


**Projet ANR-06-BDIV-001**

**ECIMAR**

Programme Biodiversité 2006

<b>A</b>	<b>IDENTIFICATION</b> .....	<b>2</b>
<b>B</b>	<b>RESUME CONSOLIDE PUBLIC</b> .....	<b>3</b>
	B.1 Résumé consolidé public en français.....	3
	B.2 Résumé consolidé public en anglais.....	4
<b>C</b>	<b>MEMOIRE SCIENTIFIQUE</b> .....	<b>6</b>
	C.1 Résumé du mémoire.....	6
	C.2 Enjeux et problématique, état de l'art .....	6
	C.3 Approche scientifique et technique.....	7
	C.4 Résultats obtenus.....	11
	C.5 Discussion.....	19
	C.6 Conclusions .....	21
	C.7 Références .....	22
<b>D</b>	<b>LISTE DES LIVRABLES</b> .....	<b>23</b>
<b>E</b>	<b>IMPACT DU PROJET</b> .....	<b>24</b>
	E.1 Indicateurs d'impact .....	24
	E.2 Liste des publications et communications (état au 1 <sup>er</sup> octobre 2011) .....	25
	E.3 Liste des éléments de valorisation.....	36
	E.4 Bilan et suivi des personnels recrutés en CDD (hors stagiaires) .....	38

## A IDENTIFICATION

Acronyme du projet	
Titre du projet	Ecologie Chimique Marine : Indicateurs de Biodiversité et Valorisation
Coordinateurs du projet (société/organisme)	Thierry Perez (Centre d'Océanologie de Marseille, Laboratoire DIMAR), Olivier Thomas (Université de Nice-Sophia Antipolis, LCMBA)
Période du projet	Janvier 2007 – Juillet 2011
Site web du projet	www.ecimar.org

Rédacteur de ce rapport	
Civilité, prénom, nom	Mr Thierry PEREZ et Mr Olivier THOMAS
Téléphone	04 91 04 16 29 et 04 92 07 61 34
Adresse électronique	ecimar@unice.fr
Date de rédaction	Septembre 2011

Liste des partenaires présents à la fin du projet (société/organisme et responsable scientifique)	<p>Equipe 1. Université de Nice Sophia Antipolis, CNRS UMR6001, Olivier Thomas</p> <p>Equipe 2. Muséum National d'Histoire Naturelle, CNRS UMR5154, Marie-Lise Bourguet Kondracki</p> <p>Equipe 3. Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS UPR2301, Ali Al Mourabit</p> <p>Equipe 4. Université de Perpignan Via Domitia EA4215, Bernard Banaigs</p> <p>Equipe 5. Université de la Méditerranée, CNRS UMR6540, Thierry Perez</p> <p>Equipe 6. Université d'Auvergne, INSERM 484, Chantal Barthomeuf</p> <p>Equipe 7. Université du Sud-Toulon Var EA4323, Gérald Culioli</p>
---	---

## B RESUME CONSOLIDE PUBLIC

### B.1 RESUME CONSOLIDE PUBLIC EN FRANÇAIS

#### Ecologie chimique marine : indicateurs de biodiversité et valorisation

ECIMAR avait pour but d'évaluer le potentiel de la biodiversité marine méditerranéenne en terme de chimiodiversité, et de mieux comprendre comment s'exprime et varie cette diversité chimique. Ce projet de recherche a fédéré systématiens, biologistes et chimistes afin de constituer un réseau d'excellence d'étude et de valorisation de la chimiodiversité marine. L'intérêt n'était pas seulement de découvrir de nouveaux métabolites secondaires aux propriétés pharmacologiques intéressantes, mais aussi d'identifier des indicateurs des modifications de l'environnement. Ainsi, les résultats attendus d'ECIMAR incluaient : 1) un inventaire de la biodiversité et de la chimiodiversité d'une communauté modèle en Méditerranée ; 2) l'identification de nouveaux métabolites secondaires d'intérêt thérapeutique ; 3) une meilleure compréhension des voies de biosynthèse de ces substances et une appréciation du rôle possible des micro-organismes symbiotiques, 4) une identification des facteurs contrôlant l'expression des métabolites secondaires ; 5) des premières indications sur leur fonction biologique ou écologique, et 6) le développement d'une base de données collaborative. La construction de ce réseau a posé les fondations de l'écologie chimique marine en France.

#### Approche interdisciplinaire pour une compréhension globale du métabolisme secondaire

Ce projet portait sur les communautés benthiques de substrat dur de mer Méditerranée, et plus particulièrement sur les espèces caractéristiques du coralligène et des grottes semi-obscurées. Dans un premier temps, nous avons procédé à des recensements, récoltes et sélections d'espèces-cibles pour les recherches de chimie et d'écologie marine. A chaque échantillon déterminé a été associée une signature chimique (métabolomique) enregistrée en base de données, représentant ainsi le patrimoine chimique d'un individu à un endroit et un instant donnés. De multiples applications ont été associées au développement de cette approche métabolomique en mer. En particulier, le couplage des données métabolomiques à des données phénologiques ou environnementales s'est avéré très pertinent pour évaluer la variabilité naturelle aux niveaux individuel et populationnel. Des protocoles d'étude *in vivo* et *in vitro* des voies métaboliques par utilisation de précurseurs isotopiquement enrichis ont été développés. De nouvelles approches basées sur le tri cellulaire et la caractérisation moléculaire de la diversité en micro-organismes symbiotiques ont permis d'apporter des éléments de compréhension du rôle de la symbiose dans production de métabolites secondaires.

#### Résultats majeurs du projet

De nouvelles espèces animales et de nouveaux métabolites secondaires bioactifs ont été décrits en mer Méditerranée. Les voies de biosynthèse de métabolites cibles ont été étudiées grâce à des méthodes originales développées pour la première fois en France. Par ailleurs, des approches métabolomiques ont été également appliquées pour la première fois en milieu marin pour répondre à des questions de chimio-systématique (classifications, support de phylogénie, identifications d'espèces cryptiques) et d'écologie (*e.g.* théories d'allocation des ressources, stress environnemental).

#### Production scientifique et brevets depuis le début du projet

Durant la durée du programme, **42 articles** ont été publiés dans des revues à comité de lecture international sur des domaines très divers ce qui traduit son interdisciplinarité : Trends Ecol. Evol., Nat. Prod. Rep., Org. Lett., BioEssays, PLoS One, Appl. Environ. Microb., Metabolomics, Biofouling,

Mar. Biotechnol., J. Nat. Prod., J. Chem. Ecol. **45% de ces articles** sont issus de collaborations entre les partenaires du programme et d'autres articles et brevets sont en cours de préparation.

### **Informations factuelles**

Le projet ECIMAR est un programme de recherche fondamentale coordonné par Thierry Pérez (Université de la Méditerranée, CNRS UMR 6540, Marseille) et Olivier P. Thomas (Université de Nice-Sophia Antipolis, CNRS UMR 6001, Nice). Il associe Marie-Lise Bourguet-Kondracki (Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris), Bernard Banaigs (Université de Perpignan Via Domitia, Perpignan), tout deux responsables du WP1, et Ali Al-Mourabit (Institut de Chimie des Substances Naturelles, Gif sur Yvette), responsable du WP2. Il associe aussi Gérald Culioli (Université du Sud Toulon Var, Toulon) et Chantal Barthomeuf (Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand), comme partenaires français et Ghazi Bitar (Université du Liban), Mikel Becerro, Xavier Turon (Centro de Estudios Avanzados de Blanes, Espagne) et Kostas Dounas (Hellenic Center for Marine Research, Grèce) comme partenaires étrangers. Le projet a commencé en janvier 2007 et a duré 54 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de 916 100 € pour un coût global de l'ordre de 5 000 000 €.

## **B.2 RESUME CONSOLIDE PUBLIC EN ANGLAIS**

### **Marine chemical ecology: biodiversity indicators and development.**

ECIMAR aimed at evaluating the potential of the Mediterranean marine biodiversity in terms of chemodiversity, and to better understand the processes controlling the expression and the variation of this chemical diversity. This project associated taxonomists, biologists and chemists in order to implement a network of excellence for the study and development of the marine chemical diversity. The objectives were not only to find new molecules with interesting pharmacological properties, but also to use the chemical diversity as indicators of environmental changes. Therefore the results expected of ECIMAR were mainly: 1) an inventory of the biological and chemical diversity within a model community of the Mediterranean Sea; 2) to identify new secondary metabolites with therapeutical potential ; 3) to better understand the biosynthetic pathways of these compounds and to assess the role of the associated micro-organisms ; 4) to identify the factors controlling the expression of the secondary metabolites ; 5) to obtain first results on the ecological functions of the compounds ; and 6) to develop a collaborative database. This consortium laid the foundations of marine chemical ecology in France.

### **A multidisciplinary approach for a global understanding of the secondary metabolism.**

The main targets of this project were the benthic communities dwelling on hard substrates in the Mediterranean Sea, and more precisely the dominant species of the coralligenous and semi-dark caves. The first steps included an inventory, a collection and a selection of target species for investigations at the chemical and ecological levels. A chemical fingerprint (metabolomics) was associated to each sample and was downloaded into a database, thus featuring the chemical heritage of the individual at a given time and location. Several applications were developed on the basis of these marine metabolomic data. In particular, the combination of metabolomics and phenological or environmental data proved to be relevant to evaluate the secondary metabolism natural variability at the individual and population levels. *In vitro* and *in vivo* protocols using incubations of isotopically labeled precursors were developed for studying metabolic pathways. New approaches based on cellular sorting and molecular characterization of the micro-symbiotic diversity provided some fundamental information on the putative the role of the symbiosis in the production of secondary metabolites.

### **Main results of the project**

New animal species and bioactive secondary metabolites were described from the Mediterranean Sea. The metabolic pathways of target metabolites were studied thanks to original methods developed for

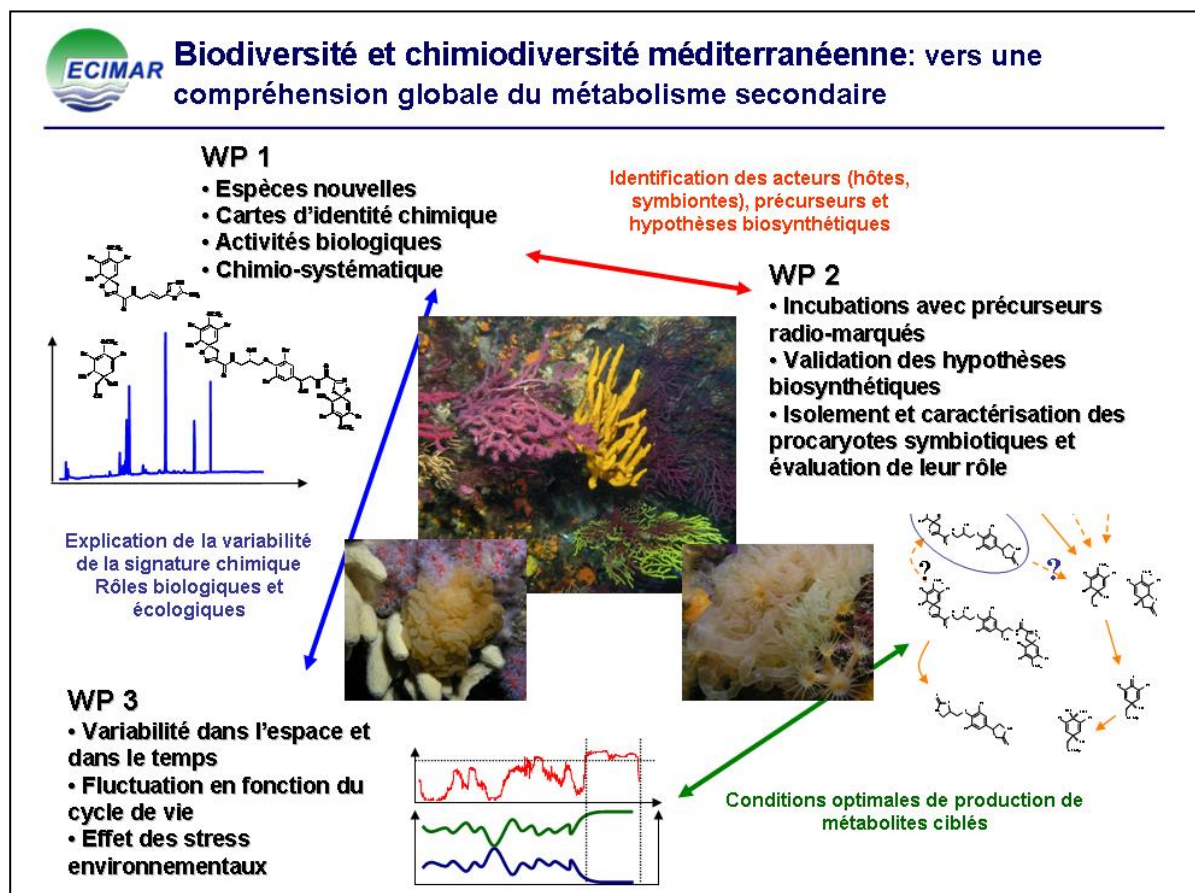
the first time in France. Metabolomics was applied with success for the first time in the marine environment to address Systematics (classification, phylogeny, identification of cryptic species) and ecological (resources allocation theories, environmental stress) issues.

### Scientific publications since the beginning of the project

During this project, 42 articles have been published in peer-reviewed journals in very diverse fields of research: Trends Ecol. Evol., Nat. Prod. Rep., Org. Lett., BioEssays, PLoS One, Appl. Environ. Microb., Metabolomics, Biofouling, Mar. Biotechnol., J. Nat. Prod., J. Chem. Ecol. 45% of these articles involve several partners of the project, some other articles and patents are still in preparation.

### Factual informations

The ECIMAR project is a fundamental research program coordinated by Thierry Pérez (Université de la Méditerranée, CNRS UMR 6540, Marseille) and Olivier P. Thomas (Université de Nice-Sophia Antipolis, CNRS UMR 6001, Nice). Marie-Lise Bourguet-Kondracki (Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris), Bernard Banaigs (Université de Perpignan Via Domitia, Perpignan) were who were in charge of the WP1, and Ali Al-Mourabit (Institut de Chimie des Substances Naturelles, Gif sur Yvette), in charge of the WP2. Gérald Culioli (Université du Sud Toulon Var, Toulon) and Chantal Barthomeuf (Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand) were the other French partners, and Ghazi Bitar (Université du Liban), Mikel Becerro and Xavier Turon (Centro de Estudios Avanzados de Blanes, Espagne) and Kostas Dounas (Hellenic Center for Marine Research, Grèce) were the foreigner partners. The project began in January 2007 and lasted 54 months. The financial support of the ANR was 916 100 euros for an approximate total cost of 5 000 000 euros.



## C MEMOIRE SCIENTIFIQUE

### *Mémoire scientifique non confidentiel*

#### C.1 RESUME DU MEMOIRE

ECIMAR avait pour but d'évaluer le potentiel que représente la biodiversité marine en terme de chimiodiversité et de mieux comprendre comment s'exprime et varie cette diversité chimique. Ce projet de recherche a fédéré des systématiseurs, biologistes et chimistes afin de constituer un réseau interdisciplinaire d'étude et de valorisation de la chimiodiversité marine. L'intérêt n'était pas seulement de découvrir de nouveaux métabolites secondaires aux propriétés pharmacologiques intéressantes, il était aussi d'utiliser la chimiodiversité des organismes en tant qu'indicateur des modifications de l'environnement. Ainsi, les résultats attendus d'ECIMAR étaient: 1) un inventaire de la biodiversité et de la chimiodiversité d'une communauté modèle pouvant servir de référence pour suivre l'évolution d'un écosystème soumis à diverses pressions environnementales, 2) d'identifier de nouveaux métabolites d'intérêt thérapeutique, 3) d'identifier de nouveaux précurseurs biosynthétiques et valider des hypothèses, 4) d'identifier les facteurs contrôlant l'expression des métabolites secondaires et ceux à l'origine des fluctuations de cette expression, 5) de développer une base de données collaborative.

ECIMAR s'est déroulé en Méditerranée parce qu'il s'agit d'une mer considérée comme un hot spot de biodiversité, et afin de profiter des connaissances déjà acquises et de la maîtrise logistique des équipes en place. Ce programme s'est concentré sur les communautés benthiques de substrat dur et plus particulièrement des espèces caractéristiques du coralligène et des grottes sous-marines. Avec ce programme interdisciplinaire, nous avons posé les fondements d'une écologie chimique marine en acquérant des données fondamentales de biologie et de chimie pour des modèles d'études sélectionnés pour leur potentiel pharmacologique, leur statut écologique ou leur sensibilité aux perturbations environnementales. Par ailleurs, les développements techniques réalisés en métabolomique, génétique et microbiologie permettent d'envisager de nouveaux programmes de recherche. Aujourd'hui, les nouveaux défis de l'écologie chimique marine sont actuellement discutés dans le cadre du GDR CNRS n° 3269, fondé en 2009 pour pérenniser la dynamique instaurée dans le cadre du programme ANR ECIMAR.

Pour en savoir plus sur ce programme de recherche, consulter sa production scientifique ou les différents rapports techniques qui ont été produits, voir [www.ecimar.org](http://www.ecimar.org).

