Décembre 2024

Thèse de Doctorat de l'Université d'Aix Marseille

Marie Derrien



Médiation chimique dans les grottes sous-marines:

Vers une meilleure compréhension du fonctionnement des écosystèmes dans l'océan

amU
Aix Marseille Université

NNT : 0000AIXM0000

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
le vendredi 20 Décembre 2024 par

Marie DERRIEN

Médiation chimique dans les grottes sous-marines : vers une meilleure compréhension du fonctionnement des écosystèmes dans l'Océan

Discipline

Sciences de l'Environnement

Spécialité

Ecologie

École doctorale

ED 251 – Sciences de l'Environnement

Laboratoire

Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale (IMBE), UMR 7263, IRD 237, Avignon Université, Aix - Marseille Université

Composition du jury

Anne-Geneviève BAGNERES Directrice de Recherche, CNRS	Rapportrice
Maggy NUGUES Maitresse de conférences HDR, EPHE	Rapportrice
Olivier THOMAS Professeur, NUIG	Examinateur & Président du jury
Thierry PÉREZ Directeur de Recherche, CNRS	Directeur de thèse
Pierre CHEVALDONNÉ Directeur de Recherche, CNRS	Co-directeur de thèse
Charlotte SIMMLER Chargée de Recherche, CNRS	Membre invitée

imbe
Institut méditerranéen de biodiversité et d'écologie - marine et continentale -

Institut Pythéas
Observatoire des Sciences de l'Univers
Aix*Marseille Université

Affidavit

Je soussignée, Marie Derrien, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Thierry Pérez, Pierre Chevaldonné et Charlotte Simmler, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille, le 25 octobre 2024



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International.

Liste de publications et participation aux conférences

1) Liste des publications réalisées dans le cadre du projet de thèse :

1. Derrien M., Chevaldonné P., Simmler C., Pérez T. (*in prep*). Putative contribution of benthic communities to chemical seascapes: case study in Mediterranean underwater caves.

2. Mauduit M., Greff S., Derrien M., Simmler C. **2025.** Describing the Complex Chemistry of Benthic Seawater: from Exometabolite Sampling Strategies to MS-Based Metabolomics. *Natural Product Reports*. 10.1039.D4NP00064A. DOI : 10.1039/d4np00064a

3. Derrien M., Chevaldonné P., Pérez T. **2024**. Patterns of benthic diversity in marine underwater caves of the Marseille Region (France, North-Western Mediterranean Sea). *Mediterranean Marine Science,* 25(3), 666–681. DOI : 10.12681/mms.38566

4. Derrien M.*, Santonja M.*, Greff S., Figueres S., Simmler C., Chevaldonné P., Pérez T. **2024.** Circadian migrations of cave-dwelling crustaceans guided by their home chemical seascape. *Frontiers in Marine Science*, 11:1448616. DOI : 10.3389/fmars.2024.1448616

5. Mauduit M.*, Derrien M.*, Grenier M.*, Greff S., Molinari, S., Chevaldonné P., Simmler C., Pérez T. **2023**. *In situ* capture and real-time enrichment of marine chemical diversity. *ACS Central Science*, 9 (11), 2084–209. DOI : 10.1021/acscentsci.3c00661.

*co-premiers auteurs

2) Participation aux conférences au cours de la période de thèse :

1. Derrien M., Simmler C., Chevaldonné P., Pérez T. **2023**. Peut-on expliquer la complexité du paysage chimique des grottes sous-marines par le niveau de diversité de leurs communautés benthiques ? Journées Ecologie Chimique 2023. Paris – Communication Orale

2. Derrien M., Chevaldonné P., Simmler C., Pérez T. **2023**. Exploration du lien entre la biodiversité benthique et le paysage chimique des grottes sous-marines. Congrès de l'Ecole Doctorale Sciences de l'Environnement. Marseille – Communication Orale & Poster

3. Boury-Esnault N., Vacelet J., Grenier M., Derrien M, Ruiz C., Chevaldonné P., Perez T. **2023**. Long-term survey of sponge biodiversity in a Mediterranean cave with bathyal affinities. International Workshop on Taxonomy of Atlanto-Mediterranean Deep-Sea & Cave Sponges. Rapallo, Italie – Communication Orale

4. Mauduit M., Grenier M., Derrien M., Greff S., Molinari S., Chevaldonné P., Pérez T., Simmler C. **2023**. Tracing sponge specialized exometabolites in seawater sheds new light on their chemical diversity. 6ème Symposium International de l'Association Francophone pour l'Enseignement et la Recherche en Pharmacognosie (AFERP), Paris – Communication Orale

5. Derrien M., Pérez T., Simmler C., Chevaldonné P. **2022.** Exploring the link between the sponge communities and chemical seascape in underwater caves. 11th International Sponge Symposium. Leiden, Pays Bas – Poster

6. Derrien M., Chevaldonné P., Simmler C., Pérez T. **2021**. Médiation chimique en milieu marin, Une ressource inestimable de Services Ecosystémique. Journée Des Doctorants 2021. Marseille – Communication Orale

Résumé

La médiation chimique est un des langages de la Nature. Les organismes détectent et s'échangent des molécules présentes dans leur environnement pour chercher de la nourriture, des partenaires sexuels ou un habitat. Ce mode de communication contribue à la distribution de la biodiversité et au fonctionnement des écosystèmes. Tandis que les fonctions des médiateurs chimiques sont bien connues en milieu terrestre, il existe un manque de connaissances dans le milieu marin.

Les grottes sous-marines ont été choisies comme écosystème modèle car elles abritent des communautés très stables et permettent de s'affranchir de nombreuses sources de variation. L'objectif était de mieux comprendre le rôle fonctionnel des espèces composant les communautés benthiques et leur implication dans les interactions chimiques. Dans 4 grottes ateliers, on a combiné caractérisation de la biodiversité benthique et du paysage chimique de l'écosystème cavernicole à des expériences menées en laboratoire simulant des interactions biotiques potentiellement médiées par des signaux chimiques.

Ces travaux ont apporté une vision détaillée de deux types de communautés cavernicoles, les Grottes Semi-Obscures (GSO) et les Grottes Obscures (GO). Des patrons de biodiversité communs aux milieux cavernicoles ont été confirmés, mais ce travail a aussi révélé la singularité de chaque site étudié. La communauté GSO abrite toujours une plus forte biodiversité que la communauté GO, les éponges dominant ces assemblages. De nombreuses espèces sont retrouvées de grotte en grotte, mais leur occurrence varie énormément dans une communauté. Enfin, ces travaux ont révélé une forte diminution du nombre d'espèces pour chaque grotte en seulement 5 ans, des changements de biodiversité liés à l'augmentation de la fréquence des vagues de chaleur marines.

L'instrument I-SMEL a été développé pour capter *in situ* les paysages chimiques à proximité des GSO et GO, et évaluer la contribution des organismes benthiques. Le traitement des données métabolomiques a ensuite révélé que l'eau de chaque communauté se distinguait par la présence de classes chimiques différentes : en GSO, les alcaloïdes et les terpènes et en GO, les acides gras et les polycétides. En GSO, ces composés pourraient dériver des métabolites spécialisés des espèces d'éponges dominant la communauté. En GO, ces molécules proviendraient plutôt du métabolisme bactérien ou bien correspondraient à des composés réfractaires à la biodégradation s'accumulant dans les parties les plus confinées des grottes. Par conséquent, les quatre grottes naturelles se distinguent plus par leur paysage chimique en GSO qu'en GO.

Les mysidacés de grotte (*Hemimysis margalefi*) sont des crustacés qui réalisent des migrations circadiennes entre l'intérieur et l'extérieur des grottes. L'influence de différents paysages chimiques de grottes sur le comportement de reconnaissance de l'habitat par les mysidacés a été étudiée. Les résultats ont démontré que chaque population reconnaissait l'eau de sa grotte, mettant alors en évidence un comportement de *homing*, probablement basé sur la détection de signaux spécifiques à chaque grotte. Dans la mesure où une population donnée de mysidacés ne choisit pas le paysage chimique spécifique d'une grotte étrangère, on peut imaginer comment des changements de biodiversité benthique en GSO peuvent avoir des conséquences sur le fonctionnement de l'écosystème.

Les résultats de ces recherches devraient ainsi permettre de proposer rapidement un nouveau modèle de fonctionnement des grottes sous-marines, prenant en compte le rôle de la médiation chimique dans les interactions biotiques. Ces travaux ouvrent la porte à d'autres démonstrations du rôle fonctionnel de la médiation chimique dans l'océan. Ces études demeurent cruciales pour mieux comprendre le fonctionnement des écosystèmes, particulièrement dans un contexte où la biodiversité est fortement affectée par les changements environnementaux en cours.

Mots clés : Paysage chimique, Biodiversité, Grottes sous-marines, Eponges, Mysidacés, Médiation chimique, Communauté, Métabolomique

Abstract

Chemical mediation is one of the Nature's languages. Organisms detect and exchange molecules present in their environment in order to find food, sexual partners or habitat. This mode of communication significantly contributes to the distribution of biodiversity and to the ecosystem functioning. While the functions of chemical mediators are relatively well known in terrestrial environments, there is a real lack of knowledge in the marine environment.

Underwater caves were chosen as model ecosystem because they are home to rather stable communities of organisms, and thus allow to avoid numerous sources of variation. The general objective was to better understand the functional role of species shaping the benthic communities and their involvement in chemical interactions. Four caves were selected as study sites for the thesis. This work combined the characterization of benthic biodiversity and of chemical seascapes of the water in these cave ecosystems, with laboratory experiments simulating biotic interactions putatively mediated by chemical signals.

These studies provided a detailed view of two types of cave communities: Semi-Dark caves (SD) and Dark caves (D). Their compositions were compared between 4 sites offering different environmental situations. While common biodiversity patterns in cave environments were confirmed, this work also revealed the uniqueness of each studied site. In each cave, the SD community harbors greater biodiversity than the D community, where sponges dominate the assemblages. Although many species are found in common in the different caves, their occurrence can vary greatly between communities. This research also demonstrated that sponge assemblages in SD showed a significant reduction in the number of species in a time frame of only 5 years. These changes in biodiversity are possibly linked to the increasing frequency of marine heatwaves over the last decade.

To record the chemical seascapes near SD and D communities and to assess the contribution of benthic organisms to this composition, the *in situ* capture instrument I-SMEL was developed. The processing of metabolomic data, obtained through mass spectrometry, revealed that the seawater from each community was distinguished by the presence of different chemical classes: in SD, alkaloids and terpenes, and in D, fatty acids and polyketides. In SD, these compounds may derive from specialized metabolites of sponge species dominating the community. In D, these molecules are likely to come from bacterial metabolism or may correspond to compounds resistant to biodegradation, accumulating in the most confined parts of the caves. Consequently, the four natural caves are more distinct in their chemical seascape in SD than in D.

Cave-dweller mysids (*Hemimysis margalefi*) are crustaceans performing circadian migrations between the inside and outside of the caves. The influence of different cave chemical seascapes on their behavior of habitat recognition was studied. The results demonstrated that each population recognized the seawater from its own cave, highlighting a homing behavior likely based on the detection of chemical signals specific to each cave. Considering that a given population of mysids does not recognize the specific chemical seascape of another cave, we can imagine how changes in the benthic biodiversity in SD could have consequences for the ecosystem functioning.

The results of this research should allow to propose a new model of underwater cave functioning, which considers the role of chemical mediation in biotic interactions. This work opens the door to further demonstrations of the functional role of chemical mediation in the ocean. Such studies remain crucial for better understanding ecosystem functioning, especially in a context where biodiversity is heavily impacted by ongoing environmental changes.

Keywords: Chemical seascape, Biodiversity, Underwater caves, Sponges, Mysids, Chemical mediation, Community, Metabolomics



Remerciements

Remerciements

Il est à présent temps de remercier toutes les personnes qui ont contribué de près et de loin à cette (tumultueuse) aventure qu'est le doctorat.

Je tiens premièrement remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail et de s'être rendus disponibles pour assister en présentiel à ma soutenance. **Anne-Geneviève et Maggy**, merci d'avoir relu consciencieusement mon manuscrit et de m'avoir fait part de vos retours et réflexions. **Olivier,** d'abord membre de mon commité de suivi de thèse (CST) puis examinateur, je te remercie pour ces échanges constructifs et tes encouragements au cours de ma thèse.

J'en profite également pour remercier **Daniella Banaru,** également membre de mon CST. Avec **Olivier**, vous m'avez aidé à avancer dans la bonne direction.

Je souhaite ensuite remercier mes encadrants de thèse. J'ai trouvé en chacun de vous, et de façon complémentaire, les qualités scientifiques qui font de moi aujourd'hui celle que je suis devenue. Aujourd'hui, je mesure la chance que j'ai eu de pouvoir me former à vos côtés et je vous remercie de m'avoir hissé jusque là.

Thierry, tout à commencé il y a maintenant 4 ans, quand je t'ai passé ce coup de téléphone pour savoir si l'offre de thèse était encore disponible et que tu m'as répondu de renseigner ma spécialité culinaire dans mon CV… euh… wtf ?! J'ai tout de même bien fait de t'envoyer mon CV, puisque quelques semaines plus tard, à l'issue de l'entretien avec Charlotte, tu m'ouvrais la porte de cette aventure, réalisant alors pas mal de rêves. Ensuite, tout s'est vite enchainé, mes premières plongées en grottes et expériences, le lancement d'I-SMEL, mes premières présentations, un voyage au Brésil, mon premier article et mes premières trippes (oui, il faut le dire). Des rires, des larmes, et me voilà aujourd'hui, à finaliser l'écriture de ma thèse… Alors, merci de ta confiance, patience, bienveillance et générosité. Merci de m'avoir poussé à donner de mon mieux, encouragé et réorienté dans le droit chemin quand il y en avait besoin. Disponible à n'importe quelle heure et prêt à donner un coup de main, je savais que je pouvais compter sur toi.

Pierre, cette thèse nous aura mis sur le même chemin un peu par hasard, mais il faut dire que ce hasard a bien fait les choses, puisque j'ai été ravie de travailler (et de plonger) avec toi. En plus de ton encadrement rigoureux, bienveillant et juste, tu t'es montré attentif à mes questionnements, sous l'eau comme sur terre. Tes pauses café du matin, qu'il s'agisse d'un simple coucou ou d'une discussion plus longue, étaient toujours les bienvenues. Propulsé un

peu malgré toi dans le monde des molécules marines, tu faisais de ton mieux pour comprendre ce que je trafiquais avec mes *features* & Cie. Au-delà de cet aspect de ma thèse, tu as su me transmettre ta passion pour les grottes sous-marines et les mysidacés. Ma perception de ces petites bêbêtes, insignifiantes pour certains, n'aurait pas été la même sans toi. Enfin, au sein de mon trio d'encadrants, tu essayais de contenter tout le monde lorsque spongiologue et chimiste n'étaient pas tout à fait d'accord ꙮ . Pour tout cela, je te remercie.

Charlotte, avec toi j'ai découvert le monde de la métabolomique et des molécules. Ta patience, tes explications, tes conseils avisés et tes (nombreuses) répétitions m'auront permis d'acquérir des compétences essentielles à mon sujet de thèse et pour la suite. Aujourd'hui je peux dire que je sais manipuler vaillement des extraits d'eau de mer, analyser et interpréter des données métabolomiques acquises par spectrométrie de masse. Alors merci pour tous ces moments où tu t'es rendue très disponible et où tu as pris soin de m'expliquer chaque étape, depuis l'extraction des molécules à la rédaction d'articles. On en aura passé du temps sur MzMine et sur Data Analysis pour traiter les données… on se sera arraché quelques cheveux aussi… mais je retiendrais surtout qu'avec toi, on a commencé à percer le mystère de la composition chimique de l'eau de mer et ça, c'est pas n'importe quoi ꙮ . Je te souhaite à présent beaucoup de réussite et de bonnes surprises dans tes actuels et futurs projets de recherche.

Je remercie ensuite profondémment toute **l'équipe NÉMO**. Depuis mon premier jour d'arrivée en thèse, j'ai évolué dans une ambiance chaleureuse et familiale. J'ai notamment eu la chance de m'instruire au contact des plus grands. **Janus, Nicole**, merci de m'avoir transmis avec passion vos connaissances sur les éponges et de m'avoir aidé à identifier les espèces présentes dans les communautés de mes grottes. **Janus**, grâce à vous, la préparation des spicules à l'acide nitrique n'a plus de secret. Vous m'avez transmis quelques petites bases de la taxonomie des éponges, ajoutant une petite corde de plus à mon arc. Merci pour ce précieux bagage. **Nicole**, tu as toujours été bienveillante et encourageante à mon égard, merci de ton soutien. Je pense aussi à remercier **Jean-Jo Harmelin** qui a pris le temps de regarder mes photos de bryozoaires et de m'aiguiller sur certains genres. Une pensée aussi pour **Alexander (#Sacha E)** et **Laurent**, on aura d'ailleurs bien rit autour d'une vodka à la poire.

Sacha, mon fidèle compagnon de bureau, merci de veiller au grain au bien être de tous, au labo comme sur le terrain. Plus particulièrement, je te suis reconnaissante de m'avoir accompagné en mer pour piloter le bateau, et de m'avoir assisté lors de mes premières expériences de médiation et lors du broyage des éponges.

Stéphane, ce fut toujours un réel plaisir de te croiser au labo et de papoter avec toi. Merci de détendre l'atmosphère avec tes petites blagues et surtout, je te suis reconnaissante d'être resté patient devant mes analyses métabo… je sais que tu en as bavé.

Aux jeun's maintenant ! Marie G. comment ne pas te mentionner ? Présente dès le début et jusqu'à la fin (où tu ne me lâchais plus ahah), tu as toujours su me conseiller et me réconforter quand j'en avais besoin. Tu as des qualités humaines exceptionnelles et la vie au labo à tes côtés n'est que plus joyeuse ! Une pensée aussi pour **Mister Ulysse**, notre mascotte poilue bien aimée. **Emie,** merci d'avoir assisté à chacune de mes présentations avec enthousiasme. Je garde aussi un super souvenir de notre virée parisenne pour le GDR d'écologie chimique. **Coline B.,** je n'oublierai pas nos baignades à la calanque du labo à la recherche des poulpes, ni tes encouragements lors de ma dernière ligne droite. Je pense aussi à remercier **Titouan,** mon compatriote Breton, **Clément, les Morgane(s), Alexandre, Margaux, Jonathan et Pierre V.** Entre discussions de Science, sessions Arkose pour décompresser et soirées improvisées, on se sera bien marrés.

Enfin, **Christophe, Christian, Sandrine**, **Virgile,** merci de m'avoir aidé quand j'en avais besoin, que ce soit pour me conseiller sur des stats, m'accompagner en plongée, s'occuper de la retransmission de ma soutenance en ligne le jour J ou répondre à mes besoins d'aquariologie.

Michel, merci pour ton dévouement à la Station Marine et pour ta bienveillance. Je te suis particulièrement reconnaissante d'avoir veiller au bon fonctionnement des pompes lors de mes périodes d'expérimentation en aquarium.

Je pense également à **Lotti** et **Clémentine**, nos discussions au détour d'un couloir ou un petit « coucou » au bureau étaient toujours les bienvenus.

Je souhaite également exprimer ma gratitude à l'équipage de l'Antedon m'ayant conduit en mer plusieurs fois pour mes besoins de plongée. **Enzo, Patrick et Arnaud,** merci de votre gentilesse et de votre disponibilité.

Je souhaite à présent remercier mes proches de me soutenir dans cette aventure et de suivre mon parcours depuis des années.

Je tiens à remercier mes parents, ma famille. **Papa, Maman, Stéphanie**, merci d'avoir cru en moi et de m'avoir poussé jusqu'ici. Papa et Maman, merci de m'avoir laissé faire les études que je souhaitais. Si j'en suis rendue là, c'est aussi en partie grâce à vous. Aujourd'hui, je peux dire que je suis fière de vous présenter mon travail ; cet aboutissement qui me tenait à cœur. Je pense aussi à mes frères et sœurs, **Paul, Noa et Anaïs**, mes cousins-cousines, **Valentin & Alex,**

Justine, Charline & Sam et Alexandre. Merci pour tous ces bons moments passés ensemble à Marseille. Entre fous rires et confidences, ce fut toujours un réel plaisir et une puissante source d'énergie de vous avoir à mes côtés. **Papis, Mamies, les tontons et les tatas**, merci également d'être là et de suivre mes aventures sur What's app. **Fabienne**, merci d'avoir fait le déplacement pour moi et d'être là pour ma soutenance. **Mikael,** je te remercie de m'avoir fourni un double écran pour parfaire mes journées estivales de télétravail.

Je remercie aussi ma seconde famille, les Sourice. Chaque moment passé ensemble est une véritable escapade et de précieux moments de décompression. Bienveillance, rigolade et générosité sont les maîtres mots de cette ambiance chaleureuse avec vous. **Fabrice, Christelle, Mélissa, Corentin et Mamie Michelle**, merci du fond du cœur pour tout cela.

Mathieu, tu en sais déjà beaucoup… mais je tiens à te le redire, merci(s). Merci d'être à mes côtés dans mes moments de joie mais aussi dans ceux de doute et d'appréhension. Merci pour tes conseils, merci d'assister à mes premières répétitions (parfois calamiteuses) et merci pour nos discussions autour de mon sujet de thèse. Merci de me rappeler, dans les moments les plus durs, que la thèse est avant tout un rêve en pleine réalisation. Merci pour ton soutien sans faille et pour ce que je lis dans tes yeux chaque jour. Dans la dernière ligne droite toi aussi, je te souhaite tout le meilleur et je nous souhaite à nous, de beaux projets dans les années à venir.

Enfin, je remercie mes amis d'être là et de maintenir, malgré la distance qui nous sépare, cette belle amitié à laquelle je tiens. **Marjorie (#Mich**), si présente au quotidien, tu m'as souvent écouté parler de ma thèse, conseillé, rassuré mais aussi rendu visite à Marseille profiter du soleil, de la mer et des palmiers ☺ . **Louise, Mirella, Manon**, même si nos études nous ont emmené dans des directions différentes, vous n'êtes pas insensibles à mes histoires d'éponges et de crevettes. **Enora,** on en aura vécu des péripéties toutes les deux. D'abord à Brest où tu es devenue ma colocataire, puis à La Rochelle où l'on s'est retrouvé dans la même promo ! Je pense également à vous qui étiez de temps en temps de passage à Marseille : **Sophie, Aurélien, Yaya, Jussie, Julie A., Gwendal, Deborah**… Et puis, il y a les amis du Criobe de Moorea… **Charlotte, Estelle**… une chouette rencontre entre coraux, requins et poissons clowns ! De beaux souvenirs et une amitié qui perdure en Métropole. Je suis tellement contente de fêter ma soutenance avec vous !

Je pense aussi aux amis & Co de Mathieu ! Notamment, **Polbich**, vive nos w-end plongée dans le coin ! **Thibaut & Elodie et Corentin M.**, l'aventure « thèse » ne vous est pas inconnue ☺ . Merci à vous pour votre soutien, pour votre curiosité sans égal vis-à-vis de mon sujet de thèse et pour ces moments partagés ensemble autour de pétanques, champignons & Cie.

Enfin, une pensée pour mes amis Marseillais (ou presque !) ; **Victoria, Tom & Coline M.**, rencontrés via les formations ADUM / CNRS et avec qui on partageait nos expériences de jeunes doctorants. **Thierry & Elodie**, merci pour ces moment de convivialités entre plages et repas par-ci par là.

