteurs tels que la taille, l'âge, le sexe, les saisons, la salinité, la température de l'eau et les niveaux de pollution locale.

L'huître perlière *Pinctada imbricata* est l'exemple le mieux décrit de mollusque bivalve cultivé pour la remédiation de contaminants métalliques en zones côtières (Gifford *et al.*, 2004). En effet, ces huîtres filtrent activement l'eau de mer, jusqu'à 25 $L.h^{-1}.g^{-1}$ de tissus (Pouvreau *et al.*, 1999), sont endémiques de nombreuses régions du monde (Colgan and Ponder, 2002), accumulent rapidement les métaux dans leurs tissus et coquilles (Bou-Olayan *et al.*, 1995; Al-Madfa *et al.*, 1998) et produisent des perles à haute valeur ajoutée.

Dans les fermes aquacoles de Port Stephens, en Australie, chaque tonne d'huîtres perlières récoltée concentrait approximativement 703 g de métaux comme le plomb, l'aluminium, le cuivre, le zinc et le fer (Gifford *et al.*, 2005). L'huître *P. imbricata* est relativement tolérante au plomb et au zinc jusqu'à des concentrations de 90 $\mu g.L^{-1}$ (Gifford, Macfarlane, *et al.*, 2006), qui sont supérieures aux valeurs retrouvées dans des estuaires ou ports impactés par les activités humaines (Dassenakis *et al.*, 1997). Les métaux principalement incorporés dans les tissus de l'huître n'affectent pas la formation des perles. L'aquaculture perlière pourrait faire partie d'une stratégie globale de gestion de la qualité des eaux des écosystèmes côtiers. Les polluants environnementaux pourraient ainsi être utilisés pour générer un retour économique permettant au programme de bioremédiation de s'autofinancer.

1.4.2.4.2. L'avenir de la zooremédiation : les Spongiaires ?

Les Spongiaires sont des organismes sessiles qui filtrent activement l'eau de mer et retiennent ainsi les particules et micro-organismes en suspension dans la colonne d'eau (Topçu *et al.*, 2010) et peuvent accumuler les métaux, aussi bien sous forme dissoute que particulaire, proportionnellement à la charge environnementale (Cebrian *et al.*, 2007). Les Spongiaires ont été proposés comme bioindicateurs de la disponibilité des métaux dans les environnements marins (Pérez *et al.*, 2005; Pan *et al.*, 2011). Ce sont à la fois des bioaccumulateurs et bioindicateurs de pollution aussi bien microbienne (Milanese *et al.*, 2003) que métallique (Patel *et al.*, 1985; Cebrian *et al.*, 2003) (Tableau 2). L'intérêt des Spongiaires par rapport aux mollusques des millieux superficiels réside principalement dans leur capacité à coloniser un plus vaste gradient vertical. Ces organismes sont aussi une source importante de composés bio-actifs d'intérêt pharmacologique à haute valeur économique (Mayer *et al.*, 2010; Blunt *et al.*, 2014). Par exemple, la molécule latrunculine B, isolée de l'éponge *Negombata magnifica*, qui inhibe la réorganisation du cytosquelette d'actine (Hadas

et al., 2005). Les Spongiaires réunissent donc les caractéristiques nécessaires pour devenir des outils de zooremédiation des milieux aquatiques.

Des recherches complémentaires devraient cependant être menées afin de vérifier si l'exposition à des polluants n'altère pas l'expression métabolique des Spongiaires. Par ailleurs, des missions de bioprospection permettraient de trouver de nouvelles espèces capables de stabiliser, transformer, dégrader ou accumuler les polluants métalliques.

La compréhension de la résistance bactérienne aux métaux est importante afin de développer des processus de bioremédiation et pour comprendre et exploiter le rôle joué par les bactéries dans la tolérance et l'accumulation de métaux chez les organismes supérieurs (mollusques bivalves, spongiaires…).

2. Bactéries marines tolérantes aux métaux

L'analyse des populations bactériennes capable de survivre dans des environnements contaminés par les métaux lourds est la première étape de la compréhension des interactions entre les bactéries et leur environnement riche en métaux (Watanabe, 2001).

2.1. Communautés bactériennes des milieux marins riches en métaux

La structure des communautés microbiennes associées à des environnements marins pollués en métaux a été étudiée par des méthodes culture dépendante, avec l'isolement de bactéries tolérantes aux métaux, et culture indépendante par l'analyse de la diversité moléculaire des ADNr16S extraits de ces environnements. Le Tableau 3 résume une partie des études menées ces trois dernières décennies sur les communautés microbiennes marines résistantes aux métaux toxiques que l'on retrouve soit libres dans l'eau de mer, soit associées à des sédiments ou à des invertébrés marins. Les espèces de corail *Porites lutea*, *Galaxea fascicularis* et *Pocillopora damicornis*, les polychètes *Alvinella pompejana et Alvinella caudata*, l'éponge *Fasciospongia cavernosa* ou des crevettes en sont une brillante illustration. Ces études ont été réalisées dans des lieux connus pour leurs niveaux de pollution métallique, en Inde (De *et al.*, 2008; Selvin *et al.*, 2009) et en Indonésie (Sabdono *et al.*, 2012), au Brésil (Almeida *et al.*, 2009), en Turquie (Matyar *et al.*, 2008), en Egypte (Sabry *et al.*, 1997) ou dans des sources naturelles de métaux comme les sources hydrothermales du site de Parigo sur la dorsale est-Pacifique (Jeanthon and Prieur, 1990). Les espèces bactériennes isolées

présentent une remarquable biodiversité, sont spécifiques de l'habitat impacté et peuvent être organisées en dix classes illustrées par les *α-Proteobacteria*, les *β-Proteobacteria*, les *γ-Proteobacteria*, les *Sphingobacteria*, les *Actinobacteria*, les *Acidobacteria*, les *Cyanophyceae*, les *Bacilli*, les *Flavobacteria* et les *Cytophagia* ainsi que des bactéries non classifiées. La classe majoritairement représentée dans toutes les études est celle des *γ-Proteobacteria*.

Une seule étude a mis en évidence la présence d'archées, les *Crenarchaeota* dans des eaux de drainage d'une mine de zinc abandonnée qui présentait les plus fortes concentrations en zinc rapportées à ce jour (Almeida *et al.*, 2009). Ces archées n'étaient, pas spécifiques du lieu impacté par la contamination et présentaient une diversité plus faible que celle des bactéries.

Les souches isolées ont été caractérisées du point de vue de leurs niveaux de résistance à différents métaux toxiques auxquels ils ont été exposés en laboratoire. La plus forte tolérance a été observée chez les souches isolées sur les sédiments, eau de mer et crevettes collectés dans la baie d'Iskenderum en Turquie avec des niveaux supérieurs à 448 $mmol.L^{-1}$ pour le chrome, 430 $mmol.L^{-1}$ pour le manganèse, 368 $mmol.L^{-1}$ pour le cadmium, 357 $mmol.L^{-1}$ pour le cuivre et 282 $mmol.L^{-1}$ pour le plomb (Matyar *et al.*, 2008).

La diversité et le rôle que ces microorganismes jouent *in situ* restent encore largement inconnus car seule une faible fraction du microbiote marin est cultivable en laboratoire (Giovannoni and Stingl, 2005). La présence de phylotypes bactériens testés pour être tolérants aux métaux pourrait refléter l'accumulation des métaux par leur hôte et donc la contamination du milieu (Kaluzhnaya and Itskovich, 2014). Ces souches bactériennes seraient de bons indicateurs biologiques de contamination métallique et permettraient ainsi de caractériser l'état des écosystèmes marins. Par ailleurs, les souches bactériennes sont capables de se développer dans des milieux hautement contaminés en métaux et pourraient devenir des outils intéressants pour la biorémédiation des environnements aquatiques contaminés (Santos-Gandelman *et al.*, 2014).

Tableau 3 : Bactéries résistantes isolées d'environnements contaminés en métaux toxiques.

Site	Origine	Métaux d'exposition	Méthode	Classes bactériennes	Résistance (mmol.L^{-1})	Référence
Source hydrothermale de Parigo sur la dorsale est-Pacifique	Polychètes : *Alvinella pompejana* *Alvinella caudata*	cadmium zinc cuivre arséniate argent sélénate	Isolement sur boîte Caractérisation phénotypique	*γ-Proteobacteria* Bactéries N.C.	cadmium (≥10) zinc (≥10) arséniate (≥25) argent (≥2)	Jeanthon and Prieur (1990)
Port d'Alexandrie, Egypte	Eau de mer	cobalt plomb cadmium zinc cuivre nickel mercure	Isolement sur boîte	-	cobalt (2,5) plomb (5) cadmium (2) zinc (2,5) cuivre (2) nickel (10) mercure (0,25) arséniate (10)	Sabry *et al.* (1997)
Baie de GoM, Inde du Sud	Eponge : *Fasciospongia cavernosa*	cuivre cadmium plomb nickel zinc chrome	Isolement sur boîte Caractérisation phénotypique	*Cytophagia* *Actinobacteria* *α-Proteobacteria* *γ-Proteobacteria*	cuivre (160) cobalt (160) cadmium (160) plomb (160) nickel (160) zinc (160) mercure (160)	Selvin *et al.* (2007)
Ferme aquacole, Australie	Sédiment Truite arc-en-ciel : *Oncorhynchus mykiss*	-	Culture en milieu liquide Culture sur boîte Caractérisation phénotypique	*γ-Proteobacteria*	cadmium (92) chrome (448) cobalt (90) manganèse (>430) pomb (282) zinc (224) cuivre (357)	Olasumbo *et al.* (2007)
Côte indienne, Inde	Eau de mer	-	Isolement sur boîte Séquençage ADNr 16S	*β-Proteobacteria* *Bacilli* *γ-Proteobacteria* *Actinobacteria*	mercure (2) cadmium (12) plomb (9)	Ramaiah and Vardanyan (2008)
Baie de Iskenderum, Turquie	Eau de mer Sédiments Crevettes	-	Isolement sur boîte Caractérisation phénotypique	*α-Proteobacteria* *β-Proteobacteria* *γ-Proteobacteria* *Flavobacteria*	cadmium (>368) cuivre (>357) plomb (>282) manganèse (>430) chrome (>448)	Matyar *et al.* (2008)
Baie de Sepetiba, Brésil	Eau de mer	zinc cadmium plomb	Clonage Séquençage ADNr 16S	*α-Proteobacteria* *β-Proteobacteria* *γ-Proteobacteria* *Sphingobacteria* *Actinobacteria* *Acidobacteria* *Cyanophyceae* Bactéries N.C. *Crenarchaeota*	-	Almeida *et al.* (2009)
Java Central, Indonésie	Corail : *Porites lutea* *Galaxea fascicularis* *Pocillopora damicornis*	plomb chrome zinc fer cuivre cadmium	Isolement sur boîte Séquençage ADNr 16S	*Bacilli* *γ-Proteobacteria*	plomb (≤10) chrome (≤5) zinc (≤1,5)	Sabdono *et al.* (2012)

2.2. Réponse bactérienne à une exposition métallique

Chez les bactéries, certains métaux, dits essentiels, comme le nickel, le fer, le zinc ou le cuivre jouent un rôle essentiel dans certaines réactions biochimiques, sont indispensables à la régulation de la pression osmotique intracellulaire mais sont toxiques à fortes concentrations (Ji and Silver, 1995). D'autres métaux, dits toxiques, comme le mercure, le cadmium, le plomb ou l'argent, interagissent de façon covalente ou ionique avec les composants cellulaires essentiels. A des concentrations qui dépassent les capacités physiologiques des cellules, les métaux essentiels et toxiques peuvent endommager les membranes cellulaires ou la structure de l'ADN, altérer des enzymes spécifiques et les fonctions physiologiques sous-jacentes (Bruins *et al.*, 2000).

Pour survivre dans des environnements contaminés en métaux, les bactéries ont développé une mécanique complexe de régulation de leur homéostasie. Elles pallient ainsi leurs effets toxiques à de fortes concentrations (Nies, 1999). Cette homéostasie résulte de la coordination des systèmes de prise en charge, de stockage et de secrétion des métaux lourds. Il existe, en effet, une grande diversité de systèmes de régulation du métabolisme des métaux lourds dont l'expression des gènes est généralement régulée par la concentration dans le milieu (Figure 4) (Silver and Walderhaug, 1992; Lloyd, 2002).

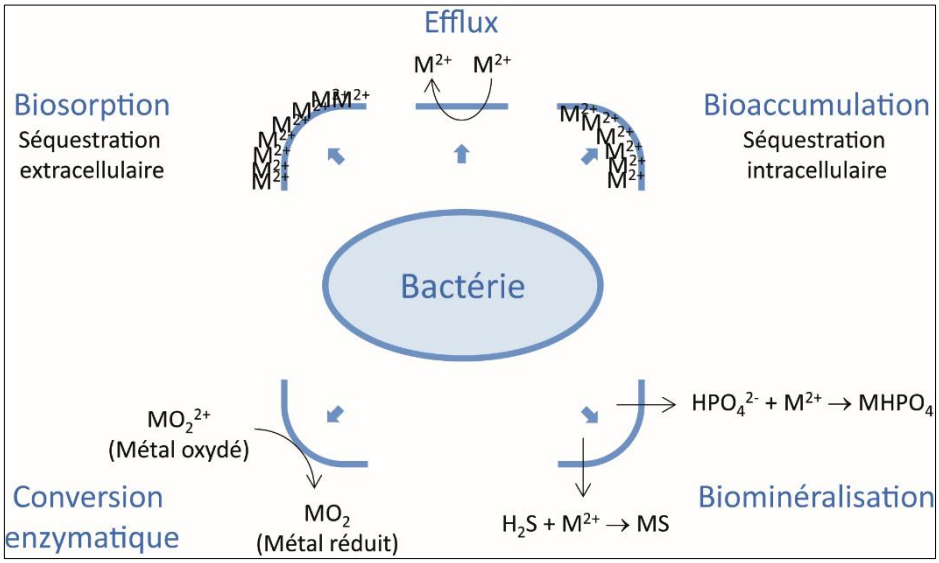


Figure 4 : Mécanismes bactériens de résistance aux métaux toxiques. M^{2+} correspond dans ce schéma au métal sous forme cationique pris en charge par la bactérie.

2.2.1. Systèmes d'import des métaux lourds

Les cellules bactériennes possèdent deux types de systèmes d'import des ions métalliques lourds.

Le premier est un système passif exprimé constitutivement, qui incorpore rapidement les ions au travers des membranes plasmiques bactériennes de façon non-spécifique en fonction du gradient chimio-osmotique. Il est constitué par des protéines de la famille des MIT (Metal Inorganic Transport), comme CorA pour le transport du nickel, du cobalt, du zinc ou du manganèse. Cette "porte ouverte" est la raison principale pour laquelle les métaux lourds sont toxiques. L'expression des gènes de la famille MIT peut être diminuée par mutation et ces mutants deviennent tolérants aux métaux. Par exemple, les mutants *corA* ont été décrits comme tolérants au cobalt (Nelson and Kennedy, 1971).

Le second système de transport est un système actif lent d'import qui possède une forte affinité pour son substrat et utilise l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie. Sa production est induite en fonction du gradient chimio-osmotique et des besoins de la cellule (Nies and Silver, 1995). Les ATPases de type P assurent l'import du manganèse, du magnésium, du calcium, du potassium, du cuivre, du zinc, du cadmium, du plomb et de l'argent (Fagan and Jr, 1994). Ces ATPases sont des pompes à cations qui doivent leur nom à la phosphorylation transitoire d'un résidu aspartate conservé pendant leur cycle réactionnel (Kühlbrandt, 2004). Il existe aussi des transporteurs lents avec une spécificité chimio-osmotique comme ceux de la famille HoxN pour le nickel et le cobalt (Tableau 4, Figure 8). Les ATP-binding cassette, ou transporteurs ABC, sont composés de deux sous-unités ATPase associées à la membrane cytoplasmique, d'un canal membranaire formé par deux sous-unités transmembranaires, une protéine de liaison aux ions dans l'espace périplasmique et une porine dans la membrane externe. Contrairement aux ATPases de type P, ces systèmes ne passent pas par un intermédiaire réactionnel phosphorylé. Ils prennent en charge le manganèse, le nickel, le zinc et le fer (Silver and Phung, 2005).

Pour les bactéries à Gram négatif, les systèmes d'import assurent le transport au travers de la membrane externe, du périplasme et de la membrane cytoplasmique. Un système de transport supplémentaire, les porines de la membrane externe, est nécessaire pour faire passer les métaux du milieu extérieur vers le périplasme (Ferguson and Deisenhofer, 2004).

Tableau 4 : Familles protéiques importantes pour l'import des métaux lourds. Les familles de MIT et HoxN utilisent l'énergie chimio-osmotique et les familles ABC et ATPase de type P sont des transporteurs qui utilisent l'énergie de l'ATP. MIT : Metal Inorganic Transport, ABC : ATP-binding cassette, HoxN : High-affinity nickel-transport protein. (Nies, 1999).

Famille	Energie	Ions métalliques	Composition
MIT	Chimio-osmotique	La plupart des cations	1 protéine intégrale de la membrane (Cor A)
HoxN	Chimio-osmotique	Co^{2+} et Ni^{2+}	1 protéine intégrale de la membrane
ABC	ATP	Mn^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+} et Fe^{2+}	2 domaines transmembranaires 2 domaines ATPasiques
ATPase de type P	ATP	Mg^{2+}, Mn^{2+}, Ca^{2+}, K^{+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+}, Pb^{2+} et Ag^{2+}	1 protéine liée à la membrane

2.2.2. Toxicité des métaux lourds

La toxicité intracellulaire des cations métalliques lourds a trois origines : la modification de la structure des acides nucléiques, l'inhibition des activités enzymatiques et l'interaction avec des dérivés réactifs de l'oxygène. La forte affinité des cations métalliques lourds pour les groupements phosphates ou soufrés entraîne la modification de la structure des acides nucléiques, empêchant ainsi la transcription et la traduction des gènes (Hengstler *et al.*, 2003).

De plus, les cations métalliques présents en excès dans la cellule vont entrer en compétition avec les cations physiologiques et en inhiber la fonction en se fixant sur les résidus cystéines, acide glutamique ou acide aspartique des sites actifs enzymatiques, ce qui provoque une inhibition de leurs activités (Nies, 1999). En se liant aux groupements thiols des acides nucléiques et des protéines, les métaux peuvent altérer leur structure conformationelle et en inhiber l'activité.

Enfin, les cations métalliques peuvent interagir avec les espèces réactives de l'oxygène et former, par la réaction de Fenton, des radicaux libres qui endommagent alors l'ADN et les protéines (Braymer and Giedroc, 2014). Chez les bactéries à Gram-négatif, ils peuvent se lier au glutathion et conduire à la formation de complexes bisglutathions qui ont tendance à réagir avec l'oxygène moléculaire (Kachur *et al.*, 1998).

2.2.3. Mécanismes de résistance

2.2.3.1. La séquestration

La séquestration des ions métalliques, qui peut être intra- ou extracellulaire, permet d'immobiliser rapidement les métaux par des interactions physico-chimiques et en limiter les effets toxiques en combinaison avec d'autres mécanismes de résistances (Gadd, 1990).

2.2.3.1.1. La séquestration intracellulaire

La séquestration intracellulaire ou bioaccumulation correspond à l'accumulation de métaux dans le cytoplasme pour en diminuer la biodisponibilité et préserver les composants cellulaires essentiels. Elle se fait par l'association des métaux comme le mercure, le cadmium, le plomb, le zinc, l'argent et le cuivre avec des protéines de haute affinité pour les ions métalliques de type métallothionéines (Bruins *et al.*, 2000; Blindauer *et al.*, 2001) (Figure 5). Les métallothionéines sont des molécules de faible poids moléculaire (6-7 kDa) riches en cystéines que l'on retrouve principalement chez les eucaryotes ainsi que chez quelques procaryotes (Hamer, 1986). Bien que de nombreux génomes bactériens aient été séquencés, peu de métallothionéines ont été identifiées à ce jour. Elles ont principalement été trouvées chez des *Cyanobacteria* et des bactéries du genre *Pseudomonas* (Blindauer *et al.*, 2002).

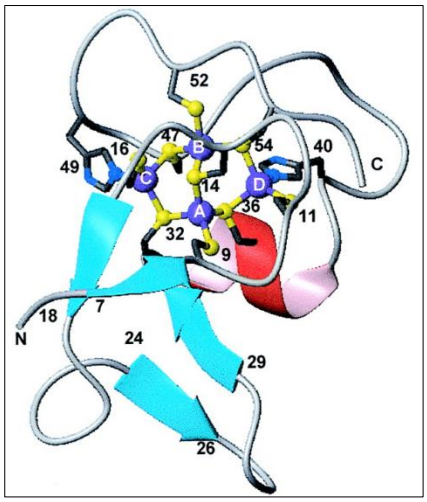


Figure 5 : Structure RMN de la métallothionéine bactérienne Zn4SmtA (Blindauer, 2001).

Les métallothionéines sont divisées en trois classes sur la base de leur structure et de leur contenu en cystéines. Les motifs caractéristiques et invariables des métallothionéines sont

Cys-Cys, Cys-X-Cys et Cys-X-X-Cys où X correspond à n'importe quel acide aminé à l'exception des acides aminés aromatiques et de l'histidine. La biosynthèse des métallothionéines est régulée au niveau transcriptionnel et peut être induite par des métaux.

Un exemple intéressant de métallothionéine a été identifié en 2002 chez la bactérie *Mycobacterium tuberculosis* responsable de la tuberculose, la métallothionéine MymT (Gold *et al.*, 2008). Cette protéine est capable de se lier et de séquestrer le cuivre de façon prédominante par rapport au zinc. Ce micro-organisme pathogène survit dans le phagosome des macrophages, où l'hôte produit des composés antimicrobiens, ainsi que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) (Finney, 2006). Les RNS vont induire la séparation de MymT et du cuivre. Le cuivre est alors détecté par le répresseur transcriptionnel sensible au cuivre (CsoR) qui va permettre l'expression de l'ATPase CtpV et donc l'export de cuivre dans le macrophage (Liu *et al.*, 2007). En parallèle, la bactérie produit dans le phagosome une superoxyde-dismutase à cuivre-zinc comme défense contre les composés microbiens produit par l'hôte (Robinson, 2008) (Figure 6).

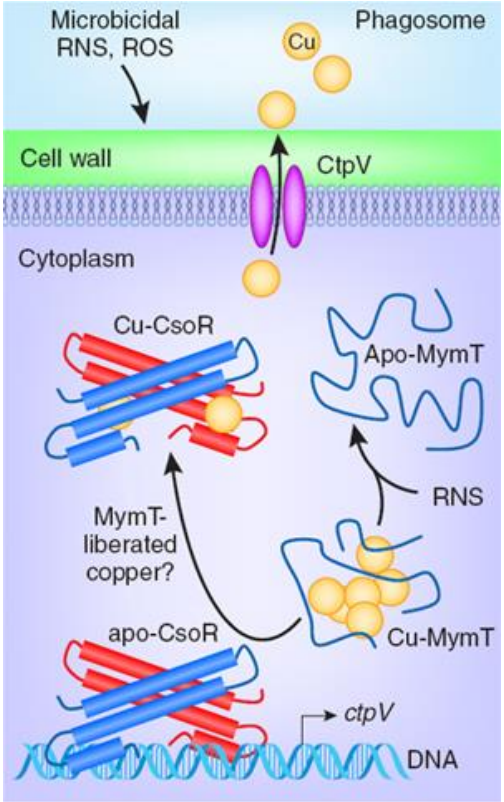


Figure 6 : Mécanisme d'action de la métallothionéine MymT de la bactérie *Mycobacterium tuberculosis* dans un phagosome d'un macrophage humain. ROS espèces réactives de l'oxygène, RNS espèces réactive de l'azote, CsoR répresseur transcriptionnel sensible au cuivre, CtpV ATPase transporteur de cuivre (Robinson, 2008).

Très peu de métallothionéines ont, à ce jour, été décrites chez des bactéries d'origine marine. Une métallothionéine est utilisée par la protéobactérie marine *Marinobacter* sp. pour détoxifier le cadmium (Ivanova *et al.*, 2002) et cette protéine est codée par le gène *smtA* chez une cyanobatérie du genre *Synechococcus* (Ji and Silver, 1995).

2.2.3.1.2. La séquestration extracellulaire

La séquestration extracellulaire correspond à deux processus cellulaires, la biosorption et la biominéralisation. La biosorption se fait *via* l'interaction des métaux avec les groupements anioniques de la paroi cellulaire (groupements thiol, hydroxyle, carboxyl, sulfonate, amine, amide, phosphonat) ou par association à des substances polymériques extracellulaires (polysaccharides, protéines, acides nucléiques ou acides gras) (Scott and Palmer, 1988, 1990). La biominéralisation agit en formant des cristaux qui vont s'adsorber de façon non spécifique sur la paroi cellulaire.

Les substances polymériques extracellulaires (EPS) constituent une barrière protectrice hautement hydratée qui joue un rôle dans la survie des bactéries puisqu'elle permet de tamponner les variations physicochimiques du milieu naturel (Harrah *et al.*, 2006). Elles assurent des fonctions variées comme la lutte contre la dessiccation, les substances hydrophobes toxiques, la résistance aux antibiotiques, la capture des minéraux essentiels et des nutriments et la biosorption des métaux (Comte *et al.*, 2008; De Philippis *et al.*, 2011). Les EPS représentent les constituants majoritaires de la matrice des biofilms et jouent un rôle dans l'agrégation des cellules entre elles et dans l'adhérence des microorganismes sur une surface biotique ou abiotique.

Les EPS de bactéries marines ont été largement isolées et caractérisées pour leur propriétés chélatrices des métaux lourds (Geesey *et al.*, 1992; Bhaskar and Bhosle, 2005) comme cela est illustré avec les bactéries du genre *Pseudoalteromonas*, isolées dans l'Océan Austral (Nichols *et al.*, 2004, 2005), l'Océan Atlantique (Gutierrez *et al.*, 2008) ou des sources hydrothermales (Rougeaux *et al.*, 1999). Les EPS produites par les bactéries marines possèdent une charge nette négative supérieure à celle de bactéries non-marines à cause de leur importante composition en acides uroniques (20-50%) représentés par les acides D-glucuroniques et D-galacturoniques (Kennedy and Sutherland, 1987; Ford *et al.*, 1991).

Deux études ont rapporté les capacités des exopolymères produits par les bactéries hydrothermales *Alteromonas macleodii* subsp. *fijiensis*, *Alteromonas infernus*, *Vibrio*

diabolicus et *Pseudoalteromonas* sp.. Les auteurs proposent que cette sécrétion serait l'une des stratégies développée par les bactéries pour limiter leur exposition aux métaux toxiques dispersés par les sources hydrothermales. L'utilisation de ces exopolymères a été suggérée pour biodétoxifier des eaux polluées (De Philippis *et al.*, 2011).

Les EPS produites par la bactérie marine *Halomonas* sp. sont polydispersés et composés de glycoprotéines polyanioniques ayant une haute masse moléculaire (Gutierrez *et al.*, 2009). Elles ont été étudiées pour leur capacité à séquestrer les métaux traces essentiels comme le zinc, le silicium, le cuivre ou le fer et les espèces toxiques comme le cadmium, l'uranium ou le plomb. Elles en modifient ainsi la biodisponibilité et influencent la croissance des eucaryotes phytoplanctoniques associés, comme les diatomées *Thalassiosira weisflogii* (Gutierrez *et al.*, 2012).

La bactérie marine *Marinobacter* sp. produit des EPS décrites comme capables de lier efficacement les métaux et provoquer une bioaccumulation des polluants métalliques dans la chaîne alimentaire. En effet, elles sont consommées comme source d'énergie et de carbone par les organismes d'un niveau trophique supérieur comme cela a été démontré pour le polychète benthique *Hediste diversicolor* (Bhaskar and Bhosle, 2006).

Les EPS des bactéries marines semblent donc avoir un rôle important dans les cycles biogéochimiques des métaux lourds en modifiant leur biodisponibilité pour les organismes du milieu. Elles peuvent ainsi être vectrices d'accumulation des métaux dans la chaîne alimentaire. Ces EPS pourraient être utilisées comme un outil puissant de biorémédiation des métaux dans les environnements pollués.

2.2.3.2. La conversion enzymatique

La conversion par des enzymes oxydo-réductrices et métal-spécifiques consiste à transformer un cation métallique en un élément de niveau d'oxydation moins toxique ou sous une forme soluble qui peut être efficacement éliminée par la cellule. En effet, pour éviter la réoxydation des composés métalliques réduits, les métaux doivent pouvoir diffuser à l'extérieur de la cellule grâce à un système d'efflux (Wakatsuki, 1995). Ce mécanisme de résistance aux métaux toxiques peut être illustré par la bactérie *Geobacter sulfurreducens*, capable de réduire l'uranium (VI) soluble en uranium insoluble (IV), qui est alors précipité à la surface cellulaire et dans le périplasme (Lloyd, 2002) (Figure 7).

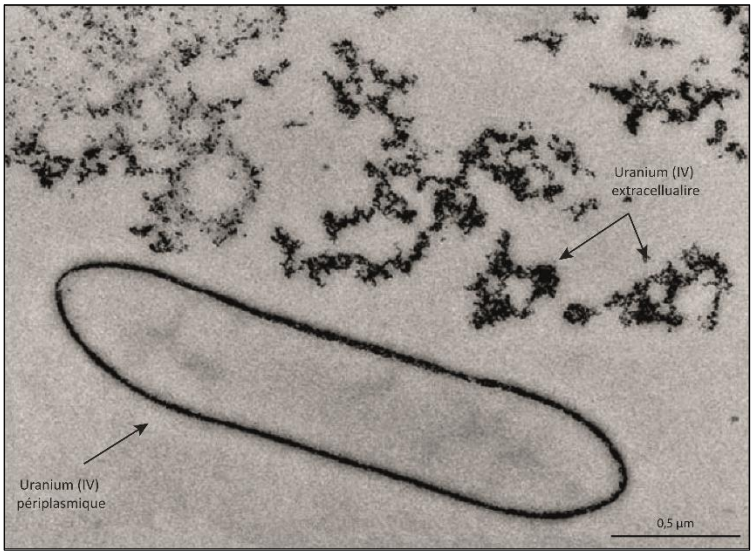


Figure 7 : Micrographie électronique en transmission de la bactérie *Geobacter sulfurreducens.* (Lloyd, 2002).

2.2.3.3. Les systèmes d'efflux

Le transport membranaire est le principal système de résistance bactérienne aux métaux lourds (Figure 8). L'accumulation des cations métalliques peut être diminuée par l'intermédiaire de systèmes d'efflux des ions au travers des membranes cellulaires. Cette extrusion active fait intervenir des transporteurs qui ont une importante spécificité pour les ions métalliques qu'ils transportent *via* des sites de reconnaissance de haute affinité (Blériot *et al.*, 2014).

Deux systèmes de transport actif ont été décrits chez les bactéries à Gram-négatif : les transporteurs primaires couplés à l'hydrolyse de l'ATP (transporteurs ABC, ATPase de type P) et des transporteurs secondaires soumis au gradient chimio-osmotique (protéines RND, CDF) (Nies and Silver, 1995) (Tableau 5, Figure 8).

Tableau 5 : Familles protéiques importantes pour l'export des métaux lourds. Deux systèmes de transport actif existent chez les bactéries, les transporteurs primaires couplés à l'hydrolyse de l'ATP et les transporteurs secondaires soumis au gradient chimio-osmotique. RND : Resistance-Nodulation-Cell Division, CDF : Cation Diffusion Facilitator, ABC : ATP-binding cassette. (Nies, 1999).

Famille	Energie	Ions métalliques	Composition
RND	Chimio-osmotique	Co^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+} et Cd^{2+}	1 antiport proton/cation, 1 protéine de fusion membranaire et 1 protéine de membrane externe
CDF	Chimio-osmotique	Co^{2+}, Zn^{2+}, Ni^{2+} et Cd^{2+}	1 protéine intégrale de la membrane
ABC	ATP	Mn^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+} et Fe^{2+}	2 domaines trans-membranaires et 2 domaines ATPasiques
ATPase de type P	ATP	Mg^{2+}, Mn^{2+}, Ca^{2+}, K^{+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+}, Pb^{2+} et Ag^{2+}	1 protéine liée à la membrane

2.2.3.3.1. Les transporteurs primaires

Les ATPases de type P d'export sont des transporteurs ioniques ubiquistes qui assurent l'extrusion active de cations métalliques (Fagan and Jr, 1994). Cette translocation peut se faire contre un gradient électrochimique grâce à l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP. Les ATPases de type P d'export prennent en charge les mêmes cations métalliques que les ATPases de type P d'import (Nies, 1999).

Comme les systèmes ABC d'imports, les transporteurs ABC d'efflux sont composés de deux sous-unités ATPase associées à la membrane cytoplasmique, d'un canal membranaire formé par deux sous-unités transmembranaires, d'une protéine de liaison aux ions dans l'espace périplasmique et d'une porine dans la membrane externe (Silver and Phung, 2005).

2.2.3.3.2. Les transporteurs secondaires

Les transporteurs secondaires sont des transporteurs qui utilisent le gradient chimio-osmotique au travers de la membrane comme source d'énergie afin d'expulser les métaux hors de la cellule.

Les systèmes RND (Resistance-Nodulation-Cell Division) sont des transporteurs de type antiport cation-proton à trois composantes, constitués d'une protéine dans la membrane externe de la famille OMF (Outer Membrane Factor), d'une pompe de la famille des RN, localisée dans la membrane interne et d'une protéine transpériplasmique de la famille des MPF (Membrane Fusion Protein) qui couple les deux premières protéines. L'ensemble de ces

trois protéines forme un canal qui permet d'extruder les ions à l'extérieur de la cellule en utilisant l'énergie provenant du gradient de protons de la membrane interne (Nies, 2007).

Les systèmes CDF (Cation Diffusion Facilitator) forment une famille de transporteurs composés d'une seule protéine et dont le principal substrat est le zinc mais ils transportent aussi le cobalt, le nickel, le fer et le cadmium (Tableau 5). Cette protéine forme un canal qui permet la diffusion passive des cations métalliques. L'énergie du transport serait fournie par un couplage à un antiport de protons (Nies, 2003, 2007).

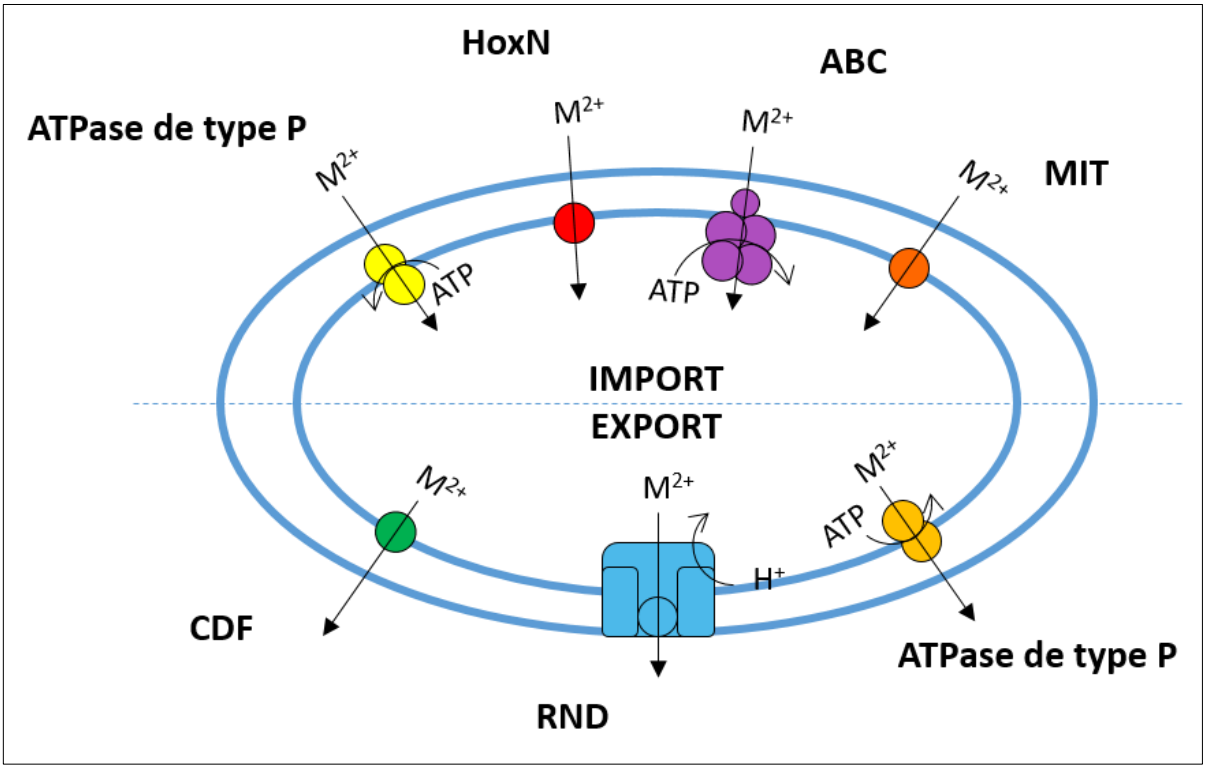


Figure 8 : Récapitulatif des mécanismes de transport des métaux lourds. Il existe quatre systèmes d'import représentés par l'ATPase de type P, HoxN (High-affinity nickel-transport protein), ABC (ATP-binding cassette) et MIT (Metal Inorganic Transport) et trois systèmes d'export avec les transporteurs RND (Resistance-Nodulation-Cell Division), CDF (Cation Diffusion Facilitator) et ABC (ATP-binding cassette). (Nies, 1999).

2.3. Biorémédiation bactérienne

L'interrogation des bases de données scientifiques comme Web of Science™ met en avant 18 808 publications relatives à la bioremédiation. Plus de 5 000 de ces articles abordent le thème de la bioremédiation bactérienne. La quantité de publications scientifiques sur ce sujet montre l'intérêt croissant que représente cette nouvelle technique biologique de dépollution des sols et des eaux.

La bioremédiation utilise des souches microbiennes, en particulier bactériennes ou fongiques, afin de dégrader des polluants *in situ* ou *ex situ* (Boopathy, 2000). L'isolement de bactéries de milieux pollués en métaux est la première étape vers la création d'outils de bioremédiation (Jones, 1998; Watanabe, 2001). Ces micro-organismes sont naturellement capables de résister aux éléments toxiques auxquels ils ont été exposés. Ils peuvent être utilisés pour détoxifier les métaux et les radionucléides des eaux contaminées, *in situ* ou *ex situ*, en les éliminant ou les immobilisant (Lovley and Coates, 1997). L'élimination microbienne des métaux se fait par oxydation ou lixiviation qui augmente ainsi leur solubilité. Cette technique fait intervenir différents mécanismes tels que la chelation, la volatilisation qui relargue les métaux sous forme gazeuse ou la production d'acides ou de surfactant. L'immobilisation microbienne est mise en place *in situ* et utilise la capacité des bactéries à réduire ou adsorber les métaux *via* les EPS. Cette méthode permet de réduire la solubilité et donc la toxicité des métaux. Les métaux précipités par les bactéries peuvent alors être récupérés par sédimentation ou filtration.

La caractérisation des EPS capables d'adsorber les métaux offre des perspectives prometteuses pour le développement de nouveaux biomatériaux pour la remédiation de sites pollués.

L'investigation de leurs mécanismes moléculaires de résistance permettrait à terme de développer des bactéries transgéniques optimisées et spécifiques pour chaque type de polluants (Vavasseur *et al.*, 2003). Certaines bactéries ont donc pu être modifiées génétiquement afin d'améliorer leur capacité de liaison, leur tolérance et leur bioaccumulation de métaux par l'expression de métallothionéines hétérologues ou de peptides de liaison aux métaux (Mejáre and Bülow, 2001).

La première stratégie consiste à produire des peptides dont la capacité à lier les métaux est importante. Ils ont soit été construits *de novo*, soit sélectionnés par criblage de bases de données peptidiques (Sousa *et al.*, 1996; Kotrba *et al.*, 1999). Ainsi, des phytochélatines synthétiques (comportant un résidu Glu au lieu de γGlu) ont été utilisées comme motif exprimé sur la surface de la bactérie hautement tolérante aux métaux *Cupriavidus metallidurans* CH34, pour la sequestration extracellulaire de métaux (Biondo *et al.*, 2012).

La seconde stratégie consiste à produire des métallothionéines hétérologues. Des métallothionéines d'origine diverse : de singe (Murooka and Nagaoka, 1987), humaines (Odawara *et al.*, 1995), de la truite *Oncorhynchus mykiss* (Kille *et al.*, 1990) ou du pois

cultivé *Pisum sativum* (Kille *et al.*, 1991) ont été exprimées intracellulairement chez *E. coli*. Cette méthode est limitée car ces protéines ont une courte demi-vie et leur fort contenu en cystéines semble interférer avec les mécanismes oxydo-réducteurs cytosoliques. Deux approches ont été mises en place pour contourner ces problèmes. Tout d'abord, l'élaboration de protéines de fusion entre des métallothionéines et des opérons inductibles, comme l'opéron arabinose *araB* (Romeyer *et al.*, 1988) et ensuite, l'expression de métallothionéines fusionnées à une porine, LamB, qui permet leur ancrage à la surface de *E. coli* (Sousa *et al.*, 1998). La production de cette protéine fusion rend les bactéries hautement tolérantes aux métaux. L'accumulation du Cd^{2+} par les cellules a été augmentée de 15 à 20 fois avec l'expression extracellulaire des métallothionéines. Cette méthode suggère que des bactéries environnementales pourraient être ainsi transformées et utilisées comme outil de bioremédiation des métaux.

Des bactéries marines non identifiées ont déjà été transformées avec un vecteur portant le gène *bmtA* codant pour la métallothionéine. La surexpression de cette protéine a conduit à une importante accumulation des métaux lourds. Ces bactéries modifiées génétiquement ont été développées et utilisées comme outil de biorémédiation de sites marins pollués (Chen *et al.*, 1999; Satyanarayana *et al.*, 2012).

3. Présentation du modèle *S. officinalis*

3.1. Généralités sur les Spongiaires

Les Spongiaires aussi connus sous le nom de Porifères (du latin *porus* - pore et *ferare* - porter) ou d'Éponges sont les premiers Métazoaires. Ces animaux sont des organismes clé pour la compréhension du passage d'un état unicellulaire (protozoaires) à un état pluricellulaire (métazoaires).

La biodiversité des Spongiaires est estimée à 8 500 espèces, divisées en quatre classes (Démosponges, Homoscléromorphes, Héxactinéllides, Calcaires), 25 ordres, 128 familles et plus de 680 genres (Hooper and Soest, 2002). Les espèces de ce phylum présentent une importante variabilité de taille, de forme et de couleur (Figure 9).

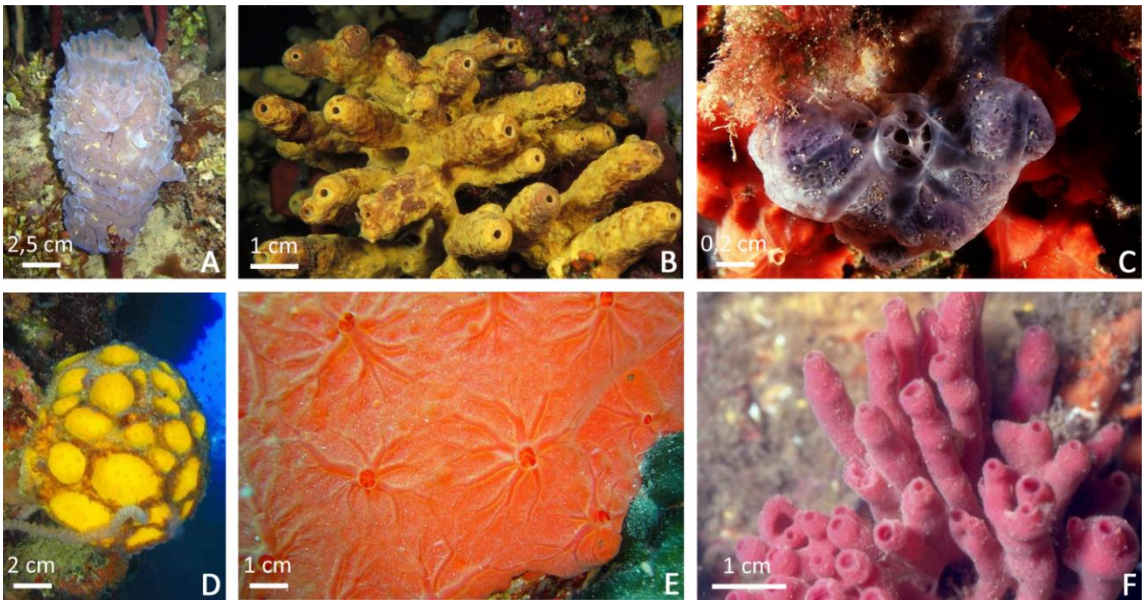


Figure 9 : Illustration de quelques spécimens de Spongiaires. A *Callyspongia plicifera*, B *Aplysina cavernicola*, C *Phorbas tenacior*, D *Cinachyra spp*, E *Crambe crambe*, F *Haliclona (Reniera) cinerea* (http://doris.ffessm.fr/).

Ces organismes sont caractérisés par un plan d'organisation simple et asymétrique de type diploblastique sans organe différencié mais sont composé de types cellulaires aux fonctions spécifiques.

Leur paroi est constituée de deux feuillets cellulaires, le pinacoderme d'origine ectodermique et le choanoderme d'origine endodermique. Le pinacoderme est constitué de cellules aplaties et jointives, les pinacocytes, qui tappisent la surface et isole l'éponge du milieu extérieur.Le corps de l'éponge est parcouru par un système aquifère ouvert composé de d'orifices inhalants ou exhalants et de canaux.

Le choanoderme est constitué det cellules flagellées à collerette, les choanocytes (Figure 10C), impliquées dans la circulation et la filtration de l'eau de mer (Stabili *et al.*, 2006). Ces deux couches cellulaires sont séparées par un tissu conjonctif sous forme d'une matrice gélatineuse, le mésohyle qui contient des cellules mobiles telles que les amoebocytes qui ont un rôle phagocytaire et nutritif, des cellules nerveuses, des éléments reproducteurs tels que les sclérocytes et les archéocytes (chez les Démosponges), des éléments de soutien du squelette de l'éponge qui sont des structures inorganiques minéralisées, les spicules. Ce mésohyle contient également des organismes symbiotiques représentés par des procaryotes et des micro- et macro- eucaryotes (Taylor *et al.*, 2007) (Figure 10B).

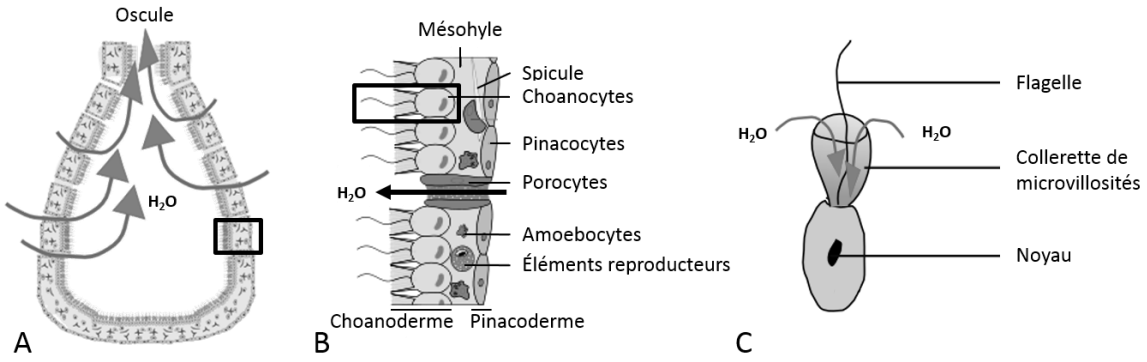


Figure 10 : Système aquifère des Spongiaires : **A** Organisation du système aquifère chez les Spongiaires du type ascon, **B** Schéma de la structure histologique de la paroi des Spongiaires, **C** Détails d'une cellule choanocytaire.

L'eau est aspirée par les porocytes inhalants et une fois filtrée par le choanoderme est évacuée par l'oscule. Chez une grande majorité de Spongiaires, la filtration permet de capter les micro-organismes et particules en suspension dans l'eau de mer qui sont ensuite phagocytés afin d'assurer leur nutrition (Vogel, 1977) (Figure 10A). Certaines éponges carnivores ne possèdent pas de système aquifère et ont la capacité de capter et de digérer de petits crustacés (Vacelet and Duport, 2004).

3.2. La Démosponge *S. officinalis* et son habitat

L'éponge de toilette *S. officinalis* (Figure 11A) aussi appelée éponge de toilette, a été décrite pour la première fois en 1759 par Carl von Linné dans son livre "*Systema naturæ per regna tria naturæ, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Tomus II*" (Linneus, 1759). Dans cet ouvrage, C. von Linné expose la première classification systématique des trois règnes de la nature.

Figure 11 : L'éponge de toilette *S. officinalis.* A Photographie de *S. officinalis* sur un tombant à 15 m de profondeur près de Porquerolles (http://doris.ffessm.fr, Thierry Perez), **B** L'éponge de toilette commercialisée après traitements chimiques pour éliminer la matière vivante, améliorer sa souplesse et lui donner une couleur jaune.

La taxonomie de cette espèce a été largement modifiée au cours du temps à cause de l'observation de variations morphologiques intraspécifiques (Cook and Bergquist, 2001a). En effet, les différents morphotypes de *S. officinalis* ont été successivement considérés comme des variétés, des sous-espèces ou des espèces différentes (Schulze, 1879; Vacelet, 1959; Pronzato and Manconi, 2008). Une étude récente a conclu que tous ces différents morphotypes observables n'étaient pas génétiquement différents et correspondaient à une seule et unique espèce, *S. officinalis* (Dailianis *et al.*, 2011).

La Démosponge *S. officinalis*, organisme massif et globulaire, est une éponge cornéo-siliceuse de la classe des Demospongiae, de l'ordre des Dictyoceratida et de la famille des Spongiidae (Figure 12).

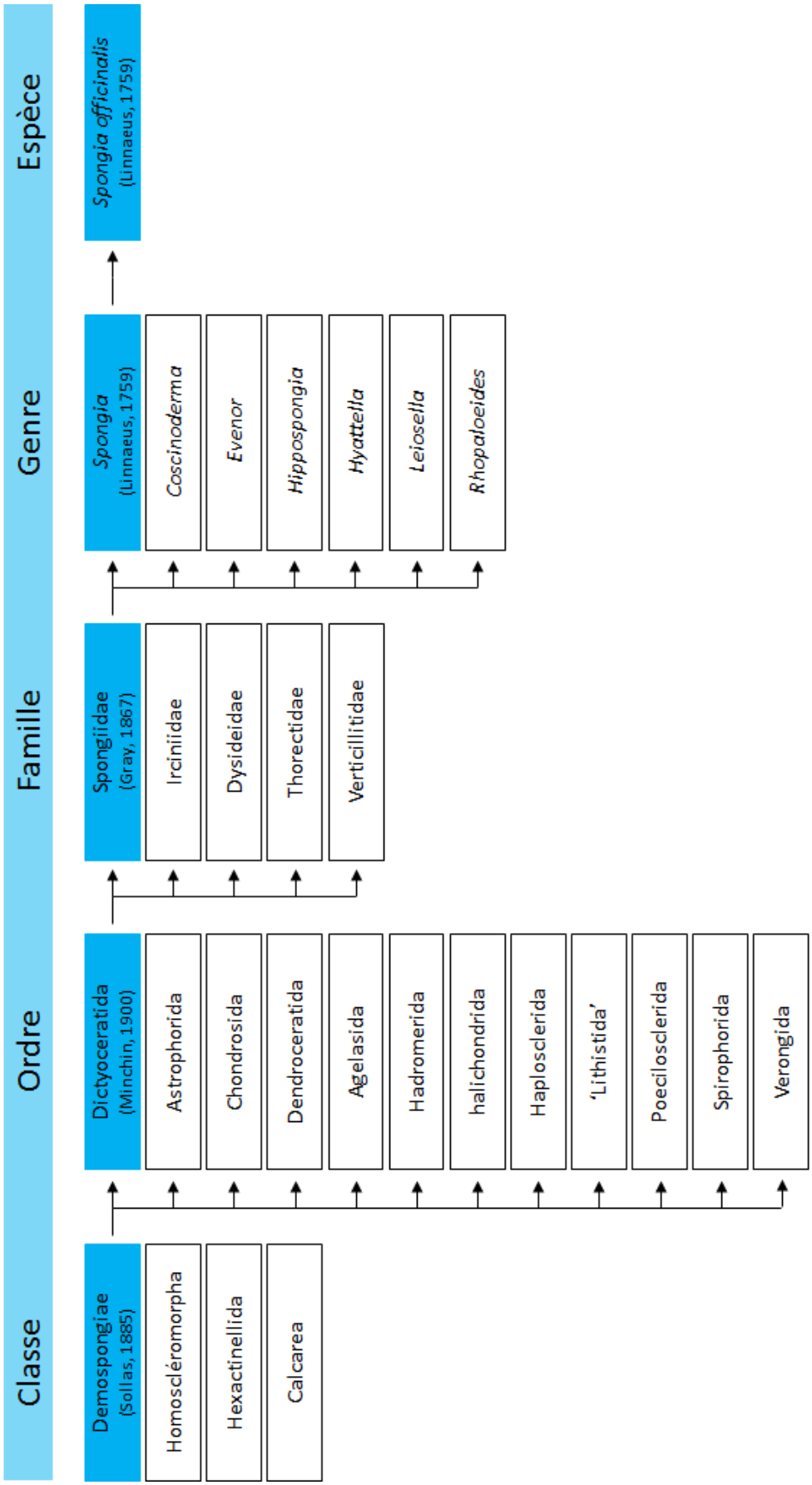


Figure 12 : Classification de *S. officinalis* au sein du phylum des Porifera (World Porifera Database, http://www.marinespecies.org/porifera/index.php, consulté le 08/04/2013).

S. officinalis est distribuée en Méditerranée et le long des côtes adjacentes de l'Atlantique Est de la Galice jusqu'aux îles du Cap Vert (Vacelet, 1959) (Figure 13). En Méditerranée, *S. officinalis* s'échelonne d'est en ouest selon un gradient d'abondance décroissant en suivant les gradients de salinité et de température de cette zone (Voultsiadou, 2009).

La Démosponge *S. officinalis* est principalement récoltée à l'est de la Méditerranée (Pronzato and Manconi, 2008). Elle est commercialisée pour sa grande souplesse et son importante capacité d'absorption de l'eau et présente aussi un intérêt économique majeur (Verdenal and Verdenal, 1987).

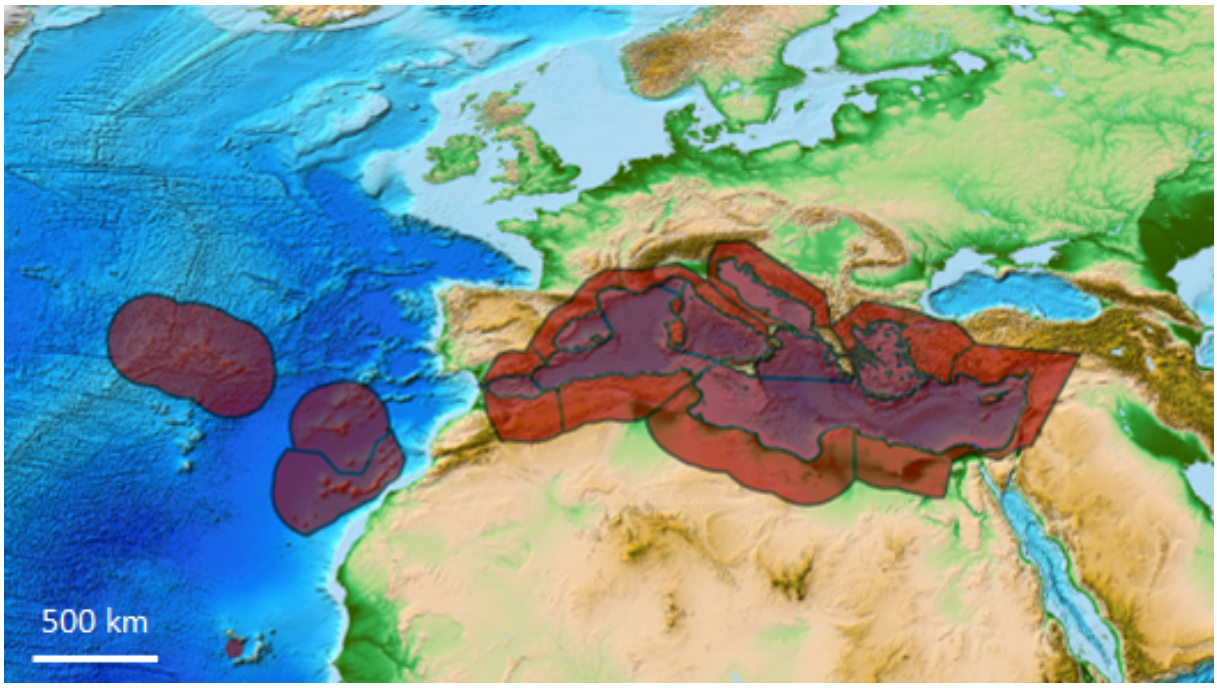


Figure 13 : Répartition géographique de *S. officinalis* (World Porifera Database, http://www.marinespecies.org/porifera/index.php)

Avant d'être commercialisées, les éponges subissent un traitement en plusieurs étapes. Tout d'abord, les éponges doivent macérer dans de l'eau de mer pour en éliminer la matière vivante. Elles subissent alors des bains successifs d'acide chlorhydrique pour décomposer les incrustations de sable, coquilles ou mollusques, puis de permanganate de potassium et d'hyposulfite de soude ce qui leur donne une couleur jaune dorée. Les éponges sont enfin trempées dans un bain de carbonate de calcium afin d'améliorer leur souplesse (Figure 11B).

Afin de pallier la raréfaction de cette éponge dans le milieu naturel et limiter sa surexploitation, des recherches en aquaculture ou de transplantation en milieu naturel ont été menées avec succès (Corriero *et al.*, 2004; Baldacconi *et al.*, 2010; Celik *et al.*, 2011). De

plus, *S. officinalis* est l'une des espèces protégées, et dont l'exploitation est régulée par les conventions de Berne en 1979 et de Barcelone en 1995.

3.3. Reproduction et cycle de vie chez *S. officinalis*

S. officinalis est une espèce vivipare qui se reproduit par voie sexuée et asexuée. La première étude sur la reproduction de *S. officinalis* date de 1984 et porte sur l'investigation ultra-structurale de la cytodifférenciation spermatique (Gaino *et al.*, 1984). Ces éponges peuvent être, soit gonochoriques avec une séparation des sexes biologiques, soit hermaphrodites avec un même individu qui change de sexe biologique au cours de sa vie (Baldacconi *et al.*, 2007). Cette forme d'hermaphrodisme avait déjà été suggérée chez d'autres espèces d'éponges comme les Démosponges d'eau douce *Spongilla lacustris* (Gilbert and Simpson, 1976) et *Ephydatia fluviatilis* (Van de Vyver and Willenz, 1975).

La reproduction asexuée se fait par formation de bourgeons qui font saillis à la surface de l'éponge et se détachent pour se fixer un peu plus loin et former de nouvelles éponges.

La reproduction sexuée s'effectue par fécondation indirecte, les spermatozoïdes flagellés étant apportés à l'éponge mère par les courants d'eau. Ce type de reproduction a été observé, en 2007, chez des individus de *S. officinalis* sur les côtes des Pouilles, en Italie (Baldacconi *et al.*, 2007).

Le cycle reproducteur se caractérise par la présence de périodes bien distinctes pour la spermatogenèse et l'ovogenèse.

L'ovogénèse, observée durant tout le cycle reproducteur, commence avec la différenciation des archéocytes en ovocytes primaires d'environ 15 µm de diamètre (Figure 14A) qui grossissent en se remplissant de grains de vitellus jusqu'à atteindre 200 µm de diamètre (Figure 14B). Les ovocytes s'accolent aux choanocytes.

La spermatogenèse apparaît durant la période hivernale qui coïncide avec un pic de production d'ovocytes et un niveau important de production d'embryons. Les spermatozoïdes dans l'eau de mer s'engagent dans le choanocyte, une vacuole se forme alors autour d'eux et pour les transformer en spermiokystes (Figure 14C).

Le choanocyte chargé de spermiokystes s'enfonce en profondeur et devient une cellule chariante qui rencontre l'ovocyte pour assurer la fécondation. Le développement des embryons s'effectue dans l'éponge mère jusqu'à la formation de stéréoblastulas (Figure 14D)

qui se recouvrent de cellules ciliées pour devenir des larves ovoïdes nageantes. Les parenchymulas (Figure 14E, F, G) sont libérées dans le milieu extérieur entre les mois de juin et juillet. Ces parenchymulas ne possèdent ni chambre choanocytaire, ni pinacocyte, ni élément du squelette. L'incorporation de micro-organismes, principalement des bactéries, dans des vacuoles intracellulaires commence dès les premiers stades de développement larvaire. Ces micro-organismes, qui proviendraient de l'éponge mère, constituent la principale source d'énergie pour le déplacement natatoire des larves. Celles-ci n'ont en effet pas encore de système aquifère pour supporter une quelconque activité de filtration. Les bactéries qui échappent à la phagocytose peuvent alors se développer. Il y aurait donc une transmission verticale des bactéries symbiotiques lors de la reproduction sexuée (Kaye, 1991).

Le contenu des cellules épithéliales flagellées pourrait servir de matrice assurant l'adhésion à un substrat de la larve parenchymula qui va alors progressivement se métamorphoser comme observé en conditions *in vitro* (Gaino *et al.*, 2007).

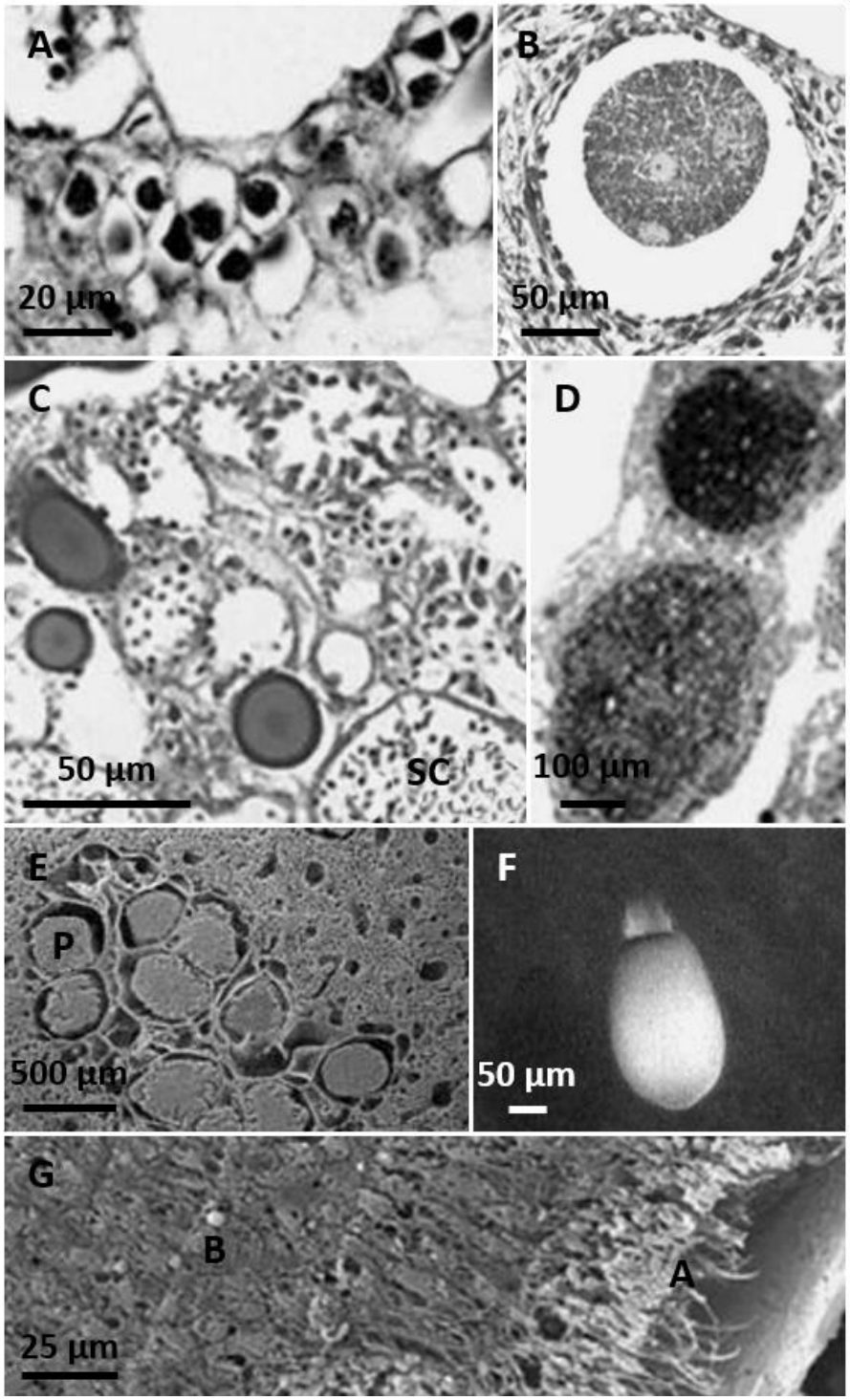


Figure 14 : Les étapes de la reproduction sexuée chez *S. officinalis*.
A Ovocytes dans les premières phase de différenciation et dont le cytoplasme se remplit de vitellus. **B** Ovocyte de forme sphérique avec un noyau excentré, rempli de vitellus. **C** Spermiokyste (SC) dans la région choanocytaire. Les spermiokystes ne sont pas tous dans la même phase de différenciation. **D** Développement embryonaire représenté par deux stéréoblastulas. **E** Stéréoblastula et parenchymula (P) regroupées pour former un bouquet dans des chambres dispersées dans le mésohyle. **F** Larve parenchymula relarguée dans l'eau de mer. **G** Portion de la surface flagellée (A) et de la région interne (B) de la larve. (Baldacconi *et al.*, 2007).

3.4. Organisation tissulaire et système aquifère

Cet organisme euryèce, qui se développe principalement sur des substrats rocheux entre 0 et 80 m de profondeur, présente une importante plasticité phénotypique qui lui permet de s'adapter à différentes conditions environnementales. Cette plasticité serait liée à ses capacités de régénération et de ré-organisation de sa structure (Gaino and Pronzato, 1989; Pronzato *et al.*, 1998, 2003). Son squelette est composé d'un solide réseau de fibres de spongine associé à du collagène et à des éléments étrangers, comme des grains de sable ou des spicules exogènes. Ce réseau, très serré, est constitué de fibres primaires, de diamètre compris entre 50 et 100 µm, qui se rassemblent le long de la surface sous forme de conules et de fibres secondaires plus nombreuses, de diamètre compris entre 20 et 25 µm. La surface supérieure est caractérisée par un oscule (ou pore exhalant), de diamètre 0,6 cm, alors que les ostioles (ou pores inhalants), de diamètre 0,37 mm, sont situés sur la surface latérale et subdivisés par un réseau fibreux de collagène (Pronzato *et al.*, 1998) (Figure 15).

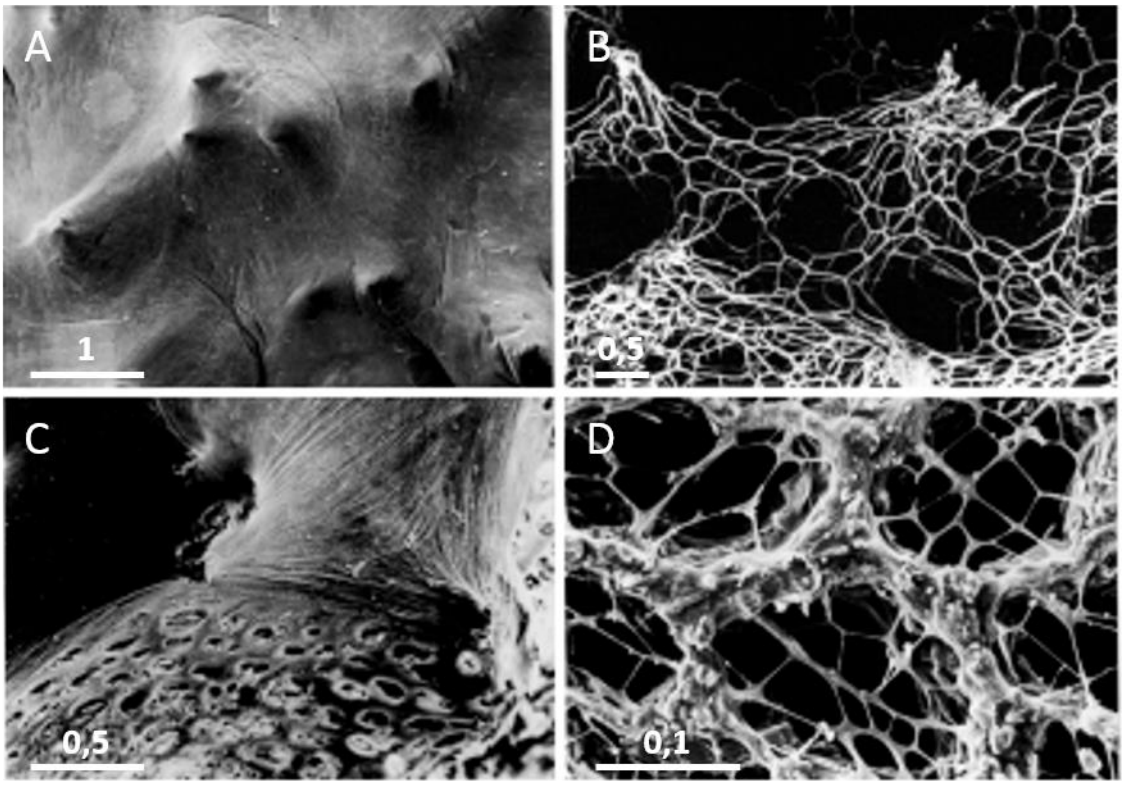


Figure 15 : Observations de *S. officinalis* au microscope électronique à balayage. A Couche fibreuse recouvrant les conules, **B** Fibres de spongine formant les conules, **C** et **D** ostioles recouvertes d'un réseau de collagène (barre d'échelle = mm). (Pronzato *et al.*, 1998).