#### C.2 ENJEUX ET PROBLEMATIQUE, ETAT DE L'ART

La France, et ses 560 000 km<sup>2</sup> d'aire maritime distribués sur tous les océans, possède une place de choix dans l'observation et l'étude de la biodiversité marine. De façon croissante, les mers et océans sont le siège d'une pression anthropique aigue qui menacent fortement cette biodiversité. Il est prioritaire de mener des études de grande ampleur sur les organismes vivants dans leur environnement marin, et il convient également de développer des approches durables de valorisation de cette richesse marine. **L'écologie chimique marine** est un domaine de recherche relativement récent. Il est interdisciplinaire par nature et exige une collaboration entre groupes de recherche en biologie marine, écologie marine mais aussi en chimie des produits naturels marins (Proksch, 2003; Paul, 2006, Eisner, 2003). La plupart des équipes de chimie des produits naturels concentraient leurs efforts sur l'isolement et la caractérisation structurale de molécules au fort potentiel de valorisation en particulier dans l'industrie pharmaceutique sans considération pour leur rôle dans l'environnement. Ainsi, plus de 20 000 substances naturelles sont décrites en 2010 dans la base de données MarinLit, alors que l'étude du milieu marin comme source de chimiodiversité n'en est toujours qu'à ses débuts. De nombreux centres de recherche se spécialisent dans la valorisation du milieu marin en

thérapeutique (Newman, 2000; Koehn, 2005) et plusieurs composés sont aujourd'hui en phase d'essais cliniques avancés pour le traitement de nombreuses maladies et en particulier pour le traitement du cancer. L'ecteinascidine (Yondelis, PharmaMar) isolé d'une ascidie a été le premier médicament à entrer sur le marché en 2007 pour le traitement des sarcomes des tissus mous. En 2010, l'eribulin mesylate (Halaven, Eisai), dérivé d'une molécule isolée de spongiaire a été mis sur le marché pour les cancers du sein (Huyck et al., 2011). La « **bioprospection** » marine s'est ainsi largement développée au travers de partenariats public-privé dans la recherche de bénéfices rapides et parfois sans tenir compte des méfaits sur l'environnement et surtout en omettant de contribuer à la description de la biodiversité marine. Le **premier objectif** d'ECIMAR a donc été de **structurer** les groupes de chimie des produits naturels en France autour d'une thématique plus générale en écologie chimique marine tout en gardant un souci de valorisation. Ainsi, en plus de contribuer à la recherche de nouvelles substances bioactives, le **second objectif** d'ECIMAR a été de **développer des protocoles standardisés pour caractériser la chimiodiversité** d'une communauté modèle marine et d'utiliser cette approche pour étudier l'influence de différents facteurs biotiques et abiotiques sur la production de ces substances. Des approches en **métabolomique marine** centrée sur le métabolisme secondaire n'avaient pas encore été réellement appliquées en milieu marin et rapidement une première problématique a consisté à développer des outils analytiques robustes. L'utilisation de ces outils a permis d'étudier la valeur des métabolites secondaires comme **indicateurs de biodiversité**. Contrairement aux métabolites primaires, ces substances sont biosynthétisées par une machinerie complexe pour jouer un rôle de médiateur chimique le plus souvent entre les organismes et leur environnement (Clardy, 2004). Leur production doit donc être nettement influencée par les conditions environnementales, et on pouvait s'attendre en Méditerranée à une influence des perturbations de grandes ampleurs (Lejeune et al., 2010). ECIMAR a ainsi permis de proposer des hypothèses sur **l'influence de différents facteurs sur la production de ces substances**. Beaucoup d'invertébrés marins sont caractérisés par des associations étroites (*e.g.* symbiotiques) avec des **procaryotes** susceptibles d'avoir un rôle dans la production de métabolites secondaires (Koenig, 2006), mais ce type d'étude était encore très rare, particulièrement en France. Enfin les **voies métaboliques** à l'origine de la production de métabolites secondaires devaient être également recherchées. Là encore, même si la chimie biomimétique avait été utilisée depuis plusieurs années pour formuler des hypothèses, les premières validations de ces hypothèses devaient passer par des études *in vivo* à travers la mise au point de protocoles originaux. Ainsi **l'objectif général** d'ECIMAR était de contribuer à **une compréhension globale du métabolisme secondaire**, en apportant des informations sur les mécanismes à l'origine de la chimio-diversité et de sa variabilité naturelle.

### C.3 APPROCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE

WP 1 - Evaluation de la chimio diversité au sein des communautés benthiques de substrat dur en Méditerranée : stratégie d'échantillonnage, taxonomie, développement métabolomique, chimie des produits naturels et activités biologiques

Le programme ECIMAR a rayonné autour de la Méditerranée avec une série de missions de terrain organisées depuis les côtes du Liban à l'Est jusqu'au détroit de Gibraltar à l'Ouest. L'idée première était d'avoir un aperçu des variations de biodiversité qui pouvaient exister au sein de communautés modèles, et de procéder à des échantillonnages pour l'étude taxonomique et chimique des espèces les plus caractéristiques. Au total, les 11 missions d'échantillonnage organisées entre 2007 et 2009 à Marseille (3), en Corse (1), en Catalogne française et espagnole (Banyuls 1 et L'Estartit 1), dans le détroit de Gibraltar (Ceuta ; 2), en Crète (1) et au Liban (2) ont permis de récolter 900 échantillons représentant environ 232 espèces d'invertébrés marins. Tous ces échantillons sont répertoriés dans la base de données du programme : [www.ecimar.org](http://www.ecimar.org).

Chaque échantillon a fait l'objet d'une détermination, le plus souvent jusqu'à l'espèce, et dans certains cas des espèces nouvelles ont du être décrites (Vacelet et al. 2007 ; Vacelet & Pérez 2008 ; Pérez et al. 2011).

Chaque échantillon a également fait l'objet d'une analyse de sa signature chimique. Pour cela, une des premières étapes du programme a consisté à mettre au point un protocole standardisé et à procéder à un exercice d'intercalibration entre les partenaires chimistes du programme (1-UNSA, 2-MNHN, 3-ICSN, 4-UPVD, 7-USTV). Ce protocole a été optimisé de manière à couvrir la plus grande portion du métabolome « secondaire » en utilisant plusieurs détections couplées à l'HPLC (DAD, ELSD et MS). Les signatures chimiques obtenues représentent de véritables indicateurs du patrimoine chimique (chimiodiversité) des espèces étudiées à un instant et un endroit précis. Ces signatures ont permis de cibler ensuite des portions de métabolome pour aboutir à la caractérisation de métabolites secondaires d'intérêt. Par ailleurs, couplées à des méthodes de traitement du signal métabolomique, elles ont permis de réaliser des études chimiotaxonomiques et d'écologie chimique (voir section C4).

Les méthodes classiques de chimie des substances naturelles (extraction, purification et élucidation structurale) ont permis d'isoler et de caractériser des métabolites secondaires parfois originaux et bioactifs. Notre approche s'affiche comme une vraie alternative aux méthodes d'évaluation par criblage biologique habituellement pratiquées en chimie des produits naturels. Elle offre différents avantages : 1) « économiser » du matériel biologique, les signatures chimiques étant réalisables à partir de quelques grammes de poids sec ; 2) mieux apprécier la diversité chimique « cachée » chez des espèces pourtant bien étudiées par le passé par les chimistes de produits naturels ; et 3) s'affranchir des résultats « faux-négatifs » ou « faux-positifs » que peuvent véhiculer les criblages biologiques, masquant ainsi le rôle biologique que peuvent avoir des composés minoritaires ou dont l'action est influencée par des réactions synergiques ou antagonistes.

Ce n'est donc que sur une sélection d'extraits puis sur des composés purifiés qu'ont été réalisés les tests d'activités biologiques en vue d'une éventuelle valorisation à moyen termes. 137 extraits bruts ont dans un premier temps été préparés par les différents partenaires pour évaluation de leur activité antimalarique, anti-farnésyl transférase et cytotoxique. Ces extraits ont été testés en plaques de 96 puits. Le partenaire 3-ICSN a pris en charge l'évaluation de leur activité cytotoxique vis-à-vis des cellules tumorales humaines KB (carcinome humain nasopharyngé) ainsi que l'évaluation de leur activité anti-farnésyl transférase vis-à-vis de l'enzyme de la levure *Saccharomyces cerevisiae* à la concentration. Le partenaire 2-MNHN s'est chargé des tests antimalariques qui a été appréciée vis-à-vis de la croissance *in vitro* de deux souches distinctes de *Plasmodium falciparum*. Les deux souches testées ont été FcB1 (sensibilité moyenne à la chloroquine) et K1 (résistante à la chloroquine). Dans le même temps, le partenaire 4-UPVD a développé un protocole expérimental pour la détection d'activités antibactériennes simultanément à l'acquisition des signatures chimiques. L'extrait préparé et analysé suivant le protocole standardisé est, au sortir du détecteur HPLC, distribué dans une plaque 96 puits par un collecteur de fractions. La plaque est, après lyophilisation, préparée (mise en solution des composés, ensemencement des bactéries) pour le test d'activité. Après incubation, la lecture de la plaque est réalisée sur un lecteur de microplaques (mesure de la turbidité). Enfin, le partenaire 7-USTV a mis au point un test anti-adhésion vis-à-vis de biofilms monospécifiques de bactéries marines qui a pu être employé pour tester à la fois des extraits et des composés purifiés.

#### WP 2 - Production de métabolites cibles : plans expérimentaux, biosynthèse, isolement des procaryotes symbiotiques

S'appuyant sur le savoir-faire des équipes de chimistes organiciens du programme, des travaux de synthèse chimique de type biomimétique ont permis de progresser dans l'élaboration d'hypothèses biosynthétiques conduisant à différentes familles de métabolites secondaires. En plus de ces approches réalisées dans la continuité des recherches passées, le programme ECIMAR a permis de développer les premières études expérimentales en France sur la biosynthèse de métabolites secondaires marins.



Sur la base des travaux antérieurs des partenaires du programme, deux familles chimiques d'alcaloïdes marins ont été particulièrement ciblées : 1) celle des Pyrrole-2-AminoImidazoles (P2AI) produits par des spongiaires (3-ICSN), et 2) celle des pyridoacridines produits par des ascidies (4-UPVD). Plusieurs approches expérimentales centrées sur l'incorporation de précurseurs isotopiquement enrichis sont possibles pour obtenir des résultats sur les voies biosynthétiques conduisant à des métabolites secondaires. La première approche employée dans le cadre de ce projet a consisté à réaliser des incorporations avec des organismes entiers maintenus en aquarium. Cette étude a été conduite par les partenaires 1-UNSA et 3-ICSN en collaboration avec le laboratoire de radio-écologie environnementale marine de l'AIEA pour mieux comprendre les voies métaboliques des P2AI chez des éponges des genres *Agelas* et *Axinella*. Les voies métaboliques ont été démontrées par incorporation de précurseurs radiomarqués au  $^{14}\text{C}$ . La détection par imagerie (beta-imager) s'est avérée la plus performante avec des seuils de sensibilité jamais atteints. Ce type d'incubation aurait pu être également réalisé avec des coupes d'organismes ou des cultures cellulaires (encore que cette dernière approche soit difficilement envisageable avec nos modèles d'étude). La deuxième approche adoptée dans le cadre d'ECIMAR a consisté à étudier le métabolisme de certaines substances dans des extraits acellulaires préparés à partir d'invertébrés marins. Cette méthode d'incubation de précurseurs isotopiquement enrichis dans des extraits acellulaires a été développée par le partenaire 4-UPVD afin d'étudier les voies de biosynthèse chez des ascidies du genre *Cystodytes*.

Un autre enjeu du programme ECIMAR était d'apporter des éléments de compréhension du rôle des microorganismes symbiotiques des éponges dans la production de métabolites secondaires. Peu de travaux avaient été conduits en France sur cette thématique, et dans ce cas encore, il a été nécessaire de procéder à des développements techniques. Quatre partenaires (2-MNHN, 4-UPVD, 5-DIMAR et 7-USTV) se sont particulièrement intéressés à développer des méthodes applicables à différentes cibles. Par exemple, la contribution des bactéries associées à la production des métabolites secondaires a été évaluée par des approches de culture indépendante et dépendante développées en parallèle avec l'éponge *Clathrina clathrus* comme modèle. Le développement de cette technique n'a cependant pas permis d'étudier le rôle de cyanobactéries symbiotiques chez d'autres espèces d'éponge. Dans ces cas, ce sont des tris cellulaires par cytométrie de flux qui ont permis d'obtenir des fractions de cellules symbiotiques où de rechercher l'expression de métabolites secondaires connus de l'organisme « holobionte ». Ainsi, quelle que soit l'approche adoptée, des analyses par HPLC/MS de fractions enrichies en cellules d'éponge ou de bactéries ont ainsi permis de localiser des métabolites secondaires ciblés ou leurs éventuels dérivés. Parallèlement à ces travaux, l'étude de l'influence de la symbiose a été également entreprise par des méthodes indirectes expérimentales ou des analyses de corrélations (voir résultats WP3) entre diversité chimique et abondance ou diversité en microorganismes. Pour ces approches, les concentrations en pigments photosynthétiques pouvaient être utilisées comme indicateurs de l'abondance de cyanobactéries, alors que la diversité procaryotique pouvait être étudiée par DGGE.

### WP 3 - Influence des facteurs biotiques et abiotiques sur la production de métabolites secondaires: suivis biologiques, plans expérimentaux, développement d'outils génétiques

Un enjeu majeur d'ECIMAR était aussi d'étudier la variabilité naturelle du métabolisme secondaire, et notamment celle qui s'exprime au sein d'une espèce, et qui peut être reliée à des facteurs environnementaux, à l'état physiologique d'un organisme, à son génotype ou à sa diversité en microorganismes endo-symbiotiques. Pour ces questionnements, des espèces dites « modèles » et des sites ateliers ont été définis au démarrage du programme, en même temps qu'étaient arrêtées les stratégies d'échantillonnage et de conservation des échantillons. Ces espèces appartenaient à trois groupes d'organismes - les éponges, les gorgones et les ascidies - sélectionnées selon plusieurs critères : des espèces représentatives des communautés de substrats durs ombragés, abondantes, et menacées par les activités humaines ou le changement global et/ou d'intérêt pour la chimie des produits naturels (domaines biomédical et environnemental). L'idée était aussi de choisir des espèces pour lesquelles des données de référence ou des outils (génétique notamment) existaient déjà. La

variabilité du métabolisme secondaire a été étudiée selon trois types d'indicateurs : (i) des suivis des niveaux d'expression métabolites ciblés, le plus souvent des composés majoritaires identifiés dans le cadre du WP1 ; (ii) des approches métabolomiques basées sur l'analyse des signatures chimiques standardisées ; (iii) des mesures d'activité biologique selon un test écotoxicologique standardisé (Microtox<sup>®</sup>).

Pour étudier les niveaux de base d'expression de métabolites secondaires en conditions naturelles, nous avons travaillé sur des séries d'échantillons prélevés mensuellement pendant plusieurs années. Deux sites ateliers principaux ont été retenus pour cette étude, un à Marseille et l'autre en Espagne. Ces sites étaient équipés d'enregistreurs de température de manière à évaluer l'influence de ce facteur abiotique. La variabilité saisonnière a été également analysée en regard du cycle de vie, et de l'énergie allouée par les organismes dans la reproduction. Pour effectuer cette tâche, nous avons bénéficié de travaux qui étaient en cours chez le partenaire 5-DIMAR dans le cadre du programme européen PHENOMED dont l'objectif général était d'étudier les effets des changements climatiques au niveau phénologique. Les nombreuses missions d'échantillonnages organisées dans le cadre du WP1 ont également permis d'évaluer la variabilité spatiale du métabolome secondaire de plusieurs espèces modèles.

Parallèlement à cette étude de la variabilité naturelle, nous avons testé l'influence de stress aigus sur le métabolisme secondaire, de manière à évaluer la pertinence de certains métabolites comme bioindicateurs. Des expériences ont été conduites en conditions naturelles et en aquarium par les partenaires 5-DIMAR, 7-USTV et 8/9-CEAB. Seules quelques espèces ont été choisies pour ces travaux de manière à étudier les effets d'un stress thermique, et mesurer la balance entre maintien de l'homéostasie et effet sur le métabolisme de défenses chimiques de manière à mieux comprendre les mécanismes conduisant à des nécroses ou mortalités massives observées lors d'anomalies climatiques. Nous avons également bâti des plans expérimentaux pour commencer à étudier le rôle de certaines molécules dans la défense contre des compétiteurs (parasites et prédateurs).

Une approche de phylogéographie et de génétique des populations visait à étudier le rapport entre diversité génétique et diversité métabolique. Nos objectifs étaient de (i) déterminer la structuration génétique des populations tant à l'échelle locale que régionale, et définir les génotypes rencontrés au sein de chaque population (utilisation de microsatellites), (ii) étudier la relation entre les différents génotypes et les variations de la production de métabolites secondaires. Dans un premier temps nous avons cherché à déterminer si les variations du métabolome résultaient d'une plasticité phénotypique liée aux conditions environnementales ou si elles reflètent une adaptation génétique à ces dernières. Ce travail a été conduit sur trois espèces de spongiaires à plusieurs échelles spatiales dans l'ensemble de la Méditerranée. Sur la durée du programme, il n'a été possible que de travailler au niveau phylogéographique, et de valider la complémentarité des signatures chimiques et des marqueurs moléculaires mitochondriaux (COI). Dans certains cas, cela nous a permis de révéler l'existence d'espèces cryptiques, confirmant ainsi l'intérêt des approches métabolomiques pour la systématique (lien avec le WP1). Pour des travaux au niveau populationnel, les microsatellites étaient les marqueurs génétiques les plus pertinents, mais leur mise au point avec des organismes non-modèles demandait du temps et de l'argent. Dans le cadre d'ECIMAR, nous avons été en mesure de développer ces outils pour les trois modèles proposés au démarrage du programme, les rendant ainsi disponibles pour de prochaines recherches sur les relations entre chimiotype et génotype.

#### WP 4 : Site internet et base de données collaborative : gestion scientifique du projet

Dans la mesure où nous souhaitons poser les fondements d'une écologie chimique marine, nous nous sommes attachés dès le démarrage du programme à acquérir une bonne visibilité de nos travaux. Notre stratégie a été de développer un site internet liant une base de données (BDD) à une partie accessible au public mettant en valeur quelques résultats de la base de données (CMS). La base de données collaborative du programme ECIMAR a donc été initiée dès 2007 pour réunir les données recueillies au cours des campagnes d'échantillonnage. Pour chaque échantillon récolté, elle comporte les données de taxonomie, les illustrations des organismes *in situ* (éponges, cnidaires en majorité) ainsi

que ses signatures chimiques acquises selon le protocole standardisé. Elle regroupe aussi les informations concernant les lieux d'échantillonnage et la localisation précise des prélèvements. Les signatures chimiques regroupées dans cette base de données sont enfin complétées par les structures des composés isolés et les résultats des tests de bioactivité. La BDD assure ainsi une vraie traçabilité de chaque échantillon prélevé en associant pour la première fois, pour ce genre de site internet, des données biologiques à des données chimiques. Cette BDD a été alimentée par les différents partenaires du programme, et elle a aussi servi à générer des pages du site internet : listes et fiches d'espèces, cartes géo-référencées des sites d'échantillonnages par exemple. Les autres pages du site internet ont été rédigées à distance par différents partenaires du programme. Ces dernières présentent l'actualité du programme, donnent accès aux différents rapports techniques produits (droits d'accès variables selon les documents), et apportent des informations sur les travaux réalisés dans chaque WP.

Aujourd'hui cet ensemble site CMS et BDD recense environ mille échantillons prélevés correspondant à 200 espèces d'invertébrés marins. Le site a été visité plus d'un million de fois, un fort pourcentage de ces connections étant de relativement longue durée (plusieurs minutes) et provenant de partout dans le monde. La structure de la base de données est encore évolutive, et elle va servir à la création de bases de données « filles » pour la gestion d'autres programmes de recherche (e.g. projet européen « Bambo »)

*Voir notre site internet et consulter les différents rapports techniques produits dans le cadre du programme.*

## C.4 RESULTATS OBTENUS

### WP 1 - Evaluation de la chimio diversité au sein des communautés benthiques de substrat dur en Méditerranée

**Biodiversité et taxonomie :** Les communautés du coralligène et des grottes sous-marines de Méditerranée ont fait l'objet de nombreuses études écologiques menées par les chercheurs du partenaire 5-DIMAR depuis les années 50, mais ECIMAR a permis une première évaluation de la variabilité à grande échelle spatiale de la composition de ces assemblages. D'Est en Ouest, les paysages sous-marins varient énormément, mais dans tous les cas, les spongiaires dominent en termes de biomasse et de diversité (# 60% des récoltes). Aujourd'hui 80% des échantillons récoltés ont été déterminés jusqu'au niveau spécifique, mais plusieurs identifications posent encore problème. Neuf espèces nouvelles de spongiaires ont déjà été décrites ou révisées (Vacelet et al. 2007, Vacelet & Pérez 2008, Pérez et al. 2011), particulièrement en Méditerranée orientale où la connaissance de la biodiversité est encore fragmentaire. Pour la côte du Liban en particulier, un manuscrit qui constituera la référence la plus complète concernant la faune de spongiaires de Méditerranée orientale est en préparation (5-DIMAR et 5'-UL). Ceci étant, même en Méditerranée occidentale, de nouvelles espèces peuvent être encore découvertes. Par exemple, une nouvelle éponge *Homoscleromorpha* est venue compléter notre inventaire des représentants méditerranéens de ce groupe taxonomique mal connu et dont la systématique est très délicate (Ereskovsky et al. 2009). Cette éponge, *Oscarella balibaloï* Pérez et al. 2011, s'est révélé avoir une écologie surprenante par rapport aux autres *Oscarella* de Méditerranée, une dynamique rapide et une capacité à coloniser d'autres espèces, que nous avons essayé d'expliquer en démarrant des recherches d'écologie chimique (cf. WP3). Cette dernière description d'espèce a été réalisée selon une approche que nous avons appelé « taxonomie intégrative » (Cardenas et al. soumis) et propose ainsi l'utilisation des signatures métabolomiques comme caractères diagnostiques pour la systématique de groupes pour lesquels la morphologie ne suffit pas (voir plus bas).