SOMMAIRE

Chapitre 1 : Introduction générale 1

1.1 Ecologie chimique marine, un besoin de connaissances 1

1.1.1 La médiation chimique, le langage de la nature 1
1.1.1.1 Les fonctions écologiques clés & les services écosystémiques associés 1
1.1.1.2 Diversité des exométabolites marins et terminologie associée 3
1.1.1.3 Exemples d'interactions impliquant des exométabolites en milieu marin 8
1.1.1.3.1 Mécanismes de défense 8
1.1.1.3.2 Mécanismes de reconnaissance 10
1.1.2 Emergence et intérêt de la métabolomique dans les études d'écologie chimique .. 14
1.1.2.1 Identification de médiateurs chimiques 15

1.2. Les grottes sous-marines 23

1.2.1 Définitions 23

1.2.2 Environnement cavernicole 25

1.2.3 Biodiversité des grottes sous-marines 27
1.2.3.1 La communauté des Grottes Semi-Obscures (GSO) 28
1.2.3.2 La communauté des Grottes Obscures (GO) 32

1.2.4 Fonctionnement trophique des grottes sous-marines 35

1.2.5 Les grottes comme modèles d'étude de la médiation chimique en milieu marin ... 37

1.3. Objectifs généraux de la thèse et organisation du manuscrit 38

Chapitre 2 : Patrons de diversité benthique dans les grottes de la région de Marseille 42

2.1. Introduction 42

2.2. Article : Patrons de diversité benthique dans les grottes de la région de Marseille 43

2.3. Conclusions & Perspectives 60

Chapitre 3 : Développement d'un outil de capture de paysages chimiques sous-marins *in situ* (I-SMEL) pour capter la signature chimique de la biodiversité benthique 62

3.1. Introduction 62

3.2. Article : Capture et enrichissement *in situ* de la diversité chimique marine 63

3.3. Conclusions & Perspectives 105

Chapitre 4 : Paysages chimiques marins et possible contribution des communautés benthiques 106

4.1. Introduction 106

4.2. Article : Paysages chimiques marins et possible contribution des communautés benthiques : étude de cas dans les grottes sous-marines de la Méditerranée 107

4.3. Conclusions & Perspectives 163

4.3.1 Quelques avancées majeures dans la compréhension de la complexité des paysages chimiques marins 163

4.3.2 Paysages chimiques au sein de communautés cavernicoles immatures 165

Chapitre 5 : Etude de l'influence du paysage chimique dans la reconnaissance de l'habitat de mysidacés cavernicoles……...171

5.1. Introduction 171

5.2 Article : Migrations circadiennes des crustacés cavernicoles influencées par le paysage chimique de leur grotte 173

5.3. Conclusion & Perspectives 207

5.3.1 Démonstration d'un comportement de *homing* en lien avec la médiation chimique ……207

5.3.2 Composition et activité des extraits enrichis en molécules issues d'eau de grotte 207

Chapitre 6 : Conclusions générales & Perspectives 212

6.1. Synthèse des nouvelles connaissances 212

6.2 Perte de biodiversité : une menace pour le fonctionnement des écosystèmes 214

6.3 Vers une meilleure caractérisation du paysage chimique marin & de ses contributeurs ……217

6.3.1 D'autres applications possibles 217

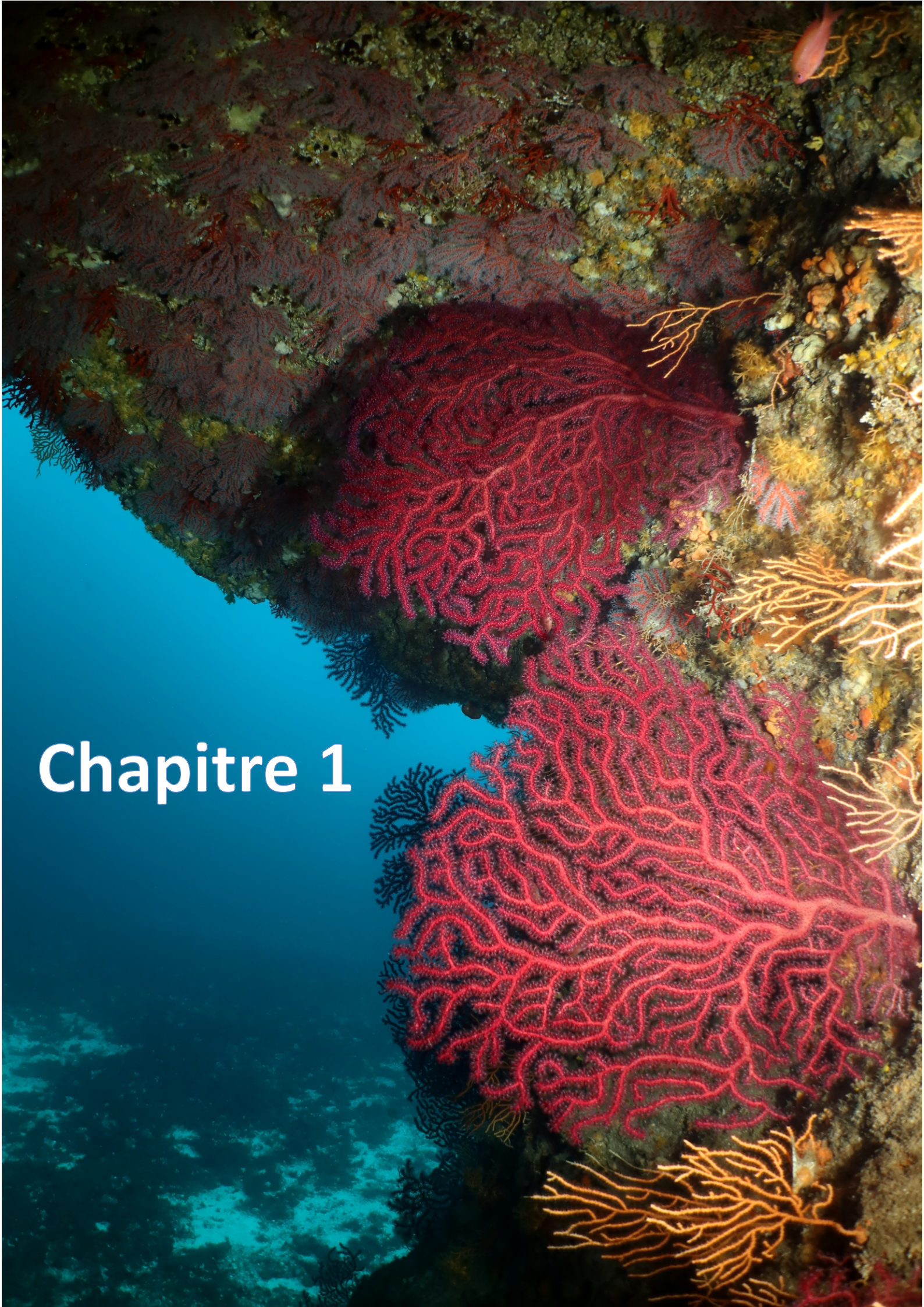
6.3.2 Vers de nouvelles générations d'I-SMEL 219

6.4 Rôle de la médiation chimique dans le fonctionnement des écosystèmes marins 220

6.4.1 Le cas des grottes sous-marines 220

6.4.2 D'autres interactions à distance relevant de la médiation chimique à révéler 223

Bibliographie 225



Chapitre 1

Introduction générale

1.1 Ecologie chimique marine, un besoin de connaissances

1.1.1 La médiation chimique, le langage de la nature

1.1.1.1 Les fonctions écologiques clés & les services écosystémiques associés

La médiation chimique est le mode de communication le plus répandu dans le monde vivant et est ainsi communément baptisé le "langage de la nature" (Wyatt, 2010, 2014). Les êtres vivants s'échangent et perçoivent des molécules présentes dans leur environnement. Elles sont essentielles à leur survie. Appelées médiateurs chimiques, ces molécules régissent des relations intra et inter-spécifiques telles que la reproduction (Yen & Lasley, 2011), la défense (Pohnert, 2004), l'alimentation (Zimmer et al., 1999 ; Kamio & Derby, 2017) et la recherche d'un habitat (Lecchini & Nakamura, 2013). De manière générale, la médiation chimique détermine la distribution spatiale de nombreuses espèces végétales et animales capables de trouver leur place au sein d'une mosaïque complexe de molécules, souvent définie comme un paysage chimique (Dyer et al., 2018). Ainsi par le jeu de ces interactions, la médiation chimique contribue de manière significative à l'organisation et au fonctionnement des écosystèmes (Burks & Lodge, 2002 ; Hay, 2009).

La pollinisation est l'un des exemples les plus communs de réseaux d'interactions biotiques conditionnées par la médiation chimique. Les molécules libérées par les fleurs attirent les insectes pollinisateurs, favorisant la reproduction des plantes et structurant ainsi la biodiversité d'une multitude d'arthropodes et de vertébrés (Parachnowitsch & Manson, 2015). La pollinisation, assurée à 90% par les insectes, est à l'origine de la reproduction de 85% des végétaux consommés par l'homme, soit 35% de notre alimentation (IPBES, 2019). Elle constitue ainsi pour l'humanité, un service écosystémique vital, inestimable et probablement sans égal. Malheureusement, la dégradation des milieux naturels par les activités humaines (déforestation, urbanisation, utilisation de pesticides) ainsi que le changement climatique menacent les pollinisateurs et donc les fonctions écologiques et services écosystémiques qu'ils rendent (Potts et al., 2010 ; Vanderplanck et al., 2021). De nombreuses espèces d'insectes, et notamment les abeilles, considérées comme le plus grand groupe de pollinisateurs, connaissent un fort déclin (Michener, 2007 ; Powney et al., 2019 ; Zattara &

Aizen, 2021). Ce déclin occasionne une diminution des interactions plantes-insectes, ce qui affecte de manière significative le maintien de la diversité des plantes sauvages et la stabilité des écosystèmes (Pauw, 2007 ; Potts et al., 2010). Alors que l'étude de la médiation chimique (aussi appelée l'écologie chimique) en milieu terrestre a permis de mettre en lumière des fonctions écologiques et services écosystémiques clés, sa contribution en milieu marin reste encore peu renseignée.

L'océan recouvre 71% de la surface de la Terre et comprend plus de 246 000 espèces connues (World Register of Marine Species, 2024). Le milieu marin fait l'objet de nombreuses perturbations environnementales (*e.g.* pollution, changement climatique, surexploitation, destruction des habitats) et certaines études rapportent déjà qu'elles affectent la perception chimiosensorielle des organismes marins (Munday et al., 2009 ; Devine et al., 2012 ; O'Connor et al., 2016 ; Roggatz et al., 2022 ; Wilke, 2021). Devant ce constat, il demeure primordial de mieux connaitre les fonctions écologiques associées à la diversité chimique des molécules produites par les organismes marins.

L'essentiel de l'écologie chimique en milieu océanique s'est focalisé sur le potentiel pharmacologique des molécules d'origine marine (Francesch et al., 2024), oubliant la plus grande portion de la diversité chimique et ses fonctions écologiques. A l'image des réseaux d'interactions que génèrent la médiation chimique en milieu terrestre, on imagine que le fonctionnement des écosystèmes marins en dépend tout autant. Si l'on pouvait démontrer le rôle clé de voûte de la médiation chimique dans l'océan en mettant en évidence une fonction aussi essentielle que la pollinisation en milieu continental, il serait alors possible de mieux communiquer sur les services écosystémiques et la nécessité de protéger la biodiversité marine dans un contexte d'environnement changeant.

1.1.1.2 Diversité des exométabolites marins et terminologie associée

Dans la littérature, les termes tels que « molécules organiques dissoutes », « substances allélochimiques » et « exsudats » désignent souvent les mêmes entités chimiques, c'est-à-dire des exométabolites. Cette diversité terminologique entre les articles et les domaines de recherche peut rendre complexe la recherche d'informations sur les techniques et les méthodologies qui ont été développées et qui sont disponibles pour étudier les exométabolites marins. Du sens le plus large au plus précis, le vocabulaire retrouvé dans la littérature est classé dans la Figure 1.1 :

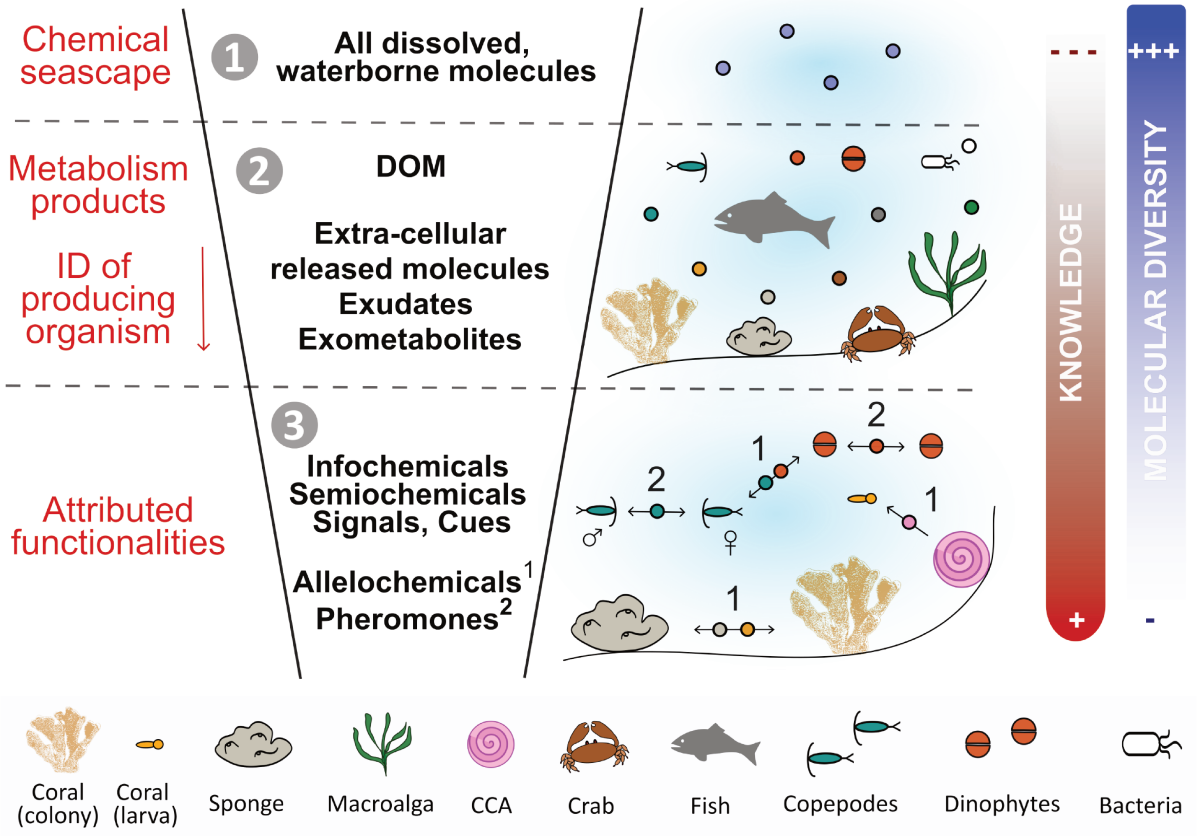


Figure 1.1 : Diversité de la terminologie utilisée dans la littérature pour décrire les exométabolites marins, du sens le plus large au sens le plus précis. Le groupe 1 rassemble le vocabulaire caractérisant le paysage chimique marin. Le second groupe concerne les termes employés pour définir les produits du métabolisme, et le troisième groupe se réfère aux termes utilisés lorsque les exométabolites sont associés à une fonction écologique. Les chiffres indiquent le type de médiateurs chimiques : 1 correspond aux "substances allélochimiques" pour les interactions interspécifiques et 2 aux "phéromones" pour les interactions intraspécifiques. DOM : « Dissolved Organic Matter », CCA : « Crustose Coralline Algae »

Ce schéma est présenté en anglais car il a été réalisé dans le cadre de la rédaction d'une revue scientifique (Mauduit et al., 2025)

Groupe 1 : En milieu marin, le terme de **paysage chimique** caractérise l'ensemble des molécules dissoutes mais aussi diluées et associées à des particules (ex : débris cellulaires) rentrant dans la composition de l'eau de mer (DeBose & Paul, 2014 ; Santonja et al., 2018;

Mauduit et al., 2023). Ces molécules peuvent avoir une origine biogène, minérale ou dériver de polluants issus des activités anthropiques (Derrien et al., 2024a ; Chapitre 5).

Groupe 2 : Les molécules d'origine biogène, aussi appelées **substances naturelles** sont sécrétées dans l'environnement via les activités métaboliques des organismes vivants (par exemple : l'excrétion des déchets, la lyse cellulaire, la communication chimique). Ces molécules peuvent aussi bien provenir du métabolisme primaire que du métabolisme secondaire (dit aussi spécialisé). Les composés du métabolisme primaire incluent les lipides, les sucres et les acides aminés, et sont impliqués dans des fonctions vitales telles que le développement embryonnaire, la croissance et le fonctionnement général de l'organisme. La production de terpénoïdes, d'alcaloïdes ou de composés phénoliques est plutôt associée à des mécanismes de survie (défense, reconnaissance), typiques du métabolisme secondaire. Tandis que les métabolites primaires, de par leur ubiquité, traduisent l'unité du vivant, les métabolites secondaires participent à la signature chimique d'un organisme dans l'environnement, illustrant ainsi la diversité du monde vivant.

Parmi ces molécules, l'appellation **« DOM** pour **Dissolved Organic Matter »** est l'une des plus utilisées et ainsi une des plus complexes à définir puisqu'elle a un sens très large. En général, DOM se qualifie comme un mélange complexe constitué de centaines de milliers de composés (Zark et al., 2017). Un litre d'eau de mer contient en moyenne < 1 mg de DOM dont la concentration est donc estimée à 35 000 fois inférieure à celle des sels inorganiques (Catalá et al., 2021). Les DOM peuvent contenir des molécules de poids moléculaires divers, allant de matières colloïdales à haut poids moléculaire (Amon & Benner, 1994) à des acides aminés libres et des hydrates de carbone simples à faible poids moléculaire (Granum et al., 2002). Ces molécules sont de composition atomique variée comprenant en grande partie du carbone organique dissous (Hansell, 2013) mais aussi de l'azote, du phosphore ainsi que des halogènes (Pereira et al., 2020 ; Weber et al., 2020 ; Olinger et al., 2021 ; Mauduit et al., 2022, 2023 ; Nelson et al., 2023 ; Bogdanov et al., 2024). Les carbohydrates, les protéines et acides aminés, les lipides et leurs dérivés sont les classes chimiques rentrant majoritairement dans la composition des DOM (Wetzel & Likens, 2000 ; Hansell & Carlson, 2014). Les terpénoïdes, les alcaloïdes, les polycétides, polyphénols, les vitamines et les composés soufrés peuvent également faire partie de cette composition (Powers et al., 2019 ; Pereira et al., 2020 ; Weber et al., 2020 ; Olinger et al., 2021 ; Mauduit et al., 2023 ; Bogdanov et al., 2024). Pour ajouter un degré de complexité, les DOM sont aussi caractérisés par une forte proportion d'isomères structuraux (molécules différentes mais ayant même formule brute) (Zark et al., 2017).

Les molécules des DOM peuvent avoir une durée de vie très courte, comme très longue dans le milieu marin (Bauer et al., 1992 ; Hansell et al., 2009). Par exemple, Hansell (2013) distingue la DOM labile, transformée rapidement par la minéralisation microbienne, de la DOM récalcitrante/réfractaire qui s'accumulent et que l'on détecte facilement dans l'eau de mer. La présence quasi systématique de molécules ayant des groupements alicycliques[1] riches en carboxyles (CRAM= *Carboxyl-Rich Acyclic Moeties*) mais aussi dérivant de terpénoïdes linéaires (MDLT= *Matter Derived from Linear Terpenoids*) participent à la caractérisation chimique de la DOM récalcitrante (Zark et al., 2017).

L'appellation **« DOM »** englobe ainsi tous les termes faisant référence aux molécules libérées par l'ensemble des organismes marins tels que les **molécules exhalées** (Fiore et al., 2017), les **composés extracellulaires** (Weber et al., 2020), les **exsudats** et les **exométabolites** (Mauduit et al., 2022, 2023 ; Wegley Kelly et al., 2022 ; Quinlan et al., 2023). Le choix du terme employé dépend surtout du champ de recherche et de l'objectif de l'étude, ainsi que du niveau de connaissance associé. L'appellation **« DOM »** est davantage retrouvée dans les études en écologie et éco-géochimie traitant du cycle de la matière organique et des réseaux trophiques (Hildebrand et al., 2022 ; Wegley Kelly et al., 2022 ; Becker et al., 2023). Tandis que les termes « **d'exométabolites »** et **« d'exsudats »** sont plutôt retrouvés dans les études de chimie des substances naturelles et en écologie chimique, dans un but de caractérisation de l'exométabolome d'un organisme ciblé et d'identification structurale de composés précis (Ternon et al., 2016 ; Law et al., 2021 ; Mauduit et al., 2022).

Groupe 3 : Parmi les composés exsudés dans l'environnement, certains sont associés à une fonctionnalité et véhiculent des informations essentielles au fonctionnement des écosystèmes (Slattery et al., 1997 ; Zimmer & Butman, 2000 ; Hay, 2009). Qualifiés de **médiateurs chimiques,** on les retrouve dans la littérature sous les dénominations d'**« infochemicals »** (Saha et al., 2019), **« semiochemicals »** (Meinwald et al., 2018), **« chemical cues »** (Hay, 2009 ; Poulin et al., 2018) et **« chemical signals »** (Heuschele & Selander, 2014). Ces composés peuvent intervenir dans les relations interspécifiques, ce sont des composés dits **allélochimiques,** ou dans des relations intraspécifiques, ils sont alors appelés **phéromones**.

Les **composés allélochimiques** peuvent notamment être impliqués dans des mécanismes de lutte contre la **prédation,** illustrée par l'interaction zooplancton – phytoplancton (Figure 1.2, interaction « 1a ») décrite dans Selander et al. (2015), la **compétition**, représentée par

[1] Un composé alicyclique est un composé organique qui est à la fois aliphatique et cyclique. Il peut contenir un ou plusieurs cycles sans hétéroatomes qui peuvent être saturés ou insaturés mais qui n'ont pas de caractère aromatique.

l'interaction éponge – corail (Figure 1.2, interaction « 1b ») (Porter & Targett, 1988) et dans la **reconnaissance d'un habitat**, symbolisée par l'interaction algues corallines encroutântes « CCA » - larves de coraux, (Figure 1.2, interaction « 1c ») dans Quinlan et al. (2023).

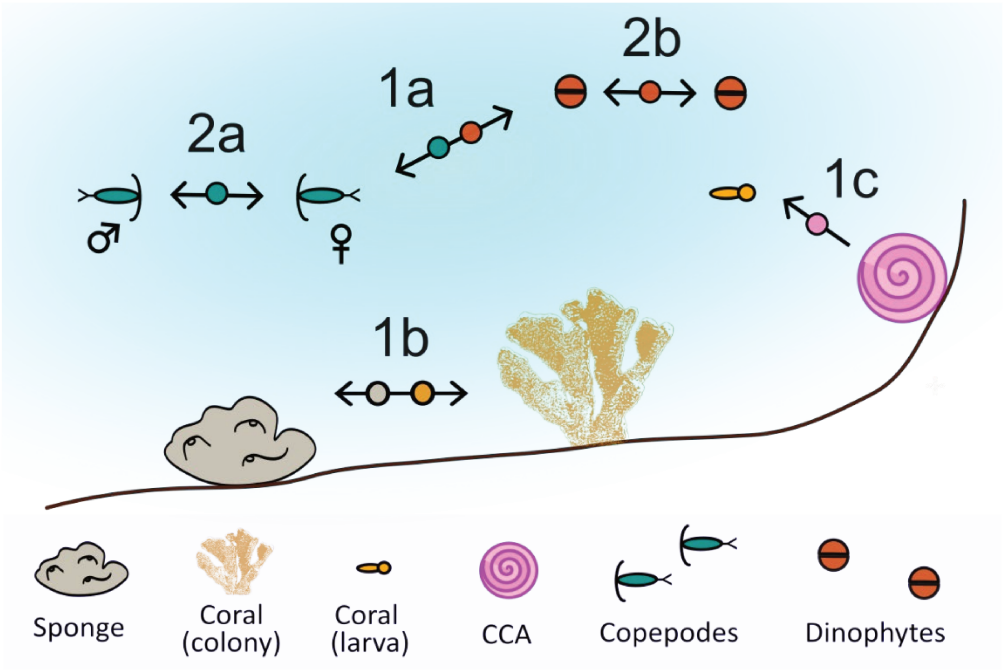


Figure 1.2 : Illustration d'interactions où les exométabolites sont associés à une fonction écologique. Les chiffres indiquent le type de médiateurs chimiques : 1 correspond aux "substances allélochimiques" pour les interactions interspécifiques et 2 aux "phéromones" pour les interactions intraspécifiques. La lettre associée correspond à un exemple tiré de la littérature : 1a illustre l'interaction copépode - dinophyte décrite dans Selander et al., 2015 ; 1b se réfère à l'interaction éponge - corail dans Porter & Targett, 1988 ; 1c symbolise l'interaction algue coralline encroûtante (CCA) - larve de corail dans Quinlan et al., 2023 ; 2a est lié à l'interaction entre copépodes mâles et femelles dans Heuschele & Selander, 2014 ; 2b se réfère à une interaction entre congénères de dinophytes dans John et al., 2015.