L'architecture tridimensionnelle du système aquifère de cette éponge est de type leucon (Figure 16A) (Burlando *et al.*, 1990). Le système inhalant est composé, à partir des ostioles, d'unités modulaires avec de petits canaux et cavités superficielles, puis de conduits qui pénètrent dans le corps de l'éponge, se séparent en petits canaux et se ré-embranchent pour former les chambres choanocytaires distribuées en bloc. Les canaux qui drainent les chambres choanocytaires composent un réseau anastomosé qui converge pour former de larges canaux conduisant aux oscules. Enfin certains canaux, relient directement le système inhalant au système exhalant, permettant ainsi à l'eau de contourner les chambres choanocytaires (Burlando *et al.*, 1990) (Figure 16B).

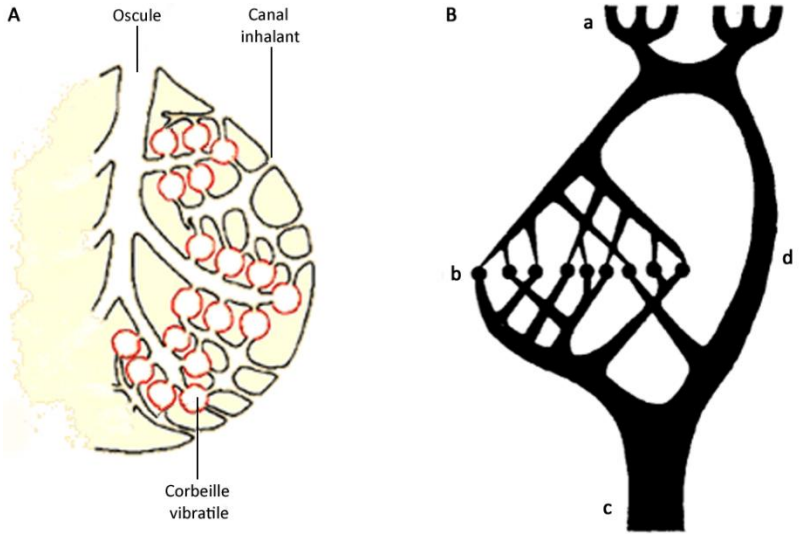


Figure 16 : Système aquifère chez *S. officinalis*. A : Organisation générale de type leucon (http://www.mer-littoral.org/02/poriferes-2.php). **B** : Diagramme du système aquifère chez *S. officinalis*. (a) système inhalant, (b) canaux anastomosés et chambres choanocytaires, (c) conduit osculaire, (d) connexion directe entre le système inhalant et le système exhalant. (Burlando *et al.*, 1990).

3.5. Une éponge filtreuse

En 2010, une étude a cherché à comprendre l'alimentation de *S. officinalis*, en conditions *in situ*, par des mesures de cytrométrie en flux et d'analyse des rapports isotopiques stables. Il semblerait que, chez cette espèce, deux groupes picoplanctoniques, les cyanobactéries et les picoeucaryotes, constituent la plus abondante source de nourriture (Pile *et al.*, 1996; Pile and Young, 2006). Le bactérioplancton et le nanoplancton sont eux moins retenus par cette éponge. La Démosponge *S. officinalis*, qui par son activité de filtration est capable d'extraire efficacement les particules organiques comprises entre 0,1 et 50 µm de

l'eau de mer environnante (Simpson, 1984), sélectionne activement les particules qu'elle retient en fonction de leur taille.

De plus, *S. officinalis* assimilerait mieux le carbone des particules nanoplanctoniques que celui des particules picoplanctoniques. En milieu naturel, les proies nanoplanctoniques seraient une source de nourriture importante car elles maximisent l'incorporation de carbone par l'éponge (Topçu *et al.*, 2010). L'absence de rétention de bactérioplancton semble pour le moins étrange et pourrait être expliquée par la faible présence de bactéries hétérotrophiques dans l'eau de mer environnante lors de cette étude. En effet, ces bactéries sont généralement considérées comme l'une des sources primaires de carbone pour les éponges et permettraient de totalement satisfaire leur besoins énergétiques (Ribes *et al.*, 1999; Yahel *et al.*, 2007).

3.6. Un outil de bioindication et de bioremédiation de pollution

La Démosponge *S. officinalis* bénéficie de certaines propriétés fondamentales afférentes aux bioindicateurs idéaux proposés par Rainbow et Phillips (Rainbow and Phillips, 1993). Espèce caractéristique des hotspots de biodiversité, elle est largement distribuée sur les fonds rocheux méditerranéens. *S. officinalis* tolère de larges fluctuations physico-chimiques et peut coloniser à la fois des sites pollués et non pollués. *S. officinalis* est, par ailleurs, facile à récolter et à identifier et se régénère en quelques mois. De plus, cette espèce possède un système aquifère sophistiqué qui lui confère d'importantes capacités de filtration.

Plusieurs études ont démontré les capacités de *S. officinalis* à accumuler efficacement les polluants, soit adsorbés sur des particules de différentes tailles, soit à l'état dissous, en particulier grâce à sa composition en fibres de spongine (Verdenal *et al.*, 1990) ou peut-être grâce à son abondante microflore symbiotique.

3.6.1. Exposition à des micro-organismes pathogènes

En Méditerranée, plusieurs épisodes de mortalités massives de *S. officinalis* ont été rapportés depuis le début du vingtième siècle. Ces épidémies peuvent avoir des impacts importants sur l'écologique des écosystèmes auxquels ils appartiennent. La survenue de ces épidémies peut être corrélée à des facteurs environnementaux comme le réchauffement climatique ou les pollutions d'origine anthropique qui fragilisent la physiologie et le système immunitaire des organismes. Ils sont alors plus sensibles aux attaques de micro-organismes pathogènes dont la prolifération est stimulée (Sutherland *et al.*, 2004; Webster, 2007).

L'une des causes principales de mortalité chez les éponges, telle que *S. officinalis* est donc l'invasion des tissus par des bactéries exogènes. Ces bactéries peuvent envahir et dégrader les fibres de spongine, ce qui conduit à la désorganisation, puis la nécrose du squelette. L'hypothèse proposée serait que, sous certaines conditions de stress tel un choc thermique, l'éponge deviendrait incapable de produire des substances antimicrobiennes, comme des terpènes, régulant la prolifération des bactéries pathogènes (Cimino *et al.*, 1971; Gonzalez *et al.*, 1982; Garrido *et al.*, 1997). Un système de défense, tel que la construction d'une barrière tissulaire pour limiter l'extension des dommages, serait tout de même mis en place. Par ailleurs, ces bactéries possèderaient des enzymes capables de dégrader la spongine ou le collagène (Wilkinson *et al.*, 1984; Gaino and Pronzato, 1989; Gaino *et al.*, 1992).

Ex situ, l'espèce *S. officinalis* présente la capacité d'assimiler en cinq heures près de la totalité des bactéries du volume d'eau dans lequel elle est maintenue et de moduler son débit de filtration en fonction de la concentration bactérienne du milieu (Stabili *et al.*, 2006). Cette éponge, par sa capacité à accumuler des bactéries, et en particulier des bactéries indicatrices de pollution microbienne, a été proposée comme outil de bioindication et de biorémédiation microbiologique dans des environnements pollués comme les fermes d'aquaculture, les stations d'épuration ou plus généralement les environnements côtiers où la charge en micro-organismes pathogènes est importante (Kefalas *et al.*, 2003; Stabili *et al.*, 2008).

3.6.2. Exposition aux métaux

3.6.2.1. Un bioindicateur de pollution métallique

Des expériences *in vitro* ont montré que le facteur de concentration des métaux chez *S. officinalis* était très élevé et que leur accumulation dépendait de la quantité présente dans le milieu. La comparaison avec les moules *Mytilus galloprovincialis*, largement utilisées comme bioindicateurs de pollution métallique, a montré que *S. officinalis* concentrait entre 3 et 53 fois plus les métaux que les moules, exception faite du zinc (Pérez *et al.*, 2004).

L'espèce *S. officinalis* a donc été proposée pour la bioévaluation des contaminations métalliques des peuplements de substrats durs, c'est-à-dire comme indicateur de la biodisponibilité des métaux dans le milieu marin. Cette caractéristique de *S. officinalis* a déjà été mise à profit afin d'évaluer les tendances spatio-temporelles de la biodisponibilité de douze métaux dans la baie de Marseille, soumise à l'influence des rejets de la ville de

Marseille et de sa banlieue (Pérez *et al.*, 2005). Il a été montré que *S. officinalis* accumulait en effet tous les métaux lourds étudiés à l'exception du mercure et du cadmium. Les résultats de contamination métallique obtenus chez *S. officinalis* étaient cohérents avec les niveaux de contamination de la zone d'étude.

La détection de niveaux importants de métaux chez cette espèce laisse présager l'existence de mécanismes de détoxification.

3.6.2.2. Mécanismes de détoxification des métaux

3.6.2.2.1. Les granules de lépidocrocite

Une étude a rapporté qu'une partie de la charge métallique incorporée pourrait être stockée sous forme de granules minéraux de lépidocrocite (γ FeOOH), retrouvés dans les fibres de spongine, qui contiennent aussi de la calcite et de la goéthite (α FeOOH) (Vacelet *et al.*, 1988) (Figure 17). La minéralisation du fer par l'intermédiaire des lépidocrocites avait déjà été observée chez l'éponge *Ircinia fasciculata* (Towe and Rützler, 1968). L'origine, la formation et le devenir des granules de lépidocrocite qui ne peuvent être reliées à aucune activité cellulaire et/ou symbiotique restent par ailleurs encore inconnus. Cette minéralisation semble relever d'un processus lent qui nécessite plus de temps que la croissance des fibres de spongine et du squelette de l'éponge.

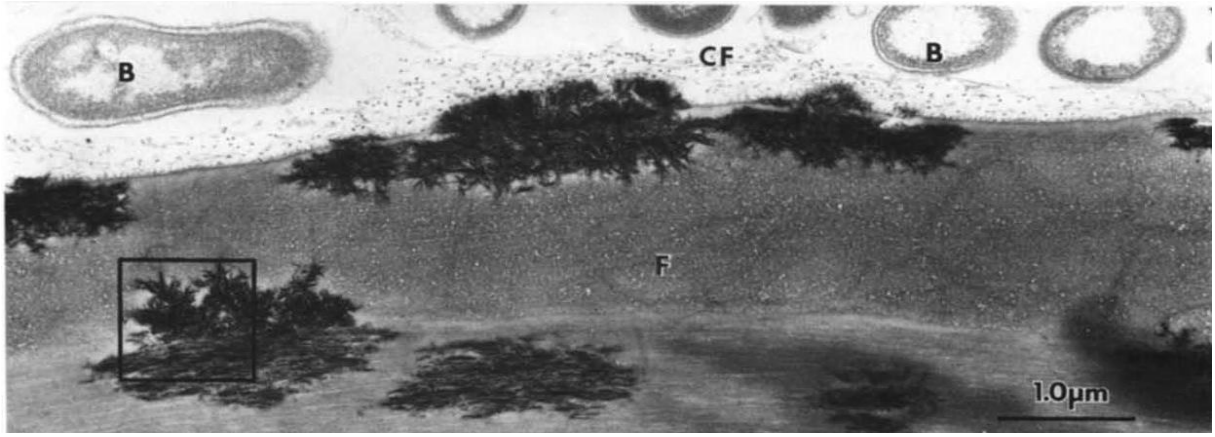


Figure 17 : Granules de lépidocrite à la surface et dans les fibres de spongine de *S. officinalis*.
B Bactéries symbiotiques ; **CF** Fibrilles de collagène intracellulaires ; **F** Fibres. (Vacelet *et al.*, 1988).

3.6.2.2.2. Les métallothionéines

Une autre partie de la charge métallique serait, concentrée sous une forme organique et liée temporairement à des ligands intracellulaires, les protéines de type métallothionéine (Berthet *et al.*, 2005). Chez *S. officinalis*, ces protéines stables à la chaleur possèdent une masse moléculaire apparente de 6 et 15 kDa. Ces protéines sont produites lors d'une exposition aux métaux et il existe une corrélation entre l'augmentation de la concentration en cuivre, mercure et zinc et la présence de ces protéines (Berthet *et al.*, 2005). Il semblerait toutefois nécessaire de caractériser ces ligands et vérifier que leur expression soit bien corrélée aux concentrations intracellulaires en métaux lourds. Les protéines de type métallothionéine chez *S. officinalis* pourraient alors être considérées comme de bons biomarqueurs d'exposition à une pollution métallique.

3.6.3. Exposition aux polychlorobiphényles

La Démosponge *S. officinalis* a également montré sa capacité à accumuler et probablement dégrader tous les types de polychlorobiphényles des plus légers, relativement solubles ou associés à des particules fines, jusqu'aux plus lourds, adsorbés sur une phase particulaire grossière, avec une forte affinité pour les hexa- et heptachlorobiphényles (Pérez *et al.*, 2003). Les quantités de polychlorobiphényles dans les tissus refléteraient directement les niveaux de contamination d'origine urbaine du milieu marin environnant.

De plus, *S. officinalis* révélerait les plus hauts niveaux de contamination rencontrés parmi les Spongiaires déjà étudiés. Cette éponge concentrerait les polychlorobiphényles trente fois plus que les moules *Mytilus galloprovincialis* (Verdenal *et al.*, 1990; Pérez *et al.*, 2003). Au cours du temps, une diminution du rapport polychlorobiphényles CB138/polychlorobiphényles CB153 et de la représentation des hexachlorobiphényles serait observée au profit des pentachlorobiphényles au sein des tissus de *S. officinalis*. En revanche, ces molécules sont stables dans le milieu environnant. Ces résultats laissent présager que cette espèce aurait la capacité de transformer ces polychlorobiphényles connus pour être persistants.

Chez les invertébrés, le métabolisme des xénobiotiques, comme les polychlorobiphényles, implique des mécanismes enzymatiques complexes de détoxification qui augmentent l'hydrosolubilité et facilitent l'extraction de ces composés (Fernández *et al.*, 2012). Cependant, l'existence de telles machineries n'a encore jamais été démontrée chez les

Spongiaires. En revanche, les effets biologiques d'une contamination par des polychlorobiphényles ont été étudiés chez les démosponges *Suberites domuncula* (Schröder *et al.*, 1999) et *Geodia cydonium* (Wiens *et al.*, 1998) avec l'induction de l'expression de protéines chaperonnes, comme les HSP 70, et la fragmentation de l'ADN. De plus, se pose la question du rôle que joueraient les bactéries associées à l'éponge dans les mécanismes de biotransformation.

3.6.4. Exposition aux agents tensio-actifs

Une expérience menée en laboratoire a montré que *S. officinalis* présentait une activité métabolique importante vis-à-vis d'agents tensio-actifs de synthèse biodégradables comme les alkylbenzène sulfonates. Ces détergents posent de nombreux problèmes en milieu aquatique car ils peuvent avoir des effets négatifs sur la faune sauvage (Marin *et al.*, 1991; Hofer *et al.*, 1995). Cette dégradation pourrait-être due à la combinaison de l'activité de filtration de l'éponge et l'action de biotransformation de ces composés par la communauté microbienne symbiotique présente chez *S. officinalis* (Pérez *et al.*, 2002).

3.7. *S. officinalis* comme source de molécules bio-actives

Au cours des dernières décennies, les éponges marines sont apparues comme une riche source de métabolites secondaires bio-actifs d'une grande diversité chimique (stérols, terpénoïdes, alcaloïdes, macrolides, peptides…) et présentant une large gamme de propriétés biologiques et pharmacologiques telles que des activités cytotoxiques, anti-tumorales, antivirales ou antimicrobiennes (Wang, 2006; Blunt *et al.*, 2014). Les molécules responsables de ces activités permettent aux éponges de survivre dans les environnements compétitifs que représentent les écosystèmes marins en intervenant dans les mécanismes de défense et de communication (Thakur and Müller, 2004).

Les molécules isolées de *S. officinalis* présentent de nombreuses activités pharmacologique telles que des activités antimicrobiennes, antiparasitaires, anticonvulsives, anti-inflammatoires ou antiprolifératives.

D'autre part, les éponges marines abritent d'importantes et diverses communautés microbiennes qui peuvent contribuer de façon significative au métabolisme et à la défense de leur hôte (Wilkinson and Garrone, 1980; Taylor *et al.*, 2007). En effet, dans de nombreux cas,

la production des molécules bio-actives isolées des éponges a pu être attribuée aux bactéries qui lui sont associées (Moore, 2005; Thomas *et al.*, 2010a).

L'étude de ces molécules a conduit à une meilleure compréhension, bien qu'encore incomplète, des mécanismes de communication entre les éponges et leurs micro-organismes associés.

3.7.1. Terpènes

Les éponges de l'ordre des Dictyocératides sont l'un des ordres les plus étudiés des Démosponges par les chimistes. Elles se sont révélées être une source importante de terpènes en particulier des furanoterpènes linéaires en C-21 ainsi que des sesterterpènes, généralement peu fréquents dans la nature, soit linéaires de type furane, soit cycliques de de type scalarane (Minale, 1978). Quelques diterpènes ont également été isolés à partir de l'éponge *S. officinalis*.

3.7.1.1. Terpènes de type furane

Les principaux furanoterpènes isolés chez *S. officinalis* sont présentés en Figure 18. Entre 1971 et 1972, plusieurs furanoterpènes linéaires en C_{21} tels que la furospongine-1 **1**, ici majoritaire, ainsi que cinq de ses dérivés (**2-6**), l'anhydrofurospongine-1 **2**, la furospongin-2 **3**, l'isofurospongine-2 **4**, la dihydrofurospongine-2 **5** et la tétrahydrofurospongine-2 **6**, ont été isolés à partir d'extraits méthanoliques de *S. officinalis* récoltés dans la baie de Naples (Cimino *et al.*, 1971; Cimino, De Stefano, Minale, *et al.*, 1972). En 1989, le composé **3**, la furospongine-2, ainsi que trois de ses isomères **3a**, **3b et 3c**, ont de nouveau été isolés à partir de cette même espèce récoltée, cette fois, dans le nord de la mer Adriatique (De Giulio *et al.*, 1989).

Des extraits de *S. officinalis* ont été caractérisés par la présence d'activités anti-microbiennes contre les bactéries benthiques et épibiotiques, associées à leur surface. Par exemple, la furospongine-1 **1** possède une activité anti-bactérienne contre des souches de *Diplococcus* sp. et *Streptococcus* sp. (Anderson *et al.*, 1994), une activité anti-parasitaire (Orhan *et al.*, 2010) et une activité cytotoxique (Orhan *et al.*, 2010). La furospongine-2 **3** et ses trois isomères **3a**, **3b** et **3c** présentent aussi des activités cytotoxiques (De Giulio *et al.*, 1989). A l'inverse, deux dérivés de la furospongine-1 **1**, la dihydrofurospongine-2 **5** et la tétrahydrofurospongine-2 **6**, se sont révélés responsables de l'induction de la formation d'un

biofilm par *E. coli* (Manzo *et al.*, 2011). Les activités biologiques de ces furanoterpènes linéaires en C_{21} isolés chez *S. officinalis* sont présentées dans le Tableau 6.

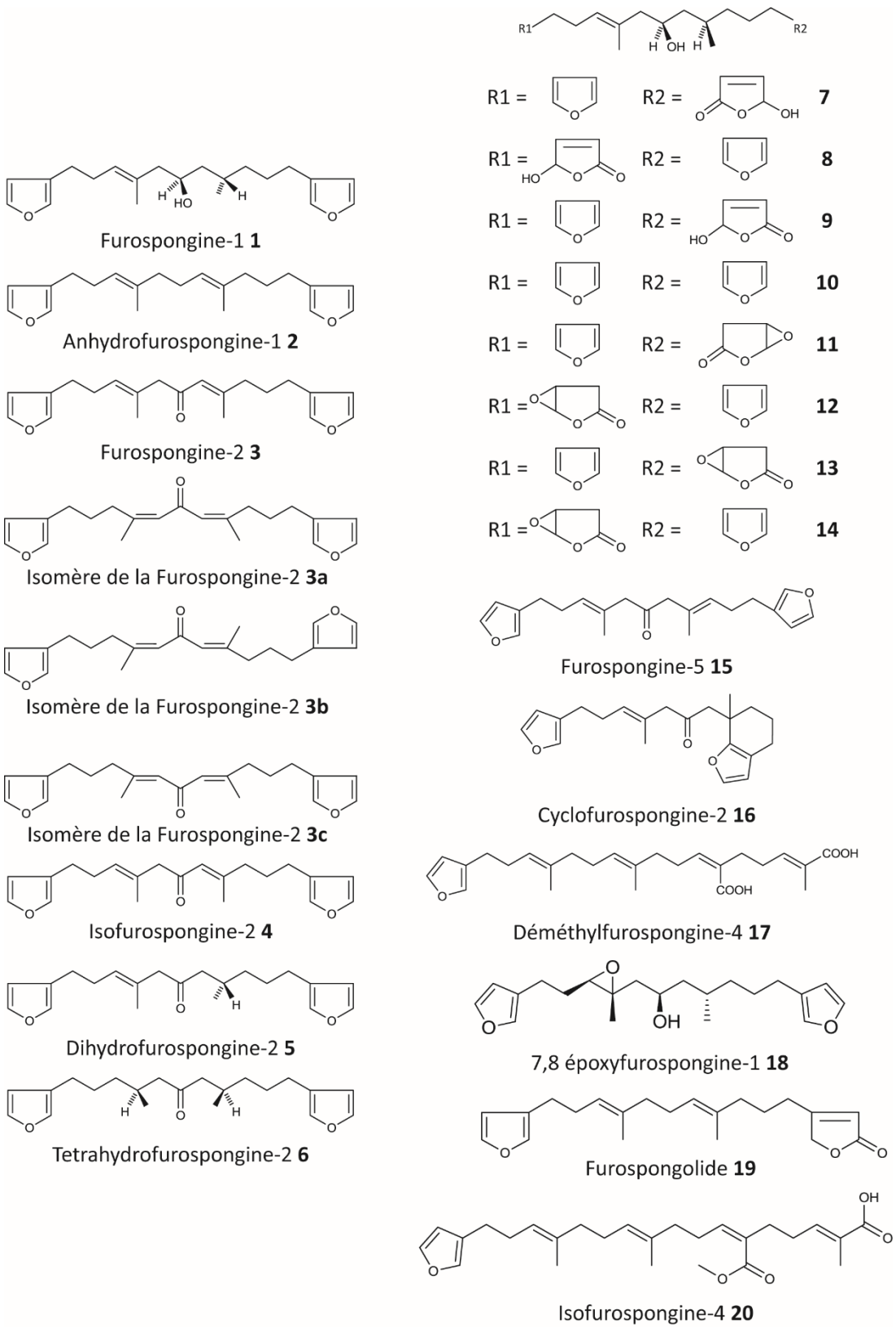


Figure 18 : Principaux furanoterpènes linéaires en C_{21} isolés chez l'éponge *S. officinalis*.

Tableau 6 : Activités biologiques des principaux furanoterpènes isolés chez l'éponge *S. officinallis*.

Molécule	**Activité**	**Lignée cellulaire (CI_{50} en µg.mL^{-1})**	**Référence**
Dihydrofurospongine-2 **5**	Induction de biofilm	*E. coli* PHL628	Manzo *et al.*, 2011
Tétrahydrofurospongine-2 **6**	Induction de biofilm	*E. coli* PHL628	Manzo *et al.*, 2011
Furospongine-1 **1**	Anti-bactérienne	*Diplococcus* sp. *Streptococcus* sp.	Anderson *et al.*, 1994
	Anti-parasitaire	*Trypanosoma cruzi* (17,49) *Trypanosoma b.rhodesiense* (13,94) *Leishmania donovani* (4,80) *Plasmodium falciparum* (14,02)	Orhan *et al.*, 2010
	Cytotoxicité	Lignée cellulaire L6 (27,45)	Orhan *et al.*, 2010
Furospongine-2 **3**	Cytotoxicité	*Artemia salina* (0,12)	De Giulio *et al.*, 1989
Isomères **3a**	Cytotoxicité	*Artemia salina (*0,45)	De Giulio *et al.*, 1989
Isomères **3b**	Cytotoxicité	*Artemia salina* (0,09)	De Giulio *et al.*, 1989
Isomères **3c**	Cytotoxicité	*Artemia salina* (1,6)	De Giulio *et al.*, 1989
Furospongine-5 **17**	Cytotoxicité	Lignée cellulaire P-388 (5)	Garrido *et al.*, 1997

D'autres furanoterpènes linéaires en C_{21}, présents en faible quantité, ont été isolés à partir de la fraction la plus polaire d'extraits méthanoliques de *S. officinalis* et identifiés (Cimino, S. de Stefano, *et al.*, 1974). Quatre d'entre eux sont des dérivés de la furospongine-1 **1** avec un cycle furane modifié en γ-hydroxy-α,β-butenolide (**7-10**) alors que quatre autres sont des γ-époxybuténolides moins polaires (**11-14**).

En 1997, la furospongine-5 **15**, la cyclofurospongine-2 **16** et la déméthylfurospongine-4 **17** ont été isolées de spécimens de *S. officinalis*, récoltés dans la zone infralittorale de la Caleta (Cádiz) en Espagne. La furospongine-5 **15** a révélé une activité cytotoxique (Garrido *et al.*, 1997) (Tableau 6).

Plus récemment, en 2011, trois autres dérivés (**18-20**) ont été isolés à partir de spécimens de *S. officinalis* récoltés le long de la côte sicilienne (Manzo *et al.*, 2011), dont la furospongolide **19** qui avait précédemment été isolée de l'éponge *Dysidea herbacea* en 1980 (Kashman and Zviely, 1980).

Deux isomères de la furospongine-1 **1**, la furospongine- 3 **21** et la furospongine-4 **22**, ont été isolés à partir d'extraits à l'acétone de spécimens de *S. officinalis* récoltés dans la baie de Naples (Cimino, De Stefano, and Minale, 1972) (Figure 19). Ces deux molécules sont des

furanosesterterpènes, c'est-à-dire des composés en C_{25} construits à partir de cinq unités isopréniques.

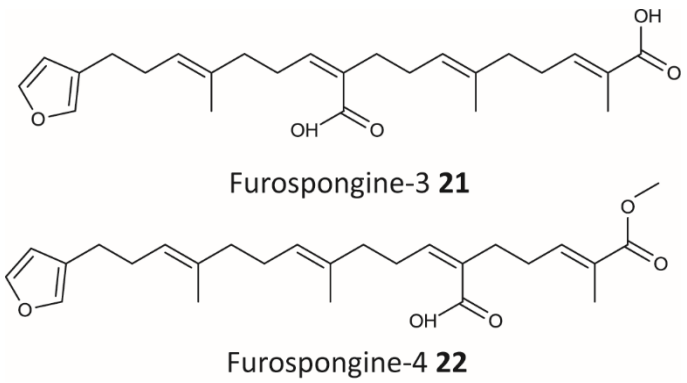


Figure 19 : Principaux furanosesterterpènes isolés chez l'éponge *S. officinalis*.

3.7.1.2. Sesterterpènes de type scalarane

Les sesterterpènes de type scalarane isolés chez *S. officinalis* sont présentés en Figure 20. Ces sesterterpènes dérivent d'une structure tétracyclique, le scalarane **23**. Ils possédent une structure proche de la scalarine **24** a été décrite pour la première fois en 1972 à partir de l'éponge *Cacospongia scalaris* récoltée dans le golfe de Naples (Fattorusso *et al.*, 1972). Sa structure a été confirmée par une étude cristallographique (Cambie *et al.*, 1999).

La déoxoscalarine **25** a été isolée chez des spécimens de *S. officinalis* récoltés dans la baie de Naples (Cimino, Stefano, and Minale, 1972). L'acétate déoxoscalarine **26** et la (–)-12-*epi*-déoxoscalarine **27** ont été isolés chez un specimen récolté au nord de la mer Adriatique.

La déoxoscalarine **25**, l'acétate déoxoscalarine **26** et la (–)-12-*epi*-déoxoscalarine **27** présentent des activités cytotoxiques (De Giulio *et al.*, 1989; Miyamoto *et al.*, 1999; Orhan *et al.*, 2010) (Tableau 7).

La (–)-12-*epi*-déoxoscalarine **27** possède aussi aussi une activité anti-parasitaire (Orhan *et al.*, 2010). Cette molècule isolée chez une autre espèce de *Spongia* a été étudiée pour sa capacité à inhiber la transactivation d'un récepteur nucléaire, le farnesoid X receptor (FXR), qui pourrait être une cible prometteuse dans le traitement de l'hypercholesterolémie chez l'Homme (Nam *et al.*, 2006) (Tableau 7).

Le scalaradial **28** a été isolé à partir de spécimens de *S. officinalis* récoltés le long de la côte sicilienne (Manzo *et al.*, 2011). Il avait déjà été identifié chez l'éponge *Cacospongia mollior* (Cimino, S. D. Stefano, *et al.*, 1974).

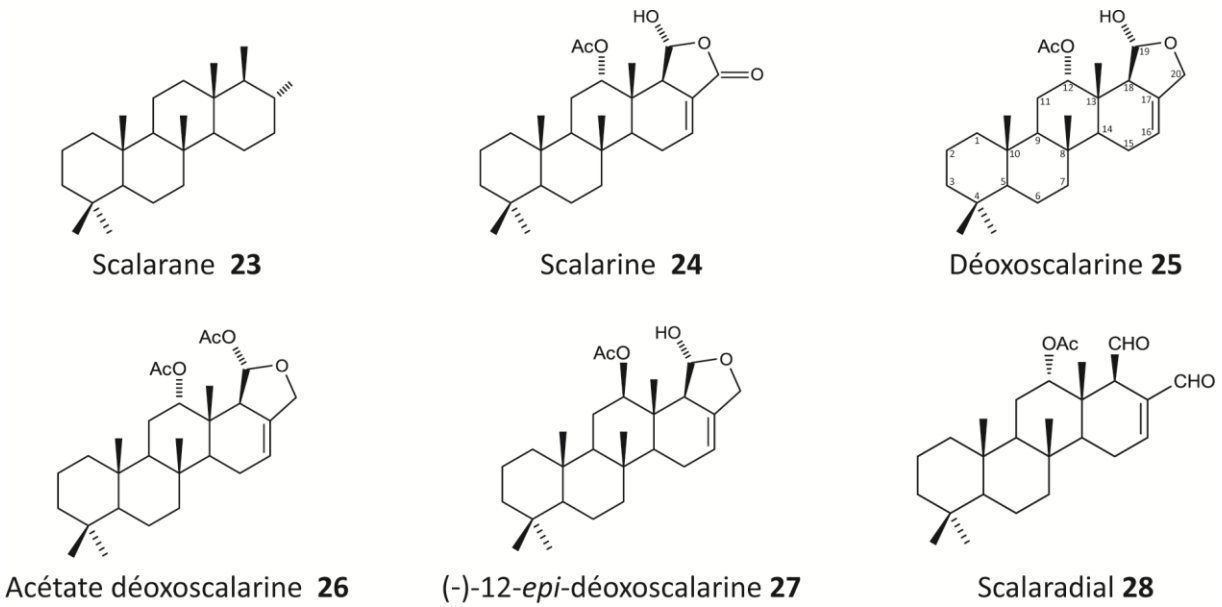


Figure 20 : Principaux sesterterpènes de type scalarane isolés chez l'éponge *S. officinalis*.

Tableau 7 : Activités biologiques des sesterterpènes de type scalarane isolés chez l'éponge *S. officinallis*.

Molécule	**Activité**	**Lignée cellulaire (CI_{50} en µg.mL^{-1})**	**Références**
Déoxoscalarine **25**	Cytotoxicité	Lymphome murin L1210 (1,4) Carcinome épidermique humain KB (6,4)	Miyamoto *et al.*, 1999
Acétate déoxoscalarine **26**	Cytotoxicité	*Artemia salina* (190)	De Giulio *et al.*, 1989
(–)-12-*epi*-déoxoscalarine **27**	Anti-parasitaire	*Trypanosoma cruzi* (40,43) *Trypanosoma b.rhodesiense* (55,25) *Leishmania donovani* (>90) *Plasmodium falciparum* (7,48)	Orhan *et al.*, 2010
	Cytotoxicité	Lignée cellulaire L6 (60,33) *Artemia salina* (200)	Orhan *et al.*, 2010 De Giulio *et al.*, 1989
	Inhibiteur FXR	-	Nam *et al.*, 2006

3.7.1.3. Diterpènes

Les diterpènes sont des molécules tétracycliques en C_{20} constitués de quatre unités isopréniques. Les diterpènes isolés chez *S. officinalis* sont présentés en Figure 21.

L'isoagatholactone **29** a été isolée chez *S. officinalis* en 1974. Sa structure chimique et sa configuration absolue ont été déterminées par des comparaisons structurales avec l'acide

grindélique (Cimino, D. De Rosa, *et al.*, 1974). La synthèse de l'isoagatholactone **29** a permis d'en confirmer la structure (Abad *et al.*, 1996).

Les extraits méthanoliques de *S. officinalis,* collectée près des îles Canaries, contenaient quatre dérivés hydroxy et acétoxy de l'isoagatholactone **29**, le 11β-hydroxyspongi-12-ène-16-one **30**,11β-acetoxyspongi-12-ène-16-one **31**, le 7β,11β-dihydroxyspongi-12-ène-16-one **32** et le 7β, 11α-dihydroxyspongi-12-ène-16-one **33**.

L'isoagatholactone **29** et deux analogues structuraux (**30**-**31**) possèdent des activités cytostatiques présentées dans le Tableau 8 (Gonzalez *et al.*, 1984),

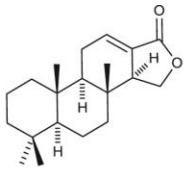
Tableau 8 : Concentration inhibitrice médiane en µg.mL^{-1} vis-à-vis de la lignée cellulaire Hela de diterpènes isolés chez l'éponge *S. officinallis* (Gonzalez *et al.*, 1984).

Molécule	**CI_{50} en µg.mL^{-1}**
Isoagatholactone **29**	10
11β-hydroxyspongi-12-en-16-one **30**	1
11β-acetoxyspongi-12-en-16-one **31**	5

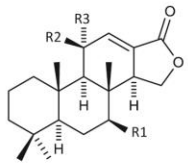
En 1980, trois autres diterpènes ont été mis en évidence, l'acide spongia-13(16),14-diène-19-oïque **34**, le spongia-13(16),14-diène-19-al **35** et le spongia-13(16),14-diène **36**. Ce dernier est le plus simple diterpène isolé d'éponge, rapporté dans la littérature (Capelle *et al.*, 1980).

En 1982, un nouveau diterpène du même type, la 15α,16α-déacétoxyspongine **37**, un dérivé déacétoxy en C-12 de l'aplysilline isolée de *Aplysilla rosea* collectée en Nouvelle Zélande en 1979 (Kazlauskas *et al.*, 1979) ainsi que trois diterpènes tricycliques (**38**-**40**) ont été isolés (Cimino *et al.*, 1982).

En 1988, la spongialactone A **41** a été isolée à partir d'un extrait lipophilique de *S. officinalis* var. *arabica* (Hirsch and Kashman, 1988).



Isoagatholactone **29**

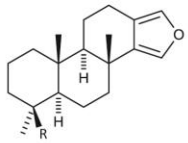


$R_1 = R_3 = H$, $R_2 = OH$
11β-hydroxyspongi-12-ène-16-one **30**

$R_1 = R_3 = H$, $R_2 = OAc$
11β-acétoxyspongi-12-ène-16-one **31**

$R_1 = R_2 = OH$, $R_3 = H$
7β, 11β-dihydroxyspongi-12-ène-16-one **32**

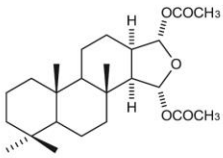
$R_1 = R_3 = OH$, $R_2 = H$
7β, 11α-dihydroxyspongi-12-ène-16-one **33**



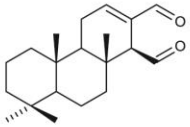
R = COOH
Acide spongia-13(16),14-diène-19-oïque **34**

R = CHO
Spongia-13(16),14-diène-19-al **35**

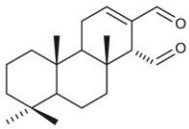
R = CH_3
Spongia-13(16),14-diène **36**



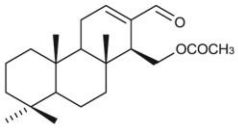
15α, 16α-déacétoxyspongine **37**



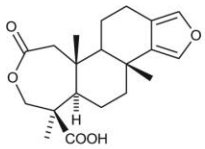
Ent-isocopal-12-ène-15, 16-dial **38**



14-iso-*ent*-isocopal-12-ène-15, 16-dial **39**



15-acétoxy-*ent*-isocopal-12-ène-16-al **40**



Spongialactone A **41**

Figure 21 : Principaux diterpènes isolés de l'éponge *S. officinalis*.

3.7.2. Stérols

Les Porifères ont été les premiers invertébrés à fournir des stérols originaux (Bergmann, 1949) et sont apparus depuis comme une source importante de nouveaux stérols d'une diversité sans précédent (Djerassi, 1981; Kerr and Baker, 1991). Le nombre de stérols présents dans une éponge peut varier de un (Kerr *et al.*, 1991) à soixante-quatorze (Itoh *et al.*, 1983). Pour une espèce donnée, la composition en stérols est qualitativement invariable quel que soit le site ou la saison de récolte. Ils ont été utilisés comme marqueurs chimiotaxonomiques de nombreuses espèces d'éponge et des combinaisons particulières de stérols semblent caractériser certains ordres, familles et genres. Les stérols de haut poids moléculaires, qui sont majoritaires, sont probablement des constituants membranaires (Bergquist *et al.*, 1980, 1991).

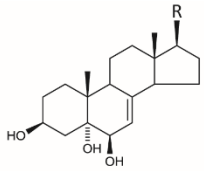
Cependant, les Spongiaires de l'ordre des Dictyocératides sont caractérisées par une composition en stérols très faible (Bergquist *et al.*, 1980) contrairement aux terpènoïdes.

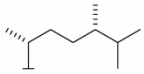
Trois catégories de stérols ont été isolées chez *S. officinalis*, des hydroxystérols (Madaio *et al.*, 1989; Migliuolo *et al.*, 1990), des sécostérols (Migliuolo *et al.*, 1991, 1992; Adinolfi *et al.*, 1994) ainsi que des époxystérols (Migliuolo *et al.*, 1993).

3.7.2.1. Hydroxystérols

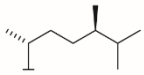
3.7.2.1.1. *Les trihydroxystérols*

En 1989, quinze 3β,5α,6β trihydroxystérols **42-56** ont été isolés chez des spécimens de *S. officinalis*, récoltés dans la baie de Naples (Madaio *et al.*, 1989) (Figure 22). Parmis ces quinze molécules, six 3β,5α,6β trihydroxystérols (**42-47**), cinq autres 3β,5α,6β trihydroxystérols (**48-52**), qui avaient précédemment été isolés et identifiés chez le bryozoaire *Myriapora truncata* communément appelé faux corail (Cafieri *et al.*, 1985), ont été identifiés. Enfin, quatre autres 3β,5α,6β trihydroxystérols avaient été précédemment isolés et identifiés en 1987 chez une autre démosponge, *Spongionella gracilis* (**53-56**) (Piccialli and Sica, 1987).

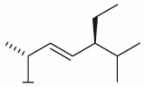


R = 

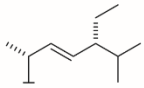
(24*S*)-24-méthyl-5α-cholest-7-ène-3β, 5, 6β-triol **42**

R = 

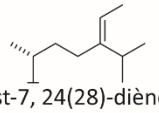
(24*R*)-24-méthyl-5α-cholest-7-ène-3β, 5, 6β-triol **43**

R = 

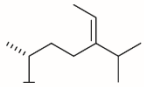
44

R = 

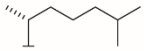
45

R = 

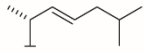
(24*Z*)-24-éthyl-5α-cholest-7, 24(28)-diène-3β, 5, 6β-triol **46**

R = 

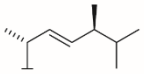
(24*E*)-24-éthyl-5α-cholest-7, 24(28)-diène-3β, 5, 6β-triol **47**

R = 

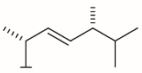
Cholest-7-en-3β, 5α, 6β-triol **48**

R = 

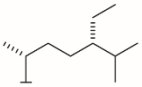
(22*E*)-cholest-7, 22-diène-3β, 5α, 6β-triol **49**

R = 

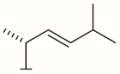
(22*E*, 24*S*)-24-méthylcholest-7, 22-diène-3β, 5α, 6β-triol **50**

R = 

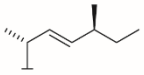
(22*E*, 24*R*)-24-méthylcholest-7, 22-diène-3β, 5α, 6β-triol **51**

R = 

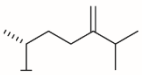
(22*E*, 24ξ)-24-éthylcholest-7, 22-diène-3β, 5α, 6β-triol **52**

R = 

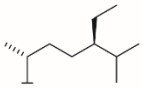
(22*E*)-24-nor-5α-cholest-7, 22-diène-3β, 5, 6β-triol **53**

R = 

(22*E*, 24*S*)-24-méthyl-5α-cholest-7, 22-diène-3β, 5, 6β-triol **54**

R = 

24-méthylène-5α-cholest-7-ène-3β, 5, 6β-triol **55**

R = 

(24*R*)-24-éthyl-5α-cholest-7-ène-3β, 5, 6β-triol **56**

Figure 22 : Principaux trihydroxystérols isolés chez *S. officinalis*.

3.7.2.1.2. Les tétrahydroxystérols

En 1990, six tétrahydroxystérols originaux **57-62** ont été isolés, à partir de spécimens de *S. officinalis* récoltés dans la baie de Naples (Migliuolo *et al.*, 1990) (Figure 23).

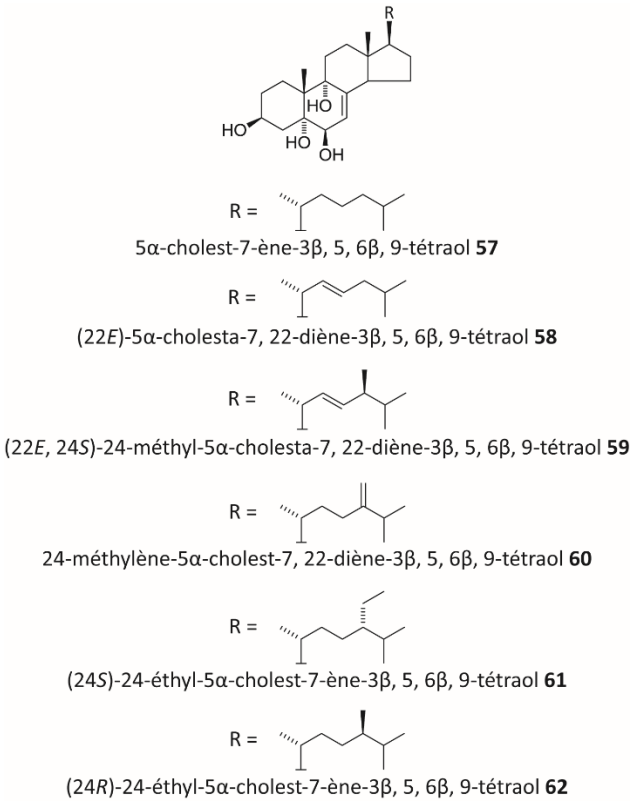


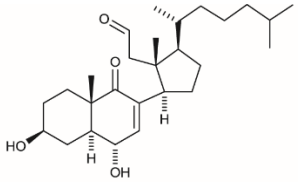
Figure 23 : Principaux tétrahydroxystérols isolés chez *S. officinalis*.

3.7.2.2. Sécostérols

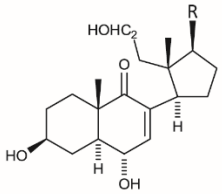
Un nombre important de sécostérols ont été isolés à partir d'invertébrés marins, en particulier de Spongiaires marins (Capon and Faulkner, 1985; Madaio *et al.*, 1988, 1990), mais aussi de Gorgones aussi appelées coraux cornés ou coraux écorce (Enwall *et al.*, 1972) et d'Alcyonaire (Kazlauskas *et al.*, 1982; Bonini *et al.*, 1983).

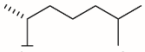
Au début des années 1990, trois 9,11-sécostérols (**63-65**), illustrés en Figure 24, ont été isolés et identifiés à partir de spécimens de *S. officinalis* récoltés dans la baie de Naples (Migliuolo *et al.*, 1991, 1992). En 1994, le 3β-acétoxy-5,6β-dihydroxy-9-oxo-9,11-seco-5α-cholest-7-ène-11-al **66** (Adinolfi *et al.*, 1994) a ensuire été isolé et identifié (Figure 24). Ce

dernier dériverait du clivage de la liaison C-9, C-11 du 3β,5α,6β,9α stérol tétrahydroxylé correspondant (Migliuolo *et al.*, 1990).

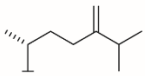


3β, 6α-dihydroxy-9-oxo-9, 11-seco-5α-cholest-7-ène-11-al **63**

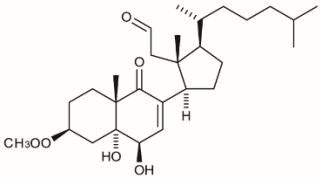


R = 

9, 11-séco-3β, 6α, 11-trihydroxy-5α-cholest-7-ène-9-one **64**

R = 

9, 11-séco-3β, 6α, 11-trihydroxy-24-méthylène-5α-cholest-7-ène-9-one **65**



3β-acétoxy-5, 6β-dihydroxy-9-oxo-9, 11-seco-5α-cholest-7-ène-11-al **66**

Figure 24 : Principaux sécostérols isolés chez l'éponge *S. officinalis*.

3.7.2.3. Époxystérols

A ce jour, six époxystérols **67-72** ont été isolés à partir d'extraits lipophiliques de *S. officinalis* (Migliuolo *et al.*, 1993) et sont présentés en Figure 25.

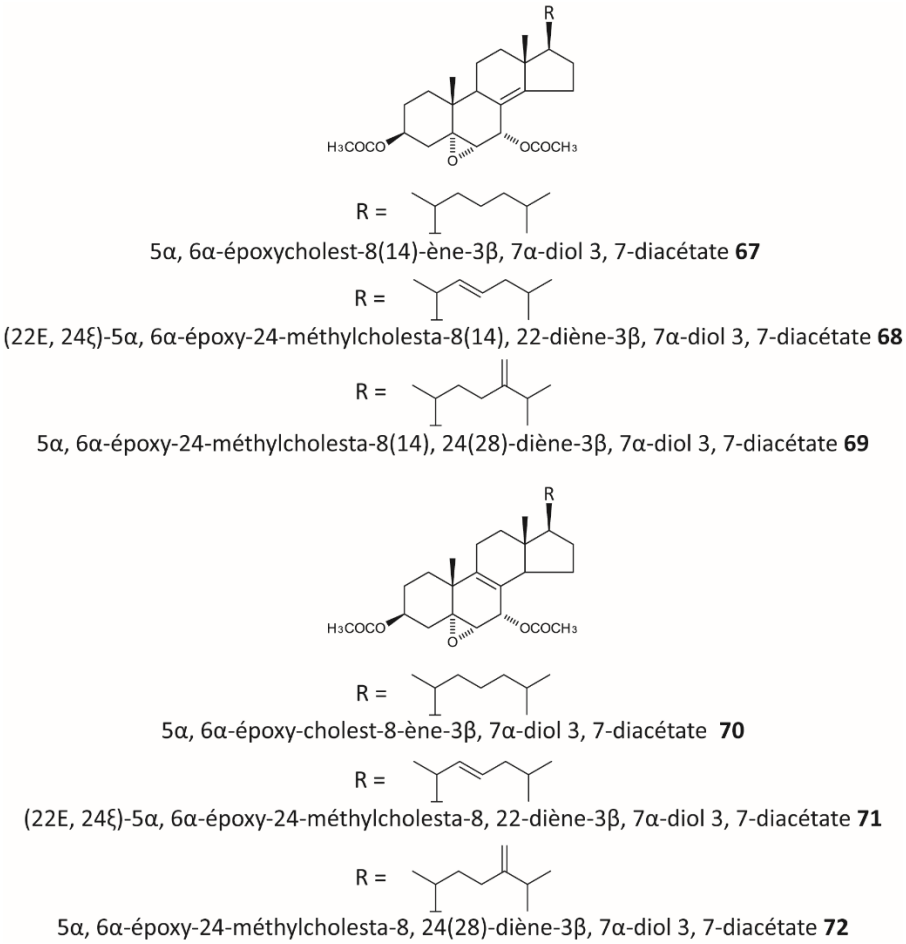
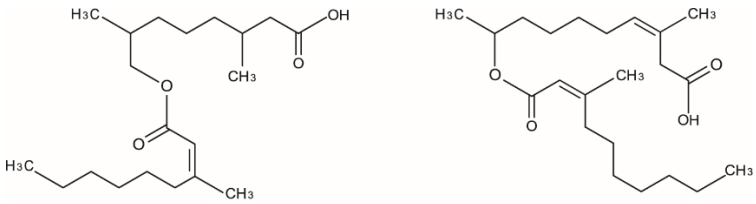


Figure 25 : Principaux époxystérols isolés chez l'éponge *S. officinalis*.

Aucune activité biologique spécifique ne semble avoir été mise en évidence pour les stérols isolés chez l'éponge *S. officinalis*.

3.7.3. Acides gras

Il est intéressant de noter que deux esters d'acide gras, l'acide officinoïque A **73** et l'acide officinoïque B **74** ont été isolés à partir de la fraction soluble d'éther diéthylique d'un extrait à l'acétone d'un broyat de *S. officinalis* (Manzo *et al.*, 2011) (Figure 26).



Acide officinoïque A **73** Acide officinoïque B **74**

Figure 26 : Principaux acides gras isolés chez l'éponge *S. officinalis*.

3.7.4. Autres composés

Les produits naturels issus de la mer et en particulier extraits des Spongiaires présentent des propriétés aux intérêts pharmacologiques variées comme des activités anti-microbiennes, anti-parasitaires, anti-convulsives, anti-inflamatoires ou anti-prolifératives. Chez *S. officinalis*, nombre de ces activités ont été ciblées avant que les molécules sous-jacentes n'aient été caractérisées (Tableau 9).

Des extraits méthanoliques ont montré une activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus sphaericus* et une activité cytostatique contre la lignée cellulaire Hela (Gonzalez *et al.*, 1984). Plus récemment, une fraction d'alcaloïdes contenant des xéstospongines et l'arugospongine a été mise en évidence chez *S. officinalis* pour son activité anti-amoebique (Lakshmi and Ghosal, 2014).

La présence de composés anti-inflammatoires et antiprolifératifs a été mise en évidence dans un extrait brut, dans des fractions semi purifiées d'exsudats ainsi que dans des extraits méthanoliques de *S. officinalis*. Ils présentaient *in vivo* une activité anti-inflammatoire et *in vitro* un effet antiproliférat if contre trois lignées cellulaires cancéreuses humaines (A 549, carcinome du poumon ; HCT15, carcinome du colon ; MCF7, adénocarcinome mammaire). Il a été démontré que ces propriétés anti-inflammatoires étaient dues à la capacité de ces extraits à interférer avec certains médiateurs de l'inflammation (histamine, sérotonine, quinine,

prostaglandine) en inhibant leur production ou en ayant un effet antagoniste (Dellai *et al.*, 2010; Dellai, Deghrigue, *et al.*, 2012).

Les mêmes auteurs ont mis en évidence que des extraits d'exsudats de *S. officinalis* auraient *in vivo* des activités anticonvulsives qui agiraient sur le système nerveux central et pourraient être utilisées dans le traitement de l'épilepsie. Ces mêmes composés auraient aussi *in vivo* des activités analgésiques qui agiraient par des mécanismes de blocage des récepteurs à la douleur ou de libération de substances endogènes qui excitent les terminaisons nerveuses de la douleur (Dellai, Ben Mansour, *et al.*, 2012).

Tableau 9 : Activités biologiques d'extraits de l'éponge *S. officinallis*.

Activité	**Lignées cellulaire (CI_{50} en µg.mL^{-1})**	**Extraits ou fractions**	**Références**
Antimicrobienne	*Staphylococcus aureus* *Pseudomonas aeruginosa* *Bacillus sphericus*	Extraits méthanoliques	Gonzalez *et al.*, 1984
Cytostatique	Lignée cellulaire Hela (1-5)	Extraits méthanoliques	Gonzalez *et al.*, 1984
Anti-amoebique	*E. histolytica* (15,62)	Fraction alcaloïde	Lakshmi and Ghosal, 2014
Anti-inflammatoire	-	Extraits méthanoliques, Extraits bruts Fractions semi purifiées d'exsudats	Dellai *et al.*, 2010 Dellai, Deghrigue, *et al.*, 2012
Antiproliférative	Carcinome pulmonaire A549 (1250) Carcinome du colon HCT15 (450) Adénocarcinome du sein MCF7 (425)	Extraits bruts,	Dellai *et al.*, 2010 Dellai, Deghrigue, *et al.*, 2012
Antiproliférative	Carcinome pulmonaire A549 (250) Carcinome du colon HCT15 (135) Adénocarcinome mammaire MCF7 (100)	Fractions semi purifiées d'exsudats	Dellai *et al.*, 2010 Dellai, Deghrigue, *et al.*, 2012
Anticonvulsive	-	Extraits d'exsudats	Dellai, Ben Mansour, *et al.*, 2012

3.7.5. Bilan sur les molécules bioactives isolées chez S.officinalis

L'éponge *S. officinalis* est caractérisée par l'expression de molécules qui induisent ou inhibent les interactions avec et entre les micro-organismes. Par exemple, la production de composés toxiques aux propriétés antifouling permettrait d'empêcher la colonisation de l'éponge par des espèces bactériennes pathogènes ou non. Elle régulerait ainsi le recrutement des bactéries qui lui sont associées et la formation des biofilms microbiens. Mais ces composés pourraient aussi, *in vivo*, participer au métabolisme de l'éponge (Becerro *et al.*, 1994).

Tableau 10 : Bilan des activités biologiques rencontrées chez l'éponge *S. officinalis*.

Activité	Molécule	Référence
Anti-bactérienne	Furospongine-1 **1**	Anderson *et al.*, 1994
Anti-parasitaire	Furospongine-1 **1**	Orhan *et al.*, 2010
	(–)-12-*epi*-déoxoscalarine **27**	Orhan *et al.*, 2010
Induction de biofilm	Dihydrofurospongine-2 **5**	Manzo *et al.*, 2011
	Tétrahydrofurospongine-2 **6**	Manzo *et al.*, 2011
Anti-microbienne	Extraits méthanoliques	Gonzalez *et al.*, 1984
Anti-amoebique	Fraction alcaloïdique	Lakshmi and Ghosal, 2014
Anti-inflammatoire	Extraits méthanoliques, extrait brut, Fractions semi purifiées d'exsudats	Dellai *et al.*, 2010; Dellai, Deghrigue, *et al.*, 2012
Anti-proliférative	Extraits méthanoliques, extrait brut, Fractions semi purifiées d'exsudats	Dellai *et al.*, 2010; Dellai, Deghrigue, *et al.*, 2012
Anti-convulsive	Extraits d'exsudats	Dellai, Ben Mansour, *et al.*, 2012
Cytotoxicité	Furospongine-1 **1**	Orhan *et al.*, 2010
	Furospongine-2 **3**	De Giulio *et al.*, 1989
	Isomères **3a**	De Giulio *et al.*, 1989
	Isomères **3b**	De Giulio *et al.*, 1989
	Isomères **3c**	De Giulio *et al.*, 1989
	Furospongine-5 **17**	Garrido *et al.*, 1997
	Déoxoscalarine **25**	Miyamoto *et al.*, 1999
	Acétate déoxoscalarine **26**	De Giulio *et al.*, 1989
	(–)-12-*epi*-déoxoscalarine **27**	Orhan *et al.*, 2010 De Giulio *et al.*, 1989
	Extraits méthanoliques	Gonzalez *et al.*, 1984
Cytostatique	Isoagatholactone **29**	Gonzalez *et al.*, 1984
	11β-hydroxyspongi-12-ène-16-one **30**	Gonzalez *et al.*, 1984
	11β-acetoxyspongi-12-ène-16-one **31**	Gonzalez *et al.*, 1984
Inhibiteur FXR	(–)-12-*epi*-déoxoscalarine **27**	Nam *et al.*, 2006

La question de l'origine de ces molécules reste encore ouverte. En effet, ces molécules pourraient être produites soit par l'éponge soit par certaines de ses bactéries épibiotiques (Taylor *et al.*, 2007).

Plus généralement, la présence de composés à activité anti-inflammatoire, anti-proliférative, anti-bactérienne, antiparasitaire et cytotoxique a été mise en évidence dans de nombreuses études (Tableau 10).

CHAPITRE 1

Bactéries associées à l'éponge marine *Spongia officinalis* et résistantes aux métaux

CHAPITRE 1 : Bactéries associées à l'éponge marine *Spongia officinalis* et résistantes aux métaux

1. Résumé

L'accumulation des métaux toxiques dans l'environnement représente une forte menace environnementale et sanitaire. Les éponges marines, invertébrés sessiles qui filtrent activement l'eau de mer environnante, peuvent concentrer des composés toxiques tels que les métaux lourds (Pérez *et al.*, 2005) et être utilisées comme bioindicateurs de pollution métallique (Patel *et al.* 1985). Par ailleurs, elles hébergent une biomasse bactérienne importante (Webster and Taylor 2011), dont le rôle dans la tolérance aux polluants environnementaux reste encore mal connu.

Notre étude s'est portée sur les bactéries tolérantes aux métaux lourds (cuivre, plomb, nickel et zinc) associées à l'éponge méditerranéenne *S. officinalis* (classe : Demospongia, ordre : Dictyoceratida, famille : Spongiidae), connue pour son accumulation en métaux toxiques (Pérez *et al.*, 2005).

Nous avons d'abord évalué les niveaux de contaminations de ces quatre métaux à la fois de l'eau de mer environnante et au sein des tissus de *S. officinalis* récoltée dans la baie de Marseille sur trois années. Nous avons alors isolé, affilié phylogénétiquement et visualisé par CARD-FISH les bactéries associées à cette éponge et tolérantes aux métaux sélectionnés. Ces souches ont ensuite été caractérisées du point de vue de leur résistance métallique par mesure de leur concentration minimale inhibitrice.

L'exploration de la diversité bactérienne chez *S. officinalis* a été réalisée à l'aide d'une approche de métagénomique comparative, l'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant.

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont fait l'objet d'une publication qui a été acceptée dans le journal **Marine Environmental Research** sous la référence :

Bauvais, C., Zirah, S., Piette, L., Chaspoul, F., Domart-Coulon, I., Chapon, V., Gallice, P., Rebuffat, S., Pérez, T., Bourguet-Kondracki, M.-L.. (2015) Sponging up metals: Bacteria associated with the marine sponge *Spongia officinalis*. *Marine Environmental Research*.doi:10.1016/j.marenvres.2014.12.005.

2. Article

Contents lists available at ScienceDirect

Marine Environmental Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/marenvrev

Sponging up metals: Bacteria associated with the marine sponge *Spongia officinalis*

Cléa Bauvais [a, b], Séverine Zirah [a], Laurie Piette [c, d, e], Florence Chaspoul [f, g], Isabelle Domart-Coulon [a], Virginie Chapon [c, d, e], Philippe Gallice [f, g], Sylvie Rebuffat [a], Thierry Pérez [h], Marie-Lise Bourguet-Kondracki [a, *]

[a] Laboratoire Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes, CNRS/MNHN UMR 7245, Muséum National d'Histoire Naturelle, 57 rue Cuvier (CP 54), 75005 Paris, France
[b] Université Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France
[c] Laboratoire des Interactions Protéines Métal, CEA, DSV, IBEB, SBVME, Bât 185, CEA de Cadarache, 13108 Saint-Paul-Lez-Durance, France
[d] CNRS, UMR 7265, Bât 185, CEA de Cadarache, 13108 Saint-Paul-Lez-Durance, France
[e] Université d'Aix-Marseille, Bât 185, CEA de Cadarache, 13108 Saint-Paul-Lez-Durance, France
[f] Laboratoire de Physique Chimie Prévention des risques, Faculté de Pharmacie, 13385 Marseille Cedex 5, France
[g] Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale, Aix-Marseille Université, UMR CNRS 7263, IRD 237, 13385 Marseille Cedex 5, France
[h] Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale, Aix-Marseille Université, UMR 7263 CNRS 7263, IRD 237, Station Marine d'Endoume, Rue de la Batterie des Lions, 13007 Marseille, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 14 November 2014
Received in revised form
22 December 2014
Accepted 24 December 2014
Available online 26 December 2014

Keywords:
Spongia officinalis
Mediterranean sea
Bioindicators
Heavy metals
Bacteria
Metallic tolerance

ABSTRACT

The present study explored the bacteria of the sponge *Spongia officinalis* in a metal-polluted environment, using PCR-DGGE fingerprinting, culture-dependent approaches and *in situ* hybridization. The sponge samples collected over three consecutive years in the Western Mediterranean Sea contained high concentrations of zinc, nickel, lead and copper determined by ICP-MS. DGGE signatures indicated a sponge specific bacterial association and suggested spatial and temporal variations. The bacterial culturable fraction associated with *S. officinalis* and tolerant to heavy metals was isolated using metal-enriched microbiological media. The obtained 63 aerobic strains were phylogenetically affiliated to the phyla Proteobacteria, Actinobacteria, and Firmicutes. All isolates showed high tolerances to the selected heavy metals. The predominant genus *Pseudovibrio* was localized *via* CARD-FISH in the sponge surface tissue and validated as a sponge-associated epibiont. This study is the first step in understanding the potential involvement of the associated bacteria in sponge's tolerance to heavy metals.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Marine sponges are sessile filter feeders that pump actively the surrounding seawater, feed on suspended organic material and pico- and nanophytoplankton (Topçu *et al.*, 2010) and can accumulate high amounts of metals according to the contamination of the environment (Hansen *et al.*, 1995; Cebrian *et al.*, 2003). They have thus been proposed as sentinels of heavy metal pollution (Patel *et al.*, 1985; Pérez *et al.*, 2005; de Mestre *et al.*, 2012).

Marine sponges are known to harbor within their tissues dense and diverse communities of microorganisms such as fungi, microalgae, archaea and bacteria, which can constitute up to 40% of the volume of some *Demospongiae* (Hentschel *et al.*, 2006). Although little is known about the role of these microorganisms for their host, it was proposed that they contribute to

the sponge metabolism as a source of nutrition (Wilkinson and Garrone, 1980; Webster and Taylor, 2012) and to its defense through the production of secondary metabolites against predators, competitors, fouling organisms or microbes (Bakus *et al.*, 1986; Taylor *et al.*, 2007). Resistance to heavy metal has been described for numerous environmental bacteria isolated from seawater (Sabry *et al.*, 1997), corals (Sabdono *et al.*, 2012), polychaete annelids (Jeanthon and Prieur, 1990) or recently from the Brazilian sponge *Polymastia janeirensis* (Santos-Gandelman *et al.*, 2014). Bacterial resistance to heavy metals relies on a large variety of mechanisms including membrane transport, metal sequestration or enzymatic detoxification systems (Nies, 1999; Bruins *et al.*, 2000). Several investigations have shown that the presence of heavy metals in the environment, due to pollution or anthropogenic activities, could affect bacterial communities and their activities (Gans *et al.*, 2005; Losfeld *et al.*, 2014). If the capacity of marine sponges to accumulate large amounts of heavy metals is well documented (Cebrian *et al.*, 2003; Pan *et al.*, 2011; Mayzel *et al.*, 2014), very few studies investigate the relationships between putative changes in their associated microbial communities composition and the presence of heavy metals in the environment. The sponge *Rhopaloeides odorabile* was reported to show a decrease in density and diversity of its total bacterial community, when exposed to cupric ion, with the selection of bacteriahighly tolerant to copper (Webster *et al.*, 2001). For the sponge *Fasciospongia cavernosa*, the associated culturable bacteria, affiliated to *Streptomyces* sp., *Salinobacter* sp., *Micromonospora* sp., *Roseobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Vibrio* sp., *Saccharomonospora* sp. and *Alteromonas* sp., were presented as suitable indicators of heavy metal contaminations (Selvin *et al.*, 2009). Finally, specific variations in bacterial community composition were proposed to be responsible for differential accumulation patterns of metals between Red Sea sponges (Pan *et al.*, 2011). Hence, sponge-associated microbial communities have been proposed as sensitive bioindicators of the heavy metal contamination of a marine habitat and may be partly responsible for metal accumulation within the sponge.

The Mediterranean *Spongia officinalis* Linnaeus, 1759, one of the commercial bath sponges, is abundant in the Provence littoral region, which is impacted by the influence of several sewages effluents including that of the city of Marseille, located in the Cortiou cove and a well-known source of anthropogenic pollutants (Pérez *et al.*, 2005). *S. officinalis* has been used for its potential capacity to strongly concentrate all the trace metals and thus to reflect metal availability in the ecosystem (Rainbow, 1995; Pérez *et al.*, 2004). This capacity was illustrated with the monitoring of the availability of twelve metals in nine sites near the city of Marseille after the start of its first sewage treatment plant (Pérez *et al.*, 2005). *S.*

officinalis revealed high content in all trace metals except for mercury and cadmium, and all metallic concentrations subsequently decreased after the opening of the treatment plant.

The aim of the present study was to investigate the bacterial community associated with *S. officinalis* and tolerant to heavy metals. We first determined with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) the level of metallic contamination of *S. officinalis* and seawater samples from two Mediterranean sites, Cortiou and Riou, over three years. Secondly, we fingerprinted with Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE) the diversity of the sponge- and seawater-associated bacterial community, which was analyzed according to metal concentrations both in sponge and surrounding seawater samples. Finally, we focused our investigations on the culturable bacterial community associated with *S. officinalis* for its tolerance to selected heavy metals. The isolated strains were phylogenetically affiliated and the *Pseudovibrio* genus was localized *in situ* with Catalyzed amplified reporter deposition fluorescence *in situ* hybridization (CARD-FISH) in the sponge tissue.

2. Materials and Methods

2.1. Sponge and seawater sampling

Specimens of *S. officinalis* (*Demospongiae*, *Dictyoceratida*, *Spongiidae*) were collected by scuba diving at Cortiou and Riou (France) at 10 and 18 meters of depth, respectively, in October 2011, September 2012 and December 2013 (Supporting Information, Figure S1). Cortiou, located 300 m east of the discharge outlet in the vicinity of the city of Marseille, is known to be strongly influenced by sewage from Marseille and its suburb (Pérez *et al.*, 2005).

Surrounding seawater samples were either directly frozen for metal analysis (2 x 50 mL per site and per year) or filtered on a 0.2 µm polycarbonate membrane (Millipore, 47 mm for microbiological analyses, 2 × 1 L per site and per year). Filter membranes, sponge samples and unfiltered seawater samples were stored at -80°C.

2.2. Treatment of the samples for metal analysis

For each sampling, five freshly collected *S. officinalis* samples and two unfiltered seawater samples were collected from each site in October 2011, September 2012 and December 2013. *S. officinalis* samples were then lyophilized. The samples were prepared for

metal analysis as follows: seawater samples were diluted tenfold in a solution containing 2% nitric acid in ultrapure water (18 MΩ) and sponges were mineralized in nitric acid (Sigma Aldrich, puriss. P.a., 65%), by the way of a microwave system. The ICP-MS instrument was a Thermo X series II model, equipped with a collision cell. The calibration curve was obtained by dilution of a certified multi-element solution (SCP Sciences). Metal concentrations were determined using Plasmalab software (Thermo-Electron, Les Ulis, France). The results for sponge samples, given as means and standard deviations expressed in $\mu g.g^{-1}$ of dry weight (DW), were analyzed statistically for differences between the years and sites by the Pairwise-Wilcoxon rank sum test using Bonferroni. Dry weights were transformed as sponge volumes by the water-dipping method (Stimson and Kinzie, 1991) in order to calculate the metal accumulation factors by dividing metal concentrations in sponge ($\mu g.L^{-1}$) by metal concentrations in seawater ($\mu g.L^{-1}$). Accumulation factors were analyzed statistically for differences between sites by the Wilcoxon test.

2.3. Total DNA extraction from sponge and seawater samples

Total DNA was extracted from *S. officinalis* after a protocol derived from two publications (Zhou *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2009). Two duplicates of 400 mg sponge tissues from Riou and Cortiou (October 2011, September 2012 and December 2013) were disrupted by a TissueLyser II (QUIAGEN). Samples were mixed with 400 µL extraction buffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 100 mM NaPPi, 1.5 M NaCl, 27.4 mM cetrimonium bromide, pH 8.0) and incubated with proteinase K at a final concentration of 1 $mg.mL^{-1}$ at 37°C for 30 min with regular inversions every 5 min. A second treatment was performed with 720 µL of 0.7 M sodium dodecyl sulfate (SDS) and incubated at 65°C for 2 h with gentle inversions every 20 min. The supernatants obtained after centrifugation at 13,000 g at room temperature for 10 min were collected and transferred into 2 mL clean tubes. The pellets were extracted with 200 µL extraction buffer and 20 µL 0.7 M SDS, then vortexed for 10 s, incubated at 65°C for 10 min and centrifuged at 14,000 g at room temperature for 10 min. Purification of total DNA of the combined supernatants was performed with 660 µL of the mixture phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) and vortexed for 20 s. After centrifugation at 14,000 g for 10 min, 0.6% (v/v) isopropanol was added to the aqueous phase and incubated at room temperature for 1 h. The supernatant was separated from the pellet by centrifugation at 14,000 g for 20 min at room temperature and the DNA-containing pellet was washed with 100 µL of

a cold solution of 70% ethanol, covered with 50 µL of sterile deionized water and stored at -20°C.

Filter membranes (0.2 µm) of the seawater samples (2 L) were aseptically cut into eight pieces and the DNA was extracted following the method described previously.

2.4. PCR amplification of the 16S rRNA genes and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis analysis (PCR-DGGE)

The bacterial DNA extracted from sponge and seawater samples was amplified and analyzed by PCR-DGGE as described previously (Chapon *et al.*, 2012). Although this fingerprinting method limits detection to the most abundantly amplified sequences and may not distinguish between different sequences migrating to the same position, it provides a comparison on the same gel of the migration pattern between environmental samples and a first estimation of their microbial diversity (Díez *et al.*, 2001; Li, 2009).