**Isolement, caractérisation et activités biologiques des métabolites secondaires :** Au cours du programme ECIMAR, 122 molécules ont été isolées et caractérisées, dont 30 se sont avérées nouvelles pour la science. 60% de ces métabolites secondaires sont issus d'éponges (58% des molécules nouvelles), 27% sont issus de cnidaires (26% des molécules nouvelles) et 11% sont issus d'ascidies (16% des nouvelles). De manière assez surprenante, de nombreuses molécules nouvelles ont été isolées d'organismes qui avaient été pourtant bien étudiés par le passé. Par exemple, une famille

entière d'alcaloïdes (5 molécules) montrant une activité antibactérienne naturelle (Microtox®) ont été isolés de *Parazoanthus axinellae* (Cachet et al. 2009), un zoanthaire dominant en Méditerranée pouvant constituer de véritables faciès. A partir de la gorgone commune de Méditerranée occidentale *Paramuricea clavata*, 11 molécules dont 3 nouvelles et 4 décrites pour la première fois ont été mises en évidence dans cette espèce (Pérez et al. 2011). Parmi ces composés, la bufotenine et le 1,3,7-trimethylisoguanine se sont révélés avoir des activités anti-fouling prometteuses, tout en étant moins toxiques que les produits anti-fouling du commerce. Dans le même temps, l'étude d'un compétiteur de cette gorgone, le zoanthaire *Savalia savaglia*, a permis de décrire 6 molécules dont 3 nouvelles pour l'espèce et une nouvelle pour la science.

Autre exemple significatif, l'ascidie *Cystodytes dellechiaiei* est une espèce méditerranéenne à large répartition, qui existe sous différentes variétés chromatiques (blanche, brune, jaune, bleue, verte ou violette). La comparaison des signatures métabolomiques a démontré l'existence de 3 chimiotypes associés aux 3 chromotypes principaux. Au total, une vingtaine de pyridoacridines a été caractérisée dont deux nouvelles dans le chromotype vert, les cystodimines A et B (Bontemps et al. 2010), et trois dans le chromotype violet, la *N*-déacétylshermilamine B, la 13-didéméthylaminocycloshermilamine D et la déméthylldéoxyamphimédine. Pour la première fois, des styelsamines, pyridoacridines tétracycliques substituées par une chaîne éthylamine, ont été isolées dans les trois chromotypes violet, vert et bleu. La présence de ces pyridoacridines "simples" dans les deux chimiotypes est un résultat important qui a permis de proposer une hypothèse de biosynthèse de ces alcaloïdes (cf. WP2). Dans le même groupe d'organismes, le méthoxyconidiol et le conitriol sont deux méroterpènes isolés d'ascidies du genre *Aplidium*. Nous avons pu montrer que ces deux composés étaient des substances de défense de l'ascidie (antibactériens et inhibiteurs de la fixation des larves de balanes). Par ailleurs, ces deux composés inhibent la division cellulaire de l'oeuf d'oursin (blocage en phase M) en perturbant la formation du fuseau de microtubules sans action directe sur la tubuline. Ils inhibent la dégradation de la cycline B dans le complexe cycline B/Cdk sans effet sur le protéasome (Simon-Levert et al. 2010).

Les éponges ont été les organismes les plus étudiés dans le cadre d'ECIMAR. Fort de l'expérience de certains partenaires chimistes, il a été possible d'aboutir à la caractérisation précise de la carte d'identité chimique de certaines espèces. Cela a été le cas par exemple pour les 2 espèces sœurs, *Aplysina aerophoba* et *A. cavernicola*. Une dizaine d'alcaloïdes isoxazoliques bromés connus, ont été identifiés. Les cinq majoritaires (aerophobin-1, aerophobin-2, aplysinamin, isofistularin-3 et aerothionin) ont été purifiés en quantité suffisante pour les travaux d'écologie chimique et de chimio-systématique (voir ci-après). L'évaluation de différentes activités biologiques (toxicité, activités antibactérienne et cytotoxique) des alcaloïdes isoxazoliques bromés majoritaires de *A. aerophoba* a été effectuée mais les composés testés ne présentaient pas ou peu d'activité sur les modèles testés. Les alcaloïdes isoxazoliques ne semblent pas jouer un rôle de défense chimique pour l'éponge. Des progrès significatifs ont été également réalisés dans la connaissance du métabolome des éponges des genres *Axinella* et *Agelas* (une vingtaine de molécules au total), ce qui a permis de préciser des hypothèses sur les voies de biosynthèse de la famille des pyrrole-2-aminoimidazoles (cf. WP2). Par exemple, deux nouveaux acides aminés, les axiphenylalaninium A et axityrosinium A, ont été isolés de l'éponge *Axinella polypoides* (Gabant et al. 2009), mais ces nouveaux composés n'ont pas montré d'activité cytotoxique. Par contre des analogues des nagélamides et du dispacamide produits par ces éponges se sont révélés être des inhibiteurs de kinases (Valorisation en cours, 3-ICSN). Ainsi la grande majorité des organismes étudiés a révélé une diversité chimique largement supérieure à celle qui était connue avant ECIMAR, et la bioactivité de plusieurs composés nouvellement décrits est actuellement encore étudiée. La première étude d'une éponge profonde du genre *Latrunculia* en Méditerranée a conduit à la découverte d'un nouveau dérivé de type batzelline (Genta-Jouve et al. 2011). Une nouvelle hydroquinone prénylée a été isolée de l'éponge *Sarcotragus spinosulus* (Abed et al. 2011) et l'étude de *Crambe crambe* a conduit à la mise en évidence de sept composés nouveaux de type alcaloïdes guanidiniques qui se sont avérés posséder des activités cytotoxiques intéressantes (Valorisation, 1-UNSA). De nouvelles saponines ont également été découvertes de *Dicyonella incisa*, et

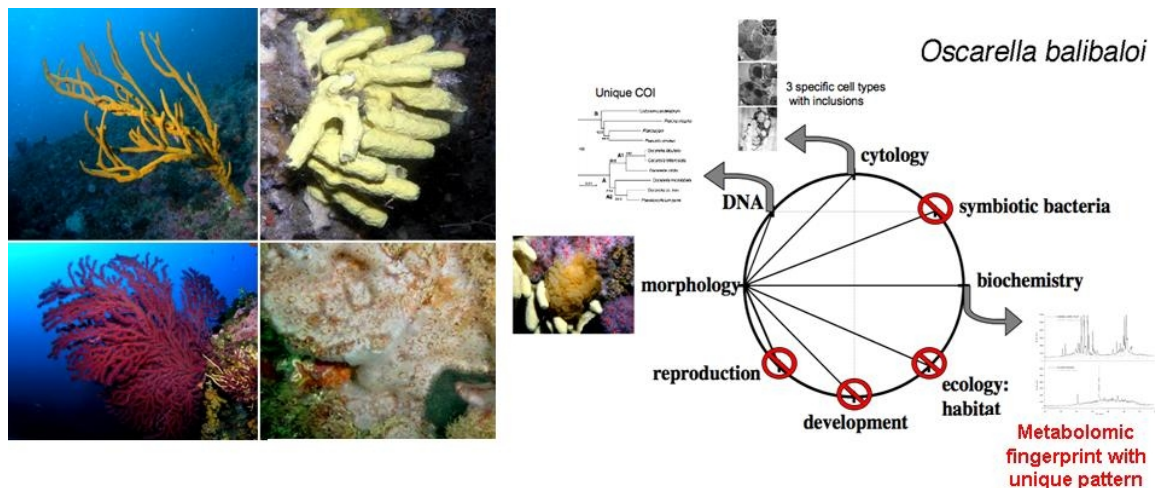
L'étude des éponges Haplosclerida *Haliclona fulva*, *H. mucosa* et *H. sarai* a déjà conduit à la découverte d'un grand nombre de structures originales en cours de valorisation (1-UNSA). *Phorbas tenacior* est également une éponge commune, encroûtante, généralement pionnière et capable de coloniser de grandes surfaces rocheuses. Le lysophospholipide 1-hexadécyl-sn-glycérol-3-phosphoryl-choline isolé de cette éponge s'est révélé être un composé à activité antimalarique modérée (CI<sub>50</sub> = 11 µM), dont l'action sur le globule rouge parasité serait bien dirigée vers le parasite et non la cellule hôte (2-MNHN).

Certains groupes d'éponges étaient largement sous-étudiés au démarrage du programme. C'est le cas en particulier des éponges Homoscleromorpha, qui sont le plus souvent de petites tailles et cantonnées dans des habitats peu accessibles (grottes sous-marines). Dans ce cas aussi, de nombreux métabolites secondaires ont été décrits. Parmi eux, des lysophospholipides (LPL) se sont avérés être des composés majoritaires potentiellement valorisables (extraits cytotoxiques vis-à-vis des cellules tumorales humaines KB et antimalariques). Par ailleurs, ces métabolites secondaires sont connus pour leur rôle de molécule de signal chez les métazoaires. Ainsi, nous avons décrit deux molécules de ce type chez l'éponge *Oscarella tuberculata* : un lyso-PAF ("platelet activating factor") déjà identifié dans quelques autres espèces d'éponges, et un lysophosphorylethanolamine C20:2 nouveau (Ivanisevic et al. 2011). Une nouvelle famille de sesterterpènes glycosylés a été également mise en évidence dans la nouvelle espèce *Oscarella balibaloï* (article en préparation, 1-UNSA et 5-DIMAR), ce qui prouve le potentiel de ce groupe d'éponges dont la nature de sa chimiodiversité reste encore à évaluer précisément. Les éponges calcaires, Calcispongiae, étaient peu étudiées également. L'étude chimique de *Clathrina clathrus* a conduit à l'isolement de huit composés, appartenant à trois familles chimiques différentes : trois alcaloïdes de type 2-aminoimidazole dont un complexe du zinc original, deux glycérolipides et trois épidioxystéroïls (Roué et al. 2010, Roué 2011).

**Chimiosystématique** : L'approche métabolomique a été appliquée dans le cadre d'une taxonomie intégrative de groupes d'invertébrés marins pour lesquels les caractères morphologiques étaient inexistants ou trop polymorphes. Dans un premier temps, cette approche a permis de statuer sur différentes espèces cryptiques d'éponges Verongida (e.g. Reveillaud et al. soumis), et plusieurs éponges nouvelles devraient être encore décrites prochainement parmi les éponges Axinellidae ou Aplysinidae de Gibraltar et du proche Atlantique, ou de Méditerranée orientale. Elle a été aussi appliquée pour statuer sur différents morphotypes d'ascidies du genre *Cystodytes*, et pour mettre en évidence des divergences chimiques parmi différents morphotypes (cas du zoanthaire *Parazoanthus axinellae* (Cachet et al. en préparation). Ainsi, plusieurs nouveaux cas d'espèces cryptiques pourraient être révélés prochainement.

Des approches innovantes en métabolomique ont été développées dans le cadre du programme pour étudier plus en profondeur les relations inter-spécifiques au sein de certains groupes de manière à proposer des classifications chimio-systématiques confrontées aux hypothèses phylogénétiques. Le développement d'une chimio-systématique a été parfois contesté car elle n'apportait pas toujours la solution espérée. Cela peut s'expliquer par une vision souvent biaisée de la diversité chimique d'un groupe d'organismes, résultant de l'utilisation d'une portion très incomplète du métabolome. Notre méthode permet d'exploiter l'ensemble des signatures chimiques d'un groupe d'espèces, afin de démontrer leur utilité en tant qu'indicateurs de la diversité métabolique à différents niveaux taxonomiques. A ce jour, cette approche a été essentiellement appliquée à deux groupes d'éponges : (i) l'ensemble monophylétique des Homoscleromorpha (Plakinidae) pour aider au positionnement dans la classification d'espèces pour lesquelles les caractères morphologiques sont rares (thèse J. Ivanisevic) (Fig. 3) ; (ii) l'ensemble polyphylétique des Axinellidae pour lequel les caractères chimiques sont bien congruents avec les hypothèses actuelles de phylogénie moléculaire (thèse C. Lejeune). Chez les Homoscleromorpha, la classification obtenue soutient les résultats les plus récents de phylogénie moléculaire et propose la restauration de deux anciens clades au sein des Homoscleromorpha: les Plakinidae, un groupe qui ne contient aujourd'hui que des espèces à squelette, et les Oscarellidae qui ne contient que des espèces sans squelette (Ivanisevic et al. 2011). Ce premier jeu de données obtenu

grâce à ECIMAR est aujourd'hui complété par l'étude d'échantillons Homoscleromorpha collectés dans d'autres zones géographiques, de manière à produire une classification fiable de ce groupe. La phylogénie moléculaire a clairement démontré la polyphylie des *Axinella* (Gazave et al. 2010), et nos résultats de métabolomiques soutiennent la nouvelle classification proposée. Aussi, il convient aujourd'hui de réviser le statut taxonomique l'ensemble des *Axinella* connues (*Axinella* vraie ou autre clade ?) en utilisant les outils développés dans le cadre d'ECIMAR (projet de collaboration avec S. Pomponi, U. de Florida).



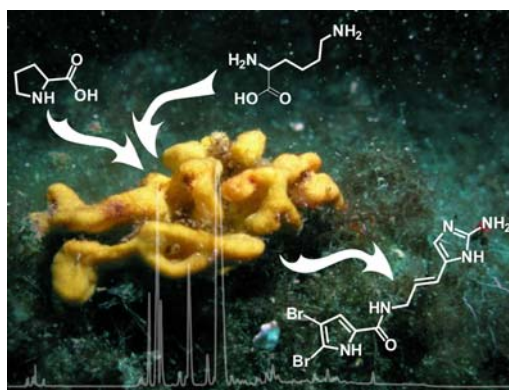
Illustrations des groupes d'organismes sélectionnés pour répondre à des questions de systématique et d'écologie (Eponges *Axinella* et *Aplysina*, gorgones et ascidies *Cystodytes*. Principe de la taxonomie intégrative, les lignes qui traversent le cercle indiquent les différentes voies possibles pour vérifier des hypothèses taxonomiques. Pour créer un nouveau taxon, au moins une de ces lignes (plus d'une c'est mieux) doit croiser le cercle. Cette approche a été employée dans ECIMAR pour révéler l'existence d'espèces cryptiques (Pérez et al. 2011 ; Cardenas et al. soumis, modifié).

## WP 2 - Production de métabolites cibles

**Synthèse et Biosynthèse de métabolites secondaires :** Deux familles de molécules ont été étudiées pour une meilleure compréhension des voies métaboliques menant à ces composés. Le partenaire 3-ICSN s'est spécialisé depuis plusieurs années dans la chimie des P-2-AI, famille d'alcoïdes marins produits uniquement par différentes éponges des genres *Axinella* et *Agelas* en particulier. Parmi les membres de cette famille, l'oroidine a depuis longtemps été reconnue comme un intermédiaire clé dans la biosynthèse d'architectures moléculaires extrêmement complexes de type palau'amine. Deux approches parallèles ont été conduites qui visaient d'une part à mieux connaître les événements pré-oroidine impliquant des précurseurs de type amino-acides et d'autre part à mieux appréhender les cascades chimiques post-oroidine conduisant à la formation de dimères complexes. Le partenaire 3-ICSN a ainsi poursuivi ses études en chimie de synthèse biomimétique pour conduire à la production en quantité de dimères comme la debromokonbu'acidine et la palau'amine mais aussi pour proposer des hypothèses sur leurs voies de biosynthèse (Al Mourabit et al. 2011). La réaction en cascade qui avait été découverte a été améliorée puisque le composé intermédiaire obtenu est plus élaboré et le rendement plus intéressant. Dans le but de préparer des P-2-AI particulièrement intéressants pour mieux étudier leurs propriétés chimiques et biologiques, les synthèses d'analogues de dispacamides à partir de dicétopipérazines (Han et al. 2011) et celle de nagélamides à partir de l'oroidine ont été entreprises. Même si ces approches de synthèse sont indispensables pour proposer des voies de biosynthèse, des résultats expérimentaux sont indispensables pour les confirmer. La collaboration des partenaires 1-UNSA et 3-ICSN a permis la réalisation des premières expériences *in vivo* sur la biosynthèse de métabolites secondaires produits par des invertébrés marins. Les résultats obtenus par l'utilisation de précurseurs acides aminés radiomarqués dans des expériences réalisées sur des

éponges vivantes en aquarium (*Axinella damicornis*) ont permis de proposer la proline et la lysine comme précurseurs de chacune des deux parties de l'oroidine (Genta-Jouve et al. 2011). Une méthode de détection extrêmement sensible par autoradiographie (Imagerie par beta-imager) a été appliquée pour la première fois à ce genre d'études ce qui a permis de mesurer des taux d'incorporation en  $^{14}\text{C}$  très faibles et jamais atteints dans ce cadre. Ce résultat est particulièrement prometteur pour une meilleure compréhension des voies métaboliques chez les spongiaires qui étaient jusqu'à présent limitées par des taux d'incorporation trop faibles pour être concluants. L'application à d'autres molécules d'intérêt est actuellement en cours, ce qui permettra également de mieux comprendre les phénomènes de transfert des gènes de la biosynthèse qui sont supposés dans ce cas être horizontaux par transmission de gène associés aux enzymes Non Ribosomal Peptide Synthases bien connues chez les bactéries vers son hôte spongiaire (Projet européen BAMMBO).

La seconde famille de molécules étudiées a été celle des pyridoacridines, une vaste famille de métabolites produits par différentes espèces d'ascidies du genre *Cystodytes*. L'ascididimine a pu être produite dans des extraits acellulaires de l'ascidie *Cystodytes dellechiaiei*. Les processus conduisant à sa biosynthèse ont été confirmés comme étant enzymatiques. Un schéma de biosynthèse impliquant toutes les molécules connues à ce jour dans cette espèce a été proposé, avec la tryptamine et la dopamine comme précurseurs clés dans la biosynthèse de cette famille de molécules.