Les **phéromones** peuvent être employées à des fins de **reproduction** pour trouver un partenaire. C'est ce qui est illustré par l'interaction mâle – femelle copépodes (Figure 1.2, interaction « 2a ») décrite dans Heuschele & Selander (2014). Elles peuvent aussi avoir une fonction de **signalisation** entre congénères face à un danger, telle que la présence d'un prédateur à proximité. C'est ce qui est représenté dans l'interaction dinophyte – dinophyte (Figure 1.2, interaction « 2b ») démontrée dans John et al. (2015).

Parmi ces deux groupes de médiateurs chimiques, on recense d'autres terminologies employées (surtout en écologie terrestre) selon le « bénéficiaire » du signal et le délai d'action (Figure 1.3).

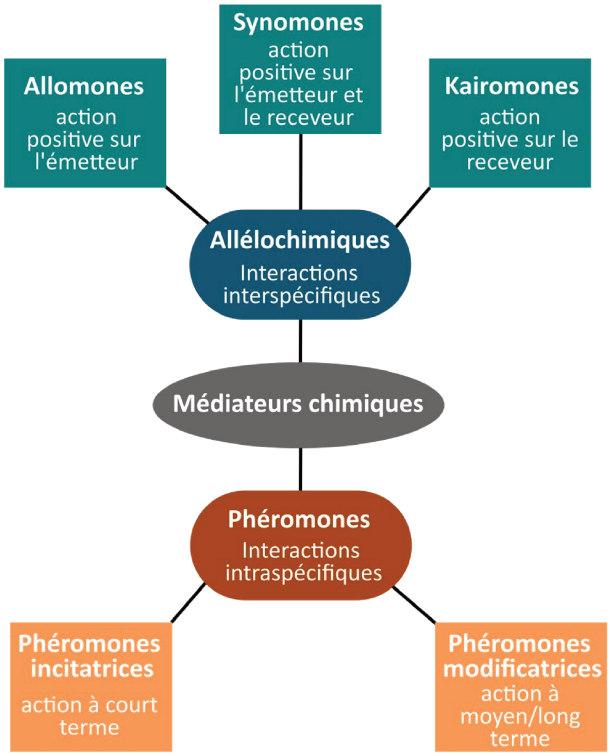


Figure 1.3 : Les différents types de médiateurs chimiques (modifié d'après Bagnères & Hossaert McKey, 2017)

Parmi les composés **allélochimiques**, on distingue les **allomones** (action positive sur l'émetteur, *e.g.* sa défense), les **kairomones** (action positive sur le récepteur, *e.g.* la détection d'une proie/d'un prédateur) et les **synomones** (bénéfiques à l'émetteur et au récepteur). Pour les **phéromones**, on parle de **phéromones incitatrices** lorsqu'elles peuvent modifier le comportement des congénères à court terme (*e.g.* la recherche d'un partenaire). A l'inverse, on parle de **phéromones modificatrices** lorsqu'elles agissent à moyen/long terme sur la physiologie de l'organisme (*e.g.* la phéromone royale des abeilles mellifères qui inhibe le développement ovarien de ses ouvrières).

Malgré leur rôle important et crucial dans la structure des populations, l'organisation des communautés et le fonctionnement des écosystèmes marins, l'omniprésence de ces signaux chimiques et leurs effets restent encore mal connus. Ce manque de connaissances explique en partie la faible utilisation de termes comme les *synomones* et les *phéromones incitatrices* ou *modificatrices* dans les études d'écologie marine. Cependant, les efforts scientifiques se sont multipliés pour élucider les mécanismes de communication chimique organisant le réseau d'interactions en milieu marin.

1.1.1.3 Exemples d'interactions impliquant des exométabolites en milieu marin

Les exemples ci-dessous présentent des mécanismes de communication chimique rapportés dans la littérature, classés par fonction et balayant une large gamme d'organismes marins, allant des microalgues aux oiseaux. Beaucoup de connaissances actuelles portent sur l'effet de métabolites provenant de la biomasse des organismes, redilués ou non dans de l'eau de mer, et/ou impliqués dans des interactions de contact (Fearon & Cameron, 1996, 1997 ; Engel & Pawlik, 2000 ; Paul & Puglisi, 2004 ; Da-Anoy et al., 2017). Mais ici, le choix est fait de présenter exclusivement des exemples faisant intervenir des médiateurs chimiques exsudés par un organisme producteur. On distingue les mécanismes de défense, des mécanismes de recherche et de reconnaissance.

1.1.1.3.1 Mécanismes de défense

Les organismes sessiles sont incapables de se déplacer, ils développent donc des mécanismes de défense contre des compétiteurs pour l'espace et les ressources, et/ou des pathogènes et/ou des prédateurs. Des médiateurs chimiques de types allomones sont employés par ces organismes pour se protéger de ces autres espèces représentant une véritable menace.

- ***Compétiteurs***

Les coraux, les éponges, les ascidies et les macro algues ont souvent une place bien définie dans les assemblages benthiques. Leur répartition dépend notamment de facteurs abiotiques tels que l'exposition aux courants et à la lumière, mais également de l'utilisation d'allomones concurrençant l'installation d'espèces sessiles vivant en syntopie[2]. Par exemple, Porter & Targett (1988) ont évalué la compétition spatiale entre deux espèces voisines *Plakortis halichondrioides* (éponge) et *Agaricia lamarcki* (corail) par contact direct et à distance (eau conditionnée supposée enrichie en exométabolites). Les résultats de cette étude ont révélé que la présence de l'éponge affecte progressivement la survie du corail. Ce dernier, sous l'effet du stress occasionné, modifie son taux de respiration et de photosynthèse, réduisant alors la quantité de dinophytes hébergés. De la même manière, Degnan & Johnson (1999) ont montré que l'eau conditionnée par trois espèces d'algues corallines (*Neogoniolithon brassica-florida, Porolithon onkodes et Lithothamnium* sp.) inhibait l'établissement et la métamorphose des larves de l'ascidie *Herdmania curvata,* cohabitant dans la même communauté d'organismes.

[2] Relation qualifiant des espèces partageant le même habitat

Les larves testées ont montré des malformations morphologiques et présentaient des cellules musculaires nécrosées. Les observations de ces deux études supposent que la libération de toxines par l'éponge et les algues corallines garantit leur survie, et ce qui expliquerait leur caractère dominant au sein de ces communautés. C'est d'ailleurs suite aux travaux de Coll et al. (1982) que Aceret et al. (1995) ont mis en évidence que *Sinularia flexibilis*, alcyonaire dominant dans de nombreux récifs coralliens de l'Indo-Pacifique, libérait des composés toxiques. Deux diterpènes, la flexibilide et la dihydroflexibilide (voir figure 1.4 pour les structures) provoquaient la nécrose des tissus et la mort des coraux scléractiniaires situés à proximité.

Les macroalgues et les éponges marines sont peu recouvertes d'épibiontes. Ceci laisse supposer qu'elles sont chimiquement protégées et dépendent de composés solubles libérés à leur surface et en continu pour empêcher les larves de s'installer. Par exemple, Walters et al. (1996) ont montré que l'eau enrichie en exsudats de 4 macroalgues tropicales (*Dictyota sandvicensis*, *Halimeda discoidea, Sphacelaria tribuloides, Ulva reticulata)* entrainait la mort ou empêchait l'établissement de larves du polychaète *Hydroides elegans* et du bryozoaire *Bugula neritina*. Ces 2 dernières sont des espèces opportunistes communément retrouvées sur les substrats durs. Chez les éponges, *Halichondria panicea* libèrerait des composés solubles dans l'eau qui empêcheraient la fixation des larves de balane *Balanus improvisus* (Toth & Lindeborg, 2008).

- ***Agents pathogènes***

L'une des principales causes du déclin des coraux est l'augmentation des maladies infectieuses. L'étude d'Ochsenkühn et al. (2018) s'est notamment intéressée à la composition en exométabolites à la surface de coraux sains et de ceux atteints de la maladie du « white syndrome ». Les auteurs ont mis en évidence la présence d'indicateurs chimiques d'un bon état de santé des d'individus qui seraient notamment le 17-β-estradiol-glucuronide, de dérivés de la xanthine et de la pyrimidine et le phosphatidyl-inositol. Ces composés joueraient un rôle soit dans la résistance aux maladies, soit dans la régulation du biofilm bactérien à sa surface. A l'inverse, des composés tels que la dihomométhionine et un dérivé de la norspermine étaient plus abondants au niveau des coraux malades. Ces composés pourraient soit jouer un rôle de défense chez les coraux, soit être produits par les pathogènes (Ohsenkühn et al., 2018).

La langouste des Caraïbes *Panulirus argus* utiliserait quant à elle des signaux chimiques contenus dans l'urine de ses congénères pour détecter et éviter les individus infectés par des virus (*e.g.* PaV1[3] et White spot syndrome virus) (Anderson & Behringer, 2013 ; Behringer et

[3] PaV1 pour *Panulirus argus* Virus 1

al., 2006 ; Lozano-Álvarez et al., 2018 ; Ross & Behringer, 2019). Une réponse d'évitement généralisée des langoustes saines vis à vis des congénères infectés constitue une défense comportementale permettant de réduire la propagation et la prévalence des virus chez les populations sauvages.

- ***Herbivores et prédateurs***

Au cours de l'évolution, les algues marines ont développé des mécanismes d'alerte entre congénères et des armes chimiques puissantes contre les herbivores. Toth & Pavia (2000) ont montré que les algues brunes (*Ascophyllum nodosum*) détectaient la présence du bigorneau (*Littorina obtusata*) à distance grâce à des signaux chimiques libérées par des congénères broutés. Ces signaux agissent comme signaux d'alerte détectés par les thalles indemnes qui produisent en retour des phlorotannins pour dissuader les bigorneaux de s'approcher. Dans la colonne d'eau, les dinophytes du genre *Alexandrium* détectent la présence des copépodes grâce à la copépodamine produite par ces crustacés herbivores (Selander et al., 2015). Afin de se protéger des copépodes, les cellules d'*Alexandrium minutum* augmentent leur toxicité en produisant jusqu'à 20 fois plus de saxitoxine ; une toxine aux propriétés paralysantes. La prolifération de ces microalgues contribue à la formation d'efflorescences toxiques. Ces toxines, une fois ingérées, se propagent dans la chaine trophique, intoxiquant les consommateurs primaires, puis secondaires (jusqu'à l'homme). Cet exemple montre ici toute l'importance de la médiation chimique, pouvant en peu de temps et à grande échelle, altérer la structure des communautés et le fonctionnement d'un réseau trophique.

1.1.1.3.2 Mécanismes de reconnaissance

Les organismes marins utilisent les molécules présentes dans l'eau pour s'orienter, parfois sur de longues distances (DeBose & Nevitt, 2008), à la recherche d'une proie, d'un partenaire sexuel ou d'un habitat convenable. Les médiateurs chimiques impliqués peuvent être des kairomones ou des phéromones.

- ***Repérage de proies***

Les consommateurs réagissent généralement aux métabolites primaires qui signalent la présence de ressources alimentaires (sucres, protéines, acides aminés, produits de la respiration ou déchets métaboliques, par exemple). Parce que les médiateurs chimiques sont des mélanges plutôt que des molécules spécifiques au sein de ces mélanges, les réponses des consommateurs à des peptides particuliers sont rarement aussi démonstratifs qu'à des mélanges naturels (Rittschof & Cohen, 2004). Le rôle des mélanges dans l'incitation à la recherche de nourriture rend difficile le fractionnement et l'identification des médiateurs chimiques impliqués.

Cependant, il existe des exemples de recherche de nourriture, sur une échelle spatiale de plusieurs centaines de kilomètres, et qui semblent faire intervenir quelques molécules simples. Lorsque le zooplancton attaque les efflorescences de phytoplancton, du sulfure de diméthyle (DMS) est généralement libéré par les proies (Dacey & Wakeham, 1986). Les travaux de Nevitt (Nevitt, 2000 ; DeBose & Nevitt, 2008) démontrent que les oiseaux de mer procellariiformes (pétrels, albatros, puffins) ont une neuroanatomie qui leur confère un sens de l'odorat très développé. Ils utilisent le DMS pour suivre les zones pélagiques à haute productivité, où ils se nourrissent de zooplancton (krill), de poissons, de calmars et même d'autres oiseaux. D'autres études suspectent aussi la détection du DMS par de grands consommateurs de zooplancton (requins-baleines, baleines à bosses) lors de leur activité de recherche de nourriture (Dove, 2015 ; Bouchard et al., 2019 ; Ryan et al., 2024). En conséquence, le DMS jouant un rôle crucial dans les interactions trophiques est désormais reconnu comme un bon indicateur des fortes zones de productivité marine (Savoca & Nevitt, 2014).

- ***Recherche d'un partenaire***

La synchronisation des évènements de reproduction est médiée par une série de signaux chimiques internes (hormones) et externes (phéromones). La biologie chimio-sensorielle des crustacés fait partie des mieux comprises chez les invertébrés et les phéromones sexuelles chez les crustacés sont étudiées depuis des décennies (Kamio et al., 2022). Chez les crabes, les femelles libèrent deux types de phéromones sexuelles dans leur urine : les phéromones de parade nuptiale et celles de copulation, déclenchant alors un comportement de séduction et de recherche de la reproduction chez les males. Plus spécifiquement, Ryan (1966) par exemple a rapporté que la femelle du crabe nageur *Portunus sanguinolentus* libère une phéromone qui induit un comportement de recherche chez les mâles présentant une posture spécifique, telle que la marche sur la pointe de ses dactyles et le redressement de ses chélicères. Depuis, plusieurs molécules provenant de l'urine des femelles de différents crabes ont été proposées comme phéromones candidates: la crustecdysone chez le *Pachygrapsus crassipes* (Kittredge et al., 1971), la N-Acetyl-D-glucosamino-1,5-lactone (NAGL) chez *Callinectes sapidus* (Kamio et al., 2014), l'uridine diphosphate chez *Carcinus maenas* (Hardege et al., 2011) et un ensemble de céramides chez *Erimacrus isenbeckii* (Asai et al., 2000).

- ***Recherche d'un habitat favorable***

Plusieurs études sur la biodiversité des récifs coralliens ont montré que le recrutement d'espèces marines benthiques faisait appel à des signaux chimiques détectés par les larves avant leur métamorphose, c'est-à-dire au moment de leur recherche d'un habitat pour s'établir.

Par exemple, Atema et al. (2002) ont apporté la première preuve que des larves de poissons de récif (principalement des apogonidés) étaient capables de faire la distinction entre les paysages chimiques du lagon et de l'océan ouvert. Lecchini et al. (2013) ont également observé que plusieurs larves de poissons, de crustacés et de céphalopodes sélectionnaient activement leur habitat pour la phase de recrutement, en supposant l'utilisation de signaux chimiques. La présence de congénères, de nourriture, la biodiversité récifale ou l'état de santé d'un écosystème sont autant de contributeurs à un paysage chimique susceptible de favoriser l'installation de juvéniles. Par exemple, Coppock et al. (2013) ont constaté que les poissons juvéniles des récifs montraient une préférence significative pour l'eau conditionnée par des congénères ou par certaines espèces benthiques constitutives des écosystèmes récifaux. De même, Lecchini et al., (2014) ont montré que diverses larves marines étaient significativement plus attirées par le paysage chimique des coraux en bonne santé que par celui des colonies blanchies.

Les molécules dissoutes jouent également un rôle dans la reconnaissance de l'habitat pour les espèces migratrices à la recherche d'un lieu de reproduction et de frai. Cette capacité de reconnaissance de l'habitat peut être dans certains cas, qualifiée de comportement de *homing*. Le *homing* se traduit par la capacité innée de certains animaux à retrouver le chemin de leur « maison » (Papi, 2012).

Les grands migrateurs, tels que les saumons et les tortues (Stabell, 1992 ; Endres et al., 2016) suivent des couloirs chimiques pour retourner avec précision à leur habitat natal (Scholz et al., 1976). Chez les saumons, deux types de signaux chimiques seraient impliqués dans ce comportement : des substances « natales imprimées » (Wisby & Hasler, 1954) et des phéromones (Solomon, 1977). Des expériences comportementales, basées sur la dilution d'acides aminés présents dans le cours d'eau natal des saumons (*Oncorhynchus keta* et *O. masou*), démontrent que ces acides aminés seraient des signaux chimiques enregistrés dès les premiers stades de vie du saumon. Ils seraient ensuite reconnus et suivis par les individus matures lors de leur migration (Shoji et al., 2000, 2003). Les molécules émises par les conspécifiques peuvent également être utilisées, mais seulement en l'absence de repères natals imprimés. Ainsi, Bett & Hinch (2015) suggèrent que les phéromones peuvent servir de repères directionnels de substitution aux signaux chimiques natals imprimés.

Outre le fait de retourner sur le lieu de naissance pour se reproduire, le comportement de *homing* peut aussi faire référence à des migrations quotidiennes entre l'habitat et le milieu extérieur. Chez les crustacés, les signaux chimiques font partie des principaux mécanismes de reconnaissance de l'habitat (Boudreau et al., 1993 ; Castañeda-Fernández De Lara et al., 2005

; Arvedlund & Kavanagh, 2009 ; Lecchini et al., 2010). Santonja et al. (2018) ainsi que Ashur & Dixson (2019) supposent que des crustacés nageurs utilisent des molécules exsudées par les éponges pour retrouver le chemin de leur habitat.

Peu d'études en écologie chimique marine ont abordé la nature chimique des exométabolites marins. L'accès à ces informations chimiques est d'autant plus crucial que le changement global modifie l'environnement, entraînant des changements de biodiversité susceptibles de modifier la chimiodiversité de l'eau de mer à l'échelle mondiale (La Barre, 2014 ; Wegley Kelly et al., 2021, 2022 ; Becker et al., 2023).

1.1.2 Emergence et intérêt de la métabolomique dans les études d'écologie chimique

Le développement des analyses métabolomiques dans les études en écologie chimique a permis d'accéder à la caractérisation des médiateurs chimiques impliqués dans les interactions entre les organismes et leur environnement. La métabolomique est basée sur la mesure rapide du contenu global d'une matrice en métabolites de faible poids moléculaire (< 1500 Da). Deux types de méthodes analytiques, ciblées et non ciblées sont employées, parfois au sein de la même étude. L'analyse ciblée se focalise sur la détection et la quantification absolue de métabolites d'intérêt et de structure connue. L'analyse non ciblée s'intéresse à l'ensemble des métabolites détectables dans un échantillon. Elle vise à enregistrer les signatures chimiques globales et à comparer la diversité et l'abondance relative des métabolites au sein de systèmes biologiques distincts.

Les deux techniques les plus employées en analyses métabolomiques, et parfois de façon complémentaire, sont la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et la Spectrométrie de Masse (MS). La RMN offre une empreinte chimique spectrale quantitative de l'ensemble des métabolites d'un échantillon sans leur séparation physique, ce qui *de facto* limite la détection de métabolites en traces (Simmler et al., 2016). Généralement aussi moins accessible que les instruments de MS, la RMN reste comparativement peu employée pour répondre à des questions d'écologie chimique. Couplée à une Chromatographie Liquide Ultra Haute Performance (UHPLC) qui assure la séparation physico-chimique des métabolites, la MS de haute résolution (UHPLC-HR-MS) assure une détection rapide d'une grande gamme dynamique de métabolites, incluant ceux à l'état de traces (concentrations ≤ 1 ppm) au sein d'extraits préparés à partir de faibles quantités d'organisme (<1 g) ou issus de matrices environnementales (eau de mer par exemple). L'identification des métabolites par HR-MS/MS est assurée par la mesure de leur masse sur charge (*m/z*) et du patron isotopique observé pour l'ion moléculaire parent et les fragments associés.

L'amélioration de la sensibilité des instruments de spectrométrie de masse, couplée à la mise à disposition des logiciels de traitement de données en libre accès (*e.g.* MZmine, Schmid et al., 2023) et au développement conjoint de service de comparaison de spectres MS/MS (*e.g.* GNPS, Nothias et al., 2020) et d'outils d'annotation *in silico* (*e.g.* SIRIUS, Dührkop et al., 2019) ont permis d'accéder à des analyses plus globales en vue d'assurer une description détaillée de la diversité chimique des exométabolites marins (Petras et al., 2017 ; Quinlan et al., 2022).

Ces avancées ont contribué à (1) définir la signature chimique des organismes dans l'eau de mer (Nelson et al., 2013 ; Weber et al., 2022 ; Wegley Kelly et al., 2022 ; Mauduit et al., 2023), (2) identifier les médiateurs chimiques potentiellement impliqués dans les interactions biotiques (voir section suivante) et (3) évaluer leur participation dans des réseaux trophiques (Fiore et al., 2017 ; Noriega-Ortega et al., 2019 ; Hildebrand et al., 2022 ; Reigel et al., 2024).

1.1.2.1 Identification de médiateurs chimiques

Le tableau ci-dessous recense quelques exemples de médiateurs chimiques marins mis en évidence par la combinaison de techniques analytiques utilisées en chimie des substances naturelles, depuis 1982 à aujourd'hui (2024). A partir de 2010, on assiste au déploiement puis à la démocratisation des analyses métabolomiques par spectrométrie de masse. La majorité des études récentes font appel à des analyses non ciblées pour explorer la diversité des métabolites et exométabolites marins.

Tableau 1 : Données bibliographiques d'exométabolites marins caractérisés et intervenant dans les relations biotiques[1].