Briefly, metagenomic DNA (20 ng) was used as template for a first PCR amplification of 16S rDNA carried out in 50 µL PCR mixture containing PCR buffer, 0.024 $U.\mu L^{-1}$ KOD Hot Start DNA Polymerase (EMD Chemicals), 0.2 mM of each dNTP and 0.5 µM universal primers P1 (5' - CCT ACG GGA GGC AGC AG - 3') and COM2 (5' - CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT - 3) (Eurofins MWG Operon). This primer set targets the V3-V5 region of the bacterial 16S rRNA gene. Amplifications were conducted in a VEriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystem) with initial denaturation step (94°C, 5 min), followed by 35 cycles of denaturation (94°C, 30 s), primer annealing (55°C, 30 s) and primer elongation (72°C, 1 min) with a final elongation step at 72°C for 5 min. The products of three independent PCR reactions were purified with a QIAquick purification kit (QUIAGEN), pooled and re-amplified as above with the universal primers P1GC (5' - CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC GCC TAC GGG AGG CAG CAG - 3') and COM2 (5' - CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT - 3) (Eurofins MWG Operon) to generate DGGE-compatible fragments (Muyzer *et al.*, 1993).

The PCR products obtained from either sponge or environmental seawater were loaded simultaneously on the same 10% (w/v) polyacrylamide-bisacrylamide (37.5:1) gel in 1x TAE buffer with a 30 to 60% denaturing gradient (100% denaturant equals 40% (v/v) formamide and 7 M urea). The gel containing duplicate sponge or seawater samples from each site and each year was run for 18 h at a constant voltage of 120 V in 1x TAE at 60°C using the DCode Universal Mutation System (Bio-Rad Laboratories, France).

The DGGE gel was then stained for 30 min with SYBR Green (Sigma, Aldrich) and captured with the U: Genius System (SYNGENE). The DGGE profiles were analyzed with the software Bio-1D (Vilbert Lourmat) to produce densitometric curves and subsequently similarity indices. Dendrograms were obtained by the unweight pair group method with arithmetic averages (UPGMA) with 5% tolerance. A matrix was constructed with the normalized data of DGGE band intensities and migration position and submitted to PCA using the freely available R environment version 3.1.1 (www.r-project.org).

2.5. Isolation and phylogenetic affiliation of the culturable bacteria tolerant to heavy metals

The sponge-associated metal-tolerant bacteria were isolated by spreading sponge homogenates onto agar plates using three different media supplemented with metals: marine agar (Marine broth 2216 Difco), marine agar supplemented with 43 µM nalidixic acid and ISP-NaCl (International *Streptomyces* Project Difco supplemented with 3.4 M NaCl) enriched with $NiCl_2$ or $PbCl_2$ (0.15 and 0.5 mM) or $ZnCl_2$ or $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (0.25 and 1 mM) (Sigma-Aldrich). Plates were incubated for 4 to 10 days at 15°C. Single colonies representative of each morphotype were repeatedly re-streaked until pure cultures were obtained. The isolates were then aerobically cultivated on marine broth liquid media at 25°C and kept in 2.1 M glycerol at -80°C for long-term storage.

For all the isolates, genomic DNA was extracted with the PureLink^{TM} Genomic DNA Kit (Invitrogen) and the 16S rRNA gene was amplified with the bacterial primers 27F (5' – AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG - 3') and 1492R (5' – GGT TAC CTT GTT ACG ACT - 3') (Lane, 1991) (Eurofins MWG Operon). PCR products were purified with a QIAquick purification kit (QUIAGEN) and sequenced by Eurofins MWG Operon. The partial rDNA sequences obtained were aligned using the BioEdit Software version 7.2.5 (http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html) and compared for homology using the BLASTn algorithm (Altschul *et al.*, 1990) to sequences of GenBank (http://blast.ncbi.lm.nih.gov). CLUSTAL W program version 1.4 was used for multiple alignment with standard parameters and visually corrected (Thompson *et al.*, 1994). On the basis of alignment results, sequence similarity was checked to define Operational Taxonomic Units (OTUs), at the 97% similarity level. A 16S rDNA phylogenetic tree was constructed using the Maximum Likelihood method based on the Tamura-Nei model (Tamura and Nei, 1993) with MEGA version 6.06 software (http://megasoftware.net) (Tamura *et al.*, 2013). All

the 16S rRNA gene sequence data have been deposited in GenBank under the accession numbers KF582949-KF582911.

2.6. Heavy metal toxicity testing

The minimal inhibitory concentration (MIC) of the four heavy metals ($NiCl_2$, $ZnCl_2$, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ and $PbCl_2$) was determined for each bacterial isolate on 96-well microtitration plates. Assays were performed in six replicates in 200 µL marine broth liquid media with concentrations higher than those used for the isolation of the bacteria, from 0.098 mM to 25 mM. Positive and negative controls were performed in the absence of any metal and in the absence of both metal and bacteria, respectively. A volume of 20 µL of bacterial culture (24 h, DO_{620nm} = 0.1) was inoculated in each well. The plates were incubated at 25°C for 40 h under constant agitation and the absorbance was measured at 620 nm every 10 min with the POLARstar Omega spectrophotometer (BMG labtech).

The MIC value was determined as the lowest concentration of metal that causes 100% growth inhibition. The MIC data for each metal were compared using one-way analysis of variance (ANOVA).

2.7. CARD-FISH detection of *Pseudovibrio* bacteria in tissue sections of *S. officinalis*

Tissue fragments (about 0.5 mm^3) were dissected from freshly collected sponge and fixed for 24h in Bouin fixative (formol with acetic acid and picric acid) then rinsed in 70% ethanol and stored at 4°C.

The morphology of the sponge surface was observed in scanning electron microscopy at 15kV with a JEOL JSM-840A instrument at the MNHN electron microscopy platform, after ethanol dehydration and CO_2 critical-point-drying of a Bouin-fixed fragment sampled through the cortex at top of the massive sponge.

For histology, fixed fragments were dehydrated in ascending ethanol series, then ethanol was substituted with butanol-1, and tissues were embedded in Paraplast Plus paraffin (Leica, France) after orientation in Histosette I cassettes (Simport, France). Sections (5 µm) were cut with disposable blades (Leica818, Leica, France) on a Leitz microtome. Sections were deparaffinized in toluene, rehydrated and used for bacterial *in situ* hybridization (CARD-FISH) experiments.

For detection of the recurrently isolated metal tolerant *Pseudovibrio* bacteria in *S. officinalis* tissues, the CARD-FISH probe NW442 (5' - AGT TAA TGT CAT TAT CTT CAC

TGC - 3') (position 442-465 16S *E. coli*) targeting *Pseudovibrio* sp. bacteria from the sponge *R. odorabile* was used (Webster and Hill, 2001). Its specificity was checked with cells from two *Pseudovibrio* sp. strains isolated from *S. officinalis* and grown in Marine Broth. Cultured bacteria were fixed in 90% ethanol, smeared on Teflon printed Multiwell slides and air-dried. Hybridization was carried out after (Quévrain *et al.*, 2009).

Histological sections or bacterial smears were pre-treated with HCl (10 mM, 10 min at room temperature), proteinase K (1 µg.mL^{-1}, 15 min at 37°C) and lysozyme (10 mg.mL^{-1}, 30 min at 37°C) to provide accessibility of rRNA to the complementary 16S rDNA oligonucleotide probe. Hybridization was performed for 3 h at 42°C in chambers wetted with hybridization buffer (0.9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.3 mM SDS, 1% blocking reagent, 10% dextran sulfate, 35% (v/v) formamide). An equimolar mixture of the eubacterial probes EUB338 I (5’ - GCT GCC TCC CGT AGG AGT - 3’) (Amann *et al.*, 1990), EUB338 II (5' - GCA GCC ACC CGT AGG TGT - 3') (Daims *et al.*, 1999) and EUB338 III (5'-GCT GCC ACC CGT AGG TGT-3') (Daims *et al.*, 1999) was used as a positive control to detect all the sponge-associated bacteria. NonEUB probe (5′ - CTC CTA CGG GAG GCA GC - 3′) (Amann *et al.*, 1990) was used as a negative control.

All probes were purchased conjugated with horseradish peroxidase from http://www.biomers.net/ (Germany). Each histological section or bacterial smear was covered with 10-20 µL of horseradish peroxidase conjugated probe (50 ng in 150 µL hybridization buffer), with volume adjusted to the size of the section. After post-hybridization wash (15 min at 43°C in 5 mM EDTA, 0.135 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0 and 0.2 mM SDS) and two rinses in PBS 10 mM pH 7.4, the signal was amplified 15 min at 37°C with H_2O_2 and tyramides coupled to Alexa488 fluorochrome (Invitrogen). The slides were washed two times with PBS for 10 min, rinsed for 1 min successively with MilliQ water and 96% ethanol, air dried, and then coverslipped in Prolong Antifade mounting medium containing DAPI (3.6 µM, Invitrogen) to counterstain DNA of sponge cell nuclei or bacteria. Four independent experiments were conducted, using four different tissue fragments corresponding to different locations in the encrusting sponge growth form.

Tissue sections were observed (two to four replicate sections and, on the same slide, the negative and positive control sections) to detect Alexa488-labeled signal in epifluorescence at the MNHN photonic microscopy platform (CeMIM) with a Nikon Eclipse TE300 wide-field microscope equipped with a triple dichroic bloc filter. Three-dimensional stacks of images were acquired (0.5 µm z-step), with MonoD excitation-emission settings for DAPI and with MonoF excitation-emission settings for Alexa-488. Images were acquired in three to five

fields per section and analyzed with ImageJ software (NIH, USA) to visualize probe-labeled structures in bacterial smears or in histological sections.

3. Results and discussion

3.1. Metallic contamination of *S. officinalis* and surrounding seawater samples

The concentrations of copper, nickel, lead and zinc, measured in *S. officinalis* and surrounding seawater samples at the two sites of Cortiou and Riou (Figure S1) in October 2011, September 2012 and December 2013, are reported in Figure 1.

Metal concentrations in seawater samples were lower than the WHO standards for drinking freshwater, and generally below the limits of detection, ranging from less than 1 $\mu g.L^{-1}$ for lead in 2012 to 718 $\mu g.L^{-1}$ for copper in 2013. These concentrations in seawater (measured in duplicates) did not appear to significantly fluctuate between years, except for a sharp increase in copper in both sites in 2013 as compared to the two previous years, and, to a lesser extent, a decrease in nickel and lead between 2011 and 2012.

Metal concentrations in sponge samples significantly fluctuated between successive years, as tested with the Pairwise-Wilcoxon rank sum test using Bonferroni correction (asterisks in Figure 1), and apparently independently from seawater fluctuations. For example, at Cortiou, nickel and zinc concentrations in sponge were statistically higher in 2013 than in 2012 despite seawater concentration decrease of the corresponding metals. At Riou, sponge zinc concentration dropped by a factor two in 2012 and 2013 compared to 2011 whereas zinc concentration in seawater remained stable across 2011, 2012 and 2013. Copper concentration in seawater in 2013 increased dramatically at both sites compared to the previous years (718 $\mu g.L^{-1}$ at Cortiou and 723 $\mu g.L^{-1}$ at Riou in 2013), suggesting a discharge of copper into the environment. However, at Riou, copper concentration in sponge generally fluctuated within the same range (from 52 $\mu g.g^{-1}$ DW in 2011 to 34 $\mu g.g^{-1}$ DW in 2013) whereas only ,at Cortiou, did it significantly increased in 2013 (102 $\mu g.g^{-1}$ DW) compared to the previous years (54 $\mu g.g^{-1}$ DW in 2011 and 26 $\mu g.g^{-1}$ DW in 2012). Similar patterns of fluctuations were observed with lead concentrations in seawater and sponge. Lead was significantly less accumulated by the sponge than the other metals.

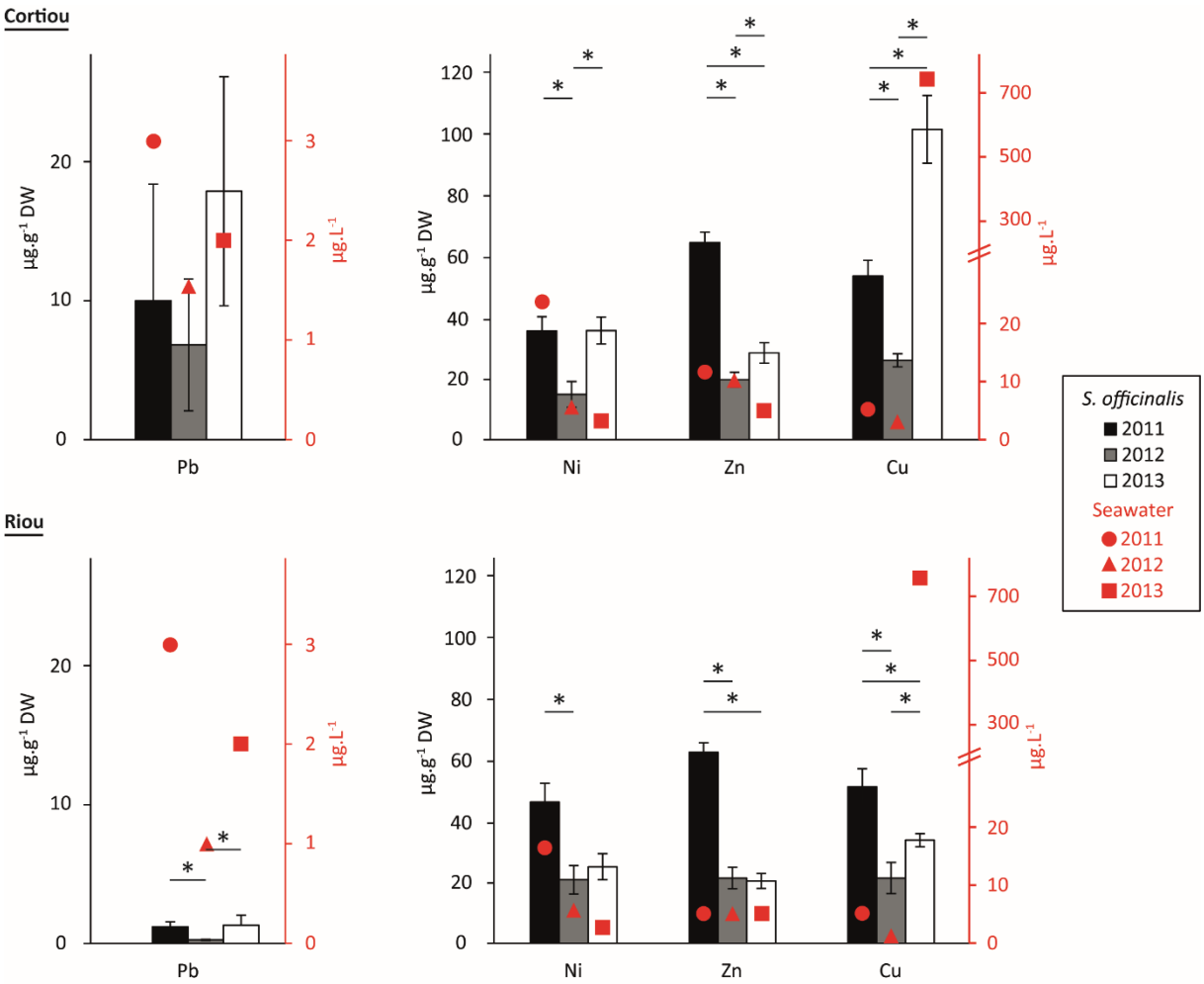


Figure 1: Estimation of heavy metal concentrations in *S. officinalis*. Specimens were collected in October 2011, September 2012 and December 2013 at Cortiou and Riou (mean ± SE µg.g^{-1} dry weight (DW), n = 5). Results of the Pairwise-Wilcoxon rank sum test using Bonferroni correction on the concentrations between the different samples are given as follows: * $p < 0.05$. The average concentrations of each metal (mean µg.L^{-1}) in water samples (n = 2) collected at the same sites are represented in red.

Similar lead concentrations were measured in seawater at Cortiou and Riou whereas sponge lead concentration was statistically higher at Cortiou compared to Riou.

Metal accumulation factors calculated for sponge specimens were high at about 1,000 times above seawater levels with 30% inter-individual variability. These accumulation factors were significantly higher for sponges collected at Cortiou than Riou for lead in 2011, 2012 and copper in 2013. This spatial variation in sponge metal content between Riou and Cortiou is in agreement with the previous results recorded in summer 1999 (Pérez *et al.*, 2005), and can be related to the historical higher impact of the urban sewage of Marseille at this site located at 300 meters from the sewage outlet. Interestingly, in Riou, located near a marine protected area at 5 km from the sewage site, significant levels of metal contaminations were

noted. Overall, the results indicate little temporal change in metal availability in the environment (except for copper) compared to significant fluctuations in sponge, dependent on metallic species, as previously observed in sponges collected on the Eastern coast of the Red Sea (Pan *et al.*, 2011).

Metal fluctuations in *S. officinalis* are thus not directly coupled to fluctuations in seawater, which implies the existence of internal mechanisms of regulation. Indeed, metal pollution has been shown to impact the growth, shape and survival of the sponge *Crambe crambe* (Cebrian *et al.*, 2003) and copper alters the physiology (pumping activity) of *Chondrosia reniformis* sponge (Cebrian *et al.*, 2006). The physiological response of *S. officinalis* may thus depend on metallic species as well as site-related environmental parameters.

The overall high metal accumulation capacity of *S. officinalis*, demonstrated in this study, confirms however, the potential of this sponge as a bioindicator of metallic environmental pollution. As suggested for Red Sea sponges (Pan *et al.*, 2011), this metal accumulation capacity may depend on the composition of its associated bacterial assemblage, prompting more research into potential site-dependent variations.

3.2. Molecular diversity of bacterial communities associated with *S. officinalis*

PCR-DGGE was used as a culture-independent technique to compare the sponge and seawater-associated bacterial communities for samples collected at Cortiou and Riou, in October 2011, September 2012 and December 2013. All 16S rDNA PCR products (~600 bp) were loaded simultaneously on the same gel (Figure 2). Even though DGGE has biases, it remains a rapid, efficient and cost-effective method for fingerprinting microbial communities. Here, the samples have been treated similarly, so we assumed that the biases linked to the technique affected them equally.

Profiles obtained from the samples of *S. officinalis* collected at the two sites exhibited relatively homogenous number of discernible bands, between 22 and 35, and few unresolved bands. Moreover these profiles contained many fragments migrating to the lower part of the gels, corresponding to 16S rRNA gene sequences with a high GC content. These observations illustrate a remarkable bacterial diversity, in agreement with previous microscopic observations of *S. officinalis* (Vacelet, 1975), which reported dense microbial consortia within this sponge.

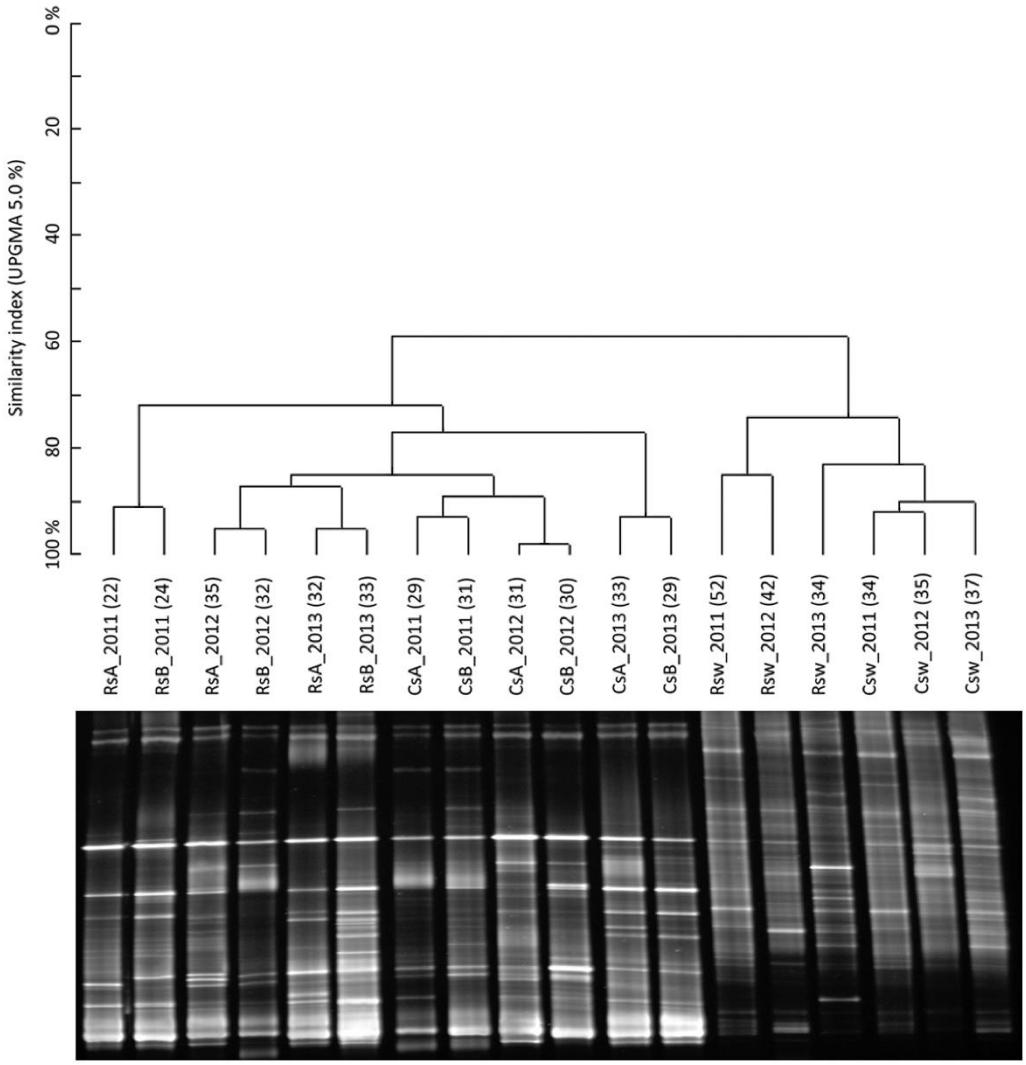


Figure 2: PCR-DGGE fingerprints of the 16S rRNA gene (bottom) and corresponding UPGMA dendrogram (5% tolerance) (up) of total bacterial communities in *S. officinalis* (S, *n* = 2) and seawater (Sw, *n* = 1) samples collected in October 2011, September 2012 and December 2013 at Riou (R) and Cortiou (C), analyzed in the same gel run. The number of discernible bands of the DGGE profiles is indicated in brackets for each sample. Scale bars represent the similarity index. Duplicates are indicated by A and B.

The abundance in the sponge specimens of GC-rich sequences migrating to the lower part of the gel corresponds to a banding pattern suggested to be characteristic of high microbial abundance (HMA) sponges (Gerçe *et al.*, 2011). In addition, profiles obtained for seawater displayed slightly higher number of bands, suggesting higher species richness.

Statistical analysis of DGGE fingerprints provide information for monitoring microbial community variations over space and time (Fromin *et al.*, 2002). Cluster analysis and corresponding similarity UPGMA dendrograms (5% tolerance) are presented in Figure 2. The similarity dendrogram revealed two well clustered groups presenting less than 60% similarity, corresponding to either *S. officinalis* or seawater samples. These results confirm previous data

reported for other species on a sponge-specific bacterial community which greatly differed from that of the seawater (Schmitt *et al.*, 2012; Webster and Taylor, 2012). The seawater cluster was gathered by site rather than by year, exhibiting 74% similarity between Riou and Cortiou. The sponge cluster revealed a relative stability of the sponge-associated bacterial community, with some internal spatial and temporal variations, which were rather attributed to geographic sites than to year of collection, as also observed for seawater.

A PCA analysis on multivariate data including both bacterial 16S rDNA PCR-DGGE profiles of sponge and seawater samples, and metal concentrations within the sponge tissues (Figure 3-A, B) confirmed the clustering previously obtained in the dendrogram. Sponge bacterial signature was reproducible and different from that of the seawater over the three successive years (Figure 3A). Analysis of the corresponding loadings (Figure 3B) suggests that the specificity of the bacterial signature at Cortiou in 2011 might be correlated with the levels of zinc in the sponge tissues. Similarly, the bacterial signature at Cortiou in 2013 might be correlated with the high concentrations of copper within the sponge.

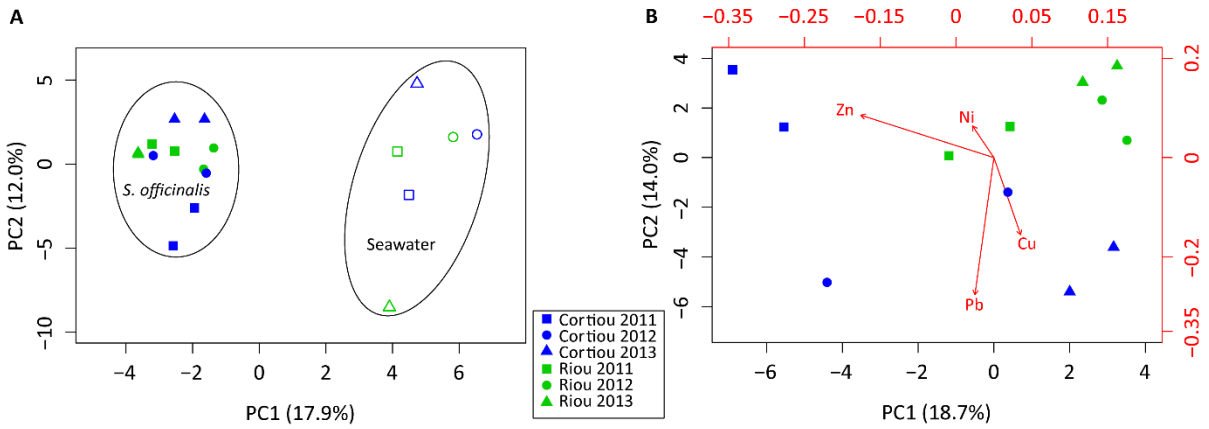


Figure 3: Spatial and temporal source of variability in the bacterial communities: A. Representation of score plot of the PCA performed on DGGE banding pattern data of *S. officinalis* (*n* = 2 per condition) and seawater samples (*n* = 1 per condition) collected at Cortiou and Riou in October 2011, September 2012 and December 2013. B. Representation of score plot of the PCA performed on DGGE banding pattern data of *S. officinalis* (*n* = 2 per condition) collected at Cortiou and Riou in October 2011, September 2012 and December 2013. The loadings corresponding to the bands selected for phylogenetic analysis are shown in red and the concentrations in heavy metals in orange.

3.3. Culturable bacteria tolerant to heavy metals isolated from *S. officinalis*

Metals play important roles in the life processes of microorganisms. Some heavy metals, such as copper, nickel, and zinc, are essential micronutrients but are toxic at high levels, while others, such as lead, have no known specific biological role (Bruins *et al.*, 2000).

Metal tolerant bacteria of *S. officinalis* were isolated from the homogenized sponge supernatant under aerobic conditions using three different media enriched with nickel, lead (0.15 mM or 0.5 mM), zinc or copper (0.25 mM or 1 mM). The choice of metal concentrations was determined on the basis of early studies focused on heavy metal tolerance of environmental marine bacteria (Sabry *et al.*, 1997; Matyar *et al.*, 2008). A total of 63 representative strains of dominant morphotypes were isolated (Table 1), of which 46% were isolated for their tolerance to nickel, 24% to lead, 19% to copper and only 11% to zinc. The phylogenetic affiliation of the metal tolerant bacteria was determined by 16S rRNA gene sequencing of each isolate. The corresponding phylogenetic tree is shown as supporting Information in Figure S2. As illustrated in Table 1, the 16S rRNA gene sequences of the 63 isolates were clustered in 15 OTUs displaying 99% identity to sequences available in GenBank. Under these experimental conditions, the majority of culturable bacteria belonged to the *Proteobacteria* (53 isolates), *Firmicutes* (8 isolates) and *Actinobacteria* (2 isolates) phyla. The *Proteobacteria* phylum, already known to dominate the bacterial community of numerous *Demospongiae* (Dupont *et al.*, 2013, 2014), represented 84% of the metal tolerant community.

Table 1: 16S rRNA gene sequence affiliation, with their closest phylogenetic neighbors of bacterial isolates from *S. officinalis* collected at Cortiou in 2011 and tolerant to nickel, copper, zinc or lead.

OTU	No. of isolates (Metal-supplemented media)	Representative strains	GenBank acc. no. (length fragment in pb)	Sequences presenting the highest identity (%)
1	7 (Zn), 15 (Ni), 7 (Pb), 5(Cu)	2011SOCNI53	KF582880 (1338)	*Pseudovibrio ascidiaceicola* NR_041040.1 (99)
2	1 (Ni)	2011SOCNI17	KF582894 (1215)	*Ruegeria atlantica* NR_112615.1 (99)
5	1 (Ni)	2011SOCNI19	KF582895 (1328)	*Paracoccus marcusii* NR_044922.1 (99)
4	1 (Ni), 1 (Pb)	2011SOCNI21	KF582897 (1408)	*Microbulbifer epialgicus* NR_041493.1 (99)
5	3 (Ni),	2011SOCNI36	KF582883 (444)	*Vibrio litoralis* NR_043545.1 (99)
6	2 (Pb), 1 (Cu)	2011SOCPBI2	KF582908 (959)	*Escherichia fergusonii* NR_027549.1 (99)
7	2 (Ni)	2011SOCNI28	KF582905 (1404)	*Lelliottia nimipressuralis* NR_044976.1 (99)
8	2 (Ni), 3 (Pb), 2 (Cu)	2011SOCNI44	KF582898 (1415)	*Citrobacter freundii* NR_028894.1 (99)
9	1 (Ni)	2011SOCNI14	KF582891 (1267)	*Bacillus subterraneus* NR_104749.1 (99)
10	3 (Cu)	2011SOCCUF3	KF582890 (988)	*Bacillus horneckiae* NR_116474.1 (99)
11	2 (Ni)	2011SOCNI13	KF582888 (811)	*Bacillus koreensis* NR_116851.1 (99)
12	1 (Pb)	2011SOCPBJ6	KF582886 (1414)	*Bacillus pumilus* NR_074977.1
13	1 (Cu)	2011SOCCUA10	KF582887 (1410)	*Fictibacillus phosphorivorans* NR_118455.1 (99)
14	1 (Pb)	2011SOCPBJ5	KF582911 (971)	*Microbacterium paraoxydans* NR_025548.1 (99)
15	1 (Ni)	2011SOCNI57	KF582907 (1401)	*Curtobacterium flaccumfaciens* NR_025467.1 (99)

Eight genera were identified and distributed amongst *Pseudovibrio* (64%), *Citrobacter* (12%), *Vibrio* (6%), *Escherichia* (6%), *Microbulbifer* (4%), *Lelliottia* (4%), *Ruegeria* (2%), *and Paracoccus* (2%). The genus *Pseudovibrio* was the most frequently found for the four studied metals, represented by 34 *Pseudovibrio* sp. strains, which clustered as a single OTU. Three genera representing the *Enterobacteriaceae* class (*Lelliottia*, *Citrobacter* and *Escherichia* sp.) are potential enteric pathogens. Their presence in *S. officinalis* may be considered as an indicator of anthropogenic impacts on aquatic ecosystems (Kefalas *et al.*, 2003; Stabili *et al.*, 2008) resulting from the greater influence at Cortiou of the sewage from Marseille and its suburb. All the isolates from the *Firmicutes* phylum, accounting for 13% of the culturable isolates, were affiliated to the *Bacillus* and *Fictibacillus* genera and none of them was isolated from zinc-enriched media. Isolates of the *Actinobacteria* phylum only represented 3% of the total culturable bacterial community tolerant to heavy metals. One isolate of the genus *Curtobacterium* and one of the genus *Microbacterium* were retrieved from nickel-enriched media and lead-enriched media, respectively.

3.4. Heavy metals tolerance of the bacteria isolated from *S. officinalis*

The tolerance to the four heavy metals considered in this study, nickel, zinc, copper and lead, was investigated for the 63 bacterial isolates from *S. officinalis* (Figure 4). All isolated strains showed a large range of tolerance towards the four studied heavy metals with MIC values ranging from 0.10 to 25 mM. Overall, comparison of the MIC data revealed higher heavy metal tolerance of bacterial isolates to nickel, than to copper, lead and zinc (p = 5.1E-13 in a one-way ANOVA). The MICs were higher than the concentration of heavy metals in the surrounding seawater and in their host *S. officinalis.* The majority of the strains were tolerant to 6.25 mM of nickel (48%), 3.12 mM of copper (60%), lead (38%) or zinc (36%). Around 27% of the strains were tolerant to 12.5 mM of nickel, whereas less than 2% of them were tolerant to the same concentration of zinc, lead or copper. Less than 8% of the isolated bacteria were tolerant to metal concentrations up to 25 mM, as illustrated with *Microbulbifer* sp. 2011SOCNI21 for its tolerance to zinc, *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 for copper, *Pseudovibrio* sp. 2011SOCPBH3 for lead, *Microbacterium* sp. 2011SOCPBJ5 and *Pseudovibrio* sp. 2011SOCCUA9 for nickel (far-right dots in Figure 4). Several invertebrate-associated *Alpha-Proteobacteria*, *Beta-Proteobacteria*, *Gamma-Proteobacteria*, *Actinobacteria* or *Bacilli* have been previously isolated for their tolerance to heavy metals (Jeanthon and Prieur, 1990; Matyar *et al.*, 2008; Sabdono *et al.*, 2012). Interestingly, the presence in sponge-associated communities of phylotypes of bacteria tested to be tolerant to metals in *S. officinalis* or assumed to be for Lake Baikal sponges may reflect the accumulation of metals within sponge tissues, and thus their exposure to pollution (Kaluzhnaya and Itskovich, 2014). As the isolated strains can develop in the presence of high metal concentrations, they could be explored as promising candidates for bioremediation of metallic contamination in aquatic environments (Santos-Gandelman *et al.*, 2014).

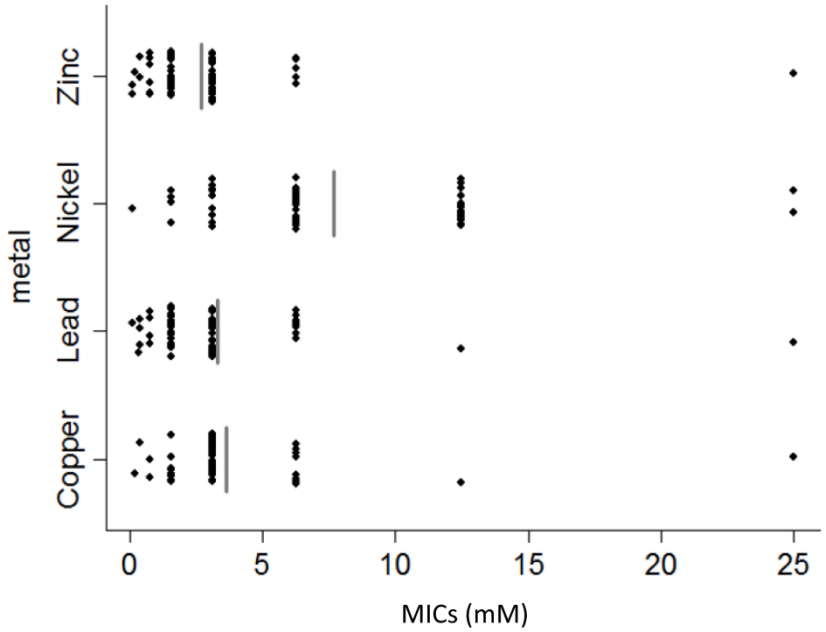


Figure 4: Minimal Inhibitory Concentration (MIC) data, in mM, obtained for the 63 bacterial strains isolated on nickel, copper, zinc and lead, from *S. officinalis* samples collected at Cortiou in 2011 (*n* = 63). Grey vertical lines represent the means of the MIC values.

3.5. *In situ* visualization of *Pseudovibrio* bacteria in *S. officinalis*.

In this study, *Pseudovibrio* strains represented 54% of all the bacteria (64% of the Proteobacteria) isolated from *S. officinalis* on metal-enriched microbiological media. These strains were found to be tolerant to at least one of the four tested metals, as illustrated with three highly tolerant strains 2011SOCNI53, 2011SOCPBH3 and 2011SOCCUA9 (25 mM metal, far-right dots in Figure 4). Representatives of the *Pseudovibrio* genus in the *Alpha-Proteobacteria* have been isolated in the Mediterranean Sea from benthic filter-feeding hosts, including *Pseudovibrio ascidiaceicola* cultured from *Botryllidae* and *Polycitor proliferus* tunicates (Fukunaga *et al.*, 2006), from *Oculina patagonica* corals (Nissimov *et al.*, 2009), as well as from the Mediterranean sea-surface microlayer (Agogué *et al.*, 2005) and from Mediterranean littoral sponges *Suberites domuncula* and *Clathrina clathrus* (Muscholl-Silberhorn *et al.*, 2008). Cultured from phylogenetically distant hosts sampled across all latitudes, they are frequent members of the cultivable community of sponge-associated bacteria, and are considered as sponge generalist bacteria. Recent genome analyses of two *Pseudovibrio* sp. strains have revealed their high metabolic versatility, their ability to use a wide range of organic substrates, and have pointed gene clusters potentially involved in the host symbiotic interactions (Bondarev *et al.*, 2013). However, as there is few overlap between

sponge cultured bacteria and the bacteria retrieved *via* direct 16SrRNA gene sequencing methods, *in situ* hybridization approaches targeting these cultured bacteria are useful to confirm their presence in the host tissue (Montalvo *et al.*, 2014). CARD-FISH experiment is a method suited to detect low abundance environmental microbes, with semi-quantitative estimation of the abundance of bacterial ribotypes in the host tissue, the signal intensity depending on their metabolic activity (ribosomal content) (Pernthaler *et al.*, 2002). This study reports the visualization of *Pseudovibrio* bacteria in tissue sections of *S. officinalis*. The suitability of probe NW442, originally designed to target *Pseudovibrio* sp. from the tropical *R. odorabile* sponge (Webster and Hill, 2001), was checked against cultured metal-tolerant *Pseudovibrio* bacteria from *S. officinalis*. This probe hybridized with two *Pseudovibrio* strains, 2011SOCNI153 and 2011SOCZNC4, isolated from *S. officinalis* (Supporting Information, Figure S3), thus confirming 16S rRNA sequence alignment predictions.

In situ hybridization with universal bacterial probe mix (EUB338 I + EUB338 II + EUB338 III) revealed the abundance of bacteria in *S. officinalis*, distributed heterogeneously within the sponge tissue (Figure 5), with preferential accumulation in the inner mass rich in skeletal spongin fibers (f, autofluorescent under UV), branching aquiferous channels and choanocyte chambers (Figure 5A and 5D). Comparatively, the surface of the sponge, composed of a dark-pigmented dermal envelope ornamented with conules and subdermal lacunae (Cook and Bergquist, 2001b), contained fewer labeled particles, indicating a lower abundance of bacteria at the sponge surface than in its central mass.

Compared to the negative control hybridized with nonsense nonEUB probe (Figure 5B and 5E), *Pseudovibrio* bacteria labeled with probe NW442 were detected in *S. officinalis* as clusters of a few bacterial cells (marked by the green-yellow color (in the web version) in Figure 5C, 5F, 5G, 5H), located within the dermal envelope and lining the subdermal lacunae. These *Pseudovibrio*-related bacteria were present at relatively low abundance compared to the total bacteria. They were not detected in the inner tissue areas rich in spongin fibers and choanocyte seawater filtration chambers. Observations were thus focused on four distinct areas at the surface of the massive encrusting sponge, in sections perpendicular or tangential to the growth surface. The *Pseudovibrio* localization was consistently restricted to the cortex of the sponge in all the investigated tissue areas (Supporting Information, Figure S4A), ranging from inhalant pores at top of the massive sponge (Figure 5C), to the outer surface area adjacent to an exhalant osculum (Figure 5F), the area between surface conules (Figure 5G), and the surface at base of the sponge (Figure 5H), in close proximity to its area of fixation to the substrate.

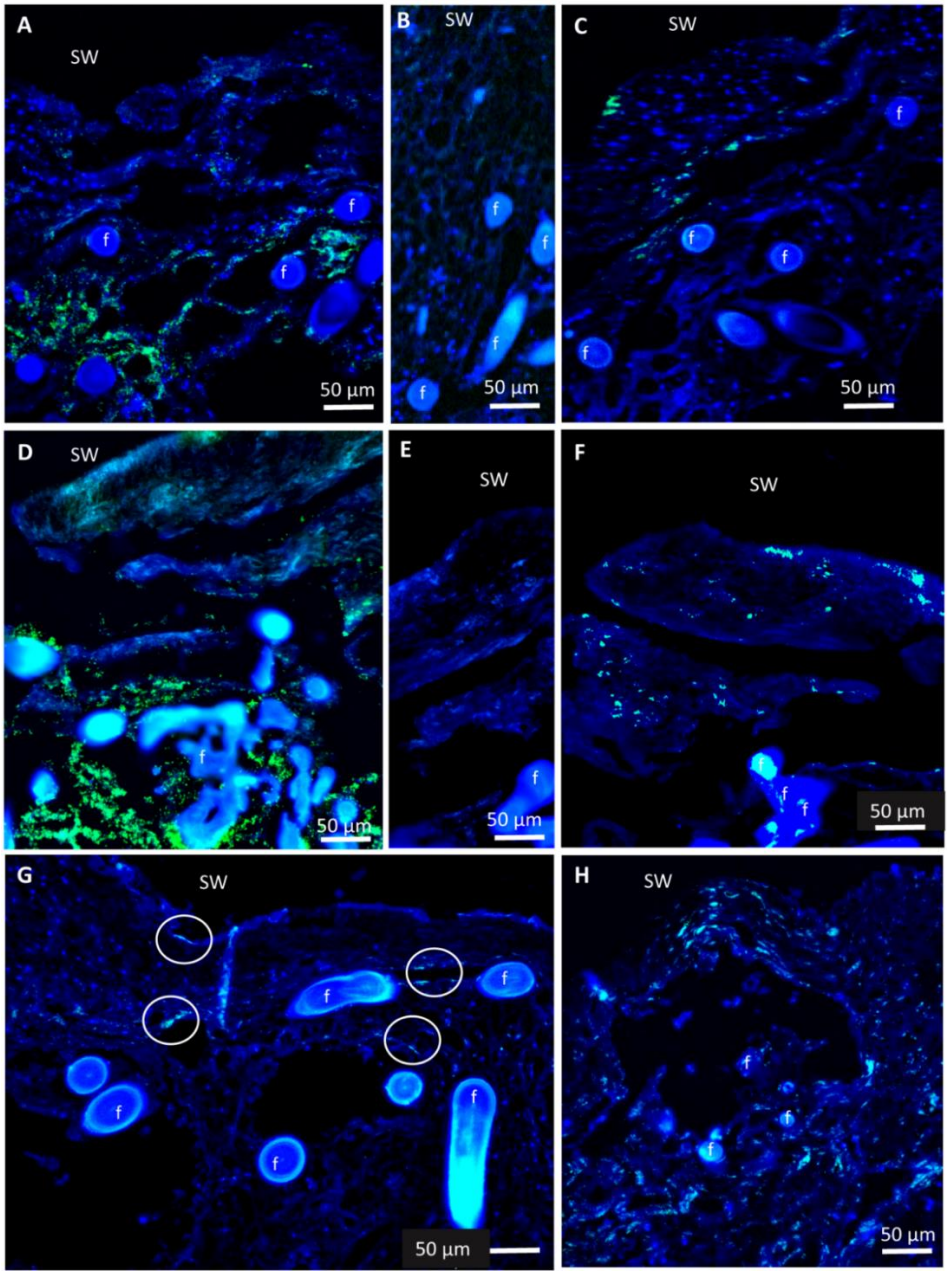


Figure 5: *In situ* visualization of cultured *Pseudovibrio* sp. bacteria in *S. officinalis* tissue. (A) Bacterial distribution in a representative tissue section sampled at top of the massive sponge and perpendicular to its surface, labeled with EUB probe mix, and (B) Negative control with nonEUB probe; (C) Bacteria related to *Pseudovibrio* sp., labeled with probe NW442 (in green-yellow color), are localized at the sponge surface in the dermal tissue facing seawater and lining the subdermal lacunae. (D) Bacterial distribution in tissue sampled in another area at the sponge surface, adjacent to an exhalant opening (osculum), labeled with EUB probe mix, (E) nonEUB negative control, and (F) NW442 probe to visualize *Pseudovibrio* bacteria (in green-yellow color), which are restricted to the dermal tissue at the sponge surface. (G) In tissue sampled on the lateral side of the massive sponge, NW442 probe labeled a few *Pseudovibrio* sp. (green-yellow color highlighted by white circles) at the surface and lining the lacunae. (H) In tangential section through the surface of tissue sampled at the base of

the sponge (near its fixation substrate), several NW442 -labeled *Pseudovibrio* sp. are detected in the dermal tissue. f: spongin skeletal fibers; SW: seawater.

As related *Pseudovibrio* sequences have been previously reported from strains isolated from the Mediterranean sea-surface microlayer (Agogué *et al.*, 2005), our detection of these bacteria at the surface of *S. officinalis* suggests uptake from the surrounding seawater and adaptation to interact with the pinacoderm cell layer delimiting the sponge outer surface. This surface localization suggested a mode of association as bacterial epibiont of *S. officinalis*.

These results indicate that *Pseudovibrio* bacteria related to the cultured metal-tolerant strains are low abundance members of the bacterial community associated with *S. officinalis* These metal-tolerant *Pseudovibrio* are probably adapted to the observed high metal accumulation by the sponge. Although present at low abundance, these bacterial epibionts might contribute to the sponge resistance mechanisms to metal pollution, along with sponge cells and uncultured bacteria, which are abundant in the sponge inner mass as shown by *in situ* hybridization with universal bacterial probes, and which diversity was suggested by the bacterial 16S rDNA PCR-DGGE banding patterns. Functional assays including experimental sponge exposure to increasing metal concentrations and further bacterial community characterization, as well as *in situ* co-localization of metals within bacterial morphotypes (Buccella *et al.*, 2014) would be helpful to further understand the implication of associated bacteria in sponge adaptation to environmental metal pollution.

4. Conclusion

The bacterial community associated with the marine sponge *S. officinalis*, under a metallic polluted environment, was investigated for the first time, combining molecular and cultural approaches. Fingerprinting analyses of the total bacterial community associated with *S. officinalis* highlighted a relative stability of its bacterial profile over time and between two sites differentially impacted by a metallic pollution, with a remarkable specificity of this association in comparison to that of the surrounding seawater.

This study also brings new insights into the sponge associated culturable bacterial community tolerant to heavy metals. The obtained isolates had high measured heavy metal tolerance and were phylogenetically affiliated to the bacterial phyla *Proteobacteria*, with a few *Firmicutes* and *Actinobacteria*. Representatives of the *Pseudovibrio* genus *(Alpha-Proteobacteria)* were visualized in relatively low abundance within the dermal envelope and lining the subdermal lacunae of *S. officinalis* and are validated as sponge-associated bacterial

epibionts. This finding suggests selection by the sponge of highly metal-tolerant bacteria contributing to survival in a polluted environment, a hypothesis which should be further explored experimentally. Cultured bacteria such as *Pseudovibrio* sp. provide models for future laboratory experiments to further characterize the bacterial stress response to metals in a sponge environment.

Acknowledgements

This work is part of Cléa Bauvais PhD, supported by a grant from the doctoral school ED 387: Interdisciplinary approach to living organisms (University Paris VI, Paris, France). Funding was partly provided by the "Diversité des micro-organismes de l'environnement" ATM programs (2012-2014) of the Museum National d'Histoire Naturelle (MNHN) of Paris, France. We acknowledge the support of the European Union 7th Framework Programme (Bluegenics FP7-KBBE-2012-6) under grant agreement n° 311848. Thanks are due to M. Vandervennet (MNHN, Paris) for her help with bacteriology, F. Zuberer (Diving office, OSU Institut Pytheas) with collecting sponge samples, E. Wafo with participating in the ICP-MS experiments, F. Gonnet (UMR7208 BOREA, France) for her help with preparing paraffin histological sections of *S. officinalis* and to C. Willig for help with epifluorescence imaging (Centre de Microscopie et d'Imagerie Numérique (CeMIM) platform of the MNHN). We also thank the two reviewers and the subject editor for their constructive comments, which substantially improved the manuscript.

Supplementary data

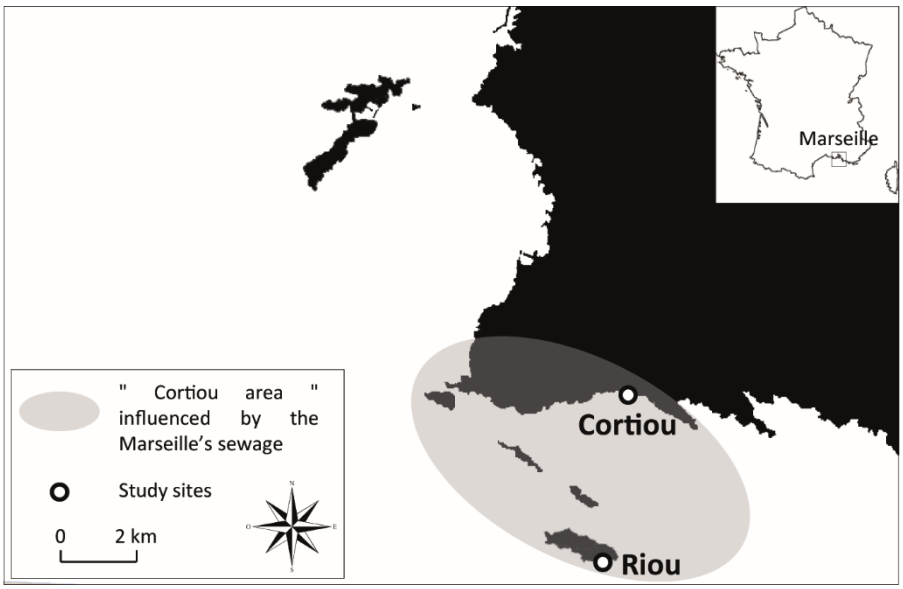


Figure S1: Location of *Spongia officinalis* sampling sites, Cortiou and Riou, in the Mediterranean Sea under the influence of the sewage of Marseille.

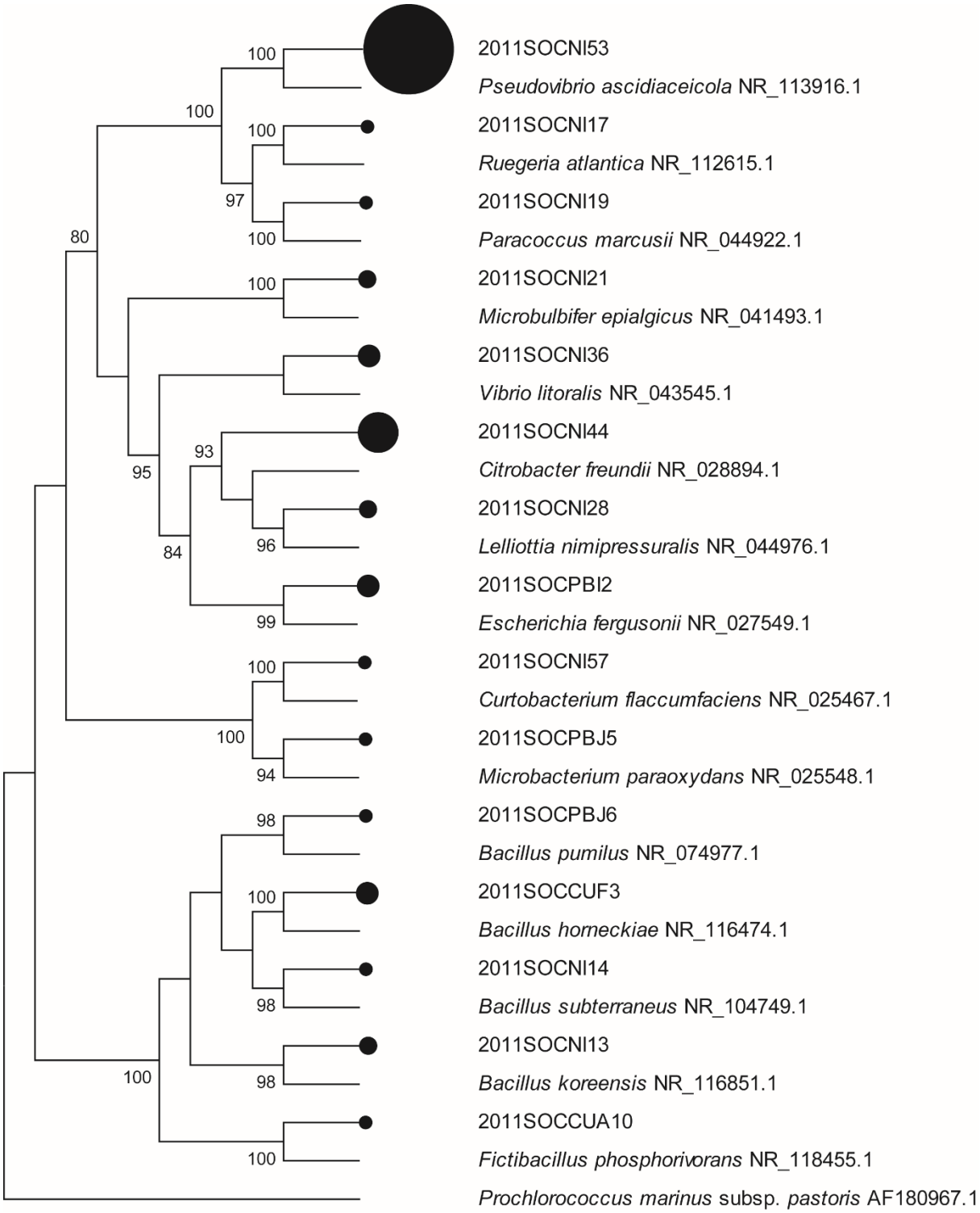


Figure S2: Consensus bootstrap phylogenetic tree, obtained by maximum likelihood method, of the OTUs corresponding to the analysis of 16S rRNA sequences obtained from the culturable associated bacteria tolerant to copper, nickel, lead or zinc cultured from a specimen of *Spongia officinalis* collected at Cortiou in October 2011. Each OTU is visualized by its representative strain and the corresponding nearest neighbor obtained from GenBank. The numbers at the nodes are percentages indicating the levels of bootstrap support, based on neighbor-joining analysis of 1000 resampled data sets. Only values > 75% are shown. Black circles are corresponding to the number of strains obtained by OTU.

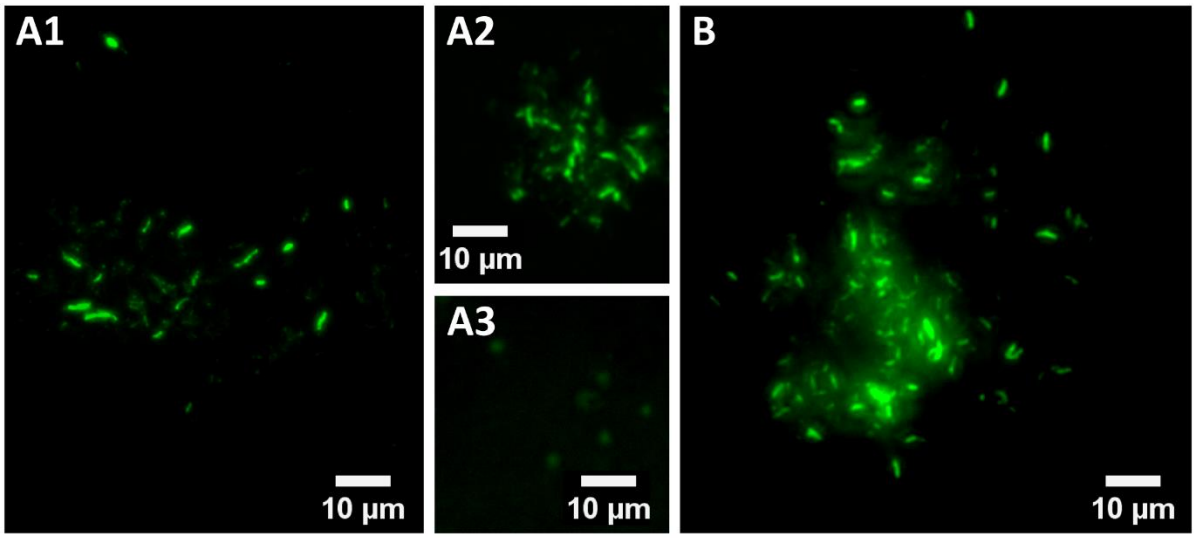


Figure S3: CardFISH probe validation for representative metal-resistant *Pseudovibrio* strains. (A1) bacterial smear of strain 2011SOCNI153 hybridized with probe NW442 targeting *Pseudovibrio* sp., with (A2) positive control with universal bacterial probe EUB mix, and (A3) negative control with nonEUB nonsense probe. (B) Bacterial smear of strain 2011SOCZNC4, another cultured bacterium, hybridized with probe NW442 targeting *Pseudovibrio* sp..

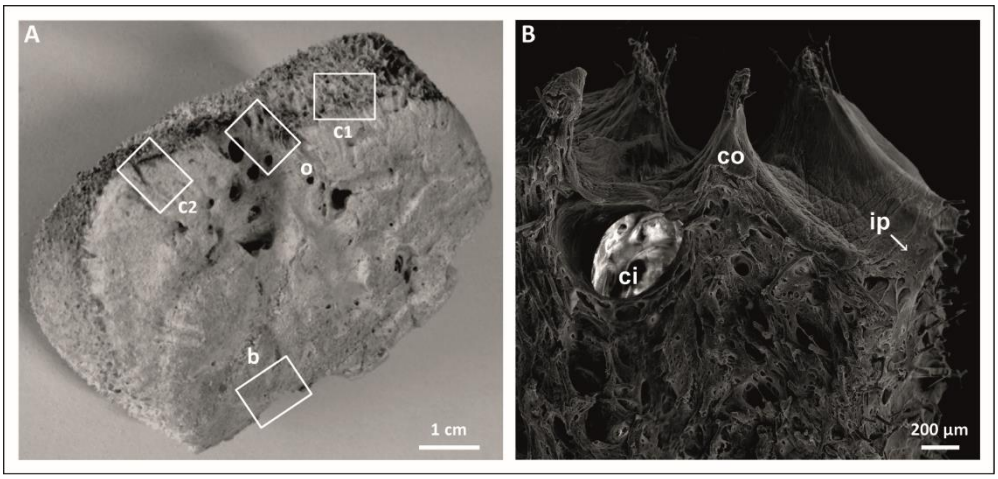


Figure S4: Orientation of tissues sampled in *Spongia officinalis* for histological observations (A) Dissected lyophilized specimen - c1 sponge cortex and inhalant system, c2 cortex and internal spongin structure, o Oscula area at the top of the exhalant system, b basal part, close to the substrate attachment area. (B) Scanning electron micrograph of c2 - co conule, ip inhalant pores, ci inhalant canal.

3. Matériel et méthodes complémentaires

3.1. Isolement des bactéries associées à *S. officinalis* et tolérantes aux métaux

L'étude microbiologique de la flore bactérienne tolérante au nickel, au cuivre, au plomb ou au zinc s'est faite à l'aide d'une méthode culturale. A partir d'homogénats de *S. officinalis* dilués successivement, 10^0 (v/v), 10^{-2} (v/v), 10^{-4} (v/v), 10^{-6} (v/v), 10^{-8} (v/v), les bactéries cultivables associées à cette éponge ont été isolées sur trois milieux solides :

- Le Marine Broth (Marine Broth 2216, Difco) qui est un milieu nutritif complexe, riche en éléments organiques (peptone, extrait de levure),
- Le Marine Broth supplémenté en acide nalidixique (43 µM) qui inhibe la sous unité A de l'ADN gyrase bactérienne et empêche la croissance des souches opportunistes et permet ainsi d'augmenter la diversité bactérienne isolée,
- Le Milieu ISP-NaCl ; L'"International *Streptomyces* Project" supplémenté avec 3,4 M de chlorure de sodium est un milieu sélectif enrichi en sels qui va favoriser la croissance des actinomycètes marins (Ravel *et al.*, 1998).

Dans cette étude, nous avons choisi de nous focaliser sur quatre métaux, trois micronutriments essentiels mais toxiques à fortes concentrations, le cuivre, le nickel et le zinc et un métal toxique à faibles concentrations, le plomb qui n'a pas de rôle biologique spécifique connu (Bruins *et al.*, 2000).

Les concentrations utilisées en métaux pour sélectionner des souches tolérantes devaient être du même ordre de grandeur que celles mesurées dans le milieu et dans les tissus de l'éponge. Ces concentrations ont aussi été définies en fonction de celles utilisées dans la littérature pour l'isolement de souches résistantes et des valeurs de concentrations minimales inhibitrices (CMI) mesurées chez des bactéries marines ou terrestres.

L'espèce modèle *Escherichia coli* a été étudiée pour sa tolérance aux métaux toxiques par la méthode classique de mesure des CMI lors d'une exposition à des gammes croissantes de métaux (Tableau 11) (Nies, 1999).

Des souches associées aux nodules racinaires de *Lespedeza cuneata*, récoltées dans une mine d'or chinoise, ont été isolées pour leur tolérance aux métaux et sont présentées dans le Tableau 11 (Wei *et al.*, 2009).

Les patterns de tolérance aux métaux pour 250 souches bactériennes modérément halophiles isolées de salines solaires et sols hypersalins situés à Cadix et dans les îles Canaries, en Espagne ont aussi été étudiés (Tableau 11) (Nieto *et al.*, 1989).

Les communautés bactériennes hétérotrophes aérobies isolées de l'eau de mer du port d'Alexandrie, en Égypte et résistantes aux métaux ont aussi été identifiées (Tableau 11) (Sabry *et al.*, 1997).

Tableau 11 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de bactéries isolées pour leur tolérance aux métaux.

Métal	**CMI (mM)**			
	(Nies, 1999)	(Wei *et al.*, 2009)	(Nieto *et al.*, 1989)	(Sabry *et al.*, 1997)
Zinc	1	1 à 1,6	0,5 à 1	2,5
Cuivre	1	0,1 à 0,4	0,5 à 2,5	2
Nickel	1	-	1 à 5	10
Plomb	5	0,05 à 0,5	2,5 à 5	5

Au regard de ces résultats, les milieux choisis ont été supplémentés en chlorure de nickel (II) (0,15 et 0,5 mM), chlorure de plomb (II) (0,15 et 0,5 mM), chlorure de zinc (II) (0,25 et 1 mM) ou chlorure de cuivre (II) dihydraté (0.25 et 1 mM) (Sigma-Aldrich).

Les boîtes de Pétri ont ensuite été incubées pendant 4 à 10 jours à 15°C. Au total, 113 souches bactériennes ont ainsi été isolées sur la base de critères phénotypiques.

Ce nombre important de souches isolées pouvait présager que certaines étaient des doublons. Une première étape de différenciation des souches et de tri était nécessaire à mettre en place avant de passer à l'étape d'identification phylogénétique. Nous avons choisi la méthode d'amplification aléatoire d'ADN polymorphe.

3.2. Sélection des souches d'intérêt par amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD)

La RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) est une technique d'amplification par PCR des fragments aléatoires d'ADN génomique avec une unique amorce de séquence nucléotidique arbitraire (Williams *et al.*, 1990). C'est une technique qui permet d'analyser la diversité génétique d'un écosystème complexe comme les holobiontes que forment les

éponges et leurs micro-organismes associés (Chelossi *et al.*, 2004; O' Halloran *et al.*, 2011). De façon complémentaire, elle permet de détecter de faibles différences entre les génomes et, dans notre cas, de discriminer les différentes espèces isolées.

Toutes les souches isolées ont été cultivées en culture liquide pure de 2 mL de Marine Broth et incubées à 22°C sous agitation (120 r.p.m). Après 24 à 48 h d'incubation, les cultures ont été centrifugées à 8 000 g pendant 20 minutes.

L'ADN génomique total a été extrait à partir du culot bactérien à l'aide du kit PureLink™ Genomic DNA (Invitrogen) avec le protocole proposé pour les lysats cellulaires de bactéries à Gram-positif. L'ADN a ensuite été quantifié avec le système Nanovue Plus (VWR).

L'amplification par PCR a été réalisée dans un volume de réaction final de 50 µL contenant 1,5 mmol.L^{-1} de tampon $MgCl_2$ (VWR), 0,2 mM de chaque dNTP (Promega), 2.5 U de *Taq* polymérase (VWR), 0.6 µM de l'amorce RAPD OPBC-18 (5' - GTG AAG GAG G - 3') (eurofins MWG) et 2 µL d'ADN génomique (30 ng.μL^{-1}). La réaction de PCR a été réalisée dans un thermocycleur Veriti™ (Applied Biosystems) selon les paramètres suivants : pré-dénaturation (94°C, 5 minutes) puis 35 cycles de dénaturation (93°C, 0,45 s), d'hybridation des primers (28°C, 1 minutes) et de polymérisation (72°C, 1 minutes) et enfin une étape finale de polymérisation à 72°C pendant 5 minutes.

Les produits de la réaction de PCR ont été séparés en fonction de leur taille sur gel d'agarose 1.2% (w/v) dans du tampon TAE 1x (40 mM Tris, 1 mM EDTA, 1,14 mM acide acétique glacial, pH 8). Les gels ont été colorés avec 0,0001x de GelRed™ (Biotium) et les bandes d'ADN ont été visualisées et photographiées avec un transilluminateur à UV. Un marqueur de taille de 500 paires de bases (Takara) a également été déposé sur le gel.

L'analyse des profils RAPD a été menée avec le logiciel Image J 1.48v.

3.3. Analyse des séquences d'ADNr 16S des bandes du gel DGGE

Dix bandes d'ADNr 16S du gel DGGE ont été excisées sous UV en utilisant un scalpel stérile et conservées dans 10 µL de TAE 1x. Les bandes ont ensuite été chauffées à 60°C et centrifugées à 14 000 g pendant 15 minutes. L'ADN extrait a été récupéré dans le surnageant et utilisé comme support pour la ré-amplification par PCR avec le couple d'amorces P1/COM2 en utilisant les conditions précédemment décrites.

Les produits de PCR ont été purifiés avec le QIAquick purification kit (QUIAGEN) et clonés dans *Escherichia coli* DH5α grâce au vecteur plasmidique pGEM-T (Promega)

conformément aux instructions du fabricant. Les cellules ainsi transformées ont été étalées sur des boîtes de Luria-Bertani supplémentées en ampicilline (0,1 $mg.mL^{-1}$), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (0,08 $mg.mL^{-1}$) et isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (0,12 $mg.mL^{-1}$) et incubées durant la nuit à 37°C.

Cinq colonies ont été sélectionnées de façon aléatoire et examinées pour la présence de l'insert de la taille correcte par PCR avec les amorces P1 / COM2. Les clones positifs ont été choisis pour être séquencés avec deux jeux d'amorces, P1 / COM2 et M13uni(-43) (5' - AGG GTT TTC CCA GTC ACG ACG TT -3') / M13rev(-29) (5' - CAG GAA ACA GCT ATG ACC - 3') par Eurofins MWG Operon.

Les séquences obtenues ont été alignées avec le logiciel BioEdit version 7.2.5 (http://www.mobio.ncsu.edu). Les séquences (approximativement 600 pb) avec 97% d'identité, définies comme des OTU, ont été comparées aux séquences de GenBank (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) avec l'algorithm BLASTn.

3.4. Activités biologiques des souches bactériennes isolées

Les souches bactériennes ont été cultivées dans 250 mL de Marine Broth (Difco 2216) à 22°C sous agitation (120 rpm) pour évaluer leurs activités antioxidante, antibactérienne et antifongique. Après 48 h d'incubation, les cultures ont été centrifugées à 8 000 g, à 4°C pendant 20 minutes.

Les surnageants ont été extraits successivement à l'acétate d'éthyle (AcOET) et au butan-1-ol (BuOH).

Les culots obtenus après la centrifugation ont été rincés deux foix dans du Marine Broth stérile et re-centrifugés à 8 000 g afin d'éliminer tout trace de surnageant. Après lyophilisation pendant 24 h et réduction en poudre, ils ont été extraits trois fois avec 50 mL d'un mélange dichlorométhane (CH_2Cl_2 / MeOH) (1 :1). Les extraits de culot ainsi obtenus ont ensuite été évaporés et conservés à température ambiante.

3.4.1. Mesure de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits obtenus précédemment a été quantitativement évaluée par la méthode de piégeage des radicaux libres 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma) (Brand-Williams *et al.*, 1995).

L'activité antioxydante a été mesurée sur microplaque 96 puits (Nunc). Dans chaque puits, un volume de 200 µL de DPPH (200 µmol.L^{-1} dans le méthanol) a été déposé puis 10 µL des produits à tester ont été ajouté (10 mg.mL^{-1} dans du DMSO). Une solution d'acide L-ascorbique (10 mg.mL^{-1} dans du DMSO) a été utilisée comme témoin positif. Le témoin correspondant au DMSO a aussi été mesuré.

Après incubation des microplaques pendant une heure à température ambiante, les densités optiques à 510 nm ont été mesurée sur un spectrophotomètre Mithras LB940 (Berthold). Le pourcentage d'inhibition a été calculé par rapport au témoin positif. La diminution de l'absorbance est induite par la capture d'un électron, *i.e.* le piégage des radicaux libres DPPH, par l'antioxydant et révèle donc la présence dune activité antioxydante. Le DPPH passe alors de la couleur violette à la couleur jaune.

3.4.2. Mesure de l'activité antimicrobienne

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été effectuée vis-à-vis des souches bactériennes à Gram positif *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) et à Gram négatif *Escherichia coli* (ATCC 8739) ainsi que de la levure *Candida ablicans* (IBMC-Strasbourg) par la méthode en milieu liquide dans des microplaques de 96 puits.

Pour l'évaluation d'une activité contre les souches *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* :

Après isolement des bactéries en milieu gélosé LB-Agar (20 g de Bacto-Agar /L de milieu Luria Bertani) (Sezonov *et al.*, 2007), une pré-culture a été réalisée à partir de 2 à 3 colonies resuspendues dans 10 mL de milieu Luria Bertani et incubée sous agitation (200 rpm) 2 heures à 37°C. Après lecture de la densité optique à 620 nm de cette préculture, une dilution a été effectuée jusqu'à l'obtention d'une densité optique à 0,03. Un volume de 200 µL de cette culture a ensuite été déposé dans chaque puits d'une microplaque de 96 puits. Les produits (500 µg.mL^{-1} dans du DMSO) ont été ajoutés pour être testés en duplicats. Les témoins négatifs correspondaient aux puits avec *Staphylococcus aureus* en présence d'ampicilline (10 mg.mL^{-1}) et *Escherichia coli* en présence de chloramphénicol (5 mg.mL^{-1}). Le témoin correspondant au DMSO a aussi été mesuré. Les plaques ont ensuite été incubées sous agitation (500 rpm) à 30°C pendant 24 heures. La lecture des densités optiques des cultures s'est effectuée sur un lecteur de microplaques Mithras LB940 (Berthold). L'activité

microbienne a été déterminée par le pourcentage d'inhibition de croissance des cultures miniaturisées en puits avec les produits à tester par rapport aux témoins (bactéries seules).