Précurseurs de l'oroidine produite par l'éponge méditerranéenne *Cymbaxinella (Axinella) damicornis* (extrait de Genta-Jouve et al. 2011 ChemBioChem),

**Rôle des microorganismes symbiotiques dans la biosynthèse de métabolites secondaires :** Ici l'objectif était d'isoler des microorganismes symbiotiques depuis l'holobionte éponge, de manière à localiser les métabolites secondaires majeurs. Ces tris ont pu être réalisés par centrifugation dans un premier temps, puis par cytométrie de flux. Les partenaires 4-UPVD et 5-DIMAR ont réalisé des tris de cellules de cyanobactéries symbiontes de l'éponge *Petrosia ficiformis*. Les analyses chimiques de ces cyanobactéries n'ont pas permis de localiser les composés apolaires majoritaires de l'extrait total de *P. ficiformis* (polyacétylènes, stérols). Ces microorganismes ne seraient donc pas responsables de la production de ces métabolites secondaires. Ces résultats sont en accord avec le fait que ces composés sont présents dans plusieurs autres espèces de *Petrosia* pour lesquelles la présence de cyanobactéries n'a pas été mise en évidence. La même approche expérimentale a été développée pour l'étude du rôle des micro-organismes symbiotiques dans la biosynthèse des alcaloïdes bromés chez l'éponge *Aplysina aerophoba* (4-UPVD). Le tri a permis d'aboutir à deux sous-populations microbiennes symbiotiques d'*A. aerophoba*: une cyanobactérie, *Synechococcus* sp. et des bactéries. Il semble que l'isofistularin-3 soit le seul alcaloïde bromé majoritaire présent dans la cyanobactérie, le culot bactérien n'en contenant pas. Le stockage et/ou la biosynthèse des métabolites secondaires semble donc se faire dans les cellules de l'éponge.

Pour pallier le manque d'études sur les éponges calcaires, le compartiment microbien associé à *Clathrina clathrus* a été caractérisé *via* des études ultrastructurales et phylogénétiques (2-MNHN et 5-DIMAR). Des analyses LC/MS de fractions enrichies en cellules d'éponge ou en bactéries ont permis la localisation de la clathridine, alcaloïde antimicrobien de type 2-aminoimidazole, dans les cellules de *C. clathrus* suggérant sa production par les cellules d'éponge. L'étude chimique de la bactérie cultivable *Pseudoalteromonas* sp. 1-Cc-11, présente de manière récurrente dans *C. clathrus*, a conduit à la

purification de sept composés : trois dicétopipérazines, un dérivé indolique, un composé benzénique et deux glycérolipides identiques à ceux précédemment isolés de l'éponge entière, révélant leur origine bactérienne. La localisation de cette bactérie dans le choanoderme par hybridation fluorescente *in situ* indique une origine alimentaire plutôt que symbiotique.

Ainsi en règle générale la plupart des métabolites secondaires isolés d'invertébrés marins semblent provenir dans nos cas des cellules de l'hôte plutôt que de ces micro-organismes associés même si une généralisation n'est pas possible à partir du peu d'exemples étudiés.

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

**Variabilité naturelle et rôle biologique potentiel des métabolites secondaires** : Un prérequis pour la réalisation de cette tâche était de bien apprécier la variabilité intra-individuelle, particulièrement pour les modèles présentant les plans d'organisation les plus complexes (e.g. espèce coloniale, à différenciation tissulaire, ou encore à communauté endo-symbiotique abondante et répartie de manière hétérogène). Chez les gorgones par exemple, ces tests ont montré une grande variabilité selon la position dans la colonie, imposant ainsi de n'échantillonner que les parties apicales pour nos suivis temporels et spatiaux. De la même manière, nous avons observé que les concentrations en alcaloïdes bromés totaux variaient significativement au sein d'un même individu d'*Aplysina aerophoba*; les parties sommitales des cheminées et le choanosome étant plus riches en métabolites secondaires que les parties basales et l'ectosome.

De manière assez classique, certaines études de la variabilité du métabolome « secondaire » ont été réalisées grâce à des méthodes de dosages chromatographiques. Cela a été appliqué chez la gorgone *Paramuricea clavata* dans le cadre d'une étude spatio-temporelle de la variabilité des métabolites dominants. Par exemple, il a été montré une variation importante de l'expression de tryptamine avec la profondeur de prélèvement des gorgones, ce qui pourrait être lié à la présence de compétiteurs pour l'espace (macrophytes aux faibles profondeurs). L'étude de plus de 150 échantillons de l'éponge *Aplysina aerophoba* a été effectuée pour évaluer la variabilité géographique à différentes échelles de distance ; 2 sites (1-10m) par stations, 2 stations (100 m) par zone, 2 zones (1000m) par région et 2 régions (2000-3000km), Méditerranée et Atlantique. Le niveau d'expression de base des métabolites secondaires s'est avéré stable avec une concentration totale en alcaloïdes bromés identique dans les 2 aires géographiques (Méditerranée vs Atlantique). Cependant, la contribution relative de chacun des 4 alcaloïdes majoritaires à cette concentration totale varie significativement dans l'espace ; l'isofistularin-3 étant plus exprimée dans les sites Atlantique, et l'aplysinaisin en Méditerranée (Sacristan et al. soumis). Une variabilité qualitative importante de la production de métabolites secondaires a été également démontrée pour l'éponge *Spongia lamella* étudiée dans 7 sites de Méditerranée occidentale (de Gibraltar à Marseille) (Noyer et al. 2011). Ces résultats soulignent la complexité existante dans le contrôle de l'expression des métabolites secondaires par des facteurs agissant à petite ou à grande échelle géographique.

Etant donné que le métabolisme secondaire peut être en compétition avec le métabolisme primaire pour les précurseurs chimiques (substrats, co-facteurs), les métabolites secondaires sont généralement considérés comme résultant d'un coûteux compromis au niveau biochimique. Les fonctions biologiques primaires sont principalement déterminées par des fluctuations saisonnières de paramètres environnementaux. Ainsi, on pouvait supposer que la bioactivité de nos modèles d'éponges et leur production de métabolites secondaires varieraient en fonction d'un compromis avec les fonctions biologiques primaires, ou en réponse à des facteurs biotiques ou abiotiques. Nous avons évalué l'influence de la température, du cycle de vie et de la présence de compétiteurs pour l'espace, et testé la Théorie de Défense Optimale (ODT) en utilisant la bioactivité de l'éponge comme indicateur du métabolisme secondaire, et l'effort de reproduction comme indicateur du métabolisme primaire. Les variations temporelles de ces deux indicateurs métaboliques à fort coût énergétique ont été suivies sur la durée du programme pour plusieurs espèces d'éponges (*Oscarella* spp., *Spongia officinalis*, *Aplysina* spp., *Agelas oroides*, *Haliclona fulva* et *Dysidea avara*). Par exemple pour les trois éponges

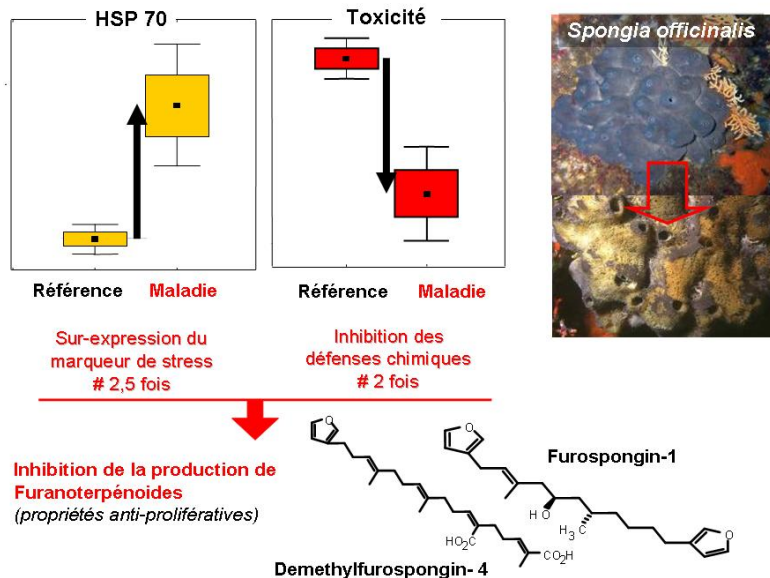


*Oscarella*, la bioactivité des extraits bruts a montré une variation significative au cours du temps, et la température n'est pas apparue comme le facteur qui explique le plus cette variabilité. Une diminution importante de la bioactivité est généralement observée en période d'embryogénèse et de développement larvaire (Ivanisevic et al. 2011 ; Ivanisevic et al. in press). L'analyse des signatures métaboliques a révélé une variation des métabolites majoritaires et a ainsi permis la distinction de phénotypes métaboliques reliés à des gammes de bioactivité (Ivanisevic et al. in press). Un phénotype semble plus exprimé lorsque les *Oscarella* sont en compétition avec d'autres éponges. Il semblerait donc que l'optimisation de l'allocation des ressources, clairement observée pendant la période de reproduction et probablement influencée par l'interaction de facteurs biotiques et abiotiques, détermine la variation de bioactivité observée. Dans le cas d'*O. tuberculata*, l'étude des variations saisonnières des deux LPLs majoritaires a permis de mieux comprendre le rôle des LPL dans le cycle de vie de l'éponge. Un plus fort niveau d'expression des LPL a été détecté dans les éponges en reproduction, et particulièrement dans les femelles lors du pic de reproduction, à savoir pendant le développement larvaire. Nos résultats indiquent un rôle évident de ces LPL dans le fonctionnement du système reproducteur et dans le développement larvaire, et suggèrent qu'ils jouent le rôle de médiateurs dans les processus d'embryogénèse et de morphogénèse de l'éponge (Ivanisevic et al. 2011). Ces molécules, dont les variations d'expression ne suivent pas l'ODT, pourraient avoir un rôle plus physiologique qu'écologique. L'hypothèse inverse a été émise pour un composé isolé de *D. avara*. Dans ce cas, les signatures métabolomiques des individus adultes ont été comparées à celles des larves, et les premiers résultats ont montré que le rapport de concentrations des composés majoritaires, avarol/monoacétylavarol, était très significativement modifié avec une expression plus importante de monoacétylavarol dans les larves. Est-ce que ce composé procure aux larves un avantage en termes de défense envers les prédateurs ? Ainsi, les approches métabolomiques développées dans le cadre du programme ont permis d'identifier des biomarqueurs de processus biologiques et/ou écologiques, dont le rôle pourra maintenant être précisé grâce à des expérimentations.

**Influence d'un stress aigu sur le métabolisme secondaire et pertinence de certains métabolites comme bioindicateurs :** Le rôle écologique des métabolites secondaires est assez mal connu, mais de nombreuses hypothèses mentionnent leur implication dans les mécanismes de défense contre les prédateurs, compétiteurs pour l'espace ou pathogènes. L'hypothèse d'une altération de cette activité métabolique a été envisagée pour expliquer des épizooties chez des spongiaires et anthozoaires (Lejeusne et al. 2010). Ainsi, nous avons voulu voir si l'intensité de la production de défenses chimiques était liée aux conditions environnementales et à l'intensité d'un stress donné, et si une inhibition de ce métabolisme pouvait être à l'origine des maladies et mortalités observées en Méditerranée. Dans le contexte du stress provoqué par l'anomalie thermique de 2003 sur l'éponge *Spongia officinalis*, parallèlement à la surexpression de protéines de stress (HSP 70), nous avons observé une diminution globale de la production de défenses chimiques, l'expression de certains métabolites étant considérablement réduite voire totalement inhibée. Les métabolites secondaires les plus sensibles appartiennent à la famille des furanoterpènes, l'un d'entre eux ayant des propriétés antiprolifératives bien connues. Ces résultats montrent une nouvelle fois la balance qui peut exister entre métabolismes primaire et secondaire, et que le maintien de l'homéostasie cellulaire par des chaperonnes telles que les HSP peut se faire au détriment de certaines activités métaboliques comme par exemple la production de défenses chimiques. Ces défenses étant réduites, la « porte » est alors entrouverte pour toute sorte de pathogènes, ce qui peut expliquer les cas de mortalités d'invertébrés marins observés au cours de la dernière décennie (Lejeusne et al. 2010). Ces résultats qui tendent à suivre la Théorie du Stress Environnemental ont été confirmés par l'observation d'une baisse de bioactivité chez les éponges *Oscarella* lors d'anomalies thermiques (négatives dans ce cas) provoquant également un phénomène de reproduction asexuée (Ivanisevic et al. 2011).

Nous avons également évalué l'influence de compétiteurs pour l'espace. Par exemple, le zoanthaire *Savalia savaglia*, une espèce dont le cycle de vie passe obligatoirement par une installation sur une gorgone vivante, sa colonisation étant ensuite progressive jusqu'à la mort de la colonie hôte. De la

même manière, la compétition entre l'éponge *Dysidea avara* et plusieurs types d'organismes a été étudiée par le partenaire 4/8-CEAB. Dans ce cas, les individus en contact avec d'autres organismes benthiques surexpriment le composé majoritaire de l'éponge, l'avarol. Par ailleurs, ce composé semble plus exprimé lorsque la compétition est avec des macroalgues que lorsqu'elle est avec d'autres invertébrés benthiques.



Inhibition de la production de défenses chimiques en condition de stress aigu – le cas de l'événement de mortalité d'éponges commerciales de l'été 2003. Les individus sur-exprimant les protéines de stress thermique et présentant une diminution globale de leur toxicité naturelle (microtox®) sont d'un phénotype métabolique différent des individus non-stressés avec une inhibition presque total de la production de furanoterpènes.

Thomas et al. 2007 5th ECMNP – Pérez et al. in prep.

**Etudier la relation entre génotype et chimiotype par des approches combinant phylogéographie, génétique des populations et chimie des produits naturels marins :** les relations entre génotype et chimio-type n'ont pu être abordées que dans le cas des éponges *Aplysina* et *Spongia lamella*, les travaux conduits sur *Spongia officinalis* par le partenaire 10-HCMR n'ayant permis pour le moment que de mettre au point les outils génétiques. L'étude de la structuration génétique et de la phylogéographie des *Aplysina* (Verongida, Aplysinidae ; marqueurs mtCOI, 18S ADNr, ITS) en région Méditerranée-Atlantique a permis de montrer la validité de l'espèce *Aplysina cavernicola* par rapport à sa congénère *A. aerophoba*, bien qu'il soit possible que ces deux espèces récemment divergées s'hybrident encore, notamment en Adriatique et Mer Egée. On a également mis en évidence l'existence d'au moins une espèce nouvelle d'*Aplysina* sur les côtes atlantiques du Pays Basque, au Portugal et à Madère. Il est également possible qu'un taxon supplémentaire d'*Aplysina* soit présent dans les eaux libanaises. L'étude d'un minisatellite développé simultanément aux microsatellites est venue corroborer l'existence des différents taxons d'*Aplysina* en Méditerranée et proche Atlantique. L'analyse des signatures métaboliques réalisée par le partenaire 4-UPVD est congruente avec ces résultats au niveau phylogéographique. Pour *A. cavernicola*, une banque enrichie en microsatellites (financée par le réseau d'excellence européen Marine Genomics) a été criblée (47 clones positifs séquencés, 31 paires d'amorces dessinées et testées). Le polymorphisme de ces microsatellites a été testé afin d'identifier les locus utilisables pour des études au niveau populationnel. Seuls 6 locus ont présenté un niveau de polymorphisme satisfaisant avec des possibilités d'amplification croisée des différentes espèces d'*Aplysina*. Malheureusement, certains loci présentaient un déséquilibre de liaison entre eux, ne permettant au final que l'utilisation de trois d'entre eux. Ces loci polymorphes ont donc été utilisés pour génotyper un grand nombre d'individus et ainsi caractériser les structures génétiques des populations des espèces d'*Aplysina* à l'échelle de la Méditerranée. L'amplification croisée des différents taxons d'*Aplysina* a permis de confirmer les résultats des autres marqueurs et valider la séparation des *Aplysina* de Méditerranée en au moins 3 espèces dont *A. cavernicola*, *A. aerophoba* et une *Aplysina* n. sp. (qui pourrait ultérieurement être scindée en deux taxons, un en Atlantique et l'autre au Liban). Pour ces dernières, le faible nombre d'individus récolté n'a permis de pousser plus avant

l'étude la structuration génétique. Par ailleurs, nous manquons pour le moment d'échantillons d'Atlantique pour effectuer les signatures métabolomiques, et achever à la description du (des) nouveau(x) taxon(s). Il faut noter, qu'à l'exception des formes de croissance qui varient, les caractères morphologiques traditionnels de cet ensemble d'espèces sont très similaires. Au sein des populations d'*Aplysina cavernicola*, les différentes analyses ont pu montrer l'existence d'une structuration intra-spécifique avec l'existence d'au moins 4 groupes génétiques: un groupe Ceuta nettement différencié des trois autres groupes, Méditerranée nord-occidentale (MNO regroupant Catalogne, Provence et Ligurie), Corse et Croatie. De la même façon, on retrouve aussi une structuration intra-spécifique chez *Aplysina aerophoba*, avec là aussi l'existence de 4 entités génétiques, dont celle atlantique (Madère) est également la plus différenciée des autres (MNO, Corse et Méditerranée orientale groupant Croatie et Liban), ce résultant pouvant être rapproché de ceux obtenus par l'étude de la variabilité géographique du métabolisme de cette espèce.

**Influence de la symbiose sur la production de métabolites secondaires** : Alors que le WP2 avait pour objectif d'essayer d'isoler et caractériser le rôle des microorganismes symbiotiques dans la biosynthèse des métabolites cibles, il était ici question d'essayer de relier leur biodiversité avec la chimiodiversité mesurée au niveau de l'holobionte. Cette biodiversité des symbiontes a été évaluée par différentes techniques moléculaires principalement pour quatre éponges modèles : *Clathrina clathrus*, *Petrosia ficiformis*, *Aplysina aerophoba* et *Spongia lamella*. Dans certains cas, les travaux ne sont pas achevés. Par exemple, les analyses moléculaires (séquençage des gènes codant pour la sous-unité ribosomale 16S / ADNr 16S et des séquences intergéniques 16S-23S / ITS) des différents échantillons de *P. ficiformis* provenant de toute la Méditerranée sont toujours en cours (7-USTV, thèse en cours de Bendaoud). L'abondance et la diversité en symbiontes de *A. aerophoba* et *S. lamella* ont été comparées par PCR quantitative et DGGE (ADNr 16S). Dans le cas d'*Aplysina aerophoba*, une relation quantitative entre la concentration en métabolites secondaires et les bactéries symbiotiques a été établie pour la première fois (Sacristan et al. 2011). La concentration en métabolites secondaires est même liée à la présence de certains types bactériens, ce qui permet de supposer qu'au moins certaines souches sont bien impliquées dans des phases du métabolisme secondaire de l'holobionte. En particulier, la production de l'aplysinamisin semble liée à une phylotype de Chloroflexi, alors que celles de l'isofistularin-3 et de l'aerophobin-2 seraient liées à une souche procaryotique qui reste inconnue pour le moment. Dans le cas de *S. lamella*, la thèse de C. Noyer a permis de confronter pour la première fois diversité génétique, chimique et micro-symbiotique. Alors que ces trois composantes de la diversité de cette éponge varient significativement entre les différentes localités (populations) étudiées, il n'a pas été trouvé de corrélation entre elles, que ce soit à l'échelle des populations ou des individus. L'indice de dissimilarité chimique s'est avéré fortement corrélé avec les indices de dissimilarité bactérienne et génétique, ce qui suggère que le métabolisme secondaire peut jouer un rôle central de « médiateur » des diversités génétiques et bactériennes (Noyer 2010). Ces résultats, avec ceux obtenus dans le WP2, démontrent qu'il n'y a pas de généralisation possible concernant le rôle potentiel des microorganismes symbiotiques dans le métabolisme secondaire des éponges.