Phylum	**Classes**	**Organisms**	**Detected specific EM** Annotated/**Identified**	**Chemical families**	**Associated ecological functionalities**	**Affected/promoted taxa**	**References**
Cnidaria	Octocorallia	*Sinularia flexibilis*	**Flexibilide** **Dihydroflexibilide**	Terpenoids	Defense against interspecific competition	Corals *(Montipora digitata* *Acropora tenuis)*	Coll et al., 1982 Aceret et al., 1995
		Sarcophyton crassicaule	**Sarcophine** **Sarcophytoxide**				
Porifera	Demospongiae	*Aplysina fistularis* forma *fulva*	**Aerothionin** **Homoaerothionin**	Alkaloids	Defense against mobile fauna causing tissue damages	Seastar *(Pisaster giganteus)* Giant limpet *(Megathura crenulate)* Abalone larvae *(Haliotis rufescens)*	Walker et al., 1985 Thompson, 1985
Cnidaria	Octocorallia	*Alcyonium paessleri*	**Cholesterol and derivatives such as 22-dehydrocholesterol, 24-methylenecholesterol**	Fatty acids (Sterols)	Defense against predators	Seastar	Slattery et al., 1997
Cnidaria	Octocorallia	*Gersemia antarctica*	**Homarine** **Trigonelline**	Alkaloids	Defense against biofoulers, pathogens	Bacteria (*Alteromonas* sp., *Moraxella* sp., *Psychrobacter* sp.)	
Porifera	Demospongiae	*Ircinia felix*	59 volatiles [e.g. thiobismethane (dimethylsulfide), methyl	Sulfides Fatty acids	Possible defense against biofoulers, competitors, predators	Barnacle larvae Corals	Duque et al., 2001

			isocyanide, methyl isothiocyanate]			Spongivorous fish seastar	
Porifera	Demospongiae	*Geodia barretti*	**Barettin** **8,9-dihydrobarettin**	Alkaloids	Defense against biofoulers and grazers	Cyprid larvae of barnacle (*Balanus improvises)* Hermit crab (*Pagurus bernhardus)*	Sjögren et al., 2002, 2004, 2011
Arthropoda	Copepoda	*Centropages typicus*	**Copepodamides A-H**	Polar lipids	Induction of chemical defense in preys (saxitoxins)	Dinophyte (*Alexandrium minutum*)	Selander et al., 2015
Porifera	Demospongiae	*Crambe crambe*	**Crambescin A2-462, Crambescidin 816**	Alkaloids	Defense against competitors by disturbing tunicate development	Ascidian (*Phallusia mamillata*)	Ternon et al., 2016
Rhodophyta	Florideophyceae	*Laurencia dendroidea*	**Elatol**	Halogenated terpenoids	Grazer attractant Possible warning signals from grazed congeners	Seahare *(Aplysia brasiliana)*	Nocchi et al., 2017 Pereira et al., 2020
Arthropoda	Decapoda	*Callinectes sapidus*	**Homarine** **Trigonelline**	Alkaloids	Warning signal of predator presence	Mud crab *(Panopeus herbstii)*	Poulin et al., 2018
Cnidaria	Hexacorallia	*Acropora* sp. *Platygyra* sp	17-β-estradiol-glucuronide, Xanthine and Pyrimidine derivatives Phosphatidyl-inositol Malabaricone C	Terpenoids Alkaloids Fatty acids Polyketides	Possible disease resistance or bacterial biofilm regulation Possible defense against pathogens Anti-microbial agent	Possibly pathogenic bacteria	Ochsenkühn et al., 2018

Porifera	Demospongiae Homosclero-morpha	*Aplysina cavernicola* *Haliclona fulva* *Spongia officinalis* *Oscarella tuberculata*	Peptides-like, oxilipins	Peptides, Fatty acids, Alkaloids	Habitat recognition/ Homing behavior	Mysid *(Hemimysis margalefi)*	Santonja et al., 2018 Derrien et al., 2024a
Rhodophyta	Florideophyceae	*Hydrolithon boergesenii* *Paragoniolithon solubile*	lipids and lipid-like compounds, amino acids and peptides, androstane steroids and diterpenoids	Fatty acids Amino acids and peptides Terpenoids	Habitat selection	Corals *(Acropora palmata, Colpophyllia natans* and *Orbicella faveolata)*	Quinlan et al., 2023

[1]Ce tableau est présenté en anglais car il a été réalisé dans le cadre de la rédaction d'une revue scientifique (Mauduit et al., 2025)

Le nombre d'études portant sur le rôle des exométabolites marins en tant que médiateurs chimiques d'une interaction a « timidement » augmenté ces dernières années. Les organismes étudiés sont majoritairement des organismes sessiles, les octocoralliaires et les éponges ayant suscité le plus d'intérêt (Figure 1.4).

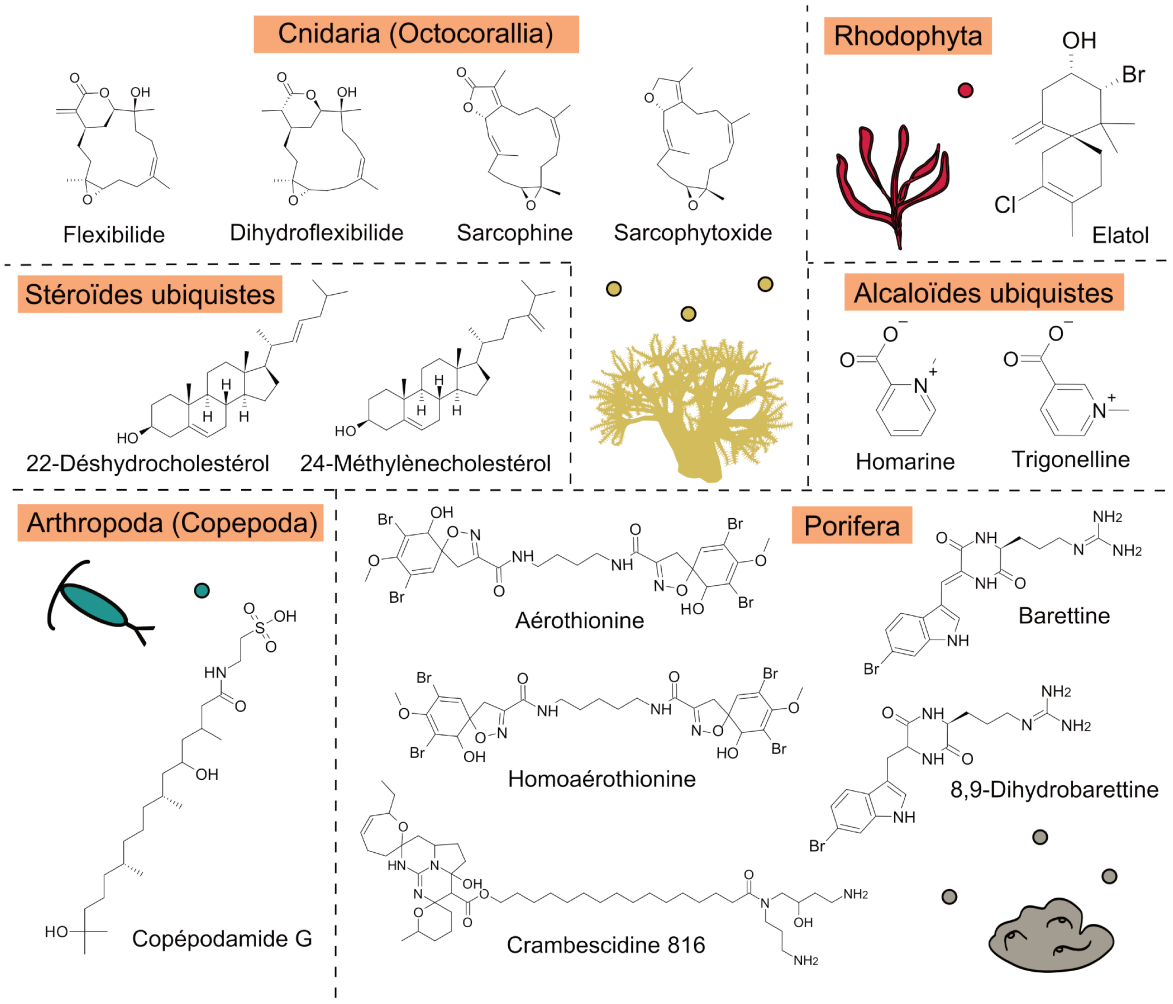


Figure 1.4 : Exemples de molécules identifiées comme étant libérées par les organismes marins en référence au tableau 1

Les exométabolites décrits dans ces études appartiennent à différentes classes chimiques tels que des alcaloïdes, des terpénoïdes, des peptides et des acides gras et interviennent majoritairement dans des mécanismes de défense, de signalisation et de sélection/reconnaissance de l'habitat. Deux méthodes d'analyse ont été employées pour mettre en évidence la nature et la fonction des exométabolites étudiés :

- Une première méthode dite « ciblée », peut être employée lorsque la caractérisation de l'exométabolome d'un individu a abouti à l'identification formelle de la structure chimique des exométabolites susceptibles d'être impliqués dans une interaction (Coll et al., 1982 ; Walker et al., 1985 ; Duque et al., 2001). Cette identification peut se faire par purification préalable de composés provenant de la biomasse (Coll et al., 1982 ; Selander et al., 2015 ; Ternon et al.,

2016 ; Nocchi et al., 2017) ou via l'utilisation de standards commerciaux (Sjögren et al., 2011 ; Poulin et al., 2018). L'identification structurale des molécules purifiées est ensuite réalisée en combinant les analyses spectroscopiques (RMN) et spectrométrique (acquisition des spectres HR-MS) (Selander et al., 2015 ; Nocchi et al., 2017 ; Poulin et al., 2018). Une fois les bonnes conditions de dilution fixées, leur potentielle bioactivité dans le cadre d'une interaction chimique, peut être testée.

Par exemple, Weissburg et al. (2016) ont montré que le crabe de vase *Panopeus herbstii,* détectait la présence du crabe bleu prédateur *Callinectus sapidus* grâce à des signaux chimiques présents dans son urine. Parmi eux, la trigonelline et l'homarine ont été purifiés et testés seuls ou en mélange sur le comportement d'alimentation des crabes de vase (Poulin et al., 2018). Dans les deux cas, la présence de ces signaux a alerté les crabes de vase de la présence de crabes bleus à proximité. Les crabes de vase ont alors modifié leur comportement pour éviter de se faire repérer (Figure 1.5).

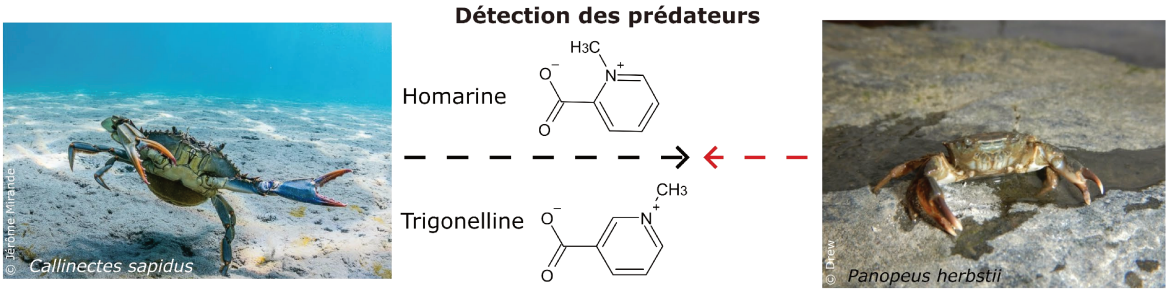


Figure 1.5 : Structure des exométabolites identifiés comme signaux de signalisation de la présence du prédateur Callinectes sapidus *(crabe bleu) par* Panopeus herbstii *(crabe de vase).*
Images : Licence CC BY-NC 4.0. Les flèches symbolisent le sens de l'interaction.

De manière intéressante, ces deux composés ubiquistes sont aussi des exométabolites de l'octocoralliaire *Gersemia antarctica* (Slattery et al., 1997). Dans leur étude, Slattery et al. ont montré que ces molécules possèdent aussi une activité antibactérienne contre les genres *Alteromonas* sp., *Moraxella* sp. et *Psychrobacter,* impliqués dans la formation de biofilm précédant le biofouling.

Une série d'exométabolites spécialisés de l'éponge *Crambe crambe* a été étudiée par Ternon et al. (2016). La cytotoxicité de la crambescidine 816 (C816) ainsi que la crambescine A2-462 a été mesurée sur le développement embryonnaire d'une ascidie méditerranéenne *Phallusia mammillata* (Figure 1.6). Leurs expériences ont montré que ces composés avaient un effet tératogénique sur le développement embryonnaire des jeunes ascidies. Bien que ces deux espèces ne soient pas sympatriques, on peut supposer que les molécules cytotoxiques libérées par l'éponge joueraient un rôle de défense contre les compétiteurs, contribuant ainsi à expliquer le succès écologique de *Crambe crambe* (Duran et al., 2004 ; Ternon et al., 2016).

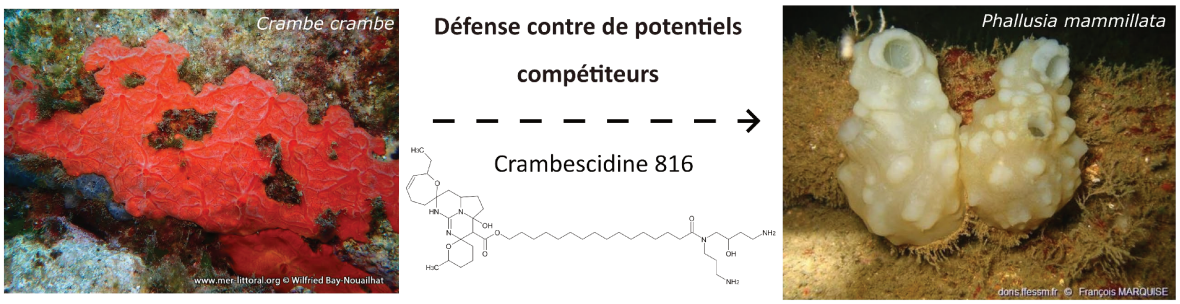


Figure 1.6 : Structure de la crambescidine 816, identifiée comme un exométabolite participant à la défense de l'éponge C. crambe *contre les compétiteurs potentiels tels que l'ascidie* Phallusia mammillata. *La flèche symbolise le sens de l'interaction.*

- Le second type de méthode consiste à évaluer une réponse biologique ou comportementale dans des conditions d'eau de mer de composition chimique *a priori* inconnue. En fonction de la réponse observée, il s'agit ensuite de mettre en évidence des marqueurs chimiques potentiellement impliqués dans une interaction (Santonja et al., 2018 ; Quinlan et al., 2023 ; Derrien et al., 2024a) par annotation spectrale et déréplication (*i.e.* identification de molécules connues par recherche de correspondances spectrales dans les banques de données disponibles et dans la littérature). Ces auteurs ont ainsi pu proposer des composés candidats appartenant à la classe des peptides, des lipides et des diterpènes.

  Ces analyses métabolomiques non ciblées permettent de formuler des hypothèses et de viser des molécules possiblement bioactives, dont l'identité est proposée avec un certain niveau de confiance (Schymanski et al., 2014). Toutefois, elles nécessitent une seconde phase de confirmation des propriétés biologiques mesurées avec les molécules purifiées, ou du moins, concentrées dans une fraction enrichie. Cependant, cette seconde étape reste aujourd'hui rarement exécutée car elle nécessite : (1) d'extraire ou de concentrer une quantité suffisante d'exométabolites afin de pouvoir assurer la purification des molécules ciblées, (2) de connaître les concentrations associées à l'activité mesurée pour ces molécules dans l'eau de mer, (3) mais aussi les conditions dans lesquelles ces molécules doivent être rediluées (en considérant les pertes par biodégradation, l'homogénéité d'une dilution dans un large volume ou les effets de bords). Cette étape de confirmation des propriétes biologiques des molécules en milieu marin se ferait donc préférablement avec des composés commerciaux, et/ou disponibles en large quantité (> 1 g, comme c'est le cas de la trigonelline par exemple).

  La démocratisation des analyses métabolomiques par spectrométrie de masse a permis une avancée significative des connaissances sur la composition chimique de l'eau de mer. Aujourd'hui, seules quelques études ont cherché à décrypter la complexité du pool d'exométabolites qui, en dehors des nutriments, peut régir des interactions biotiques.

Par conséquent, au regard de la diversité des espèces benthiques, de multiples efforts de recherche restent encore à fournir pour approfondir les connaissances de l'espace chimique dans les océans. Il est nécessaire de passer d'une considération de l'organisation de l'écosystème, basée sur des relations trophiques, à une compréhension plus complète. Ainsi, cette caractérisation devrait prendre en compte d'autres processus fonctionnels, telle que la médiation chimique, qui est aujourd'hui reconnue comme un service écosystémique inestimable sur terre (Parachnowitsch & Manson, 2015). L'amélioration des connaissances sur le fonctionnement des écosystèmes marins doit se faire en plusieurs étapes, depuis des études de cas en conditions contrôlées (*e.g*. Santonja et al., 2018 ; Mauduit et al., 2022) jusqu'à des mesures *in situ* en commençant par des écosystèmes relativement stables.

1.2 Les grottes sous-marines

1.2.1 Définitions

La mer Méditerranée est considérée comme un hotspot mondial de biodiversité, abritant environ 10 % des espèces marines répertoriées dans les océans du monde (Bianchi & Morri, 2000 ; Coll et al., 2010). Parmi les écosystèmes remarquables présents dans cet "océan miniature" (Lejeusne et al., 2010), les grottes sous-marines constituent de véritables réservoirs de biodiversité, avec plus de 2300 taxons répertoriés en 2021 (Gerovasileiou & Bianchi, 2021) et un grand nombre encore à décrire. Ainsi, les grottes sous-marines comptent parmi les habitats remarquables répertoriés par la Directive Habitats de l'UE (92/43/CEE, type d'habitat 8330).

Actuellement, 3000 grottes sous-marines ont été recensées en Méditerranée (Giakoumi et al., 2013). Elles sont surtout localisées sur la côte Nord de la Méditerranée (Figure 1.7), mais très peu ont fait l'objet d'études approfondies.



Figure 1.7: ***(A)*** *Distribution des grottes sous-marines recensées en Méditerranée. (Image provenant de Gerovasileiou & Bianchi, 2021).*

En 1949, Pérès & Picard ont fourni la première esquisse d'une description des biocénoses des grottes, et depuis, plusieurs études ont révélé une biodiversité unique, composée parfois d'espèces rares, exclusives et/ou d'espèces des grands fonds (Harmelin et al., 1985 ; Vacelet et al., 1995 ; 1996).

Les grottes sont des habitats fragmentés qui hébergent des communautés peu résilientes, et donc plus sensibles aux perturbations à grande échelle. La biodiversité des grottes sous-marines est aujourd'hui menacée par les changements globaux tels que le réchauffement climatique et l'augmentation de l'occurrence des vagues de chaleur sous-marine. Ces dernières représentent le principal risque environnemental (Parravicini et al., 2010 ; Garrabou et al., 2022). En effet, elles déclenchent des événements de mortalité massive impactant les principales composantes benthiques des communautés tels que les éponges, les anthozoaires, les bryozoaires mais aussi les ascidies (Pérez et al., 2000, 2003 ; Garrabou et al., 2009, 2022). Par exemple, les éponges *Petrosia ficiformis*, *Ircinia* spp, *Dysideidae* spp, *Spongia officinalis* et le corail rouge *Corallium rubrum* comptent parmi les espèces d'entrées de grottes régulièrement affectées par ces vagues de chaleurs (Perez et al., 2000 ; Garrabou et al., 2009 ; Grenier et al., 2023). Chez les espèces mobiles, les populations de mysidacés *Hemimysis speluncola* ont quasiment disparu des grottes de la région marseillaise, suite aux vagues de chaleurs répétées de 1997 et 1999 (Chevaldonné & Lejeusne, 2003). Face à ces menaces et à leurs conséquences, il est important de mesurer l'influence de ces changements de biodiversité sur le fonctionnement de cet écosystème.

1.2.2 Environnement cavernicole

Le terme « grotte » est généralement utilisé pour décrire une ouverture dans une cavité naturelle souterraine ou sous-marine, qui est suffisamment grande pour qu'un être humain puisse y pénétrer (Gunn, 2004 ; Romero, 2009).

La plupart des grottes sous-marines, particulièrement en Provence, sont creusées dans le calcaire Urgonien et résultent des phénomènes de dissolution karstique (Pouliquen, 1972). De nombreuses grottes présentent encore aujourd'hui des zones de résurgences d'eau douce, plus ou moins actives et intenses. Les grottes peuvent résulter d'autres processus géologiques tels que l'érosion éolienne, les processus de fracturation ou d'effondrement, mais ces cas-là sont plus rares. Suite à la montée du niveau de la mer, certaines de ces cavités se sont retrouvées ennoyées, la présence de stalagmites dans certaines d'entre elles témoignant de leur passé aérien. L'action mécanique des vagues contribue également à (re)modeler la configuration des grottes (Riedl, 1966).

Parmi les grottes immergées, on distingue les **grottes aveugles** (à une seule entrée) se terminant en cul-de-sac, des **tunnels** qui s'ouvrent sur des entrées à deux extrémités ou plus (Riedl, 1966). Le profil topographique rentre dans la particularité morphologique des grottes. On distingue les grottes à profil ascendant (le fond est moins profond que l'entrée), les grottes au profil descendant (le fond est plus profond que l'entrée) et les grottes dont la profondeur ne varie quasiment pas entre le fond et l'entrée.

La profondeur, le degré d'immersion et la morphologie déterminent les conditions de luminosité et d'hydrodynamisme à l'intérieur des grottes. Les grottes médiolittorales reçoivent davantage de lumière que les grottes complétement immergées, plus profondes. Elles sont en revanche, confrontées à des conditions hydrodynamiques intenses, rythmées par le cycle des marées et les conditions météorologiques. Au contraire, les grottes plus profondes sont davantage protégées des effets de la houle. Les tunnels, du fait de leurs entrées multiples, bénéficient d'une meilleure pénétration de la lumière et d'un brassage de l'eau plus important que les grottes aveugles.

La morphologie de la grotte ainsi que son exposition à l'hydrodynamisme influencent le type de dépôt sédimentaire dans les grottes. Au regard de la granulométrie du sédiment, on peut ainsi avoir une idée du niveau d'hydrodynamisme local. Par exemple, un sol recouvert de particules très fines (limon, vase) témoignera d'un très faible hydrodynamisme alors que la présence de sédiments grossiers (galets, blocs de roche) résulte d'importants mouvements d'eau occasionnels.

Le profil topographique de la grotte peut entrainer un gradient thermique. Les parties terminales des grottes au profil ascendant connaissent en hiver des températures un peu plus élevées que l'eau extérieure (Harmelin, 1969 ; Pouliquen, 1969, 1972 ; Passelaigue & Bourdillon, 1985). En été, l'inverse est observé pour les grottes à profil descendant : la température de l'eau est plus froide dans les parties terminales de ces grottes qu'à l'extérieur. Par exemple, la température dans la partie terminale de la grotte des 3PP reste quasiment constante toute l'année (12.8 à 14.5°C) alors qu'à l'extérieur de la grotte, elle oscille entre 13 et 24.7° C (Vacelet et al., 1994 ; Harmelin & Vacelet, 1997).

Dans la présente étude, les grottes sélectionnées sont toutes entièrement submergées et 3 d'entre elles sont de type « aveugle ». La quatrième grotte bénéficie de 2 entrées, bien qu'elle dispose malgré tout de plusieurs parties complètement obscures. Deux d'entre elles ont un profil plutôt ascendant, l'une d'elle a une profondeur plutôt constante, voire légèrement descendante dans sa partie obscure, tandis que la dernière a un profil clairement descendant.

Les grottes sous-marines sont le siège de plusieurs gradients environnementaux, souvent superposés. Le premier de ces gradients est évidemment un **gradient de lumière**. D'après Passelaigue (1989), dans une grotte littorale de la région marseillaise située à 15 m de fond, l'intensité lumineuse à 50 m de l'entrée est similaire à celle de 400 m de profondeur dans l'océan ouvert. Selon l'orientation de l'entrée de la grotte par rapport au soleil, sa profondeur, et sa géomorphologie, l'obscurité totale peut être atteinte très rapidement, à seulement quelques mètres de l'entrée (Morri et al., 1994). A l'intérieur, les mouvements de l'eau sont fortement réduits, les temps de résidence de l'eau de mer allant d'un jour à l'entrée à plus de 8 jours dans les parties terminales de certaines grottes aveugles (Fichez, 1991).

La faible luminosité limite la production primaire via la photosynthèse et donc la quantité de matière organique autochtone disponible pour l'alimentation des organismes hétérotrophes (Morri et al., 1994). Les apports de matière organique sont donc majoritairement d'origine allochtone et dépendent des mouvements d'eau vers l'intérieur de la grotte (Bianchi & Morri, 1994). Ainsi, les **gradients de lumière et d'hydrodynamisme** sont à l'origine d'un gradient en apports de matière organique de l'entrée vers le fond de grotte (Bianchi et al., 2003). Les travaux de Fichez (1989) et Morri et al. (1994) montrent également une diminution de la qualité nutritive de la matière organique particulaire en suspension en fond de grotte. Elle s'évalue notamment en calculant le rapport Carbone total / Azote total de la matière organique. Plus le rapport est élevé, moins l'apport est nutritif. Les aliments à forte teneur en carbone et à faible teneur en azote (*e.g.* les sucres/carbohydrates) sont ainsi moins nutritifs que les aliments plus riches en azote (*e.g.* les protéines). Ces conditions d'appauvrissement de la

quantité et de la qualité de la nourriture génèrent une **oligotrophie** extrême en fond de grotte et similaire à celle retrouvée dans les zones bathyales et abyssales (Harmelin et al., 1985). Ce gradient d'oligotrophie est doublé d'un gradient de propagules, représentant la capacité des colonisateurs venant de l'extérieur à s'établir en fond de grotte.