Pour l'évaluation d'une activité contre la souche *Candida albicans* : Après isolement des bactéries en milieu gélosé Sabouraud-Agar, une pré-culture a été réalisée à partir de 2 à 3 colonies resuspendues dans 10 mL de milieu Sabouraud et incubée sous agitation (200 rpm) 48 heures à 30°C. Un volume de 12 µL de la pré-culture a été dilué dans un volume de 12 mL de milieu de culture. Un aliquot de 200 µL de culture bactérienne a été déposé dans chaque puits auxquels ont été ajouté les produits (500 $\mu g.mL^{-1}$ dans du DMSO) pour être testés en duplicats. Pour réaliser les témoins négatifs, de l'econazole (5 $mg.mL^{-1}$) a été ajouté dans les puits correspondant. Le témoin correspondant au DMSO a aussi été mesuré. Les microplaques ont été incubées pendant 48 h et observées au microscopes afin d'évaluer l'activité antimicrobienne.

4. Résultats complémentaires

4.1. Sélection des souches d'intérêt par RAPD

L'analyse des profils RAPD a permis de réaliser un premier tri à partir des 113 souches isolées puisque cette technique permet de détecter des différences entre les génomes. Ainsi, deux souches de la même espèce auront des profils similaires ou quasi similaires. Nous avons ainsi mis en évidence 63 souches aux profils différents, 29 des 59 souches isolées sur le nickel (Figure 27A), 7 des 13 souches isolées sur le zinc (Figure 27B), 15 des 19 souches isolées sur le plomb (Figure 27C) et 12 des 22 souches isolées sur le cuivre (Figure 27D).

4.2. Analyse phylogénétique des communautés bactériennes associées à *S. officinalis*

L'analyse de la composition et de la structure des communautés bactériennes associées à l'éponge *S. officinalis* récoltée à Cortiou et Riou en 2011, 2012 et 2013 a été réalisée grâce à une électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE).

La DGGE est une méthode d'empreinte moléculaire qui permet d'évaluer la diversité microbienne dans une communauté complexe (Muyzer *et al.*, 1993; Muyzer and Smalla, 1998). Cette technique simple et reproductible repose sur une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) suivi d'une électrophorèse sur gel qui contient un gradient linéaire d'agents

dénaturants. Les fragments d'ADN obtenus lors de l'amplification par PCR, et donc de tailles identiques, vont migrer le long du gradient en fonction de leur pourcentage en GC *i.e.* en fonction de leur séquence (Murray *et al.*, 1996; Díez *et al.*, 2001).

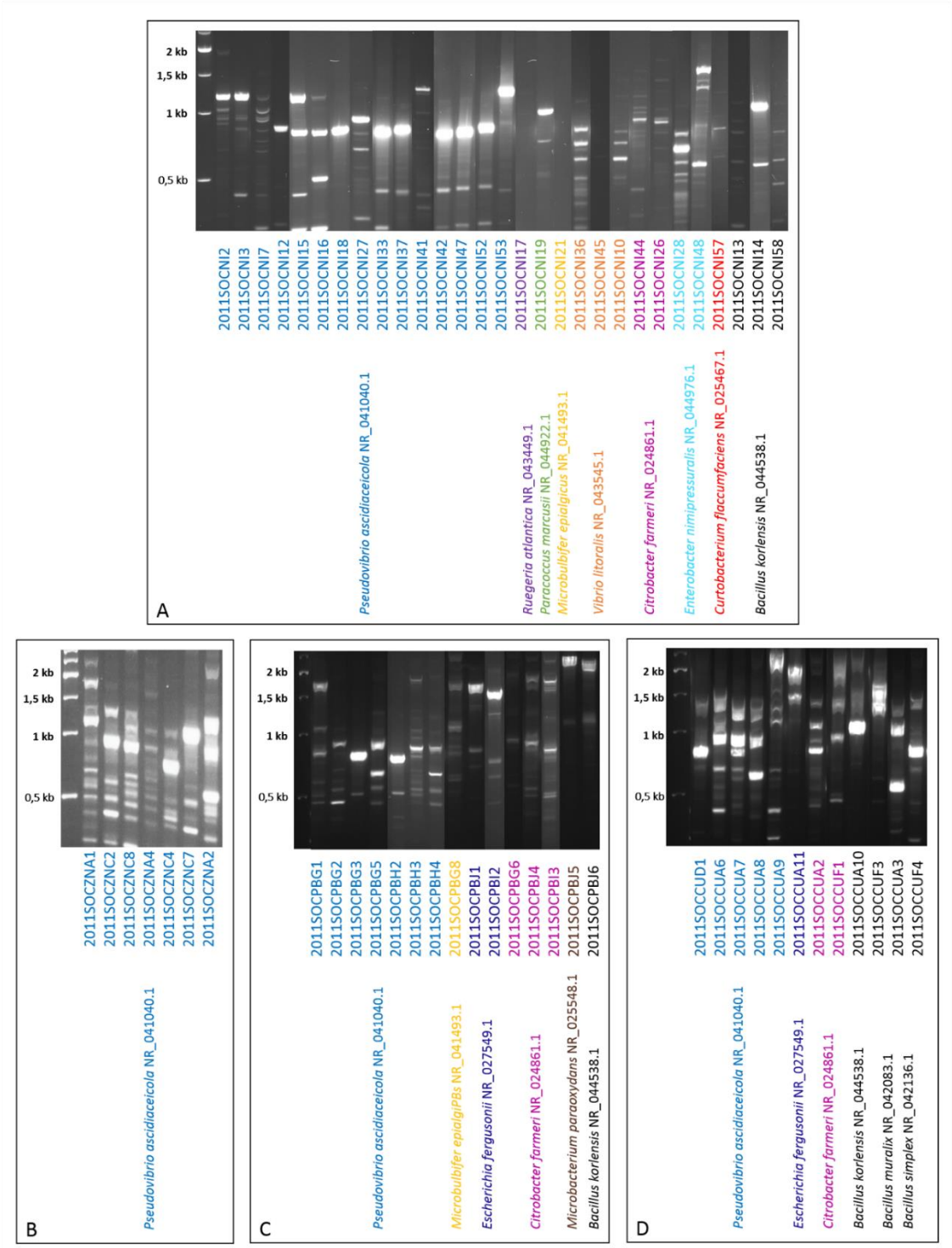


Figure 27 : Profils RAPD et identification phylogénétique des souches isolées de *S. officinalis*.
A Souches sélectionnées sur le nickel, **B** Souches sélectionnées sur le zinc, **C** Souches sélectionnées sur le plomb et **D** Souches sélectionnées sur le cuivre.

Le résultat de la DGGE est un "patron de bandes" qui correspondent aux membres prédominants de la communauté bactérienne étudiée. Cette technique permet de comparer les dynamiques de communautés bactériennes sous l'effet de perturbations environnementales comme les saisons, la géographie ou la pollution (Müller *et al.*, 2001; Chapon *et al.*, 2012), d'investiguer la stabilité chez des organismes holobiontes comme les *Spongia*ires et leurs communautés microbiennes associées (Noyer *et al.*, 2011).

L'ultime étape de caractérisation de ces communautés bactériennes est le séquençage des bandes de DGGE excisées du gel, ré-amplifiées par PCR et suivies d'un clonage et séquençage des produits de PCR. Le séquençage des bandes permet l'affiliation phylogénétique des espèces détectées (Muyzer *et al.*, 1993).

Dans notre étude, les résultats générés par la DGGE ont été soumis à une analyse en composante principale afin d'avoir une confirmation statistique des observations réalisées sur le gel.

Le grand nombre de bandes observées sur les gels a permis de confirmer des observations microscopiques précédentes et de classer *S. officinalis* parmi les "High Microbial Abundance sponge" (Vacelet, 1975; Gerçe *et al.*, 2011).

Nous avons aussi pu mettre en évidence une spécificité des empreintes correspondantes aux communautés associées à *S. officinalis* par rapport à celles de l'eau de mer environnante. Ce pattern était doublé d'une spécificité spatiale et temporelle qui pourrait être expliqué par la présence de métaux dans l'environnement. Par exemple, la structuration des communautés bactériennes associées aux échantillons de Cortiou en 2013 pouvait être corrélée à la présence de cuivre dans le milieu.

Sur les dix bandes sélectionnées, huit correspondaient à des espèces bactériennes impliquées dans le clustering par site et par année dans les échantillons d'éponges et deux dans les échantillons d'eau de mer à Cortiou en 2012 (Tableau 12).

Plusieurs séquences ont été identifiées pour chacun des des bandes RsB2011_1, RsB2011_2, CsB2012_7, CsB2012_8, Csw2012_9 and Csw2012_10.

Les bandes sélectionnées étaient dominées par deux phyla *e.g.* les *Actinobacteria* et les *Proteobacteria*, qui sont couramment retrouvés dans les environnements marins et particulièrement au sein des communautés associées aux éponges (Hentschel *et al.*, 2012).

Toutes les séquences ont été affiliées à des espèces cultivables et non cultivables, à l'exception de Csw-2012-9a. Huit classes bactériennes ont ainsi été mises en evidence, les *Acidobacteria*, les *Actinobacteria*, les *Chloroflexi*, les *Clostridia*, les *Gamma-proteobacteria*, les *Alpha-proteobacteria* et les *Delta-proteobacteria*.

Tableau 12 : Affiliation phylogénétique des séquences dérivées des bandes DGGE des communautés bactériennes associées à l'éponge *S. officinalis* et de l'eau de mer environnante. Rs correspond aux échantillons récoltés à Riou, Cs à ceux de Cortiou et Csw aux échantillons d'eau de mer récoltés à Cortiou. Pour chaque séquence d'ADNr 16S, apparaissent les identités pour les bactéries cultivables et non cultivables.

Sequences	No. acc. GenBank (longueur en pb)	Sequences avec la plus haute identité (%)
R_SB2011_1a	KF881017 (569)	*Acidithiomicrobium* sp. GQ225720.1 (93)
		Uncultured actinobacterium clone FJ229953.1 (94)
R_SB2011_1b	KF881018 (529)	*Thiohalophilus thiocyanatoxydans* NR_043875.1 (92)
		Uncultured bacterium clone GU981923.1 (95)
R_SB2011_1c	KF881019 (585)	*Pseudoalteromonas* sp. HF912440.1 (97)
		Uncultured bacterium clone JX206638.1 (99)
R_SB2011_2a	KF881020 (466)	*Ferrimicrobium* sp. KF663614.1 (91)
		Uncultured actinobacterium clone FJ229953.1 (97)
R_SB2011_2b	KF881021 (513)	*Actinomycetales* bacterium DQ994722.1 (89)
		Uncultured bacterium clone JX206733.1 (90)
C_SB2011_3	KF881022 (477)	*Acidimicrobidae* bacterium AY673309.1 (92)
		Uncultured Acidimicrobidae bacterium clone JN596627.1 (100)
R_SA2012_4	KF881023 (480)	*Psychrobacter* sp. AB550521.1 (100)
		Unidentified marine bacterioplankton clone KC000214.1 (100)
R_SA2012_5	KF881024 (428)	*Desulfonatronum* sp. HM750217.1 (87)
		Uncultured bacterium clone JX206649.1 (99)
C_SA2012_6	KF881025 (576)	*Candidatus Solibacter usitatus* NR_074351.1 (85)
		Uncultured bacterium clone EF159864.1 (98)
C_SB2012_7a	KF881026 (588)	*Acidimicrobium ferrooxidans* EF621760.1 (90)
		Uncultured actinobacterium clone JN113042.1 (99)
C_SB2012_7b	KF881027 (464)	*Iamia majanohamensis* JQ899225.1 (90)
		Uncultured bacterium clone JQ612206.1 (99)
C_SB2012_7c	KF881028 (468)	*Pseudoruegeria* sp. KF303136.1 (98)
		Uncultured bacterium clone JF261917.1 (100)
C_SB2012_7d	KF881029 (647)	*Desulfuromonas alkaliphilus* NR_043709.1 (87)
		Uncultured bacterium clone JX206632.1 (100)
C_SB2012_8a	KF881030 (578)	*Caldilinea aerophila* NR_074397.1 (84)
		Uncultured Chloroflexi bacterium clone JN596657.1 (98)
C_SB2012_8b	KF881031 (477)	*Thermacetogenium phaeum* NR_074723.1 (81)
		Uncultured marine bacterium clone JQ236295.1 (99)
C_{SW}2012_9a	KF881032 (380)	*Shewanella* sp. KF009845.1 (100)
C_{SW}2012_9b	KF881033 (473)	*Aestuariibacter halophilus* AY207503.2 (97)
		Uncultured marine bacterium clone KF185806.1 (99)
C_{SW}2012_10a	KF881034 (478)	*Alteromonas* sp. KF358313.1 (93)
		Uncultured bacterium clone AY664267.1 (92)
C_{SW}2012_10b	KF881035 (466)	*Ruegeria* sp. KC429937.1 (98)
		Uncultured marine bacterium clone KF185986.1 (100)

Treize séquences, RsB2011_1a, RsB2011_1b, RsB2011_2a and 2b, CsB2011_3, RsA2012_5, CsA2012_6, CsB2012_7a, CsB2012_7b, CsB2012_7d, CsB2012_8a,

CsB2012_8b, Csw2012_10a, présentaient moins de 95% d'homologie avec les séquences obtenues dans GenBank. Ces séquences pourraient donc probablement être assignées à de nouvelles espèces bactériennes. Ces résultats doivent être modérés en raison du biais apporté par la relative courte longueur des fragments des séquences analysées.

Il est intéressant de noter que douze séquences présentent d'importantes similarités avec des séquences de bactéries marines non cultivables rencontrées chez des Démosponges. Trois des quatre séquences isolées à partir de l'eau de mer ont été attribuées à des bactéries marines non cultivables (Tableau 13).

Ces résultats supportent les observations précédentes d'une communauté bactérienne spécifique associée aux tissus d'éponges (Schmitt *et al.*, 2012; Webster and Taylor, 2012).

Tableau 13 : Origine des bactéries présentant une homologie avec les séquences d'ADNr 16S obtenues à partir du gel DGGE des échantillons de *S. officinalis*.

	Séquence	Organisme hôte	Origine	Référence
Démosponges	RsB2011_1a, RsB2011_2a, CsB2011_3, CsA2012_6	*Xetospongia muta*	Floride	Montalvo and Hill, 2011 Schmitt *et al.*, 2008
	RsB2011_1b	*Haliclona logarthi*	Mer des Caraïbes	Yang *et al.*, 2011
	RsB2011_1c, RsB2011_2b, RsA2012_5, CsB2012_7d	*Ircinia oros*	Nord-ouest de la mer Méditerranée	Erwin *et al.*, 2012
	CsB2012_7a	*Astrosclera willeyana*	Mer de Chine méridionale	Yang and Li, 2012
	CsB2012_7b	*Geodia baretti*	Norvège	Radax *et al.*, 2012
	CsB2012_8a	*Xetospongia testudinaria*	Indonésie	Montalvo and Hill, 2011
Eau de mer	Csw2012_9b, Csw2012_10b	-	mer Adriatique	Vojvoda *et al.*, 2014
	Csw2012_10a	-	mer de Behring	Jiao *et al.*, 2007

4.3. Activités biologiques des souches bactériennes isolées

4.3.1. Evaluation de l'activité antioxydante

Sur l'ensemble des souches analysées, seulement huit extraits présentaient une activité antioxydante (*Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53, *Paracuccus* sp. 2011SOCNI19, *Enterobacter* sp. 2011SOCNI28, *Citrobacter* sp. 2011SOCNI44, *Citrobacter* sp. 2011SOCCUF1, *Escherichia* sp. 2011SOCCUA11). Les pourcentages d'inhibition étaient peu significatifs et compris entre 10 et 13% (Tableau 14).

4.3.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Les souches bactériennes analysées n'ont présenté aucune activité antifongique contre la levure *Candida albicans* et aucune activité antibactérienne contre la souche *Escherichia coli*. Les extraits du surnageant de culture des souches *Bacillus* sp. 2011SOCPBJ6 et *Escherichia* sp. 2011SOCPBJ1 ont révélé des activité antimicrobienne significatives contre la souche de *Staphylococcus aureus* avec 34% pour les extraits à l'acétate d'éthyle et respectivement 48% et 33% pour les extraits au butanol. Ces activités semblent intéressantes et ces résultats nécéssiteraient d'être approfondis (Tableau 14).

Tableau 14 : Récapitulatif des activités antioxydantes, antibactériennes et antifongiques des souches bactériennes isolées chez l'éponge marine *S. officinalis*. (-) pas d'activité, (+) active, [a] Test quantitatif au DPPH, [b] Test d'antagonisme contre la souche *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538).

Souche	Identification	Bioactivité	
		Antioxydante[a]	Antimicrobienne[b]
2011SOCNI53	*Pseudovibrio* sp.	+	-
2011SOCNI19	*Paracuccus* sp	+	-
2011SOCNI28	*Enterobacter* sp	+	-
2011SOCNI44	*Citrobacter* sp.	+	-
2011SOCCUF1	*Citrobacter* sp.	+	-
2011SOCCUA11	*Escherichia* sp.	+	-
2011SOCPBJ6	*Bacillus* sp.	-	+
2011SOCPBJ1	*Escherichia* sp.	-	+

CHAPITRE 2

Pseudovibrio sp., une bactérie associée à *Spongia officinalis* et résistante au cuivre

CHAPITRE 2 : *Pseudovibrio* sp., une bactérie associée à *Spongia officinalis* et résistante au cuivre

1. Introduction

La pollution des mers et des océans par les métaux toxiques est l'une des contaminations majeures d'origine anthropogénique à l'échelle mondiale. Les rejets dans l'environnement de composés toxiques ont constitué le point de départ du développement de nouvelles niches écologiques constituées d'organismes capables de survivre dans ces environnements pollués.

Les Spongiaires par leur capacité de filtration active de l'eau de mer environnante peuvent accumuler les métaux en fonction de la contamination environnementale (Cebrian *et al.*, 2003; Pan *et al.*, 2011; Mayzel *et al.*, 2014). Les holobiontes que forment les Spongiaires et leurs communautés microbiennes associées figurent parmi les rares écosystèmes à avoir développé des propriétés spécifiques et nécessaires à l'adaptation aux environnements pollués en métaux. Ces organismes ont été proposés comme bio-indicateurs de pollution métallique (Patel *et al.*, 1985; Pérez *et al.*, 2004; de Mestre *et al.*, 2012).

L'influence des métaux sur les communautés bactériennes associées aux éponges et leur résistance à ces composés a été peu étudiée. Chez l'éponge marine *Fasciospongia cavernosa*, les bactéries cultivables associées aux genres *Streptomyces*, *Salinobacter*, *Micromonospora*, *Roseobacter*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Saccharomonospora et Alteromonas* ont été proposées comme indicateurs de contamination métallique environnementale (Selvin *et al.*, 2009). Comme cela a été décrit pour certaines éponges de la mer Rouge, la composition des communautés bactériennes pourrait être en partie responsable de l'accumulation des métaux par l'éponge (Pan *et al.*, 2011).

En effet, de nombreuses bactéries environnementales isolées à partir d'eau de mer (Sabry *et al.*, 1997), de coraux (Sabdono *et al.*, 2012), d'annélides (Jeanthon and Prieur, 1990) ou plus récemment de l'éponge *Polymastia janeirensis* (Santos-Gandelman *et al.*, 2014) se sont révélées être résistantes aux métaux. La résistance bactérienne repose sur la mise en place de mécanismes comme le transport membranaire, la bio-accumulation intra- ou

extracellulaire ou des systèmes de détoxification enzymatiques (Nies, 1999; Bruins *et al.*, 2000).

Récemment, deux souches bactériennes isolées à partir d'éponges marines ont été caractérisées pour leur implication dans la biorémédiation de métaux comme le mercure et le molybdène.

Une souche *Bacillus cereus* isolées de l'éponge *Polymastia janeirensis* présentait une résistance jusqu'à 100 µM de chlorure de mercure et 10 µM de méthylmercure par réduction du Hg^{2+} en Hg^{0} volatile et était caractérisée par la présence sur son chromosome bactérien d'un opéron *mer*. Cette souche a été proposée comme outil de bioremédiation du chlorure de mercure et du méthylmercure dans les environnements aquatiques (Santos-Gandelman *et al.*, 2014).

Une nouvelle espèce de *γ-Proteobacteria* a été observée en microscopie électronique à transmission à la surface du tissu de l'éponge *Halichondria phakellioides* contaminée par du molybdène. Contre toute attente, le molybdène a été co-localisé avec ces morphotypes bactériens et non avec les cellules d'éponge. Cette étude présente la première preuve de l'implication des bactéries dans l'accumulation des métaux par une éponge (Buccella *et al.*, 2014).

Dans le **Chapitre 1**, nous avons décrit l'isolement et la caractérisation des espèces bactériennes associées à l'éponge *S. officinalis* et résistantes aux métaux comme le cuivre, le zinc, le nickel et le plomb. Les souches de *Pseudovibrio* représentaient 54% de toutes les bactéries (64% des *Proteobacteria*) isolées sur des milieux biologiques enrichis en métaux. Ces souches de *Pseudovibrio* sp. étaient toutes tolérantes à au moins l'un des quatres métaux testés. En particulier, les souches *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53, 2011SOCPBH3 et 2011SOCCUA9 ont montré des concentrations minimales inhibitrices de 25 mM respectivement pour le cuivre, le plomb et le nickel. Ces souches bactériennes ont été visualisées *via* une expérience de CARD-FISH et caractérisées comme des épibiontes de *S. officinalis*.

Les représentants du genre *Pseudovibrio* sont des bactéries à gram négatif de la famille des *Rhodobacteriaceae* dans la classe des *Alpha-Proteobacteria* (Shieh *et al.*, 2004). Les *Pseudovibrio* sp. sont fréquemment retrouvés dans les habitats marins associés à des organismes benthiques filtreurs, tels que les tuniciers *Botryllidae* sp. et *Polycitor proliferus*

(Fukunaga *et al.*, 2006), le corail *Oculina patagonica* (Nissimov *et al.*, 2009) et principalement les Spongiaires (Hentschel *et al.*, 2001; Webster and Hill, 2001; Enticknap *et al.*, 2006; Muscholl-Silberhorn *et al.*, 2008; O' Halloran *et al.*, 2011). Des souches du genre *Pseudovibrio* ont été cultivées à partir d'hôtes phylogénétiquement distants et d'origine géographique variée et sont largement décrites comme bactéries associées aux éponges. Une souche de *Pseudovibrio* sp. a été visualisée, par FISH, dans la région du mésohyle autour des chambres choanocytaire de l'éponge (Webster and Hill, 2001). Par ailleurs, la souche *P. denitrificans* a été isolée à partir des larves de l'éponge *Mycale laxissima* dont la présence a été confirmée par DGGE et par FISH (Webster and Hill, 2001; Enticknap *et al.*, 2006). Les auteurs suggèrent que certains représentants de ce genre pourraient être des symbiontes de Spongiaires acquis par transmission verticale. Cette hypothèse reste tout de même encore à démontrer. Il faudrait par exemple étudier les flux métaboliques entre la bactérie et son hôte. De plus, dans une autre étude, une souche de *Pseudovibrio* sp., isolée des éponges *Aplysina aerophoba* et *A. cavernicola*, n'a pas pu être localisée dans le tissu de ces éponges (Hentschel *et al.*, 2001).

Les trois espèces de *Pseudovibrio* sp. identifiées à ce jour, *P. denitrificans*, *P. japonicus* et *P. ascidiaceicola*, possèdent des caractéristiques communes qui sont l'hétérotrophie, la croissance anaérobie facultative, la capacité de fermentation et de dénitrification ainsi que la motilité liée à la présence de nombreux flagelles (Shieh *et al.*, 2004; Fukunaga *et al.*, 2006).

Des analyses récentes en génomique de deux souches de *Pseudovibrio* sp. ont révélé leur grande polyvalence métabolique, leur capacité à utiliser une large gamme de substrats organiques et ont mis en évidence des clusters de gènes potentiellement impliqués dans les interactions symbiotiques avec leur hôte (Bondarev *et al.*, 2013).

Les souches de ce genre ont été décrites pour leurs propriétés antimicrobiennes (Hentschel *et al.*, 2001; O' Halloran *et al.*, 2011) mais jamais dans le cadre d'une étude sur la résistance bactérienne aux métaux.

L'étude menée dans ce chapitre initie la compréhension de la tolérance au cuivre de la souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53, isolée de *S. officinalis* par diverses approches. Tout d'abord, sa capacité à accumuler le cuivre dans ses compartiments intra- et extra-cellulaires a été analysée par dosage métallique par ICP-MS combiné à des observations en microscopie électronique à balayage couplé à la microanalyse par énergie dispersive de rayons X. Les substances polymériques extracellulaires produites par la souche ont été extraites et leur propension à se coupler au métal a été analysé. Enfin une étude de protéogénomique

(électrophorèse bidimensionnelle et spectrométrie de masse, séquençage du génome) a été initiée pour mettre en évidence les protéines impliquées dans la réponse bactérienne à un stress métallique. Trois génomes de bactéries du genre *Pseudovibrio* isolées de *S. officinalis*, présentant des niveaux de tolérance différents aux métaux, ont été séquencés en vue de conduire une étude génomique comparative.

2. Matériel et Méthodes

2.1. La souche bactérienne *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53

La souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 a été isolée à partir d'un homogénat de *S. officinalis* étalé sur milieu solide marine agar (Marine Broth 2213 Difco) supplémenté en nickel (0,5 mM) (Nieto *et al.*, 1989; Nies, 1999; Congeevaram *et al.*, 2007). La séquence de l'ADNr 16s de cette souche a été déposée sur la banque de données GenBank sous le numéro d'accession KF582880.

2.2. Dosages

2.2.1. Dosage des métaux

2.2.1.1. ICP-MS

Les analyses élémentaires des métaux ont été réalisées par spectrométrie par torche à plasma (ICP-MS). Les échantillons ont été dilués dans une solution contenant 2% d'acide nitrique dans de l'eau ultrapure (18MΩ). L'instrument d'ICP-MS était un Thermo X series II équipé avec une cellule de collision. La courbe de calibration a été obtenue par dilution d'une solution de multi-éléments certifiée (SCP Sciences). Les concentrations en métaux ont été déterminées grâce au logiciel Plasmalab (Thermo-Electron, Les Ulis, France)

2.2.1.2. Dosage colorimétrique

Dans l'étude sur les intéractions entre les EPS et le cuivre, les métaux ont été dosés dans le filtrat par la dithizone (Hervieu and Nalovic, 1965; Marczenko and Balcerzak, 2000). Un volume de 5 mL de dithizone 0,001% préparée dans du CCl_4 a été ajouté à 1 mL d'échantillon

et agité pendant 1 minute. Après 10 minutes d'incubation, l'absorbance a été mesurée à 555 nm avec le spectrophotomètre à microplaque POLARstar Omega (BMG labtech). Les mesures ont été réalisées en triplicat. Une gamme étalon a été réalisée à partir d'une solution de $CuCl_2$ à 10 mg.mL^{-1}, avec des concentrations de 0 à 5 µg.mL^{-1}.

2.2.2. Dosage des oses neutres

La concentration en oses neutres des fractions polysccharidiques des EPS a été mesurée en triplicat par dosage colorimétrique au phénol/acide sulfurique (Dubois *et al.*, 1956). Cette réaction n'est pas spécifique et permet d'effectuer un dosage global des oses (aldoses, cétoses et acides uroniques). Un aliquot de 200 µL d'échantillon, concentré à 2 mg.mL^{-1}, a été mélangé à 200 µL d'une solution de phénol 5% et à 1 mL d'acide sulfurique à 97%. Les tubes ont été incubés pendant 30 minutes à l'abris de la lumière. L'absorbance de la solution a été mesurée à 490 nm avec le spectrophotomètre à microplaque POLAR star oméga (BMG LABTECH) et les concentrations en oses ont été déterminées à partir d'une gamme étalon de glucose avec des concentrations de 0 à 50 µg.mL^{-1}.

2.2.3. Dosage des protéines

2.2.3.1. Méthode de l'acide bicinchonique

La concentration en protéines des extraits protéiques des EPS a été mesurée en triplicat par la méthode de l'acide bicinchoninique (Walker, 2009) avec le kit BCA Protein Assay (Pierce™) en suivant les instructions du fournisseur. Une gamme étalon a été réalisée à partir d'une solution d'albumine de sérum bovin à 2 mg.mL^{-1} (Thermo Scientific), avec des concentrations de 0 à 2 mg.mL^{-1}. L'absorbance des solutions a été mesurée avec le spectrophotomètre POLAR star oméga (BMG Labtech).

2.2.3.2. Méthode de Bradford

La concentration en protéines a été mesurée par dosage colorimétrique de Bradford (Bradford, 1976) avec le kit Roti® Quant (Carl Roth). Un volume de 200 µL de colorant Roti® Quant 30% a été ajouté à 50 µL des échantillons dilués au vingtième, au quarantième et au centième. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, les absorbances ont été

mesurées à 595 nm avec le spectrophotomètre POLAR star oméga (BMG Labtech). A cette longueur d'onde, les protéines se lient avec le marqueur. Une gamme étalon a été réalisée à partir d'une solution d'albumine de sérum bovin à 2 $mg.mL^{-1}$ (Thermo Scientific), avec des concentrations de 0 à 2 $mg.mL^{-1}$.

2.3. Isolement des protéines et des polysaccharides extracellulaires

2.3.1. Production et extraction des substances exopolymériques (EPS)

Une préculture de 5 mL de *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 a été incubée à 26°C pendant 24h dans un milieu Marine Broth, jusqu'à atteindre une densité optique (DO) de ≈0,8. Un aliquot de cette préculture a été prélevé et ajouté à un volume de 200 mL de Marine Broth afin d'obtenir une DO initiale de 0,001.

Les cultures bactériennes ont alors été incubées 6 jours à 26°C en présence de 5 mM de cuivre ou de 0,16 $mol.L^{-1}$ de glucose ou en absence de ces deux éléments sous une agitation continue de 180 rpm. Les méthodes d'extractions se sont inspirées de trois publications majeures (Leroy, 2006; Ortega-Morales *et al.*, 2007; Montersino *et al.*, 2008). La centifugation de 200 mL de milieu de culture à 6 000g pendant 30 minutes a permis de séparer 2 fractions : le culot comprenant les EPS liées à la paroi bactérienne et le surnageant comprenant les EPS secrétées par la bactérie dans le milieu extracellulaire.

Les EPS du surnageant sont filtrées (0.45 µm) et précipitées par l'ajout de 2 volumes d'éthanol absolu et froid. Après une nuit d'incubation à 4°C, ce mélange a été centrifugé à 6 000 g pendant 30 minutes et le culot qui comprenait les EPS a été dissous dans 5 mL d'eau milliQ, puis dialysé contre de l'eau milliQ pendant 48 h à 4°C (12-14 kDa, Spectral/Por, Spectrum) afin éliminer le maximum de contaminants de faible masse moléculaire comme les sels. Enfin, les échantillons ont été lyophilisés.

Pour la fraction des EPS liées à la surface des bactéries, le culot obtenu après centrifugation des cultures a été repris dans 10 mL d'une solution de NaCl à 20 g/L puis centrifugé à 6 000 g pendant 45 minutes. Ce culot a été re-suspendu dans 10 mL d'une solution de NaCl à 10 $g.L^{-1}$ puis dialysé contre de l'eau milliQ pendant 48 h (12-14 kDa, Spectral/Por, Spectrum). Le dialysat a été centrifugé à 15 000 g pendant 45 minutes pour éliminer les bactéries et le surnageant a été lyophilisé.

2.3.2. Isolement des protéines et des polysaccharides à partir des EPS

Dans le but de caractériser les EPS précédemment extraits des culots et surnageants bactériens, les fractions protéiques et exopolysaccharidiques ont été isolées selon les méthodes décrites dans quatre publications majeures (Faber *et al.*, 2001; Kachlany *et al.*, 2001; Muralidharan and Jayachandran, 2003; Saravanan and Jayachandran, 2008).

Les EPS liées à la paroi cellulaires et les EPS secrétées dans le milieu extracellulaires ont été dissous à 10 $mg.mL^{-1}$ dans de l'eau milliQ. Les protéines présentes dans ces extraits ont été précipitées avec 10% d'acide trichloroacétique à 4°C pendant 1 h. Après une centrifugation à 11 500 g pendant 15 minutes à 4°C, le surnageant contenant les exopolysaccharides et le culot protéique ont été séparés.

Les exopolysaccharides du surnageant ont été précipités par une incubation d'une nuit à 4°C en présence de deux volumes d'éthanol absolu froid. Le culot obtenu après centrifugation (6 000 g, 30 minutes) a alors été solubilisé dans un tampon Tris-HCl 0,1 M, $CaCl_2$ 10 mM, pH 7,5 auquel a été ajouté les enzymes DNase I (50 $\mu g.mL^{-1}$) et RNase (50 $\mu g.mL^{-1}$) et incubé pendant 1 h à 37°C. Les protéines ou grands peptides encore présents dans la fractions ont ensuite été dégradés par la pronase (50 $\mu g.mL^{-1}$) pendant une nuit à 37°C. Les trois enzymes ont été désactivées à 80°C pendant 20 minutes. Une ultrafiltration a été réalisée sur des colonnes d'ultrafiltration de porosité 50 kDa (Vivaspin, Sartorius stedim) afin de récupérer les EPS, qui sont de haute masse moléculaire et de se débarrasser des molécules de faible masse moléculaire. Les exopolysaccharides ont été récupérés dans la fraction non filtrée et solubilisés dans de l'eau milliQ.

Le culot protéique a été lavé avec 1 mL d'acétone froid. La solution a ensuite été vortéxée pendant 5 minutes. Après centrifugation à 11 500 g à 4°C pendant 15 minutes, les culots ont été séchés à l'air libre puis mélangés avec 200 µL de tampon d'extraction (8,75 M urée, 2,5 M de thiourée, 5% CHAPS, 20 mM DTT et un inhibiteur de protéase en tablette (Complete EDTA free de Roche) dans du 2,2,2-trifluoroéthanol 50% qui facilite la solubilisation des protéines). La solution a ensuite été vortéxée toutes les dix minutes pendant 1 h puis centrifugée à 14 000 g à température ambiante pendant 15 minutes. Les protéines étaient alors contenues dans le surnageant.

Les protéines et les oses neutres ont respectivement été dosés par l'acide bicinchonique et le mélange phénol/acide sulfurique.

2.4. Interactions des bactéries ou des EPS avec le cuivre

2.4.1. Interaction de Pseudovibrio sp. *2011SOCNI53* avec le cuivre

Une préculture de 5 mL de *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 a été incubée à 26°C pendant 24h dans un milieu Marine Broth (MB) (2213 Difco), jusqu'à atteindre une densité optique à 620 nm (DO_{620}) d'environ 0,8. Un aliquot de cette préculture a été prélevé et ajouté à un volume de 20 mL de MB afin d'obtenir une DO_{620} initiale de 0,001. Classiquement, les souches du genre *Pseudovibrio* nécessitent une température entre 20 et 35°C et une salinité du milieu entre 2 et 6% (Shieh *et al.*, 2004).

La souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 a donc été cultivée en bioréacteur dans 20 mL de MB à 26°C, sous agitation (180 rpm). Lorsque la culture a atteint la phase exponentielle, la culture a été divisée en deux. Dans l'un des bioréacteurs, 10 mM de $CuCl_2$ dissous dans du MB ont été ajoutés, dans l'autre correspondant à la culture contrôle, le volume équivalent de MB. Les cultures ont été réalisées en triplicats en présence et en absence de métal dans un milieu MB.

Les cultures ont été centrifugées à 8 000 g pendant 20 minutes. Un aliquot de 1 mL des surnageants a été directement conservé à 4°C (fraction S1) afin de doser la quantité totale de métal présent dans le surnageant sous forme libre, précipité et adsorbé sur exopolysaccharides. Le reste du surnageant a été filtré sur une colonne d'ultrafiltration de porosité 100 kDa (Vivaspin, Sartorius stedim) (fraction S2) afin d'éliminer les EPS extracellulaire et de ne doser que le métal libre dans le surnageant. Le culot bactérien a été lavé une fois avec du milieu MB filtré puis deux fois avec de l'eau stérile déionisée. Il a ensuité été séché à 50°C et pesé (fraction C). Le métal intracellulaire ou associé à la paroi a ainsi été mis en évidence.Les analyses élémentaires des métaux ont été réalisées par spectrométrie par torche à plasma (ICP-MS).

2.4.2. Interaction entre les EPS et le cuivre

Les EPS obtenus à partir du surnageant bactérien d'une culture en absence de cuivre et de glucose (à 0,1% m/v) ont été incubés en présence de $CuCl_2$ à 50, 500 et 800 $\mu g.mL^{-1}$ et placés sous agitation à 200 rpm, à température ambiante pendant 3h. Un contrôle négatif a été

réalisé pour vérifier que les métaux n'étaient pas adsorbé par le verre. Les solutions ont été filtrées sur une membrane d'ultrafiltration (porosité 30 kDa, Vivaspin, Sartorius stedim) afin de séparer le cuivre en solution à celui qui est lié aux EPS. Les métaux ont été dosés dans le filtrat par colorimétrie avec la dithizone.

L'efficacité d'élimination du métal ES a été déterminé en utilisant l'équation générale (Volesky, 1990; Dada *et al.*, 2012) : $ES = 100\times([Ce]_i - ([Ce]_{eq})/[Ce]_i$.
Dans cette équation, $[Ce]_i$ correspond à la concentration initiale et $[Ce]_{eq}$ la concentration finale en métaux.

2.5. Observations microscopiques de la souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53

Les observations ont été réalisées en microscopie électronique à balayage couplée à la microanalyse par énergie dispersive de rayons X (MEB-EDX). La microscopie électronique à balayage (MEB) permet d'obtenir des images de surface de matériaux solides. Les échantillons doivent être fixés, déshydratés puis métallisés préalablement à l'observation microscopique. La métallisation permet de recouvrir l'objet d'une mince couche conductrice (or, carbone…) par pulvérisation cathodique afin d'assurer la conductibilité électrique de l'échantillon. La microscopie électronique à balayage conventionnelle permet de travailler sous vide ordinaire c'est-à-dire à 10^{-6} mbar. Il est principalement utilisé pour l'observation d'échantillons d'origine géologique. La microscopie électronique à balayage environnementale permet de travailler à pression contrôlée, c'est-à-dire dans un vide allant jusqu'à 30 mbar et autorise l'observation d'échantillons biologiques souples.

Le faisceau d'électrons balaye la surface de l'échantillon et induit un signal, les électrons secondaires et rétrodiffusés, qui sont récupérés par un détecteur afin de reconstituer une cartographie de l'intensité du signal et donc une image.

La microanalyse X (EDX pour *Energy Dispersive X-ray Analysis*) permet de réaliser une analyse élémentaire, par détection des raies caractéristiques X des éléments contenus dans l'échantillon. Cette analyse est à la fois qualitative et quantitative. La cartographie spectrale obtenue peut être superposée à l'image de microscopie et donne une information visuelle de la composition chimique de l'échantillon.

Plusieurs tests et tentatives ont été nécessaires à la mise au point d'un protocole adapté aux observations microscopiques de notre souche bactérienne marine soumise ou non à un stress métallique.

2.5.1. Conditions de culture de la souche Pseudovibrio sp. 2011SOCNI53

2.5.1.1. Culture en milieu liquide

Une préculture de 5 mL de *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 a été incubée à 26°C pendant 24h dans un milieu MB (2213 Difco), jusqu'à atteindre une DO_{620} d'environ 0,8. Un aliquot de cette préculture a été prélevé et ajouté à un volume de 10 mL de MB afin d'obtenir une DO_{620} initiale de 0,001.

La souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 a donc été cultivée en bioréacteur dans 10 mL de MB à 26°C, sous agitation (180 rpm), à partir d'une préculture en milieu liquide. Lorsque la culture a atteint la phase exponentielle, la culture a été divisée en deux. Dans l'un des bioréacteurs, 10 mM de $CuCl_2$ dissous dans du MB ont été ajoutés, dans l'autre correspondant à la culture contrôle, le volume équivalent de MB. Les cultures ont été incubées pendant 24 h. Un aliquot de 1 mL de chacune des cultures a été centrifugé à 8000 g.

2.5.1.2. Formation de biofilms

Une préculture de 5 mL de *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 a été incubée à 26°C pendant 24h dans un milieu MB, jusqu'à atteindre une DO_{620} d'environ 0,8. Un aliquot de cette préculture a été prélevé et ajouté à un volume de 10 mL de MB afin d'obtenir une DO_{620} initiale de 0,001. Cette culture a été incubée jusqu'à atteindre une DO_{620} d'environ 0,1. Un aliquot de 2 mL de culture a été ajouté à un falcon de 50 mL dans lequel avait préalablement été déposé une lamelle de verre. Cette culture a été incubée à 26°C, sans agitation, jusqu'à atteindre une DO_{620} de 0,5. Dans le tube représentant la culture exposée au métal, 5 mM de $CuCl_2$ ont été ajoutés, dans l'autre correspondant à la culture contrôle, le volume équivalent de MB. Les cultures ont de nouveau été incubées dans les mêmes conditions pendant trois jours.

2.5.2. Fixation des échantillons

2.5.2.1. Culot bactériens

Les culots bactériens obtenus après centrifugation ont été resuspendus dans un volume de 1 mL de fixateur C (glutaraldéhyde 0,175 M, $CaCl_2$ 10 mM, sucrose 0,6 M, Sørensen-

phosphate (pH 8) 0,1 M), 1 mL de fixateur R composé d'oxychlorure de ruthénium ammoniacal (glutaraldéhyde 0,175 M, oxychlorure de ruthénium ammoniacal 0,055%, $CaCl_2$ 10 mM, sucrose 0,6 M, Sørensen-phosphate (pH 8) 0,1 M). L'oxychlorure de ruthénium ammoniacal, de couleur rouge, permet de conserver les structures polysaccharidiques. Les échantillons ont été incubés pendant 2 h avec le fixateur C et 2 h avec le fixateur R. Les culots bactériens ont été centrifugés à 8 000 g pendant 5 minutes.

2.5.2.2. Biofilms sur lamelle

Les lamelles de verres ont été lavées dans un bain de MB puis incubées dans 1 mL de fixateur CC (glutaraldéhyde 2,5%, cacodylate 0,2 M, NaCl 0,3 M) ou 1 mL de fixateur CCR (oxychlorure de ruthénium ammoniacal 0,055%, glutaraldéhyde 2,5%, cacodylate 0,2 M, NaCl 0,3 M). Les lamelles de verre ont été incubées pendant 1,5 h avec les fixateurs CC et CCR.

2.5.3. Lavage et déshydratation

Après l'étape de fixation, les culots bactériens et lamelles de verre ont été lavés soit avec un tampon phosphate salin (PBS, 37 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 1,76 mM KH_2PO_4) pendant 1 h puis avec de l'eau distillée pendant 2 × 10 minutes, soit directement avec de l'eau distillée pendant 2 × 10 minutes Pour les culots bactériens, les échantillons ont été centrifugés à 8 000 g pendant 10 minutes et le surnageant a été éliminé entre chaque étape.

Les échantillons ont ensuite été déshydratés par passage dans des bains successifs d'éthanol à 50% (1 × 10 minutes) puis 70% (3 × 10 minutes), 90% (1 × 10 minutes), 95% (1 × 10 minutes) et enfin 100% (3 × 10 minutes). Pour les culots bactériens, les échantillons ont été centrifugés à 8 000 g pendant 10 minutes et le surnageant a été éliminé entre chaque étape.

Des aliquots de 50 µL culots bactériens dilués au sixième dans de l'éthanol 100% ont été déposés sur filtres hydrophiles de type HA 0,2 µm (Millipore) ou sur lamelles de verre.

Certaines lamelles ont ensuite été déposées dans des microtubes de 2 mL criblés de trous à l'aiguille. Ces microtubes ont de nouveau été plongés dans une solution d'éthanol

100% afin de finaliser leur dessiccation par contournement de leur point critique dans un appareil à point critique (Emitech K850).

Cette technique permet de déshydrater un échantillon sans déformer et casser la structure à cause d'une évaporation trop rapide de l'eau contenue dans la structure hydratée. Au point critique, le liquide contenu dans les échantillons se trouve à la fois à l'état liquide et à l'état gazeux caractérisé par des valeurs de température et de pression spécifique. Dans ces conditions, le milieu intérieur de la cellule est substitué par du CO_2 liquide qui est ensuite évacué.

Les lamelles de verres ainsi que les filtres ont été collés sur des adhésifs au carbone (Electron Microscopy Sciences) et eux-mêmes ont été déposés sur des porte-objets en aluminium (Electron Microscopy Sciences).

2.5.4. Métallisation et observation microscopique

Les portes-objets ainsi chargé ont été métallisés par pulvérisation cathodique soit de carbone (1 × 30 secondes, Jeol JFC-1200 fine coater), soit d'or (2 × 30 secondes, Jeol JFC-1200 fine coater). Les échantillons ont été observés par microscopie électronique à balayage couplé à la microanalyse par énergie dispersive de rayons X.

2.5.5. Protocole sans étapes de fixation, déshydratation

Après 24h de culture en présence ou en absence de cuivre, chaque culture a été centrifugée à 1 100 g pendant 5 minutes, afin de ne pas abimer les cellules. Les culots ont alors été resuspendus dans du milieu de culture MB. Après une centrifugation à 1 100 g pendant 5 minutes, un volume de 100 µL du surnageant a été transféré dans un microtube. Le reste du surnageant a été éliminé et le culot a été resuspendu avec les 100 µL précédemment mis de côté. Cette solution a été diluée dans 20 mL de tampon HEPES 10 mM. Ce volume a été filtré sur filtres de type GTTP 0,2 µm (Millipore). Les filtres ont ensuite été déposés sur des porte-objets MEB. Les porte-objets ainsi chargé ont été métallisés par pulvérisation cathodique de carbone (1 × 30 secondes).

2.6. Séquençage du génome de *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53

Les étapes nécessaires au séquençage de ce génome ont toutes été réalisées dans le Service de Systématique Moléculaire (SSM) du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris avec l'aide précieuse de Régis Debruyne et José Utge.

2.6.1. Préparation des échantillons à séquencer

2.6.1.1. Extraction de l'ADN génomique

La souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 a été cultivée en bioréacteur dans 20 mL de MB à 26°C, sous agitation (180 rpm). Après centrifugation d'aliquots de 2 mL de la culture, l'ADN génomique (ADNg) de cette souche a été extrait avec le kit PureLink™ Genomic DNA (Invitrogen) conformément aux instructions du fabricant.

2.6.1.2. Préparation de la librairie d'amplicons d'ADN génomique

La procédure générale mise en place a commencé par la fragmentation de l'ADNg en fragments d'approximativement 200 pb. Les extrémités des fragments ont ensuite été réparées et des adaptateurs y ont été ajoutés. Enfin la librairie a été a été amplifiée par PCR (Figure 28).

2.6.1.2.1. Fragmentation de l'ADNg, réparation des extrémités et purification

L'ADNg de la souche a été fragmenté mécaniquement par sonication en utilisant le système BioRuptor® Sonication UCD-200 (Life technologies, Invitrogen) jusqu'à obtenir des fragments de 200 pb. Pour cette étude, trois cycles de 15 minutes avec une alternance de 30 secondes de sonication et 30 secondes de refroidissement à faible puissance ont été nécessaires. La vérification de la longueur des fragments a été réalisée par migration sur gel d'agarose 1%.

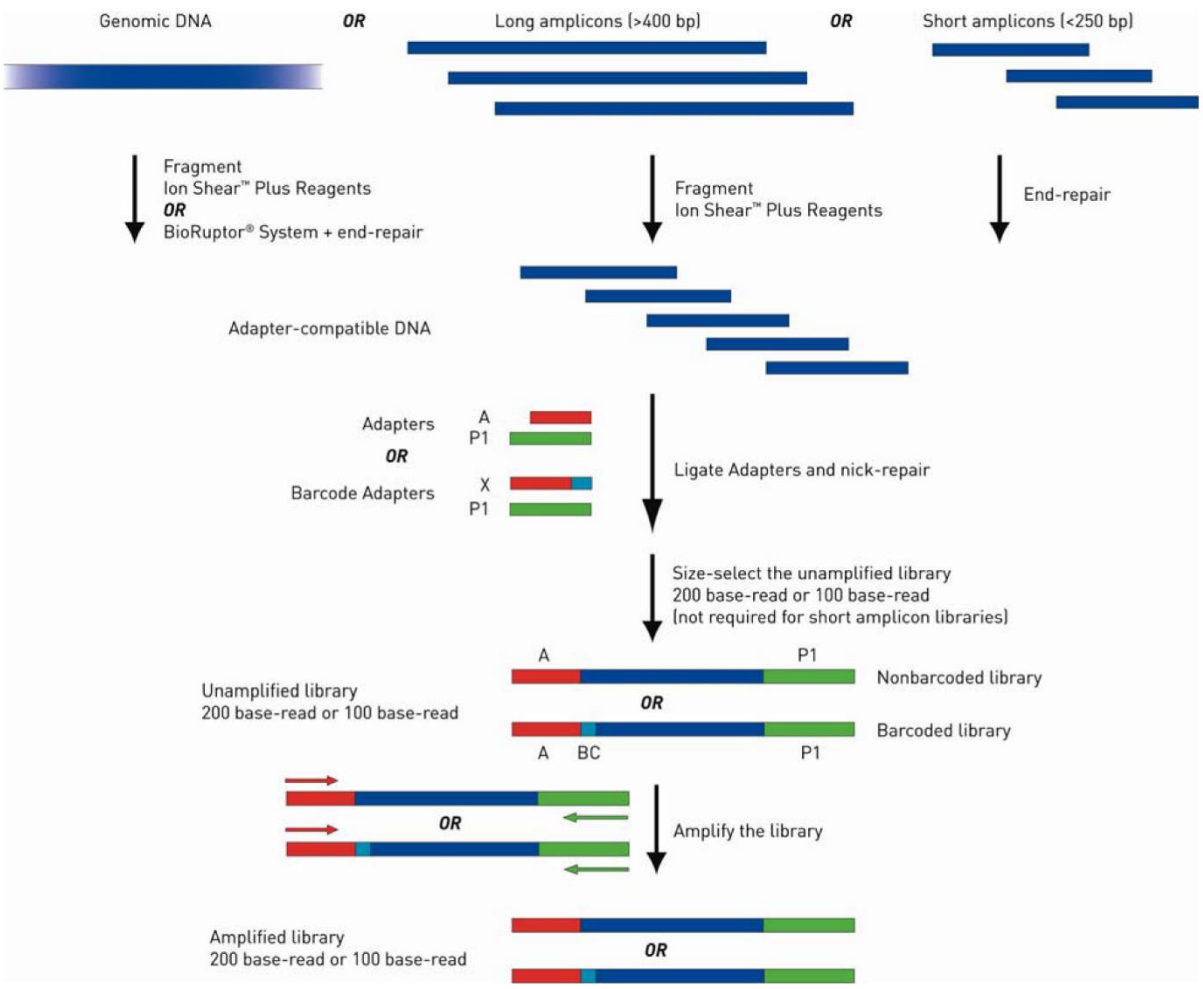


Figure 28 : Vue d'ensemble de la procédure de préparation de la librairie d'amplicons à partir d'un échantillon d'ADN génomique (source : Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit User guide).

2.6.1.2.2. Réparation des extrémités des fragments d'ADN

Les extrémités des fragments d'ADN obtenus après la sonication ont été réparés à l'aide avec l'enzyme End Repair du kit "Ion Plus Fragment" (Life technologies, Invitrogen).

L'ADN ainsi réparé a alors été purifié avec le "Agencourt® AMPure® XP" (Life technologies, Invitrogen) conformément aux instructions du fabricant. Cette purification se fait à l'aide de billes magnétiques sur lesquelles vont se fixer l'ADN.

2.6.1.2.3. Ligation des adaptateurs

Lors de cette étape, deux éléments ont été ajoutés aux extrémités des fragments d'ADNg, des adaptateur Ion Xpress™ P1 et A pour permettre l'amplification ultérieure des fragments. L'adaptateur A est lié à un code barre Ion Xpress™ Barcode X. Le code barre

correspond à une séquence d'environ 10 nucléotides qui permet d'identifier les ADN et de traiter plusieurs échantillons différents en même temps.

Les volumes de 10 µL de tampon de ligation (10X), 2 µL d'adaptateur P1, 2 µL d'adaptateur avec un code barre X, 2 µL de mix de dNTP, 49 µL d'eau Nuclease-free, 2 µL d'ADN ligase, 8 µL de polymérase réparatrice de coupures fournis dans les kits "Ion Plus Fragment Library" et "IonXpressTM Barcode Adapters" (Life Technologies, Invitrogen) ont été ajoutés à un volume de 25 µL d'ADNg fragmenté. Ce mélange a alors été placé dans un thermocycleur avec un programme de 15 minutes à 25°C suivi de 5 minutes à 72°C.

L'ADNg auquel les adaptateurs ont été liés a ensuite été purifié avec le kit "Agencourt® AMPure® XP" (Life Technologies, Invitrogen) conformément aux instructions du fabricant.

2.6.1.2.4. Amplification des fragments d'ADNg

Cette étape permet d'enrichir sélectivement la bibliothèque de fragments à l'aide d'amorces complémentaires aux adaptateurs A et P1. La préparation de l'échantillon à amplifier a été réalisée avec le kit "Platinum® PCR superMix High Fidelity" (Life Technologies, Invitrogen) conformément aux instructions du fabricant. Le mélange correspondant a alors été placé dans un thermocycleur avec un programme de dénaturation (95°C, 5 minutes), puis huit cycles de dénaturation (95°C, 15 s), d'hybridation (58°C, 15 s) et élongation (70°C, 1 minute) et les produits de PCR ont enfin été maintenus à 4°C.

Comme précédemment, la purification a été réalisée avec le kit "Agencourt® AMPure® XP" (Life Technologies, Invitrogen) conformément aux instructions du fabricant.

2.6.1.2.5. Quantification de la librairie d'amplicons d'ADNg

La quantification de la librairie d'amplicons d'ADNg par PCR quantitative (qPCR) est une étape cruciale avant de réaliser une amplification clonale fiable par PCR en émulsion. Elle permet de déterminer avec précision la concentration molaire des amplicons de la librairie et de vérifier la taille des fragments d'ADNg. La quantification a été réalisée à l'aide du kit "Ion Library Quantitation" (Life Technologies, Invitrogen).

Une fois cette étape terminée, la librairie d'amplicons d'ADNg a été diluée afin d'avoir une concentration de 26 $pmol.L^{-1}$.

2.6.1.3. Préparation de la matrice de séquençage

Cette étape correspond à la préparation de la matrice pour le système de séquençage Ion Personal Genome Machine™ (PGM). Elle permet de réaliser une amplification clonale par PCR en émulsion des amplicons d'ADNg de la librairie sur les microbilles "Ion Sphere Particles" (ISPs). L'amplification clonale contribue à atteindre le seuil de détection du signal nécessaire pour effectuer le séquençage.

Les produits de PCR précédemment obtenus ont été fixés sur des microbilles par des séquences complémentaires de l'adaptateur P1. Les conditions de traitement des échantillons, c'est-à-dire le ratio nombre de molécules d'ADN par nombre de billes, doivent être telles que statistiquement chaque microbille sera porteuse d'un fragment de PCR.

La PCR en émulsion a été réalisée en microplaque 96 puits MicroAmp® par 50 cycles de PCR. Chaque microbille est contenue dans un microréacteur constitué par une microgoutte de l'émulsion eau/huile et composé des éléments nécessaires à la PCR (enzymes, tampon, dNTPs, amorce A couplée à la biotine). Le kit "IonXpress™ Template 200" (Life Technologies, Invitrogen) a permis de préparer les échantillons nécessaires à la PCR. Les fragments d'ADN fixés ont été amplifiés autour de chaque bille (Figure 29).

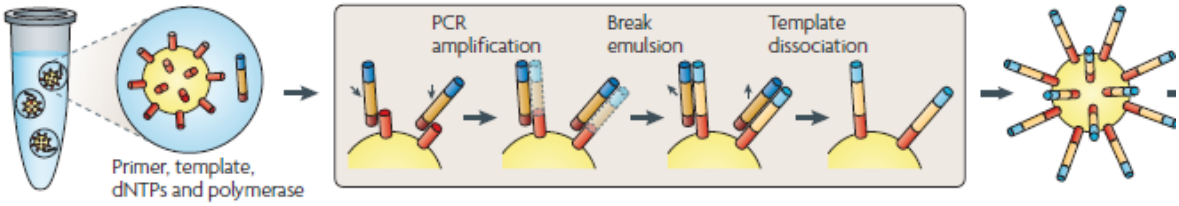


Figure 29 : Préparation de la matrice de séquençage du génome par PCR en émulsion. L'adaptateur P1 (en rouge) permet la fixation des fragments d'ADN au niveau de la surface des sphères. L'adaptateur A (en bleu) permettra par la suite la capture des sphères couplées aux fragments d'ADN.

A la fin de la PCR, les microbille ont été récupérées grâce au système "SOLiD® Emulsion Collection Tray" (Life Technologies, Invitrogen). La qualité des échantillons a été testée avec le fluoromètre Qubit® 2.0 (Invitrogen). Trois situations ont été observées, des microbilles monoclonales qui n'ont intégré qu'une seule séquence d'ADN et seront utilisées comme matrice pour le séquençage, des microbilles polyclonales avec plusieurs segments d'ADN différents ainsi que des microbillles vides. Les microbilles monoclonales et polyclonales ont été récupérées par des billes magnétiques recouvertes de streptavidine qui se couple à la biotine chargé sur les extrémités "A" des fragments amplifiés.

2.6.2. *Séquençage du génome en Ion Torrent*

Suite aux étapes précédemment décrites, le séquençage de l'ADNg amplifié a pu être réalisé sur le séquenceur PGM™ (Life Technologies, Invitrogen). Les réactifs et le matériel nécessaires au séquençage sont fournis dans le kit "Ion Sequencing 200". Le protocole utilisé est décrit dans le guide intitulé "Ion Sequencing 200 kit User guide". Le système PGM™ a d'abord du être nettoyé et initialisé afin notamment d'homogénéiser les valeurs de pH à 7,8 au sein des différents réactifs de l'appareil.

La matrice de séquençage couplée aux amorces de séquençage et à la polymérase a ensuite été chargée sur la puce Ion 316v2™. Cette puce recouverte de micro-puits sur une surface semi-conductrice représente le support de séquençage. Les ions H^+ produits lors de la polymérisation de l'ADN entraînent une variation de pH qui est détectée au niveau de la surface semi-conductrice de chaque puits de la puce et les signaux ioniques alors générés sont transcrits sous forme d'ionogrammes **(**Figure 30**)**.

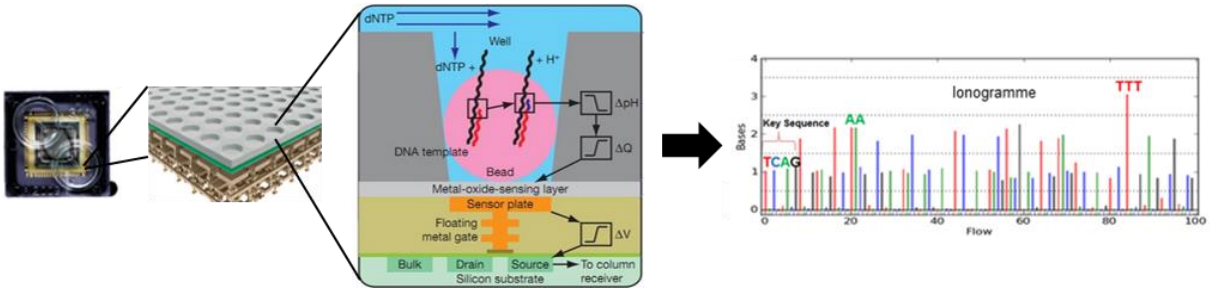


Figure 30 : Description d'une puce à ADN Ion 316v2™. Cette puce est recouverte de micro-puits positionnés sur une surface semi-conductrice qui représente le support de séquençage. Dans chaque puits, Les fragments d'ADN sur les microbilles vont être polymérisés. Les ions H^+ produits lors de cette polymérisation entraînent une variation de pH qui va être détectée au niveau de la surface semi-conductrice sous-jacente. Les signaux ioniques ainsi générés vont être transcrits en ionogrammes.

2.6.3. *Analyse des données de séquençage de l'ADNg*

A l'issue du séquençage, l'ensemble des données brutes, les ionogrammes, ont été transférées vers le serveur "Torrent " et l'algorithme de base "calling" permet alors de les convertir en séquences d'acides nucléiques (A, T, C, G). Les données forment des "reads" qui sont chacun associés à un score de qualité. Les "reads" générés ont été prétraités afin d'éliminer la séquence des adaptateurs, les portions de "reads" de mauvaise qualité ainsi que les "reads" de petite taille et les "reads" polyclonaux. Ce traitement a permis de réaliser un

premier assemblage automatique des "reads" par comparaison avec le génome connu de *Pseudovibrio* sp. FO-BEG1 (Bondarev *et al.*, 2013). Un rapport qui informe sur le nombre de "reads" obtenus, leur taille moyenne et leur qualité est généré à l'issue de ce prétraitement des données.

Les données prétraitées ont été transférées à "Cellule de Soutien à la Bioinformatique" du département "Régulation, Développement et Diversité Moléculaire" du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris. Evelyne Duvernois-Berthet, sous la responsabilité de Loic Ponger, a réalisé le "mapping" et l'assemblage du génome de la souche *Pseudovibrio* sp. contre les génomes proches des souches du même genre, *Pseudovibrio* sp. FO-BEG1 et JE06, précédemment séquencés (Bondarev *et al.*, 2013).

Les ADN génomiques et plasmidiques de souches du même genre présentant des profils de tolérance aux métaux différents, *Pseudovibrio* sp. 2011SOCCUA9 résistant au nickel (CMI = 25 mM) et *Pseudovibrio* sp. 2011SOCZNC4 peu résistant aux cuivre, nickel, zinc et plomb. L'assemblage de ces génomes est en cours.

2.7. Caractérisation des protéines

2.7.1. Électrophorèse sur gel d'acrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)

L'électrophorèse a été réalisée sur un gel de polyacrylamide à 12% (12% bis-acrylamide, 25% Tris HCl (1,5 M, pH 8,8), 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,04% Temed). Un volume de 10 µL d'un échantillon protéique (2 $mg.mL^{-1}$) a été mélangé avec 10 µL de tampon de charge (Tris 50 mM pH 6,8, bleu de bromophénol, SDS 2%, glycérol 10%, DTT 35 mM). Ce mélange a été chauffé à 95°C pendant 5 minutes puis déposé dans les puits du gel. La migration a été menée à 90 V pendant 40 minutes dans un tampon de migration (Tris-tricine à 0,1 M, SDS 0,1%, pH 8,5). Le marqueur de masse moléculaire utilisé était le "Page Ruller unstained protein ladder" de 10 à 200 kDa (Thermo Scientific). Les protéines ont été révélées par agitation du gel dans une solution de coloration (40% éthanol, 7% acide acétique, 0,025% bleu de Coomassie) pendant 1 h puis dans une solution de décoloration (40% éthanol, 7% acide acétique) pendant 50 minutes. Les deux bandes majoritaires observables sur le gel ont été excisées.

2.7.2. Électrophorèse bidimentionelle

2.7.2.1. Préparation des échantillons à partir d'un culot bactérien

Une préculture de 5 mL de *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 a été incubée à 26°C pendant 24h dans un milieu MB, jusqu'à atteindre une densité optique DO_{620} d'environ 0,8. Un aliquot de cette préculture a été prélevé et ajouté à un volume de 20 mL de MB afin d'obtenir une DO_{620} initiale de 0,001. Cette culture a été incubée à 26°C, sous agitation (180 rpm). Lorsque la culture a atteint la phase exponentielle, la culture a été divisée en deux. Dans l'un des bioréacteurs, 10 mM de $CuCl_2$ dissous dans du MB ont été ajoutés, dans l'autre correspondant à la culture contrôle, le volume équivalent de MB. Les cultures ont de nouveau été incubées pendant 24 h, à 26°C sous agitation (180 rpm).

Les culots bactériens ont été obtenus par centrifugation de cultures bactériennes à 8 000 g, à 4°C pendant 15 minutes. Les culots ont été lavés par aspiration-refoulement avec quatre volumes par gramme de culot de tampon de lavage (3 mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4, 68 mM NaCl, 9 mM Na_2HPO_4). Après centrifugation à 8 000 g, à 4°C pendant 15 minutes, les étapes de lavage ont été répétées deux fois.

Les culots ont été re-suspendus dans quatre volumes de tampon d'extraction TE_1 [8,75 M urée, 2,5 M thiourée, 5% CHAPS, 20 mM DTT et un inhibiteur de protéase (Complete EDTA free de Roche) dans du 2,2,2-trifluoroéthanol 50%]. Ces conditions de solubilisation ont été définies pour extraire à la fois les protéines aqueuses *i.e.* cytosoliques et les protéines moins solubles, comme les protéines membranaires (Molloy *et al.*, 1998). Le 2,2,2-trifluoroéthanol a été utilisé pour maintenir la solubilité des protéines hydrophobiques pendant la séparation des protéines qui a ainsi été améliorée (Deshusses *et al.*, 2003).

Les culots ont ensuite été homogénéisés et soniqués (10 minutes, 20%, alternance de 10 secondes de sonication et 10 secondes de refroidissement) et maintenus sous agitation pendant 1 heure à température ambiante. Une dernière centrifugation à 20 000 g à 4°C pendant 15 minutes a permis de récupérer les protéines solubilisées dans le surnageant.

2.7.2.2. Précipitation des protéines

Pour chaque échantillon, les protéines ont été précipitées par addition de huit volumes d'acétone et d'un volume d'acide trichloroacétique à un volume d'extrait protéique. Cette solution a été incubée à -20°C pendant 1 heure. Une centrifugation de la solution à 11 500 g à

4°C pendant 15 minutes a permis de concentrer les protéines dans les culots. Ces derniers ont ensuite été séchés à l'air libre quelques minutes puis réhydratés avec un volume de 500 µL de solution de réhydration TE_2 [8,75 M urée, 2,5 M thiourée, 5% CHAPS et un inhibiteur de protéase (Complete EDTA free de Roche)]. L'échantillon a ensuite été maintenu à température ambiante pendant une heure en vortexant légèrement toutes les 10 minutes puis centrifugé à 14 000 rpm à température ambiante pendant 10 minutes. Les protéines ont ainsi été solubilisées dans le surnageant.

2.7.2.3. Dessalage des protéines

Les échantillons ont été dessalés sur une colonne "PD-10 Desalting" (Sephadex™ G25M, GE Healthcare). La séparation des molécules de l'échantillon repose sur leurs migrations au travers de billes poreuses par chromatographie d'exclusion. Les plus petites molécules passent par les pores des billes et sont ralenties dans leur progression, alors que les plus grosses progresseront plus rapidement.

La colonne a été équilibrée avec 25 mL de tampon TE_2 avant que 2,5 mL des extraits protéiques aient été chargés sur celle-ci. Elle est rincée avec 25 mL de tampon TE_2 pour éliminer les sels et les protéines sont éluées avec 3,5 mL de tampon TE_2.

2.7.2.4. Electrophorèse bidimensionnelle

L'électrophorèse bidimensionnelle est un outil central en protéomique classique, qui permet de séparer des centaines de protéines d'un mélange biologique selon leur point isoélectrique par focalisation isoélectrique, et leur masse moléculaire apparente par migration en électrophorèse PAGE-SDS (O'Farrell, 1975) (Figure 31).

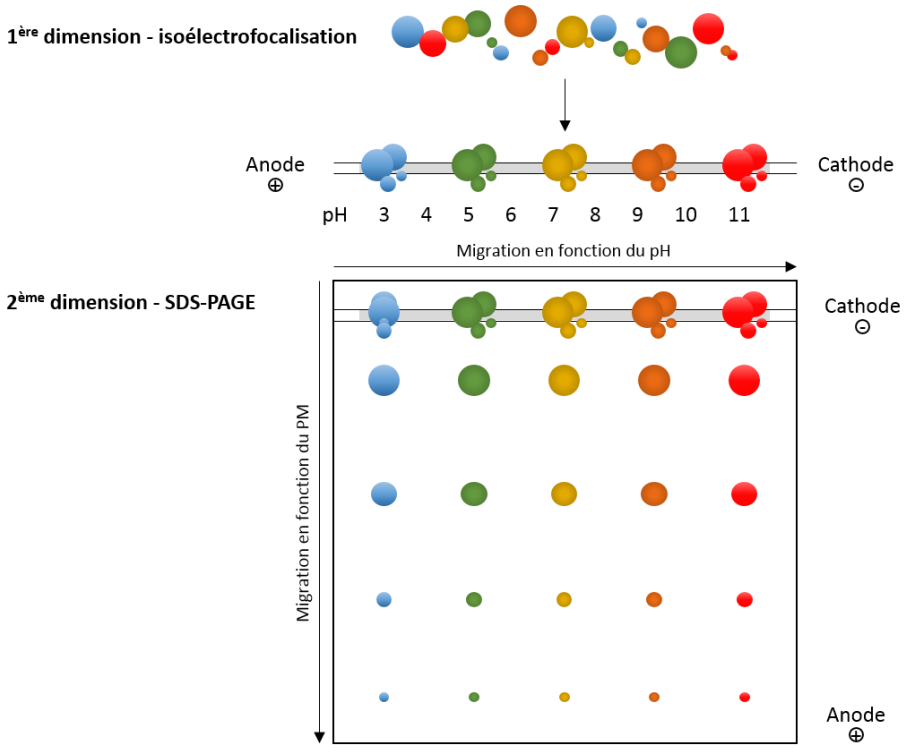


Figure 31 : Schéma des étapes de l'électrophorèse bidimensionnelle

Elle permet d'identifier des changements d'expression protéique entre différentes conditions et de détecter des modifications post- et co-traductionnelles, qui ne peuvent pas être prédites par la séquence génique.

2.7.2.4.1. La focalisation isoélectrique

La première dimension de l'électrophorèse bidimensionnelle permet la création d'un gradient de pH dans lequel pourront se déplacer les protéines soumises à un champ électrique. Les protéines s'immobilisent lorsqu'elles atteignent le pH qui correspondra à leur point isoélectrique.

La séparation en première dimension a été réalisée sur des bandelettes de gel d'acrylamide de 17 cm, avec un gradient de pH 3 - 10 non linéaire, immobilisé (*Immobiline DryStrip gels* Bio-Rad). Les bandelettes ont été réhydratées passivement en présence de 400 µg de protéines des échantillons, d'un mélange de 0,03% de bleu de bromophénol et de 20% d'ampholytes (Bio-Rad).