## C.5 DISCUSSION

D'une manière générale, les objectifs fixés au démarrage du programme ont été largement atteints, et ont même parfois dépassé nos espérances. Il est vrai que tous les travaux ne sont pas achevés, qu'il reste des espèces et des molécules à décrire, que des questions posées au démarrage restent ouvertes et que de nombreuses autres ont émergé. Avec ECIMAR, nous avons voulu proposer une approche alternative à la recherche de molécules bioactives d'origine marine par bioguidage dans un seul but pharmaceutique. L'ANR a permis aux équipes de chimistes de s'affranchir, au moins un temps, des contraintes imposées par des collaborations avec l'industrie pharmaceutique. Par ailleurs, les tests de bioactivités pratiqués par les partenaires du programme devaient permettre une bonne évaluation de l'intérêt thérapeutique des composés isolés. Malheureusement, les défaillances du partenaire 6-UA

n'ont pas permis d'aller jusqu'au bout de nos projets de valorisation dans le domaine de recherche d'anti-tumoraux mais les nouveaux projets de collaboration avec l'industrie ou d'autres partenaires permettront d'avancer plus en avant dans ce sens. Certaines équipes d'ECIMAR ont effectué un virage important vers l'écologie chimique, d'autres peuvent aujourd'hui envisager de nouveaux rapprochements vers l'industrie avec des chimiothèques d'organismes méditerranéens à valoriser.

L'acquisition systématique de signatures chimiques (ou métabolomiques) a permis de démontrer le potentiel de la chimiodiversité marine méditerranéenne, en revisitant des organismes qui avaient été pourtant largement étudiés par le passé, ou en explorant pour la première fois des groupes peu considérés. Par exemple, les analyses préliminaires portant sur les bryozoaires ont montré que certaines espèces – *Celleporina caminata*, *Smittina cervicornis* et *Adeonella calveti* – constituaient une source potentielle de substances naturelles originales. Un verrou important qu'il faudra lever pour pouvoir explorer plus en avant ce groupe taxonomique est l'accès à une bonne expertise naturaliste. Ce type d'expertise se fait aujourd'hui très rare, alors qu'une bonne détermination (voire une description) de l'organisme étudié représente un pré-requis indispensable pour valoriser sa chimiodiversité.

Aujourd'hui, la métabolomique révolutionne la chimio-systématique en offrant la possibilité de comparer un grand nombre d'échantillons par l'analyse de fractions beaucoup plus complètes du métabolome, et ce, pour obtenir des classifications comparables à celles fournies par la systématique moléculaire. Elle permet ainsi de soutenir des hypothèses phylogénétiques ou phylogéographiques. Le métabolome peut être utilisé comme une signature de l'évolution ou comme un « indicateur des effets de la sélection naturelle » et permet aussi de mieux comprendre l'apparition de certaines voies de biosynthèse.

Parmi les verrous qu'il faudra lever pour valoriser au mieux cette nouvelle approche, il sera nécessaire de développer des outils de traitement des données métabolomiques, libres, simples et automatisés (pré et post « processing »). Il paraît indispensable aussi d'engager une réflexion pour homogénéiser les outils, les protocoles, le format de fichiers, pour le traitement des données métabolomiques, et leur intégration dans des bases de données telles que celle d'ECIMAR.

Les connaissances actuelles portant sur les voies de biosynthèse des métabolites secondaires sont encore très nettement insuffisantes, particulièrement en France où une structuration des efforts dans ce domaine nécessite une interdisciplinarité difficile à mettre en place. Les études de biosynthèse conduites dans ECIMAR permettent d'avoir aujourd'hui de nombreuses perspectives de recherche. L'utilisation de précurseurs marqués isotopiquement combinée à des approches métabolomiques permettra d'accéder à des données cinétiques sur les flux de production de métabolites. Les approches génomiques telles que nous l'envisagions lors de la soumission de notre projet seront décisives pour révéler de nouvelles voies ou des étapes manquantes, et pour apporter une validation fonctionnelle. Faute de budget, cet objectif a dû être abandonné au démarrage du programme. Des progrès significatifs pourront résulter d'une combinaison d'approches de génétique quantitative et de travaux d'ingénierie métabolique utilisant des systèmes hétérologues. En l'absence de génome complet, les outils de génomiques fonctionnelles qui intègrent les données de métabolomique et de transcriptomique permettront de mieux comprendre un système complexe dans son ensemble et de mieux interpréter les conditions de modulation de ses voies métaboliques. Il paraît toutefois évident que l'accès au séquençage d'espèces « non modèles » permettra à moyen terme de faire de grands progrès dans ce domaine.

ECIMAR aura aussi permis d'apporter des outils et quelques éléments de réponse sur la question des relations procaryotes/eucaryotes (symbiontes/hôtes) et leur impact sur la production de métabolites secondaires. Cependant cette problématique demande à être approfondie avec d'autres modèles biologiques et moléculaires, et nécessitera certainement le montage d'un programme plus ambitieux totalement dédié à cette question. Les outils développés dans le cadre d'ECIMAR permettront d'étudier de manière globale l'influence de l'environnement sur ces relations: *e.g.* perturbation du

dialogue moléculaire et stabilité de la symbiose dans l'espace et dans le temps. En effet, les changements environnementaux s'accompagnent souvent de variations fonctionnelles et métaboliques, expression directe de mécanismes d'adaptation aux nouvelles conditions environnementales pouvant remettre en cause une symbiose. L'association de la métabolomique avec les outils d'analyse génomique permettra de démultiplier le potentiel d'investigation des processus co-évolutifs et de pouvoir en dégager des traits généraux au sein de ces processus qui peuvent déboucher sur une nette amélioration des connaissances dans le domaine des interactions biotiques et dans les processus impliqués lors de leur mise en place.

Les conséquences sur le métabolome des espèces des perturbations de grande ampleur telles que les changements climatiques ou les invasions biologiques, ainsi que les conséquences sur le fonctionnement des écosystèmes sont loin d'être établies. En effet, elles varient selon les espèces, et en fonction du type de métabolite secondaire et de l'intensité du changement. Par exemple, avec les introductions biologiques, il est possible d'étudier les mécanismes d'acclimations, d'adaptations et d'évolution d'espèces confrontées à un nouvel environnement, où l'écologie chimique jouera un rôle central. Toute modification de l'environnement constitue une source potentielle, nouvelle ou intensifiée, de sélection directionnelle sur des traits importants pour la valeur sélective d'une espèce. A la combinaison de pressions de sélections fortes (notamment dans le cadre du changement global actuel), les organismes peuvent répondre de façon intégrative par des réponses adaptatives (e.g. ajustements physiologiques, processus micro-évolutifs). La démocratisation de la métabolomique et des nouvelles technologies de séquençage appliquées au génome et au transcriptome permet d'accéder de façon très complète à la quasi totalité de ces niveaux d'organisation, et par là-même d'envisager une approche intégrative amenant à une connaissance approfondie des mécanismes de l'adaptation.

D'une manière générale, ce sont les fonctions biologiques et écologiques des métabolites secondaires en mer que nous pouvons envisager d'étudier par des combinaisons d'études en conditions naturelles et en milieu contrôlé. Cela nécessite de faire aussi progresser les techniques d'extraction des signaux pertinents en lien avec la phénologie des modèles étudiés, leur milieu de vie et la fonction ciblée. Dans ce domaine aussi, notre communauté a commencé à œuvrer pour disposer à courts termes de toutes les facilités nécessaires à l'émergence de l'écologie chimique marine en France.

## C.6 CONCLUSIONS

ECIMAR aura donc produit :

- des données fondamentales sur la biologie, l'écologie et la chimie d'organismes invertébrés de mer Méditerranée,
- un protocole standardisé d'acquisition de signatures chimiques,
- des premières applications de la métabolomique en mer,
- de nouveaux caractères pour la chimio-systématique de groupes problématiques,
- des protocoles d'études des voies de biosynthèse,
- des protocoles d'études du rôle des associations eucaryotes/procaryotes,
- des démonstrations de l'influence de facteurs biotiques et abiotiques sur le métabolisme secondaire,
- une base de données collaborative.

Comme nous le prévoyions au démarrage du programme, il existe maintenant plusieurs perspectives de transposition de l'approche développée dans ECIMAR à d'autres écosystèmes. Par ailleurs, les outils disponibles aujourd'hui permettent de répondre à de nombreuses questions d'écologie chimique marine. ECIMAR a démontré l'utilité de promouvoir l'interdisciplinarité et les échanges d'expérience et de méthodologie entre les communautés scientifiques (notamment chimistes et écologues) de manière à alimenter une base de données, favoriser la caractérisation de métabolomes complets et identifier des marqueurs de processus biologiques et/ou écologiques. ECIMAR a contribué à renforcer les interactions entre les chimistes des produits naturels et écologues en créant le GDR

CNRS 3269 BioChiMar qui regroupe aujourd'hui une quarantaine d'équipes françaises. Nous appelons maintenant la mise en place de plateaux de métabolomique performants et d'équipes de recherche dédiée à l'écologie chimique marine, ainsi qu'au recrutement de personnels spécialisés tels que ceux qui ont été formés dans le cadre de ce programme ANR.

## C.7 REFERENCES

*N.B. : Il s'agit des références bibliographiques hors ECIMAR. Les autres références sont situées dans le tableau listant notre production scientifique*

- Clardy J, Walsh C. (2004) Lessons from natural molecules. *Nature*, 432, 829-837.
- Huyck, T. K., Gradishar, W., Manuguid, F. and Kirkpatrick, P. (2011). Eribulin mesylate. *Nature Reviews Drug Discovery* 10, 173-174.
- Koenig G. M., Kehraus S., Seibert S. F., Abdel-Lateff A., Mueller D. (2006) Natural products from marine organisms and their associated microbes. *ChemBioChem.*, 7, 229-238.
- Newman D. J, Cragg G. M., Snader K. M. (2000) The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Product Reports*, , 17, 215-234.
- Paul V. J., Puglisi M. M., Ritson-Williams R. (2006) Marine chemical ecology. *Natural Product Reports.*, 23, 153-180.
- Proksch P., Ebel R., Edrada R. A., Schupp P., Lin W. H., Sudarsono, Wray V., Steube K. (2003) Detection of pharmacologically active natural products using ecology. Selected examples from indopacific marine invertebrates and sponge-derived fungi. *Pure and Applied Chemistry*, 75, 343-352.
- Koehn F. E., Carter G. T. (2005) The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews Drug and Discovery*, 4, 207-220.

## D LISTE DES LIVRABLES

Date de livraison	N°	Titre	Nature (rapport, logiciel, prototype, données, ...)	Partenaires (souligner le responsable)	Commentaires
M1, 7, 13, 19, 25, 31, 37, 43, 49	M.	Rapports comité de pilotage	Rapports	<u>1-UNSA, 5-DIMAR</u>	Achevés
M1, 13, 25, 37, 49	M.	Rapports annuels	Rapports	<u>1-UNSA, 5-DIMAR</u>	Achevés
M25, 37	M.	Workshops	Workshops, écoles thématiques	<u>1-UNSA, 4-UPVD, 5-DIMAR</u>	Achevés
M1	1.1	Protocole échantillonnage	Rapport	<u>5-DIMAR</u>	Achevé
M36	1.1	Echantillonnage et collection de Vouchers	Rapport	<u>5-DIMAR</u> + tous les partenaires	Achevé
M48	1.1	Taxonomie	Données, publications	<u>5-DIMAR</u> , 4/8-CEAB	Achevé partiellement, en cours
M12	1.2	Protocole standardisé pour signatures chimiques	Rapport	1-UNSA, <u>2-MNHN</u> , 3-ICSN, <u>4-UPVD</u> , 7-USTV	Achevé
M48	1.3	Screening biologique	Rapport	<u>2-MNHN</u> , 3-ICSN, 4-UPVD, 7-USTV	Achevé
M48	1.3	Caractérisation des métabolites	Données, publications	1-UNSA, 2-MNHN, 3-ICSN, <u>4-UPVD</u> , 7-USTV	Achevé partiellement, en cours
M12	1.4	Protocole d'évaluation de la bioactivité	Rapport	<u>2-MNHN</u> , 3-ICSN, 4-UPVD, 7-USTV	Achevé
M42	1.5	Marqueurs taxonomiques et environnementaux	Rapport, publications	1-UNSA, <u>4-UPVD</u> , 5-DIMAR, 7-USTV, 4/8-CEAB	Achevés, publications (dont certaines en cours)
M36	2.1	Publications de métabolites secondaires isolés	Publications	1-UNSA, 2-MNHN, <u>3-ICSN</u> , 4-UPVD, 5-DIMAR, 7-USTV	Achevé partiellement, en cours
M36	2.1	Protocole d'étude de la biosynthèse in vivo	Rapport, publication	<u>1-UNSA</u> , 3-ICSN	Achevé (non prévu)
M24	2.2	Fractionnement cellules d'éponges et micro-organismes	Rapport, publications	<u>2-MNHN</u> , 4-UPVD, 7-USTV	Achevé
M36	2.2	Identification moléculaire d'endo-symbiontes	Rapport (thèse), publications	<u>2-MNHN</u> , 4-UPVD, 7-USTV, 4/8-CEAB	Achevé
M48	2.2	Résultats sur les cultures de symbiontes	Résultat infructueux	<u>7-USTV</u>	Abandonné
M48	2.3	Résultats sur l'identification et l'expression de gènes candidats	Abandonné suite à la réduction du budget	1-UNSA, 4-UPVD, 5-DIMAR, <u>4/8-CEAB</u>	Abandonné
M36	3.1	Analyse de séries d'échantillons	Rapport, publications	<u>5-DIMAR</u> , 4/8-CEAB	Achevé partiellement, en cours
M36	3.2	Protocoles expérimentaux pour étude de stress et résultats	Rapport	<u>5-DIMAR</u>	Achevé
M48	3.3	Développement de marqueurs génétiques	Publications	<u>5-DIMAR</u> , 4/8 CEAB, 10-HCMR	Achevé
M48	3.4	Protocoles expérimentaux « symbioses »	Publications	4-UPVD, 5-DIMAR, <u>7-USTV</u> , 4/8 CEAB	Achevé
M9	4.1	Création du site Ecimar	Site	<u>1-UNSA</u>	Achevé
M18	4.3	Charte graphique et ergonomie	Site	<u>1-UNSA</u>	Achevé
M48	4.4	Remplissage des données	Données	<u>5-DIMAR</u> + Tous les partenaires	En continu

## E IMPACT DU PROJET

### E.1 INDICATEURS D'IMPACT

#### *Nombre de publications et de communications (détaillé en E.2)*

		Publications multipartenaires	Publications monopartenaires
International	Revue à comité de lecture	<b>19</b> (3 soumises)	<b>23</b> (8 soumises)
	Ouvrages ou chapitres d'ouvrage	<b>2</b>	<b>2</b>
	Communications (conférence)	20 orales – 5 affiches	23 orales – 5 affiches
France	Revue à comité de lecture		
	Ouvrages ou chapitres d'ouvrage	<b>2</b> thèses de doctorat	<b>6</b> thèses de doctorat
	Communications (conférence)	5 orales – 1 affiche	11 orales – 5 affiches
Actions de diffusion	Articles vulgarisation	3	1
	Conférences vulgarisation*	11	3
	Autres	2 Reportages TV	

#### *Autres valorisations scientifiques (détaillé en E.3)*

	Nombre, années et commentaires (valorisations avérées ou probables)
Brevets internationaux obtenus	
Brevet internationaux en cours d'obtention	
Brevets nationaux obtenus	
Brevet nationaux en cours d'obtention	
Licences d'exploitation (obtention / cession)	
Créations d'entreprises ou essaiage	
Nouveaux projets collaboratifs	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Création du GDR CNRS n°3269 « Biodiversité et Chimiodiversité Marine (BioChiMar) »</li> <li>• Programmes de collaboration avec le Maghreb « Décrire et valoriser la biodiversité du littoral tunisien et algérien » (Région PACA et ARCUS Méditerranée) : 1-UNSA, 5-DIMAR, 7-USTV</li> <li>• Programme Era-Net Biome « Diversity and functioning of coastal marine biomes under siege: implications of seaweed proliferations across three oceans (SEAPROLIF) »: 1-UNSA, 5-DIMAR et autres partenaires GDR BioChiMar</li> <li>• Programme Parc National de Port-Cros « Capacités d'adaptation d'organismes benthiques autochtones face à l'algue invasive « <i>Caulerpa racemosa</i> »</li> <li>• Programme européen FP7 KBBE 2010 : BAMMBO Sustainable production of Biologically Active Molecules of Marine Based Origin. 1-UNSA</li> </ul>
Colloques scientifiques	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Organisation des journées annuelles du GDR BioChimar (2009, 2010 et 2011) – 3-ICSN, 5-DIMAR</li> <li>• Organisation World Sponge Conference, Girona, Espagne –</li> </ul>

\* NB : En fait des exposés réalisés devant des non-spécialistes, le plus souvent sur invitation, en France et à l'étranger (Tunisie, Canada, USA, .