L'ensemble de ces gradients se résume en un **gradient de confinement** horizontal entrainant une zonation de la biodiversité, de moins en moins riche et abondante au fur et à mesure que l'on s'enfonce dans la grotte (Balduzzi et al., 1989 ; Morri et al., 1994 ; Harmelin, et al., 1985 ; Bussotti et al., 2006).

1.2.3 Biodiversité des grottes sous-marines

Les gradients environnementaux de l'entrée vers le fond des grottes sont à l'origine d'un gradient de biodiversité benthique, modulant la distribution de la biodiversité le long d'une zonation souvent horizontale. De l'entrée vers le fond, les nombreuses formes colorées, massives et à croissance érigée présentes à l'entrée sont progressivement remplacées par des spécimens moins colorés à blancs, encroûtants et de moins en moins fréquents vers le fond (Harmelin et al., 1985) (Figure 1.8).

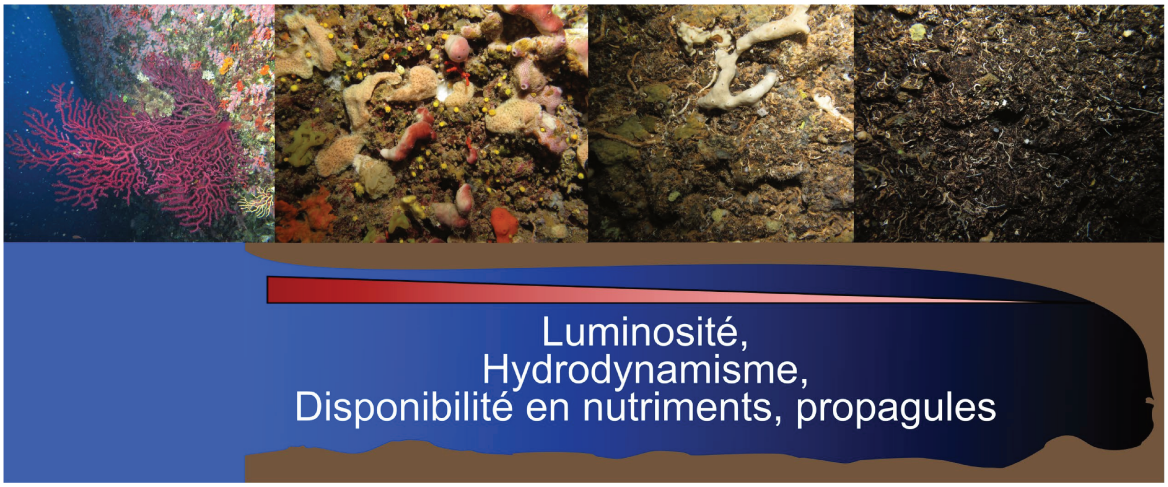


Figure 1.8 : Le gradient de biodiversité fixée est conditionné par le gradient de conditions environnementales ainsi que par la capacité des propagules à atteindre le fond des grottes.

Les conditions d'obscurité régnant dans les grottes limitent l'installation d'organismes photosynthétiques favorisant ainsi l'installation des animaux fixés tels que les spongiaires, les cnidaires, les ascidies et les bryozoaires. Le long de ce gradient, les éponges dominent l'assemblage benthique en biomasse et en richesse spécifique (Harmelin et al., 1985). Ces patrons de biodiversité ont premièrement été mis en évidence dans des études pionnières des grottes de la région de Marseille (Laborel & Vacelet, 1958 ; Harmelin et al., 1985) et depuis, l'exploration d'autres grottes, dans différentes régions du monde, témoigne de l'universalité de

cette organisation (Vasseur, 1984 ; Bianchi & Morri, 1994 ; Harmelin et al., 2003 ; Pérez et al., 2016 ; Dimarchopoulou et al., 2018).

A chaque extrémité de ce gradient de confinement, on distingue deux biocénoses ou communautés aux biodiversités très contrastées : la **communauté des grottes semi-obscures (GSO)** près de l'entrée, qui reçoit encore de la lumière et les apports nutritifs de l'océan ouvert et la **communauté des grottes obscures (GO)** vers le fond (Pérès & Picard, 1964) (Figure 1.9).

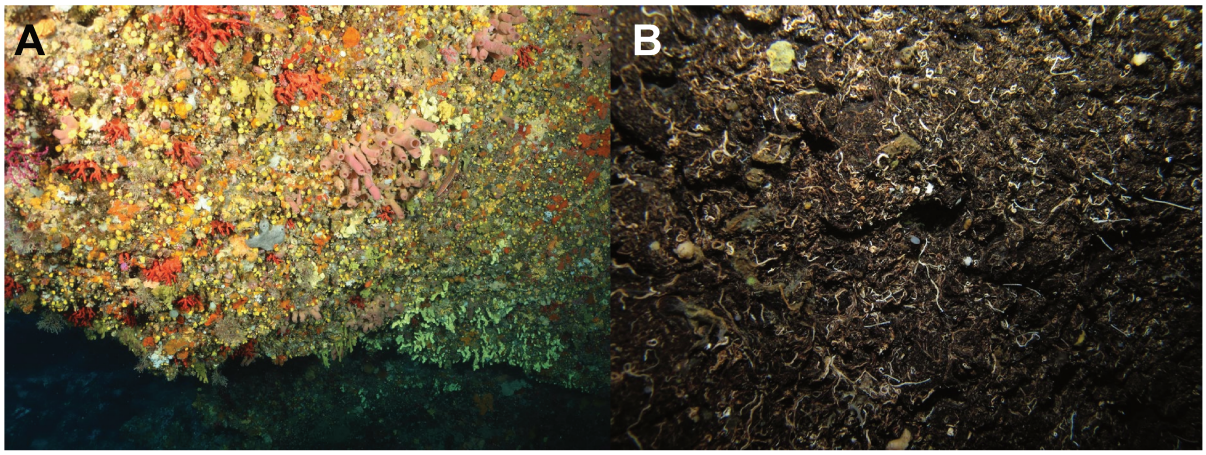


*Figure 1.8: **(A)** photo d'une communauté de grotte semi-obscure dominée par les éponges et les coraux et **(B)** photo d'une communauté de grotte obscure où l'on remarque la présence de vers serpulidés et de quelques individus d'éponges, superposés à de discrets et sombres nodules de bryozoaires.*

1.2.3.1 La communauté des Grottes Semi-Obscures (GSO)

Dans certaines entrées de grottes, on observe encore des gorgones, des hydrozoaires et des macroalgues. La communauté des GSO débute juste après et se caractérise par une biodiversité luxuriante et colorée, composée majoritairement d'éponges, d'anthozoaires et de bryozoaires (Pérès & Picard, 1949 ; Harmelin et al., 1985 ; Laborel & Vacelet, 1958). La couverture benthique atteint 100 % et les espèces que l'on retrouve ici sont souvent partagées avec les communautés adjacentes de l'extérieur (*e.g.* le coralligène).

Les **éponges** représentent le groupe taxonomique majoritaire, soit au moins 50 % de l'assemblage benthique (Corriero et al., 2000 ; Digenis et al., 2022, voir Chapitre 2). Une liste de 61 espèces d'éponges représentatives de ces communautés dans la région Marseillaise a été proposée par Grenier et al. (2018). Parmi ces espèces, on retrouve assez communément en Méditerranée occidentale les démosponges *Agelas oroides, Axinella damicornis*, *Crella pulvinar*, *Dendroxea lenis*, *Diplastrella bistellata, Haliclona mucosa, Ircinia variabilis, Petrosia ficiformis* et *Pleraplysilla spinifera,* ainsi que les homoscléromorphes *Oscarella tuberculata et Plakina jani* (Grenier et al., 2018) (Figure 1.10).

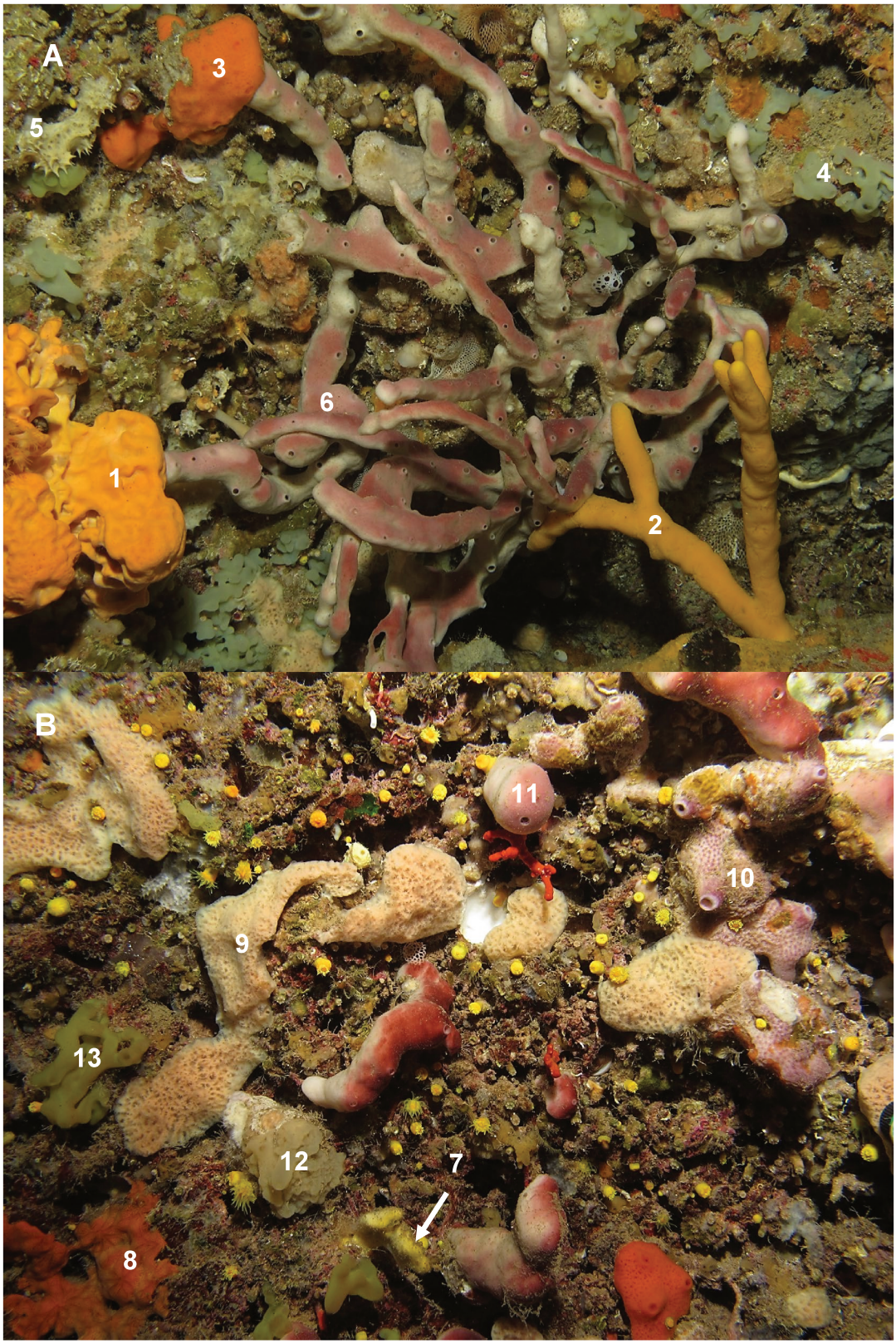


Figure 1.10 : Photos d'assemblage d'éponges caractéristiques de la communauté GSO. ***(A)*** *(1)* Agelas oroides, *(2)* Axinella polyploides, *(3)* Haliclona fulva, *(4)* Oscarella sp., *(5)* Pleraplysilla spinifera *et (6)* Petrosia ficiformis. ***(B)*** *(7)* Axinella damicornis, *(8)* Spirastrella cunctatrix, *(9)* Haliclona mucosa, *(10)* Ircinia variabilis, *(11)* Petrosia ficiformis, *(12)* Oscarella balibaloi *et (13)* Oscarella tuberculata.

Trois faciès à **anthozoaires** sont caractéristiques de la biocénose des grottes semi-obscures, (Pérès, 1967 ; Zibrowius 1978) : **(1)** le faciès à scléractiniaires, tels que *Leptopsammia pruvoti* ou *Caryophyllia inornata* **(2)** le faciès à corail rouge *Corallium rubrum,* fréquemment retrouvé tapissant le plafond des grottes (Figure 1.11) **(3)** le faciès à *Parazoanthus axinellae* plutôt présent dans les zones à fort hydrodynamisme, comme les tunnels.

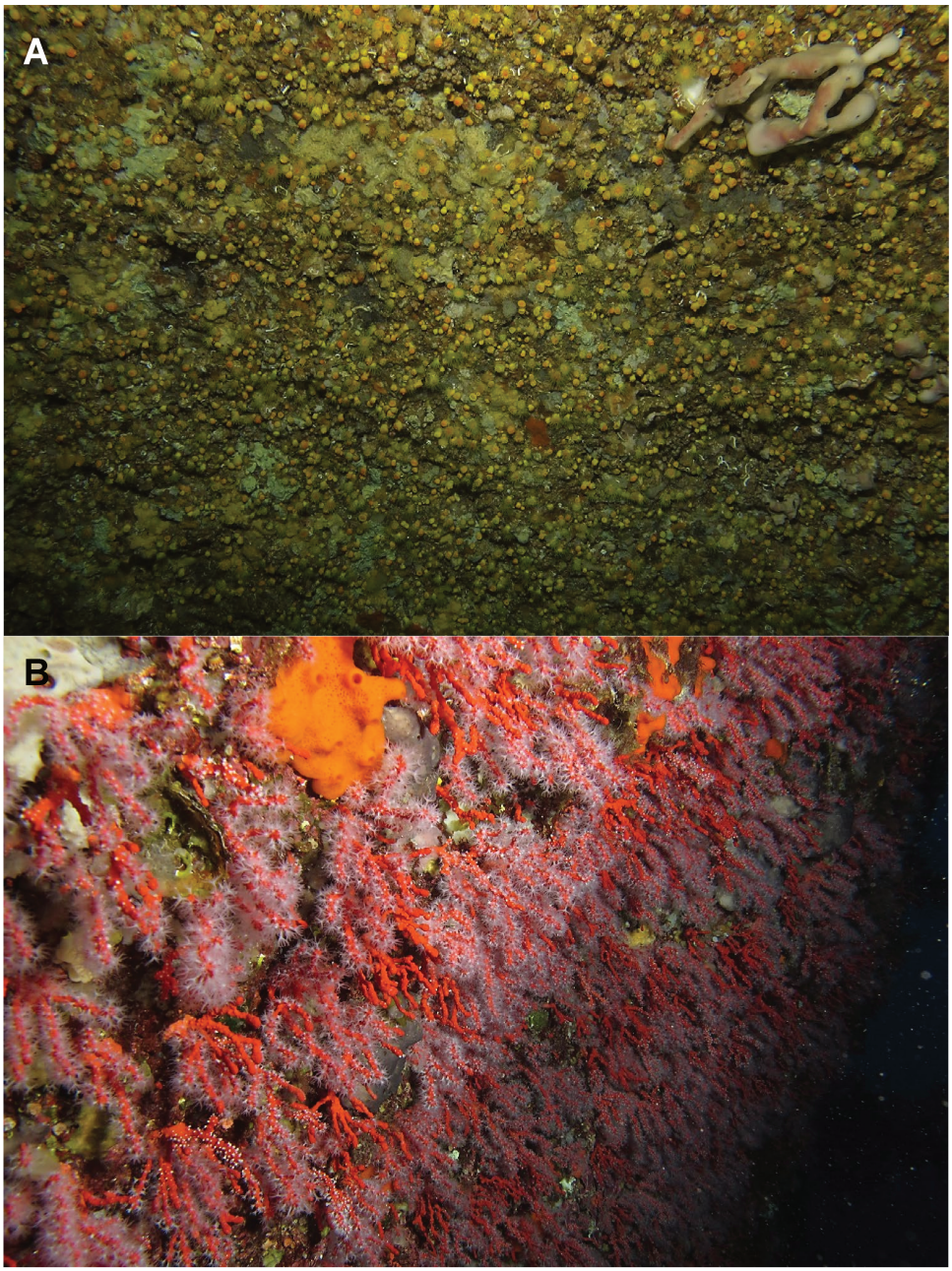


Figure 1.9 : Faciès à ***(A)*** Leptopsammia pruvoti *et à* ***(B)*** *corail rouge sur la paroi de la grotte du Figuier en communauté GSO.*

Parmi ces espèces, le corail rouge est exclusivement retrouvé dans la communauté GSO, alors que quelques individus de *Leptopsammia pruvoti* peuvent être signalés dans la communauté GO. Des faciès à **bryozoaires** érigés (*Adeonella* spp. et *Reteporella* spp.) peuvent également se développer dans cette biocénose (Pérès, 1967 ; Ros et al. 1985).

Dans cette partie des grottes, la faune mobile est majoritairement représentée par des crustacés et des poissons (Harmelin, 1994 ; Bussotti et al., 2003 ; Bussotti & Guidetti, 2009 ; Rastorgueff et al., 2011 ; Bianchi et al., 2022 ; P. Chevaldonné, communication personnelle) (Figure 1.12). La plupart utilise la grotte de manière temporaire pour s'y protéger le jour durant. Les **mysidacés** *Hemimysis lamornae mediterranea* et *Siriella gracilipes* sont des espèces sciaphiles que l'on retrouve communément à l'entrée des grottes. La langouste *Palinurus elephas,* les crevettes cavernicoles rouges (*Lysmata seticaudata* et *L. nilita)* et la grande crevette rose *(Palaemon serratus)* font partie des **crustacés décapodes** les plus retrouvés en GSO, mais elles peuvent également être signalées dans les écosystèmes extérieurs rocheux et ombragés. L'apogon *Apogon imberbis,* le barbier *Anthias anthias* sont des **poissons** qui affectionnent particulièrement les entrées de grotte, mais aussi les anfractuosités et les tombants rocheux. On retrouve également des gobies dont le gobie léopard (*Thorogobius ephipiatus*) et le gobie nain (*Corcyrogobius lichtensteini)* qui sont des espèces plus typiquement cavernicoles.

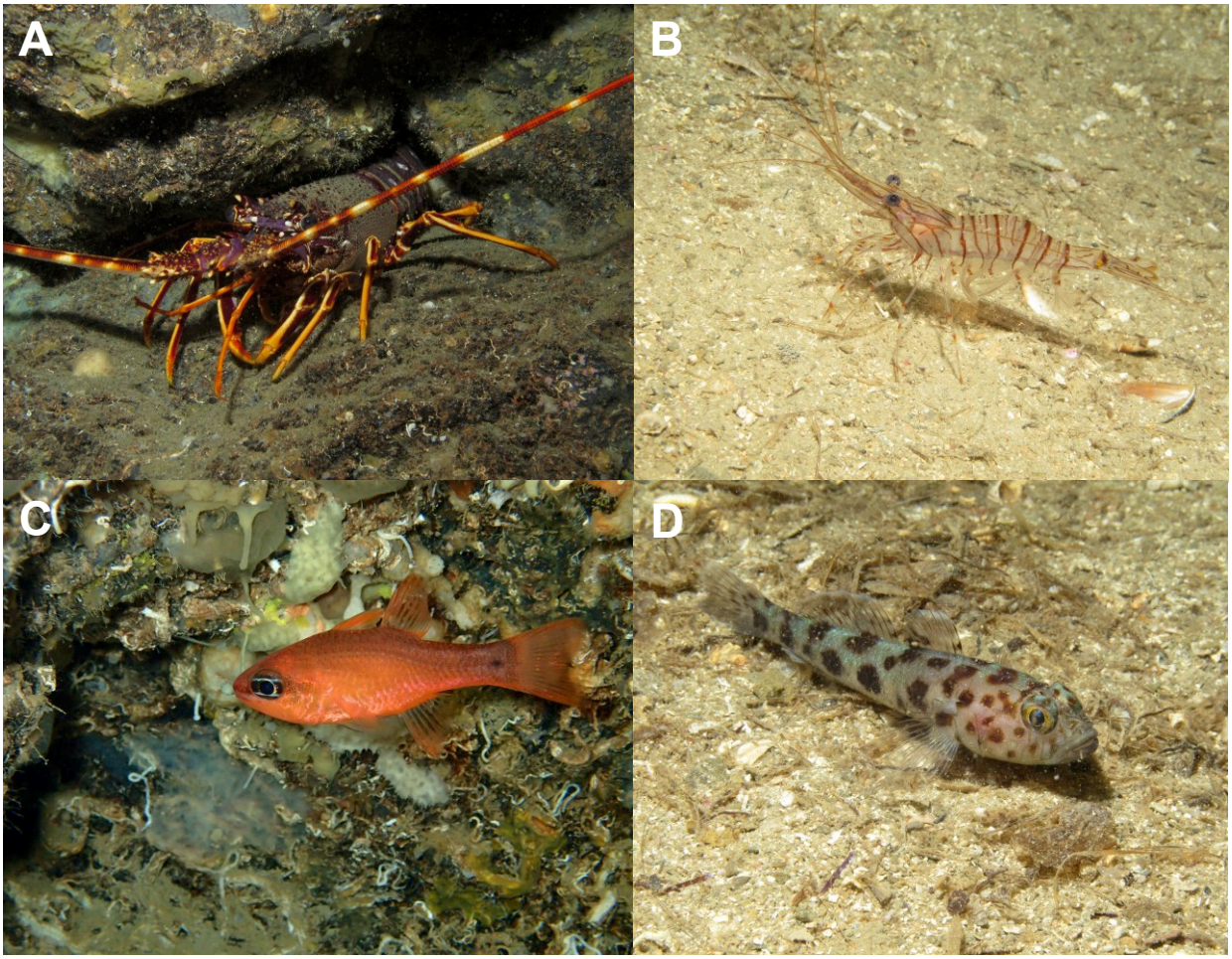


Figure 1.10 : Photos d'organismes mobiles caractéristiques de la communauté GSO. (A) la langouste (Palinurus elephas), *(B) la grande crevette rose* (Palaemon serratus), *(C) l'apogon* (Apogon imberbis) *et (D) le gobie léopard* (Thorogobius ephipiatus).

1.2.3.2 La communauté des Grottes Obscures (GO)

En GO, la couverture benthique peut être inférieure à 10 %. La richesse spécifique et la biomasse diminuent considérablement. La biodiversité sessile se limite généralement à des éponges encroûtantes, à des vers serpulidés et à quelques bryozoaires (Pérès, 1967 ; Laborel & Vacelet, 1959 ; Vacelet, 1976 ; Harmelin et al., 1985). Parmi les **éponges** les plus caractéristiques de GO, on recense *Petrobiona massiliana* et *Penares* spp. (Pérès, 1967, Gerovasileiou & Voultsiadou, 2012) (Figure 1.13A). Dans les grottes d'eaux froides (*e.g.* grotte des 3PP), on retrouve certaines espèces des profondeurs bathyales ou abyssales, telles que l'éponge hexactinellide *Oopsacas minuta* et l'éponge carnivore *Lycopodina hypogea* (Harmelin et al., 1985 ; Vacelet et al., 1994 ; Bakran-Petricioli et al., 2007) (Figure 1.13B et 1.13C). En GO, on retrouve aussi des morphotypes décolorés et de plus petites tailles, d'espèces communes des GSO, voire même d'autres écosystèmes. C'est le cas par exemple de *Diplastrella bistellata, Haliclona mucosa* et *Petrosia ficiformis*.



Figure 1.11 : Photos de 3 espèces d'éponges caractéristiques de la communauté GO. (A) Petrobiona massiliana*, (B)* Oopsacas minuta *et (C)* Lycopodina hypogea*.*

Les **polychètes serpulidés** font partie des organismes dominants des GO, les espèces les plus communes étant *Filogranula annulata*, *Janita fimbriata*, *Metavermilia multicristata*, *Serpula cavernicola*, *Spiraserpula massiliensis* et *Vermiliopsis monodiscus* (Zibrowius 1968 ; Sanfilippo & Mòllica 2000 ; Bianchi & Sanfilippo 2003).