Après la réhydratation, l'isoélectrofocalisation a été réalisée avec la PROTEAN® IEF cell (Bio-Rad) en quatre étapes. Les bandelettes ont d'abord été maintenues pendant 15

minutes à 250 V, puis le voltage a été augmenté à 10 000 V avec une pente rapide jusqu'à atteindre 60 000 V-heure tout en maintenant les bandelettes à 20°C avec un courant limité à 50 µA par bandelette. Les bandelettes sont maintenues à faible voltage (500 V) pour empêcher les protéines de dériver de leur point isoélectrique. Lorsque la focalisation a été terminée, les bandelettes ont été stockées à -20°C.

2.7.2.4.2. Electrophorèse SDS-PAGE

La deuxième dimension en électrophorèse SDS-PAGE permet la migration des protéines en fonction de leur masse moléculaire.

Les bandelettes ont été tamponnées lors d'une phase d'équilibration. Les protéines ont été réduites puis carbamidométhylées dans un tampon Téq (6 M d'urée, 70 mM de SDS, 34,4% de glycérol, 1,5 M de Tris-HCl pH 8,8) avec respectivement 10 mg/mL de DTT pendant 10 minutes, puis 25 mg/mL d'iodoacétamide et 0,001% de bleu de bromophénol pendant 10 minutes.

Les protéines ont ensuite été séparées par PAGE-SDS 12%. Une fois le gel polymérisé, les bandelettes et le marqueur de charge (PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific) ont été déposés en haut du gel et recouverts d'une solution d'agarose low melting (1% agarose) préparée avec du tampon de migration (TM = 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0,1% SDS). La migration a été conduite dans le système Criterion™ Cell (Bio-rad) dans le tampon TM avec un courant électrique de 25 mA / gel pendant 18 h.

Les protéines ont été visualisées avec du bleu de Coomassie. Après fixation des protéines (7% acide acétique / 40% éthanol / 1 heure), coloration (40% éthanol, 7% acide acétique, et 0,025% bleu de Coomassie / 2 h) puis décoloration par plusieurs bains changés toutes les 30 minutes (40% éthanol, 7% acide acétique), les gels ont été conservés dans de l'acide acétique 10%.

2.7.2.5. Analyse des gels

Les gels ont ensuite été scannés avec une caméra (Fx7 de Vilbert Lourmat). L'analyse de ces gels a été réalisée avec le logiciel Image Master 2D platinum (GE Healthcare). Les spots ont été détectés automatiquement par le logiciel. Après vérification manuelle, les gels ont été superposés et les spots identifiés et appariés. Ce traitement automatisé nécessite une vérification et une correction manuelle pour chaque spot afin de quantifier et normaliser leurs

volumes. Le volume calculé correspond au volume au-dessus de la frontière située à 75% de la hauteur du spot (Figure 32).

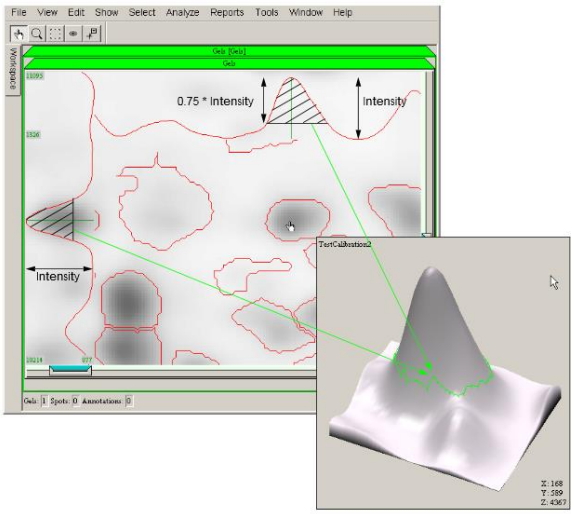


Figure 32 : Quantification des spots observables sur les gels obtenus après électrophorèse SDS-PAGE. La vue en 3D dans ImageMaster reflète la forme des spots et le volume de ce qui va être quantifié. Le contour du spot correspond à l'aire à 75% de sa hauteur.

Le test de Wilcoxon a été utilisé pour comparer les volumes des spots entre les gels de chaque condition expérimentale (avec et sans cuivre). Les spots affichant des valeurs de p-value inférieures à 0,05 ont été considérés comme significativement différents les uns des autres.

2.7.3. Digestion enzymatique et identification protéique

2.7.3.1. Digestion des protéines sur gel

Les spots protéiques d'intérêt observables sur le gel ont été découpés. Les morceaux de gel ont été lavés, dans le but d'éliminer les différentes molécules chimiques contaminantes, avec 500 µL d'hydrogénocarbonate d'ammonium (NH_4HCO_3), 50 mmol.L^{-1} pendant 10 minutes à 950 rpm, puis 500 µL d'un mélange 50/50 d'acétonitrile/NH_4HCO_3, 50 mmol.L^{-1} pendant 10 minutes à 950 rpm. Ces deux étapes ont été répétées une fois. Les morceaux de gels ont ensuite été lavés avec 500 µL d'acétonitrile pendant 10 minutes à 950 rpm pour les déshydrater et ensuite séchés sous vide (Speed Vac®, SAVANT SPD 111V, Thermo electron).

Les protéines présentes dans le gel ont été réduites en présence de 10 mM de dithiothréitol (DTT) (1 h, 57°C, 950 rpm) et alkylées avec 55 mM d'iodoacétamide (1 h, 57°C, 950 rpm). Les étapes de lavage ont été répétées. Les protéines ont été digérées par de la trypsine 20 ng.µL^{-1} dans 50 mM de NH_4HCO_3. Après une nuit de digestion à 30 °C sous agitation, le surnageant a été récupéré. Les morceaux de gel ont ensuite été lavés, afin d'extraire les peptides encore piégés à l'intérieur du gel, avec 50 µL d'acide formique 0,1% sous agitation pendant 10 min, 50 µL d'un mélange 50/50 d'acétonitrile/acide formique 0,1% sous agitation pendant 10 min et 50 µL d'acétonitrile sous agitation pendant 10 minutes. L'ensemble des surnageants ont été rassemblés et séchés sous vide (Speed Vac® SAVANT SPD 111V, Thermo electron).

2.7.3.2. Analyse par chromatographie liquide haute performance couplé à la spectrométrie de masse

L'analyse a consisté à cartographier les peptides présents dans le mélange de digestion. Par cette technique appelée empreinte peptidique massique (PMF), nous avons cherché un maximum de peptides appartenant à la protéine présente afin de permettre son identification.

Les analyses des échantillons solubilisés dans 20 à 50 µL d'acide formique (AF) 0,1% ont été réalisées sur une chaîne de chromatographie liquide à haute performance Ultimate 3000 Micro-HPLC system (Thermo Scientific) couplée à un spectromètre de masse ESI-Qq-TOF Q-STAR Pulsar (AB Sciex) équipé d'une source électrospray (ESI) et d'un analyseur quadrupôle-temps de vol (qQ-TOF). Les peptides ont été séparés par microHPLC sur une colonne C_{18} en phase inverse (Uptisphere WTF, 150 × 1 mm, 300 Å, 5 µm, Interchim). La phase mobile était constituée de l'éluant A (H_2O/AF 0,1%) et de l'éluant B (acétonitrile/AF 0,08%). Les peptides ont été élués avec un débit de 40 µL.min^{-1} et un gradient linéaire de 10 à 80% d'éluant B en 45 minutes suivi par une augmentation linéaire jusqu'à 100% d'éluant B en 5 minutes et d'un pallier en maintenant le %B constant pendant 5 minutes. Ce gradient et cette colonne permettent de séparer les molécules en fonction de leur polarité.

L'analyse par spectrométrie de masse a été réalisée en mode positif dans une gamme de *m/z* entre 400 et 1300 et en mode d'acquisition dépendante des données avec enchaînement de séries d'une expérience MS (1 seconde) suivie de deux expériences en tandem (MS/MS) sur les deux ions majoritaires (2 secondes chacune), en sélectionnant les ions d'états de charge 2+, 3+ ou 4+.

Les fichiers obtenus par HPLC-MS/MS ont ensuite été analysés avec le logiciel Mascot (version 2.4.01,Matrix Science) en interrogeant les banques de données Swissprot UniProtKB et NCBi avec les paramètres suivants : digestion trypsique, taxonomie des bactéries, modifications partielles par carbamidométhylation / oxydation, un "missed cleavage", tolérance de masse : 1,2 Da en mode MS et 0.6 Da en mode MS/MS, charge des peptides 2+, 3+ et 4+, appareil ESI-QUAD-TOF.

Tous les peptides d'une protéine pourraient ne pas être mis en évidence en même temps à cause d'une digestion incomplète ou de la présence de peptides de trop petite ou de trop grande masse. Par ailleurs, il existe des phénomènes d'extinction de signal à cause de peptides trop proches en masse ou faiblement ionisables. Enfin, des peptides peuvent ne pas être associés si la protéine correspondante n'est pas dans les bases de données.

3. Résultats et Discussion

La souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 a été isolée à partir d'un homogénat de *S. officinalis* étalé sur milieu solide marine agar (Marine Broth 2213 Difco) supplémenté en nickel (0,5 mM) (Nieto *et al.*, 1989; Nies, 1999; Congeevaram *et al.*, 2007). La séquence de l'ADNr 16s de cette souche a été déposée sur la banque de données GenBank sous le numéro d'accession KF582880.

La mesure des concentrations minimales de cette souche, pour le cuivre (25 mM), le zinc (1,56 mM), le plomb (12,5 mM) et le nickel (6,25 mM) a permis de mettre en évidence son fort niveau de tolérance pour le cuivre. Ce résultat a justifié sa sélection comme modèle pour l'étude de la résistance d'une bactérie marine au cuivre.

3.1. Étude des substances polymériques extracellulaires (EPS) produites par *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53

Les EPS représentent l'ensemble des molécules, riche en carbones organiques, excrétées par la bactérie tels que des protéines, des acides nucléiques et des sucres représentés par les oses neutres, les acides uroniques et les hexosamines dont les proportions peuvent varier (Nicolaus *et al.*, 2004). Ces EPS assurent la capture de minéraux et de nutriments essentiels pour la survie des bactéries. Elles représentent le constituant majoritaire de la

matrice des biofilms et jouent un rôle important dans l'adhérence des micro-organismes entre eux et sur une surface biotique ou abiotique (Flemming *et al.*, 2007).

Les EPS jouent un rôle important dans la survie des bactéries car elles permettent de tamponner les variations physico-chimiques environnementales (pH, disponibilité en carbone et en cations, pression osmotique) (Harrah *et al.*, 2006). Elles permettent de lutter contre la dessication, les substances hydrophobes toxiques, tels que les détergents, et la prédation par des protozoaires. Elles assurent la résistance contre les antibiotiques et les métaux toxiques.

De nombreuses substances polymériques extracellulaires de bactéries ont été isolées et caractérisées pour leur propriétés chélatrices des métaux lourds (Geesey *et al.*, 1992; Bhaskar and Bhosle, 2005). En effet, ces exopolymères sont largement composés d'hétéropolysaccharides avec des groupements chargés négativement comme des acides phosphoriques ou des acides uroniques qui présentent de fortes affinités pour les métaux (Mittelman and Geesey, 1985). L'adsoption des métaux par les EPS est un processus passif non métabolique qui ne coûte pas d'énergie à la cellule (Kim *et al.*, 1996). Par exemple, les EPS du biofilm, produits par la bactérie *Shewanella* sp. HRCR-1, contibuent à l'immobilisation de l'uranium (VI) par la mise en place de mécanismes de sorption et de réduction. Les polysaccharides des EPS sembleraient être responsables de la sorption et les composés redox actifs tels que les cytochromes de type-*c* de la membrane externe faciliteraient la réduction de l'uranium (VI).

Les résultats préliminaires ont montré que la souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 cultivée en milieu solide présentait un phénotype mucoïde et qu'en milieu liquide elle était fortement résistante au cuivre avec une CMI de 25 mM et pourrait, entre autre, mettre en place des mécanismes de biosorption. Nous avons donc cherché à comprendre si la production d'exopolymères pouvait protéger cette souche du cuivre par la caractérisation de leur capacité de biosorption de ce métal.

3.1.1. Production et extraction des EPS

Les extractions d'EPS ont été faites sur des cultures de *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 en milieu liquide de 200 mL et incubées pendant 6 jours afin d'optimiser la production d'EPS.

Les cultures bactériennes ont été soit supplémentées en cuivre (5 mM) ou en glucose (0,16 M) soit incubées en absence de cuivre et de glucose. La concentration choisie en métal était cinq fois inférieure à la CMI de cette souche et a donc permis d'observer la production

d'EPS dans des conditions de stress sans être à un niveau léthal. Les sucres du milieu extracellulaire sont utilisés par les bactéries comme source de carbone et donc comme précurseur pour la synthèse d'exopolymères. L'ajout de glucose à la concentration de 5 mM dans le milieu a donc été proposé pour favoriser la synthèse d'EPS par les bactéries (Nichols *et al.*, 2004; Raguénès *et al.*, 2004; Montersino *et al.*, 2008).

Après centifugation de la culture bactérienne et extraction des EPS du culot et du surnageant, les EPS fixées à la surface des micro-organismes étaient attendues dans les extraits des culots bactériens et les EPS libérées dans le milieu de culture dans l'extrait du surnageant.

Les biomasses bactériennes et les masses d'EPS extraites pour les trois conditions de culture sont indiquées dans le Tableau 15.

Pour la culture contrôle réalisée en absence de glucose et de cuivre, la biomasse récoltée était de 3 g et les masses d'EPS extraites dans le culot et le surnageant étaient respectivement de 28,6 $mg.g^{-1}$ et 5,2 $mg.g^{-1}$. Les bactéries marines sont connues pour être d'importantes source d'EPS (Bhaskar and Bhosle, 2005). La concentration totale d'EPS (1 $g.L^{-1}$) produites par la souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 était du même ordre de grandeur que celles rencontrées pour d'autres souches bactériennes marines (Vincent *et al.*, 1994; Raguénès *et al.*, 1997; Mancuso Nichols *et al.*, 2004; Bramhachari *et al.*, 2007)

Tableau 15 : Masses des EPS lyophilisées extraites du culot et du surnageant rapportées aux biomasses de *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53. Trois milieux de culture ont été testés : **A** MB en absence de glucose et de cuivre, **B** MB supplémenté en glucose 0,16 $mol.L^{-1}$, **C** MB supplémenté en cuivre 5 $mmol.L^{-1}$.

Culture	Glucose (0,16 $mol.L^{-1}$)	Cuivre (5 $mmol.L^{-1}$)	Biomasse (g)	Surnageant ($mg.g^{-1}$)	Culot ($mg.g^{-1}$)
A	-	-	3	28,6	5,2
B	+	-	1,6	14,7	3,4
C	-	+	2,2	24,8	1,1

La biomasse bactérienne des cultures en présence de glucose a été réduite de 47% par rapport à celle des cultures contrôles. La croissance de la souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 semble être inhibée par la présence de cette source supplémentaire de carbone, le glucose. Les masses d'EPS extraites des cultures en présence de glucose obtenues reflètent cette inhibition et, contrairement à ce qui est rapporté dans la littérature, sont inférieures à celles de la culture contrôle aussi bien pour le culot avec 3,4 $mg.g^{-1}$, que pour le surnageant avec 14,7 $mg.g^{-1}$.

En présence de cuivre, la biomasse bactérienne analysée à la fin des 6 jours de culture était de 2,2 g. Ceci montre que bien que la souche soit hautement tolérante au cuivre, ce métal affecte sa croissance, comme observé sur les courbes de croissance en absence et en présence de métal faites lors des mesures de CMIs (**chapitre 1**). La masse d'EPS extraites a été diminuée aussi bien pour le surnageant (24,8 $mg.g^{-1}$) que pour le culot (1,1 $mg.g^{-1}$). Par contre, si l'on rapporte la proportion d'EPS à la biomasse bactérienne, celle du surnageant semble équivalente au témoin alors que celle du culot a été divisée par cinq. Cette souche semble donc avoir maintenu sa production d'EPS libérées dans le milieu au dépend de celles associées au culot. Par ailleurs, il est intéressant de noter que les EPS extraites du surnageant et du culot avaient une couleur bleutée similaire à celle du cuivre en solution. Il semblerait donc que les EPS aient adsorbé du cuivre.

La souche bactérienne *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 maintiendrait sa production d'EPS lors d'une exposition à un stress métallique induit par l'introduction de cuivre dans le milieu de culture. Ces EPS pourraient donc être un des mécanismes de protection contre le cuivre mis en place par les bactéries.

3.1.2. Caractérisation des EPS

Après séparation des fractions protéiques et exopolysaccharidiques des EPS, leur composition en oses et protéines a pu être caractérisée par dosages colorimétriques. Les oses ont été dosés par la méthode phénol/acide sulfurique et les protéines par la méthode de l'acide bicinchoninique. Une fraction variable des EPS n'a pu être identifiée et pourrait correspondre à des oses non neutres, des lipides, des acides nucléiques ou d'autres molécules chimiques (Figure 33).

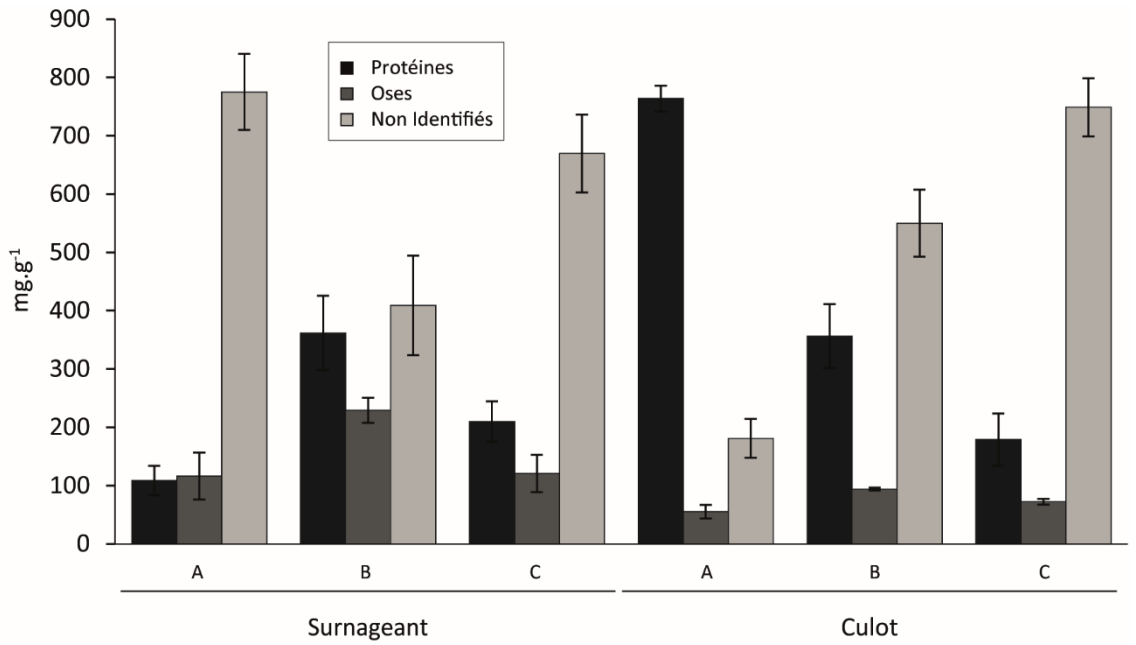


Figure 33 : Concentrations en oses, en protéines et en éléments non identifiés (en mg par g de biomasse) pour les culots et les surnageants des cultures bactériennes de *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53. (A) Souches cultivées en absence de glucose et de cuivre. (B) Souches cultivées en présence de glucose. (C) Souches cultivées en présence de cuivre.

Les niveaux de production d'EPS du surnageant sont similaires entre les souches cultivées en absence et en présence de cuivre. La proportion d'oses neutres, de protéines et de composés non identifiées semble aussi relativement similaire, à l'exception des protéines qui sont légérement plus représentées en présence de cuivre (Figure 33).

Pour le culot, la production d'EPS en présence de cuivre a été significativement altérée. Par ailleurs la quantité de protéines a été divisés par quatre en présence de cuivre au profit de composés non identifiés. La diminution de la masse des EPS du culot pourrait être expliquée par la diminution de la quantité de protéines. La présence de cuivre dans le milieu semblerait donc avoir un impact sur le métabolisme de la bactérie et modifier son expression protéique globale (Figure 33). Aucune étude sur l'impact des métaux sur la composition des EPS sécrétées par des bactéries n'a été trouvé dans la littérature.

Certaines protéines sont liées à la paroi des cellules par des cations divalents, comme le $Ca^{2+,}$ et pourraient donc avoir été décrochées par le cuivre et donc s'être retrouvées dans le surnageant.

En présence de glucose, la biomasse ainsi que la quantité d'EPS dans le surnageant et le culot ont significativement diminué. La proportion de protéines et d'oses neutres ont

significativement augmenté dans le surnageant mais celle de protéines a diminué dans le culot (Figure 33).

3.1.3. Identification de protéines des EPS associées au culot bactérien

La fraction protéique des EPS extraites du culot de la souche *Pseudovibrio* sp 2011SOCNI53 cultivé en absence de cuivre a été caractérisée plus précisèment en raison de la forte variation de la concentration en protéines en présence et en absence de cuivre.

Sur un gel SDS-PAGE de polyacrylamide à 12%, 14 bandes correspondant à des protéines de masse moléculaire entre 30 et 200 kDa ont pu être dénombrées. Les deux bandes majoritaires ont été excisées du gel et digérées sur gel par la trypsine et les peptides générés ont été analysés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) et par spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). L'interrogation des bases de données protéiques avec le logiciel Mascot a permis d'identifier ces deux protéines : une métalloprotéase dépendante du zinc et une protéine de liaison au substrat du transporteur ABC (Figure 34).

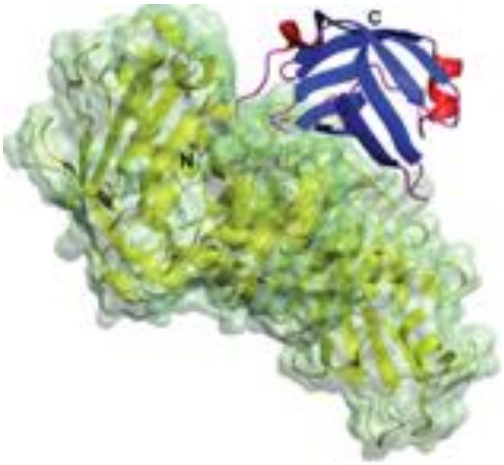


Figure 34 : Métalloprotéase de la souche bactérienne *Serratia marcescens*.

La métalloprotéase dépendante du zinc avait précédemment été décrite comme une protéine associée aux EPS secrétées par la souche *Bacillus subtilis* (Marvasi *et al.*, 2010). Cette métalloprotéase est connue pour dégrader les proteines présentes dans l'environnement en cas de stress et pour participer à la formation de biofilms (Bindel Connelly *et al.*, 2004). La métalloprotéase pourrait être induite en cas de stress métallique et dégrader les protéines

sécrétées par la bactérie (Wan *et al.*, 2008). Cette hypothèse pourrait en partie expliquer la diminution des protéines associées au culot en présence de cuivre.

Les transporteurs de type ABC ont déjà été identifiés à partir d'EPS de souches bactériennes comme *Bacillus cereus* (Karunakaran and Biggs, 2010) ou *Pseudomonas fluorescens* (Hinsa *et al.*, 2003) et caractérisés pour leur rôle dans les interactions bactériennes nécessaires à la formation de biofilms.

Les deux protéines majoritaires identifiées à partir des EPS associées au culot de la souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 ne sont pas connues pour être impliquées dans la séquestration du cuivre mais sont impliquées dans la formation de biofilms. Cette propriété est en accord avec la définition même des EPS qui représentent le constituant majeur de la matrice des biofilms et jouent un rôle important dans l'adhérance des micro-organismes entre eux et sur une surface biotique ou abiotique et la protection contre les environnements extrêmes comme la présence de métaux toxiques (Flemming *et al.*, 2007).

3.2. Quantification de la capacité de la souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 à détoxifier le cuivre

3.2.1. Mesure de l'accumulation du cuivre par la souche en culture

Pour cette étude, les mesures de l'accumulation du cuivre par la souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 ont été réalisée sur des cultures supplémentées avec du $CuCl_2$ à une concentration deux fois inférieure à la CMI de cette souche afin d'être en condition de stress mais non létale.

Les propriétés d'accumulation du cuivre ont été évaluées par la mesure de l'appauvrissement en métal dans les surnageants de culture et l'accumulation de métal dans les culots de cellules par spectrométrie par torche à plasma (ICP-MS) (Figure 35). Une détoxification du cuivre a bien été observée avec une réduction 53% des 10 mM de cuivre initialement présents dans le milieu de culture (Figure 35). La quantification du cuivre dans le surnageant a été réalisée avant et après filtration sur une cartouche d'ultrafiltration de porosité 100 kDa afin d'évaluer la contribution potentielle à l'adsorption des métaux des EPS de haut poids moléculaire, tels que les exopolysaccharides sécrétées par la bactérie. Les EPS adsorberaient près de 7% du cuivre présent dans le milieu de culture (Figure 35). Environ 50% du métal initialement ajouté au milieu de culture était sous forme libre dans le surnageant.

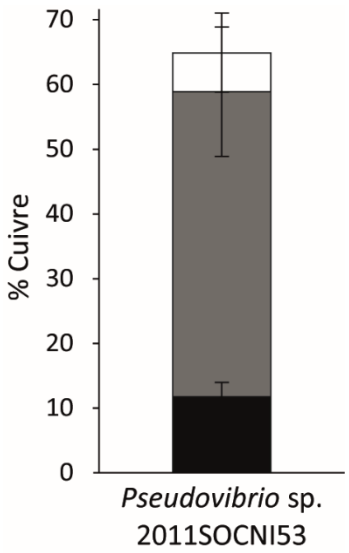


Figure 35 : Quantification par ICP-MS du contenu en métal, exprimé comme un pourcentage par rapport au métal initial du culot bactérien (zone noire), du surnageant de culture (zone grisée) et des EPS (zone blanche) après culture de la bactérie *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 en présence de 10 mM de $CuCl_2$.

La teneur en cuivre dans les culots bactériens était d'environ 80 $mg.g^{-1}$ (poids sec) de culot qui correspond à 10% du métal initial. La capacité de biosorption de la souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 est comprise dans la gamme de capacités rencontrées pour des souches bactériennes environnementales tolérantes au cuivre, telles que 23 $mg.g^{-1}$ pour *Pseudomonas aeruginosa* (Chang *et al.*, 1997), 30,1 $mg.g^{-1}$ pour *Pantoea* sp. TEM18 (Ozdemir *et al.*, 2004), 92 $mg.g^{-1}$ pour *Bacillus* sp. (Tunali *et al.*, 2006) et 700 $mg.g^{-1}$ pour *Thiobacillus ferooxidans* (Boyer *et al.*, 1998). Les parois cellulaires des biomasses microbiennes présentent de nombreux sites de fixations aux métaux comme les groupements carboxyles, hydroxyles, sulfates ou phosphates qui ont une forte affinité pour les métaux. Les métaux alors complexés à la paroi neutralisent de nombreux sites actifs de protéines nécessaires au bon fonctionnement cellulaire (Beveridge, 1989).

La somme des pourcentages de cuivre dans le surnageants et le culot n'est pas égale à 100% (Figure 35). Cette observation suggère qu'une partie du métal serait perdu lors des phases de lavage du traitement des échantillons.

La plus importante proportion du cuivre se trouve dans le surnageant après ultrafiltration. Ce résultat suggère que cette bactérie mettrait en place des systèmes non spécifique d'efflux du cuivre. Les proportions associées aux EPS et au culot suggèrent des mécanismes de tolérance complémentaires via une séquestration intra et extracellulaire.

3.2.2. Adsorption du cuivre par les EPS

Pour mettre en évidence la capacité de fixation du cuivre par les EPS du surnageant de *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53, une solution de 0,1% d'EPS a été incubée pendant 3h en présence de trois concentrations en cuivre, de 50, 500 et 800 $\mu g.mL^{-1}$. La solution a été ultrafiltrée afin d'éliminer les molécules de masse moléculaire supérieure à 30 kDa. Nous considérons donc que les exopolysaccharides ont été retenus par la membrane. Le cuivre a été ensuite dosé dans le filtrat par la dithizone.

Pour les concentrations allant de 50 et 500 $\mu g.mL^{-1}$, à peu près 30% du métal a été éliminé de la solution. Le cuivre a donc été fixé sur des molécules de masse moléculaire supérieure à 30 kDa. Pour la concentration initiale la plus élevée, les EPS semblaient atteindre leur limite d'adsoption. Seulement 6% du cuivre, équivalent à 58 $mg.g^{-1}$, ont été adsorbés. Cette capacité limite d'adsorption du cuivre a été retrouvée dans la littérature pour d'autres souches bactériennes marines productrices d'EPS illustrées par *Marinobacter* sp. *Halomonas* sp. et *Enterobacter cloaceae* (Iyer *et al.*, 2005; Bhaskar and Bhosle, 2006; Gutierrez *et al.*, 2012). Les valeurs obtenues sont assez faibles mais laissent apparaître que, jusqu'à un certain seuil, une petite proportion du métal serait prise en charge par les EPS lors d'une exposition des souches aux contaminants.

Avec cette méthode, les dosages n'ont pu être réalisés que sur une gamme très étroite de concentrations et sur des échantillons dilués, ce qui a introduit un biais dans les mesures. Ce sont des résultats préliminaires qui doivent donc être analysés avec recul. Ils donnent une idée de la capacité d'adsorption du métal par les EPS du surnageant de *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53.

3.2.3. Observations microscopique de la souche Pseudovibrio sp. 2011SOCNI53 sous des conditions de stress métallique

Afin de mieux caractériser les mécanismes mis en jeu dans la tolérance aux métaux, nous avons initié des observations par microscopie électronique à balayage couplée à une microanalyse élémentaire (EDX pour *Energy Dispersive X-ray Analysis*), avec l'aide précieuse d'Isabelle Domart-Coulon (Unité "Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes") et Jennifer Miot ("Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie").

Les éléments présentés ici sont des résultats préliminaires car de nombreux tests ont été nécessaires à la mise au point d'un protocole adapté aux observations microscopiques de la souche bactérienne marine *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 soumise ou non à un stress métallique. Les contraintes principales étaient liées d'une part à l'utilisation d'un milieu de culture salin et d'autre part à la présence de cuivre dans ce milieu de culture. Le détail de ces protocoles et des résultats obtenus sont résumés dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Récapitulatifs des différents modes opératoires utilisés pour observer la souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 en absence et en présence de cuivre en microscopie électronique à balayage couplée à une microanalyse élémentaire.

	Conditions de culture	**Tampon de fixation**	**Déshydratation (EtOH)**	**Dépôt**	**Point critique**	**Métallisation**	**Observations**
1	Culture liquide	Sørensen +/- Rouge de Ruthénium	+	Filtre Lamelle de verre	+	Carbone (30 secondes)	Co-localisation : Cuivre Matériel extracellulaire Phosphore
2	Culture liquide	Cacodylate +/- Rouge de Ruthénium	+	Lamelle de verre	+	Or (2 × 30 secondes)	Pas de métal détecté
3	Biofilm sur verre	Cacodylate +/- Rouge de Ruthénium	Détachement des bactéries	-	+ / -	Carbone (30 secondes)	Peu de bactéries Débris cellulaires
4	Culture liquide	-	-	Lamelle de verre	-	Carbone (30 secondes)	

L'utilisation du fixateur C et du fixateur R et leur tampon de lavage correspondant a mis en évidence dans les cultures de *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 une co-localisation du cuivre et du phosphore dans des particules à l'extérieur des cellules. Cette observation suggère la présence de phases minérales composées de phosphates qui pourraient être associées au EPS (Figure 36). Sur ces images, les bactéries apparaissent déformées aussi bien en présence de cuivre qu'en absence de cuivre. Cette observation pourrait résulter d'un problème d'osmolarité entre le milieu intérieur des bactéries et les tampons utilisés ou de la trop forte vitesse de centrifugation utilisée tout au long du protocole.

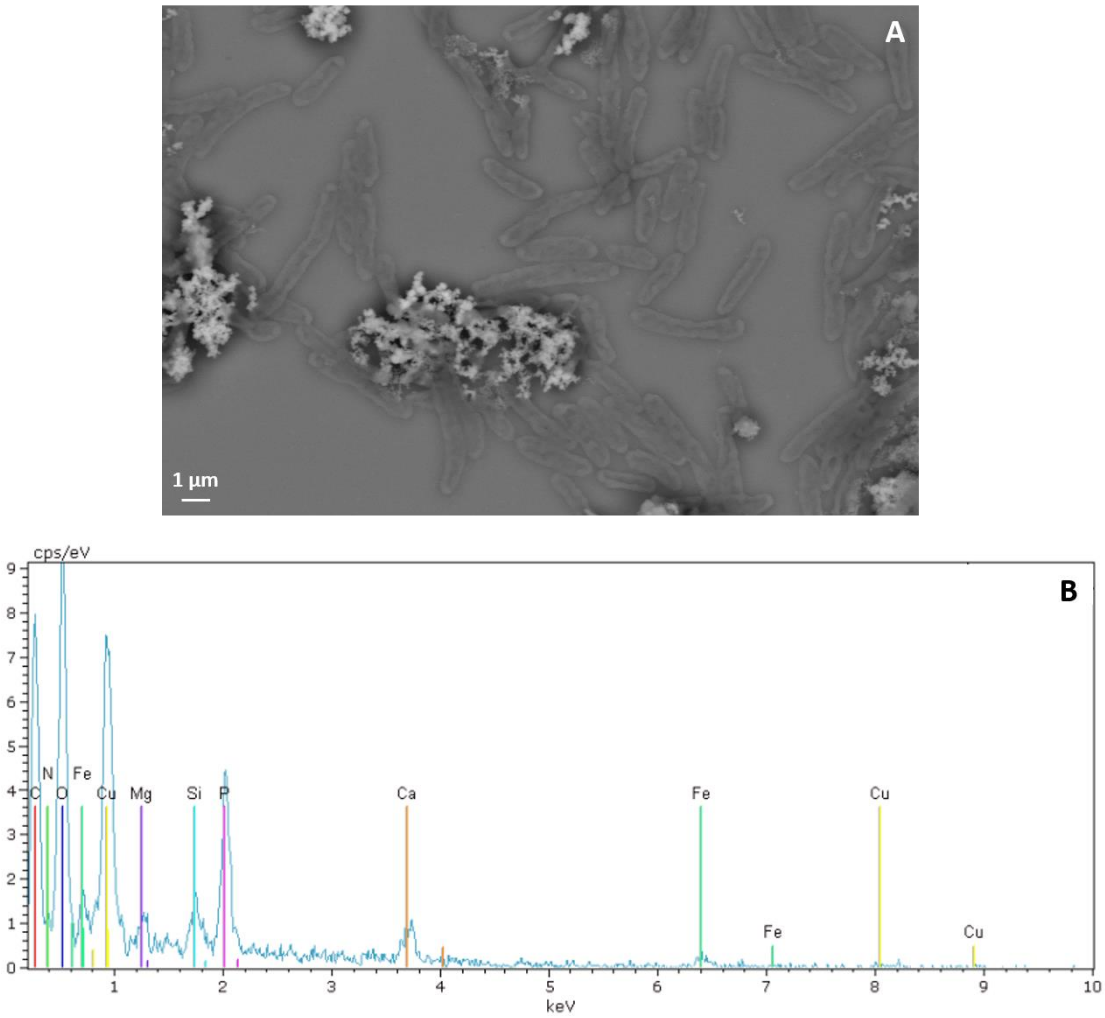


Figure 36 : Observation au microscope électronique à balayage couplée à une microanalyse élémentaire de la souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 cultivée en présence de 10 mM de $CuCl_2$ et fixée au tampon C. A Image de microscopie, **B** Profil EDX.

L'utilisation d'un tampon phosphate lors des étapes de fixation et de lavage pourrait être responsable de la précipitation du cuivre en raison de la forte affinité des groupements phosphates pour le cuivre. Nous avons donc choisi de tester un tampon sans phosphates, le cacodylate. Ce tampon a été utilisé à la fois pour la fixation des biofilms développés sur lamelle de verre et pour les culots bactériens. Pour les biofilms, les étapes de lavage ont conduit à un détachement des bactéries de la lamelle de verre malgré les précautions prises lors de cette étape. Les observations des culots bactériens ont montré l'absence de précipités autour des bactéries et l'absence de cuivre co-localisé ave les bactéries ou dans le milieu extracellulaire.

Nous nous sommes ensuite affranchis des étapes de fixation et de lavage des échantillons qui induisent une perte d'information sur les interactions qui se produisent dans

le milieu de culture et les informations observables lors de l'analyse en microscopie. Après lavage, les culots bactériens ont été dilués dans un tampon HEPES, sans phosphate, et déposés sur un filtre. Une attention particulière a été apportée à l'osmolarité de la solution employée et les vitesses de centrifugation ont été réduites de 8 000 à 1 100 g afin de préserver au maximum les structures cellulaires. Une co-localisation des bactéries et du cuivre a été observée (Figure 37). Ces images permettent d'avancer que les bactéries mettraient en place un mécanisme d'adsorption du cuivre. Mais, l'échantillon était trop concentré et la présence d'un tapis bactérien dense empêchait de voir si le cuivre est précipité sur la paroi bactérienne ou dans le milieu extracellulaire *via* des substances polymériques extracellulaires par exemple. Il serait donc intéressant de reproduire cette expérience avec une densité cellulaire plus faible.

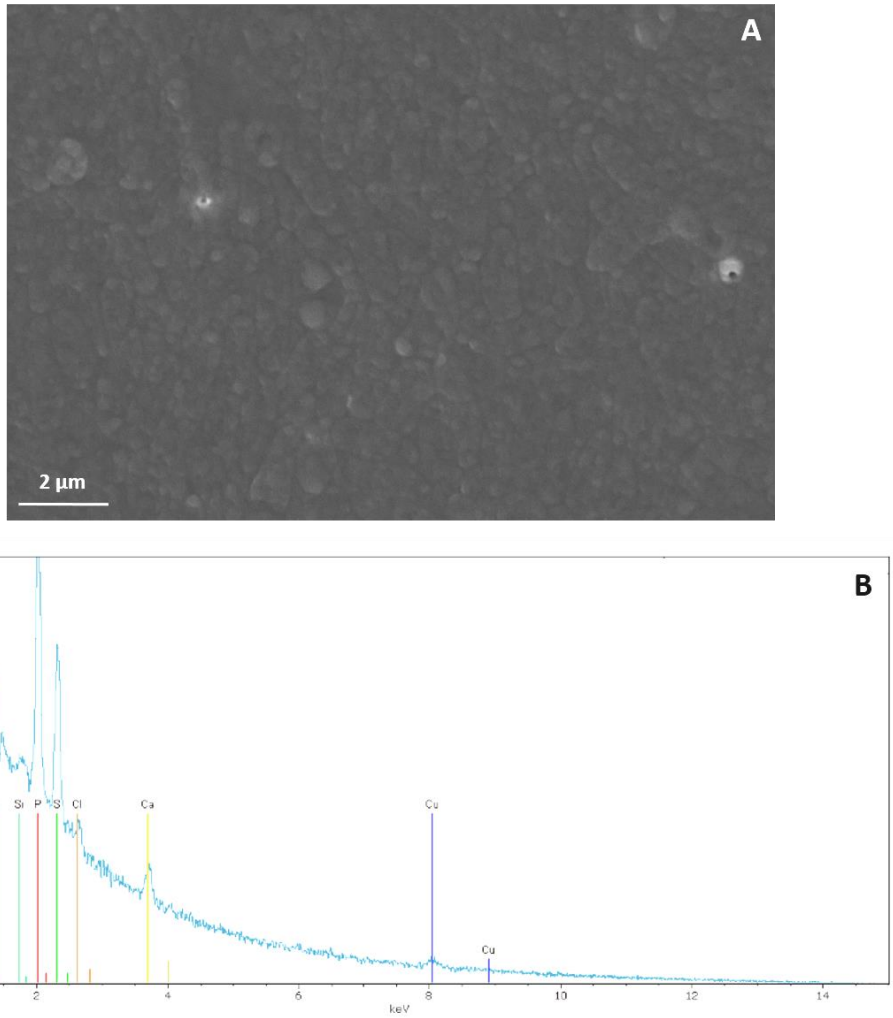


Figure 37 : Observation au microscope électronique à balayage couplée à une microanalyse élémentaire de la souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 cultivée en présence de 10 mM de $CuCl_2$ et non fixée. A Image de microscopie, **B** Profil EDX.

Pour compléter cette étude il serait intéressant d'observer des échantillons de *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 exposés au cuivre en microscopie électronique à transmission afin de voir si les métaux sont précipités dans le compartiment intracellulaire.

3.3. Séquençage du génome de *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53

Le génome de *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 a été séquencé par la technologie Ion Torrent afin de pouvoir caractériser les protéines impliquées dans les mécanismes de résistance au stress métallique.

En concertation avec le SSM, nous avons opté pour la technologie Ion Torrent qui était disponible au Muséum et adaptée au séquençage de petits génomes tels que les génomes bactériens. La technologie Ion Torrent permet d'obtenir des tailles de "reads" supérieures à 100 pb contre des "reads" de 36 à 151 pb pour la technologie d'Illumina (Meldrum *et al.*, 2011). Les données issues de la technologie Ion Torrent permettent une meilleure gestion des séquences répétées lors de la phase d'assemblage du génome.

Les objectifs de ce projet ont été d'une part de "mapper" le génome de *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 contre ceux des souches *Pseudovibrio* sp. FO-BEG1 et *Pseudovibrio* sp. JE062 et d'autre part d'assembler le génome de *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 afin de trouver les séquences des phases ouvertes de lecture (ORFs) utilisable pour l'identification des protéines d'intérêt par empreinte peptidique.

Pour cela, nous avons développé des outils bioinformatiques pour le traitement des données. Les données présentées ci-après sont les résultats du travail précieux d'Evelyne Duvernois-Berthet de la "Cellule de Soutien à la Bioinformatique" du département "Régulation, Développement et Diversité Moléculaire" du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris.

3.3.1.Séquençage du génome par la technologie Ion Torrent

A la fin du séquençage, approximativement 2,5 M de "reads" (Figure 38B) représentant 460 Mb (Figure 38A) ont été obtenus après traitement avec les filtres imposés par la technologie Ion Torrent. La taille médiane des "reads" était de 179 pb (Figure 38C).

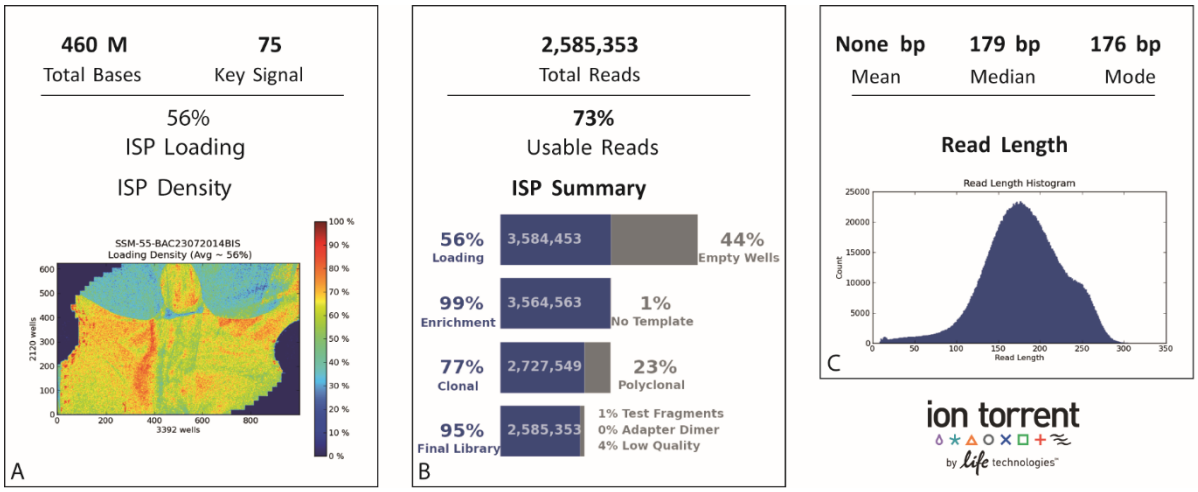


Figure 38 : Analyse automatique des résultats de séquençage de la souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53. A Densité des ISP sur la puce à ADN 316v2™. **B** Analyse des microbilles disposées dans les puits et la qualité de l'ADN séquencé. **C** Couverture des longueurs de "reads" séquencés.

3.3.2. "Mapping" contre des génomes proches connus

Une première approximation du génome de *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 a été réalisée par la plateforme du SSM en dressant la carte de ce génome par comparaison des données à celles de deux souches proches de l'espèce étudiée, *Pseudovibrio* sp. FO-BEG1 et JE062 (Bondarev *et al.*, 2013).

La plateforme du SSM a d'abord mappé les "reads" contre le génome de *Pseudovibrio* sp. FO-BEG1, qui a été publié en 2003. Ce génome contient deux séquences qui correspondent au chromosome et à un plasmide. Pour cette souche, deux programmes d'alignement des données ont été utilisés : "Torrent Mapping Alignment Program" (TMAP) (https://github.com/iontorrent/TMAP) qui est l'outil de cartographie développé par l'équipe d'IonTorrent pour ce type de données, et Geneious (Kearse *et al.*, 2012) (http://www.geneious.com/) dont l'algorithme d'assemblage GeneiousReadMapper est utilisé pour les génomes circulaires bactériens. Un "mapping" contre les 19 contigs du génome de *Pseudovibrio* sp. JE062 a ensuite été réalisé.

Pour les librairies obtenues avec l'algorithme GeneiousReadMapper, tous les "reads" ont d'abord été "mappés" contre le chromosome de la souche FO-BEG1. Puis, les "reads" restants ont de nouveau été "mappés" itérativement contre le chromosome de la souche FO-BEG1. Cinq itérations ont ainsi été réalisées, seulement deux ont été conservées. Enfin, les derniers "reads" ont été mappés contre le plasmide de la souche FO-BEG1.

3.3.3.Analyse de la qualité des données

L'outil FastQC (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/) a été utilisé pour analyser la qualité globale des "reads" générés par le séquençage. Les résultats obtenus indiquent que les données présentent un niveau d'erreur de seulement 10^{-4}.

3.3.4.Comparaison des librairies

La comparaison des différentes librairies a indiqué qu'il y avait un important pool commun de "reads" utilisés dans tous les "mappings" des données avec le TMAP contre les 19 contigs de *Pseudovibrio* sp. JE062 ou le chromosome ou le plasmide de *Pseudovibrio* sp. FO-BEG1 (Figure 39). Il y avait donc un ensemble "reads" commun à tous les "mappings". Cependant, à cause des différents filtres appliqués par l'algorithme, certains "reads" étaient spécifiques de certaines analyses. Les données "mappées" avec GeneiousReadMapper ne contiennent pas de "reads" non mappés. Elles ne sont pas présentées dans cette étude.

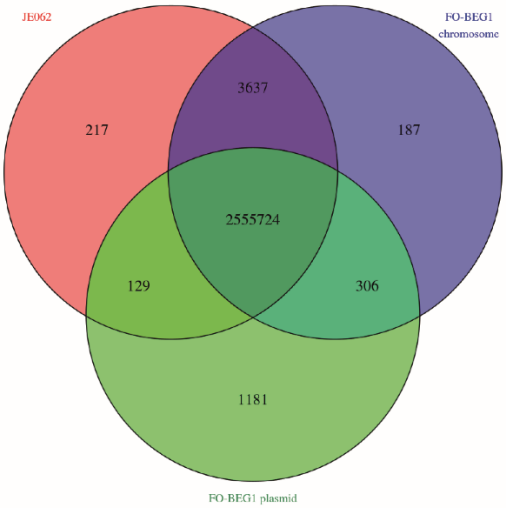


Figure 39 : Comparaison des "reads" utilisés pour le "mapping" TMAP contre le chromosome ou le plasmide de *Pseudovibrio* sp. FO-BEG1 et les 19 contigs de *Pseudovibrio* sp. JE062.

Le recouvrement entre les "mappings" réalisés avec GeneiousReadMapper ou TMAP était assez bon. Par ailleurs, chaque méthode a apporté de nouveaux "reads" mappés et donc de nouveaux ORFs potentiels (Figure 40, Figure 41). Sur les 2 231 619 "reads" mappés contre le chromosome de *Pseudovibrio* sp. FO-BEG1, 1 865 082, c'est-à-dire environ 84%, ont été "mappés" par toutes les méthodologies employées. Comme attendu, en raison de la stratégie mise en œuvre, il n'y avait pas de "reads" communément "mappés" avec les deux itérations de

GeneiousReadMapper. Ceci confirmait que les "reads" des deux itérations pouvaient être poolés en une unique banque.

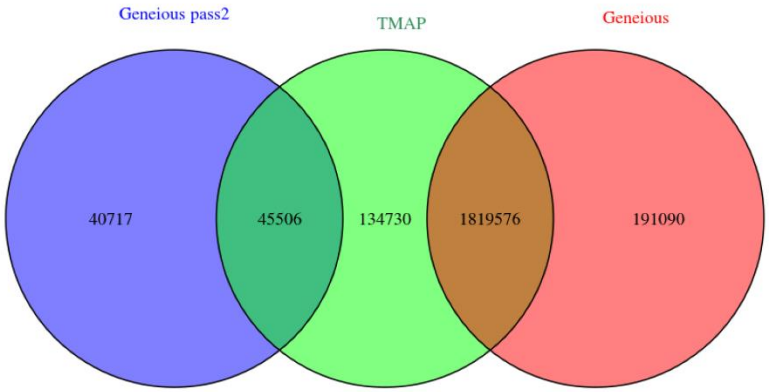


Figure 40 : Comparaison des deux itérations effectuées avec GeneiousReadMapper sur les "reads" utilisés pour le "mapping" contre le chromosome de *Pseudovibrio* sp. FO-BEG1.

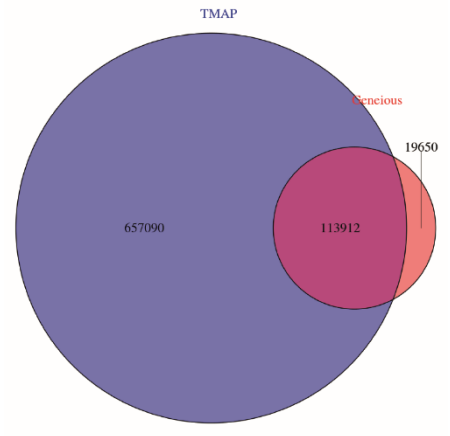


Figure 41 : Comparaison des deux méthodes GeniousReadMapper et TMAP sur les "reads" utilisés pour le "mapping" contre le plasmide de *Pseudovibrio* sp. FO-BEG1.

3.3.5. Création d'une séquence concensus

Une séquence consensus est une séquence qui rend compte des bases les plus fréquemment rencontrées pour chaque position lorsque des séries de séquences présumées similaires sont comparées.

Pour créer une séquence consensus de *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53, le génome de *Pseudovibrio* sp. FO-BEG1, au format FASTA, a été téléchargé de la banque de données NCBI le 28 juillet 2014 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/374328350?report=fasta). Ce génome est composé d'une séquence chromosomique (5,5 Mpb) et d'une séquence plasmidique (0,4 Mpb).

La séquence consensus a été créée en utilisant un pipeline d'analyse, DETECT_ORFs, développé spécifiquement pour cette analyse. La longueur initiale des séquences consensus était similaire à celle des séquences de référence utilisées, c'est-à-dire approximativement 5,5 Mb pour le chromosome de FO-BEG1 et 0,4 Mb pour le plasmide.

La séquence consensus obtenue n'était pas complètement informative et contenait des blocs "N" qui correspondaient à des régions sans couverture. La Figure 42 présente l'un de ces blocs "N" de la région 2381-3150 de la séquence consensus obtenue après le "mapping" des "reads" de *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 contre le chromosome FO-BEG1 avec GeneiousReadMapper.

```
>NC_016642:2381..3150
  1 gggtttgagcacggtggagttccgcaccgcgttccgtgaccgttccggatccatgCttTT
 61 CAAGCGcagagcccgctccggagaaaccacgcGtttggcaatctcatcttcattacaaag
121 cagtctgaccggcaaaaaccgggcctttctccgctgagctgtttcccgaatggcctnnnn
181 nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn
241 nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn
301 nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn
361 nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn
421 nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn
481 nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnncactcccaacctttctg
541 acgcttcTGCATCAAGATCACGAAAAACCAAAGATAAATACCAGTCTCCAACGCACGTTG
601 CATGAGGCCACTGAAAACGGTTTCAAGcatcAGACTGAAGAGCAATGCGAATAAaaccaa
661 tcctggaacaaaCCagtaagaccgccttcttGtgcgcgggCAAACAAACACAATCCGAC
721 AACAGCGCAGAAATAGGCaaataGGCCAGCAGCCGTATGTATGAGTTGGC
```

Figure 42 : Bloc "N" de la région 2381-3150 de la séquence consensus du génome de *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 après le "mapping" contre chromosome de la souche FO-BEG1 avec GeneiousReadMapper. n : positions inconnues dans la séquence.

La couverture horizontale, qui indique la longueur réelle de la séquence consensus, a été calculée après l'élimination de tous les blocs "N" et en ne prenant en compte que les "nucléotides informatifs". La couverture horizontale calculée était approximativement de 88% pour le "mapping" contre le chromosome FO-BEG1 aussi bien avec l'algorithme GeneiousReadMapper que TMAP. Pour le "mapping" contre le plasmide FO-BEG1, elle était de 77% avec l'algorithme GeneiousReadMapper et 99% avec TMAP.

Les séquences consensus obtenue après le "mapping" ont ensuite été nettoyées pour éliminer les blocs "N" de plus de 10 "reads". Cette étape a permis d'enlever les régions qui ne figuraient pas sur le génome de *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53, par comparaison à celui de la souche FO-BEG1.

Un alignement multiple de type "Pairwise alignment" a été réalisé avec l'outil Mugsy v1r2.3 (Angiuoli and Salzberg, 2011) afin de comparer les différentes séquences consensus obtenues après les "mappings" générées par les différents algorithmes. Une importante similitude entre les séquences a ainsi été mise en évidence. Le Tableau 17 représente les résultats du calcul de couverture des séquences consensus. La couverture représente le nombre moyen de nucléotides de la séquence analysée qui sont à la même position que les nucléotides de la séquence de référence, même s'ils sont différents. Ce résultat est simplement informatif. Le niveau de couverture très faible avec la séquence consensus obtenue dans la seconde passe de GeneiousReadMapper peut être expliqué soit par une grande différence de longueur par rapport aux autres séquences, soit parce que des régions spécifiques de cette séquence ont été détectées.

Tableau 17 : Recouvrement des séquences consensus obtenues à partir des données générées du "mapping" du chromosome et du plasmide de FO-BEG1 par les algorithmes TMAP et GeneiousReadMapper.

***Pseudovibrio* sp. de référence**	***Pseudovibrio* sp. comparé**	**Couverture**
Chromosome FO-BEG1 *GeneiousReadMapper*	Chromosome FO-BEG1 *TMAP*	85%
Chromosome FO-BEG1 *TMAP*	Chromosome FO-BEG1 *GeneiousReadMapper*	81%
Plasmide FO-BEG1 *GeneiousReadMapper*	Plasmide FO-BEG1 *TMAP*	82%
Plasmide FO-BEG1 *TMAP*	Plasmide FO-BEG1 *GeneiousReadMapper*	69%

Après le nettoyage des blocs "N", les séquences consensus ont été fragmentées pour chaque bloc "N" d'une longueur supérieure à 5. Cette étape a permis de créer des pseudo-contigs à partir de la séquence consensus à partir desquels les ORFs ont été recherchés. Le nombre de contigs obtenus à partir des séquences consensus du chromosome FO-BEG1 (GeneiousReadMapper), du chromosome FO-BEG1 (TMAP), du plasmide FO-BEG1 (GeneiousReadMapper) et du plasmide FO-BEG1 (TMAP) étaient respectivement de 100, 657, 39 et 13947.

L'analyse des séquences consensus a conduit à la prédiction de 4129 ORFs. Les séquences de chacun des ORFs ont été sauvegardées.

Le même travail a été réalisé avec les résultats obtenus à partir du mapping contre le génome de *Pseudovibrio* sp. JE062.

3.3.6.Assemblage du génome de Pseudovibrio sp. 2011SOCNI53

Les analyses précédentes ont indiqué que certaines séquences étaient spécifiques au génome de *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 et n'apparaissaient donc pas dans le "mapping". L'assemblage du génome était donc nécessaire afin de visualiser ces spécificités. Pour ce faire, tous les "reads" qui ont servi au "mapping" de ce génome sur celui de FO-BEG1 (chromosome et plasmide) ont été utilisés. La librairie qui a été utilisée comportait donc 2 561 168 "reads". Deux logiciels, "St. Petersburg génome assembler" (SPAdes) (http://bioinf.spbau.ru/spades) (Bankevich *et al.*, 2012) et "Mimicking Intelligent Read Assembly" (MIRA) (http://mira-assembler.sourceforge.net) (Chevreux *et al.*, 2004), ont été testés afin de réaliser un assemblage générique des "reads" avec un compromis intéressant entre le temps de calcul et le rendement des résultats.

Des deux méthodes, le programme SPAdes a fourni le meilleur assemblage pour cette étude. Pourtant 25% de contigs en moins ont été produits avec ce programme pour un total de 5,7 Mb par rapport à 5,8 Mb obtenu par le logiciel MIRA. Le plus grand contig obtenu par le logiciel SPAdes est 500 pb plus courte que par le logiciel MIRA. Mais la longueur cumulative des contigs, après laquelle 50% ou plus du génome est couverte, est un tiers plus longue avec le logiciel SPAdes. En outre, le logiciel SPAdes n'intègre pas les "N" dans les contigs. Les ORF obtenus avec le logiciel SPAdes ont alors été traduits en protéines.

Le séquençage par IonTorrent *de novo* et l'analyse bioinformatique du génome de *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 a permis de détecter les ORFs pour identifier les peptides spécifiques de cette souche et ainsi de créer une banque d'ORFs utilisable pour l'identification des protéines d'intérêt par empreinte peptidique.

Ces données permettront de compléter l'identification des protéines mises en évidence par la méthode d'électrophorèse bidimensionnelle, pour être impliquées dans la tolérance au cuivre et ainsi de mieux comprendre le mécanisme de résistance à ce métal. L'identification de ces protéines est en cours.

Ce projet sera complété par l'analyse comparative de deux autres souches présentant des profils de résistance aux métaux différents. A terme, ce projet devrait permettre d'identifier des mécanismes de tolérance aux métaux au sein du genre *Pseudovibrio* et d'appréhender les différences de tolérance aux métaux entre souches.

3.4. Étude protéique de la réponse de *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 à un stress métallique

La protéomique comparative consiste à analyser un extrait protéique obtenu dans deux conditions différentes afin d'analyser l'expression différentielle des protéines dans chacune de ces conditions. Les protéines impliquées dans un processus physiologique donné peuvent alors être identifiées.

L'approche classique consiste à coupler la séparation des protéines d'un échantillon biologique complexe par électrophorèse bidimensionnelle et la caractérisation des protéines ainsi observées par spectrométrie de masse (O'Farrell, 1975) (Figure 43). Si cette technique a largement été utilisée dans les études de protéomique, elle a aussi montré ses limites en termes de spectre d'analyse, excluant, par exemple, les protéines minoritaires et membranaires (Santoni *et al.*, 2000).

A l'inverse, l'approche "shotgun" sur des protéines en mélange complexe consiste à analyser en spectrométrie de masse les peptides obtenus après digestion d'un extrait protéique, c'est-à-dire sans étape de séparation sur gel (Fournier *et al.*, 2007) (Figure 43).

Nous avons développé une approche de protéomique afin de mettre en évidence les mécanismes de résistance au cuivre de la souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53. Au début de cette étude, le génome de la souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 n'avait pas été encore séquencé, rendant difficile l'identification des protéines d'intérêt par protéomique "shot-gun". Nous nous sommes donc orientés dans un premier temps vers une approche de protéomique comparative classique.

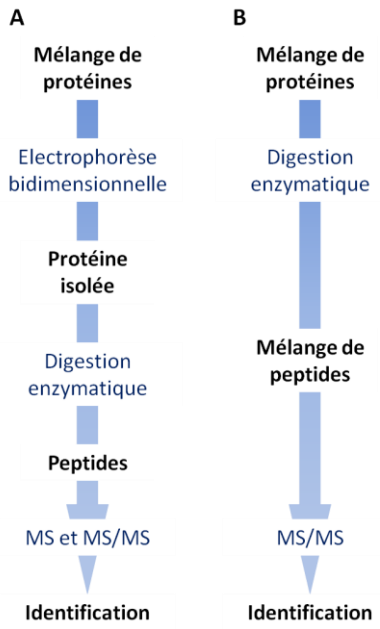


Figure 43 : Comparaison des différentes approches utilisées en protéomique comparative. A Approche dite classique, **B** Approche shotgun.

Le protéome de la souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 en présence ou en absence de cuivre a été analysé dans des conditions de solubilisation définies pour extraire à la fois les protéines cytosoliques et les protéines membranaires (Molloy *et al.*, 1998). Des empreintes protéiques de ces extraits ont ensuite été réalisées par électrophorèse bidimensionnelle afin de mettre en évidence les protéines impliquées dans la réponse physiologique à une exposition au cuivre.

Une première observation triviale des gels a révélé des profils de migration différents entre les échantillons traités ou non au cuivre (Figure 44). Les échantillons traités au cuivre avaient des profils dont la migration en seconde dimension était ralentie, pour les trois réplicats. En effet, il a été observé qu'une même protéine migrait moins sur les profils des extraits obtenus en présence qu'en absence de cuivre. L'hypothèse qui expliquerait cette observation serait que le cuivre limiterait la fixation du SDS sur les protéines. La charge négative apporté par le SDS en serait donc modifier et la migration des protéines sur le gel ralentie. Cette observation est retrouvée dans la littérature pour l'analyse du protéome de *Mytilus edulis* exposé au cuivre (Shepard *et al.*, 2000).

Par ailleurs, le protocole utilisé a permis de détecter environ 600 spots sur chaque gel dont 27 ont montré une expression significativement différente ($p < 0,05$ d'après le test de Wilcoxon) entre les différentes conditions. Parmi les 27 protéines mises en évidence, 14

protéines étaient sur-régulées et 13 sous-régulées en présence de cuivre. Ces spots ont été sélectionnés afin d'identifier les protéines correspondantes par spectrométrie de masse en tandem. L'analyse comparative des empreintes a donc mis en évidence une modification de l'expression protéique des souches cultivées en présence de cuivre par rapport à la condition contrôle.

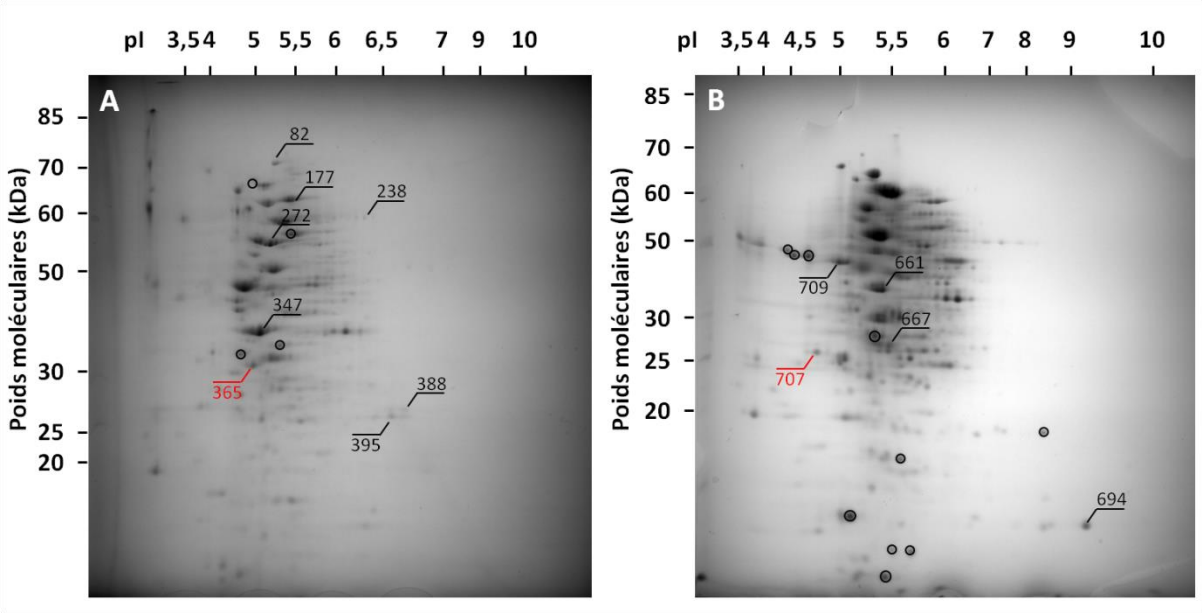


Figure 44 : Gel d'électrophorèse bidimensionnelle des protéines extraites de *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53. A Souche cultivée en absence de $CuCl_2$. **B** Souche cultivée en présence de 10 mM de $CuCl_2$. Les protéines différentiellement exprimés qui ont été identifiées en comparaison des bases de données de NCBInr sont indiqués par un numéro noir, celles en comparaison de la base de données créée sur la base du séquençage du génome de *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 par un numéro rouge. Les protéines différentiellement exprimées qui n'ont pas été identifiés sont cerclés de noir.

Les protéines sélectionnées ont été analysées en LC-MS/MS. Les données obtenues ont d'abord été comparées à la base de données NCBInr en utilisant la taxonomie bactérienne, *via* le moteur de recherche Mascot 2.4.01. Ces recherches ont permis d'identifier onze protéines (indiquées par des numéros noirs sur la Figure 44) dont sept étaient sous-régulées et quatre sur-régulées en présence de cuivre. Sur les onze protéines, dix ont été affiliées à des protéines exprimées chez des souches de *Pseudovibrio* sp.. Ces protéines sont listées dans le Tableau 18.

Les données peptidiques encore non identifiées ont été comparées à la base de données créée après le séquençage du génome de la souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53. Deux nouvelles protéines ont ainsi pu être identifiées dont une sur-régulée et l'autre sous-régulée

(indiquées par des numéros rouges sur la Figure 44). Ces protéines sont listées dans le Tableau 19.

Les masses moléculaires théoriques des protéines identifiées différaient de celles calculées sur le gel. En effet, les gènes prédisent les séquences entières, mais les protéines peuvent être clivées ou subir diverses modifications post-traductionnelles.

Les protéines identifiées ont pu être classées en trois catégories distinctes qui sont le transport, le métabolisme primaire et l'adaptation au stress.

Une protéine périplasmique de liaison aux sucres, qui permet le transfert de ceux-ci à un transporteur ABC (spot 709) est sur-régulée en présence de cuivre. La surexpression de cette protéine pourrait permettre d'augmenter le métabolisme énergétique afin de survivre au stress métallique. *A contrario*, certaines protéines périplasmiques impliquées dans l'import de composés étaient sous-régulées dans notre étude. Chez les bactéries à Gram négatif, comme *Pseudovibrio* sp., ces protéines ont pour rôle de transférer sélectivement dans le périplasme des composés d'un système de transport de la membrane externe vers une protéine de transport actif de la membrane interne de type transporteur ABC. Une sous-expression a été observée pour :

(1) la protéine périplasmique liant les oligopeptides (spot 177), constituant de l'oligopeptide perméase, un système d'import des peptides,

(2) la protéine périplasmique de liaison au glutathion (spot 238), qui permet l'import du glutathion, un tripeptide impliqué dans le maintien du potentiel redox de la cellule,

(3) la protéine périplasmique de liaison au phosphate (spot 347), impliquée dans l'import du phosphate.

(4) la protéine périplasmique de transport des C4-dicarboxylates (spot 365) est sous-régulée en présence de cuivre dans le milieu. Les C4-dicarboxylates, représentés par le succinate, le fumarate, le malate et l'aspartate, sont métabolisés par des bactéries dans des conditions aérobies ou anaérobies. Dans le métabolisme aérobie, ils sont incorporés dans les cellules *via* des systèmes de transport et servent de source de carbone et d'énergie et sont oxydés en CO_2 dans le cycle de l'acide citrique (Janausch *et al.*, 2002). Chez *Bacillus subtilis*, les cations bivalents, spécialement Mg^{2+} et Co^{2+}, sont connus pour diminuer le transport des C4-dicarboxylates (Kay and Ghei, 1981). Cette protéine a par ailleurs été décrite comme

sous-régulée chez la bactérie *Fusobacterium nucleatum* exposée à un stress induit par la modification du pH du milieu (Zilm, 2008).

Cette sous-expression pourrait être un moyen pour la bactérie de limiter l'import de composés associés au cuivre.

La surreprésentation de protéines périplasmiques peut-être expliquée par leur forte abondance chez les bactéries chez les bactéries à Gram négatif.

D'autre part, certaines protéines impliquées dans le métabolisme énergétique étaient sur-régulées comme :

(1) le facteur d'élongation thermostable Ts (spot 661), qui donne la capacité aux bactéries de réguler rapidement, réversiblement et en consommant peu d'énergie la biosynthèse de protéines

(2) la protéine triose phosphate isomérase (spot 667), qui est une enzyme de la voie glycolytique, impliquée dans le métabolisme énergétique des bactéries (Meyerhof and Beck, 1944).

La surexpression de ces protéines permettrait d'accroître le stock énergétique de la bactérie et ainsi de maintenir son métabolisme primaire en conditions de stress. Une surexpression de cette protéine a déjà été montrée en présence de cobalt, indiquant son rôle dans la résistance au stress métallique (Sharma *et al.*, 2006).

Tableau 18 : Liste de protéines bactériennes isolées chez la souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 cultivée en absence et en présence de cuivre. (*) Protéines régulées significativement différentiellement entre les conditions (test de Wilcoxon, $p < 0,05$).