	8/9-CEAB
<b>Autres (préciser)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Formation de nombreux étudiants, à l'interface chimie/écologie marine.</li> <li>• Organisation de deux écoles thématiques dans le cadre d'ECIMAR et participation à l'organisation d'une école thématique du CNRS en 2012.</li> <li>• Participation à la rédaction des « Prospectives en Ecologie Chimique » pour l'INEE du CNRS. Co-animation des thèmes 1, « Chimie du vivant éco-inspirée », et 5 « approches métabolomiques en écologie chimique ».</li> <li>• Plusieurs projets en gestation dans le cadre du GDR BioChiMar.</li> </ul>

## E.2 LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS (ETAT AU 1<sup>ER</sup> OCTOBRE 2011)

Publications (JCR)					
WP1	Five new sponge species (Porifera: Demospongiae) of subtropical or tropical affinities from the coast of Lebanon (eastern Mediterranean)	Vacelet J., Bitar G., Carteron S., Zibrowius H., Pérez T.	5-DIMAR	2007	Journal of the Marine Biological Association of UK
WP1	Marine metabolites overcoming or circumventing multidrug resistance mediated by ATP-dependent transporters. A new hope for patient with tumors resistant to conventional chemotherapy	Barthomeuf C., Bourguet-Kondracki M.L., Kornprobst J.M.	2-MNHN, 6-UA	2008	Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry
WP1	<i>Phorbas topsenti</i> (Demospongiae, Poecilosclerida), new name for the Mediterranean ' <i>Phorbas paupertas</i> ', with description of a new <i>Phorbas</i> species	Vacelet J. & Pérez T.	5-DIMAR	2008	Zootaxa
WP2	Biosynthesis of bromopyrrole alkaloids in <i>Agelas oroides</i>	Cachet N., Thomas O. P., Al-Mourabit A., Oberhänsli F., Teyssié J. L., Jeffrey R.	1-UNSA, 3-ICSN	2008	Planta Medica
WP2	Diterpenoids from the mediterranean brown alga <i>Dictyota</i> sp. evaluated as antifouling substances against a marine bacterial biofilm	Viano Y., Bonhomme D., Camps M., Briand J.-F., Ortalo-Magné A., Blache Y., Piovetti L., Culioli G.	7-USTV	2009	Journal of Natural Products
WP1	Synthesis of a polyprenyl-type library containing 1,4-disubstituted-1,2,3-triazoles with anti-biofilm activities against <i>Pseudoalteromonas</i> sp.	Praud-Tabariès A., Dombrowsky L., Bottzek O., Briand J.-F., Blache Y.	7-USTV	2009	Tetrahedron Letters
WP1, WP3	My favourite animal : The homoscleromorph sponge <i>Oscarella lobularis</i> as model in evolutionary and developmental biology	Ereskovsky A.V., Borchiellini C., Gazave E., Ivanisevic J., Lapébie P., Pérez T., Renard-Daniel E., Vacelet J.	5-DIMAR	2009	BioEssays
WP1	Halocytin and papillosin, two new antimicrobial peptides isolated from hemocytes of the solitary tunicate, <i>Halocynthia</i>	Galinié R., Roger E., Sautière P.-E., Banaigs B., Mitta G.	4-UPVD	2009	Antimicrobial agents in Medicinal Chemistry

	<i>papillosa</i>				
WP1, WP3	Chemical bioactivity of sponges along an environmental gradient in a Mediterranean cave	Turon X, Martí R, Uriz MJ	8- CEAB	2009	Scientia Marina
WP1	Marine antifouling laboratory bioassays: an overview of their diversity	Briand J.-F.	7-USTV	2009	Biofouling
WP1	Novel 3-alkylpyridiniums from Haplosclerida marine sponges	Laville R., Amade P., Thomas O. P.	1-UNSA	2009	Pure and Applied Chemistry
WP3	Isolation and characterization of microsatellite loci from the endangered Mediterranean sponge <i>Spongia agaricina</i> (Demospongiae: Dictyoceratida)	Noyer C, Agell G, Pascual M, Becerro MA	8/9-CEAB	2009	Conservation Genetics
WP3	Characterization of polymorphic microsatellite markers for the endangered Mediterranean bath sponge <i>Spongia officinalis</i> L.,	Dailianis, T., Tsigenopoulos CS.	5/10-HCMR	2009	Conservation Genetics
WP3	In vitro effects of metal pollution on Mediterranean sponges: species-specific inhibition of 2',5'-oligoadenylate synthetase.	Saby E., Justesen J., Kelve M., Uriz MJ.	8- CEAB	2009	Aquatic Toxicology
WP3	2'-phosphodiesterase and 2',5'-oligoadenylate synthetase activities in the lowest metazoans, sponge [Porifera].	Saby E., Poulsen JB., Justesen J., Kelve M., Uriz MJ.	8- CEAB	2009	Biochimie
WP2	Biomimetically Inspired Short Access to the 2-Aminoimidazole-Fused Tetracyclic Core of Dibromoagelaspongin	S. Picon, Huu Dau E.-T., Martin M.-T., Retailleau P., Zaparucha A. Al-Mourabit A.	3-ICSN	2009	Organic Letters
WP1	Axiphenylalaninium and Axityrosinium, Modified Amino Acids from the Mediterranean Marine Sponge <i>Axinella polypoides</i>	M. Gabant, Martin M.-T., Moriou, Ermolenko L., Guérineau V., Retailleau P., Thoison O., Boury-Esnault N., Pérez T., Al-Mourabit A.	3-ICSN, 5-DIMAR	2009	Journal of Natural Products
WP1	Parazoanthines: hydantoin alkaloids from the Mediterranean sea anemone <i>Parazoanthus axinellae</i>	Cachet N., Genta-Jouve G., Regalado E., Mokrini R., Amade P., Culioli G., Thomas O. P.	1-UNSA, 7-USTV	2009	Journal of Natural Products
WP1, WP2	Cellular Localization of Clathridimine, an Antimicrobial 2-Aminoimidazole Alkaloid Produced by the Mediterranean Calcareous Sponge <i>Clathrina clathrus</i>	Roué M., Domart-Coulon I., Ereskovsky A., Djediat C., Pérez T., Bourguet-Kondracki M.L.	2-MNHN, 5-DIMAR	2010	Journal of Natural Products
WP1, WP2, WP3	Characterization and localization of a hybrid non-ribosomal peptide synthetase and polyketide synthase gene from the toxic dinoflagellate <i>Karenia brevis</i>	López-Legentil S, Song BK, DeTure M, Baden DG	8-CEAB	2010	Marine Biotechnology
WP1	Structure and antimicrobial activity of new pyridoacridine alkaloids isolated from different chromatotypes of the ascidian <i>Cystodytes dellechiaiei</i> .	Bontemps N., Bry D., Lopez-Legentil S., Simon-Levert A., Long C., Banaigs B.	4-UPVD, 8/9-CEAB	2010	Journal of Natural Products

WP1, WP2	Marine Natural Meroterpenes: Synthesis and Antiproliferative Activity	Simon-Levert A., Menniti C., Soulière L., Genevière A-M., Barthomeuf C., Banaigs B., Witczak A.	4-UPVD, 6-UA	2010	Marine Drugs
WP3	In situ investigation of <i>Spongia officinalis</i> (Demospongiae) particle feeding: coupling flow cytometry and stable isotope analysis	Topçu N.E., Pérez T., Gregori G., Harmelin-Vivien M	5-DIMAR	2010	Journal of Experimental Marine Biology and Ecology
WP3	Climate change effects on a miniature ocean: the highly diverse, highly impacted Mediterranean Sea	Lejeusne C., Chevaldonné P., Pergent-Martini C., Boudouresque CF., Pérez T.	5-DIMAR	2010	Trends in Ecology and Evolution
WP3	Quantitative comparison of bacterial communities in two Mediterranean sponges	Noyer C., Hamilton A., Sacristan-Soriano O. and Becerro M. A.	8-CEAB	2010	Symbiosis
WP3	The biodiversity of the Mediterranean sea: estimates, patterns and threats	Coll M et 39 auteurs (X Turon parmi eux)	8-CEAB	2010	PLoS One
WP1, WP3	<i>Oscarella balibaloï</i> , a new sponge species (Homoscleromorpha: Plakinidae) from the Western Mediterranean Sea: cytological description, reproductive cycle and ecology	Pérez T., Ivanisevic J., Dubois M., Pedel L., Thomas O. P., Tokina D., Ereskovsky A.V.	1-UNSA, 5-DIMAR	2011	Marine Ecology
WP3	Exploring the links between natural products and bacterial assemblages in the sponge <i>Aplysina aerophoba</i>	Sacristán-Soriano O., Banaigs B., Casamayor E., Becerro M. A.	8-CEAB 4-UPVD	2011	Applied and Environmental Microbiology
WP1	New pyridoacridine alkaloids from the purple morph of the ascidian <i>Cystodytes dellechiaiei</i>	Bry D., Banaigs B., Long C. and Bontemps N.	4-UPVD	2011	Tetrahedron Letters
WP1, WP3	Metabolic fingerprinting as indicator of biodiversity: an attempt to elucidate interspecific relationships among Homoscleromorpha sponges	Ivanisevic, Thomas O.P., Lejeusne C., Chevaldonné P. Pérez T.	1-UNSA, 5-DIMAR	2011	Metabolomics
WP1, WP3	Lysophospholipids in the Mediterranean sponge <i>Oscarella tuberculata</i> : seasonal variability and putative biological role	Ivanisevic J., Pérez T., Barnathan G., Thomas O. P.	1-UNSA, 5-DIMAR	2011	Journal of Chemical Ecology
WP1	Citharoxazole from the Mediterranean Deep-Sea Sponge <i>Latrunculia</i> (Biannulata) <i>citharistae</i>	Genta-Jouve G., Francezon N., Puisant A., Auberger P., Vacelet J., Pérez T., Al-Mourabit A., Fontana A., Thomas O. P.	1-UNSA, 3-ICSN, 5-DIMAR	2011	Magnetic Resonance in Chemistry
WP1	Antifouling activity of commercial biocides vs natural and natural-derived products assessed by marine bacteria adhesion bioassay	Camps M., J.-F. Briand, L. Guentas-Dombrowsky, G. Culioli, A. Bazire, Y. Blache	7-USTV	2011	Marine Pollution Bulletin
WP1, WP3	Patterns of chemical diversity in the Mediterranean sponge <i>Spongia lamella</i>	Noyer C., Thomas O. P. and Becerro M. A.	1-UNSA, 8-CEAB	2011	PLoS one
WP1	A New Hydroxylated Nonaprenylhydroquinone from	Abed C., Legrave N., Dufies M.,	1-UNSA, 5-DIMAR	2011	Marine Drugs

	the Mediterranean Marine Sponge <i>Sarcotragus spinosulus</i>	Robert G., Guérineau V., Vacelet J., Auberger P., Amade P., Mehiri M.			
WP2	Pyrrole-assisted and easy oxidation of cyclic $\alpha$ -amino acid derived diketopiperazines under mild conditions	H. Tian, L. Ermolenko, M. Gabant, C. Vergne, C. Moriou, P. Retailleau and A. Al-Mourabit	3-ICSN	2011	Advanced Synthesis and Catalysis
WP2	Biosynthesis, Asymmetric Synthesis, and Pharmacology Including Cellular Targets of the Pyrrole-2-Aminoimidazole Marine Alkaloids	Al-Mourabit A., Zancanella M. A., Tilvi S., Romo D.	3-ICSN	2011	Natural Products Report
WP3	Linking diversities in the Mediterranean sponge <i>Spongia lamella</i>	Noyer C. and Becerro M. A.	8/9-CEAB	2011	Hydrobiologia
WP2	New insight into marine alkaloids metabolic pathways: revisiting oroidin biosynthesis,	Genta-Jouve G., Cachet N., Holderith S., Oberhänsli F., Teyssié J.-L., Jeffrey R., Al Mourabit A., Thomas O.P.	1-UNSA, 3-ICSN	2011	ChemBioChem,
WP3	Genetic diversity of the imperilled bath sponge <i>Spongia officinalis</i> Linnaeus, 1759 across the Mediterranean Sea: patterns of population differentiation and implications for taxonomy and conservation	Dailianis T., Tsigenopoulos C. S., Dounas C., Voultziadou E.	10-HCMR	En ligne 2011	Molecular Ecology
WP1	Antifouling Properties of Simple Indole and Purine Alkaloids from the Mediterranean Gorgonian <i>Paramuricea clavata</i>	Pérez N., Culioli G., Pérez T., Briand J.F., Thomas O.P., Blache Y.	1-UNSA, 5-DIMAR, 7-USTV	2011	Journal of Natural Products
WP3	Biochemical trade-offs: evidence for ecologically linked secondary metabolism of the sponge <i>Oscarella balibaloï</i>	Ivanisevic J., Thomas O. P., Pedel L., Penez N., Ereskovsky A.V., Culioli G., Pérez T.	1-UNSA, 5-DIMAR, 7-USTV	Sous presse	PLoS One
WP1, WP3	Anti-adhesion activities against marine bacteria exhibited by metabolites of the Mediterranean sponge <i>Petrosia ficiformis</i>	Bendaoud A., Guentas-Dombrowsky L., Culioli G., Pérez T., Barani A.E., Ortalo-Magné A., Briand J.F., Blache Y.	5-DIMAR, 7-USTV	En révision	Marine Biotechnology
WP1	Sponge systematics facing new challenges. Advances in Marine Biology.	Cardenas P., Pérez T., Boury-Esnault N.	5-DIMAR	Soumis invité	Advances in Marine Biology
WP2	Sponge chemical diversity: From biosynthetic pathways to ecological roles	Genta-Jouve G. & Thomas O.P	1-UNSA	Soumis invité	Advances in Marine Biology
WP1, WP2, WP3	The good, the bad, and the ugly of sponge science	Becerro M. A., Uriz M. J., Maldonado M. and Turon X.	8/9-CEAB	Soumis invité	Advances in Marine Biology
WP1, WP2, WP3	Sponge Ecology in the Molecular Era	Uriz, M.J. and X. Turon	8/9-CEAB	Soumis Invité	Advances in Marine Biology
WP1, WP2	Bacterial and chemical diversity in calcareous sponges	Quévrain E, Roué M., Domart-Coulon I., Bourguet-Kondracki M-L.	2- MNHN	Soumis Invité	Journal of Marine Science and Technology

WP1, WP3	Relevance of an Integrative Approach for Taxonomic Revision in Sponge Taxa: Case Study of the Shallow-water Atlanto-Mediterranean <i>Hexadella</i> (Porifera, Ianthellidae, Verongida)	Reveillaud J., Allewaert C., Pérez T., Vacelet J., Banaigs B., Vanreusel A.	4-UPVD, 5-DIMAR	Soumis	Invertebrate Systematics
WP1, WP2	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. bacteria contribute glycerolipids to their calcareous sponge host <i>Clathrina clathrus</i>	Roué M., Domart-Coulon I., Jovet J., and Bourguet-Kondracki M.L.	2-MNHN	Soumis	Microbial Ecology
WP1, WP3	Diversity and spatial distribution of sponge-associated bacteria in <i>Spongia lamella</i>	Noyer C., Casamayor E. O., Hamilton A. and Becerro M. A.	8-CEAB	Soumis	Microbial Ecology
WP3	Population genetics of the bath sponge <i>Spongia lamella</i> in the Western Mediterranean Sea	Noyer C., Perez-Portela R. and Becerro M. A.	8-CEAB	Soumis	Diversity and Distribution
WP1, WP3	Relevant scales of chemical variation in <i>Aplysina aerophoba</i>	Sacristán-Soriano O., Banaigs B and Becerro M. A.	8-CEAB, 4-UPVD	Soumis	Marine Drugs
<b>Autres publications (chapitres et vulgarisation)</b>					
WP1	Overview on Homoscleromorpha sponges diversity in the Mediterranean	Ereskovsky A., Ivanisevic J., Pérez T.	1-UNSA, 5-DIMAR	2009	Proceedings of the first symposium on coralligenous and other calcareous bioconstructions, RAC/SPA Publ., Tunis
ECIMAR	La biodiversité marine et le médicament : espoirs, réalités et contraintes	Banaigs B. & Kornprobst J-M.	4-UPVD	2007	L'actualité chimique n°306
ECIMAR	ECIMAR, au cœur de la biodiversité marine méditerranéenne	Pérez T. & Thomas O.P.	1-UNSA, 5-DIMAR	2008	Marine n°220
ECIMAR	Biodiversité marine, source de diversité chimique, des métabolites pas si secondaires	Bourguet-Kondracki M. L. et Banaigs B	2-MNHN, 4-UPVD	2009	Biofutur (n° 301 spécial Biodiversités marines)
WP2	Biomimetic synthesis of marine pyrrole-2-aminoimidazole and guanidinium alkaloids,	Appenzeller J. & Al-Mourabit A.	3-ICSN	2011	Editor E. Poupon and B. Nay of Wiley-VCH « Biomimetic Organic Chemistry »
WP1, WP2	Quand les chimistes imitent la nature	Al-Mourabit A.	3-ICSN	2011	Pour la Science
WP1, WP3	La vida en el cuerpo de otro: simbiosis microbiana en invertebrados marinos	Uriz M.J.	8-CEAB	<i>in press</i>	Efectos de la biodiversidad microbiana Book:colección divulgacion csic
<b>Communications à congrès - Conférences</b>					
WP1, WP2	Pyrrole-2-Aminoimidazole Marine Metabolites: Isolation and Biomimetic Synthesis Convergence	Al-Mourabit A., Vergne C., Pérez T., Martin M.T., Adeline M.T.	3-ICSN, 5-DIMAR	Mars 2007	233rd American Chemical Society National Meeting, Chicago, USA
WP1, WP3	Marine organisms and secondary metabolites: from chemical ecology to biotechnology	Banaigs B.	4-UPVD	Juin 2007	4th International Symposium Cosm'ing 07, St Malo, France

WP3	Sponge chemical defences in stress conditions: the case study of the last disease outbreak observed in the NW Mediterranean	Thomas O.P., Sarrazin S., Ivanisevic J., Amade P., Pérez T.	1-UNSA, 5-DIMAR	Septembre 2007	5th European Conference on Marine Natural Products, Ischia, Italie
WP1, WP3	Secondary metabolism of the sponge group <i>Homoscleromorpha</i> : diversity and variation of its expression in relation with biotic and abiotic factors	Ivanisevic J., Thomas O., Pérez T.	1-UNSA, 5-DIMAR	Septembre 2007	5th European Conference on Marine Natural Products, Ischia, Italie
WP1	Pyridoacridine alkaloids within purple morphs of <i>Cystodytes</i> spp. (Asciacea: Polycitoridae)	Bontemps-Subielos N., Simon-Levert A., Lopez-Legentil S., Banaigs B.	4-UPVD	Septembre 2007	5th European Conference on Marine Natural Products, Ischia, Italie
ECIMAR	Marine Natural Products: The French case and the ECIMAR program	Thomas O.	1-UNSA	Mars 2008	1er Encuentro internacional en biotecnología Medellín, Colombie
WP1	Isolation of simple indole derivatives from the mediterranean gorgonian <i>Paramuricea clavata</i>	Pérez N., Mokriani R., Pérez T., Culioli G.	5-DIMAR, 7-USTV	Avril 2008	4èmes Journées franco-italiennes de chimie, Nice, France
ECIMAR	Bioactive marine natural products; from ecology to pharmacology.	Simon-Levert A., Banaigs B.	4-UPVD	Mai 2008	22èmes Journées Franco-Belges de Pharmacochimie à Caen, France
WP2	Novel 3-alkylpyridiniums from <i>Haplosclerida</i> marine sponges	Thomas O.	1-UNSA	Juillet 2008	IUPAC conference on biodiversity and Marine Natural Products, Charlottetown, Canada
WP2	Isolation and biomimetic synthesis of alkaloids from <i>Parazoanthus axinellae</i>	Mehiri M.	1-UNSA	Juillet 2008	IUPAC conference on biodiversity and Marine Natural Products, Charlottetown, Canada
ECIMAR	Chemodiversity of the Mediterranean Sea : the ECIMAR network	Thomas O.	1-UNSA	Août 2008	Symposium on Biotechnology, Bogota Colombie
WP1 & 3	Chemical defense of marine organisms against biofouling explored with an adhesion bacteria bioassay	Camps M., Dombrowsky L., Viano Y., Blache Y., Briand J.-F.	7-USTV	Septembre 2008	13th France-Japan Oceanography Symposium, Marseille, France
WP3	Concentrations of natural products are associated with certain bacterial types in the sponge <i>Aplysina aerophoba</i>	Sacristán-Soriano O, Banaigs B, Casamayor EO, Becerro MA	8/9 CEAB	Septembre 2008	43rd European Marine Biology Symposium, Azores, Portugal
WP 1	Quel bioessai pour évaluer l'activité antifouling ?	Camps M., Dombrowsky L., Culioli G., Blache Y. & Briand J.-F.	7-USTV	Novembre 2008	3èmes Journées Scientifiques Euroméditerranéennes, Toulon, France
WP3	Les cyanobactéries symbiontes d'éponges participent-elles à la protection de leur hôte contre le biofouling ?	Bendaoud A., Ortalo-Magne A., Dombrowsky L., Blache Y. & Briand J.-F.	7-USTV	Novembre 2008	3èmes Journées Scientifiques Euroméditerranéennes, Toulon, France
WP1, WP3	Assessing the Mediterranean biodiversity and effects of environmental changes: secondary metabolites as bioindicators	Pérez T., J. Ivanisevic, N. Pérez, G. Culioli, O. Thomas	1-UNSA, 5-DIMAR, 7-USTV	Novembre 2008	<b>Conférence invitée</b> - 1st Euro-Mediterranean Conference on Marine Natural Products (EMCMNP-I), Sharm El Sheikh, Egypte
WP2	Pyrrole-2-Aminoimidazole Metabolites from Sponges: What's behind structures and Reactivity	Al-Mourabit A.	3-ICSN	Novembre 2008	<b>Conférence invitée</b> - 1st Euro-Mediterranean Conference on Marine Natural Products (EMCMNP-I), Sharm El Sheikh, Egypte)
WP1, WP3	Secondary metabolism of the sponge group <i>Homoscleromorpha</i> : diversity and variation of its expression in relation to biotic and abiotic factors.	Ivanisevic J., Thomas O., Ereskovsky A.V., Pérez T.	1-UNSA, 5-DIMAR	Novembre 2008	World Conference on Marine Biodiversity, 11-15 November 2008, Valence, Espagne
WP1, WP2, WP3	New alkaloids from two Mediterranean cnidarians	Thomas O.P, Cachet N., Culioli G., Mokriani R., Pérez T., Mehiri M.	1-UNSA, 5-DIMAR, 7-USTV	Novembre 2008	World Conference on Marine Biodiversity, 11-15 November 2008, Valence, Espagne