Dans les GO, on retrouve aussi des espèces mobiles inféodées à cette communauté (Bussotti & Guidetti, 2009 ; Rastorgueff et al., 2011 ; Bianchi et al., 2022). Les **mysidacés**, *Hemimysis margalefi* et *H. speluncola,* forment de gros essaims orangés, de milliers d'individus et affectionnent particulièrement les recoins des GO (Figure 1.14A). Leur présence (et dominance) dans les grottes dépend de leur tolérance à l'augmentation de la température de l'eau. Ces espèces ont la particularité d'effectuer des migrations nycthémérales entre l'intérieur et l'extérieur des grottes, profitant de la nuit pour aller se nourrir à l'extérieur de la grotte et éviter les prédateurs chassant à vue (Macquart-Moulin & Passelaigue, 1982 ; Passelaigue & Bourdillon, 1986 ; Rastorgueff et al., 2011). Plusieurs études se sont intéressées aux mécanismes de reconnaissance utilisés par les mysidacés pour s'orienter. Les variations de l'intensité lumineuse, de température et de la vitesse du courant font partie des principaux facteurs mis en évidence (Bourdillon & Castelbon, 1983 ; Crouau, 1986 ; Passelaigue & Bourdillon, 1986 ; Riera et al., 1991). Cachés au milieu de ces essaims, on peut parfois trouver des individus solitaires d'une autre espèce de mysidacés, *Harmelinella mariannae* qui est exclusivement cavernicole (Ledoyer, 1989 ; Chevaldonné et al., 2015). La crevette orange *Stenopus spinosus* (Figure 1.14B), l'araignée de mer ridée *Herbstia condyliata* et la Dromie *Dromia personata* sont les **décapodes** les mieux représentés dans cette partie des grottes.

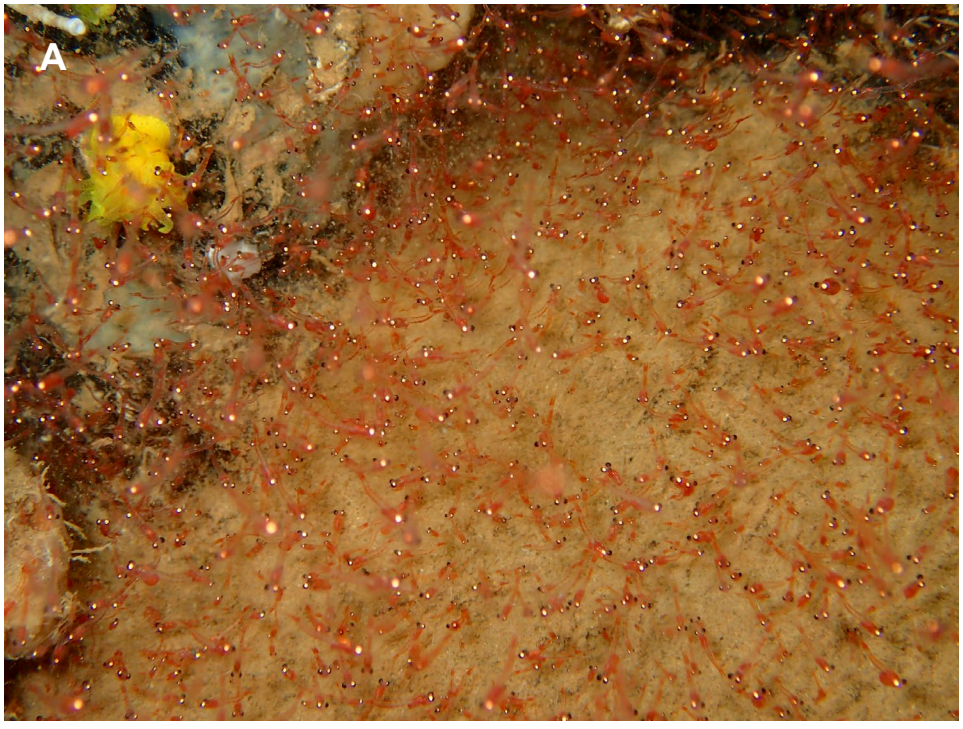




Figure 1.12: Photos de crustacés caractéristiques de la communauté GO. ***(A)*** *un essaim de mysidacés de l'espèce* Hemimysis margalefi *et* ***(B)*** *la crevette orange* (Stenopus spinosus).

Les **poissons** y sont plus rares, *Grammonus ater* étant une espèce fréquemment représentée par quelques individus.

Les grottes abritent des espèces opportunistes qui viennent trouver refuge dans différents recoins de l'habitat. Par exemple, on trouve assez fréquemment un homard au fond d'un boyau obscur, les galatées et cigales de mer sont quant à elles assez fréquentes dans les parties semi-obscures. Les congres, Corbs et beaucoup d'autres espèces de poissons observables dans de nombreux écosystèmes, peuvent aussi temporairement élire domicile dans l'obscurité des grottes (Figure 1.15).



Figure 1.13 : Un congre dans la grotte des 3PP

Bien que l'on distingue les communautés GSO et GO par la composition de leur biodiversité, cette frontière devient perméable quand on considère les relations fonctionnelles entre les différents groupes d'organismes présents dans cet écosystème.

1.2.4 Fonctionnement trophique des grottes sous-marines

Les changements dans la composition des communautés, sur le gradient entrée (semi-obscur) fond (obscur), résultent principalement de la difficulté pour la plupart des espèces à faire face aux fortes conditions d'oligotrophie (Harmelin et al., 1985). Les filtreurs passifs et les carnivores sessiles (cnidaires) sont désavantagés par les faibles apports de nourriture (Balduzzi et al., 1989 ; Fichez, 1990, 1991). Néanmoins, ces organismes cavernicoles peuvent bénéficier de la présence des filtreurs actifs, comme les éponges, qui transforment la matière organique de diverses origines (principalement le bactérioplancton) et la relarguent sous forme de matière organique dissoute (DOM) et particulaire (POM) (sponge loop) biodisponibles pour d'autres organismes (Topçu et al., 2010 ; De Goeij et al., 2013 ; Rix et al., 2018). Les migrations d'organismes mobiles depuis l'extérieur vers l'intérieur, telles que celles opérées par les crustacés ou les poissons, permettent aussi des apports nutritifs, atténuant ainsi les conditions d'oligotrophie (Bussotti et al., 2018 ; Rastorgueff et al., 2011, 2015).

C'est en considérant ces échanges qu'un modèle de fonctionnement des grottes sous-marines, basé sur les relations trophiques entre les organismes des communautés GSO et GO, a été proposé par Rastorgueff et al. (2015) (Figure 1.16).

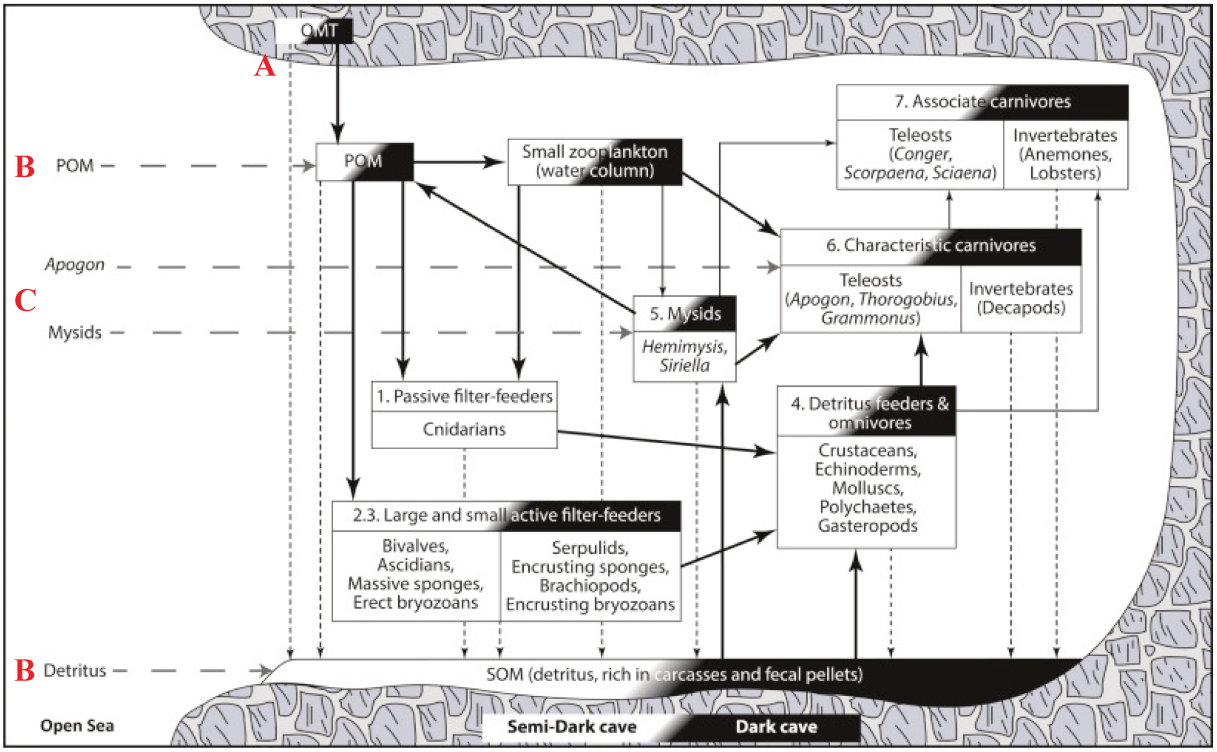


Figure 1.14 : Modèle théorique de la structure et du fonctionnement de l'écosystème des grottes sous-marines de la Méditerranée. La distinction entre les biocénoses des grottes semi-obscures et obscures apparaît dans la tête de chaque composant (cases). Les flèches noires représentent l'intensité des flux de matière organique à travers les différentes composantes : Les flèches noires pleines représentant les principaux flux. Les flèches verticales en pointillés représentent la matière organique atteignant le fond des grottes, telle que la matière organique d'origine terrestre, la matière organique particulaire en suspension (POM), les pelotes fécales et les organismes morts. Les flèches horizontales en pointillés représentent les principaux apports de matière organique dans les grottes, soit par advection due au mouvement de l'eau (pour la POM et les détritus), soit par la migration circadienne des mysidacés et de certains poissons.

Schéma et légende provenant de l'article de Rastorgueff et al., 2015

Du milieu ouvert vers l'entrée des grottes, les apports de matière organique proviennent de diverses origines : **(A)** de la matière organique terrestre qui arrive par percolation de l'eau via les fissures de la roche, **(B)** de la matière organique particulaire en suspension (POM), composée de cellules phytoplanctoniques et de détritus marins ou continentaux amenés par les courants et **(C)** des migrations nycthémérales des mysidacés et des poissons. La matière organique (**A**) et (**B**) est utilisée par le zooplancton, lui-même consommé par les maillons trophiques supérieurs tels que des filtreurs passifs dont les coraux **(case 1)** et des petits carnivores **(cases 5 et 6)**. Le rôle trophique des mysidacés cavernicoles **(case 5)** a particulièrement été bien étudié (Coma et al., 1997 ; Rastorgueff et al., 2011 ; Rastorgueff et al., 2015). Leur présence est une source de nourriture importante, car ce sont des proies consommées par les petits poissons et décapodes de la grotte **(case 6)**, eux même recherchés

par les plus gros poissons et des invertébrés **(case 7).** De plus, la production de pelotes fécales est une source d'alimentation pour les organismes détritivores **(case 4)**.

Par l'intermédiaire de leur activité métabolique, tous les organismes de cet écosystème relarguent de la matière organique dissoute et particulaire. Cet apport représente une source d'alimentation non négligeable qui vient compléter les apports extérieurs et qui permet le succès écologique des éponges dans les grottes. En filtrant jusqu'à 6.5 L/s par kg de matière sèche d'éponge (Weisz et al., 2008) et en réapprovisionnant continuellement l'écosystème en matière organique, les éponges constituent des acteurs clés des courtes chaînes trophiques et des couplages bentho-pélagiques (Bell, 2008).

1.2.5 Les grottes comme modèles d'étude de la médiation chimique en milieu marin

Les écosystèmes des grottes sous-marines permettent de travailler sur des processus plutôt simplifiés par rapport à la mer ouverte, offrant ainsi des conditions expérimentales idéales pour étudier la médiation chimique. Elles bénéficient de conditions environnementales souvent stables, où, au moins en Méditerranée, les mouvements d'eau et les apports nutritifs sont limités. Ces conditions permettent de s'affranchir d'une partie des variations de la composition de l'eau liée à des facteurs externes. De plus, l'obscurité limite le développement des organismes photosynthétiques, dont les biomasses sont soumises à d'importantes variations saisonnières dans les écosystèmes éclairés. Les grottes abritent ainsi des communautés plutôt stables dans le temps, et dominées par les éponges (Harmelin et al., 1985 ; Gerovasileiou & Voultsiadou, 2016). Les éponges sont des organismes très étudiés en chimie des substances naturelles. Elles produisent une grande diversité structurale de molécules, dont certaines sont déjà connues pour être impliquées dans des interactions interspécifiques (Garson, 2002 ; Carroll et al., 2024). A travers leur importante activité de filtration, les éponges relarguent des composés de nature chimique originale et variée, susceptibles de contribuer au paysage chimique et ainsi de médier des interactions à distance (Ashur & Dixson, 2019 ; Mauduit et al., 2023). Santonja et al. (2018) ont notamment montré que les migrations nycthémérales opérées par les mysidacés pouvaient être conditionnées par la présence de composés libérés dans l'eau de mer par des éponges. C'est à la suite de ces premiers constats, que ce projet de recherche a été construit.

1.3. Objectifs généraux de la thèse et organisation du manuscrit

Les travaux d'écologie chimique présentés dans cette introduction se sont principalement concentrés sur l'étude des interactions au sein du compartiment planctonique et benthique et en ciblant les récifs coralliens. Par ailleurs, ils se sont majoritairement intéressés à des interactions de contact (*e.g.* compétition), en se focalisant sur des molécules contenues au sein de l'organisme, plutôt qu'à celles exsudées. Concernant l'identité de ces molécules libérées, la plupart des recherches récemment menées ont plutôt ciblé les métabolites primaires ou petits métabolites polaires (acides aminés et gras, vitamines) afin de mieux décrypter les échanges nutritifs entre différents maillons d'un réseau trophique. Ainsi, en milieu marin, très peu de travaux se sont intéressés aux interactions biotiques à distance et à toute la complexité du paysage chimique environnant, incluant possiblement des métabolites spécialisés.

Mes travaux de thèse visent à mieux comprendre la place et l'importance de la médiation chimique dans le fonctionnement des écosystèmes marins. L'objectif général est de mieux comprendre le rôle fonctionnel des espèces composant les communautés benthiques et leur implication dans les interactions chimiques. Dans un contexte d'environnement changeant, on cherche aussi à mesurer comment une variation de la composition de la biodiversité est susceptible d'influencer la composition du paysage chimique, et donc les interactions biotiques qui en dépendent.

De manière plus détaillée, le premier objectif de la thèse a consisté à étudier la possible corrélation entre la complexité du paysage chimique de l'eau de grotte et la diversité des communautés benthiques. En déployant des suivis de biodiversité et une série de captures de paysages chimiques *in situ*, on a testé l'hypothèse selon laquelle plus la diversité biologique est élevée, plus la composition chimique de l'eau est complexe. Pour se faire, on a premièrement caractérisé la biodiversité benthique de 4 grottes sous-marines de la région marseillaise selon la morphologie et les conditions environnementales de chaque site. Un dispositif de capture *in situ* des exometabolites marins, I-SMEL (In Situ Marine moleculE Logger), a été conçu pour simplifier l'échantillonnage et affiner la diversité chimique de l'eau au voisinage d'espèces benthiques ciblées. Dans une étude preuve de concept, I-SMEL a été déployé sur trois espèces d'éponges modèles de composition chimique connue dans le but de pouvoir démontrer sa capacité à collecter des exométabolites caractéristiques. Cette étude a également permis d'établir un protocole de collecte et de préparation des échantillons pour les analyses métabolomiques. I-SMEL a ensuite été déployé dans les quatre grottes étudiées, au-dessus de

communautés benthiques à la biodiversité contrastée. La diversité chimique de l'eau a ainsi été captée et décortiquée par des analyses métabolomiques basée sur la spectrométrie de masse.

Le deuxième objectif a été d'étudier l'influence des paysages chimiques sur la réponse comportementale d'organismes cavernicoles nageurs. Les déplacements des mysidacés semblaient indiquer une reconnaissance de signaux chimiques produits par des éponges marquant l'entrée de l'habitat (Santonja et al., 2018), ce qu'il fallait confirmer en reproduisant ces expériences avec des eaux cavernicoles, c'est-à-dire des paysages chimiques plus complexes. Par ailleurs, on se posait la question de savoir si cette potentielle reconnaissance orientant les migrations nycthémérales des mysidacés, pouvaient être considérée comme du *homing*, et ainsi être liée à la signature chimique spécifique de l'eau d'une grotte. Pour cela, on a déployé au laboratoire (i) des outils d'écologie comportementale pour mesurer l'influence de différents paysages chimiques sur nos modèles nageurs et (ii) des analyses métabolomiques par spectrométrie de masse pour identifier des marqueurs chimiques de ces différents paysages et potentiellement impliqués dans la fonction de médiation.

La suite du manuscrit de thèse se présente sous la forme de 4 chapitres, présentant chacun un article en lien avec les objectifs énoncés. Chaque chapitre peut être lu indépendamment des autres.

1) Patrons de biodiversité benthique dans les grottes sous-marines

Cette partie comprend les résultats associés à l'analyse des photoquadrats des communautés de grottes semi-obscures (GSO) et grottes obscures (GO) dans 4 grottes sous-marines de la région marseillaise. Les résultats ont été mis en forme pour l'article intitulé « *Patterns of benthic diversity in marine underwater caves of the Marseille Region (France, North-Western Mediterranean Sea) »* et publié en 2024 dans le journal ***Mediterranean Marine Science***. Dans cet article, nous avons comparé la composition et le niveau de diversité des communautés GSO et GO des 4 grottes. De plus, en utilisant une partie des données de l'article de Grenier et al. (2018), nous avons évalué les changements temporels dans les assemblages d'éponges des GSO de ces mêmes grottes pour la période 2015-2020.

2) Développement d'un outil de capture de paysages chimiques sous-marins *in situ* (I-SMEL) pour capter la signature chimique de la biodiversité benthique

Cette partie présente la preuve de concept de l'appareil I-SMEL permettant d'enregistrer rapidement la signature chimique des organismes benthiques au sein du paysage chimique marin.

L'article est intitulé "*In Situ Capture and Real-Time Enrichment of Marine Chemical Diversity"* et a été publié en 2023 dans le journal ***ACS Central Science*.** Dans cette étude, nous avons évalué la capacité d'I-SMEL à capter *in situ* la diversité chimiques des exométabolites marins, en particulier la signature chimique de 3 espèces d'éponges représentatives des communautés cavernicoles.

3) Paysages chimiques marins et possible contribution des communautés benthiques

Cette partie présente les résultats associés aux captures de paysages chimiques réalisés dans l'eau au-dessus des communautés GSO et GO de chaque grotte. A travers cette étude nous avons essayé de déterminer si la diversité des communautés benthiques influençait la composition des paysages chimiques en GSO et GO. Cette partie est rédigée en anglais car elle sera soumise pour publication autour de la soutenance de la thèse.

En complément, des résultats préliminaires d'analyses métabolomiques comparatives sont aussi présentés et concernent le déploiement d'I-SMEL au sein des grottes artificielles immergées il y a juste 20 ans. L'objectif ici est d'étudier les paysages chimiques dans des écosystèmes cavernicoles immatures, c'est à dire où la biodiversité est très faible en comparaison de grottes représentant le climax de cet écosystème. Il s'agira de savoir si l'on détecte déjà la contribution de la biodiversité au paysage chimique et/ou si l'on voit déjà la signature de l'environnement cavernicole.

4) Influence du paysage chimique sur le comportement migratoire de mysidacés cavernicoles

Cette dernière partie présente les résultats des expériences conduites en aquarium pour étudier le rôle fonctionnel des paysages chimiques. L'article intitulé « *Circadian migrations of cave-dwelling crustaceans guided by their home chemical seascape »* publié en 2024 dans le journal ***Frontiers in Marine Science*,** montre que la reconnaissance de l'habitat de deux populations de mysidacés est en fait du *homing* journalier conditionné par la signature spécifique du paysage chimique des grottes. Cette démonstration a été réalisée en combinant des tests de choix, couramment employés en écologie comportementale, et des analyses métabolomiques en spectrométrie de masse des paysages chimiques.

Par la suite, il sera discuté des résultats d'expériences complémentaires ayant eu pour objectif de préciser l'origine et la nature des signaux chimiques potentiellement impliqués dans la réponse des mysidacés. Cette section inclut des tests de redilution des extraits de l'eau de l'une des grottes dans une eau de mer contrôle.

La dernière partie du manuscrit présente les conclusions et perspectives de recherches liées à ce travail. J'aborderais ainsi la possible conséquence des changements de biodiversité dans la composition des paysages chimiques. Il sera également question d'imaginer déployer I-SMEL pour augmenter notre connaissance sur la diversité des paysages chimiques marins, en ciblant des écosystèmes plus complexes et/ou moins accessibles. Cette section présentera aussi des pistes de recherche pour identifier de nouvelles interactions et mesurer l'influence de la médiation chimique dans le fonctionnement de l'écosystème des grottes sous-marines, et plus généralement dans l'Océan.



Chapitre 2

Patrons de diversité benthique dans les grottes de la région de Marseille

2.1. Introduction

L'étude des patrons de diversité benthique dans les grottes sous-marines de la région marseillaise représentait un prérequis indispensable pour ensuite établir un lien potentiel entre la biodiversité des communautés benthiques et la chimiodiversité des paysages chimiques. Il s'agissait de décrire la biodiversité benthique de 4 grottes de la région de Marseille : Les grottes de Méjean, de Jarre, du Figuier et des 3PP.

Cette étude des patrons de diversité benthique devait en particulier distinguer les communautés des Grottes Semi-Obscures (GSO) et des Grottes Obscures (GO), situées aux extrémités d'un gradient allant de l'entrée au fond de ces grottes. Les quatre grottes présentant des géomorphologies différentes, on s'attendait à observer des variations significatives dans la composition de la biodiversité entre les différentes communautés étudiées. Par ailleurs, disposant de données antérieures (Grenier et al., 2018), on supposait pouvoir détecter d'éventuels changements temporels de biodiversité, liés principalement au changement climatique et à l'augmentation de la fréquence des vagues de chaleur (Lejeusne et al., 2010). En effet, la période 2015-2020 correspond aux années les plus chaudes jamais enregistrées en Méditerranée Nord-Occidentale (Garrabou et al., 2022), et au cours de cette thèse, des mortalités massives de certaines éponges vivant à l'entrée des grottes sous-marines ont été enregistrées (Grenier et al., 2023). Ainsi, notre hypothèse était que tout changement significatif de biodiversité pourrait avoir des conséquences mesurables dans la composition du paysage chimique d'un écosystème.