	Spot	Protéine identifiée (Souche)	Nb. Acces.	Score Mascot	Nb pept	Recov (%)	MM thr.	pI thr.	*p*-value	Fonction
Sous-régulation	82	Phosphatase alcaline (*Pseudovibrio* sp. FO-BEG1)	gi495827930	108	4	5	79	4,84	0,0463*	Catalyse de l'hydrolyse d'une liaison ester monophosphate
	177	Prot. périplasmique de liaison aux oligopeptides (*Pseudovibrio* sp. FO-BEG1)	gi374330339	101	3	5	61	4,92	0,1266	transport des peptides
	238	Prot. De liaison de glutathion GsiB (*Pseudovibrio* sp. FO-BEG1)	gi374330400	98	2	3	58	5,5	0,0463*	Liaison au glutathion qui lient les métaux, régulation post-traductionnelle des protéines et protection contre le stress oxydatif
	272	Prot. Périplasmique de transport de dipeptides (*Pseudovibrio* sp. FO-BEG1)	gi374333775	104	3	3	56	4,96	0,0495*	Transport de dipeptides
	347	Prot. Périplamique de liaison au phosphate (*Pseudovibrio* sp. FO-BEG1	gi374330038	110	5	20	38	4,95	0,0495*	Transport de phosphates
	388	LuxR_C_like (*Pseudovibrio* sp. FO-BEG1)	gi374330766	273	7	39	25	6,45	0,0495*	Prot. Membranaire, régulation de l'expression des gènes en réponse à la fluctuation de la densité de la population cellulaire
	395	Peptidase M23 (*Pseudovibrio* sp. JE062)	gi495824517	103	4	19	25	6,7	0,0495*	Endopeptidase qui clive les peptidoglycanes de la paroi
Sur-régulation	661	Facteur d'élongation Ts (*Pseudovibrio* sp. FO-BEG1)	gi374331754	144	3	12	32	4,81	0,2463	Biosynthèse de protéines
	667	Prot. triose phosphate isomérase (*Pseudovibrio* sp. FO-BEG1)	gi374331727	49	2	11	26	5,03	0,0463*	Enzyme clé de la voie glycolytique
	694	Glutamate méthyl-estérase (*Vibrio vulnificus* CMCP6)	CHEB1_VIBVU	48	2	9	41	9,23	0,2463	Chimiotaxie bactérienne,
	709	Prot. Périplasmique de liaison aux sucres (*Pseudovibrio* sp. FO-BEG1)	gi374331162	140	3	10	43	4,73	0,7963	Transport du sucre qui sera métabolisé par les bactéries

Tableau 19 : Liste de protéines bactériennes isolées chez la souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 cultivée en absence et en présence de cuivre et identifiée à partir de la base de données de protéines générée suite au séquençage du génome de *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53. (*) Protéines régulées significativement différentiellement entre les conditions (test de Wilcoxon, $p < 0,05$).

	Spot	Protéine identifiée (Souche)	Nb. Acces.	N° ORF (Assembl.)	Score Mascot	Nb pept	Recov (%)	MM thr.	pI thr.	*p*-value	Fonction
Sous-régulation	365	Protéine périplasmique de transport C4-dicarboxylates (*Pseudovibrio* sp. JE062)	gi495826634	orf00207 (Sprades)	63	3	13	36	4,76	0,0495*	Transport C4-dicarboxylate
Sur-régulation	707	Flagelline (*Pseudovibrio* sp. JE062)	gi495827303	orf00002 (Mira1)	72	2	7	36	4,21	0,0463*	Mobilité

Certaines protéines d'adaptation au stress sont sur-régulées en présence de cuivre, comme :

(1) la glutamate méthyl-estérase qui régule la réponse à la chimiotaxie (spot 694). C'est une enzyme qui permet aux bactéries la détection, la réponse et l'adaptation à des environnements variés, aux facteurs de stress et aux conditions de croissance (Simms *et al.*, 1985).

(2) la flagelline (spot 365) correspond à la protéine de structure du filament de l'organe de motilité bactérienne. Chez *E. coli*, la présence de faibles concentrations en métaux dans l'environnement induit la transcription du gène *fliC* qui code pour la flagelline et joue ainsi un rôle dans l'activation de la motilité bactérienne (Guzzo *et al.*, 1991).

Enfin, la sous-expression d'autres protéines a été mise en évidence :

(1) la phosphatase alcaline (spot 82) est une enzyme qui permet de catalyser l'hydrolyse d'une liaison ester monophosphate pour donner un ion phosphate et un groupement hydroxyle libre. Sa sous-expression pourrait permettre d'éviter la précipitation de phosphate de cuivre dans la cellule.

(2) la peptidase M23 (spot 395) est une endopeptidase qui permet la dégradation des peptidoglycanes de la paroi cellulaire (Sudiarta *et al.*, 2010).

(3) la protéine LuxR_C_like (spot 388) qui est associée à la membrane cytoplasmique, participe au quorum sensing en régulant l'expression des gènes en réponse à une fluctuation de la densité de la population cellulaire (Kolibachuk and Greenberg, 1993).

Les variations du protéome de *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 en fonction de la présence ou de l'absence de cuivre ont été déterminées. La moitié des protéines identifiées

seraient impliquées dans le transport de solutés et le reste des protéines joueraient un rôle dans le métabolisme. Il semblerait que globalement différents systèmes de transport de la bactérie soient sous-régulés en présence de cuivre, ce qui permettrait de limiter indirectement l'import non spécifique de cuivre dans la cellule. De plus, une sur-régulation du transporteur de glucose permettrait de maintenir le métabolisme de la cellule, malgré le stress occasionné par l'excès de cuivre. D'autres protéines ont un rôle métabolique permettant la survie de la bactérie en milieu fortement exposé au cuivre, comme celui de maintenir la biosynthèse des protéines (facteur d'élongation thermostable Ts), de fabriquer de l'énergie à la cellule (triose-phosphate isomérase) et de permettre une adaptation des bactéries au milieu (protéine glutamate méthyl-estérase de régulation de la réponse à la chimiotaxie, flagelline).

Le nombre de protéines dont le niveau d'expression est modulé en fonction des conditions expérimentales analysées est faible et correspond à environ 1,7% de l'ensemble des spots détectés.

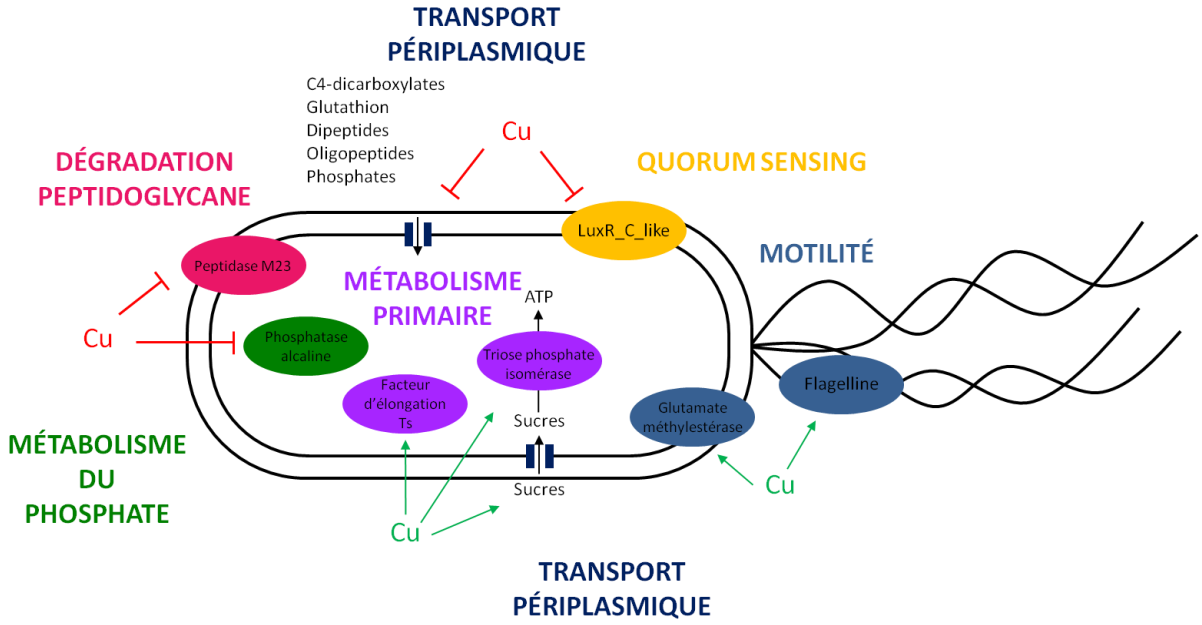


Figure 45 : Bilan des protéines identifiées chez la souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 et régulées en réponse à un stress métallique. Les symboles d'interdiction rouges représentent la sous-régulation induite par l'excès de cuivre et les flèches vertes la sur-régulation.

Cette étude n'a pas permis de caractériser des protéines qui présentent un effet direct sur le cuivre, mais principalement des protéines qui favorisent la survie en conditions de stress métallique, en favorisant le métabolisme énergétique, en limitant l'import et/ou la précipitation du cuivre à l'intérieur de la bactérie et en augmentant la motilité (Figure 45).

Quatorze protéines dont le niveau de production est modifié en présence de cuivre n'ont pu être identifiées, car les peptides détectés ne coïncident pas avec des peptides présents dans les bases de données. Une étude protéomique « shot-gun » est prévue pour compléter l'approche classique.

4. Conclusion

De nombreuses souches bactériennes du genre *Pseudovibrio* sp. ont été isolées de *S. officinalis*, une éponge accumulatrice de métaux et étudiées pour leur tolérance aux métaux, et en particulier la souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 pour le cuivre. Ces bactéries sont des épibiontes de l'éponge présentes en faible abondance au niveau de l'enveloppe dermale et le long des lacunes sous-dermales (Bauvais *et al.*, 2015). Ainsi, par leur localisation dans l'éponge, ces bactéries évoluent dans un milieu fortement concentré en métaux. Les souches de *Pseudovibrio* sp. sont fréquemment rencontrées dans les habitats marins principalement associés à des organismes benthiques filtreurs (Hentschel *et al.*, 2001; Shieh *et al.*, 2004; Fukunaga *et al.*, 2006).

Le genre bactérien *Pseudovibrio* a été étudié pour la première fois pour sa résistance aux métaux et utilisé comme modèle pour caractériser la réponse bactérienne à un stress métallique.

L'étude menée dans ce chapitre initie la compréhension de la tolérance au cuivre de la souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 par diverses approches.

Les EPS sécrétées par la souche en absence et en présence de cuivre ont tout d'abord été analysées. Nous avons observé que la présence de cuivre dans le milieu n'affectait pas la production des EPS mais modifiait leur composition avec une importante diminution du contenu protéique des EPS associées au culot bactérien. Cette observation pourrait être expliquée par l'impact du cuivre sur le métabolisme global de la souche qui modifierait sa synthèse protéique de façon quantitative. De plus, la souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 s'est révélée capable de séquestrer le cuivre dans les compartiments intra- (10%) et extra-cellulaires *via* l'adsorption par les EPS (7%) ou l'efflux mis en évidence par la présence importante de cuivre libre dans le surnageant (50%). Il semblerait que les EPS n'interviendraient donc que de façon minime dans l'adsorption du cuivre.

Des observations préliminaires en MEB-EDX ont permis de confirmer cette séquestration métallique. Des analyses microscopiques complémentaires (MEB-EDX, MET-

EDX) permettraient d'approfondir cette première observation et de caractériser avec plus de précision les compartiments cellulaires impliqués dans la séquestration métallique.

Une étude de protéomique comparative, par électrophorèse bidimensionnelle, a été mise en place afin de mettre en évidence les protéines impliquées dans la réponse bactérienne à un stress métallique. Le nombre de protéines dont le niveau d'expression est modulé en fonction des conditions expérimentales analysées correspond à environ 1,7% de l'ensemble des protéines détectées par cette méthode. La moitié des protéines identifiées seraient impliquées dans le transport de solutés, certaines protéines joueraient un rôle dans le métabolisme et d'autres dans l'adaptation au stress. Il semblerait que ces modifications permettraient de limiter indirectement l'import non spécifique de cuivre dans la cellule tout en maintenant son métabolisme primaire nécessaire à sa survie. De nombreuses protéines n'ont pas encore pu être identifiées. Ceci pourrait être expliqué par les limites imposées par la sensibilité du spectromètre de masse utilisé lors de l'étude.

Le séquençage du génome de la souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 a permis de détecter les ORFs pour identifier les peptides spécifiques de cette souche et ainsi créer une banque d'ORFs utilisable pour l'identification des protéines d'intérêt par empreinte peptidique. Ces nouvelles données ont permis de compléter l'identification des protéines impliquées dans la résistance métallique. Pour être exhaustifs, cette étude sera complétée par une analyse protéomique quantitative de type "shot-gun" entre les souches exposées ou non aux métaux et l'analyse complémentaire de deux autres souches de *Pseudovibrio* sp. qui présentent des profils de résistance aux métaux différents.

CHAPITRE 3

Variabilité de l'expression des furanoterpènes chez *Spongia officinalis*, une éponge accumulatrice de métaux

CHAPITRE 3 : Variabilité de l'expression des furanoterpènes chez *Spongia officinalis*, une éponge accumulatrice de métaux

1. Résumé

L'éponge *S. officinalis* représente une source importante de métabolites secondaires bio-actifs d'une grande diversité chimique, en particulier de terpénoïdes et minoritairement de stérols et d'acides gras. Ces molécules ont été isolées et identifiées par le biais de méthodes spectroscopiques. Certaines d'entre elles présentent des propriétés biologiques et pharmacologiques intéressantes telles que des activités cytotoxiques, antimicrobiennes ou cytostatiques avec respectivement les furospongines (De Giulio *et al.*, 1989; Garrido *et al.*, 1997; Orhan *et al.*, 2010), la furospongine-1 et la (–)-12-*epi*-déoxoscalarine (Anderson *et al.*, 1994; Orhan *et al.*, 2010) ou l'isoagatholactone (Gonzalez *et al.*, 1984). Les molécules responsables de ces activités permettent aux éponges de survivre dans les environnements compétitifs que représentent les écosystèmes marins et interviennent dans les mécanismes de défense et de communication (Thakur and Müller, 2004).

D'autre part, cette éponge marine abrite une importante communauté microbienne qui pourrait contribuer au métabolisme et à la défense de son hôte. En effet, la production des molécules bio-actives isolées des éponges a pu être attribuée aux bactéries associées dans de nombreux cas (Moore, 2005; Thomas *et al.*, 2010a).

Aucune étude n'a encore été menée sur la chimiodiversité de *S. officinalis* et plus particulièrement sur la variation spatiale et temporelle de son expression métabolique dans un contexte de pollution métallique.

La chimodiversité chez *S. officinalis* a été étudiée sur une collection d'échantillons provenant de deux sites de la mer Méditerranée récoltés sur trois années, en combinaison avec leurs niveaux de contamination métallique. Une approche chimique à l'aide d'empreintes métaboliques combinée avec des analyses statistiques multivariées a permis de mettre en évidence la variabilité de l'expression des métabolites secondaires dans l'espace et le temps, principalement attribuable à des niveaux différentiels de molécules de type furanosesterterpène qui pourraient constituer des marqueurs de stress.

Les résultats obtenus au cours de cette étude font l'objet d'une publication qui est en cours de rédaction.

2. Article

Metabolite profiling reveals furanoterpene variability in the metal polluted sponge *Spongia officinalis*

Cléa Bauvais[1,2], Marie-Lise Bourguet-Kondracki[1], Thierry Perez[3], Séverine Zirah[1]

[1]: Laboratoire Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes. CNRS / MNHN UMR 7245, Muséum National d'Histoire Naturelle. 57 rue Cuvier (CP 54). Paris, FR 75005
[2]: Université Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France
[3]: Institut méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale. Aix-Marseille Université, UMR 7263 CNRS.

Corresponding author
Séverine Zirah, Laboratoire Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes. CNRS / MNHN UMR 7245, Muséum National d'Histoire Naturelle. 57 rue Cuvier (CP 54). Paris, FR 75005, +33140793140, szirah@mnhn.fr

Running title

Metabolite profiling within a metal polluted sponge

Summary

The chemodiversity of *Spongia officinalis*, a Demospongiae from the Mediteranean Sea that accumulates high levels of heavy metals, was investigated by metabolic fingerprinting of samples over three years at two sites near Marseille (France). LC-MS metabolic fingerprinting combined with multivariate statistical analysis highlighted an important variability in the sponge secondary metabolites expression over space and time, which could be attributed to variations in the expression of furanoterpenes. This family was identified through a comprehensive structural analysis of the isolated representative demethylfurospongin-4, and further explored by LC-MS/MS analyses in positive and negative ion modes, revealing twelve members of the family showing a specific spatio-temporal pattern, including several new compounds. In addition, several metabolites selectively detected in the samples with high copper content, may constitute metal stress bioindicators.

Introduction

Marine sponges are sessile benthic organisms without effective escape mechanisms or physical defense. They survive to ecological pressures such as fouling, predation or competition by developing chemical defenses (Wahl, 1989; Connolly and Roughgarden, 1999), involving the production of a wide range of secondary metabolites with a great diversity of structures and pharmacological activities (Blunt *et al.*, 2012). These molecules can present biotechnological interests in the anticancer, antibiotic, anti-inflammatory or analgesic fields (Mayer *et al.*, 2010). The associated microorganisms hosted by these active filter feeders constitute a stable, dense and diverse community within their tissues, constituting up to 40% of the sponge volume (Hentschel *et al.*, 2006). Part of the bioactive natural compounds from the sponge holobiont has been ascribed to associated microorganisms (Piel, 2009; Thomas *et al.*, 2010), which contribute to the sponge metabolism (Erwin and Thacker, 2008) and its defense (Taylor *et al.*, 2007).

The Mediterranean Demospongiae *Spongia officinalis* (Linneus, 1759), one of the commercial sponges, has been widely described as a rich source of terpenoids such as *diterpenes*, furanosesterterpenes including *scalarane sesterterpenes* (Minale, 1978; Liu *et al.*, 2006), as well as diverse sterols, hydroxy-, seco- and epoxy-sterols (Bergquist *et al.*, 1980). Several terpenes isolated from *S. officinalis* exert bioactive activities, illustrated with

furospongin-1, which shows antibacterial, antiprotozoal and cytotoxic activities (Cimino *et al.*, 1971; Orhan *et al.*, 2010) and furospongin-2, furospongin-5, isoagatholactone, 11β-hydroxyspongi-12-en-16-one and 11β-acetoxyspongi-12-en-16-one, which display cytotoxic activities (Gonzalez *et al.*, 1984; De Giulio *et al.*, 1989; Garrido *et al.*, 1997). However, their biosynthetic origin and their ecological role in the sponge remain poorly understood.

Previously, the marine sponge *S. officinalis* has been proposed as a biomonitor of heavy metal pollution in the French area of the Cortiou cove, known for being influenced by anthropogenic pollutants (Pérez *et al.*, 2005). Recently, our group investigated the levels of four metals (nickel, copper, zinc and lead) in *S. officinalis* over three years at two sites of this area, Cortiou and Riou, differentially impacted by the urban sewage (Bauvais *et al.*, 2015). The sponge *S. officinalis* was shown to accumulate high contents of heavy metals, with a peak in copper level at Cortiou in 2013. In this study, we combined LC-MS metabolic fingerprinting and multivariate statistical analysis in order to evaluate the chemiodiversity and spatial and temporal variability of the metabolites extracted from the *S. officinalis* samples.

Results

LC-MS profiling of the extracts of *S. officinalis* collected in October 2011, September 2012 and December 2013 at Cortiou and Riou (5 samples for each collection) revealed a large panel of apolar compounds. The LC-MS data were processed using XCMS online, which allows peak detection, automatic retention time alignment and peak matching (Tautenhahn *et al.*, 2012; Gowda *et al.*, 2014). Such processing generated a multivariate matrix consisting of 30 samples and 297 peaks, each characterized by an *m/z* ratio and a retention time. The matrix was submitted to multivariate statistical analysis with unsupervised and supervised methods: principal component analysis (PCA), partial least squares discriminant analysis (PLS–DA) (Barker and Rayens, 2003) and sparse PLS-DA (sPLS-DA) (Lê Cao *et al.*, 2011), the latter permitting to easily select the most informative variables. The score plot of the PCA showed a clustering of the samples at two levels, by year (2011, 2012 and 2013) and by site (Riou and Cortiou) (Figure 1A-B). The first three components, PC1, PC2 and PC3, explained 35.6, 17.5 and 11.8% of the variance, respectively. Component PC1 mainly showed a clustering differentiating the 2013 samples from that of the other years. The time point Cortiou 2013 revealed a very particular profile, while Riou 2013 was intermediate between Cortiou 2013 and the other spatio-temporal classes. The clustering per site and per year was particularly visible on the PC2/PC3 score plot (Figure 1B). The score plots of the PLS-DA also showed a

good separation of samples by year and site of collect in the three first dimensions, with a clear discrimination of the 2013 samples in the first dimension (Figure 1C-D).

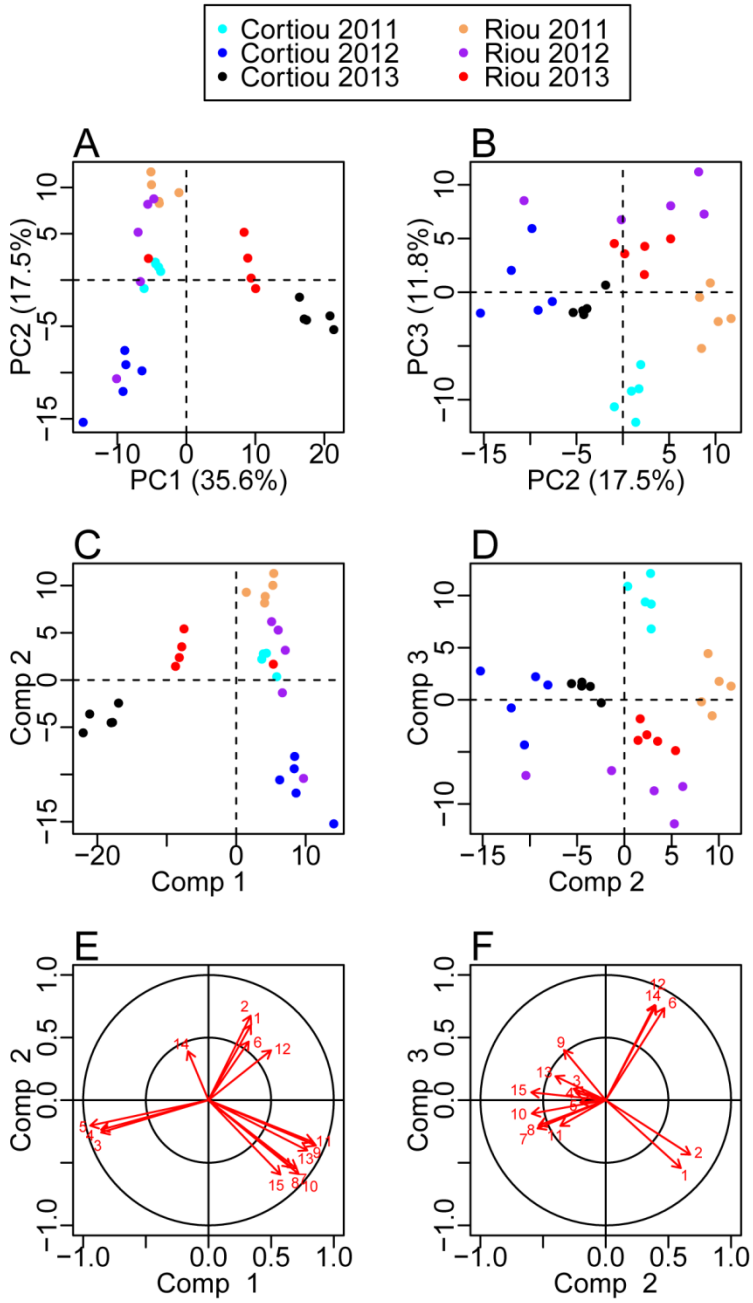


Figure 1: Spatial and temporal source of variability in the chemical profiles of *S. officinalis*. Score plot of the PCA (A,B) and PLS-DA (C,D) performed on the LC-MS data of the chemical extracts of *S. officinalis* collected at Cortiou and Riou in October 2011, September 2012 and December 2013 (n = 5 per conditions). E,F: PLS-DA loadings corresponding to the main metabolites involved in the clustering. The labels of the variables correspond to the compound numbering indicated in Table 1.

Analysis of the scores provided by XCMS online for the Cortiou/Riou two-group comparison, in conjunction with a careful consultation of the raw LC-MS data, permitted to select two main species involved in the clustering per site: compound **1** ($[M+H]^+$ at *m/z* 415.25, 39.1

min) and compound **2** ([M+H]$^+$ at *m/z* 433.27, 32.5 min). These compounds were significantly up-regulated at Riou (Figure 2), and were correlated ($p < 0.05$ in Spearman correlation test). The other metabolites associated with the spatio-temporal clustering of the extracts (compounds **3** to **15**) were deducted from the loading plots of sPLS-DA (Figure S1 in the Supporting information).

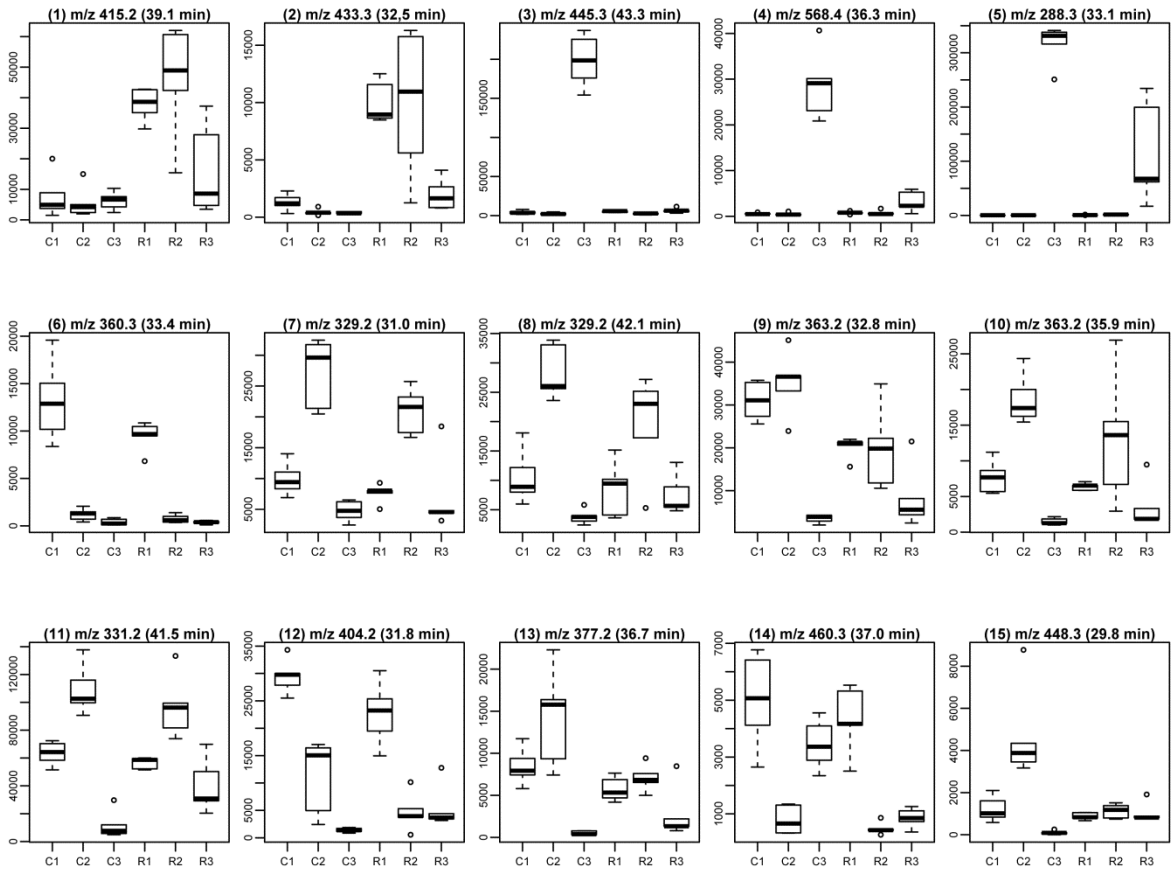


Figure 2: Boxplot representing the intensity of the [M+H]$^+$ species of the main metabolites involved in the clustering per site and per year. The labels correspond to the site (C for Cortiou, R for Riou) and year (1, 2 3 for 2011, 2012 and 2013, respectively).

The list of metabolites **1** to **15** is given in Table 1. They display *m/z* values ranging from 288.3 to 568.4 in positive ion mode and retention times ranging from 29.8 to 43.3 min. Their PLS-DA loadings are shown in Figure 1E-F and their relative abundance per site and year is shown in Figure 2. Compounds **3**, **4** and **5**, which were up-regulated at Cortiou 2013, were correlated two by two ($p < 0.05$ in Spearman correlation test). A correlation was also revealed between compounds **6** and **12**, up-regulated in 2011.

Table 1: Metabolites associated with the spatio-temporal variability in the metabolic profiles of the extracts of *Sponfia officinalis*. nd: not detected.

Compound	Retention time (min)	Spatio-temporal profile	m/z detected in positive-ion mode	m/z detected in negative-ion mode	Identification
1	39.1	Up-regulated at Riou	415.2 $[M+H]^+$ 432.4 $[M+NH_4]^+$ 829.5 $[2M+H]^+$ 846.5 $[2M+NH_4]^+$	413.2 $[M-H]^-$	Demethylfurospongin-4 (Garrido *et al.*, 1997)
2	32.5	Up-regulated at Riou	433.3 $[M+H]^+$ 415.2 $[M+H-H_2O]^+$ 450.3 $[M+NH_4]^+$ 865.5 $[2M+H]^+$ 882.5 $[2M+NH_4]^+$	431.2 $[M-H]^-$	Furofficin, a new compound (this study)
3	43.3	Up-regulated at Cortiou 2013	445.3 $[M+H]^+$ 385.3 ?	443.3 $[M-H]^-$ 489.3 $[M+HCOO]^-$	unknown
4	36.3	Up-regulated at Cortiou 2013	568.4 $[M+H]^+$ 585.4 $[M+NH_4]^+$	nd	unknown
5	33.1	Up-regulated in 2013	288.3 $[M+H]^+$	286.2 $[M-H]^-$ 320.2 ?	unknown
6	33.4	Up-regulated in 2011	360.3 $[M+H]^+$ 342.3 $[M+H-H_2O]^+$	nd	unknown furanoterpene, in progress
7	31.0	Up-regulated in 2012	329.2 $[M+H]^+$ 311.2 $[M+H-H_2O]^+$ 657.4 $[2M+H]^+$	nd	Furospongenone (Kazlauskas *et al.*, 1976)
8	42.1	Up-regulated in 2012	329.2 $[M+H]^+$ 346.2 $[M+NH_4]^+$ 311.2 $[M+H-H_2O]^+$ 657.4 $[2M+H]^+$	nd	Unkown furanoterpene ($C_{21}H_{28}O_3$)
9	32.8	Down-regulated in 2013	363.2 $[M+H]^+$ 380.2 $[M+NH_4]^+$ 345.2 $[M+H-H_2O]^+$ 742.5 $[2M+NH_4]^+$	361.2 $[M-H]^-$	Isomers of γ-hydroxy-α,β-butenolide furospongin-1 (isomer a) (Cimino *et al.*, 1974)
10	35.9	Down-regulated in 2013	363.2 $[M+H]^+$ 380.2 $[M+NH_4]^+$ 345.2 $[M+H-H_2O]^+$	361.2 $[M-H]^-$	unknown furanoterpene, $C_{21}H_{30}O_5$
11	41.5	Up-regulated in 2012, down-regulated in 2013	331.2 $[M+H]^+$ 348.3 $[M+NH_4]^+$ 313.2 $[M+H-H_2O]^+$ 661.5 $[2M+H]^+$ 678.5 $[2M+NH_4]^+$	329.2 $[M-H]^-$	Furospongin-1 (Cimino *et al.*, 1971) tetrahydrofurospongin-2 (Cimino *et al.*, 1972) or furospongenol (Kazlauskas *et al.*, 1976)
12	31.8	Up-regulated in 2011	404.2 $[M+H]^+$ 386.2 $[M+H-H_2O]^+$ 421.3 $[M+NH_4]^+$ 807.5 $[2M+H]^+$ 824.5 $[2M+NH_4]^+$	402.2 $[M-H]^-$	unknown furanoterpene, isomers (**12a** and **12b**, $C_{23}H_{33}NO_5$), in progress
13	36.7	Down-regulated in 2013	377.2 $[M+H]^+$ 394.3 $[M+NH_4]^+$ 359.2 $[M+H-H_2O]^+$ 422.3 $[M+HCOOH]^+$ 753.5 $[2M+H]^+$	nd	unknown furanoterpene, in progress
14	37.0	Up-regulated in 2011	460.3 $[M+H]^+$	458.3 $[M-H]^-$	unknown furanoterpene, in progress
15	29.8	Up-regulated at Cortiou 2012	448.3 $[M+H]^+$ 430.3 $[M+H-H_2O]^+$	nd	unknown

Ion-dependant LC-MS/MS analysis was performed in positive and negative ion modes (see Figure 3 for compounds **1** and **2**). This revealed that most of the compounds (**1, 2**, and **6** to **14**) showed common product ions, and in particular a diagnostic species at *m/z* 135 in positive ion mode (Table 2). This trend suggested that they belong to the same chemical

family. The purification of compound **1** was performed by successive steps of reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) of the CH_2Cl_2/MeOH crude extract, guided by LC-MS experiments. A detailed examination of its MS/MS fragmentation (Figure 3A-B) together with other spectroscopic data (UV, IR, 1D and 2D NMR presented in the Material and Method section and as Supporting information Figures S2 and S3) allowed to confirm its identification as the linear furanosesterterpene demethylfurospongin-4, previously described from *S. officinalis* (Garrido *et al.*, 1997). Thus, compounds **1**, **2** and **6** to **14**, which share the product ion at *m/z* 135 in positive ion mode (assigned to $C_9H_{11}O^+$) were proposed to belong to the furanoterpene family. Note that a product ion at *m/z* 135 has also been reported as intense species in the MS/MS spectra of furanoterpene ions formed by electron impact (Garrido *et al.*, 1997; Issa *et al.*, 2003; Shen *et al.*, 2006). The complete purification of compound **2** was unsuccessful, due to the small amount of the fraction and its co-elution with an inseparable product. Its MS/MS spectrum in positive-ion mode (Figure 3C) did not provide much information, as it revealed almost similar to that of compound **1**. However, the MS/MS spectra of compounds **1** and **2** in negative-ion mode (Figure 3B, D) revealed a clearly distinct fragmentation pattern, and permitted to propose that compound **2** is a new close derivative of compound **1**, with an hydroxyl group at position 7 and a saturated C-12-C-13 bond (molecular formula $C_{25}H_{36}O_6$). In particular, the product ions at *m/z* 151 ($C_9H_{11}O_2^-$) and *m/z* 57 (base peak, corresponding to $C_3H_5O^-$) permitted to localize the hydroxyl group. The new compound **2** was named furofficin.

Table 2: Main product ions detected on the MS/MS spectra of the furanoterpene compounds involved in *Sponfia officinalis* metabolomic spatio-temporal variability. na: not available.

Compound	Retention time	Precursor ion (bold), collision voltage (in brackets) and major product ions	
		Positive mode	**Negative mode**
1	39.1	***m/z* 415.2** (20V) 397.2, 379.2, 369.2, 361.2, 351.2, 335.2, 333,2, 243.2, 225.2, 203.1, 199.1, 185.1, 175.1, 149.1, 147.1, 135.1	***m/z* 413.2** (-40V) 369.3, 351.2, 325.3, 217.2, 165.1, 149.1, 133.1, 109.1, 99.1, 97.0, 81.0, 73.0, 55.1
2	32.5	***m/z* 433.3** (20V) 397.2, 379.2, 369.2, 361.2, 351.2, 335.2, 333.2, 243.2, 225.2, 203.1, 199.1, 185.1, 175.1, 149.1, 147.1, 135.1	***m/z* 431.2** (-40V) 387.3, 327.2, 235.2, 217.2, 191.2, 163.2, 153.1, 151.1, 135.1, 109.1, 99.1, 97.1, 73.0, 69.0, 57.0, 55.1
6	33.4	***m/z* 360.3** (20V) 342.2, 324.2, 315.2, 297.2, 298.2, 279.2, 210.2, 180.1, 166.1, 163.1, 149.1, 147.1, 138.1, 135.1, 110.1	na
7	31.0	***m/z* 329.2** (20V) 311.2, 293.2, 283.2, 273.1, 259.1, 173.1, 149.1, 147.1, 135.1, 131.1	na
8	42.1	***m/z* 329.2** (20V) 313.2, 311.2, 301.2, 295.2, 293.2, 283.2, 273.1, 265.2, 251.1, 179.1, 163.1, 161.1, 151.1, 149.1, 147.1, 145.1, 135.1, 133.1, 121.1, 107.1, 95.1, 81.0	na
9	32.8	***m/z* 363.2** (20V) 345.2, 327.2, 309.2, 299.2, 281.2, 195.1, 193.1, 191.1, 177.1, 175.1, 173.1, 165.1, 163.1, 161.1, 151.1, 149.1, 147.1, 145.1, 135.1	***m/z* 361.2** (-30V) 317.2, 179.1, 149.1, 137.1, 123.1, 119.1, 109.1, 81.1, 69.0, 57.0
10	35.9	***m/z* 363.2** (20V) 345.2, 327.2, 309.2, 299.2, 281.2, 191.1, 165.1, 163.1, 149.1, 145.1, 135.1	***m/z* 361.2** (-30V) 193.1, 179.1, 149.1, 137.1, 123.1, 69.0, 62.0, 57.0
11	41.5	***m/z* 331.2** (20V) 313.2, 295.2, 285.2, 277.2, 267.2, 179.1, 177.1, 163.1, 151.1, 149.1, 145.1, 137.1, 135.1, 133.1, 121.1, 95.1, 81.0	na
12a	31.2	***m/z* 404.2** (20V) 386.2, 368.2, 358.2, 340.2, 322.2, 312.2, 266.2, 254.2, 236.1, 224.1, 208.1, 178.1, 163.1, 154.1, 135.1	***m/z* 402.2** (-30V) 252.1, 222.1, 208.1, 190.1, 178.1, 154.1, 149.1, 138.1, 122.1, 110.1, 81.0
12b	31.8	***m/z* 404.2** (20V) 386.2, 368.2, 358.2, 340.2, 342.2, 322.2, 312.2, 266.2, 254.2, 236.1, 224.1, 210.1, 208.1, 182.1, 178.1, 163.1, 154.1, 149.1, 145.1, 135.1	***m/z* 402.2** (-30V) 208.1, 178.1, 149.1, 138.1, 122.1, 110.1, 98.1, 69.0
13	36.7	***m/z* 377.2** (20V) 359.2, 343.2, 327.2, 309.2, 279.1, 181.1, 179.1, 165.1, 163.1, 153.1, 149.1, 137.1, 135.1, 133.1, 119.1, 109.1, 107.1, 95.1	na
14	37.0	***m/z* 460.3** (20V) 442.3, 424.3, 396.3, 378.3, 310.2, 280.2, 264.2, 238.1, 234.2, 163.1, 149.1, 135.1	na

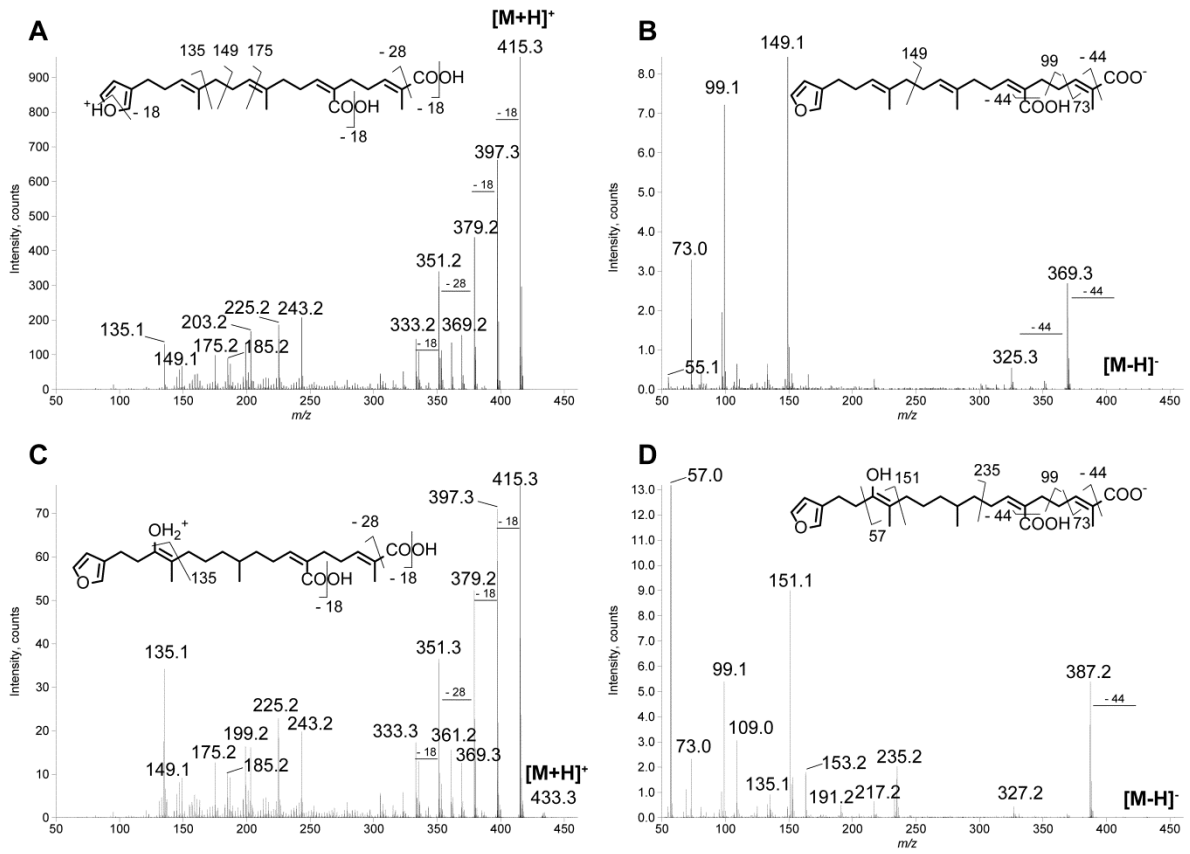
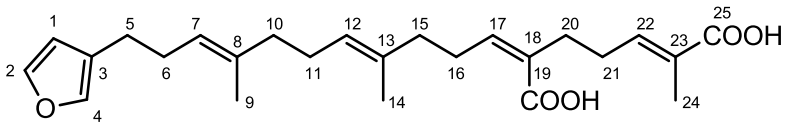


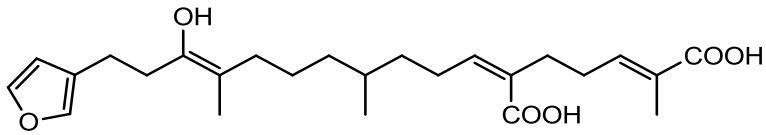
Figure 3: LC-MS/MS spectra of compounds **1** and **2** in positive (A, C) and negative (B, D) ion modes. (A) $[M+H]^+$ species of compound **1** (*m/z* 415.25), collision voltage 20 V, (B) $[M-H]^-$ species of compound **1** (*m/z* 413.27), collision voltage -40 V, (C) $[M+H]^+$ species of compound **2** (*m/z* 433.27), collision voltage 20 V, (D) $[M-H]^-$ species of compound **2** (*m/z* 431.24), collision voltage -40 V. The main product ions are shown on the structures.

The *m/z* value measured for compounds **9** and **10** ($[M+H]^+$ at *m/z* 363.2, assigned to the molecular formula $C_{21}H_{30}O_5$) corresponded to a series of furanoterpene isomers containing a tetronic acid unit, isolated from *S. officinalis*, termed butenolide furospongin-1 (Cimino *et al.*, 1974). These compounds contain a furan moiety on one side and either a γ-hydroxy-α-β-butenolide or α β, γ -epoxy butenolide moiety on the other side. The fragmentation patterns of compound **9** in positive and negative ion modes (Figure S4A-B in the Supporting information) were compatible with the a γ-hydroxy-α-β-butenolide furospongin-1, although the product ions detected did not permit to unambiguously assign it to a specific isomer. Note that the chromatographic peak corresponding to this compound had a bimodal peak shape, suggesting a close elution of two isomers. The fragmentation pattern of compound **10** revealed close to that of compound **9**, although the fragmentation extent was much weaker, in particular in positive ion mode (Figure S4C-D in the Supporting information). The important differences in the fragmentation extent and retention times (3.1 min) between compounds **9**

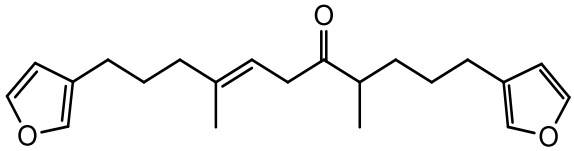
and **10** suggested that these isomers differ by more than just a change in the position of a hydroxyl group. Compound **10** appears more stable and hydrophobic, and may consist of a more complex structure, possibly cyclic or oligomeric. However, we could not propose a structure based only on the LC-MS/MS data.



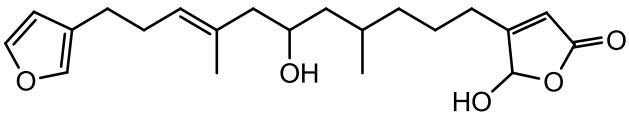
Compound **1**: Demethylfurospongin-4



Compound **2**: Furofficin



Compound **7**: Furospongenone



Compound **9**: Mix of isomers of γ-hydroxy-α-β-butenolide furospongin-1

The *m/z* value measured for compound **11** ($[M+H]^+$ at *m/z* 331.2, assigned to the molecular formula $C_{21}H_{30}O_3$) could correspond to different furanoterpernes isolated from different sponges species of the genus *Spongia* and from the closely related *Hippospongia communis*: furospongin-1 (Cimino *et al.*, 1971), tetrahydrofurospongin-2 (Cimino *et al.*, 1972), and furospongenol (Kazlauskas *et al.*, 1976). The product ions detected on the MS/MS spectrum of the $[M+H]^+$ species of this compound (Figure S5 in the Supporting information) is compatible with the three structures. One can also consider the possibility of keto-enol tautomerism. Note that the diagnostic product ion at *m/z* 135 was very intense. This could be related to the fact that this metabolite does not display a double bond between C-7 and C-8, which should favor cleavage adjacent to C-8. In that case, the double bond in the *m/z* 135 species would result from the fragmentation process. This hypothesis would be in favor of the isomer tetrahydrofurospongin-2.

The *m/z* value measured for the metabolites **7** and **8** ($[M+H]^+$ at *m/z* 329.2, assigned to the molecular formula $C_{21}H_{28}O_3$) corresponded to furospongenone, isolated from the sponges *Spongia* sp. and *Hippospongia communis* (Kazlauskas *et al.*, 1976). As already observed for the two isomers **9** and **10**, the two compounds were very different in terms of fragmentation extent (Figure S6 in the Supporting information) and retention time (11 min difference), suggesting very different structures in terms of stability and hydrophobicity. The product ions detected for the two compounds were very similar (Table 2), but with different relative intensities. Compound **7** showed an intense *m/z* 135 species together with product ions at *m/z* 151 and *m/z* 179 (in common with compound **11**). Its fragmentation pattern is compatible with the structure of furospongenone. Compound **8** displayed a small *m/z* 135 species and a product ion at *m/z* 149. It was proposed to contain a double bond between C-7 and C-8, but could not be further identified based on its poorly informative MS/MS spectrum.

Compounds **6**, **12** and **14**, which display an even molecular mass, were assumed to contain one nitrogen atom. Their MS/MS spectra are shown in Figure S7-S8A-B in the Supporting information. Their fragmentation pattern is presently investigated, in order to propose structures compatible with the product ions detected. Compound **12** (assigned to the molecular formula $C_{23}H_{33}NO_5$) was renamed **12a** and **12b** since the chromatographic peak shape suggested the elution of two closely related isomers. Finally, compound **13** showed a fragmentation pattern close to those of compounds **9** to **11**, suggesting that they are closely related (Figure S8C in the Supporting information). However, it could not been identified precisely based on the product ions detected.

Discussion

We investigated the intra-specific variability in secondary metabolites of the Mediterranean Demospongiae *S. officinalis*. The chemical profiles of five specimens over three years and two sites with different levels of metallic contamination were obtained by LC-MS experiments of the CH_2Cl_2/MeOH extracts.

The metabolic profiles highlighted an important chemical diversity with a large panel of apolar compounds, and revealed a spatial and temporal variability. Most of the metabolites involved in this variability belong to the furanoterpene family. The isolation and comprehensive structural characterization of one representative compound of the family permitted to unambiguously identify it as demethylfurospongin-4. For the other compounds, analysis of the MS/MS spectra in positive and negative ion modes permitted to obtain

structural information, although a complete identification was not always possible. Furanoterpenes have been extensively studied by electron impact mass spectrometry, and to the best of our knowledge, this is the first study that reports the use of collision induced dissociation of ions formed by electrospray to characterize this family. Note that positive ion mode provided a diagnostic ion of this family, at *m/z* 135, while negative mode provided several signatures very informative on the chemical groups present: (i) the species at *m/z* 99 and *m/z* 73 were characteristic of the species with carboxylic acid groups such as compounds **1** and **2**, (ii) the product ions at *m/z* 69 and *m/z* 57 were observed specifically for tetronic acid moieties (compounds **9** and **10**). The partially symmetric structure of the compounds rendered difficult their unambiguous identification based only on their fragmentation profiles, and in particular it remains difficult to precisely localize the double bonds, as it is the case for unsaturated fatty acids (Kerwin *et al.*, 1996). Although the furanoterpenes from *Spongia* species have been extensively studied, the analysis of *S. officinalis* extracts by LC-MS permitted to reveal a number of new members of this family, such as the furanosesterterpene furofficin (compound **2**) and compounds **6**, **12a, 12b** and **14**, which contain a nitrogen atom. This is the first time furanoterpenes including a nitrogen atom are reported from a *Spongia* species. Several nitrogen-containing furanoterpenes have been isolated from sponges (Liu *et al.*, 2006), such as pyrrolosesterpenes (Liu *et al.*, 2002, 2003) and trinorsesterterpenoid lactams (Shin *et al.*, 2001), isolated from the species *Sarcotragus*. In these compounds, the furan is replaced by a pyrrole moiety. Another example is Hippospongin C, isolated from *Hippospongia* sp., which contains an amide linkage to 1,2-diaminoethane (Rochfort *et al.*, 1996). The product ion at *m/z* 110 detected on the MS/MS spectrum of the isomers **12a** and **12b** in negative ion mode (Figure S7 in the Supporting information) supports the presence of a pyrrole moiety, but we need to go further in the assignment of the spectra to unambigously characterize the structure of the detected compounds.

Numerous animal species were described with variations in the expression of secondary metabolites according to the geographic location, as illustrated with the Pacific gorgonians *Annella mollis* and *Annella reticulata* (Puglisi *et al.*, 2000), the tropical nudibranch *Asteronotus cespitosus* (Fahey and Garson, 2002), the tropical marine sponge *Acanthella cavernosa* (Jumaryatno *et al.*, 2007) and the Mediterranean sponge *Spongia lamella* (Noyer *et al.*, 2011). Essential factors such as water temperature, light exposure, chemical contamination or food availability should be considered for additional ecological interpretations of the chemical variability over space and time (Thompson *et al.*, 1987). Although genetic or environmental control of chemical expression variations remains still

unclear, further investigations on the sponge genetic diversity over time and space should be performed to deeply evaluate the origin of the secondary metabolite variation expression.

These metabolic variations might also result from the variation of the bacterial communities associated with *S. officinalis* diversity, as previously demonstrated by denaturing gradient gel electrophoresis (Bauvais *et al.*, 2015). There is no doubt that bacterial communities can hardly contribute to the sponge metabolism and so to the production of secondary metabolites (Taylor *et al.*, 2007). Thereby, little changes in bacterial communities, which produce secondary metabolites, might influence the sponge chemical patterns.

In our study, the linear furanosesterterpene demethylfurospongin-4 and the new furofficin were identified as the main compounds explaining the variability between the two sites, Cortiou and Riou. Demethylfurospongin-4 was previously isolated from *S. officinalis* as one of the major furanoterpenes produced by the sponge (Garrido *et al.*, 1997), but to the best of our knowledge, it is not clear whether this compound is produced by the sponge itself or by its associated microflora. Given their large occurrence within sponges, it is most probable that these molecules are biosynthesized by the sponge itself. However, the wide diversity of these compounds in the sponge holobionte could result from biotransformations by the hosted microbiota. The biotransformation of furan to amide in the marine linear furanosesterterpene palinurin, by the fungus *Cunninghamella* sp. NRRL 5695, supports this hypothesis (El Sayed *et al.*, 1999). Further study reported that demethylfurospongin-4 showed a significant growth inhibitory activity against four parasitic protozoa, *Trypanosoma brucei rhodesiense* (4.90 $\mu g.mL^{-1}$), *Trypanosoma cruzi* (>90 $\mu g.mL^{-1}$), *Leishmania donovani* (10.2 $\mu g.mL^{-1}$), and *Plasmodium falciparum* (13.36 $\mu g.mL^{-1}$) but no cytotoxicity (Orhan *et al.*, 2010). In addition, furanoterpene-type compounds have been presented as promising antifouling agents, as illustrated with dihydrofurospongin-2, isolated as the major metabolite from the marine sponge *Cacospongia scalaris* (Cimino *et al.*, 1972), which exhibited a significant antifouling activity against *Balanus amphitrite* cypris larvae settlement with only 11.2% of settlement at 100 $\mu g.mL^{-1}$ but no cytotoxicity (Hellio *et al.*, 2005). In this latter study, all extracts containing furanoterpenes showed a strong settlement inhibition, confirming that the presence of an electronegative oxygen group such as a furan ring might be a common feature of antifouling marine natural products (Clare, 1996; Omae, 2003). The expression of the toxic demethylfurospongin-4 has also been reported to decrease under the climatic warming event of 2003, which caused a mass mortality of *S. officinalis*. The authors concluded that *S. officinalis* allocated more energy in maintaining homeostasis than chemical defense, which would then favor the virulence of bacterial pathogens (Thomas *et al.*, 2007).

In conclusion, the chemical diversity of *S. officinalis* was examined at two sites of the Cortiou area (Cortiou and Riou), over three years, in conjunction with the previously monitored metallic pollution levels. The chemical analyses of *S. officinalis* highlighted a specificity of the chemical expression, with a higher spatial than temporal variability. Furanoterpene-type compounds, already known for their antifouling activity, explained the chemical variability between the two sites, Cortiou and Riou. One of them has been isolated and characterized as the linear furanosesterterpene demethylfurospongin-4. Demethylfurospongin-4 was up-regulated in the less polluted site, an observation which must be considered before a too rapid extrapolating conclusion. This trend could result from the presence of more interacting microorganisms at this site, requiring the production of more antifouling compounds. In addition, several metabolites selectively detected in the samples with high copper content (**3**, **4** and **5,** which remain to be identified), may constitute metal stress bioindicators.

Experimental procedures

Chemical fingerprinting of Spongia officinalis samples by LC/MS

Five freshly collected *S. officinalis* samples collected from each site in 2011, 2012 and 2013 were lyophilized. After lyophilization, samples (dry weight, 2g) were ground to a powder and extracted with a CH_2Cl_2 (Carlo Erba reagents)/MeOH (VWR) 1:1 mixture (3 × 60 mL, sonication for 15 minutes at room temperature). The CH_2Cl_2/MeOH extracts were concentrated under reduced pressure to yield a yellow powder, which was mixed with 2 g of C18 silica (50 µm, 65 Å - Phenomenex) and chromatographed on a C18 solid phase extraction (SPE) cartridge (12 cc - Phenomenex) in a vacuum chamber. The cartridges were washed with 10 mL H_2O and eluted with 10 mL CH_2Cl_2/MeOH 1:1. The LC-MS analysis of 2 µL of the SPE fraction was performed using an Ultimate 3000 Micro-HPLC system (Thermo Scientific) connected to an ESI-Qq-TOF Q-STAR Pulsar mass spectrometer (AB Sciex) equipped with an IonSpray source. The chromatographic separation was achieved on a C18 column (Uptisphere WTF, 150 × 1 mm, 300 Å, 5 µm, Interchim) using a gradient of H_2O/0.1% formic acid (FA) (solvent A) and CH_3CN/0.08% FA (solvent B) at a flow rate of 40 $\mu L.min^{-1}$: linear increase from 10% B to 80% B within 35 min followed by a linear increase to 100% B in 2 min, and 5 min stage at 100% B. The MS data were collected in positive ion mode in the *m/z* range 250 - 1500. The samples were also analysed in positive or negative ion mode in ion-dependent acquisition (IDA) mode to generate automatic MS/MS spectra on the main ions

detected. Finally, the ions of interest were analysed by LC-MS/MS in positive or negative ion mode at different collision voltages (indicated on the figures).

Multivariate data analysis

The raw LC-MS data were processed using XCMS Online version 2.01.00 (https://xcmsonline.scripps.edu/index.php) (Tautenhahn *et al.*, 2012; Gowda *et al.*, 2014). The multivariate matrix generated was then treated using the freely available R environment version 3.1.1 (www.r-project.org). PCA, PLS-DA and sPLS-DA were carried out using R package MixOmics (Lê Cao *et al.*, 2009). The PCA was performed on mean centred data. sPLS-DA was carried out for 3 components with 10 variables kept on the first component and 30 variables kept on components 2 and 3. Within the variables selected, the compounds with a maximum area of 5000 counts and not eluted in the void volume were further picked out.

*Purification of compound **1***

The CH_2Cl_2/MeOH extract (1.71 g) was subjected to successive RP-HPLC on an analytic Ultimate 3000 HPLC system (Thermo Scientific), on a C18 Luna column (250 × 4.6 mm, 100 Å, 5 µm, Phenomenex), with increasing amount of CH_3CN/0.08% FA in H_2O/0.1% FA as eluent (flow rate: 1 mL. min^{-1}, wavelength: 226 nm) to yield compound **1** (retention time: 38.9 min, 2.7 mg).

*Identification of compound **1***

Spectral data of compound **1** were obtained using a UVIKON 930 spectrometer for UV spectrum and a Shimadzu 8400S FT-IR spectrometer for IR spectrum. Mass spectra were recorded on an ESI-Qq-TOF Q-STAR mass spectrometer (AB Sciex). NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE 600 spectrometer using standard pulse sequences. The acquisition of HMBC spectrum was optimized for 7 Hz. Compound ***1*** was identified as demethylfurospongin-4: colorless oil; UV (EtOH) λ_{max} (ε) 206 (12700) nm; IR (NaCl disk) ν_{max} 2924, 2854, 1685, 1558 cm^{-1}; ^1H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ 7.33 (1H, dd, *J* = 1.6, 2.0 Hz, H-1), 7.20 (1H, m, H-4), 6.94 (1H, br t, *J* =8.2 Hz, H-22), 6.27 (1H, brs, H-2), 6.01 (1H, br t, *J* = 7.3 Hz, H-17), 5.17 (1H, tq, *J* = 7.2, 1.1 Hz, H-7), 5.12 (1H, tq, *J* = 6.9, 1.1 Hz, H-12), 2.53 (4H, m, H-16 and H-20), 2.45 (2H, brt, *J* = 7.5 Hz, H-5), 2.36 (2H, dt, *J* = 7.5, 8.0

Hz, H-21), 2.24 (2H, td, *J* = 7.5, 8.0 Hz, H-6), 2.08 (4H, m, H-11 and H-15), 1.99 (2H, brt, *J* = 7.3 Hz, H-10), 1.79 (3H, brs, H-24), 1.59 (6H, brs, H-9 and H-14); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz), 173.98 (C-19), 173.32 (C-25), 144.59 (C-17), 143.72 (C-22), 142.51 (C-1), 138.81 (C-4), 135.67 (C-8), 134.01 (C-13), 131.24 (C-18), 127.98 (C-23), 125.01(C-12), 124.97 (C-3), 123.77 (C-7), 111.08 (C-2), 39.61(C-10), 38.91(C-15), 33.11 (C-20), 30.66 (C-21), 28.42 (C-6), 28.02 (C-16), 26.40 (C-11), 25.02 (C-5), 16.05 (C-9), 15.84 (C-14), 11.69 (C-24) (Supporting information Figures S2 and S3). ESI-MS $[M+H]^+$ found at *m*/*z* 415.2494 calc. 415.2479 for $C_{25}H_{35}O_5$.

Acknowledgements

This work is part of Cléa Bauvais PhD, supported by a grant from the doctoral school ED 387: Interdisciplinary approach to living organisms (University Paris VI, Paris, France). Funding was partly provided by an ATM grant from the MNHN (2012–2014). We also acknowledge the support of the European Union 7th Framework Programme (Bluegenics FP7-KBBE-2012-6) under grant agreement n° 311848. We thank the "Plateforme analytique du Muséum" for access to the NMR and mass spectrometry facilities. We thank Alain Blond and Alexandre Deville, (MNHN, Paris) for making the NMR experiments, Arlette Longeon and Linh H. Mai (MNHN, Paris) for their assistance in chemistry, Frédéric Zuberer (Mediteran Institute of Oceanography) for collecting the sponge samples and Alain Paris (MNHN, Paris) and Paul Benton (Scripps Center for Metabolomics and Mass Spectrometry, La Jolla, CA, USA) for fruitful discussion on metabolomics.

Supporting information

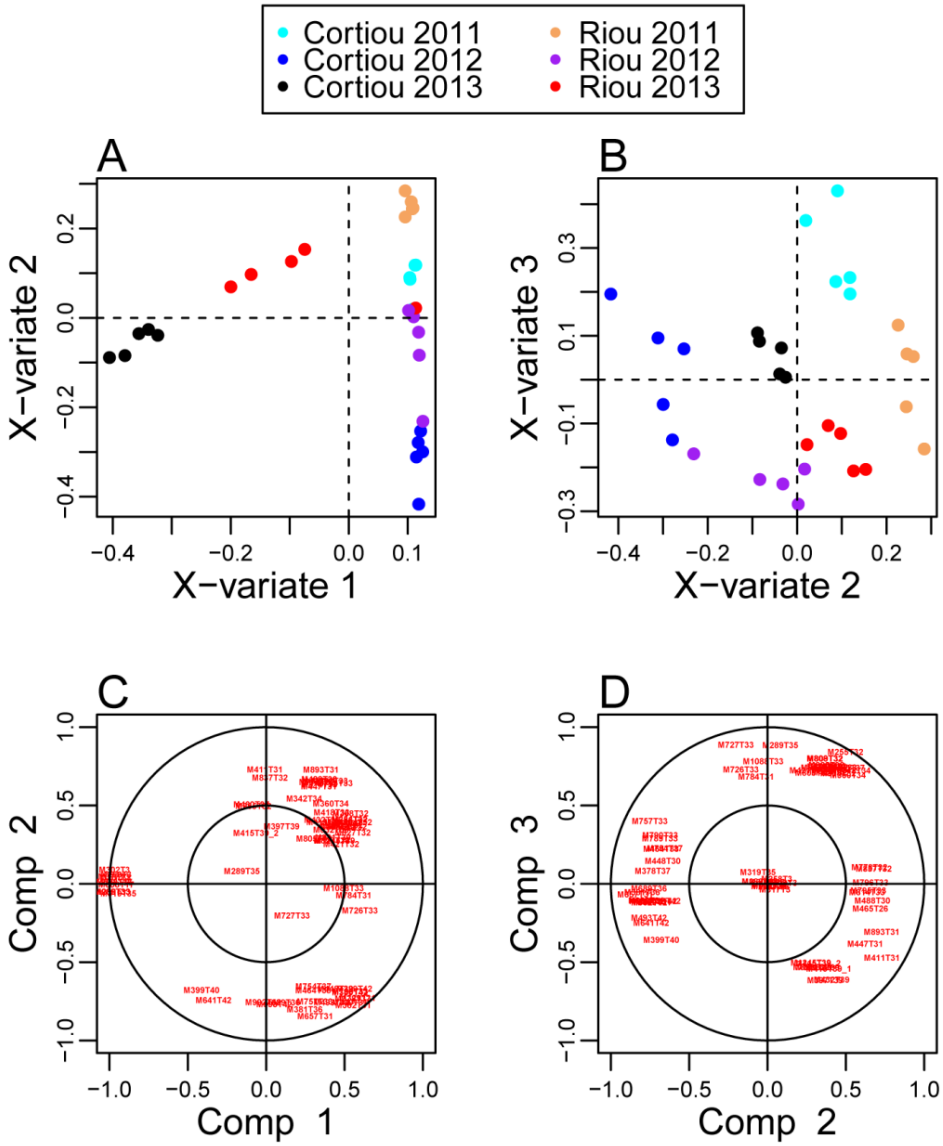


Figure S1. Score (A-B) and loading (C-D) plots of sPLS-DA with 3 components and 10, 30 and 30 variables selected on each component, selectively. The variables are labeled MxxTyy, where xx denotes the nominal *m/z* ratio and yy indicates the nominal retention time.

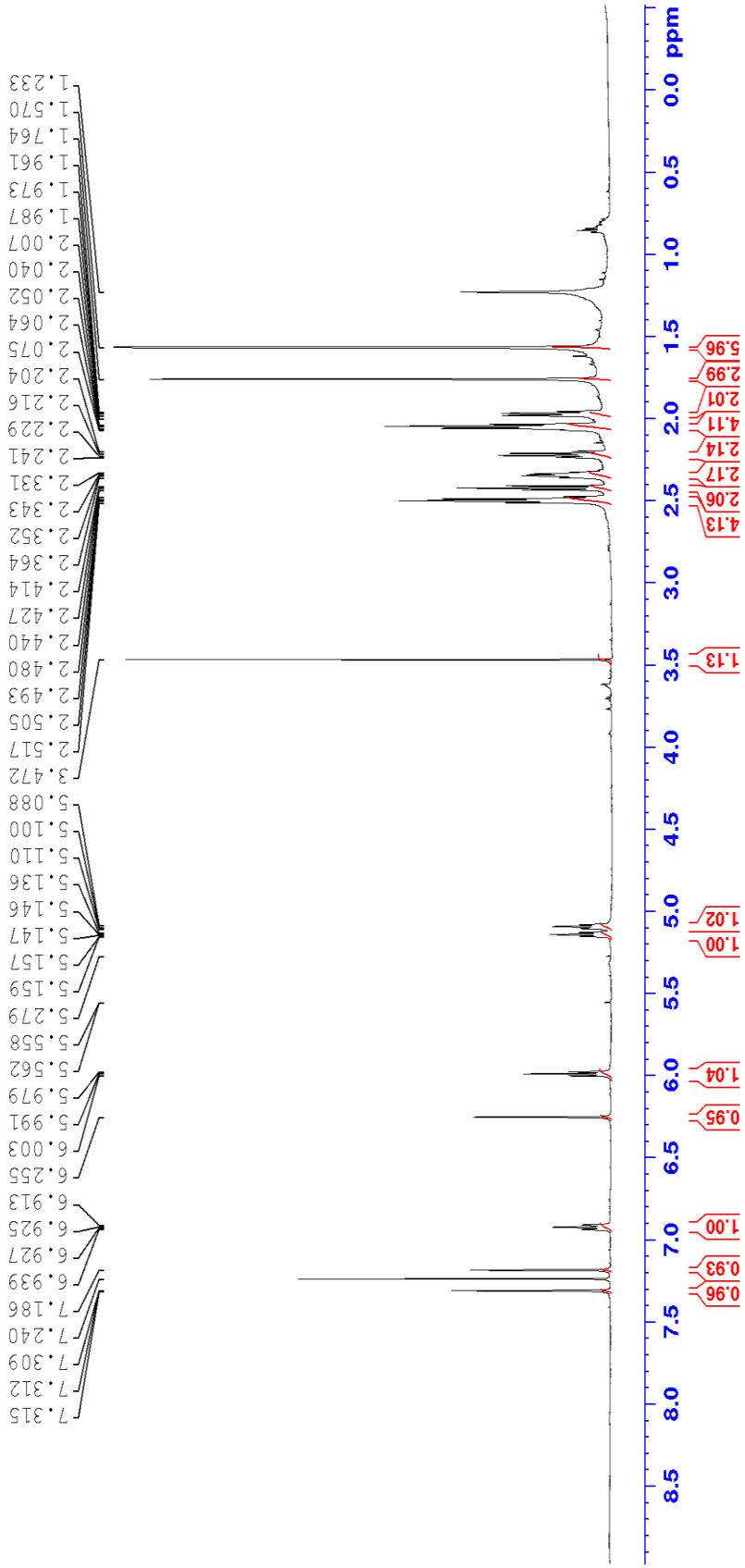


Figure S2: ^{1}H NMR spectrum of compound **1** ($CDCl_3$, 600 MHz).

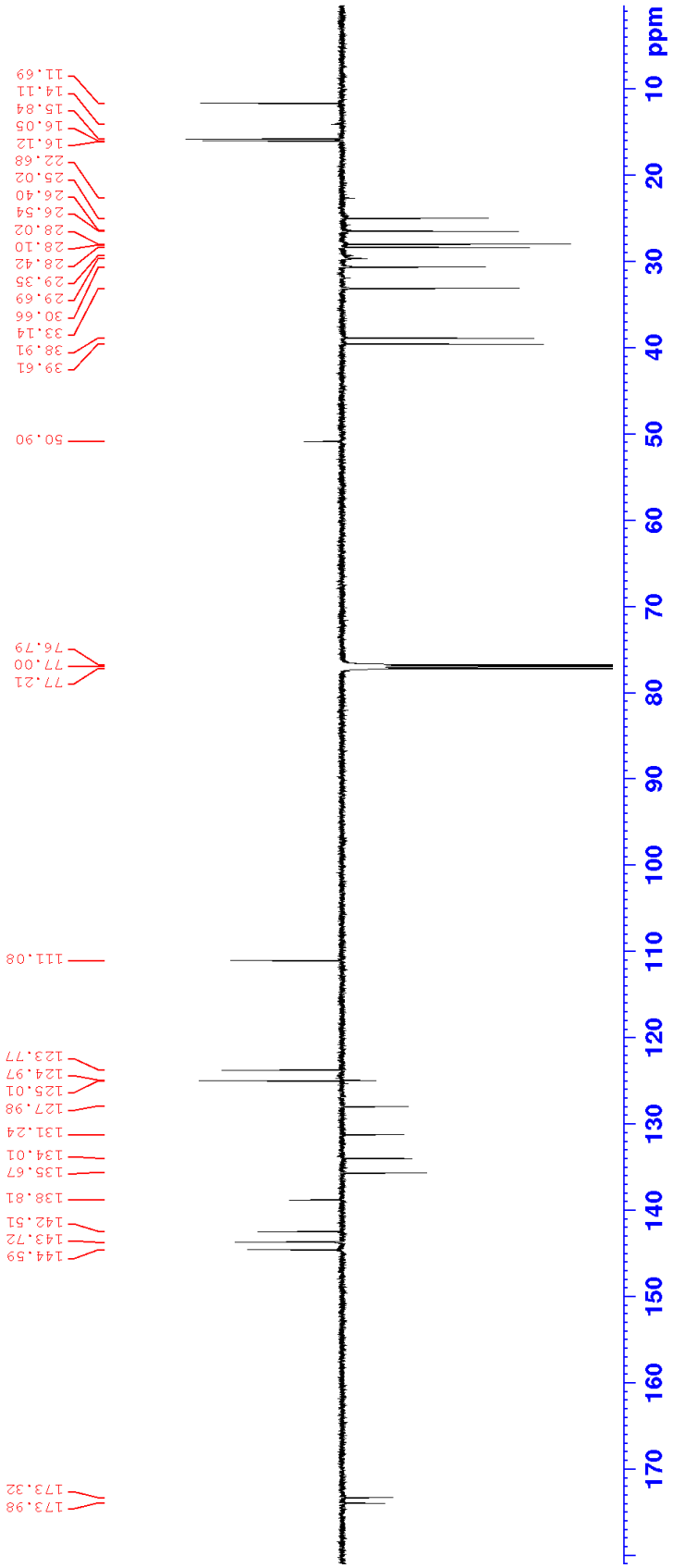


Figure S3: ^{13}C NMR spectrum of compound **1** ($CDCl_3$, 600 MHz).