WP2, WP3	Genetic and bacterial diversity of the endangered sponge <i>Spongia agaricina</i>	Noyer C., Becerro M.A., Uriz M.J., McKenzie D.	8-CEAB	Novembre 2008	World Conference on Marine Biodiversity, 11-15 November 2008, Valence, Espagne
WP1	Overview on Homoscleromorpha sponges diversity in the Mediterranean	Ereskovsky A., Ivanisevic J., Pérez T.	1-DIMAR	Janvier 2009	1 <sup>st</sup> Symposium for the conservation of coralligenous and other calcareous bioconstructions of the Mediterranean Sea, Tabarka, Tunisie
ECIMAR	Biodiversité marine et médicament ; de l'écologie chimique à la pharmacochimie	B. Banaigs	4-UPVD	Février 2009	<b>Conférence invitée</b> Académie nationale de Pharmacie, Paris
WP1	Synthèse et étude de relations structure-activité d'analogues terpéniques à visée antifouling	Sall C., Camps M., Dombrowsky L., Blache Y.	7-USTV	Avril 2009	21 <sup>ème</sup> Journée de la Société Chimique de France, Marseille
WP1	Caractérisation chimique de la gorgone méditerranéenne <i>Paramuricea clavata</i>	Pérez N., Culioli G., Perez T., Blache Y.	5-DIMAR, 7-USTV	Avril 2009	21 <sup>ème</sup> Journée de la Société Chimique de France, Marseille
WP1	Des composés diterpéniques d'origine marine en tant qu'inhibiteurs de biofilms bactériens	Viano Y., D. Bonhomme, M. Camps, J.-F. Briand, A. Ortalo-Magné, L. Piovetti, Y. Blache, G. Culioli	7-USTV	Avril 2009	21 <sup>ème</sup> Journée de la Société Chimique de France, Marseille
WP2	Toward the total synthesis of the immunosuppressive marine pyrrole-2-aminoimidazole palau'amine	Al-Mourabit A.	3-ICSN	Juillet 2009	<b>Conférence invitée</b> 6 <sup>th</sup> European Conference on Marine Natural Products, Porto, Portugal
WP2	Biosynthesis of pyridoaclidines in <i>C. dellechiajei</i> cell-free extracts.	Bry D., Bontemps N., Banaigs B.	4-UPVD	Juillet 2009	6 <sup>th</sup> European Conference on Marine Natural Products, Porto, Portugal
WP3	Relevant scale of chemical variation in <i>Aplysina aerophoba</i>	Becerro M., Sacristan-Soriano O., Majdi N., Banaigs B.	8-CEAB, 4-UPVD	Juillet 2009	6 <sup>th</sup> European Conference on Marine Natural Products, Porto, Portugal
WP3	Intraspecimen variability of natural products in the sponge <i>Aplysina aerophoba</i> .	Sacristan-Soriano O., Banaigs B., Becerro M.	8-CEAB, 4-UPVD	Juillet 2009	6 <sup>th</sup> European Conference on Marine Natural Products, Porto, Portugal
WP1	Algal diterpenoids as antifouling substances against a marine bacterial biofilm	Viano Y., Bonhomme D., Camps M., Briand J.-F., Ortalo-Magné A., Blache Y. & Culioli G.	7-USTV	Juillet 2009	6 <sup>th</sup> European Conference on Marine Natural Products, Porto, Portugal
WP1	Chemotaxonomy as valuable approach to study sponges of the family Irciniidae (Porifera, Dictyoceratida)	Abed C., Khalaf G., Bitar G., Thomas O.P., Mehiri M., Pérez T.	1-UNSA, 5-DIMAR, 5'UL	Juillet 2009	6 <sup>th</sup> European Conference on Marine Natural Products, Porto, Portugal
WP1	<sup>1</sup> H HRMAS and LC-MS <sup>n</sup> as useful taxonomical tools for the discrimination of brown algae belonging to the <i>Cystoseira</i> genus	Jégou C., G. Culioli, N. Kervarec & V. Stiger-Pouvreau	7-USTV	Septembre 2009	European Society for Marine Biotechnology Conference, Concarneau, France
WP1, WP3	Co-cultures of marine invertebrate cells with their associated bacteria	Roué M., Pichon D., Pernice M., Bourguet-Kondracki M.-L., Domart-Coulon I.	2-MNHN	Septembre 2009	European Society for Marine Biotechnology Conference, Concarneau, France
WP1	Natural products as potential biocides in antifouling coatings	Culioli G., A. Ortalo-Magné, S.P. Dennington, L. Chambers & Y. Blache	7-USTV	Septembre 2009	EUROCORR 2009, Nice, France
WP1	Marine fouling organisms and their use in antifouling bioassays	Salta M., Chambers L., Briand J.-F., Blache Y., Wharton J.A., Wood R.J.K. & Stokes K.R.	7-USTV	Septembre 2009	EUROCORR 2009, Nice, France
WP1, WP2, WP3	Antifouling activities of MAPIEM	Bressy C., Briand J.-F., Carriere P., Culioli G., Dombrowsky L., Perrin F.-X., Praud-Tabaries A., Ortalo-Magné A., Tanguy B., Bottzeck O., Blache Y. & Margaillan A	7-USTV	Septembre 2009	EUROCORR 2009, Nice, France
WP1	Biofilms bactériens <i>in vitro</i> utilisés comme bioessais antifouling	Camps M., Dombrowsky L., Blache Y. & Briand J.-F.	7-USTV	Septembre 2009	3 <sup>ème</sup> Colloque d'Ecologie Microbienne, Lyon, France
WP2	Contribution de la flore microbienne	Roué M., Domart-	2-MNHN	Mai 2010	Journée scientifique de la

	associée à la diversité chimique de l'éponge <i>Clathrina clathrus</i>	Coulon I., Bourguet-Kondracki M.L.			FRE 3206 Paris, France
WP1, WP3	Variability in the production of alkaloids by the red gorgonian <i>Paramuricea clavata</i> .	Pérez N., Culioli G., Pérez T., Thomas O., Blache Y.	1-UNSA 5-DIMAR 7-USTV	Août 2010	26th annual meeting of the International Society of Chemical Ecology, Tours, France
WP1, WP3	Metabolic fingerprinting as an indicator of biodiversity: towards understanding inter-specific relationships among <i>Homoscleromorpha</i> sponges	Ivanisevic I. Thomas O., Lejeune C., Chévaldonné P., Pérez T.	1-UNSA 5-DIMAR	Août 2010	26th annual meeting of the International Society of Chemical Ecology, Tours, France
WP1, WP3	Etude des fluctuations de l'expression métabolique de la gorgone rouge méditerranéenne <i>Paramuricea clavata</i> .	Pérez N., Culioli G., Pérez T., Thomas O., Blache Y.	1-UNSA 5-DIMAR 7-USTV	Septembre 2010	Colloque Ecologie 2010 Montpellier, France
WP3	Bioactivity and secondary metabolite variation in relation to biotic and abiotic factors: chemical ecology study of a new Mediterranean <i>Oscarella</i> species (Porifera, <i>Homoscleromorpha</i> ).	Ivanisevic J., Thomas O.P., Pédel L., Ereskovsky A., Pérez T.	1-UNSA 5-DIMAR	Septembre 2010	Colloque Ecologie 2010 Montpellier, France
WP1, WP2, WP3	Médiateurs chimiques d'une ascidie méditerranéenne	D. Bry, S. Lopez-Legentil, A. Simon-Levert, X. Turon, N. Bontemps, B. Banaigs	8-CEAB 4-UPVD	Septembre 2010	Colloque Ecologie 2010 Montpellier, France
WP3	Sponge islands in an algal sea: associated fauna of two Mediterranean sponges	Abdo D. A., Sacristan-Soriano O. and Becerro M. A.	8-CEAB	Septembre 2010	World Sponge Conference Girona, Spain
WP2, WP3	Photosynthetic symbionts of the Mediterranean sponge <i>Petrosia ficiformis</i> : characterization and implication in the prevention of fouling.	Bendaoud A., Briand J.F., Ortalo-Magne A., Dombrowsky L., Perez T., Barani A., Gregori G., Blache Y.	5-DIMAR 7-USTV	Septembre 2010	World Sponge Conference Girona, Spain
WP3	Bioactivity and secondary metabolite variation in relation to biotic and abiotic factors: chemical ecology study of a new Mediterranean <i>Oscarella</i> species (Porifera, <i>Homoscleromorpha</i> ).	Ivanisevic J., Thomas O.P., Pédel L., Ereskovsky A., Dubois M., Pérez T.	1-UNSA 5-DIMAR	Septembre 2010	World Sponge Conference Girona, Spain
WP2	Toward the total synthesis of the immunosuppressive palau'amine	Al-Mourabit A.	3-ICSN	Octobre 2010	<b>Conférence invitée</b> 11th Eurasia Conference on Chemical Sciences (EuAsC2S-11), Jordan
WP1, WP2	Bacterial and chemical diversity in calcareous sponges: ecological approaches	Bourguet-Kondracki M-L.	2-MNHN	Novembre 2010	<b>Conférence invitée</b> Taiwan-France Conference "Biodiversity and Ecophysiology of Marine Organisms", Keelung, Taiwan
WP1, WP2	Involvement of bacterial community in the metabolome of the two calcareous sponges <i>Leuconia johnstoni</i> and <i>clathrina clathrus</i>	Quévrain E, Roue M., Domart-Coulon I, Ereskovsky A., Pérez T., Bourguet-Kondracki M-L.	2-MNHN, 5-DIMAR	Mars 2011	1 <sup>st</sup> International Symposium on Sponge microbiology, Würzburg, Germany
WP3	Host-Specificity and environmental structuring of bacterial symbionts in <i>Ircinia</i> spp.	Erwin PM, López-Legentil S, Pita L, Turon X	8-CEAB	Mars 2011	1 <sup>st</sup> International Symposium on Sponge microbiology, Würzburg, Germany
WP1, WP3	Dosage d'alcoïdes polaires d'origine marine par CLHP/UV/SM	Pérez N., G. Culioli, O.P. Thomas, J.-F. Briand, T. Pérez, Y. Blache	1-UNSA, 5-DIMAR, 7-USTV	Mars 2011	22 <sup>ème</sup> Journée de la Chimie SCF-PACA, Toulon
WP3	A threat around the corner? Assessing the invasive potential and biogeographic boundaries of an introduced ascidian	Pineda MC, López-Legentil S, Rius M, McQuaid C, Turon X	8-CEAB	Mai 2011	VII International Conference on Marine Bioinvasions, Barcelona, Spain
WP1, WP2	Exploring the origin of secondary metabolites using the Mediterranean sponge <i>Clathrina clathrus</i> and its associated bacteria as biological model	Roué M., Domart-Coulon I, Ereskovsky A., Pérez T., Bourguet-Kondracki M-L.	2-MNHN, 5-DIMAR	Juin 2011	<b>Conférence invitée</b> NatPharma, Naples, Italy



WP1, WP3	Chemical ecology of the Mediterranean red gorgonian <i>Paramuricea clavata</i> : Study of the variations in the chemical expression	Pérez N., G. Culioli, T. Pérez, J.-F. Briand, O.P. Thomas, Y. Blache	1-UNSA, 5-DIMAR, 7-USTV	Août 2011	7 <sup>th</sup> European Conference on Marine Natural Products, Strömstad, Suède
WP2	Revisiting orofidin biosynthesis	Genta-Jouve G., Al Mourabit A., Thomas O. P.	1-UNSA, 3-ICSN	Août 2011	7 <sup>th</sup> European Conference on Marine Natural Products, Strömstad, Suède
WP3	Ascidian photosymbionts: do we know who's hiding in the tunic?	Lopez-Legentil S, Turon X, Song B	8-CEAB	Juillet 2011	6 <sup>th</sup> International Tunicate Meeting, Montreal, Canada
WP3	Crossing the thin line between introduced and invasive species: factors shaping the distribution and invasive potential of the solitary ascidian <i>Styela plicata</i>	Pineda MC, López-Legentil S, Rius M, McQuaid C, Turon X	8-CEAB	Juillet 2011	6 <sup>th</sup> International Tunicate Meeting, Montreal, Canada
WP2	Marine bioactive metabolites, isolation and synthesis	Al-Mourabit A.	3-ICSN	Septembre 2011	<b>Conférence invitée</b> 12 <sup>th</sup> International Conference on the Chemistry of Antibiotics ICCA – 12, TU Berlin, Germany
WP3	Chemical defenses in the sponge <i>Aplysina aerophoba</i> : Seasonality and tissue specificity.	Sacristán-Soriano O., Banaigs B., Becerro M.	8-CEAB 4-UPVD	Septembre 2011	46 <sup>th</sup> European Marine Biology Symposium, Rovinj, Croatie
<b>Communications à congrès – Affiches</b>					
ECIMAR	ECIMAR: Ecologie chimique Marine: indicateurs de biodiversité et valorisation	Amade P. & De Vaugelas J.	1-UNSA	Décembre 2007	5 <sup>mes</sup> Journées de l'Institut Français de la Biodiversité, Tours, France
WP2	Biosynthesis of bromopyrrole alkaloids in <i>Agelas oroides</i>	Cachet N., Thomas O. P., Al-Mourabit A., Oberhänsli F., Teyssié J. L., Jeffree R.	1-UNSA	Août 2008	7 <sup>th</sup> Joint Meeting on Natural Products, Athènes, Grèce
WP 3	Experimental study of the relationship between natural products and endosymbiont bacteria in the sponge <i>Aplysina aerophoba</i>	Sacristan-Soriano O, Becerro MA	8/9 CEAB	Septembre 2008	XV Simposio Ibérico de Biología Marina. Funchal, Madeira, Portugal
WP1	Pyrrole-2-aminoimidazoles alkaloids from <i>Axinella cf polypoides</i> sponge	Lejeune C., Gabant M., Martin M.T., Thoison O., Pérez T., Bitar G., Al-Mourabit A.	3-ICSN, 5-DIMAR, 5'UL	Juillet 2009	6 <sup>th</sup> European Conference on Marine Natural Products, Porto, Portugal
WP1, WP2	Chemiluminescent oxidative degradation of diketopiperazines and early precursors of marine pyrrole-2-aminoimidazole ; metabolites	Ermolenko L., Ratinaud C., Mazères S., Gabant M., Moriou C., Al-Mourabit A.	3-ICSN	Juillet 2009	6 <sup>th</sup> European Conference on Marine Natural Products, Porto, Portugal
WP1, WP3	Study of the bacteria associated with <i>Clathrina clathrus</i> and evaluation of their contribution to secondary metabolism	Roué M., Domart-Coulon I., Ereskovsky A., Becerro M., Perez T., Bourguet-Kondracki M.-L.	2-MNHN, 8-CEAB, 5-DIMAR	Juillet 2009	6 <sup>th</sup> European Conference on Marine Natural Products, Porto, Portugal
WP1, WP2, WP3	Symbiontes photosynthétiques de Spongiaires : Isolement, mise en culture et production de métabolites actifs en antifouling	Bendaoud A., Ortalo-Magne A., Camps M., Dombrowsky L., Barani A., Gregori G., Perez T., Blache Y. & Briand J.-F	7-USTV	Septembre 2009	3 <sup>eme</sup> Colloque d'Ecologie Microbienne, Lyon
WP1, WP3	Reliability of a marine antifouling assay based on in vitro bacterial adhesion	Briand J.-F., Camps M., Dombrowsky L., Bazire A. & Blache Y.	7-USTV	Novembre 2009	5 <sup>th</sup> ASM Conference on Biofilms, Cancun, Mexico
WP1, WP2, WP3	Temporal and intraindividual variation of secondary metabolites in sponges : avarol production in <i>Dysidea avara</i>	De Caralt S, Bry D, Bontemps N, Turon X, Uriz MJ, Banaigs B	8-CEAB 4-UPVD	Septembre 2010	XVI Iberian Symposium of Marine Biology Alicante, Spain
WP3	Ascidian-Cyanobacteria symbiosis	López-Legentil S, Song BK, Pawlik JR, Turon X	8-CEAB	Septembre 2010	XVI Iberian Symposium of Marine Biology Alicante, Spain
WP1, WP2, WP3	Genetic, bacterial, and chemical diversity of the Mediterranean sponge <i>Spongia lamella</i>	Noyer C., Hamilton A., Thomas O. P. and Becerro M. A.	8-CEAB	Septembre 2010	World Sponge Conference Girona, Spain
WP1, WP2,	Variability of natural products in the	Sacristan-Soriano O.,	8-CEAB	Septembre	World Sponge Conference