Les résultats de ce travail ont fait l'objet d'un article publié en 2024 :

Derrien M., Chevaldonné P. & Pérez T. (2024) **Pattern of benthic diversity in marine underwater caves of the Marseille Region (France, North-Western Mediterranean Sea)**, *Mediterranean Marine Science.* DOI : 10.12681/mms.38566

2.2. Article : Patrons de diversité benthique dans les grottes de la région de Marseille

Research Article

Mediterranean Marine Science
Indexed in WoS (Web of Science, ISI Thomson) and SCOPUS
www.hcmr.gr
DOI: https://doi.org/10.12681/mms.38566

Patterns of benthic diversity in marine underwater caves of the Marseille Region (France, North-Western Mediterranean Sea)

Marie DERRIEN, Pierre CHEVALDONNÉ and Thierry PÉREZ

IMBE, UMR CNRS 7263, IRD 237, Aix Marseille Université, Avignon Université, Station Marine d'Endoume, Chemin de la batterie des lions, 13007 Marseille, France

Corresponding author: Thierry PÉREZ; thierry.perez@imbe.fr

Contributing Editor: Vasilis GEROVASILEIOU

Received: 02 August 2024; Accepted: 02 October2024; Published online: 30 October 2024

Abstract

Underwater caves are remarkable habitats of the Mediterranean Sea. In the present study, we compare the geomorphology of four underwater caves of the Marseille area and the associated sessile assemblages across two contrasted communities (Semi-Dark and Dark-cave communities). Using a non-destructive method of sampling, photoquadrats of the walls of the caves were performed in 2020 to assess the biodiversity and the structure of these communities. In addition, taking advantage of available reference data from 2015, we evaluate the changes in sponge assemblages for the period 2015-2020, focusing on observations of the Semi-Dark cave community. Our results illustrate how the diversity of environmental settings and cave morphologies shape the benthic community composition of the four caves. In all four caves, the Semi-Dark community is the more diverse and harbours the higher number of species when compared to the Dark community. Each cave presents a different species assemblage with in most cases, distinct dominant species which highlight the singularity of each cave. Moreover, our temporal change assessment demonstrates a critical decrease in sponge species richness for all caves, possibly related to the increasing frequency of marine heatwaves that have occurred in the last decade. Although some species (mostly in the Keratosa subclass) seem to be particularly affected, other species such as *Chondrosia reniformis* appear to have benefitted from the situation. Our findings underline the importance of biodiversity monitoring in a context of a rapidly changing environment, in particular in poorly resilient marine ecosystems such as underwater caves.

Keywords: Benthic biodiversity; Porifera; Photo survey; Underwater cave; Mediterranean Sea.

Introduction

The Mediterranean Sea is a global biodiversity hotspot, harbouring about 10% of the marine species acknowledged in the world ocean (Bianchi & Morri, 2000; Coll *et al.*, 2010). Among the remarkable ecosystems distributed across this miniature ocean, underwater caves represent genuine reservoirs of biodiversity, displaying poorly resilient communities with more than 2300 taxa reported thus far (Gerovasileiou & Bianchi, 2021) and a considerable number of putative taxa remaining to be described. To date, 3000 underwater caves have been recorded in the Mediterranean Sea (Giakoumi *et al.*, 2013) but only a very few have been subjected to extensive investigation. The exploration of these caves began with the popularization of SCUBA diving. Pérès & Picard (1949) provided the first description of cave biocoenoses, and since then several studies have unveiled a unique and teeming biodiversity, frequently composed of rare, exclusive and/or deep-sea species (Harmelin *et al.*, 1985; Vacelet *et al.*, 1995; 1996).

From the entrance to the back of a marine underwater cave, the decrease in both light and water movement leads to a decrease in food supply, which is responsible for a confinement gradient (Harmelin *et al.*, 1985; Bussotti *et al.*, 2006). These conditions explain a benthic biodiversity gradient where the numerous erect growth forms at the entrance of a cave are progressively replaced by more scarce encrusting species as one penetrates towards the back (Harmelin *et al.*, 1985). At both ends of the confinement gradient, two distinct communities can be acknowledged: the Semi-Dark cave community near the entrance, and the Dark cave community at the back (Pérès & Picard, 1964). The boundary between these two communities is often difficult to define. The Semi-Dark cave community (SD) is characterized by the rare occurrence of macroalgae and the dominance of sponges, anthozoans and bryozoans (Harmelin *et al.*, 1985; Laborel & Vacelet, 1958; Grenier *et al.*, 2018), and by a benthic coverage of 100%. In the Dark cave community (D), the benthic coverage can be less than 10%, and the sessile

biodiversity is usually restricted to encrusting sponges and serpulid worms (Pérès 1967; Laborel & Vacelet, 1959; Vacelet *et al.*, 1976). Although the SD biodiversity is rather well described due to its accessibility, the most remote D community remains poorly known.

Sponges are essential members of these communities. As powerful active filter feeders, they are components of short food-webs, feeding on a wide range of microscopic particles and recycling organic materials of various origins (e.g., Topçu *et al.*, 2010). In caves, where most of the food comes from adjacent ecosystems, and primarily from the pelagic system of the open ocean, sponges are considered as keystone participants in benthic-pelagic coupling (Bell, 2008).

Underwater caves figure among the remarkable habitats listed by the EU Habitats Directive (92/43/EEC, Habitat type 8330). Their biodiversity and ecosystem functioning are, however, threatened by global change, with climate warming and the increasing occurrence of marine heatwaves (MHWs) representing the main environmental hazards (Parravicini *et al.*, 2010; Garrabou *et al.*, 2022). These phenomena trigger mass mortality events impacting the main benthic components of the SD community: sponges, anthozoans, bryozoans and also ascidians (see for instance Pérez *et al.*, 2000, 2003; Garrabou *et al.*, 2009, 2022; Lejeusne *et al.*, 2010; Grenier *et al.*, 2023). For example, the sponges *Petrosia ficiformis*, *Ircinia* spp., Dysideidae spp., *Spongia officinalis* and the red coral *Corallium rubrum* count among the SD cave dwellers regularly affected by MHWs (Pérez *et al.*, 2000; Garrabou *et al.*, 2009; Grenier *et al.*, 2023). In the D cave community, such negative impacts also occur, but have so far been thoroughly documented for mobile species only (Chevaldonné & Lejeusne, 2003).

The aim of the present work is to study the patterns of benthic diversity in the SD and D cave communities in the Marseille area using a rapid assessment method. We describe and compare the composition of SD and D communities of four underwater caves of the Marseille area presenting contrasted environmental conditions. Moreover, benefiting from reference data for the SD communities in four caves (Grenier *et al.*, 2018), we also assess temporal changes in biodiversity over a 5-year time frame from 2015 to 2020, which corresponds to the warmest period ever recorded in the NW Mediterranean Sea (Garrabou *et al.*, 2022).

Material and Methods

Study sites & sampling

The four underwater caves studied here, Méjean, Jarre, Figuier and 3PP are located in the Western Mediterranean Sea, in the Marseille region, from the North of the city to the Eastern extremity of the Calanques National Park (Fig. 1). These caves display variable environmental characteristics which shape rather distinct species assemblages.

Sampling was carried out by SCUBA diving using a non-destructive method. Photoquadrats of the walls of the caves were obtained in winter 2020 following the method deployed by Grenier *et al.* (2018). A total of 236 photoquadrats were taken randomly around predetermined points in the SD and D communities of the four caves. Figuier cave benefits from two entrances so sampling of its SD communities was performed in the main entrance, which is the deepest and largest (Table 1). Photoquadrat number varied slightly between sampling stations according to cave geomorphology, particularly in case of narrowness (Table 1).

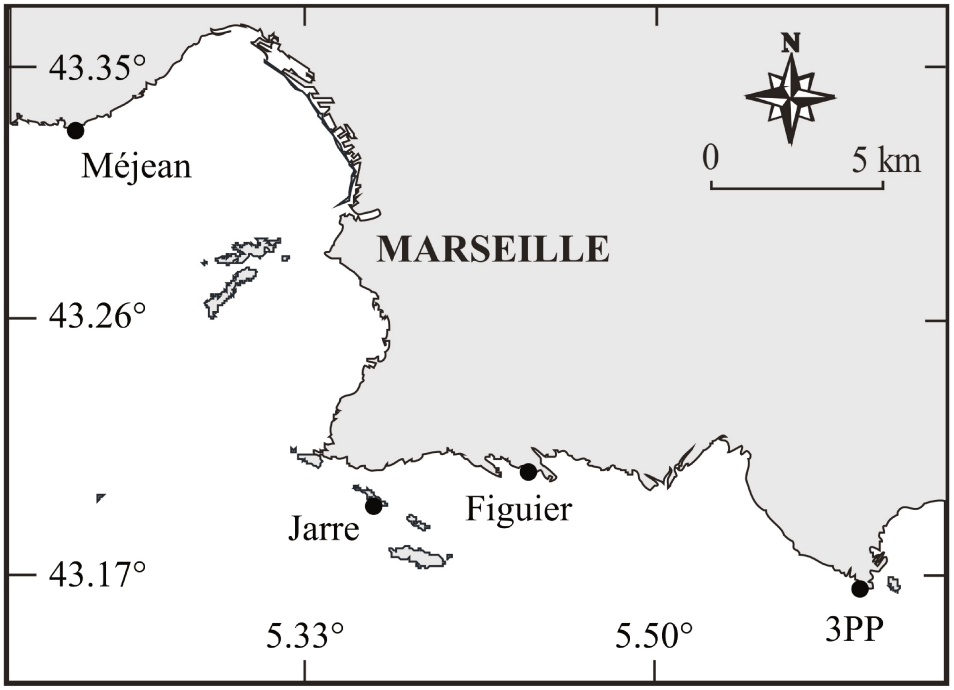


Fig. 1: Location of the four studied caves in the Marseille area (Mediterranean Sea, France) (modified from Chevaldonné & Lejeusne, 2003).

Table 1. Locations of the studied underwater caves and topography of the sampling stations. For each cave, the numbers of photoquadrats is given per station. SD: Semi-Dark community, D: Dark community. * refers to the distance from the main entrance of Figuier, where SD photoquadrats were taken.

Caves	Coordinates	SD			D		
		Depth (m)	Distance from entrance (m)	Number of photoquadrats	Depth (m)	Distance from entrance (m)	Number of photoquadrats
Méjean	43.32800° N, 5.22100° E	15	1-2	24	9	18	33
Jarre	43.19600° N, 5.36570° E	17	1-2	30	18	50	33
Figuier	43.20500° N, 5.44700° E	22	2-5	30	10	45*	32
3PP	43.16300° N, 5.60000° E	15	2-4	33	25	50	21

Photoquadrats analysis

Independently from their taxonomic identification (see below), species present in the photoquadrats were recorded using PhotoQuad, a software dedicated to the analysis of benthic communities (Trygonis & Sini, 2012) and previously used in underwater caves (Gerovasileiou & Voultsiadou, 2016; Digenis *et al.*, 2022). Each photoquadrat was processed by overlaying a virtual quadrat of 20 cm x 20 cm in order to keep the same sampling surface. One hundred points were then randomly distributed in 100 sub-cells of the redefined surface, with 1 point attributed per cell (stratified and random projection method). Each point was assigned either to a taxonomic level (from species to phylum), to a morpho-functional category (e.g., encrusting red algae, epibiont) or to a non-living category (e.g., substrate, mud). An automatic community matrix was generated by PhotoQuad to present the number of points associated to the categories per photo and per sampling station. Of the 123 recorded taxonomic units, 52 were identified to species, genus or family level (Table 2). After photo processing, we obtained 123 distinct taxonomic units that comprise:

- the identified taxa (to species, genus and family) with n = 52 (Table 2);
- the unidentified taxa (e.g., Porifera sp.1, Porifera sp.2, small orange Bryozoa) with n = 63;
- the morpho-functional categories with undetermined taxa (e.g., other non-identified organisms such as other sponges, epibiontic organisms) with n = 8.

In cases where the taxonomic identification of sponges was difficult, additional close-up photos and specimen collection were conducted. Taxonomic analyses were carried out using ad-hoc methods for the Porifera phylum (e.g., Boury-Esnault & Rützler, 1997) to determine a family identification and most often a species name.

Biodiversity measurements

Composition of the communities

All data were analysed with R (v.3.4.0). The matrix exported from PhotoQuad was first cleaned by removing the points associated with non-living categories and by normalizing to 100 the points associated with living categories. The R 'vegan' package (v. 2.5-7, Oksanen *et al.*, 2018) was used to explore the diversity of the communities. The community matrix, with the 123 recorded taxonomic units, was transformed into a Bray-Curtis dissimilarity matrix by using the 'vegdist' function. A PERMANOVA (Adonis2 function, 999 permutations) was performed to test the influence of the degree of confinement (SD vs. D stations) and of the location, as well as their interaction on the community composition.

Calculation of biodiversity indices was performed on the 115 clearly distinct taxonomic units by using the number of points recorded for each. Cumulative species richness was calculated for each station by using the "specaccum" function that determines the taxonomic unit accumulation curves per station by adding the number of new taxonomic unit records quadrat after quadrat. At the end of this process, the total number of "species" (here: taxonomic units or taxa) in a station is obtained. The shape of the cumulative species richness curve gives an indication of the efficiency of the sampling effort, but also an overall picture of the benthic diversity. For instance, in addition to the species richness of the sampling site, the number of quadrats required to reach the asymptote of the curve also gives an indication of the diversity of the benthic community: the fewer the quadrats needed, the faster the sampling saturation, and thus the poorer the diversity of the benthic community. Additionally, the mean species richness (S) (function "spenumber"), the Shannon (H) diversity index (function "diversity") and Pielou's evenness (H / log(S)) were also assessed for each station.

Table 2. Inventory of the 52 identified taxa (species, genus, family) at the study sites and their distribution in the Semi-Dark (SD) and Dark (D) communities. Species in bold are common to the four caves. * distinct morphotypes with unconfirmed species names.

	Méjean		Jarre		Figuier		3PP	
	SD	**D**	**SD**	**D**	**SD**	**D**	**SD**	**D**
Porifera (38)								
Acanthella acuta Schmidt, 1862					X		X	
Agelas oroides (Schmidt, 1864)	X		X		X		X	
Aplysina cavernicola (Vacelet, 1959)			X				X	
Axinella damicornis (Esper, 1794)	X		X		X			
Chondrosia reniformis Nardo, 1847	X				X		X	
Clathrina clathrus (Schmidt, 1864)			X	X			X	
Crella pulvinar (Schmidt, 1868)	X				X	X	X	
Dendroxea lenis (Topsent, 1892)	X		X	X	X	X	X	
Diplastrella bistellata (Schmidt, 1862)	X	X	X	X	X	X	X	
Dysideidae spp.	X		X		X	X	X	
Erylus sp.					X		X	
Eurypon sp.	X		X				X	
Haliclona fulva (Topsent, 1893)			X		X			
Haliclona mucosa (Griessinger, 1971)	X	X	X	X	X	X	X	
Haliclona sp.						X		
Chalinidae sp.		X		X				
Hippospongia communis (Lamarck, 1814)			X				X	
Hymedesmiidae sp.							X	
Ircinia dendroides (Schmidt, 1862)			X				X	
Ircinia oros (Schmidt, 1864)			X					
Ircinia variabilis (Schmidt, 1862)	X		X		X		X	
Lycopodina hypogea (Vacelet & Boury-Esnault, 1996)								X
Merlia deficiens Vacelet, 1980							X	
Myceliospongia araneosa Vacelet & Pérez, 1998				X		X		
Oscarella balibaloi Pérez, Ivanisevic, Dubois, Pedel, Thomas, Tokina & Ereskovsky, 2011			X				X	
Oscarella microlobata Muricy, Boury-Esnault, Bézac & Vacelet, 1996	X							
***Oscarella* spp. (*O. tuberculata* or *O. lobularis*)**	X	X	X	X	X		X	
Penares helleri (Schmidt, 1864)		X		X				
Pleraplysilla spinifera (Schulze, 1879)			X		X		X	
Petrobiona massiliana (Vacelet & Lévi, 1958)		X		X		X	X	
Petrosia ficiformis (Poiret, 1789)	X		X	X	X		X	
Phorbas tenacior (Topsent, 1925)	X		X			X		
Plakina jani Muricy, Boury-Esnault, Bézac & Vacelet, 1998				X	X		X	
Raspaciona aculeata (Johnston, 1842)					X			
Rhabderemia sp.		X						
Terpios gelatinosus (Bowerbank, 1866)					X	X	X	
Thymosiopsis spp. (*T. cuticulatus* or *T. conglomerans*)	X							
Timea sp.								X
Ascidiacea (5)								
Botrylloides crystallinus Bay-Nouailhat, Bay-Nouailhat, Gasparini & Brunetti, 2020	X							

Continued

Table 2 continued

	Méjean		Jarre		Figuier		3PP	
	SD	**D**	**SD**	**D**	**SD**	**D**	**SD**	**D**
Clavelina lepadiformis (Müller, 1776)	X							
Halocynthia papillosa (Linnaeus, 1767)	X							
Lissoclinum perforatum (Giard, 1872)	X			X		X		
Polyclinidae sp.	X							
Cnidaria (3)								
Caryophyllia inornata (Duncan, 1878)	X		X		X			
Corallium rubrum (Linnaeus, 1758)			X		X			
Leptopsammia pruvoti Lacaze-Duthiers, 1897	**X**		**X**		**X**	**X**	**X**	
Bryozoa (3)								
Reteporella sp.			X		X			
*Crassimarginatella solidula** (Hincks, 1860)						X		
*Dentiporella sardonica** (Waters, 1879)			X		X			
Mollusca (2)								
Chama gryphoides Linnaeus, 1758							X	
Neopycnodonte cochlear (Poli, 1795)							X	
Foraminifera (1)								
Miniacina miniacea (Pallas, 1766)	**X**		**X**			**X**	**X**	

Significant differences between stations were determined according to ANOVA tests followed by post hoc Tukey's test when the conditions of normality of residuals and homogeneity of variances were respected. Otherwise, a Kruskal-Wallis test followed by a post-hoc Dunn's test was conducted.

We then assessed the differences in biodiversity composition between communities. Based on the large matrix with the 123 taxonomic units, the proportion of each living category per station was calculated by adding up the number of points belonging to each category. We term this "abundance" in the Results, where it is represented in stacked bar charts. Additionally, based on the 115 taxonomic units, a Principal Coordinates Analysis (PCoA) representing the community structure per station was conducted using the R script available in Gauff *et al.* (2022). The 'envfit' function of the vegan package was used to overlay vectors of taxa significantly correlated with the ordination (p-value < 0.05, $R^2 > 0.2$; Oksanen *et al*., 2018). To identify taxa contributing the most to the distinction between stations, a multipattern analysis was performed with the 'indicspecies' R package (De Cáceres *et al.*, 2011). Parameters were set to 999 permutations while testing for station.

Temporal change in sponge diversity

The assessment of temporal change in sponge diversity was based on surveys undertaken in 2015 with the same sampling method, but only at SD stations (Grenier *et al.*, 2018). The 5-year comparison of the sponge assemblages was based on the list of SD cave representative sponge species proposed for the Marseille area (Grenier *et al.*, 2018). The cumulative and mean species richness was determined and *t*-tests (or Mann-Whitney when normality and homoscedasticity conditions were not met) were performed to assess the difference of mean specific richness between 2015 and 2020 for each SD station.

Additionally, for each photoquadrat, species occurrences were calculated as follows:

$$Species\ occurrence = \frac{number\ of\ photos\ recording\ a\ given\ species}{total\ number\ of\ photos\ per\ cave}$$

These values were then compared to those from Grenier *et al.* (2018) by measuring the rate of change between species occurrences in 2020 and 2015, and thus enabled to evaluate their stability or variability in the studied communities.

Results

General description of the four studied caves

The four caves studied here are all entirely submerged but display variable geomorphological and environmental characteristics, as described below:

The Méjean cave (see Millet, 1977) has a karstic origin and is located in the Côte Bleue Marine Park (a marine protected area – MPA) in the northwestern part of the Bay of Marseille, east of Méjean village. The cave is rather shallow with an angled shape and ascending profile (49 m long, 15 m depth at the entrance and ascending to the surface). The entrance is fairly small and the overall size is moderate (48 m long, up to 2 m wide and 3 m high). The Semi-Dark zone is ca. 6 m long and 1.5 m wide. The Dark zone begins 18 m from the entrance after a bend to the left, at 9 m depth where the cave is ca. 2 m wide. Outflow of fresh water frequently occurs in the Dark zone

of the cave. The floor of the cave is without silt and is mostly covered with pebbles or composed of bedrock, testifying to significant occasional water movement.

Jarre cave (see Fichez, 1989) is located on the southern side of Jarre Island, Riou Archipelago, in the Calanques National Park (CNP), south-east of Marseille and is of karstic origin. The cave has a tubular shape (130 m long, up to 6 m wide and 2 m high on average) and presents a mostly horizontal profile (17-18 m for most of the cave) allowing water homogenization with the outside, with scattered deeper recesses. The far end of the cave beyond 80 m is very narrow and ascends almost to the surface, but was not explored during this study. The Jarre cave is one of the largest caves in the area. The Semi-Dark zone is ca. 20 m long and 6 m wide. The Dark zone begins after a mound, 50 m from the entrance. Silt covers the floor of the studied zones of the cave, indicative of low water movement in those areas.

The Figuier cave (see Pouliquen, 1972) is located west of the Morgiou Cape, in the heart of the CNP and is of karstic origin. This cave has a curved shape (65 m long) with an entrance at each extremity: the largest is located between 18 and 27 m depth and the second is between 10 and 12 m depth. These two connected entrances ensure that this cave benefits from a significant water renewal rate. Sampling in the SD zone was carried out in the deepest and largest entrance of the cave. Figuier cave displays the largest SD zone of the four caves (28 m long and 25 m wide). The Dark zone studied here is fairly small (4 m²) and is located 45 m from the larger entrance and 25 m from the smaller one, at 10 m depth. This cave presents other D zones that could not be included in this study. Silty sand and pebbles cover the floor of the larger entrance and are gradually replaced by boulders and bedrock elsewhere. Water movement in the cave obviously derives from the two entrances.

The 3PP cave (see Vacelet *et al.*, 1994) is located below the "Bec de l'Aigle" Cape in the eastern part of the CNP. Unlike the other caves studied here, the rock is an Upper Cretaceous "Poudingue" (Puddingstone conglomerate) rather than limestone. The cave has a tubular shape (120 m long, 3-10 m wide and up to 8 m high) and is one of the largest caves of the area. The floor has a descending profile (15 m depth at the entrance to 25 m depth at the end). This peculiar topography leads to thermal stratification of the water in summer, when cold water is trapped in the inner cave chamber due to its density. For example, while the outside water temperature varies throughout the year (from 13 to 24°C on average), the water temperature of the inner chamber remains roughly constant (at about 14°C on average). Water renewal inside the cave is thus reduced, but the presence of cold water represents an opportunity for deep water taxa. The SD zone is ca. 20 m long and 3 m wide. The Dark zone begins at the end of the slope, 25 m from the entrance and at 22 m depth. The floor of the cave is covered by very fine silty sediment with traces of biogenic activity.

Description of the communities

Global overview

In total, 123 distinct taxonomic units were recorded: 82 Porifera, 16 Bryozoa, 5 Ascidiacea, 4 Cnidaria, 3 Algae, 2 Mollusca, 2 Annelida and 1 Foraminifera. Eight units correspond to epibiontic and other non-identified organisms. The total number of distinct taxonomic units varied between caves (3PP (57), Figuier (54), Méjean (46) and Jarre (44)) according to the confinement level, with 95 distinct taxonomic units found in the SD community and 40 found in the D community. The SD community is characterized by colourful, erect and massive specimens belonging to several taxonomic groups: sponges, cnidarians, ascidians, bryozoans and sometimes encrusting red algae (Fig. 2). The D community is primarily represented by encrusting sponges and bryozoans, serpulid polychaetes and a few scleractinian corals and foraminiferans (Fig. 3). In the SD zone, on average 83% of points were assigned to a living category, which provides an estimate of the benthic cover. In the D zones, only 33% could be assigned to such a category.

Of the reported taxonomic units, 52 were identified at the species, genus or family levels (Table 2). Eleven were commonly found in the 4 caves. Three of them (sponges) were restricted to the SD community: *Agelas oroides*, *Ircinia dendroides*, and *Ircinia variabilis* (Table 2, Fig. 2). The sponges *Dendroxea lenis*, *Diplastrella bistellata*, *Haliclona mucosa*, *Oscarella* spp., *P. ficiformis*, the coral *Leptopsammia pruvoti,* and the foraminiferan *Miniacina miniacea* were predominantly found in the SD community, but were also identified in the D community in some caves (Table 2, Fig. 2 and 3). *Petrobiona massiliana*, habituallyreported as a D cave dweller, as in Méjean, Jarre, and Figuier, was also found in the SD cave community of 3PP (Table 2).