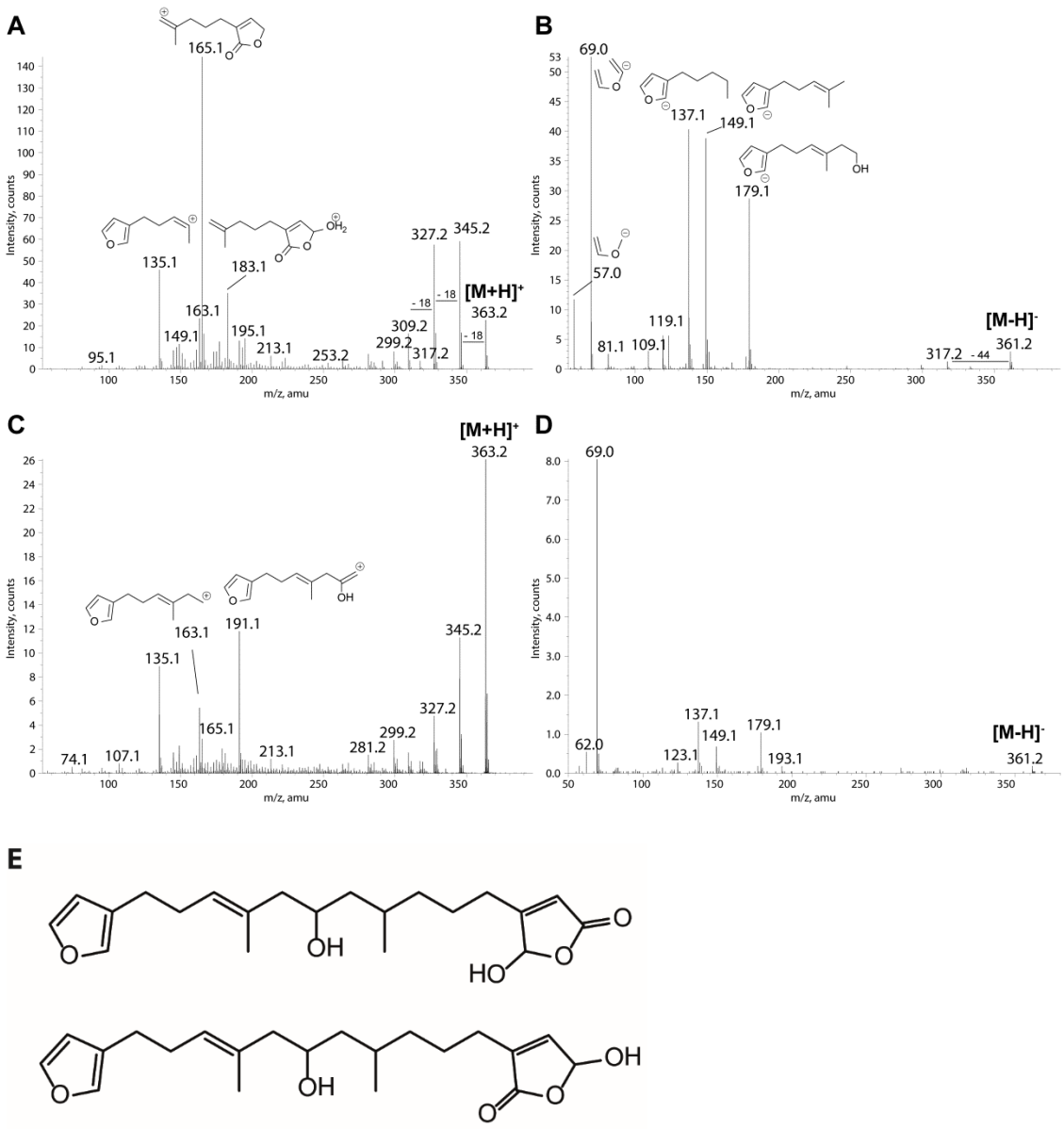


Figure S4: LC-MS/MS spectra of compounds **9** and **10** in positive (A, C) and negative (B, D) ion modes. (A) $[M+H]^+$ species of compound **9** (*m/z* 363.22), collision voltage 20 V, (B) $[M-H]^-$ species of compound **9** (*m/z* 361.20), collision voltage -30 V, (C) $[M+H]^+$ species of compound **10** (*m/z* 363.22), collision voltage 20 V, (D) $[M-H]^-$ species of compound **2** (*m/z* 361.20), collision voltage -30 V. The main product ions are represented. E. Known furanoterpenes sharing the same molecular formula and compatible with the MS/MS data of compound **9**: isomers of γ-hydroxy-α,β-butenolide furospongin-1 (Cimino, S. de Stefano, *et al.*, 1974).

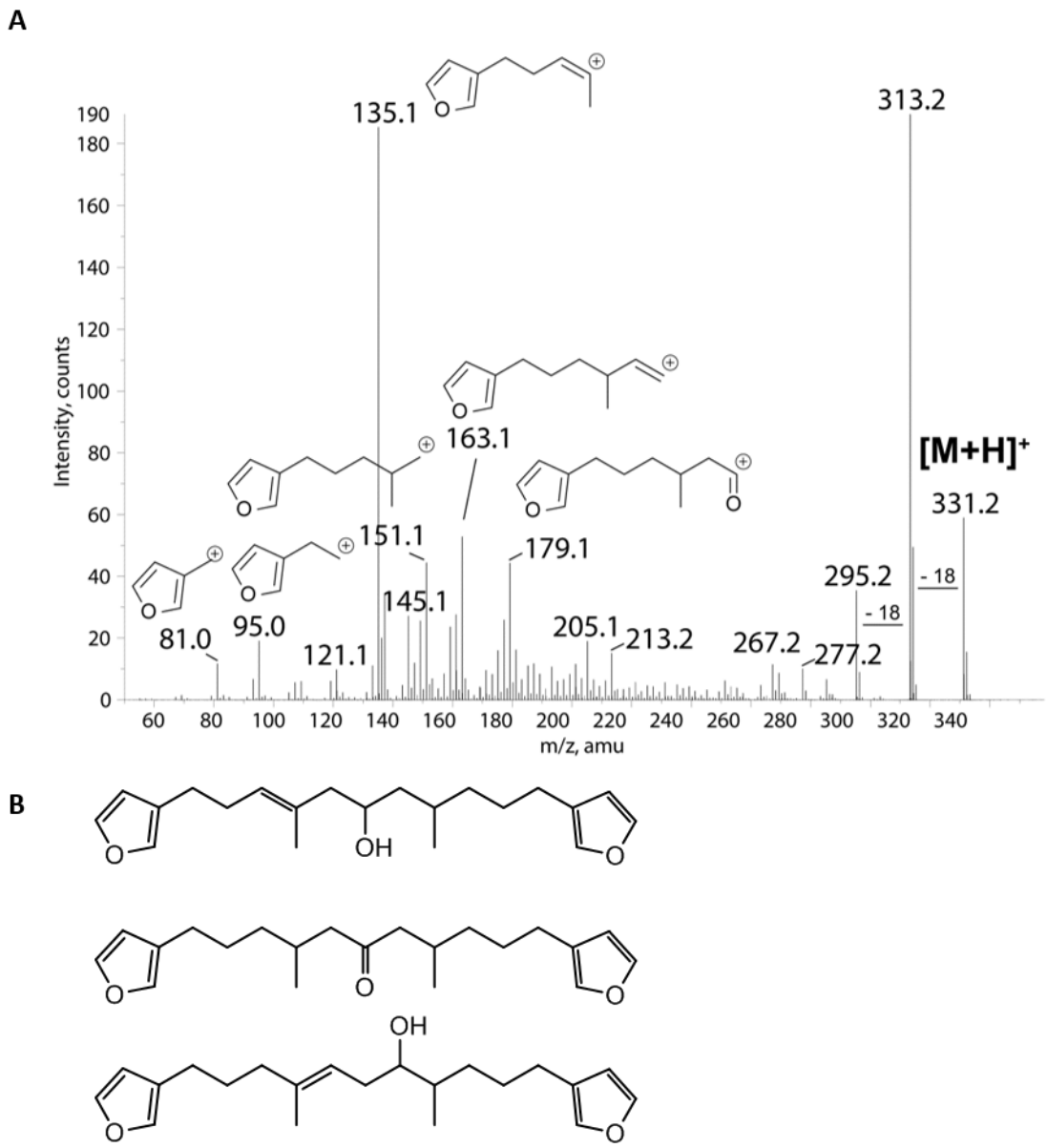


Figure S5. (A) LC-MS/MS spectrum of the $[M+H]^+$ species of compound **11** (*m/z* 331.23), collision voltage 20 V. The main product ions are represented. (B) Known furanoterpenes sharing the same molecular formula and compatible with the MS/MS data: furospongin-1 (Cimino *et al.*, 1971), tetrahydrofurospongin-2 (Cimino *et al.*, 1972), and furospongenol (Kazlauskas *et al.*, 1976).

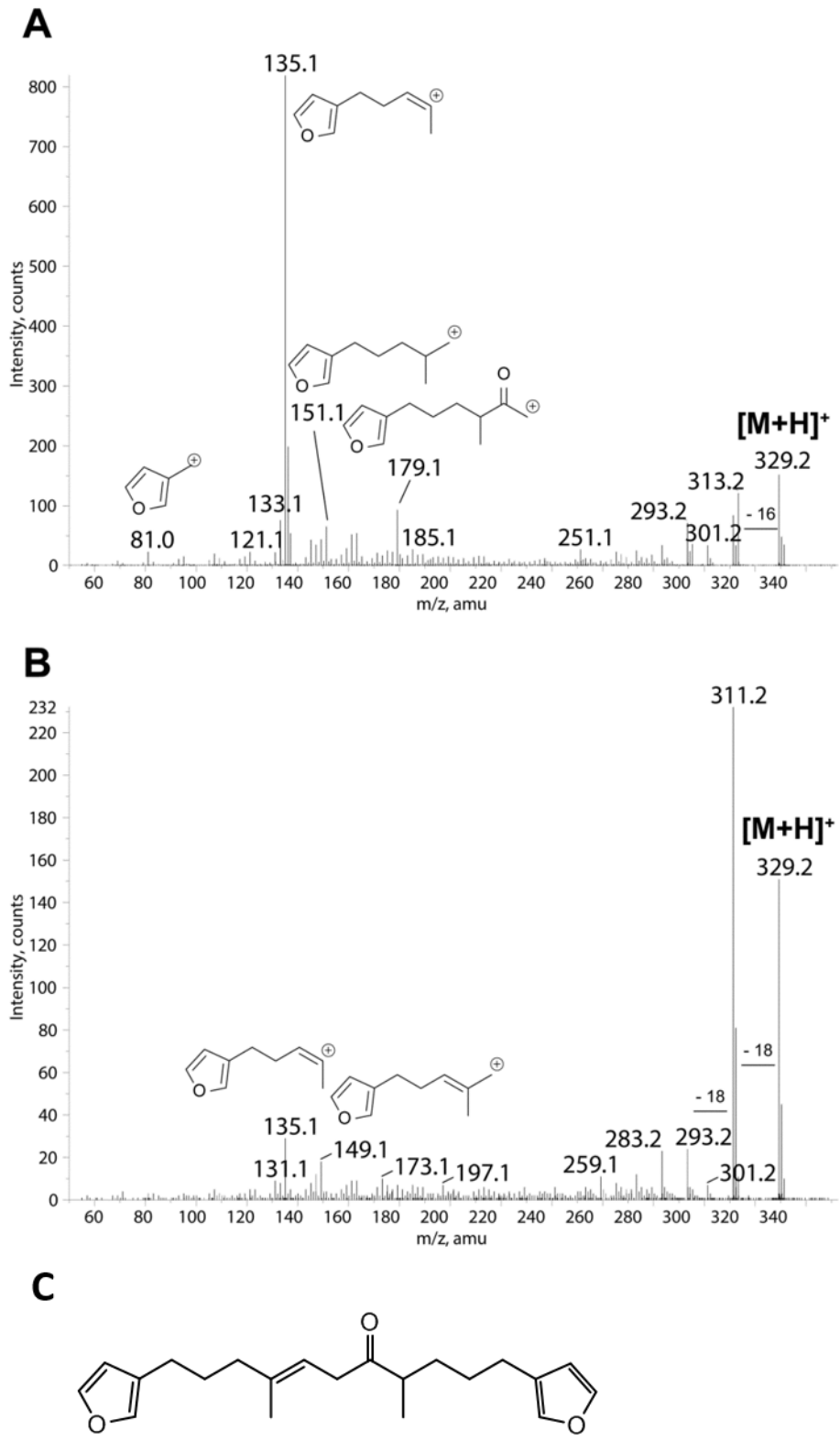


Figure S6. LC-MS/MS spectra of the $[M+H]^+$ species of compounds **7** (A) and **8** (B) (*m/z* 329.21), collision voltage 20 V. The main product ions are represented. (C) Known furanoterpene sharing the same molecular formula and compatible with the MS/MS data of compound **7**: furospongenone (Kazlauskas *et al.*, 1976).

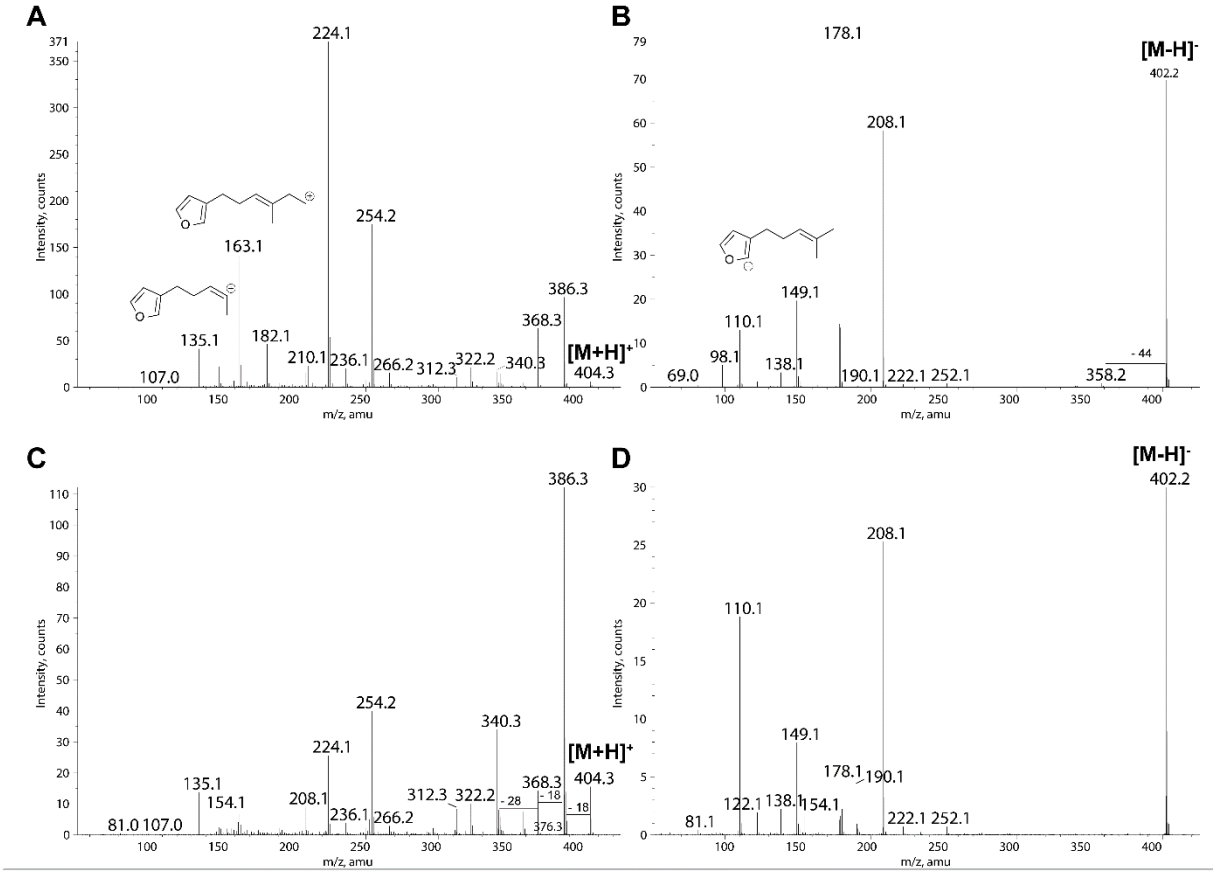


Figure S7. LC-MS/MS spectra of compounds **12a** and **12b** in positive (A, C) and negative (B, D) ion modes. (A) $[M+H]^+$ species of compound **12a** (*m/z* 404.28), collision voltage 20 V, (B) $[M-H]^-$ species of compound **12a** (*m/z* 402.26), collision voltage -30 V, (C) $[M+H]^+$ species of compound **12b** (*m/z* 404.28), collision voltage 20 V, (D) $[M-H]^-$ species of compound **12b** (*m/z* 402.26), collision voltage -30 V. The assigned product ions are represented.

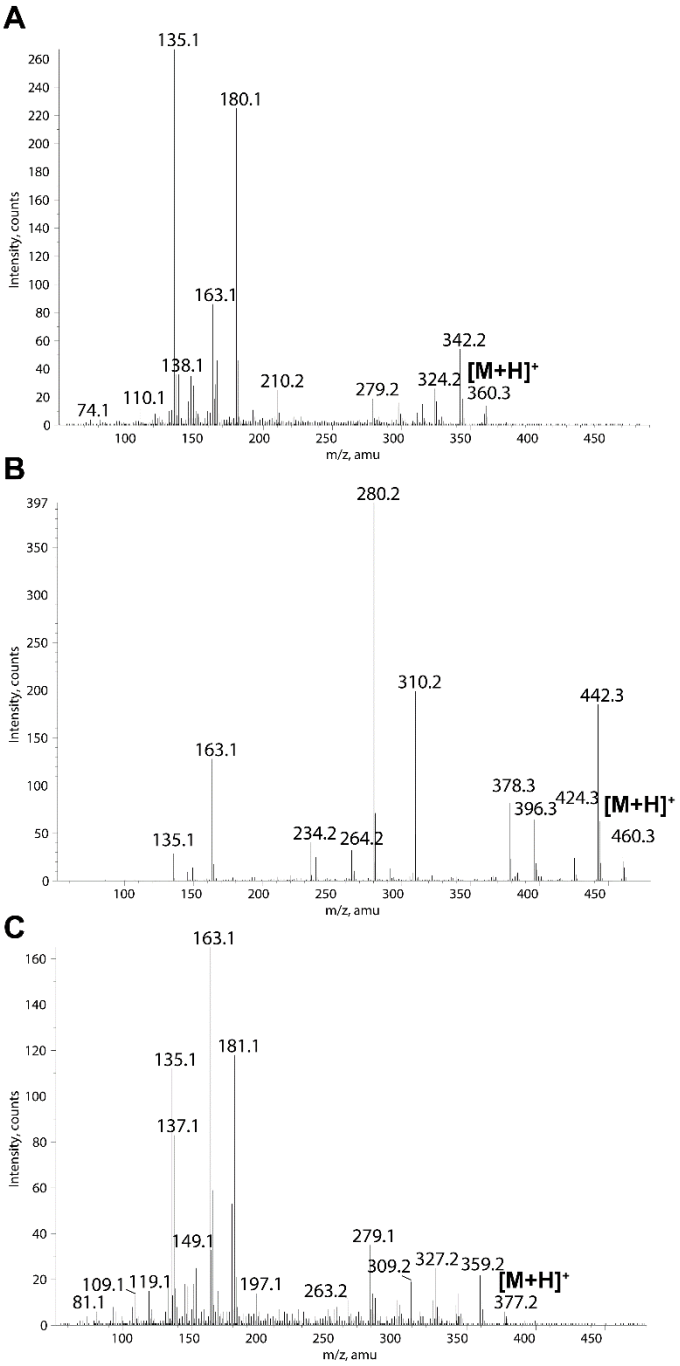


Figure S8. LC-MS/MS spectra of the $[M+H]^+$ species of compounds **6** (A, *m/z* 360.3), **14** (B, *m/z* 460.3) and **13** (C, *m/z* 377.2), collision voltage 20 V.

Conclusions et perspectives

Conclusion et Perspectives

Si les métaux sont nécessaire pour le bon fonctionnement des systèmes biologiques (Nies, 1999), ils n'en restent pas moins dangereux car leur toxicité se développe par bioaccumulation le long de la chaîne alimentaire et impacte dangereusement la santé des écosystèmes.

Les éponges marines, animaux filtreurs actifs, peuvent concentrer dans leurs tissus différents métaux toxiques. Ainsi, plusieurs études ont proposé des éponges comme bioindicateurs de pollution métallique et comme outil de zooremédiation, avec notamment l'éponge de toilette, *Spongia officinalis*, qui fait l'objet de cette thèse (Pérez *et al.*, 2005, Gifford *et al.*, 2006). Beaucoup de Spongiaires, en particulier les Démosponges sont connues pour héberger une communauté microbienne importante, qui dans certains cas peut représenter jusqu'à 40 % de leur volume (Hentschel *et al.*, 2006). Bien que le rôle de ces micro-organismes chez leur hôte soit encore peu connu, il a été proposé qu'ils contribueraient au métabolisme de l'éponge en tant que source nutritive (Wilkinson et Garrone, 1980, Webster et Taylor, 2012) et à sa défense par la production de métabolites secondaires contre les prédateurs, les compétiteurs ou des micro-organismes (Bakus *et al.*, 1986, Taylor *et al.*, 2007).

La résistance aux métaux toxiques a été décrite pour de nombreuses bactéries isolées à partir d'environnements marins pollués (Sabry *et al.*, 1997, Sabdono *et al.*, 2012, Santos-Gandelman *et al.*, 2014). Pour survivre dans ces environnements, les bactéries ont développé une grande diversité de systèmes de régulation qui assurent l'homéostasie des métaux lourds pour en limiter les effets toxiques (Nies, 1999).

Plusieurs études ont montré que la présence de métaux lourds dans l'environnement pouvait affecter la composition des communautés microbiennes associées aux éponges (Webster *et al.*, 2001). Les bactéries cultivables associées pourraient être utilisées comme bioindicateurs de contaminations métalliques (Selvin *et al.*, 2009). En effet, les variations spécifiques de la composition des communautés bactériennes associées aux éponges ont été proposées comme facteurs de la variation des niveaux d'accumulation métallique par les éponges (Pan *et al.*, 2011).

Les objectifs de cette thèse étaient de mettre en évidence la diversité chimique et d'étudier les bactéries associées à l'éponge accumulatrice *Spongia officinalis* et tolérantes aux métaux toxiques.

Les résultats présentés dans le **chapitre 1** ont été obtenus par empreinte moléculaire par PCR-DGGE combinée à une approche culture dépendante et hybridation *in situ*. Des dosages de métaux conduits sur des échantillons d'eau de mer et d'éponge ont tout d'abord permis de confirmer la capacité de l'holobionte éponge à concentrer les métaux. Par ailleurs, notre étude a permis de caractériser pour la première fois la communauté bactérienne associée à l'éponge marine *S. officinalis* dans un environnement pollué en métaux. Des empreintes moléculaires ont permis d'accéder à la communauté bactérienne totale spécifiquement associée à cette éponge. Une relative stabilité des profils bactériens de spécimens récoltés sur trois années et deux sites différentiellement impactés par la pollution métallique a été observée.

La communauté bactérienne cultivable de l'éponge et tolérante aux métaux a aussi été isolée. Ces souches ont été majoritairement affiliées au phylum des *Proteobacteria*, ainsi qu'aux *Firmicutes* et *Actinobacteria*. Elles présentaient de forts niveaux de tolérance aux métaux. Les représentants du genre *Pseudovibrio* (*Alpha-Proteobacteria*) ont été visualisés au niveau de l'enveloppe dermale et le long des lacunes sous-dermales en faible abondance et validés comme des épibiontes de *S. officinalis*. Les souches cultivables de ce genre semblaient être un modèle intéressant pour comprendre la réponse bactérienne à un stress métallique contrôlé.

Ce travail constitue une étape essentielle à la compréhension du fonctionnement de l'écosystème formé par une éponge et ses bactéries associées soumis à une pression anthropogénique, l'exposition aux métaux. Ces observations soulèvent tout de même une question fondamentale qui est de comprendre si les éponges recrutent des bactéries pour leur capacité à accumuler des métaux, ce qui les aideraient à survivre à un environnement pollué. A l'inverse, l'environnement pollué que représente l'éponge ne pourrait-il pas induire la mise en place de mécanisme de résistance chez ses bactéries associées ?

Des dosages métalliques complémentaires des fractions bactériennes et cellulaires des éponges permettraient de comprendre leur compartimentation et caractériser la proportion des métaux accumulés par les bactéries associées aux éponges. Il serait aussi intéressant de répéter les expériences d'isolement de la communauté bactérienne cultivable sur des

spécimens de *S. officinalis* maintenus en aquariums avec des conditions d'exposition métallique contrôlées suivant un gradient de pollution.

Les résultats obtenus dans le **Chapitre 2** présentent pour la première fois l'utilisation d'une souche du genre *Pseudovibrio* comme modèle d'étude dans la compréhension de la réponse à un stress métallique d'une souche bactérienne épibionte d'un organisme benthique filtreur soumis à d'importants niveaux de pollution métallique. La résistance vis-à-vis du cuivre de la souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNIO53 a été analysée par des approches combinées de protéogénomique (électrophorèse bidimensionnelle, séquençage du génome) et de microscopie (microscopie électronique à balayage couplée à une analyse élémentaire EDX).

Cette souche séquestre le cuivre dans les compartiments intra- et extra-cellulaires. Environ 10% du cuivre ont été séquestrés dans les culots et 7% ont été adsorbés par les substances polymériques extracellulaires excrétées par la souche en condition de stress métallique. La majorité du métal est éliminé dans le surnageant (50%). L'efflux du cuivre semblerait donc être le principal mécanisme mis en place par la bactérie pour survivre dans un milieu contaminé par du cuivre.

Il semblerait que les EPS n'interviendraient que de façon minime dans l'adsorption du cuivre, mais nous avons tout de même choisi d'investiguer la capacité de la souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNIO53 à produire des substances polymériques extracellulaires en condition de stress métallique. Cette production n'a pas été pas affectée en présence de cuivre dans le milieu. En revanche, la composition des substances polymériques extracellulaires a été modifiée avec une importante diminution du contenu protéique des EPS associées au culot bactéries.

Des observations préliminaires en MEB-EDX ont permis de confirmer cette séquestration métallique. Une optimisation des protocoles de préparation des échantillons adaptés à l'observation de souches bactériennes marines et exposés au cuivre a été nécessaire avant d'obtenir les premiers résultats interprétables. Des analyses complémentaires en MEB-EDX et MET-EDX devront être mises en place afin d'approfondir ces premières observations et de caractériser avec plus de précision les compartiments cellulaires impliqués dans la séquestration métallique.

Le séquençage du génome de cette souche a été réalisé par Ion torrent et a permis de générer une banque d'ORFs utilisable pour l'identification des protéines d'intérêt par empreinte peptidique. En parallèle, une analyse protéomique classique a été conduite sur cette souche en absence ou en présence de cuivre afin de mettre en évidence les protéines impliquées dans la réponse bactérienne à une exposition au cuivre. Trois mécanismes principaux sont affectés en présence de cuivre, le transport périplasmique de solutés, le métabolisme et l'adaptation au stress par la surexpression de protéines impliquées dans la motilité flagellaire et la chimiotaxie. Cette souche semble limiter l'import indirect de cuivre dans la cellule tout en essayant de maintenir son métabolisme. Les données générées par le séquençage de la souche ont été utilisées afin de terminer l'interprétation de données de protéomique. Cette méthode classique de protéomique comparative semble peu informative et ne donne qu'un aperçu des protéines impliquées dans la résistance au cuivre de la souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53.

A l'issue de la thèse, cette étude sera complétée par une comparaison des génomes et des données de protéomique "shot-gun" de trois souches de *Pseudovibrio* : 2011SOCNI53 hautement tolérante au cuivre, 2011SOCCUA9 hautement tolérante au nickel et 2011SOCZNC4 faiblement tolérante aux cuivre, nickel, zinc. A terme, ce projet devrait permettre d'identifier des mécanismes de tolérance aux métaux au sein du genre *Pseudovibrio* et d'appréhender les différences de tolérance aux métaux entre souches.

Par ailleurs, l'éponge *S. officinalis* a été largement décrite comme une source importante de terpènes : des diterpènes, mais surtout des terpènes en C_{21} de type furane et sesterterpènes de type scalarane (Minale, 1978; Liu *et al.*, 2006), ainsi que des stérols avec les hydroxy-, seco- et époxy-stérols (Bergquist *et al.*, 1980). Certains terpènes isolés de *S. officinalis* ont été caractérisés comme des composés bioactifs tels que la furospongine-1, qui a révélé des activités antibactériennes, antiprotozoaires et cytotoxiques (Cimino *et al.*, 1971; Orhan *et al.*, 2010), et les furospongine-2, furospongine-5, isoagatholactone, 11β-hydroxyspongi-12-ène-16-one et 11β-acetoxyspongi-12-ène-16-one, qui ont montré des activités cytotoxiques (Gonzalez *et al.*, 1984; De Giulio *et al.*, 1989; Garrido *et al.*, 1997). Leur rôle dans l'éponge reste encore inconnu et la diversité des molécules produites par l'éponge ou ses micro-organismes associés n'a encore jamais été étudiée en liaison avec les paramètres environnementaux, tels que la pollution métallique.

Notre étude, présentée dans le **chapitre 3**, a permis d'évaluer la chimiodiversité chez *S. officinalis* dans un contexte de pollution environnementale par la combinaison d'empreintes métaboliques par LC-MS et d'analyses statistiques multivariées. Une importante variabilité temporelle et spatiale de l'expression des métabolites secondaires a été mise en évidence. L'utilisation de la spectrométrie de masse équipée d'une source électrospray et d'un analyseur quadrupôle-temps de vol couplée à des analyses statistiques de type ACP et à la spectrométrie de masse en tandem, restent encore une méthode de choix pour la découverte de nouveaux composés.

Cette variabilité était liée à la variation de l'expression des molécules de la famille des furanosesterterpènes. L'un d'eux, la deméthylfurospongine-4, a été isolé et caractérisé par RMN. Son analyse structurale en comparaison avec des données de LC-MS/MS générées en modes positif et négatif a permis de déduire d'autres molécules de cette famille qui caractérisent la variabilité spatiale et temporelle des profils métaboliques chez *S. officinalis*.
Il est intéressant de noter que les résultats obtenus étaient en accord avec la stabilité relative de la diversité bactérienne totale entre les deux sites de l'étude différentiellement impactés par la pollution métallique, Cortiou et Riou, mais pourraient être dues à d'autres facteurs environnementaux qui restent encore à découvrir.

Références bibliographiques

A

Abad, A., Agullo, C., Arno, M., Marin, M.L., and Zaragoza, R.J. (1996) Podocarpane-to-spongian skeleton conversion. Synthesis of (+)-isoagatholactone and (–)-spongia-13(16),14-diene. *J. Chem. Soc.* 2193–2199.

Adinolfi, R., Migliuolo, A., Piccialli, V., and Sica, D. (1994) Isolation and Synthesis of a New 9,11-Secosterol from the Sponge *Spongia officinalis*. *J. Nat. Prod.* **57**: 1220–1226.

Agogué, H., Casamayor, E.O., Bourrain, M., Obernosterer, I., Joux, F., Herndl, G.J., and Lebaron, P. (2005) A survey on bacteria inhabiting the sea surface microlayer of coastal ecosystems. *FEMS Microbiol. Ecol.* **54**: 269–280.

Almeida, W.I., Vieira, R.P., Cardoso, A.M., Silveira, C.B., Costa, R.G., Gonzalez, A.M., *et al.* (2009) Archaeal and bacterial communities of heavy metal contaminated acidic waters from zinc mine residues in Sepetiba Bay. *Extremophiles* **13**: 263–271.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403–410.

Alvarez-Ayuso, E., García-Sánchez, A., and Querol, X. (2003) Purification of metal electroplating waste waters using zeolites. *Water Res.* **37**: 4855–4862.

Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., and Stahl, D.A. (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1919–1925.

Anderson, A.P., Beveridge, A.A., and Capon, R. (1994) Pharmacological properties of the natural marine product furospongin-1. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **21**: 945–953.

Angiuoli, S.V. and Salzberg, S.L. (2011) Mugsy: fast multiple alignment of closely related whole genomes. *Bioinformatics* **27**: 334–342.

Arthur, E.L., Rice, P.J., Rice, P.J., Anderson, T.A., Baladi, S.M., Henderson, K.L.D., and Coats, J.R. (2005) Phytoremediation-An Overview. *Crit. Rev. Plant Sci.* **24**: 109–122.

B

Bakus, G.J., Targett, N.M., and Schulte, B. (1986) Chemical ecology of marine organisms: An overview. *J. Chem. Ecol.* **12**: 951–987.

Baldacconi, R., Cardone, F., Longo, C., Mercurio, M., Marzano, C.N., Gaino, E., and Corriero, G. (2010) Transplantation of *Spongia officinalis L.* (Porifera, Demospongiae): a technical approach for restocking this endangered species. *Mar. Ecol.- Evol. Perspect.* **31**: 309–317.

Baldacconi, R., Nonnis-Marzano, C., Gaino, E., and Corriero, G. (2007) Sexual reproduction, larval development and release in *Spongia officinalis L.* (Porifera, Demospongiae) from the Apulian coast. *Mar. Biol.* **152**: 969–979.

Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., *et al.* (2012) SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol. J. Comput. Mol. Cell Biol.* **19**: 455–477.

Barker, M. and Rayens, W. (2003) Partial least squares for discrimination. *J. Chemom.* **17**: 166–173.

Barwick, M. and Maher, W. (2003) Biotransference and biomagnification of selenium copper, cadmium, zinc, arsenic and lead in a temperate seagrass ecosystem from Lake Macquarie Estuary, NSW, Australia. *Mar. Environ. Res.* **56**: 471–502.

Bauvais, C., Zirah, S., Piette, L., Chaspoul, F., Domart-Coulon, I., Chapon, V., *et al.* (2015) Sponging up metals: Bacteria associated with the marine sponge *Spongia officinalis*. *Mar. Environ. Res.* **104**: 20–30.

Becerro, M.A., Lopez, N.I., Turon, X., and Uriz, M.J. (1994) Antimicrobial activity and surface bacterial film in marine sponges. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **179**: 195–205.

Bergmann, W. (1949) Comparative biochemical studies on the lipids of marine invertebrates, with special reference to the sterols. *J Mar Res* **8**: 137–176.

Bergquist, P.R., Hofheinz, W., Hofheinz, W., and Oesterhelt, G. (1980) Sterol composition and the classification of the demos*pongia*e. *Biochem. Syst. Ecol.* **8**: 423–435.

Bergquist, P.R., Karuso, P., Cambie, R.C., and Smith, D.J. (1991) Sterol composition and classification of the Porifera. *Biochem. Syst. Ecol.* **19**: 17–24.

Berthet, B., Mouneyrac, C., Pérez, T., and Amiard-Triquet, C. (2005) Metallothionein concentration in sponges (*Spongia officinalis*) as a biomarker of metal contamination. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **141**: 306–313.

Bertine, K.K. and Goldberg, E.D. (1972) Trace elements in clams, mussels, and shrimp. *Limnol Ocean. 17 No 6 877-884Nov 1972*.

Beveridge, T.J. (1989) Role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization. *Annu. Rev. Microbiol.* **43**: 147–171.

Bhaskar, P.V. and Bhosle, N.B. (2006) Bacterial extracellular polymeric substance (EPS): a carrier of heavy metals in the marine food-chain. *Environ. Int.* **32**: 191–198.

Bhaskar, P.V. and Bhosle, N.B. (2005) Microbial extracellular polymeric substances in marine biogeochemical processes. *Curr. Sci.* **88**: 45–53.

Biondo, R., da Silva, F.A., Vicente, E.J., Souza Sarkis, J.E., and Schenberg, A.C.G. (2012) Synthetic phytochelatin surface display in *Cupriavidus metallidurans* CH34 for enhanced metals bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* **46**: 8325–8332.

Blanchard, G., Maunaye, M., and Martin, G. (1984) Removal of heavy metals from waters by means of natural zeolites. *Water Res.* **18**: 1501–1507.

Blériot, C., Gault, M., Gueguen, E., Arnoux, P., Pignol, D., Mandrand-Berthelot, M.-A., and Rodrigue, A. (2014) Cu binding by the Escherichia coli metal-efflux accessory protein RcnB. *Metallomics* **6**: 1400–1409.

Blindauer, C.A., Harrison, M.D., Parkinson, J.A., Robinson, A.K., Cavet, J.S., Robinson, N.J., and Sadler, P.J. (2001) A metallothionein containing a zinc finger within a four-metal cluster protects a bacterium from zinc toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 9593–9598.

Blindauer, C.A., Harrison, M.D., Robinson, A.K., Parkinson, J.A., Bowness, P.W., Sadler, P.J., and Robinson, N.J. (2002) Multiple bacteria encode metallothioneins and SmtA-like zinc fingers. *Mol. Microbiol.* **45**: 1421–1432.

Bindel Connelly, M., Young, G.M., and Sloma, A. (2004) Extracellular proteolytic activity plays a central role in swarming motility in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **186**: 4159–4167.

Blunt, J.W., Copp, B.R., Keyzers, R.A., Munro, M.H.G., and Prinsep, M.R. (2012) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **29**: 144.

Blunt, J.W., Copp, B.R., Keyzers, R.A., Munro, M.H.G., and Prinsep, M.R. (2014) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **31**: 160.

Bohdziewicz, J., Bodzek, M., and Wąsik, E. (1999) The application of reverse osmosis and nanofiltration to the removal of nitrates from groundwater. *Desalination* **121**: 139–147.

Bondarev, V., Richter, M., Romano, S., Piel, J., Schwedt, A., and Schulz-Vogt, H.N. (2013) The genus *Pseudovibrio* contains metabolically versatile bacteria adapted for symbiosis. *Environ. Microbiol.* **15**: 2095–2113.

Bonini, C., Cooper, C.B., Kazlauskas, R., Wells, R.J., and Djerassi, C. (1983) Minor and trace sterols in marine invertebrates. Part 41. Structure and stereochemistry of naturally occurring 9,11-seco sterols. *J. Org. Chem.* **48**: 2108–2111.

Boopathy, R. (2000) Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresour. Technol.* **74**: 63–67.

Bourgoin, B.P. (1990) Mytilus edulis shell as a bioindicator of lead pollution considerations on bioavailability and variability. *Mar Ecol Prog Ser* **61**: 253–262.

Boyer, A., Magnin, J.-P., and Ozil, P. (1998) Copper ion removal by *Thiobacillus ferrooxidans* biomass. *Biotechnol. Lett.* **20**: 187–190.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248–254.

Bramhachari, P.V., Kishor, P., Ramadevi, R., Kumar, R., Rao, B.., and Dubey, S.. (2007) Isolation and characterization of mucous exopolysaccharide (EPS) produced by *Vibrio furnissii* strain VB0S3. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 44–51.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., and Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* **28**: 25–30.

Braymer, J.J. and Giedroc, D.P. (2014) Recent developments in copper and zinc homeostasis in bacterial pathogens. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **19**: 59–66.

Bruins, M.R., Kapil, S., and Oehme, F.W. (2000) Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **45**: 198–207.

Buccella, C., Alvarez, B., Gibb, K., and Padovan, A. (2014) A rod-like bacterium is responsible for high molybdenum concentrations in the tropical sponge Halichondria phakellioides. *Mar. Freshw. Res.* **65**: 838.

Burlando, B., Bavestrello, G., Sarà, M., and Cocito, S. (1990) The aquiferous systems of *Spongia officinalis* and *Cliona viridis* (Porifera) based on corrosion cast analysis. *Ital. J. Zool.* **57**: 233–239.

C

Cafieri, F., Fattorusso, E., Gavagnin, M., and Santacroce, C. (1985) 3β,5α,6β-Trihydroxysterols from the Mediterranean Bryozoan *Myriapora truncata*. *J. Nat. Prod.* **48**: 944–947.

Calabrese, A., Collier, R.S., Nelson, D.A., and MacInnes, J.R. (1973) The toxicity of heavy metals to embryos of the American oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol.* **18**: 162–166.

Calabrese, A., MacInnes, J.R., Nelson, D.A., and Miller, J.E. (1977) Survival and growth of bivalve larvae under heavy-metal stress. *Mar. Biol.* **41**: 179–184.

Calabrese, A. and Nelson, D.A. (1974) Inhibition of embryonic development of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*, by heavy metals. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **11**: 92–97.

Cambie, R.C., Rickard, C.E.F., Rutledge, P.S., and Yang, X.-S. (1999) Scalarolide and scalarin, sesterterpenes from *Cacospongia* and *Ircinia* sponges. *Acta Crystallogr. C* **55**: 112–114.

Lê Cao, K.-A., Boitard, S., and Besse, P. (2011) Sparse PLS discriminant analysis: biologically relevant feature selection and graphical displays for multiclass problems. *BMC Bioinformatics* **12**: 253.

Lê Cao, K.-A., Martin, P.G., Robert-Granié, C., and Besse, P. (2009) Sparse canonical methods for biological data integration: application to a cross-platform study. *BMC Bioinformatics* **10**: 34.

Capelle, N., Braekman, J., Daloze, D., and Tursch, B. (1980) Three new spongian diterpenes from *Spongia officinalis*. *Bull. Soc. Chim. Belg.* **89**: 399–404.

Capon, R.J. and Faulkner, D.J. (1985) Herbasterol, an ichthyotoxic 9,11-secosterol from the sponge *Dysidea herbacea*. *J. Org. Chem.* **50**: 4771–4773.

Cebrian, E., Martí, R., Uriz, J.., and Turon, X. (2003) Sublethal effects of contamination on the Mediterranean sponge *Crambe crambe*: metal accumulation and biological responses. *Mar. Pollut. Bull.* **46**: 1273–1284.

Cebrian, E., Agell, G., Marti, R., and Uriz, M.J. (2006) Response of the Mediterranean sponge Chondrosia reniformis Nardo to copper pollution. *Environ. Pollut.* **141**: 452–458.

Cebrian, E., Uriz, M.-J., and Turon, X. (2007) Sponges as biomonitors of heavy metals in spatial and temporal surveys in northwestern Mediterranean: Multispecies comparison. *Environ. Toxicol. Chem.* **26**: 2430–2439.

Celik, I., Cirik, S., Altinagac, U., Ayaz, A., Celik, P., Tekesoglu, H., *et al.* (2011) Growth performance of bath sponge (*Spongia officinalis* Linnaeus, 1759) farmed on suspended ropes in the Dardanelles (Turkey). *Aquac. Res.* **42**: 1807–1815.

Chang, J.-S., Law, R., and Chang, C.-C. (1997) Biosorption of lead, copper and cadmium by biomass of *Pseudomonas aeruginosa* PU21. *Water Res.* **31**: 1651–1658.

Chapon, V., Piette, L., Vesvres, M.-H., Coppin, F., Le Marrec, C., Christen, R., *et al.* (2012) Microbial diversity in contaminated soils along the T22 trench of the Chernobyl experimental platform. *Appl. Geochem.* **27**: 1375–1383.

Chelossi, E., Milanese, M., Milano, A., Pronzato, R., and Riccardi, G. (2004) Characterisation and antimicrobial activity of epibiotic bacteria from Petrosia ficiformis (Porifera, Demospongiae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **309**: 21–33.

Chen, W., Brühlmann, F., Richins, R.D., and Mulchandani, A. (1999) Engineering of improved microbes and enzymes for bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**: 137–141.

Chevreux, B., Pfisterer, T., Drescher, B., Driesel, A.J., Müller, W.E.G., Wetter, T., and Suhai, S. (2004) Using the miraEST assembler for reliable and automated mRNA transcript assembly and SNP detection in sequenced ESTs. *Genome Res.* **14**: 1147–1159.

Chiffoleau, J.F., Claisse, D., Cossa, D., Ficht, A., Gonzalez, J.L., Guyot, D., *et al.* (2011) La contamination métallique. Programme Seine-Aval, fascicule n°8. IFREMER, Plouzané (France).

Cimino, G., Morrone, R., and Sodano, G. (1982) New Diterpenes from *Spongia officinalis*. *Tetrahedron Lett.* **23**: 4139–4142.

Cimino, G., De Rosa, D., De Stefano, S., and Minale, L. (1974) Isoagatholactone, a diterpene of a new structural type from the sponge *Spongia officinalis*. *Tetrahedron* **30**: 645–649.

Cimino, G., Stefano, S. de, and Minale, L. (1972) Deoxoscalarin, a further sesterterpene with the unusual tetracyclic carbon skeleton of scalarin, from *Spongia officinalis*. *Experientia* **29**: 934–936.

Cimino, G., De Stefano, S., and Minale, L. (1972) Further linear furanoterpenes from marine sponges. *Tetrahedron* **28**: 5983–5991.

Cimino, G., Stefano, S. de, and Minale, L. (1974) Oxidized furanoterpenes from the Sponge *Spongia officinalis*. *Experientia* **30**: 18–20.

Cimino, G., De Stefano, S., Minale, L., and Fattorusso, E. (1971) Furospongin-1, a new C-21 furanoterpene from the sponges *Spongia officinalis* and *Hippospongia communis*. *Tetrahedron* **27**: 4673–4679.

Cimino, G., De Stefano, S., Minale, L., and Fattorusso, E. (1972) Minor C-21 furanoterpenes from the sponges *Spongia officinalis* and *Hippospongia communis*. *Tetrahedron* **28**: 267–273.

Cimino, G., Stefano, S.D., and Minale, L. (1974) Scalaradial, a third sesterterpene with the tetracarbocyclic skeleton of scalarin, from the sponge *Cacospongia mollior*. *Experientia* **30**: 846–847.

Claisse, D. and Alzieu, C. (1993) Copper contamination as a result of antifouling paint regulations? *Mar. Pollut. Bull.* **26**: 395–397.

Clare, A.S. (1996) Marine natural product antifoulants: Status and potential. *Biofouling* **9**: 211–229.

Colgan, D.J. and Ponder, W.F. (2002) Genetic discrimination of morphologically similar, sympatric species of pearl oysters (Mollusca : Bivalvia : *Pinctada*) in eastern Australia. *Mar. Freshw. Res.* **53**: 697–709.

Commissariat général au développement durable (2011) Chapitre V : Pollutions et qualité du milieu marin. In, *Environnement littoral et marin*, Références. Bialec, Nancy (France), pp. 103–128.

Comte, S., Guibaud, G., and Baudu, M. (2008) Biosorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) towards Cd, Cu and Pb for different pH values. *J. Hazard. Mater.* **151**: 185–193.

Congeevaram, S., Dhanarani, S., Park, J., Dexilin, M., and Thamaraiselvi, K. (2007) Biosorption of chromium and nickel by heavy metal resistant fungal and bacterial isolates. *J. Hazard. Mater.* **146**: 270–277.

Connolly, S.R. and Roughgarden, J. (1999) Theory of marine communities: competition, predation, and recruitment-dependent interaction strength. *Ecol. Monogr.* **69**: 277–296.

Connor, P.M. (1972) Acute toxicity of heavy metals to some marine larvae. *Marine Pollution Bulletin* **3**: 190–192.

Cook, S. and Bergquist, P.R. (2001) New species of *Spongia* (Porifera: Demospongiae: Dictyoceratida) from New Zealand, and a proposed subgeneric structure. *N. Z. J. Mar. Freshw. Res.* **35**: 33–58.

Corriero, G., Longo, C., Mercurio, M., Nonnis Marzano, C., Lembo, G., and Spedicato, M.T. (2004) Rearing performance of *Spongia officinalis* on suspended ropes off the Southern Italian Coast (Central Mediterranean Sea). *Aquaculture* **238**: 195–205.

Cunningham, S.D. and Berti, W.R. (2000) Phytoextraction and phytostabilization: Technical, economic and regulatory considerations of the soil-lead issue. In, *Phytoremediation of contaminated soil and water*.

D

Dada, A.O., Olalekan, A.P., Olatunya, A.M., and Dada, O. (2012) Langmuir, Freundlich, Temkin and Dubinin–Radushkevich isotherms studies of equilibrium sorption of Zn^{2+} unto phosphoric acid modified rice husk. *IOSR J. Appl. Chem.* **3**: 38–45.

Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K.H., and Wagner, M. (1999) The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**: 434–444.

Dailianis, T., Tsigenopoulos, C.S., Dounas, C., and Voultsiadou, E. (2011) Genetic diversity of the imperilled bath sponge *Spongia officinalis* Linnaeus, 1759 across the Mediterranean Sea: patterns of population differentiation and implications for taxonomy and conservation. *Mol. Ecol.* **20**: 3757–3772.

Dassenakis, M., Scoullos, M., and Gaitis, A. (1997) Trace metals transport and behaviour in the Mediterranean estuary of Acheloos river. *Mar. Pollut. Bull.* **34**: 103–111.

De, J., Ramaiah, N., and Vardanyan, L. (2008) Detoxification of toxic heavy metals by marine bacteria highly resistant to mercury. *Mar. Biotechnol.* **10**: 471–477.

De Giulio, A., De Rosa, S., Di Vincenzo, G., and Zavodnik, N. (1989) Terpenoids from the North Adriatic Sponge Spongia officinalis. *J. Nat. Prod.* **52**: 1258–1262.

Dellai, A., Deghrigue, M., Laroche-Clary, A., Ben Masour, H., Chouchane, N., Robert, J., and Bouraoui, A. (2012) Evaluation of antiproliferative and anti-inflammatory activities of methanol extract and its fractions from the Mediterranean sponge. *Cancer Cell Int.* **12**: 18.

Dellai, A., Laroche-Clary, A., Mhadhebi, L., Robert, J., and Bouraoui, A. (2010) Anti-inflammatory and antiproliferative activities of crude extract and its fractions of the defensive secretion from the Mediterranean sponge, *Spongia officinalis*. *Drug Dev. Res.* **71**: 412–418.

Dellai, A., Ben Mansour, H., Clary-Laroche, A., Deghrigue, M., and Bouraoui, A. (2012) Anticonvulsant and analgesic activities of crude extract and its fractions of the defensive secretion from the Mediterranean sponge, *Spongia officinalis*. *Cancer Cell Int.* **12**: 15.

Denkhaus, E. and Salnikow, K. (2002) Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **42**: 35–56.

Deshusses, J.M.P., Burgess, J.A., Scherl, A., Wenger, Y., Walter, N., Converset, V., *et al.* (2003) Exploitation of specific properties of trifluoroethanol for extraction and separation of membrane proteins. *Proteomics* **3**: 1418–1424.

Di Benedetto (1997) Méthodes spectrométriques d'analyse et de caractérisation : Les métaux lourds Ecole des Mines de Saint-Etienne, Centre SPIN.

Díez, B., Pedrós-Alió, C., Marsh, T.L., and Massana, R. (2001) Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) To Study the Diversity of Marine Picoeukaryotic Assemblages and Comparison of DGGE with Other Molecular Techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2942–2951.

Djerassi, C. (1981) Recent studies in the marine sterol field. *Pure Appl. Chem.* **53**:

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**: 350–356.

Duffus, J.H. (2009) "Heavy metals" a meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **74**: 793–807.

Dupont, S., Carré-Mlouka, A., Descarrega, F., Ereskovsky, A., Longeon, A., Mouray, E., *et al.* (2014) Diversity and biological activities of the bacterial community associated with the marine sponge Phorbas tenacior (Porifera, Demospongiae). *Lett. Appl. Microbiol.* **58**: 42–52.

Dupont, S., Corre, E., Li, Y., Vacelet, J., and Bourguet-Kondracki, M.-L. (2013) First insights into the microbiome of a carnivorous sponge. *FEMS Microbiol. Ecol.* **86**: 520–531.

E

El Sayed, K.A., Mayer, A.M.S., Kelly, M., and Hamann, M.T. (1999) The biocatalytic transformation of furan to amide in the bioactive marine natural product Palinurin. *J. Org. Chem.* **64**: 9258–9260.

Enticknap, J.J., Kelly, M., Peraud, O., and Hill, R.T. (2006) Characterization of a culturable alphaproteobacterial symbiont common to many marine sponges and evidence for vertical transmission via sponge larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 3724–3732.

Enwall, E.L., Helm, D. van der, Hsu, I.N., Pattabhiraman, T., Schmitz, F.J., Spraggins, R.L., and Weinheimer, A.J. (1972) Crystal structure and absolute configuration of two cyclopropane containing marine steroids. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 215–216.

Erwin, P.M. and Thacker, R.W. (2008) Phototrophic nutrition and symbiont diversity of two Caribbean sponge-cyanobacteria symbioses. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **362**: 139–147.

Erwin, P.M., Pita, L., López-Legentil, S., and Turon, X. (2012) Stability of Sponge-Associated Bacteria over Large Seasonal Shifts in Temperature and Irradiance. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 7358–7368.

F

Faber, E.J., van den Haak, M.J., Kamerling, J.P., and Vliegenthart, J.F.G. (2001) Structure of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* S3. *Carbohydr. Res.* **331**: 173–182.

Fagan, M.J. and Jr, M.H.S. (1994) P-type ATPases of eukaryotes and bacteria: Sequence analyses and construction of phylogenetic trees. *J. Mol. Evol.* **38**: 57–99.

Fahey, S.J. and Garson, M.J. (2002) Geographic variation of natural products of tropical nudibranch *Asteronotus cespitosus*. *J. Chem. Ecol.* **28**: 1773–1785.

Fattorusso, E., Magno, S., Santacroce, C., and Sica, D. (1972) Scalarin, a new pentacyclic C-25 terpenoid from the sponge *Cacospongia scalaris*. *Tetrahedron* **28**: 5993–5997.

Ferguson, A.D. and Deisenhofer, J. (2004) Metal import through microbial membranes. *Cell* **116**: 15–24.

Fernández, B., Campillo, J.A., Martínez-Gómez, C., and Benedicto, J. (2012) Assessment of the mechanisms of detoxification of chemical compounds and antioxidant enzymes in the digestive gland of mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from Mediterranean coastal sites. *Chemosphere* **87**: 1235–1245.

Figueira, M.M., Volesky, B., Ciminelli, V.S.T., and Roddick, F.A. (2000) Biosorption of metals in brown seaweed biomass. *Water Res.* **34**: 196–204.

Finney, N. (2006) NO place to hide. *Nat. Chem. Biol.* **2**: 349–350.

Flemming, H.-C., Neu, T.R., and Wozniak, D.J. (2007) The EPS Matrix: The "house of biofilm cells." *J. Bacteriol.* **189**: 7945–7947.

Ford, T., Sacco, E., Black, J., Kelley, T., Goodacre, R., Berkeley, R.C., and Mitchell, R. (1991) Characterization of exopolymers of aquatic bacteria by pyrolysis-mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1595–1601.

Fournier, M.L., Gilmore, J.M., Martin-Brown, S.A., and Washburn, M.P. (2007) Multidimensional separations-based shotgun proteomics. *Chem. Rev.* **107**: 3654–3686.

Fourest, E. and Volesky, B. (1997) Alginate properties and heavy metal biosorption by marine algae. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **67**: 215–226.

Francesconi, K.A. (1989) Distribution of cadmium in the pearl oyster, Pinctada albina albina (Lamarck), following exposure to cadmium in seawater. *Bull Environ Contam Toxicol* **43**: 321–328.

Frey, B., Keller, C., and Zierold, K. (2000) Distribution of Zn in functionally different leaf epidermal cells of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Cell Environ.* **23**: 675–687.

Fromin, N., Hamelin, J., Tarnawski, S., Roesti, D., Jourdain-Miserez, K., Forestier, N., *et al.* (2002) Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environ. Microbiol.* **4**: 634–643.

Fu, F. and Wang, Q. (2011) Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *J. Environ. Manage.* **92**: 407–418.

Fukunaga, Y., Kurahashi, M., Tanaka, K., Yanagi, K., Yokota, A., and Harayama, S. (2006) *Pseudovibrio* ascidiaceicola sp. nov., isolated from ascidians (sea squirts). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 343–347.

G

Gadd, G.M. (2000) Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**: 271–279.

Gadd, G.M. (1990) Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. *Experientia* **46**: 834–840.

Gaino, E., Baldacconi, R., and Corriero, G. (2007) Post-larval development of the commercial sponge *Spongia officinalis* L. (Porifera, Demospongiae). *Tissue Cell* **39**: 325–334.

Gaino, E., Burlando, B., Zunino, L., Pansini, M., and Buffa, P. (1984) Origin of Male Gametes from Choanocytes in *Spongia officinalis* (porifera, Demospongiae). *Int. J. Invertebr. Reprod. Dev.* **7**: 83–93.

Gaino, E. and Pronzato, R. (1989) Ultrastructural evidence of bacterial damage to *Spongia officinalis* fibres (Porifera, Demospongiae). *Dis. Aquat. Organ.* **6**: 67–74.

Gaino, E., Pronzato, R., Corriero, G., and Buffa, P. (1992) Mortality of commercial sponges: Incidence in two mediterranean areas. *Bolletino Zool.* **59**: 79–85.

Gans, J., Wolinsky, M., and Dunbar, J. (2005) Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science* **309**: 1387–1390.

Garrido, L., Zubía, E., Ortega, M.J., and Salvá, J. (1997) New furanoterpenoids from the sponge *Spongia officinalis*. *J. Nat. Prod.* **60**: 794–797.

Geesey, G.G., Bremer, P.J., Smith, J.J., Muegge, M., and Jang, L.K. (1992) Two-phase model for describing the interactions between copper ions and exopolymers from *Alteromonas atlantica*. *Can. J. Microbiol.* **38**: 785–793.

Gerçe, B., Schwartz, T., Syldatk, C., and Hausmann, R. (2011) Differences between bacterial communities associated with the surface or tissue of Mediterranean sponge species. *Microb. Ecol.* **61**: 769–782.

Gifford, S., Dunstan, H., O'Connor, W., and Macfarlane, G.R. (2005) Quantification of *in situ* nutrient and heavy metal remediation by a small pearl oyster (Pinctada imbricata) farm at Port Stephens, Australia. *Mar. Pollut. Bull.* **50**: 417–422.

Gifford, S., Dunstan, R.H., O'Connor, W., Koller, C.E., and MacFarlane, G.R. (2006) Aquatic zooremediation: deploying animals to remediate contaminated aquatic environments. *Trends Biotechnol.* **25**: 60–65.

Gifford, S., Dunstan, R.H., O'Connor, W., Roberts, T., and Toia, R. (2004) Pearl aquaculture-profitable environmental remediation? *Sci. Total Environ.* **319**: 27–37.

Gifford, S., Macfarlane, G.R., O'connor, W.A., and Dunstan, R.H. (2006) Effect of the pollutants lead, zinc, hexadecane and octocosane on total growth and shell growth in the akoya pearl oyster, pinctada imbricata. *J. Shellfish Res.* **25**: 159–165.

Gilbert, J.J. and Simpson, T.L. (1976) Sex reversal in a freshwater sponge. *J. Exp. Zool.* **195**: 145–151.

Giovannoni, S.J. and Stingl, U. (2005) Molecular diversity and ecology of microbial plankton. *Nature* **437**: 343–348.

De Giulio, A., De Rosa, S., Di Vincenzo, G., and Zavodnik, N. (1989) Terpenoids from the North Adriatic Sponge *Spongia officinalis*. *J. Nat. Prod.* **52**: 1258–1262.

Gold, B., Deng, H., Bryk, R., Vargas, D., Eliezer, D., Roberts, J., *et al.* (2008) Identification of a copper-binding metallothionein in pathogenic mycobacteria. *Nat. Chem. Biol.* **4**: 609–616.

Goldberg, E.D. (1995) Emerging problems in the coastal zone for the twenty-first century. *Mar. Pollut. Bull.* **31**: 152–158.

Gonzalez, A., Darias, V., and Estevez, E. (1982) Contribution to the Biological Study of *Spongia officinalis*. *Farm.-Ed. Sci.* **37**: 179–183.

Gonzalez, A.G., Estrada, D.M., Martin, J.D., Martin, V.S., Perez, C., and Perez, R. (1984) New antimicrobial diterpenes from the sponge *Spongia officinalis*. *Tetrahedron* **40**: 4109–4113.

Gowda, H., Ivanisevic, J., Johnson, C.H., Kurczy, M.E., Benton, H.P., Rinehart, D., *et al.* (2014) Interactive XCMS Online: Simplifying advanced metabolomic data processing and subsequent statistical analyses. *Anal. Chem.*

Gray, J.S. (2002) Biomagnification in marine systems: the perspective of an ecologist. *Mar. Pollut. Bull.* **45**: 46–52.

Gutierrez, T., Biller, D.V., Shimmield, T., and Green, D.H. (2012) Metal binding properties of the EPS produced by Halomonas sp. TG39 and its potential in enhancing trace element bioavailability to eukaryotic phytoplankton. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* **25**: 1185–1194.

Gutierrez, T., Morris, G., and Green, D.H. (2009) Yield and physicochemical properties of EPS from *Halomonas* sp. strain TG39 identifies a role for protein and anionic residues (sulfate and phosphate) in emulsification of n-hexadecane. *Biotechnol. Bioeng.* **103**: 207–216.

Gutierrez, T., Shimmield, T., Haidon, C., Black, K., and Green, D.H. (2008) Emulsifying and Metal Ion Binding Activity of a Glycoprotein Exopolymer Produced by *Pseudoalteromonas* sp. Strain TG12. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 4867–4876.

Guzzo, A., Diorio, C., and DuBow, M.S. (1991) Transcription of the Escherichia coli fliC gene is regulated by metal ions. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2255–2259.

H

Hadas, E., Shpigel, M., and Ilan, M. (2005) Sea ranching of the marine sponge *Negombata magnifica* (Demospongiae, Latrunculiidae) as a first step for latrunculin B mass production. *Aquaculture* **244**: 159–169.

Hamdy, A.A. (2000) Biosorption of heavy metals by marine algae. *Current Microbiology* **41**: 232–238.

Hamer, D.H. (1986) Metallothionein. *Annu. Rev. Biochem.* **55**: 913–951.

Hamon, M.-C. and Thomas-Bouil, M. (1990) Rétention de métaux lourds : un procédé écologique. *Eau Ind. Nuis.* 91–93.

Hansen, I.V., Weeks, J.M., and Depledge, M.H. (1995) Accumulation of copper, zinc, cadmium and chromium by the marine sponge *Halichondria panicea Pallas* and the implications for biomonitoring. *Mar. Pollut. Bull.* **31**: 133–138.

Harrah, T., Panilaitis, B., and Kaplan, D. (2006) Microbial Exopolysaccharides. In, Dr,M.D.P., Falkow,S., Rosenberg,E., Schleifer,K.-H., and Stackebrandt,E. (eds), *The Prokaryotes*. Springer New York, pp. 766–776.

Hellio, C., Tsoukatou, M., Maréchal, J.-P., Aldred, N., Beaupoil, C., Clare, A.S., *et al.* (2005) Inhibitory effects of Mediterranean sponge extracts and metabolites on larval settlement of the barnacle *Balanus amphitrite*. *Mar. Biotechnol.* **7**: 297–305.

Hentschel, U., Schmid, M., Wagner, M., Fieseler, L., Gernert, C., and Hacker, J. (2001) Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **35**: 305–312.

Hengstler, J.G., Bolm-Audorff, U., Faldum, A., Janssen, K., Reifenrath, M., Götte, W., *et al.* (2003) Occupational exposure to heavy metals: DNA damage induction and DNA repair inhibition prove co-exposures to cadmium, cobalt and lead as more dangerous than hitherto expected. *Carcinogenesis* **24**: 63–73.

Hentschel, U., Usher, K.M., and Taylor, M.W. (2006) Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS Microbiol. Ecol.* **55**: 167–177.

Hentschel, U., Piel, J., Degnan, S.M., and Taylor, M.W. (2012) Genomic insights into the marine sponge microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**: 641–654.

Hervieu, J. and Nalovic, L. (1965) Dosage des éléments cobalt, nickel, cuivre et zinc et leur distribution dans quelques types de sols de Madagascar. *Cah ORSTOM Ser Péd* **3**: 237–265.

Hill, M.K. (2004) Understanding Environmental Pollution (2nd Edition) Cambridge University Press.

Hinsa, S.M., Espinosa-Urgel, M., Ramos, J.L., and O'Toole, G.A. (2003) Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Mol. Microbiol.* **49**: 905–918.

Hirsch, S. and Kashman, Y. (1988) Spongialactone A, a new spongian diterpene from *Spongia arabica*. *J. Nat. Prod.* **51**: 1243–1245.

Hofer, R., Jeney, Z., and Bucher, F. (1995) Chronic effects of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) and ammonia on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry at water criteria limits. *Water Res.* **29**: 2725–2729.

Hooper, J.N.A. and Soest, R.W.M.V. (2002) Systema Porifera. A Guide to the Classification of Sponges. In, Hooper,J.N.A., Soest,R.W.M.V., and Willenz,P. (eds), *Systema Porifera*. Springer US, pp. 1–7.

Hossain, A. and Aditya, G. (2013) Cadmium biosorption potential of shell dust of the fresh water invasive snail Physa acuta. *J. Environ. Chem. Eng.* **1**: 574–580.

I

INERIS (2010) Données technico-économiques sur les substances chimiques en France : zinc et principaux composés (http://rsde.ineris.fr/).

Issa, H.H., Tanaka, J., and Higa, T. (2003) New cytotoxic Furanosesterterpenes from an Okinawan marine sponge, *Ircinia* sp. *J. Nat. Prod.* **66**: 251–254.

Itoh, T., Sica, D., and Djerassi, C. (1983) Minor and trace sterols in marine invertebrates. Part 35. Isolation and structure elucidation of seventy-four sterols from the sponge *Axinella cannabina*. *J. Chem. Soc. [Perkin 1]* 147–153.

Ivanova, E.P., Kurilenko, V.V., Kurilenko, A.V., Gorshkova, N.M., Shubin, F.N., Nicolau, D.V., and Chelomin, V.P. (2002) Tolerance to Cadmium of Free-Living and Associated with Marine Animals and Eelgrass Marine *Gamma-Proteobacteria*. *Curr. Microbiol.* **44**: 357–362.

Iyer, A., Mody, K., and Jha, B. (2005) Biosorption of heavy metals by a marine bacterium. *Mar. Pollut. Bull.* **50**: 340–343.

J

Jadia, C.D. and Fulekar, M.H. (2009) Phytoremediation of heavy metals: Recent techniques. *Afr. J. Biotechnol.* **8**:

Jana, B.B. and Das, S. (1997) Potential of freshwater mussel (*Lamellidens marginalis*) for cadmium clearance in a model system. *Ecol. Eng.* **8**: 179–193.

Janausch, I.G., Zientz, E., Tran, Q.H., Kröger, A., and Unden, G. (2002) C4-dicarboxylate carriers and sensors in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1553**: 39–56.

Järup, L. (2003) Hazards of heavy metal contamination. *Br. Med. Bull.* **68**: 167–182.

Jeanthon, C. and Prieur, D. (1990) Susceptibility to heavy metals and characterization of heterotrophic bacteria isolated from two hydrothermal vent Polychaete Annelids, *Alvinella pompejana* and *Alvinella caudata*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3308–3314.

Ji, G. and Silver, S. (1995) Bacterial resistance mechanisms for heavy metals of environmental concern. *J. Ind. Microbiol.* **14**: 61–75.

Jiao, N., Zhang, Y., Zeng, Y., Hong, N., Liu, R., Chen, F., and Wang, P. (2007) Distinct distribution pattern of abundance and diversity of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the global ocean. *Environ. Microbiol.* **9**: 3091–3099.

Jones, W.R. (1998) Practical applications of marine bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**: 300–304.

Juberg, D.R., Kleiman, C.F., and Kwon, S.C. (1997) Position paper of the American Council on Science and Health: Lead and human health. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **38**: 162–180.

Jumaryatno, P., Stapleton, B.L., Hooper, J.N.A., Brecknell, D.J., Blanchfield, J.T., and Garson, M.J. (2007) A comparison of sesquiterpene scaffolds across different populations of the tropical marine sponge *Acanthella cavernosa*. *J. Nat. Prod.* **70**: 1725–1730.

K

Kachlany, S.C., Levery, S.B., Kim, J.S., Reuhs, B.L., Lion, L.W., and Ghiorse, W.C. (2001) Structure and carbohydrate analysis of the exopolysaccharide capsule of *Pseudomonas putida* G7. *Environ. Microbiol.* **3**: 774–784.

Kachur, A.V., Koch, C.J., and Biaglow, J.E. (1998) Mechanism of copper-catalyzed oxidation of glutathione. *Free Radic. Res.* **28**: 259–269.

Kaiser, J. (2001) Bioindicators and biomarkers of environmental pollution and risk assessment. 204 pp.

Kaluzhnaya, O.V. and Itskovich, V.B. (2014) Phylogenetic diversity of microorganisms associated with the deep-water sponge Baikalospongia intermedia. *Russ. J. Genet.* **50**: 667–676.

Kang, S.-Y., Lee, J.-U., Moon, S.-H., and Kim, K.-W. (2004) Competitive adsorption characteristics of Co2+, Ni2+, and Cr3+ by IRN-77 cation exchange resin in synthesized wastewater. *Chemosphere* **56**: 141–147.