WP3	sponge <i>Aplysina aerophoba</i> over a two-year survey	Banaigs B. and Becerro M. A.	4-UPVD	2010	Girona, Spain
WP1, WP3	Metabolic fingerprinting as an indicator of biodiversity: towards understanding inter-specific relationships among <i>Homoscleromorpha</i> sponges.	Ivanisevic J., Thomas O., Lejeune C., Chevaldonne P., Perez T.	1-UNSA 5-DIMAR	Septembre 2010	World Sponge Conference Girona, Spain
WP3	Temperature effects in reproduction of Mediterranean sponges	Ereskovsky A., Pérez T.	5-DIMAR	Septembre 2010	World Sponge Conference Girona, Spain
WP2, WP3	Chemical and microbial investigations of the calcareous mediterranean sponge <i>Clathrina clathrus</i>	Roue M., Domart-Coulon I., Ereskovsky A., Pérez T., Bourguet-Kondracki M.L.	2-MNHN 5-DIMAR	20-24 Septembre 2010	World Sponge Conference Girona, Spain
WP1, WP2	Assessing the role of bacteria associated with the Mediterranean calcareous sponge <i>Clathrina clathrus</i>	Roué M., Domart-Coulon I., Bourguet-Kondracki M-L	2-MNHN	Octobre 2011	1 <sup>st</sup> International Conference on Micro-organisms facing their environment, MNHN Paris, France
<b>Thèses de doctorat</b>					
WP1, WP2, WP3	Métabolites secondaires d'invertébrés marins et biosynthèse in vivo d'alcaloïdes d' <i>Agelas oroides</i>	Nadja Cachet	1-UNSA	Juin 2009	Thèse de doctorat de l'Université de Nice
WP1, WP2	Métabolites d'éponges marines de la famille de la Palau'amine : isolement et synthèse biomimétique	Clarisse Lejeune	3-ICSN	Novembre 2010	Thèse de doctorat, Université de Paris XI
WP1, WP3	Relationship between genetic, bacterial and chemical diversity of the Mediterranean sponge <i>Spongia agaricina</i>	Charlotte Noyer	8-CEAB	Décembre 2010	Thèse de doctorat, Université de Barcelone
WP1, WP2	Métabolites secondaires d'invertébrés marins : empreintes chimiques, caractérisation structurale et biosynthèse	Delphine Bry	4-UPVD	Décembre 2010	Thèse de doctorat, Université de Perpignan Via Domitia
WP1, WP2	Métabolisme secondaire des éponges <i>Homoscleromorpha</i> : diversité et fluctuation de son expression en fonction de facteurs biotiques et abiotiques	Julijana Ivanisevic	1-UNSA, 5-DIMAR	Mai 2011	Thèse de doctorat Université de la Méditerranée (Aix-Marseille 2)
WP1, WP2	Contribution de la flore bactérienne associée au métabolisme secondaire de l'éponge calcaire méditerranéenne <i>Clathrina clathrus</i>	Mélanie Roué	2-MNHN	Mai 2011	Thèse de Doctorat, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6
WP1	Bio-essai anti-adhésion sur bactéries marines pour le criblage de molécules et de revêtements antifouling	Mercedes Camps	7-USTV	Juin 2011	Thèse de doctorat, Université du Sud Toulon-Var
WP1, WP2	Métabolisme secondaire d'éponges marines méditerranéennes: du métabolome à l'élucidation des voies de biosynthèse	Grégory Genta-Jouve	1-UNSA, 3-ICSN	Juillet 2011	Thèse de doctorat, Université de Nice Sophia-Antipolis
<i>N.B. : trois thèses en voie de finalisation – C. Abed (1-UNSA/5-DIMAR), A. Bendaoud (7-USTV), N. Pénez (7-USTV)</i>					
<b>Documents techniques et Rapports d'étudiants</b>					
WP1, WP3.1	Métabolisme secondaire des éponges <i>Homoscleromorpha</i> : diversité et fluctuation de son expression en fonction de facteurs biotiques et abiotiques	Ivanisevic J.	1-UNSA, 5-DIMAR	Juin 2007	Master 2, Université Paris VI
WP3.2	Expression de gènes impliqués dans la résistance au stress: étude méthodologique	Sarrazin V.	5-DIMAR	Juin 2007	Master 2, Université de la Méditerranée
WP1	Protocole standardisé : échantillonnage, empreintes chimiques et cartes d'identité chimique	Banaigs B. & Bourguet-Kondracki M.L.	Tous les partenaires	Novembre 2007	Doc. en ligne ECIMAR
WP 1	Missions d'échantillonnage 2008 : Liban, Crète, Corse, Marseille, Espagne	Pérez T., Amade P., Bitar G., Becerro M., Banaigs B.	1-UNSA, 5-DIMAR, 4-UPVD, 8-CEAB	Juin/juillet 2008	Rapports de mission, en ligne sur <a href="http://www.ecimar.org">www.ecimar.org</a>
WP 1 WP3	Etude et compréhension des modes d'expression des métabolites secondaires chez la gorgone	Pénez N.	5-DIMAR, 7-USTV	Juin 2008	Rapport Master 2. Master Biodiversité et Ecosystèmes continentaux et marins

	<i>Paramuricea clavata</i>				
WP 3	Cycle de reproduction et effort de l'éponge <i>Oscarella lobularis</i> (Homoscleromorpha) en relation avec les fluctuations de température	Dubois M.	5-DIMAR	Juin 2008	Rapport Master 1. Sciences et technologies, mention de sciences de la terre et environnement, écologie
WP 1	Etude taxonomique des Spongiaires méditerranéens de substrat dur	Da Costa S.	5-DIMAR	Juin 2008	Rapport de stage UEL L3
WP1	Mise au point d'une méthode d'analyse biologique couplée à la CLHP	Saidou H.	4-UPVD	Juin 2008	Rapport de stage M1. Master Biologie Chimie Environnement (spécialité DINEV)
WP 1	Etude chimique et synthèse de métabolites secondaires issus de deux éponges marines Haplosclerida	Velluti M.	1-UNSA	Juin 2008	Rapport de stage M2
WP 3	Expression of secondary metabolites by the Mediterranean sponges <i>Aplysina aerophoba</i> and <i>Aplysina cavernicola</i>	Majdil N.	4-UPVD	Juin 2008	Rapport de stage M2. Master Biologie Chimie Environnement (spécialité DINEV)
WP3	Relationship between natural products and endobiotic bacteria in the sponge <i>Aplysina aerophoba</i>	Sacristan O.	4/8- CEAB	Octobre 2008	Master Thesis, Univ. of Barcelona
WP1	Impact de la nature des substrats immergés sur la structure de la communauté des biofilms	Djeridi I.	7-USTV	Juin 2009	Rapport de Master 2 Recherche Océanographie, Spécialité « Biologie, Ecologie Marine »
WP3	Analyse chimique de gorgones méditerranéennes et caractérisation structurale de métabolite bio-actifs	Louis L.	7-USTV	Mai 2009	Rapport de Master 1 « Analyse et Contrôle Lyon »
WP3	Mise au point d'une méthode de quantification de métabolites secondaires d'éponge	Szablewski M.	4-UPVD	Juin 2009	Rapport de stage M1. Master Biologie Chimie Environnement (spécialité Molécules Bioactives)
WP3	Expression des métabolites secondaires produits par deux éponges méditerranéennes : <i>Aplysina aerophoba</i> et <i>Aplysina cavernicola</i>	Legendre M.	4-UPVD	juin 2009	Rapport de stage DUT Génie de l'Environnement 2ème
WP1	Métabolites secondaires d'éponges marines méditerranéennes du genre <i>Phorbas</i>	Pirron-Reynaud E.	2-MNHN	Juin 2009	Master 2 Sciences du médicament, Chimie dirigée vers les Sciences du Vivant
WP3	Etude phénologique d'éponges du genre <i>Oscarella</i> : relation avec le métabolite secondaire, et influence des changements environnementaux	Dubois M.	5-DIMAR	juin 2009	Rapport de Master 2 Recherche Biologie et Ecologie Marines
WP 3	Ecologie chimique des éponges du genre <i>Oscarella</i> (Porifera, Homoscleromorpha) : définition des facteurs clé expliquant la variation naturelle de bioactivité	Pedel L.	5-DIMAR	Juin 2010	Master 2, Centre d'Océanologie de Marseille
WP1, WP2	Etudes chimique et bactérienne de l'éponge <i>Phorbas tenacior</i>	Descarréga F.	2-MNHN	Septembre 2010	Rapport de Technicien Supérieur de la Mer, Filière Génie Biologique et Productions Marines.
WP1, WP3	Alcaloïdes isoxazoliques chez deux espèces d'éponges Méditerranéennes : <i>Aplysina aerophoba</i> et <i>Aplysina cavernicola</i> .	Brissard C.	4-UPVD	Septembre 2010	Rapport de Master 2, UPVD
WP2	Isolement de métabolites d'une éponge marine <i>Leucetta</i> sp.	Escande V.	3-ICSN	Septembre 2011	Rapport de Master 2, ICSN
WP2	Synthèse de librairie d'analogues 2-aminoimidazoliques marins : À la recherche de nouveaux antibactériens, antifongiques et antibiofilms	Bo YU	3-ICSN	Juin 2011	Rapport de Master 2, ICSN
WP1	Métabolites anti-oxydants isolés de l'éponge méditerranéenne <i>Phorbas topsenti</i>	Keryhuel A.	2-MNHN	Juin 2011	Rapport de Master 2 MNHN Paris
WP1	Métabolites secondaires isolés d'éponges marines méditerranéennes	Mokrini R.	1-UNSA	Juin 2011	Rapport de master 2 UNS

### E.3 LISTE DES ELEMENTS DE VALORISATION

Le principal élément de valorisation du programme ECIMAR est le **nombre d'étudiants formés**. Au total, 22 étudiants ont réalisé des stages de fin d'étude (pour la plupart du niveau Master), et 11 doctorants ont conduit leur thèse sur des problématiques du programme (3 soutenances encore à venir). La majorité de ces étudiants a acquis une formation pluridisciplinaire qui leur permettra très certainement de se positionner dans un avenir proche pour l'obtention d'une position dans la recherche académique. Trois post-doctorants ont été accueillis, dont deux d'entre eux ont déjà obtenus des postes d'enseignant-chercheur.

Dans le cadre du programme, **deux écoles thématiques** ont été organisées. La première (« *Cours de biologie et écologie marine* ») était centrée sur les connaissances fondamentales de biologie des modèles biologiques du programme, et la deuxième (« *Des métabolites dits secondaires: introduction à l'écologie chimique dans les écosystèmes marin* ») a été consacrée à l'acquisition de connaissances en écologie chimique et chimie des produits naturels marins. Au-delà des étudiants participants au programme, ces écoles ont également accueilli des étudiants ou jeunes chercheurs extérieurs, pour certains venant de pays du sud (e.g. Tunisie).

A mi-parcours d'ECIMAR, les partenaires ont souhaité consolider la structure fédérative créée pour la première fois dans le cadre de programme ANR en proposant la création d'un Groupe de Recherche au CNRS. Le **GdR 3269 BioChiMar « Biodiversité et Chimiodiversité Marines »**, dirigé par A. Al Mourabit (partenaire 3-ICSN) et T. Pérez (5-DIMAR), est aujourd'hui une communauté nationale d'équipes de recherche de biologistes et de chimistes travaillant sur les écosystèmes marins, en particulier ceux associés aux points chauds de la biodiversité planétaire, et sur les molécules des organismes qui les peuplent. Ce GDR a des objectifs d'animation, de modernisation et de structuration des collaborations de la communauté scientifique dont les préoccupations thématiques concernent les processus moléculaires du milieu marin et le développement durable de ses ressources. Les équipes de chimistes et de biologistes qui composent BioChiMar sont engagées dans des thématiques pluridisciplinaires relevant de la chimie, de la biologie, de l'écologie chimique et de la valorisation. Ainsi, BioChiMar réunit des chercheurs chimistes structuralistes, chimistes organiciens, biochimistes, pharmacologues, généticiens, écologues marins, taxonomistes et microbiologistes, ceux du programme ECIMAR et bien d'autres. Il regroupe actuellement 41 équipes scientifiques.

Avec l'avancée des travaux d'ECIMAR et la création du GDR, nous avons été conduits à interagir progressivement avec les laboratoires faisant de l'écologie chimique en milieu continental, et a participé à une série de réunions de perspectives organisées par le CNRS-INEE. Les réflexions conduites dans ce cadre nous ont amené à participer à l'**écriture de Perspectives à la demande de la direction de l'INEE**.

ECIMAR a fait naître de nombreuses perspectives en écologie chimique et il est fort probable que de nombreuses « suites » soient proposées. Nous avons déjà commencé à transposer les approches du programme dans des régions de Méditerranée que nous n'avions pas pu couvrir (Algérie et Tunisie) grâce à des financements du **programme ARCUS Méditerranée et du programme de collaboration internationale de la Région PACA** (Coordination G. Culioli & T. Pérez). Par ailleurs, plusieurs programmes de recherche sur des questions scientifiques nouvelles et s'appuyant sur les acquis d'ECIMAR sont aussi en cours de démarrage. L'objectif est d'appliquer la métabolomique environnementale à l'étude des effets de perturbations et transposée à d'autres écosystèmes que la Méditerranée. C'est ainsi que vient de démarrer un programme sur « **les capacités d'adaptation d'organismes benthiques autochtones face à l'algue invasive *Caulerpa racemosa*** » (Coordination T. Pérez). L'objet de ce programme, mené dans un premier temps **en partenariat avec le Parc National de Port-Cros**, est d'entamer l'étude des ajustements métaboliques que peuvent opérer des organismes subissant la compétition de *C. racemosa*. Il s'agit pour l'instant d'un programme exploratoire ne comportant que des études en conditions naturelles, mais qui fera l'objet prochainement de

développements avec le couplage d'études sur les bases génétiques de l'adaptation. Ce projet préfigurait également un autre projet qui vient d'être retenu par l'ERA-NET **Biome**, et qui est consacré au cas des algues *Asparagopsis* en milieu tempéré comme en milieu tropical. Dans ce programme né d'un atelier thématique organisé par le GDR BioChiMar et dont le titre est "*Diversity and functioning of coastal marine biomes under siege: implications of seaweed proliferations across three oceans*", les objectifs liés aux acquis d'ECIMAR sont : (i) de dresser la carte d'identité d'individus provenant de différentes zones d'étude par la taxonomie moléculaire et la métabolomique de manière à voir comment elle explique sa capacité à envahir ; (ii) étudier expérimentalement les effets d'*Asparagopsis*, en utilisant sa bioactivité comme proxy de la production de substances biologiquement actives (O. Thomas et T. Pérez, responsables de WP). Les bioactivités enregistrées seront analysées en regard des différents phénotypes métaboliques définis par ailleurs selon les procédures mises au point dans ECIMAR. Les résultats attendus permettront de combler les lacunes sur le statut du genre *Asparagopsis* à l'échelle mondiale, de mieux appréhender les proliférations dans les différentes régions concernées, et d'en évaluer les impacts dans le but de proposer des mesures de gestion de la biodiversité marine pour les décideurs/gestionnaires des régions concernées.

Des contacts avancés ont été pris avec des entreprises spécialisées dans le secteur thérapeutique comme Galderma pour le montage de projets et de thèses sur la valorisation de la biodiversité marine méditerranéenne (O. Thomas). Ainsi les valorisations des résultats obtenus dans le cadre d'ECIMAR se feront également dans un futur proche par la création de collaborations public/privé.

Enfin, sur la base de molécules prometteuses issues du programme ECIMAR, le partenaire 1-UNSA participe à un **projet européen FP7 KBBE 2010 intitulé BAMMBO** ([www.bammbo.eu](http://www.bammbo.eu)) sur la recherche de solutions durables pour la production de ces molécules en quantité. Ce partenaire a pu bénéficier d'une part des connaissances acquises sur la construction du site collaboratif (Responsable WP) mais aussi sur le nouveau protocole d'étude des voies de biosynthèse des spongiaires par expériences *in vivo* en aquarium.

## E.4 BILAN ET SUIVI DES PERSONNELS RECRUTES EN CDD (HORS STAGIAIRES)

Identification				Avant le recrutement sur le projet			Recrutement sur le projet				Après le projet				
Nom et prénom	Sexe H/F	Adresse email (1)	Date des dernières nouvelles	Dernier diplôme obtenu au moment du recrutement	Lieu d'études (France, UE, hors UE)	Expérience prof. Antérieure, y compris post-docs (ans)	Partenaire ayant embauché la personne	Poste dans le projet (2)	Durée missions (mois) (3)	Date de fin de mission sur le projet	Devenir professionnel (4)	Type d'employeur (5)	Type d'emploi (6)	Lien au projet ANR (7)	Valorisation expérience (8)
Pierre SAULEAU	M	pierre.sauleau@univ-ubs.fr	Mars 2007	Doctorat	France	1 année post doc en Israël	3-ICSN	Post-doc	18	Juillet 2009	CDI MCF	Université	Enseignant-chercheur Université de Bretagne Sud	non	oui
Grégory GENTA-JOUVE	M	gregory.gentajouve@unice.fr	Octobre 2011	Master Recherche	Italie	0	1-UNSA, 3-ICSN	doctorant	36	juillet 2011	CDD	Université	Chercheur UNSA, Nice	oui	oui
Mélanie ROUE	F	melanie.roue@free.fr	Septembre 2011	Master Recherche	France	0	2-MNHN	Doctorante	37	30/09/10	CDD ATER	Institut Pasteur	Enseignant-chercheur, paris	non	oui
Delphine BRY	F	delphine.bry@hotmail.fr	Septembre 2011	Master Recherche	France	0	4-UPVD	doctorante	36	Décembre 2010	CDI	Entreprise	Ingénieur	non	oui
Nicolas PENEZ	H	penez@univ-tln.fr	En cours	Master Recherche	France	0	7-USTV	Doctorant	36	12/2011	-	-	-	-	-
Julijana IVANISEVIC	F	Julijana.ivanisevic@univmed.fr	Octobre 2011	Master Recherche	Croatie, France	0	5-DIMAR	Doctorante	36	05/2011	CDD ATER	Université	Enseignant-chercheur, Université de Provence	non	oui
Vanessa SARRAZIN	F	vanessasarrazin@hotmail.com	Septembre 2011	Master Recherche	France	2 années CDD CNRS	5-DIMAR	Ingénieur d'étude	15	10/2007	Sans emploi	-	-	-	-
Christophe LEJEUSNE	H	lejeusne@ebd.csic.es	Octobre 2011	Doctorat	France	2 années ATER, 1 année post-doc au Canada	1-UNSA, 5-DIMAR	Post-doc	13	10/2008	CDD	Enseignement et recherche publique	Chercheur au CSIC Seville, Espagne	non	oui
MohamedM EHIRI	H	Mohamed.mehiri@unice.fr	Octobre 2011	Doctorat	France	1 année et demi post-doc aux USA	1-UNSA	Post-doc	7	08/2008	CDI MCF	Université	Enseignant-chercheur UNSA, Nice	oui	oui
Maia FOURS	F	maia.fours@univmed.fr	Octobre 2001	Master pro	France	3 années CDD en France	1-UNSA, 5-DIMAR	Ingénieur d'étude, assistante de coordination	14	05/2008	CDI	Association	Ingénieur d'étude au GIS Posidonie, Marseille	non	oui

N.B. : Plusieurs doctorants ont réalisé leur thèse dans le cadre de l'ANR ECIMAR (fonctionnement et dynamique scientifique) avec des bourses ou salaires financés sur d'autres ressources : Nadja Cachet (Bourse Région-CNRS, thèse soutenue en juin 2009), Clarisse Lejeune (Bourse CNRS-ICSN, thèse soutenue en décembre 2010), Charline Abed (Bourse du CNR libanais, thèse en cours jusqu'à fin 2011), Amina Bendaoud (Bourse du gouvernement algérien, thèse en cours jusqu'à fin 2011) et Charlotte Noyer (Bourse européenne, thèse soutenue en décembre 2010).