Karunakaran, E. and Biggs, C.A. (2010) Mechanisms of *Bacillus cereus* biofilm formation: an investigation of the physicochemical characteristics of cell surfaces and extracellular proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **89**: 1161–1175.

Kashman, Y. and Zviely, M. (1980) Furospongolide, a new C21 furanoterpene from a marine organism. *Experientia* **36**: 1279.

Katranitsas, A., Castritsi-Catharios, J., and Persoone, G. (2003) The effects of a copper-based antifouling paint on mortality and enzymatic activity of a non-target marine organism. *Mar. Pollut. Bull.* **46**: 1491–1494.

Kay, W.W. and Ghei, O.K. (1981) Inorganic cation transport and the effects on C4 dicarboxylate transport in Bacillus subtilis. *Can. J. Microbiol.* **27**: 1194–1201.

Kaye, H.R. (1991) Sexual reproduction in four Caribbean commercial sponges. II. Oogenesis and transfer of bacterial symbionts. *Invertebr. Reprod. Amp Dev.* **19**: 13–24.

Kazlauskas, R., Murphy, P.T., Quinn, R.J., and Wells, R.J. (1976) Two new unsymmetrically oxygenated C 21 furanoterpenes from a sponge. *Tetrahedron Letters* **17**: 1333–1334.

Kazlauskas, R., Murphy, P., Ravi, B., Sanders, R., and Wells, R. (1982) Spermidine derivatives and 9,11-secosteroids from a soft coral (*Sinularia* sp.). *Aust. J. Chem.* **35**: 69–75.

Kazlauskas, R., Murphy, P.T., Wells, R.J., and Daly, J.J. (1979) A new diterpene from the sponge *Aplysilla rosea*. *Tetrahedron Lett.* **20**: 903–906.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., *et al.* (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* **28**: 1647–1649.

Kefalas, E., Castritsi-Catharios, J., and Miliou, H. (2003) Bacteria associated with the sponge *Spongia officinalis* as indicators of contamination. *Ecol. Indic.* **2**: 339–343.

Kennedy, A.F. and Sutherland, I.W. (1987) Analysis of bacterial exopolysaccharides. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **9**: 12–19.

Kerr, R.G. and Baker, B.J. (1991) Marine sterols. *Nat. Prod. Rep.* **8**: 465–497.

Kerr, R.G., Kerr, S.L., Pettit, G.R., Herald, D.L., Groy, T.L., and Djerassi, C. (1991) Sterols of marine invertebrates. 63. Isolation and structure elucidation of sutinasterol, the major sterol of the marine sponge *Xestospongia* sp. *J. Org. Chem.* **56**: 58–62.

Kerwin, J.L., Wiens, A.M., and Ericsson, L.H. (1996) Identification of fatty acids by electrospray mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **31**: 184–192.

Kim, S.-Y., Kim, J.-H., Kim, C.-J., and Oh, D.-K. (1996) Metal adsorption of the polysaccharide produced from *Methylobacterium organophilum*. *Biotechnol. Lett.* **18**: 1161–1164.

Kille, P., Stephens, P., Cryer, A., and Kay, J. (1990) The expression of a synthetic rainbow trout metallothionein gene in E. coli. *Biochim. Biophys. Acta* **1048**: 178–186.

Kille, P., Winge, D.R., Harwood, J.L., and Kay, J. (1991) A plant metallothionein produced in E. coli. *FEBS Lett.* **295**: 171–175.

Kolibachuk, D. and Greenberg, E.P. (1993) The *Vibrio fischeri* luminescence gene activator LuxR is a membrane-associated protein. *J. Bacteriol.* **175**: 7307–7312.

Kotrba, P., Dolecková, L., de Lorenzo, V., and Ruml, T. (1999) Enhanced bioaccumulation of heavy metal ions by bacterial cells due to surface display of short metal binding peptides. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1092–1098.

Kühlbrandt, W. (2004) Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**: 282–295.

Kurniawan, T.A., Chan, G.Y.S., Lo, W.-H., and Babel, S. (2006) Physico–chemical treatment techniques for wastewater laden with heavy metals. *Chem. Eng. J.* **118**: 83–98.

L

De Lafontaine, Y., Gagné, F., Blaise, C., Costan, G., Gagnon, P., and Chan, H.M. (2000) Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquat. Toxicol.* **50**: 51–71.

Lakshmi, V. and Ghosal, S. (2014) Antiamoebic activity of marine sponge *Spongia officinalis* var. *ceylonensis Dendy*. *Bangladesh Pharm. J.* **17**: 38–42.

Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In, *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley, Chichester, United Kingdom, pp. 115–175.

Lee, O.O., Wong, Y.H., and Qian, P.-Y. (2009) Inter- and intraspecific variations of bacterial communities associated with marine sponges from San Juan Island, Washington. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 3513–3521.

Leroy, C. (2006) Lutte contre les salissures marines : approche par procédés enzymatiques.

Li, Z. (2009) Application of PCR-DGGE Fingerprinting in Molecular Ecology of Marine Microbial Symbionts. In, *DNA fingerprinting, Sequencing and Chips*. Kresten Ovesen and Ulrich Matthiesen.

Lingard, S.M., Evans, R.D., and Bourgoin, B.P. (1992) Method for the estimation of organic-bound and crystal-bound metal concentrations in bivalve shells. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **48**: 179–184.

Linneus, C. (1759) Systema naturæ per regna tria naturæ, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis.

Liu, Y., Hong, J., Lee, C.-O., Im, K.S., Kim, N.D., Choi, J.S., and Jung, J.H. (2002) Cytotoxic Pyrrolo- and Furanoterpenoids from the sponge *Sarcotragus* Species. *J. Nat. Prod.* **65**: 1307–1314.

Liu, Y., Mansoor, T.A., Hong, J., Lee, C.-O., Sim, C.J., Im, K.S., *et al.* (2003) New Cytotoxic Sesterterpenoids and Norsesterterpenoids from two sponges of the genus *Sarcotragus*. *J. Nat. Prod.* **66**: 1451–1456.

Liu, T., Ramesh, A., Ma, Z., Ward, S.K., Zhang, L., George, G.N., *et al.* (2007) CsoR is a novel *Mycobacterium tuberculosis* copper-sensing transcriptional regulator. *Nat. Chem. Biol.* **3**: 60–68.

Liu, Y., Zhang, S., and Abreu, P.J.M. (2006) Heterocyclic terpenes: linear furano- and pyrroloterpenoids. *Nat. Prod. Rep.* **23**: 630-651.

Lloyd, J.R. (2002) Bioremediation of metals; the application of micro-organisms that make and break minerals. *interactions* **2**: M2.

Lone, M.I., He, Z., Stoffella, P.J., and Yang, X. (2008) Phytoremediation of heavy metal polluted soils and water: Progresses and perspectives. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **9**: 210–220.

Losfeld, G., Escande, V., Jaffré, T., L'Huillier, L., and Grison, C. (2012) The chemical exploitation of nickel phytoextraction: An environmental, ecologic and economic opportunity for New Caledonia. *Chemosphere* **89**: 907–910.

Losfeld, G., de La Blache, P.V., Escande, V., and Grison, C. (2012) Zinc hyperaccumulating plants as renewable resources for the chlorination process of alcohols. *Green Chemistry Letters and Reviews* **5**: 451–456.

Losfeld, G., Saunier, J.-B., and Grison, C. (2014) Minor and trace-elements in apiary products from a historical mining district (Les Malines, France). *Food Chem.* **146**: 455–459.

Lovley, D.R. and Coates, J.D. (1997) Bioremediation of metal contamination. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**: 285–289.

M

Madaio, A., Notaro, G., Piccialli, V., and Sica, D. (1990) Minor 5,6-Secosterols from the Marine Sponge *Hippospongia communis*. Isolation and Synthesis of (7Z,22E,24R)-24-Methyl-5,6-secocholesta-7,22-diene-3β,5β,6-triol. *J. Nat. Prod.* **53**: 565–572.

Madaio, A., Piccialli, V., and Sica, D. (1988) Hipposterol, a unique trihydroxylated 5,6-secosterol from the marine sponge *Hippospongia communis*. *Tetrahedron Lett.* **29**: 5999–6000.

Madaio, A., Piccialli, V., Sica, D., and Corriero, G. (1989) New Polyhydrozysterols from the Dictyoceratid Sponges *Hippospongia Communis*, *Spongia officinalis*, *Ircinia Variabilis*, and *Spongionella gracilis*. *J. Nat. Prod.* **52**: 952–961.

Al-Madfa, H., Abdel-Moati, M. a. R., and Al-Gimaly, F.H. (1998) *Pinctada radiata* (pearl oyster): A bioindicator for metal pollution monitoring in the Qatari waters (Arabian Gulf). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **60**: 245–251.

Mancuso Nichols, C. a., Garon, S., Bowman, J. p., Raguénès, G., and Guézennec, J. (2004) Production of exopolysaccharides by Antarctic marine bacterial isolates. *J. Appl. Microbiol.* **96**: 1057–1066.

Manzo, E., Ciavatta, M.L., Villani, G., Varcamonti, M., Sayem, S.M.A., van Soest, R., and Gavagnin, M. (2011) Bioactive Terpenes from *Spongia officinalis*. *J. Nat. Prod.* **74**: 1241–1247.

Marczenko, Z. and Balcerzak, M. (2000) Chapter 19. Copper. In, *Separation, Preconcentration and Spectrophotometry in Inorganic Analysis*. Elsevier.

Marin, M.G., Bressan, M., and Brunetti, R. (1991) Effects of linear alkylbenzene sulphonate (LAS) on two marine benthic organisms. *Aquat. Toxicol.* **19**: 241–248.

Martin, S. and Griswold, W. (2009) Human health effects of heavy metals. *Environ. Sci. Technol. Br. Cit* **15**: 1–6.

Marvasi, M., Visscher, P.T., and Casillas Martinez, L. (2010) Exopolymeric substances (EPS) from *Bacillus subtilis*: polymers and genes encoding their synthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **313**: 1–9.

Mason, A.Z. and Jenkins, K.D. (1995) Metal detoxification in aquatic organisms. In, *Metal speciation and Bioavailability in aquatic systems*. Tessier, A., Turner, D. R., Chichester, UK, pp. 479–608.

Matyar, F., Kaya, A., and Dinçer, S. (2008) Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey. *Sci. Total Environ.* **407**: 279–285.

Mayer, A.M.S., Glaser, K.B., Cuevas, C., Jacobs, R.S., Kem, W., Little, R.D., *et al.* (2010) The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends Pharmacol. Sci.* **31**: 255–265.

Mayzel, B., Aizenberg, J., and Ilan, M. (2014) The Elemental Composition of Demospongiae from the Red Sea, Gulf of Aqaba. *PloS One* **9**: e95775.

McCutcheon, S.C. and Schnoor, J.L. (2003) Phytoremediation: Transformation and control of contaminants. John Wiley & Sons.

Mejáre, M. and Bülow, L. (2001) Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. *Trends Biotechnol.* **19**: 67–73.

Meldrum, C., Doyle, M.A., and Tothill, R.W. (2011) Next-generation sequencing for cancer diagnostics: a practical perspective. *Clin. Biochem. Rev.* **32**: 177–195.

De Mestre, C., Maher, W., Roberts, D., Broad, A., Krikowa, F., and Davis, A.R. (2012) Sponges as sentinels: Patterns of spatial and intra-individual variation in trace metal concentration. *Mar. Pollut. Bull.* **64**: 80–89.

Meyerhof, O. and Beck, L.V. (1944) Triose Phosphate Isomerase. *J. Biol. Chem.* **156**: 109–120.

Migliuolo, A., Notaro, G., Piccialli, V., and Sica, D. (1990) New Tetrahydroxylated Sterols from the marine sponge *Spongia officinalis*. *J. Nat. Prod.* **53**: 1414–1424.

Migliuolo, A., Piccialli, V., and Sica, D. (1991) Structure elucidation and synthesis of 3-Beta,6-alpha-dihydroxy-9-oxo-9,11-seco-5-alpha-cholest-7-en-11-al, a novel 9,11-Secosterol from the sponge *Spongia officinalis*. *Tetrahedron* **47**: 7937–7950.

Migliuolo, A., Piccialli, V., and Sica, D. (1992) Two New 9,11-Secosterols from the marine sponge *Spongia officinalis* - Synthesis of 9,11-Seco-3-beta,6-alpha,11-trihydroxy-5-alpha-cholest-7-en-9-one. *Steroids* **57**: 344–347.

Migliuolo, A., Piccialli, V., Sica, D., and Giordano, F. (1993) New Δ8- and Δ8(14)-5α-6α-epoxysterols from the marine sponge *Spongia officinalis*. *Steroids* **58**: 134–140.

Milanese, M., Chelossi, E., Manconi, R., Sarà, A., Sidri, M., and Pronzato, R. (2003) The marine sponge *Chondrilla nucula* Schmidt, 1862 as an elective candidate for bioremediation in integrated aquaculture. *Biomol. Eng.* **20**: 363–368.

Minale, L. (1978) Chapter 4: Terpenoids from marine sponges. In, Scheuer,P.J. (ed), *Marine Natural Products: Chemical And Biological Perspectives*. Academic Press, pp. 175–240.

Mittelman, M.W. and Geesey, G.G. (1985) Copper-binding characteristics of exopolymers from a freshwater-sediment bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 846–851.

Miyamoto, T., Sakamoto, K., Amano, H., Arakawa, Y., Nagarekawa, Y., Komori, T., *et al.* (1999) New cytotoxic sesterterpenoids from the nudibranch *Chromodoris inornata*. *Tetrahedron* **55**: 9133–9142.

Molloy, M.P., Herbert, B.R., Walsh, B.J., Tyler, M.I., Traini, M., Sanchez, J.-C., *et al.* (1998) Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* **19**: 837–844.

Montalvo, N.F., Davis, J., Vicente, J., Pittiglio, R., Ravel, J., and Hill, R.T. (2014) Integration of Culture-Based and Molecular Analysis of a Complex Sponge-Associated Bacterial Community. *PLoS ONE* **9**: e90517.

Montersino, S., Prieto, A., Muñoz, R., and De Las Rivas, B. (2008) Evaluation of exopolysaccharide production by *Leuconostoc mesenteroides* strains isolated from wine. *J. Food Sci.* **73**: M196–M199.

Moore, B.S. (2005) Biosynthesis of marine natural products: microorganisms (Part A). *Nat. Prod. Rep.* **22**: 580.

Muchie, M. and Akpor, O.B. (2010) Remediation of heavy metals in drinking water and wastewater treatment systems. *Int. J. Phys. Sci.* **5**:

Müller, A.K., Westergaard, K., Christensen, S., and Sørensen, S.J. (2001) The effect of long-term mercury pollution on the soil microbial community. *FEMS Microbiol. Ecol.* **36**: 11–19.

Muralidharan, J. and Jayachandran, S. (2003) Physicochemical analyses of the exopolysaccharides produced by a marine biofouling bacterium, *Vibrio alginolyticus*. *Process Biochem.* **38**: 841–847.

Murooka, Y. and Nagaoka, T. (1987) Expression of cloned monkey metallothionein in Escherichia coli. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 204–207.

Murray, A.E., Hollibaugh, J.T., and Orrego, C. (1996) Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2676–2680.

Muscholl-Silberhorn, A., Thiel, V., and Imhoff, J.F. (2008) Abundance and bioactivity of cultured sponge-associated bacteria from the Mediterranean sea. *Microb. Ecol.* **55**: 94–106.

Muyzer, G. and Smalla, K. (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* **73**: 127–141.

Muyzer, G., de Waal, E.C., and Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 695–700.

N

Nam, S.-J., Ko, H., Shin, M., Ham, J., Chin, J., Kim, Y., *et al.* (2006) Farnesoid X-activated receptor antagonists from a marine sponge *Spongia* sp. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**: 5398–5402.

Nelson, D.L. and Kennedy, E.P. (1971) Magnesium Transport in *Escherichia coli*: inhibition by cobaltous ion. *J. Biol. Chem.* **246**: 3042–3049.

Nichols, C.M., Garon, S., Bowman, J. p., Raguénès, G., and Guézennec, J. (2004) Production of exopolysaccharides by Antarctic marine bacterial isolates. *J. Appl. Microbiol.* **96**: 1057–1066.

Nichols, C.M., Lardière, S.G., Bowman, J.P., Nichols, P.D., Gibson, J.A.E., and Guézennec, J. (2005) Chemical characterization of exopolysaccharides from Antarctic marine bacteria. *Microb. Ecol.* **49**: 578–589.

Nicolas, E., Ruiz-Pino, D., Buat-Ménard, P., and Bethoux, J.P. (1994) Abrupt decrease of lead concentration in the Mediterranean sea: A response to antipollution policy. *Geophys. Res. Lett.* **21**: 2119–2122.

Nicolaus, B., Schiano Moriello, V., Lama, L., Poli, A., and Gambacorta, A. (2004) Polysaccharides from extremophilic microorganisms. *Orig. Life Evol. Biosphere J. Int. Soc. Study Orig. Life* **34**: 159–169.

Nieboer, E. and Richardson, D.H.S. (1980) The replacement of the nondescript term “heavy metals” by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environ. Pollut. Ser. B Chem. Phys.* **1**: 3–26.

Nies, D.H. (2007) Bacterial Transition Metal Homeostasis. In, Nies,D.H. and Silver,S. (eds), *Molecular Microbiology of Heavy Metals*, Microbiology Monographs. Springer Berlin Heidelberg, pp. 117–142.

Nies, D.H. (2003) Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**: 313–339.

Nies, D.H. (1999) Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**: 730–750.

Nies, D.H. and Silver, S. (1995) Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J. Ind. Microbiol.* **14**: 186–199.

Nieto, J.J., Fernández-Castillo, R., Márquez, M.C., Ventosa, A., Quesada, E., and Ruiz-Berraquero, F. (1989) Survey of metal tolerance in moderately halophilic eubacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2385–2390.

Nisbet, E.G. and Fowler, C.M.R. (1995) Is metal disposal toxic to deep oceans? *Nature* **375**: 715–715.

Nissimov, J., Rosenberg, E., and Munn, C.B. (2009) Antimicrobial properties of resident coral mucus bacteria of Oculina patagonica. *FEMS Microbiol. Lett.* **292**: 210–215.

Noyer, C., Thomas, O.P., and Becerro, M.A. (2011) Patterns of Chemical Diversity in the Mediterranean Sponge Spongia lamella. *PLoS ONE* **6**: e20844.

O

Odawara, F., Kurasaki, M., Suzuki-Kurasaki, M., Oikawa, S., Emoto, T., Yamasaki, F., *et al.* (1995) Expression of human metallothionein-2 in *Escherichia coli*: cadmium tolerance of transformed cells. *J. Biochem. (Tokyo)* **118**: 1131–1137.

O'Farrell, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**: 4007–4021.

O' Halloran, J.A., Barbosa, T.M., Morrissey, J.P., Kennedy, J., O' Gara, F., and Dobson, A.D.W. (2011) Diversity and antimicrobial activity of *Pseudovibrio* spp. from Irish marine sponges. *J. Appl. Microbiol.* **110**: 1495–1508.

Bou-Olayan, A.-H., Al-Mattar, S., Al-Yakoob, S., and Al-Hazeem, S. (1995) Accumulation of lead, cadmium, copper and nickel by pearl oyster, *Pinctada radiata*, from Kuwait marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* **30**: 211–214.

Oliver, L.M., Fisher, W.S., Winstead, J.T., Hemmer, B.L., and Long, E.R. (2001) Relationships between tissue contaminants and defense-related characteristics of oysters (*Crassostrea virginica*) from five Florida bays. *Aquatic Toxicology* **55**: 203–222.

Omae, I. (2003) General aspects of tin-free antifouling paints. *Chem. Rev.* **103**: 3431–3448.

Orhan, I., Şener, B., Kaiser, M., Brun, R., and Tasdemir, D. (2010) Inhibitory activity of marine sponge-derived natural products against parasitic Protozoa. *Mar. Drugs* **8**: 47–58.

Ortega-Morales, B.O., Santiago-García, J.L., Chan-Bacab, M.J., Moppert, X., Miranda-Tello, E., Fardeau, M.L., *et al.* (2007) Characterization of extracellular polymers synthesized by tropical intertidal biofilm bacteria. *J. Appl. Microbiol.* **102**: 254–264.

Ozdemir, G., Ceyhan, N., Ozturk, T., Akirmak, F., and Cosar, T. (2004) Biosorption of chromium(VI), cadmium(II) and copper(II) by *Pantoea* sp. TEM18. *Chem. Eng. J.* **102**: 249–253.

P

Pan, K., Lee, O.O., Qian, P.-Y., and Wang, W.-X. (2011) Sponges and sediments as monitoring tools of metal contamination in the eastern coast of the Red Sea, Saudi Arabia. *Mar. Pollut. Bull.* **62**: 1140–1146.

Patel, B., Balani, M.C., and Patel, S. (1985) Sponge "sentinel" of heavy metals. *Sci. Total Environ.* **41**: 143–152.

Pawlak, Z., Zak, S., and Zablocki, L. (2006) Removal of hazardous metals from groundwater by reverse osmosis. *Pol. J. Environ. Stud.* **15**: 579.

Pérez, T., Longet, D., Schembri, T., Rebouillon, P., and Vacelet, J. (2005) Effects of 12 years' operation of a sewage treatment plant on trace metal occurrence within a Mediterranean commercial sponge (*Spongia officinalis*, Demospongiae). *Mar. Pollut. Bull.* **50**: 301–309.

Pérez, T., Sarrazin, L., Rebouillon, P., and Vacelet, J. (2002) First evidences of surfactant biodegradation by marine sponges (Porifera): an experimental study with a linear alkylbenzenesulfonate. *Hydrobiologia* **489**: 225–233.

Pérez, T., Vacelet, J., and Rebouillon, P. (2004) *In situ* comparative study of several Mediterranean sponges as potential biomonitors of heavy metals. *Bolletino Dei Musei E Degli Instituti Biol. DellUniversita Genova* **68**: 517–525.

Pérez, T., Wafo, E., Fourt, M., and Vacelet, J. (2003) Marine Sponges as Biomonitor of Polychlorobiphenyl Contamination: Concentration and Fate of 24 Congeners. *Environ. Sci. Technol.* **37**: 2152–2158.

De Philippis, R., Colica, G., and Micheletti, E. (2011) Exopolysaccharide-producing cyanobacteria in heavy metal removal from water: molecular basis and practical applicability of the biosorption process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **92**: 697–708.

Pernthaler, A., Pernthaler, J., and Amann, R. (2002) Fluorescence In Situ Hybridization and Catalyzed Reporter Deposition for the Identification of Marine Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 3094–3101.

Piccialli, V. and Sica, D. (1987) Four new trihydroxylated sterols from the sponge *Spongionella gracilis*. *J. Nat. Prod.* **50**: 915–920.

Piel, J. (2009) Metabolites from symbiotic bacteria. *Nat. Prod. Rep.* **26**: 338.

Pile, A.J., Patterson, M.R., and Witman, J.D. (1996) *In situ* grazing on plankton < 10 μm by the boreal sponge *Mycale lingua*. *Mar Ecol Prog Ser* **141**: 95–102.

Pile, A.J. and Young, C.M. (2006) The natural diet of a hexactinellid sponge: Benthic–pelagic coupling in a deep-sea microbial food web. *Deep Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap.* **53**: 1148–1156.

Pilon-Smits, E. (2005) Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **56**: 15–39.

Pouvreau, S., Jonquières, G., and Buestel, D. (1999) Filtration by the pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, under conditions of low seston load and small particle size in a tropical lagoon habitat. *Aquaculture* **176**: 295–314.

Prahalad, A.K. and Seenayya, G. (1986) *In situ* compartmentation and biomagnification of copper and cadmium in industrially polluted Husainsagar Lake, Hyderabad, India. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **15**: 417–425.

Pronzato, R., Bavestrello, G., and Cerrano, C. (1998) Morpho-functional adaptations of three species of *Spongia* (Porifera, Demospongiae) from a Mediterranean vertical cliff. *Bull. Mar. Sci.* **63**: 317–328.

Pronzato, R., Dorcier, M., Sidri, M., and Manconi, R. (2003) Morphotypes of *Spongia officinalis* (Demospongiae, Dictyoceratida) in two Mediterranean populations. *Ital. J. Zool.* **70**: 327–332.

Pronzato, R. and Manconi, R. (2008) Mediterranean commercial sponges: over 5000 years of natural history and cultural heritage. *Mar. Ecol.* **29**: 146–166.

Puglisi, M.P., Paul, V.J., and Slattery, M. (2000) Biogeographic comparisons of chemical and structural defenses of the Pacific gorgonians *Annella mollis* and *A. reticulata*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **207**: 263–272.

Q

Quévrain, E., Domart-Coulon, I., Pernice, M., and Bourguet-Kondracki, M.-L. (2009) Novel natural parabens produced by a Microbulbifer bacterium in its calcareous sponge host Leuconia nivea. *Environ. Microbiol.* **11**: 1527–1539.

R

Radax, R., Rattei, T., Lanzen, A., Bayer, C., Rapp, H.T., Urich, T., and Schleper, C. (2012) Metatranscriptomics of the marine sponge Geodia barretti: tackling phylogeny and function of its microbial community. *Environ. Microbiol.* **14**: 1308–1324.

Raguénès, G., Christen, R., Guezennec, J., Pignet, P., and Barbier, G. (1997) *Vibrio diabolicus* sp. nov., a new polysaccharide-secreting organism isolated from a deep-sea Hydrothermal vent Polychaete Annelid, *Alvinella pompejana*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 989–995.

Raguénès, G., Moppert, X., Richert, L., Ratiskol, J., Payri, C., Costa, B., and Guezennec, J. (2004) A Novel exopolymer-producing bacterium, *Paracoccus zeaxanthinifaciens* subsp. *payriae*, isolated from a Kopara mat located in Rangiroa, an atoll of French Polynesia. *Curr. Microbiol.* **49**:

Rainbow, P.S. (1995) Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* **31**: 183–192.

Rainbow, P.S. (2002) Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environ. Pollut.* **120**: 497–507.

Rainbow, P.S. and Phillips, D.J.H. (1993) Cosmopolitan biomonitors of trace metals. *Mar. Pollut. Bull.* **26**: 593–601.

Raskin, I., Smith, R.D., and Salt, D.E. (1997) Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**: 221–226.

Ravel, J., Amoroso, M.J., Colwell, R.R., and Hill, R.T. (1998) Mercury-resistant actinomycetes from the Chesapeake Bay. *FEMS Microbiol. Lett.* **162**: 177–184.

Ribes, M., Coma, R., and Gili, J.-M. (1999) Natural diet and grazing rate of the temperate sponge *Dysidea avara* (Demospongiae, Dendroceratida) throughout an annual cycle. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **176**: 179–190.

Robinson, B., Schulin, R., Nowack, B., Roulier, S., Menon, M., Clothier, B., *et al.* (2006) Phytoremediation for the management of metal flux in contaminated sites. *For. Snow Landsc. Res.* **80**: 221–224.

Robinson, N.J. (2008) A bacterial copper metallothionein. *Nat. Chem. Biol.* **4**: 582–583.

Rochfort, S.J., Atkin, D., Hobbs, L., and Capon, R.J. (1996) Hippospongins A−F: New Furanoterpenes from a Southern Australian marine sponge *Hippospongia* sp. *J. Nat. Prod.* **59**: 1024–1028.

Romeyer, F.M., Jacobs, F.A., Masson, L., Hanna, Z., and Brousseau, R. (1988) Bioaccumulation of heavy metals in *Escherichia coli* expressing an inducible synthetic human metallothionein gene. *J. Biotechnol.* **8**: 207–220.

Rougeaux, H., Guezennec, J., Carlson, R.W., Kervarec, N., Pichon, R., and Talaga, P. (1999) Structural determination of the exopolysaccharide of *Pseudoalteromonas* strain HYD 721 isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Carbohydr. Res.* **315**: 273–285.

S

Sabdono, A., Radjasa, O.K., and Utomo, H.S. (2012) Screening of multi-metal resistances in a bacterial population isolated from coral tissues of central Java coastal waters, Indonesia. *Int. J. Oceanogr. Mar. Ecol. Syst.* **1**: 11–23.

Sabry, S.A., Ghozlan, H.A., and Abou-Zeid, D.-M. (1997) Metal tolerance and antibiotic resistance patterns of a bacterial population isolated from sea water. *J. Appl. Microbiol.* **82**: 245–252.

Salvato, B., Santamaria, M., Beltramini, M., Alzuet, G., and Casella, L. (1998) The enzymatic properties of *Octopus vulgaris* hemocyanin: o-diphenol oxidase activity. *Biochemistry (Mosc.)* **37**: 14065–14077.

Santoni, V., Molloy, M., and Rabilloud, T. (2000) Membrane proteins and proteomics: Un amour impossible? *Electrophoresis* **21**: 1054–1070.

Santos-Gandelman, J.F., Cruz, K., Crane, S., Muricy, G., Giambiagi-deMarval, M., Barkay, T., and Laport, M.S. (2014) Potential application in mercury bioremediation of a marine sponge-isolated *Bacillus cereus* strain Pj1. *Curr. Microbiol.* 374.

Saravanan, P. and Jayachandran, S. (2008) Preliminary characterization of exopolysaccharides produced by a marine biofilm-forming bacterium *Pseudoalteromonas ruthenica* (SBT 033). *Lett. Appl. Microbiol.* **46**: 1–6.

Satyanarayana, T., Prakash, A., and Johri, B.N. (2012) Microorganisms in Environmental Management: Microbes and Environment Springer Science & Business Media.

Sbriz, L., Aquino, M.R., Alberto de rodriguez, N.M., Fowler, S.W., and Sericano, J.L. (1998) Levels of chlorinated hydrocarbons and trace metals in bivalves and nearshore sediments from the Dominican Republic. *Marine Pollution Bulletin* **36**: 971–979.

Schiff, K., Diehl, D., and Valkirs, A. (2004) Copper emissions from antifouling paint on recreational vessels. *Mar. Pollut. Bull.* **48**: 371–377.

Schmitt, S., Angermeier, H., Schiller, R., Lindquist, N., and Hentschel, U. (2008) Molecular microbial diversity survey of sponge reproductive stages and mechanistic insights into vertical transmission of microbial symbionts. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 7694–7708.

Schmitt, S., Tsai, P., Bell, J., Fromont, J., Ilan, M., Lindquist, N., *et al.* (2012) Assessing the complex sponge microbiota: core, variable and species-specific bacterial communities in marine sponges. *ISME J.* **6**: 564–576.

Schröder, H.C., Batel, R., Lauenroth, S., Hassanein, H.M.A., Lacorn, M., Simat, T., *et al.* (1999) Induction of DNA damage and expression of heat shock protein HSP70 by polychlorinated biphenyls in the marine sponge *Suberites domuncula*. Olivi. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **233**: 285–300.

Schulze, F.E. (1879) Untersuchungen über den bau und die entwicklung der Spongien. Siebente Mittheilung. Die Familie der Spongidae. *Z. Für Wiss. Zool.* **32**: 593–660.

Scott, J.A. and Palmer, S.J. (1988) Cadmium bio-sorption by bacterial exopolysaccharide. *Biotechnol. Lett.* **10**: 21–24.

Scott, J.A. and Palmer, S.J. (1990) Sites of cadmiun uptake in bacteria used for biosorption. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 221–225.

Selvin, J., Priya, S.S., Kiran, G.S., Thangavelu, T., and Bai, N.S. (2009) Sponge-associated marine bacteria as indicators of heavy metal pollution. *Microbiol. Res.* **164**: 352–363.

Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., and D'Ari, R. (2007) Escherichia coli Physiology in Luria-Bertani Broth. *J. Bacteriol.* **189**: 8746–8749.

Sharma, S., Sundaram, C.S., Luthra, P.M., Singh, Y., Sirdeshmukh, R., and Gade, W.N. (2006) Role of proteins in resistance mechanism of *Pseudomonas fluorescens* against heavy metal induced stress with proteomics approach. *J. Biotechnol.* **126**: 374–382.

Shen, Y.-C., Lo, K.-L., Lin, Y.-C., Khalil, A.T., Kuo, Y.-H., and Shih, P.-S. (2006) Novel linear C22-sesterterpenoids from sponge *Ircinia formosana*. *Tetrahedron Lett.* **47**: 4007–4010.

Shepard, J.L., Olsson, B., Tedengren, M., and Bradley, B.P. (2000) Protein expression signatures identified in *Mytilus edulis* exposed to PCBs, copper and salinity stress. *Mar. Environ. Res.* **50**: 337–340.

Shieh, W.Y., Lin, Y.-T., and Jean, W.D. (2004) *Pseudovibrio denitrificans* gen. nov., sp. nov., a marine, facultatively anaerobic, fermentative bacterium capable of denitrification. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 2307–2312.

Shin, J., Rho, J.-R., Sea, Y., Lee, H.-S., Cho, K.W., and Sim, C.J. (2001) Sarcotragins A and B, new sesterterpenoid alkaloids from the sponge *Sarcotragus* sp. *Tetrahedron Letters* **42**: 3005–3007.

Silver, S. and Phung, L. (2005) A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 587–605.

Silver, S. and Walderhaug, M. (1992) Gene regulation of plasmid- and chromosome-determined inorganic ion transport in bacteria. *Microbiol. Rev.* **56**: 195–228.

Simkiss, K. and Taylor, M.G. (1995) Transport of metals across membranes. In, *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*. Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems André Tessier and David R. Turner, pp. 1–44.

Simms, S.A., Keane, M.G., and Stock, J. (1985) Multiple forms of the CheB methylesterase in bacterial chemosensing. *J. Biol. Chem.* **260**: 10161–10168.

Simpson, T.L. (1984) The cell biology of sponge Springer New York.

Singh, R. and Prasad, B.B. (2000) Trace metal analysis: selective sample (copper II) enrichment on an AlgaSORB column. *Process Biochem.* **35**: 897–905.

Sousa, C., Cebolla, A., and de Lorenzo, V. (1996) Enhanced metalloadsorption of bacterial cells displaying poly-His peptides. *Nat. Biotechnol.* **14**: 1017–1020.

Sousa, C., Kotrba, P., Ruml, T., Cebolla, A., and De Lorenzo, V. (1998) Metalloadsorption by *Escherichia coli* cells displaying yeast and mammalian metallothioneins anchored to the outer membrane protein LamB. *J. Bacteriol.* **180**: 2280–2284.

Stabili, L., Licciano, M., Giangrande, A., Longo, C., Mercurio, M., Marzano, C.N., and Corriero, G. (2006) Filtering activity of *Spongia officinalis* var. *adriatica* (Schmidt) (Porifera, Demospongiae) on bacterioplankton: Implications for bioremediation of polluted seawater. *Water Res.* **40**: 3083–3090.

Stabili, L., Licciano, M., Longo, C., Corriero, G., and Mercurio, M. (2008) Evaluation of microbiological accumulation capability of the commercial sponge *Spongia officinalis* var. adriatica (Schmidt) (Porifera, Demospongiae). *Water Res.* **42**: 2499–2506.

Stimson, J. and Kinzie, R.A. (1991) The temporal pattern and rate of release of zooxanthellae from the reef coral Pocillopora damicornis (Linnaeus) under nitrogen-enrichment and control conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **153**: 63–74.

Sudiarta, I.P., Fukushima, T., and Sekiguchi, J. (2010) *Bacillus subtilis* CwlP of the SP-β prophage has two novel peptidoglycan hydrolase domains, muramidase and cross-linkage digesting dd-endopeptidase. *J. Biol. Chem.* **285**: 41232–41243.

Sutherland, K.P., Porter, J.W., and Torres, C. (2004) Disease and immunity in Caribbean and Indo-Pacific zooxanthellate corals. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **266**: 273–302.

T

Tamura, K. and Nei, M. (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* **10**: 512–526.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**: 2725–2729.

Tautenhahn, R., Patti, G.J., Rinehart, D., and Siuzdak, G. (2012) XCMS Online: A web-based platform to process untargeted metabolomic data. *Anal. Chem.* **84**: 5035–5039.

Taylor, M.W., Radax, R., Steger, D., and Wagner, M. (2007) Sponge-associated microorganisms: Evolution, ecology and biotechnological potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**: 295–347.

Thakur, N.L. and Müller, W.E. (2004) Biotechnological potential of marine sponges. *Curr Sci* **86**: 1506–1512.

Thomas, O., Sarrazin, S., Ivanisevic, J., Amade, P., and Pérez, T. (2007) Sponge chemical defences in stress conditions: the case study of the last disease outbreack observed in the NW mediterranean. Ischia, Italie.

Thomas, T.R.A., Kavlekar, D.P., and LokaBharathi, P.A. (2010) Marine Drugs from Sponge-Microbe Association - A Review. *Mar. Drugs* **8**: 1417–1468.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673–4680.

Thompson, J.E., Murphy, P.T., Berquist, P.R., and Evans, E.A. (1987) Environmentally induced variation in diterpene composition of the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Biochem. Syst. Ecol.* **15**: 595–606.

Topçu, N.E., Pérez, T., Grégori, G., and Harmelin-Vivien, M. (2010) *In situ* investigation of *Spongia officinalis* (Demospongiae) particle feeding: Coupling flow cytometry and stable isotope analysis. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **389**: 61–69.

Towe, K.M. and Rützler, K. (1968) Lepidocrocite iron mineralization in keratose sponge granules. *Science* **162**: 268–269.

Tunali, S., Çabuk, A., and Akar, T. (2006) Removal of lead and copper ions from aqueous solutions by bacterial strain isolated from soil. *Chem. Eng. J.* **115**: 203–211.

V

Vacelet, J. (1959) Répartition générale des éponges et systématique des éponges cornées de la région de Marseille et de quelques stations méditerranéennes.

Vacelet, J. (1975) Etude en microscopie électronique de l'association entre bactéries et spongiaires du genre Verrongia (Dictoceratida). *J. Microsc. Biol. Cell.* **23**: 271–288.

Vacelet, J. and Duport, E. (2004) Prey capture and digestion in the carnivorous sponge *Asbestopluma hypogea* (Porifera: Demospongiae). *Zoomorphology* **123**: 179–190.

Vacelet, J., Verdenal, B., and Perinet, G. (1988) The iron mineralization of *Spongia officinalis* L. (Porifera, Dictyoceratida) and its relationships with the collagen skeleton. *Biol. Cell* **62**: 189–198.

Vavasseur, A., Peltier, G., Pignol, D., Bourguignon, J., and Coves, J. (2003) Bio-depollution, bio-remediation.

Verdenal, B., Diana, C., Arnoux, A., and Vacelet, J. (1990) Pollutant levels in Mediterranean commercial sponges. In, *New perspectives in sponge biology*. Smithsonian Institution Press, Washington, pp. 516–524.

Verdenal, B. and Verdenal, M. (1987) Evaluation de l'intérêt economique de la culture d'eponges commerciales sur les côtes méditerranéennes françaises. *Aquaculture* **64**: 9–29.

Vincent, P., Pignet, P., Talmont, F., Bozzi, L., Fournet, B., Guezennec, J., *et al.* (1994) Production and characterization of an exopolysaccharide excreted by a deep-sea hydrothermal vent bacterium isolated from the Polychaete Annelid *Alvinella pompejana*. *Appl. Environ. Microbiol. Appl. Environ. Microbiol.* **60, 60**: 4134, 4134–4141.

Vogel, S. (1977) Current-induced flow through living sponges in nature. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**: 2069–2071.

Vojvoda, J., Lamy, D., Sintes, E., Garcia, J.A.L., Turk, V., and Herndl, G.J. (2014) Seasonal variation in marine-snow-associated and ambient-water prokaryotic communities in the northern Adriatic Sea. *Aquat. Microb. Ecol.* **73**: 211–224.

Volesky, B. (1990) Biosorption of heavy metals. CRC Press.

Volesky, B. (2003) Biosorption process simulation tools. *Hydrometallurgy* **71**: 179–190.

Voultsiadou, E. (2009) Reevaluating sponge diversity and distribution in the Mediterranean Sea. *Hydrobiologia* **628**: 1–12.

Van de Vyver, G. and Willenz, P. (1975) An experimental study of the life-cycle of the fresh-water sponge *Ephydatia fluvitilis* in its natural surroundings. *Wilhelm Rouxs Arch. Dev. Biol.* **177**: 41–52.

W

Wahl, M. (1989) Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling: some basic aspects. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **58**: 175–189.

Wakatsuki, T. (1995) Metal oxidoreduction by microbial cells. *J. Ind. Microbiol.* **14**: 169–177.

Walker, J.M. (2009) The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. In, Walker,J.M. (ed), *The Protein Protocols Handbook*, Springer Protocols Handbooks. Humana Press, pp. 11–15.

Wan, R., Mo, Y., Zhang, X., Chien, S., Tollerud, D.J., and Zhang, Q. (2008) Matrix metalloproteinase-2 and -9 are induced differently by metal nanoparticles in human monocytes: The role of oxidative stress and protein tyrosine kinase activation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **233**: 276–285.

Wang, G. (2006) Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 545–551.

Watanabe, K. (2001) Microorganisms relevant to bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**: 237–241.

Webster, N.S. and Hill, R.T. (2001) The culturable microbial community of the Great Barrier Reef sponge *Rhopaloeides odorabile* is dominated by an *α-Proteobacterium*. *Mar. Biol.* **138**: 843–851.

Weast, R.C., Astle, M.J., and Beyer, W.H. (1984) CRC handbook of chemistry and physics 64 edn. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Webster, N.S. (2007) Sponge disease: a global threat? *Environ. Microbiol.* **9**: 1363–1375.

Webster, N.S. and Hill, R.T. (2001) The culturable microbial community of the Great Barrier Reef sponge Rhopaloeides odorabile is dominated by an α-Proteobacterium. *Mar. Biol.* **138**: 843–851.

Webster, N.S. and Taylor, M.W. (2012) Marine sponges and their microbial symbionts: love and other relationships. *Environ. Microbiol.* **14**: 335–346.

Webster, N.S., Webb, R.I., Ridd, M.J., Hill, R.T., and Negri, A.P. (2001) The effects of copper on the microbial community of a coral reef sponge. *Environ. Microbiol.* **3**: 19–31.

Wei, G., Fan, L., Zhu, W., Fu, Y., Yu, J., and Tang, M. (2009) Isolation and characterization of the heavy metal resistant bacteria CCNWRS33-2 isolated from root nodule of Lespedeza cuneata in gold mine tailings in China. *J. Hazard. Mater.* **162**: 50–56.

Wiens, M., Koziol, C., Hassanein, H.M.A., Batel, R., Schrder, H.C., and Mller, W.E.G. (1998) Induction of gene expression of the chaperones 14-3-3 and HSP70 by PCB 118 (2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl) in the marine sponge *Geodia cydonium*: novel biomarkers for polychlorinated biphenyls. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **165**: 247–257.

Wilkinson, C.R. and Garrone, R. (1980) Nutrition in marine sponges. Involvement of symbiotic bacteria in the uptake of dissolved carbon. In, *Nutrition in the lower Metazoa*. Pergamon Press, Oxford, pp. 157– 161.

Wilkinson, C.R., Garrone, R., and Vacelet, J. (1984) Marine sponges discriminate between food bacteria and bacterial symbionts: Electron microscope radioautography and *in situ* evidence. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **220**: 519–528.

Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., and Tingey, S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6531–6535.

Y

Yahel, G., Whitney, F., Reiswig, H.M., Eerkes-Medrano, D.I., and Leys, S.P. (2007) *In situ* feeding and metabolism of glass sponges (Hexactinellida, Porifera) studied in a deep temperate fjord with a remotely operated submersible. *Limnol. Oceanogr.* **52**: 428–440.

Yang, Z. and Li, Z. (2012) Spatial distribution of prokaryotic symbionts and ammoxidation, denitrifier bacteria in marine sponge Astrosclera willeyana. *Sci. Rep.* **2**: 528.

Yang, J. and Volesky, B. (1999) Biosorption of uranium on *Sargassum* biomass. *Water Res.* **33**: 3357–3363.

Yang, J., Sun, J., Lee, O.O., Wong, Y.H., and Qian, P.Y. (2011) Phylogenetic diversity and community structure of sponge-associated bacteria from mangroves of the Caribbean Sea. *Aquat. Microb. Ecol.* **62**: 231–240.

Z

Zahir, F., Rizwi, S.J., Haq, S.K., and Khan, R.H. (2005) Low dose mercury toxicity and human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **20**: 351–360.

Zhou, J., Bruns, M.A., and Tiedje, J.M. (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 316–322.

Zilm, P.S. (2008) Studies on the stress response in *Fusobacterium nucleatum*.

Annexes

1. Annexe 1

Liste des publications et des communications réalisées pendant la thèse

Publications :

Bauvais, C., Zirah, S., Piette, L., Chaspoul, F., Domart-Coulon, I., Chapon, V., *et al.* (2015) Sponging up metals: Bacteria associated with the marine sponge *Spongia officinalis*. *Marine Environmental Research* **104**: 20–30.

Bauvais, C., Bourguet-Kondracki, M-L., Perez, T., Zirah, S. Metabolite profiling reveals furanoterpene variability in the metal polluted sponge *Spongia officinalis*. (Soumission en cours)

Communications orales :

Bauvais, C., Zirah, S., Piette, L., Chaspoul, F., Domart-Coulon, I., Chapon, V., *et al.* Bactéries associées à l'éponge *Spongia officinalis* et résistances aux métaux, GDR Mediatec, 28 au 30 octobre 2014, Paris.

Bauvais, C., Zirah, Perez, T., Wafo, E., Rebuffat, S., Bourguet-Kondracki, M.L.. Résistance bactérienne aux métaux toxiques chez *Spongia officinalis*, Assemblée générale 2012 du GDR BioChiMar, 10 au 12 décembre 2012, Gif-sur-Yvette.

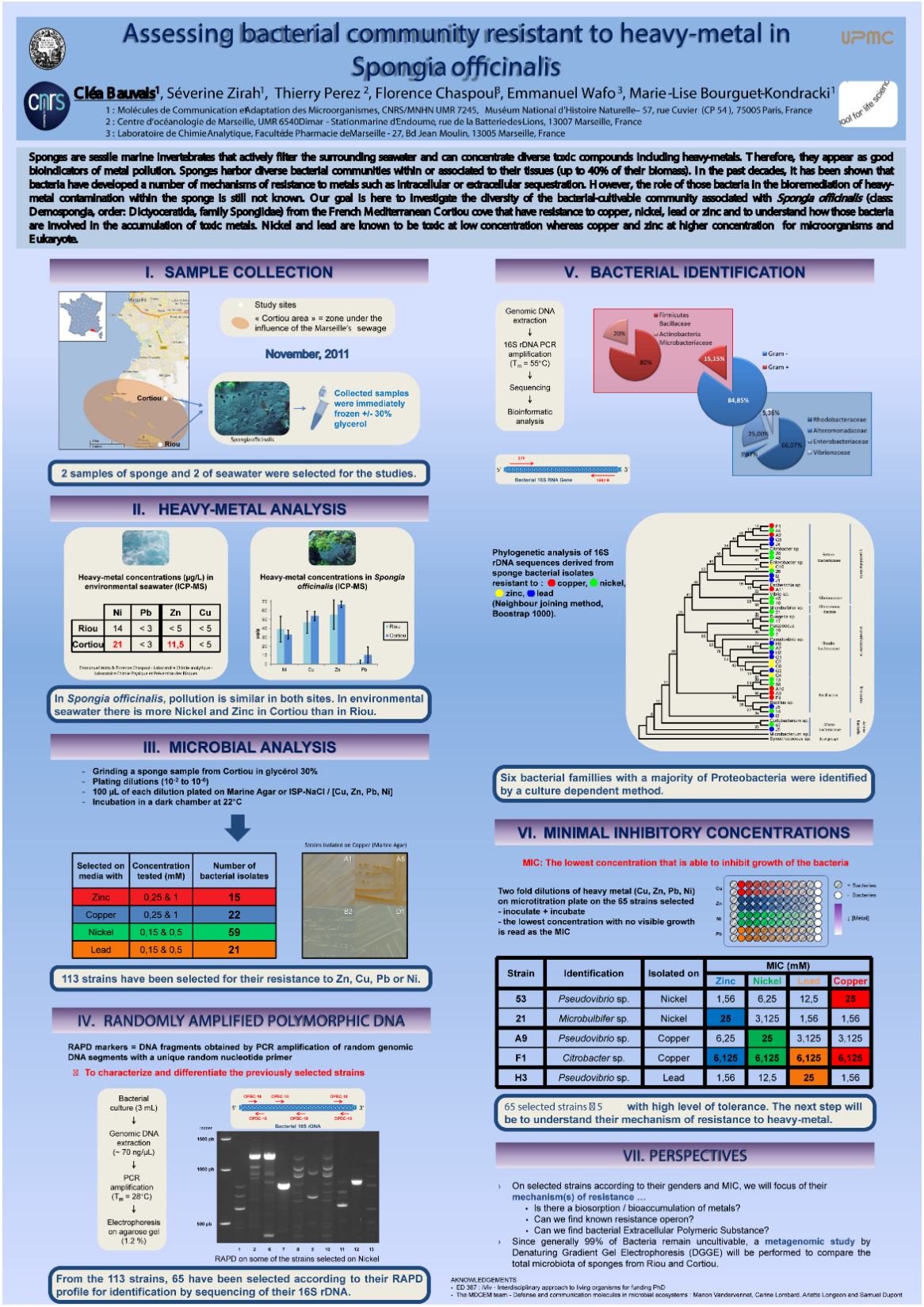
Posters :

C. Bauvais, S. Zirah, T. Perez, F. Chaspoul, E. Wafo, M.L. Bourguet-Kondracki. Bacterial resistance to heavy-metal in *Spongia officinalis* - 13th International Conference on soils, sediments and water, 18 au 20 Mars 2014, Lille.

C. Bauvais, S. Zirah, T. Perez, E. Wafo, S. Rebuffat, M.L. Bourguet-Kondracki. Assessing bacterial community resistant to heavy-metals in *Spongia officinalis* - 1ère Rencontre Nationale 2013 des Jeunes Chercheurs en Écologie Chimique, 5 au 7 juin 2013, Montpellier.

2. Annexe 2

Poster présenté à la 1ère Rencontre Nationale des Jeunes Chercheurs en Écologie Chimique, Montpellier (2012)



Assessing bacterial community resistant to heavy-metal in Spongia officinalis

Cléa Bauvais[1], Séverine Zirah[1], Thierry Perez [2], Florence Chaspoul[3], Emmanuel Wafo[3], Marie-Lise Bourguet-Kondracki[1]

1 : Molécules de Communication et Adaptation des Microorganismes, CNRS/MNHN UMR 7245, Muséum National d'Histoire Naturelle– 57, rue Cuvier (CP 54), 75005 Paris, France
2 : Centre d'océanologie de Marseille, UMR 6540Dimar - Stationmarine d'Endoume, rue de la Batterie-des-Lions, 13007 Marseille, France
3 : Laboratoire de Chimie Analytique, Faculté de Pharmacie de Marseille - 27, Bd Jean Moulin, 13005 Marseille, France

Sponges are sessile marine invertebrates that actively filter the surrounding seawater and can concentrate diverse toxic compounds including heavy-metals. Therefore, they appear as good bioindicators of metal pollution. Sponges harbor diverse bacterial communities within or associated to their tissues (up to 40% of their biomass). In the past decades, it has been shown that bacteria have developed a number of mechanisms of resistance to metals such as intracellular or extracellular sequestration. However, the role of those bacteria in the bioremediation of heavy-metal contamination within the sponge is still not known. Our goal is here to investigate the diversity of the bacterial-cultivable community associated with *Spongia officinalis* (class: Demospongia, order: Dictyoceratida, family Spongiidae) from the French Mediterranean Cortiou cove that have resistance to copper, nickel, lead or zinc and to understand how those bacteria are involved in the accumulation of toxic metals. Nickel and lead are known to be toxic at low concentration whereas copper and zinc at higher concentration for microorganisms and Eukaryote.

I. SAMPLE COLLECTION

2 samples of sponge and 2 of seawater were selected for the studies.

II. HEAVY-METAL ANALYSIS

Heavy-metal concentrations (µg/L) in environmental seawater (ICP-MS)

	Ni	Pb	Zn	Cu
Riou	14	< 3	< 5	< 5
Cortiou	21	< 3	11,5	< 5

Heavy-metal concentrations in *Spongia officinalis* (ICP-MS)

In *Spongia officinalis*, pollution is similar in both sites. In environmental seawater there is more Nickel and Zinc in Cortiou than in Riou.

III. MICROBIAL ANALYSIS

- Grinding a sponge sample from Cortiou in glycérol 30%
- Plating dilutions (10^{-2} to 10^{-6})
- 100 µL of each dilution plated on Marine Agar or ISP-NaCl / [Cu, Zn, Pb, Ni]
- Incubation in a dark chamber at 22°C

Selected on media with	Concentration tested (mM)	Number of bacterial isolates
Zinc	0,25 & 1	15
Copper	0,25 & 1	22
Nickel	0,15 & 0,5	59
Lead	0,15 & 0,5	21

Strains isolated on Copper (Marine Agar)

113 strains have been selected for their resistance to Zn, Cu, Pb or Ni.

IV. RANDOMLY AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA

RAPD markers = DNA fragments obtained by PCR amplification of random genomic DNA segments with a unique random nucleotide primer

To characterize and differentiate the previously selected strains

Bacterial culture (3 mL) → Genomic DNA extraction (~ 70 ng/µL) → PCR amplification (T_m = 28°C) → Electrophoresis on agarose gel (1.2 %)

RAPD on some of the strains selected on Nickel

From the 113 strains, 65 have been selected according to their RAPD profile for identification by sequencing of their 16S rDNA.

V. BACTERIAL IDENTIFICATION

Genomic DNA extraction → 16S rDNA PCR amplification (T_m = 55°C) → Sequencing → Bioinformatic analysis

Phylogenetic analysis of 16S rDNA sequences derived from sponge bacterial isolates resistant to : copper, nickel, zinc, lead (Neighbour joining method, Boostrap 1000).

Six bacterial familles with a majority of Proteobacteria were identified by a culture dependent method.

VI. MINIMAL INHIBITORY CONCENTRATIONS

MIC: The lowest concentration that is able to inhibit growth of the bacteria

Two fold dilutions of heavy metal (Cu, Zn, Pb, Ni) on microtitration plate on the 65 strains selected
- inoculate + incubate
- the lowest concentration with no visible growth is read as the MIC

Strain	Identification	Isolated on	MIC (mM)			
			Zinc	Nickel	Lead	Copper
53	*Pseudovibrio* sp.	Nickel	1,56	6,25	12,5	25
21	*Microbulbifer* sp.	Nickel	25	3,125	1,56	1,56
A9	*Pseudovibrio* sp.	Copper	6,25	25	3,125	3.125
F1	*Citrobacter* sp.	Copper	6,125	6,125	6,125	6,125
H3	*Pseudovibrio* sp.	Lead	1,56	12,5	25	1,56

65 selected strains 5 with high level of tolerance. The next step will be to understand their mechanism of resistance to heavy-metal.

VII. PERSPECTIVES

- On selected strains according to their genders and MIC, we will focus of their mechanism(s) of resistance …
  - Is there a biosorption / bioaccumulation of metals?
  - Can we find known resistance operon?
  - Can we find bacterial Extracellular Polymeric Substance?
- Since generally 99% of Bacteria remain uncultivable, a metagenomic study by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) will be performed to compare the total microbiota of sponges from Riou and Cortiou.

AKNOWLEDGEMENTS
- ED 387 : Vie - Interdisciplinary approach to living organisms for funding PhD
- The MDCEM team - Defense and communication molecules in microbial ecosystems : Manon Vandervennet, Carine Lombard, Arlette Longeon and Samuel Dupont

3. Annexe 3

Poster présenté au 13th International Conference on soils, sediments and water, Lille (2014)

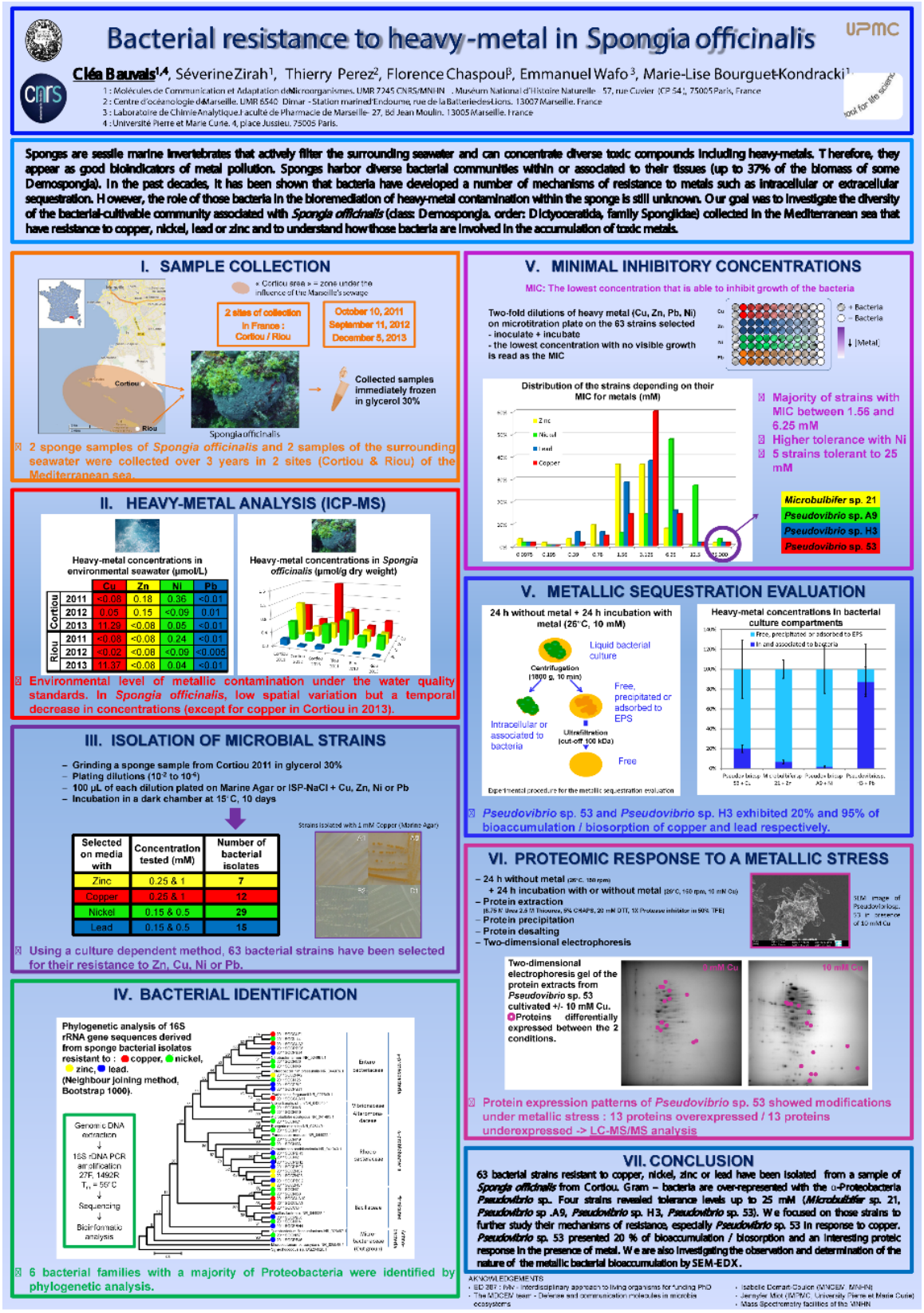


Table des illustrations

Figure 1 : Tableau de Mendeleïev 21

Figure 2 : Évolution temporelle de la concentration des éléments traces métalliques (Cu, Ni, Pb, Zn) dans le milieu marin..... 24

Figure 3 : Illustration des cinq principaux mécanismes de phytodépollution que sont la phytoextraction, la phytodégradation, la phytostabilisation, la phytovolatilisation et la rhizodégradation 32

Figure 4 : Mécanismes bactériens de résistance aux métaux toxiques..... 39

Figure 5 : Structure RMN de la métallothionéine bactérienne Zn4SmtA 42

Figure 6 : Mécanisme d'action de la métallothionéine MymT de la bactérie *Mycobacterium tuberculosis* dans un phagosome d'un macrophage humain 43

Figure 7 : Micrographie électronique en transmission de la bactérie *Geobacter sulfurreducens.* 46

Figure 8 : Récapitulatif des mécanismes de transport des métaux lourds..... 48

Figure 9 : Illustration de quelques spécimens de Spongiaires..... 51

Figure 10 : Système aquifère des Spongiaires..... 52

Figure 11 : L'éponge de toilette *S. officinalis* 53

Figure 12 : Classification de *S. officinalis* au sein du phylum des Porifera 54

Figure 13 : Répartition géographique de *S. officinalis* 55

Figure 14 : Les étapes de la reproduction sexuée chez *S. officinalis* 58

Figure 15 : Observations de *S. officinalis* au microscope électronique à balayage..... 59

Figure 16 : Système aquifère chez *S. officinalis* 60

Figure 17 : Granules de lépidocrite à la surface et dans les fibres de spongine de *S. officinalis* 63

Figure 18 : Principaux furanoterpènes linéaires en C_{21} isolés chez l'éponge *S. officinalis.* ... 67

Figure 19 : Principaux furanosesterterpènes isolés chez l'éponge *S. officinalis*..... 69

Figure 20 : Principaux sesterterpènes de type scalarane isolés chez l'éponge *S. officinalis*... 70

Figure 21 : Principaux diterpènes isolés de l'éponge *S. officinalis*..... 72

Figure 22 : Principaux trihydroxystérols isolés chez *S. officinalis* 74

Figure 23 : Principaux tétrahydroxystérols isolés chez *S. officinalis*..... 75

Figure 24 : Principaux sécostérols isolés chez l'éponge *S. officinalis* 76

Figure 25 : Principaux époxystérols isolés chez l'éponge *S. officinalis* 77

Figure 26 : Principaux acides gras isolés chez l'éponge *S. officinalis* 78

Figure 27 : Profils RAPD et identification phylogénétique des souches isolées de *S. officinalis* 117

Figure 28 : Vue d'ensemble de la procédure de préparation de la librairie d'amplicons à partir d'un échantillon d'ADN génomique 138

Figure 29 : Préparation de la matrice de séquençage du génome par PCR en émulsion 140

Figure 30 : Description d'une puce à ADN Ion 316v2™ 141

Figure 31 : Schéma des étapes de l'électrophorèse bidimensionnelle 145

Figure 32 : Quantification des spots observables sur les gels obtenus après électrophorèse SDS-PAGE 147

Figure 33 : Concentrations en oses, en protéines et en éléments non identifiés (en mg par g de biomasse) pour les culots et les surnageants des cultures bactériennes de *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 153

Figure 34 : Métalloprotéase de la souche bactérienne *Serratia marcescens* 154

Figure 35 : Quantification par ICP-MS du contenu en métal, exprimé comme un pourcentage par rapport au métal initial du culot bactérien, du surnageant de culture et des EPS après culture de la bactérie *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 en présence de 10 mM de $CuCl_2$. 156

Figure 36 : Observation au microscope électronique à balayage couplée à une microanalyse élémentaire de la souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 cultivée en présence de 10 mM de $CuCl_2$ et fixée au tampon C 159

Figure 37 : Observation au microscope électronique à balayage couplée à une microanalyse élémentaire de la souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 cultivée en présence de 10 mM de $CuCl_2$ et non fixée 160

Figure 38 : Analyse automatique des résultats de séquençage de la souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 162

Figure 39 : Comparaison des "reads" utilisés pour le "mapping" TMAP contre le chromosome ou le plasmide de *Pseudovibrio* sp. FO-BEG1 et les 19 contigs de *Pseudovibrio* sp. JE062 163

Figure 40 : Comparaison des deux itérations effectuées avec GeneiousReadMapper sur les "reads" utilisés pour le "mapping" contre le chromosome de *Pseudovibrio* sp. FO-BEG1. 164

Figure 41 : Comparaison des deux méthodes GeniousReadMapper et TMAP sur les "reads" utilisés pour le "mapping" contre le plasmide de *Pseudovibrio* sp. FO-BEG1. 164

Figure 42 : Bloc "N" de la région 2381-3150 de la séquence consensus du génome de *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 après le "mapping" contre chromosome de la souche FO-BEG1 avec GeneiousReadMapper 165

Figure 43 : Comparaison des différentes approches utilisées en protéomique comparative. 169

Figure 44 : Gel d'électrophorèse bidimensionnelle des protéines extraites de *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 170

Figure 45 : Bilan des protéines identifiées chez la souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 et régulées en réponse à un stress métallique 175

Table des tableaux

Tableau 1 : Récapitulatif des normes françaises sur la qualité des eaux de consommation adoptées en 2001 pour les principaux éléments traces métalliques présentant un danger pour la santé humaine. 22

Tableau 2 : Quelques exemples de capacité d'accumulation métallique chez des organismes marins..... 34

Tableau 3 : Bactéries résistantes isolées d'environnements contaminés en métaux toxiques. 38

Tableau 4 : Familles protéiques importantes pour l'import des métaux lourds (Nies, 1999). 41

Tableau 5 : Familles protéiques importantes pour l'export des métaux lourds. 47

Tableau 6 : Activités biologiques des principaux furanoterpènes isolés chez l'éponge *S. officinallis*. 68

Tableau 7 : Activités biologiques des sesterterpènes de type scalarane isolés chez l'éponge *S. officinallis*. 70

Tableau 8 : Concentration inhibitrice médiane en $\mu g.mL^{-1}$ vis-à-vis de la lignée cellulaire Hela de diterpènes isolés chez l'éponge *S. officinallis*. 71

Tableau 9 : Activités biologiques d'extraits de l'éponge *S. officinallis*..... 79

Tableau 10 : Bilan des activités biologiques rencontrées chez l'éponge *S. officinalis*..... 80

Tableau 11 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de bactéries isolées pour leur tolérance aux métaux. 112

Tableau 12 : Affiliation phylogénétique des séquences dérivées des bandes DGGE des communautés bactériennes associées à l'éponge *S. officinalis* et de l'eau de mer environnante..... 119

Tableau 13 : Origine des bactéries présentant une homologie avec les séquences d'ADNr 16S obtenues à partir du gel DGGE des échantillons de *S. officinalis*. 120

Tableau 14 : Récapitulatif des activités antioxydantes, antibactériennes et antifongiques des souches bactériennes isolées chez l'éponge marine *S. officinalis*. 121

Tableau 15 : Masses des EPS lyophilisées extraites du culot et du surnageant rapportées aux biomasses de *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53. 151

Tableau 16 : Récapitulatifs des différents modes opératoires utilisés pour observer la souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 en absence et en présence de cuivre en microscopie électronique à balayage couplée à une microanalyse élémentaire..... 158

Tableau 17 : Recouvrement des séquences consensus obtenues à partir des données générées du "mapping" du chromosome et du plasmide de FO-BEG1 par les algorithmes TMAP et GeneiousReadMapper..... 166

Tableau 18 : Liste de protéines bactériennes isolées chez la souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 cultivée en absence et en présence de cuivre..... 173

Tableau 19 : Liste de protéines bactériennes isolées chez la souche *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53 cultivée en absence et en présence de cuivre et identifiée à partir de la base de données de protéines générée suite au séquençage du génome de *Pseudovibrio* sp. 2011SOCNI53..... 174

Résumé

Diversité chimique et bactéries associées à *Spongia officinalis*, une éponge marine accumulatrice de métaux

L'accumulation des métaux toxiques dans l'environnement représente une forte menace environnementale et sanitaire. Les éponges marines, invertébrés sessiles qui filtrent activement l'eau de mer environnante, peuvent concentrer des composés toxiques comme les métaux lourds (Pérez *et al.*, 2005) et être utilisés comme bioindicateurs de pollution métallique (Patel *et al.*, 1985). Elles hébergent une biomasse bactérienne importante (Webster and Taylor, 2012), dont le rôle dans la séquestration de polluants environnementaux reste encore mal connu.
Notre étude s'est portée sur les bactéries tolérantes aux métaux lourds (Cu^{2+}, Pb^{2+}, Ni^{2+} et Zn^{2+}) associées à l'éponge méditerranéenne *Spongia officinalis* (classe : Demospongia, ordre : Dictyoceratida, famille : Spongiidae) connue pour son accumulation de métaux toxiques (Pérez *et al.*, 2005). Nous avons d'abord développé une étude de la communauté bactérienne associée à l'éponge *S. officinalis* récoltée dans un environnement pollué en métaux par la combinaison d'approches moléculaire (DGGE, CARD-FISH) et culturale. Afin de comprendre les mécanismes d'accumulation et/ou de résistance vis-à-vis des métaux d'une souche de *Pseudovibrio* sp. isolée de *S. officinalis* pour sa tolérance au cuivre nous avons développé des approches combinées de protéogénomique (électrophorèse bidimensionnelle, séquençage du génome) et de microscopie (microscopie électronique à balayage couplée à une analyse élémentaire EDX). Enfin, la diversité chimique associée à l'éponge *S. officinalis*, sa variabilité spatiale et temporelle ont ensuite été caractérisées par couplage d'analyse chromatographique et de spectrométrie de masse (LC-MS, LC-MS/MS).

Mots clés : *Spongia officinalis*, tolérance métallique, bactéries, *Pseudovibrio*, chimiodiversité.

Chemical diversity and bacteria associated with the marine sponge *Spongia officinalis*, a metal bioaccumulator

The accumulation of toxic metals in the environment is a strong environmental and health threat. Marine sponges are sessile invertebrates that actively filter the surrounding seawater. They can concentrate toxic compounds such as heavy metals (Perez *et al.* 2005) and are used as bioindicators of metal pollution (Patel *et al.* 1985). They host an important bacterial biomass (Webster and Taylor 2011), whose role in the sequestration of environmental pollutants is still unclear.
Our study focused on bacteria tolerant to heavy metals (Cu^{2+}, Pb^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+}) associated with the Mediterranean sponge *Spongia officinalis* (class: Demospongia, order Dictyoceratida, family: Spongiidae) known for its accumulation of toxic metals (Perez *et al.* 2005). We first developed a study of bacterial community associated with the sponge *S. officinalis* harvested in a metal polluted environment by the combination of cultural and molecular approaches (DGGE, CARD-FISH). The mechanisms of accumulation and/or resistance to copper of a sponge isolated strain, *Pseudovibrio* sp. was investigated by combined approaches of proteogenomics (two-dimensional electrophoresis, sequencing of the genome) and microscopy (scanning electron microscopy coupled with elemental analysis EDX). A final approach was developed to characterize the chemical diversity associated with this sponge and spatial and temporal variability by coupling chromatographic analysis and mass spectrometry (LC-MS, LC-MS/MS).

Keywords: *Spongia officinalis*, metallic tolerance, bacteria, *Pseudovibrio*, chemodiversity.