SD vs. D cave communities

Examination of the matrix with the 123 taxonomic units revealed significant differences in biodiversity composition between caves and between the two types of communities (PERMANOVA, p-value = 0.001). The ratio between the variance of each group and the total variance (F) indicates a five-fold greater difference between the SD and the D communities across caves (F = 85) than between the caves (across communities) (F = 17).

- Semi-Dark cave community

Of the 115 taxonomic units (here excluding the 8 undetermined taxa), the SD communities of 3PP and Figuier display the highest total number of taxonomic units with 46 and 42 respectively, followed by Méjean (37) and Jarre (35) (Fig. 4A). The cumulative curve reached a plateau for Méjean after the 23rd photoquadrat, for Jarre after the 29th, for Figuier after the 27th and for 3PP after the 26th. Mean species richness and the Shannon (H) index

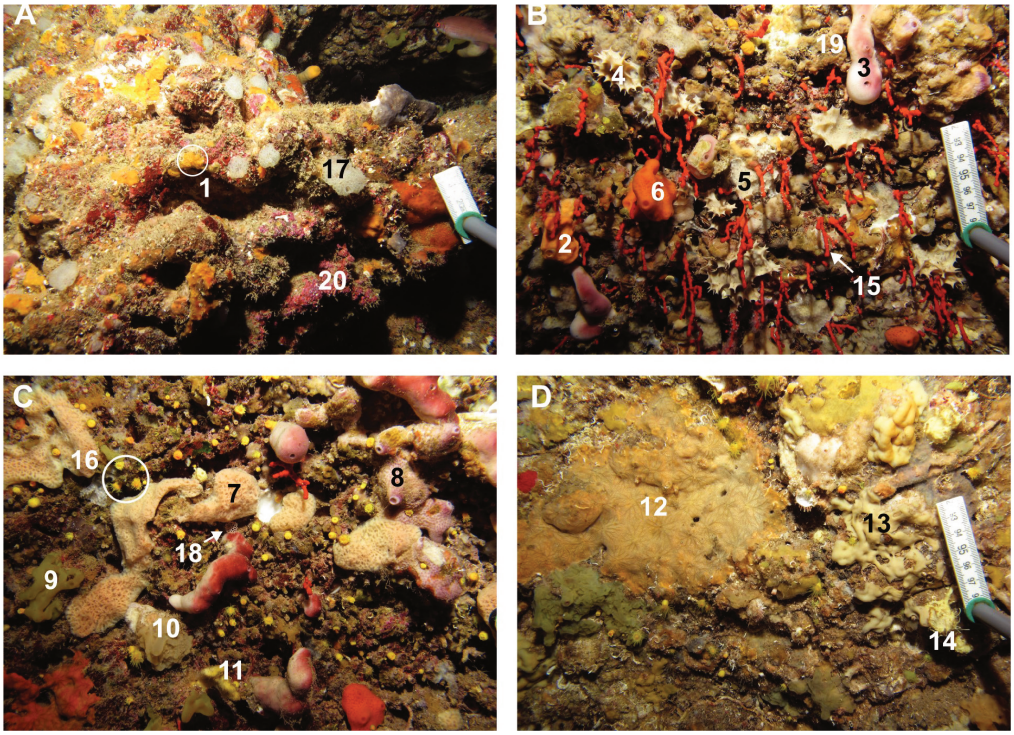


Fig. 2: *In situ* photographs of the benthic diversity in the Semi-Dark cave community of (A) Méjean, (B) Figuier, (C) Jarre, and (D) 3PP caves. Each cave harbours a specific assemblage including: sponges – (1) *Crella pulvinar*, (2) *Agelas oroides**, (3) *Petrosia ficiformis**, (4) *Pleraplysilla spinifera*, (5) Dysideidae sp., (6) *Haliclona fulva*, (7) *Haliclona. mucosa**, (8) *Ircinia variabilis**, (9) *Oscarella* sp.*, (10) *Oscarella balibaloi*, (11) *Axinella damicornis*, (12) *Diplastrella bistellata**, (13) *Plakina jani*, (14) *Aplysina cavernicola*; cnidarians – (15) *Corallium rubrum*, (16) *Leptopsammia pruvoti**; ascidians – (17) *Botrylloides crystallinus*; bryozoans – (18) *Reteporella* sp., (19) Bryozoa sp.15; and an encrusting red alga in (20). *Species/morphotypes common to the Semi-Dark zones of the four caves.

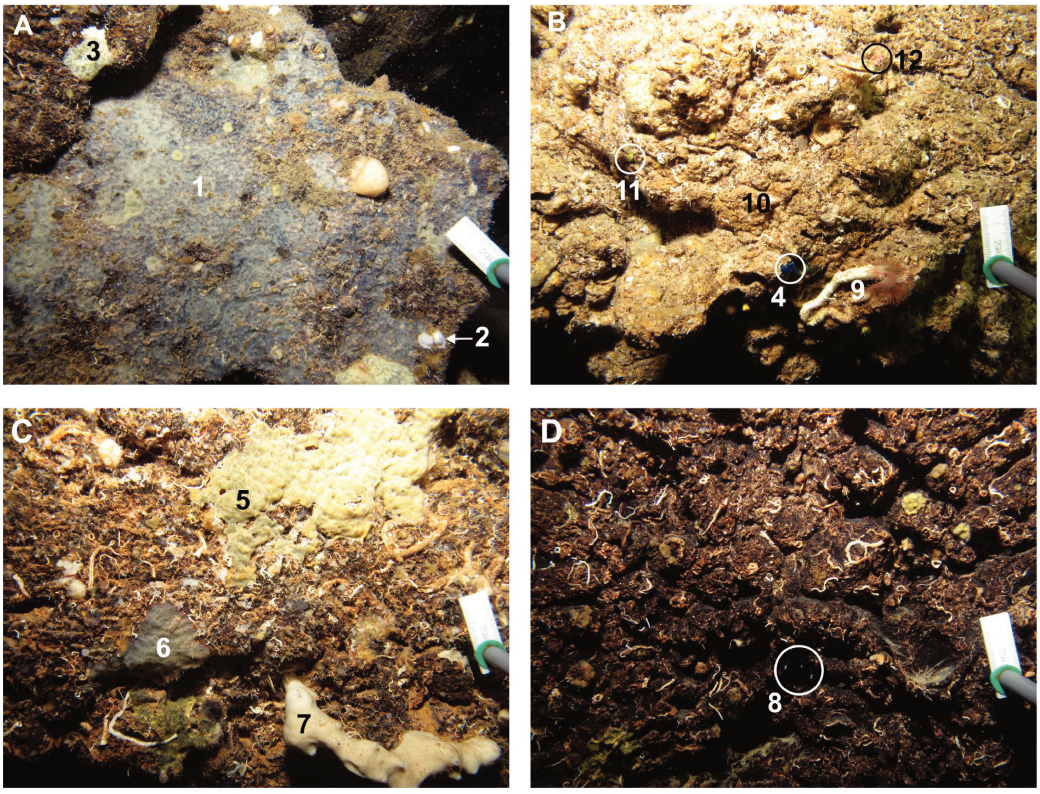


Fig. 3: *In situ* photographs of the benthic diversity in the Dark cave community of (A) Méjean, (B) Figuier, (C) Jarre, and (D) 3PP caves. Each cave harbours a specific assemblage including: sponges – (1) *Rhabderemia* sp., (2) *Petrobiona massiliana*, (3) *Haliclona mucosa*, (4) *Terpios gelatinosus*, (5) *Diplastrella bistellata*, (6) *Dendroxea lenis*, (7) *Petrosia ficiformis*, (8) *Lycopodina hypogea*; serpulid polychaetes (9); bryozoans – (10) *Crassimarginatella solidula* (unconfirmed identification); cnidarians – (11) *Leptopsammia pruvoti*; and foraminiferans – (12) *Miniacina miniacea.*

indicate that the SD community in Figuier is the most diverse (p-value < 0.01), with about 10 taxonomic units per photoquadrat and an H index of 1.92 (Fig. 4B and 4C). The other caves present 6 to 7 taxonomic units per photoquadrat on average and an H index between 1.50 and 1.61 (Fig. 4B and 4C). Pielou's evenness varies slightly but not significantly: from 0.77 at 3PP to 0.85 at Figuier.

Of the number of points associated to each of the 123 categories, sponges represent nearly 50% (in abundance) of the species assemblage (Fig. 5A). Each cave has its own particularities: the SD community of the 3PP cave presents the highest number of sponge taxa (37, constituting 59% of the assemblage). Figuier's SD community differs from the others by a higher abundance of bryozoans (13%) and cnidarians (14%). Méjean's SD community presents encrusting red algae (6%) and ascidians (3%), while Jarre's SD community is characterized by the presence of cnidarians (4%) and the highest proportion of epibiontic non-identified organisms (15%) (Fig. 5A).

Of the 115 taxonomic units, 33.8% of the variability in community composition can be explained by the PCoA (Fig. 5B). Taxa abundances, positively correlated with ordination, are significantly associated to the different sites (p-value < 0.01) (Fig. 5B,). For instance, Figuier's SD community is distinguished by the higher abundance of the red coral *C. rubrum* (22%), the sponge *Pleraplysilla spinifera* (5%) and a non-identified bryozoan (Bryozoa sp.15; 15%) (Fig. 5B, Fig. 2B,). Another sponge, *H. mucosa,* is highly represented in this community (13%) as well as in Jarre (19%) (Fig. 5B, Fig. 2C,). Jarre's SD community is characterized by the abundance of the sponge *D. lenis* (17 %) and the coral *L. pruvoti* (7%) (Fig. 5B,

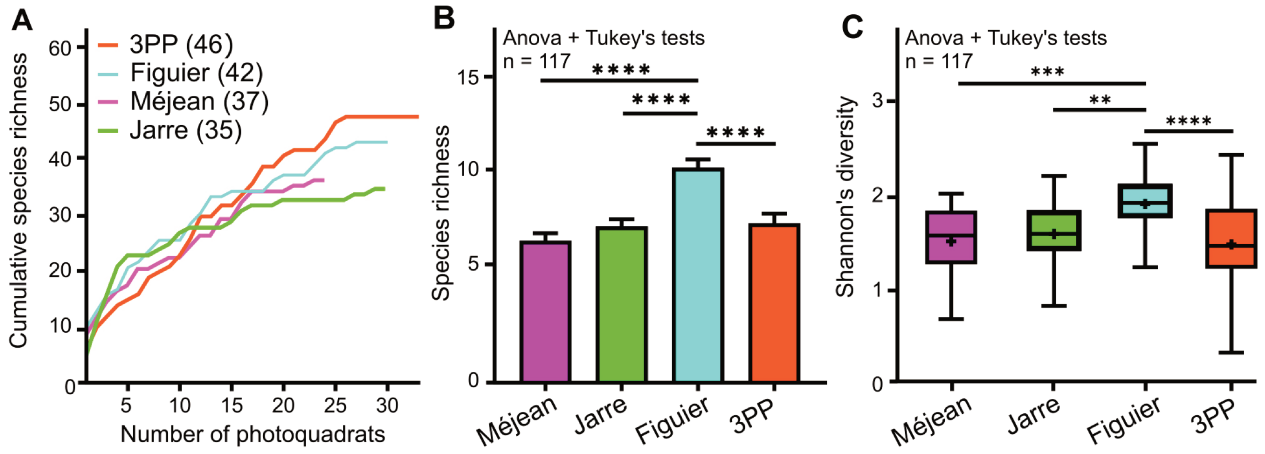


Fig. 4: Biodiversity indices in the Semi-Dark cave community at the four study sites. (A) Cumulative richness curves. Numbers in parentheses represent the total number of taxa per station. (B) Mean species richness per quadrat and standard errors. (C) The Shannon index with boxes indicating first to last quartile, and whiskers representing maximum and minimum values. Crosses correspond to the mean values. Significant pairwise differences (Dunn's or Tukey's post hoc tests) are indicated by brackets. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$; no brackets: non-significant.

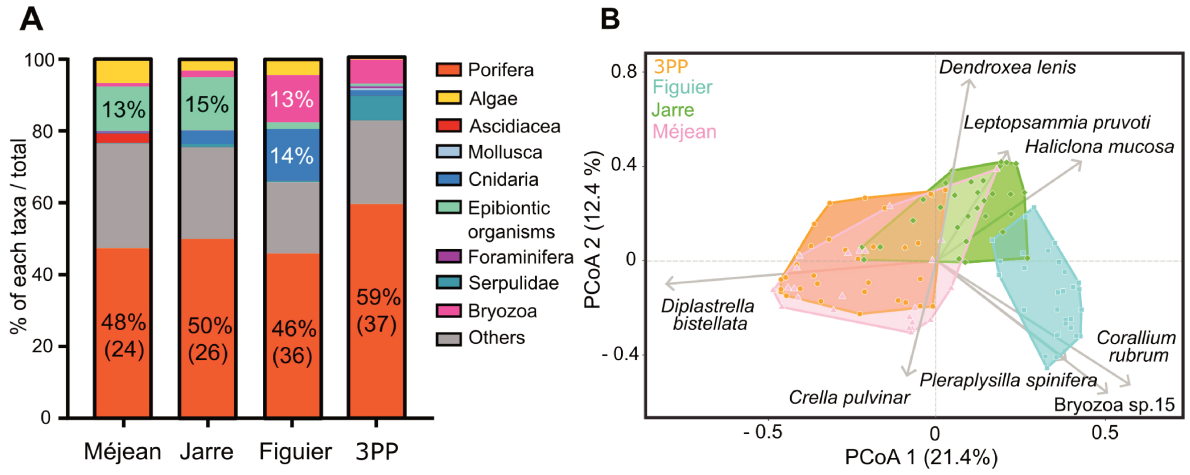


Fig. 5*:* Biodiversity composition of the studied Semi-Dark cave community. (A) Benthic composition with the relative percentage of each taxon per station. Numbers in parentheses represent the total number of sponge species. (B) Principal Coordinate Analysis (PCoA) plot of the community structure. Vector overlay indicates species having a positive correlation ($p < 0.05$; $R^2 > 0.2$) with the cave community projections.

Fig. 2C,). The SD community at 3PP and Méjean share the same dominant sponge species, *D. bistellata* (31% and 22%), but Méjean differs by the abundance of the sponge *Crella pulvinar* (8.5%) and the tunicate *Botrylloides crystallinus* (4.5%) (Fig. 5B, Fig. 2A,).

The SD community can also be distinguished by the uniqueness of some encountered species (Table 2). For instance, *Raspaciona aculeata* appears exclusive to Figuier, and *Merlia deficiens* was restricted to 3PP. Additionally, four of the five recorded tunicates were found only in Méjean.

- Dark cave community

Of the 115 taxonomic units, the D communities at Jarre and Figuier present the highest total number of distinct taxonomic units (17), followed by Méjean (12) and 3PP (9) (Fig. 6A). The cumulative curve reached a plateau for all the stations. No taxonomic units were recorded after the 27th photoquadrat for Méjean SD, the 24th for Jarre SD and the 14th for 3PP SD. For Figuier, the number of taxonomic units is shown to slightly increase after the 32nd. The mean species richness (S) and the Shannon (H) index show that the D community at Jarre is significantly more diverse than those observed at Figuier and 3PP (p-value < 0.01), with approximately 3.4 taxonomic units per photoquadrat and an H index of 0.91 (Figs. 6B, 6C). The 3PP D community is the least diverse, with mean values of S (1.7), H (0.28) and a significantly lower Pielou evenness (0.36) than for Jarre and Méjean (p-value < 0.05,).

Of the number of points associated to each of the 123

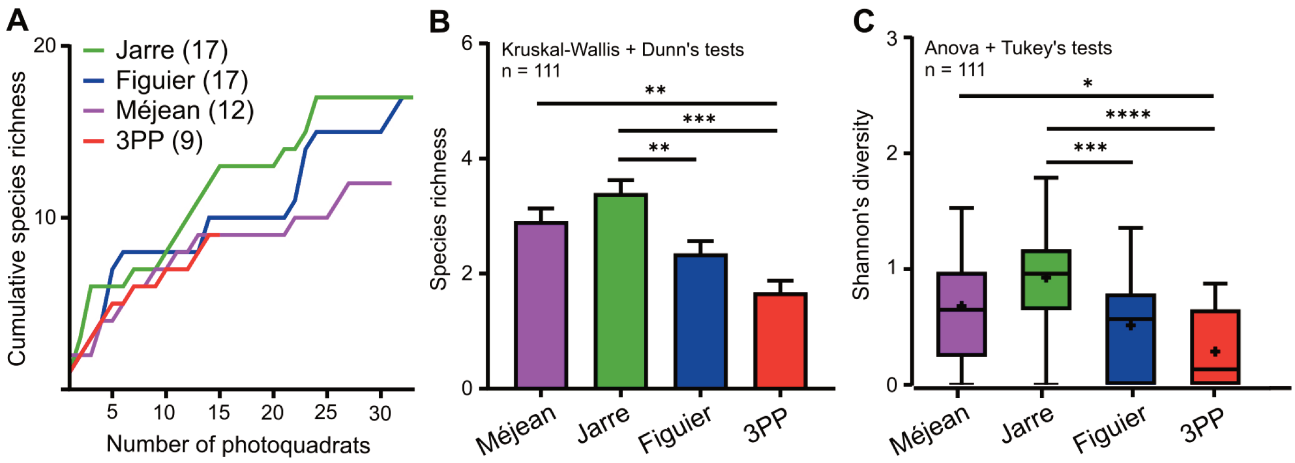


Fig. 6: Biodiversity indices in the Dark cave community at the four study sites. (A) Cumulative richness curves. Numbers in parentheses represent the total number of species per station. (B) Mean species richness per quadrat and standard error. (C) The Shannon index, with boxes showing first to last quartile, and whiskers representing maximum and minimum values. Crosses correspond to the mean values. Significant pairwise differences (Dunn's or Tukey's post hoc tests) are indicated by brackets. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$; no bracket: non-significant.

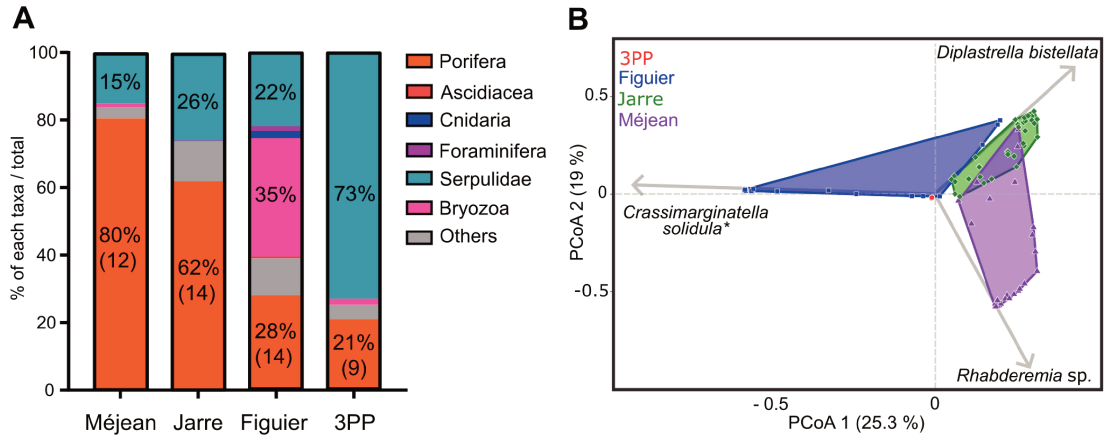


Fig. 7: Biodiversity composition of the studied Dark cave community. (A) Benthic composition with the relative percentage of each taxon per station. Numbers in parentheses represent the total number of sponge species. (B) Principal Coordinate Analysis (PCoA) plot of the community structure. Vector overlay indicates species having a positive correlation ($p < 0.05$; $R^2 > 0.2$) with the cave community projections. *distinct morphotype with unconfirmed species name.

categories, sponges account for the largest proportion of the living organisms in this community at Méjean (80%) and Jarre (62%) (Fig. 7A). In Figuier's D community, sponges (28%) share the substrate with bryozoans (35%) and serpulid worms (22%). In the 3PP D community, serpulid worms (73%) dominate and sponges represent only 21% (Fig. 7A). However, it must be noted that on photoquadrats it is rarely possible to ascertain whether serpulid worms are living or not.

Of the 115 taxonomic units, 44.3% of the variability in species composition is explained by the PCoA (Fig. 7B). As the D community of 3PP was particularly represented by non-identified polychaetes (alive or dead) and the PCoA constructed solely with distinguishable taxa, only a few photoquadrats were considered and appeared to be superimposed on the PCoA. However, two taxa were reported exclusively in the 3PP D community: the carnivorous sponge *Lycopodina hypogea* and *Timea* sp. (Table 2).

The taxa which correlate positively with ordination are also significantly associated with the different sites based on their abundance in the D communities (p-value = 0.001) (Fig. 7B). Figuier's D community is characterized by the dominance of an encrusted bryozoan (38%), potentially *Crassimarginatella solidula* (Harmelin *et al.*, 2000). Jarre's D community is defined by the presence of the sponge species *D. bistellata* (13 %), whereas the D community in Méjean is mostly dominated by another sponge, *Rhabderemia* sp. (50%), which is found there exclusively (Fig. 7B, Fig. 3A and C).

Temporal change in the sponge assemblage

Compared to 2015, the total number of representative sponge species (listed in Grenier *et al.*, 2018) decreased for all SD sites (Table 3). Therefore, the mean species richness per site significantly declined for Méjean, Jarre and 3PP (p-value < 0.001, Table 3).

Variations in the occurrence of sponge taxa (listed in Grenier *et al.*, 2018) can be classified into five groups (Fig. 8). The first group includes 13 uncommon species initially reported to occur in fewer than 19% of the 2015 photoquadrats but which were no longer found in the 2020 photoquadrats. The second group consists of seven species whose occurrence declined in all the sites where they were initially recorded in 2015. Three of these species were initially well represented: *A. acuta* was recorded in 54% of Jarre's photoquadrats, *Axinella damicornis* in 63% of the 3PP photoquadrats, and *Oscarella balibaloi* in 43% of Méjean's photoquadrats (unpublished data from Grenier *et al*., 2018). The third group includes species with occurrences which have either increased or decreased in photoquadrats, depending on the site. Among the most contrasted variations between sites is the occurrence of *P. spinifera* which was four times higher in the Figuier SD community in 2020 (63%) compared to 2015 (16%), and 4.2 times lower in Jarre in 2020 (13%) compared to 2015 (56%). Similarly, *Plakina jani* was 2.6 times higher in the 3PP community but 8.4 times lower in the Figuier community in 2020. Interestingly, *Aplysina cavernicola* was not recorded in Figuier's SD community in 2020, despite being present in the 2015 photoquadrats. However, its occurrence increased in the 2020 photoquadrats of the SD community at 3PP and Jarre due to some small specimens of an unusual growth form. The fourth group presents taxa with moderate variations in their occurrence, except for *D. lenis* and Dysideidae spp., which appear to have been 2.6 to 3.6 times less represented in 2020 in Méjean compared to 2015. The last group includes taxa whose presence seems to have increased in all sites. For example, *Chondrosia reniformis* was newly reported in the SD community at 3PP and Méjean, and its occurrence was five times higher in Figuier in 2020 than in 2015.

Discussion

Marine caves around the world are recognized as biodiversity hotspots (Gerovasileiou & Bianchi, 2021; Pérez *et al.*, 2016) and they harbour original benthic species assemblages essentially described in the North-Western and Eastern Mediterranean and. Sponges are the main

Table 3. Total and Mean Species richness per quadrat (with standard errors) of the Semi-Dark Cave community of the four studied sites in 2015 and 2020. This comparison takes into account only the listed sponge species of this community as proposed by Grenier *et al*. (2018). Differences between 2015 and 2020 were tested with a Student/Kruskal-Wallis (K-W) test. p-value (p) < 0.01; *** : p < 0.001; ****, ns: non-significant.

	Total Species richness		**Mean Species richness / quadrat**		
	2015	**2020**	**2015**	**2020**	Student/ K-W test
Méjean	20	14	5.4 +/- 0.29	3.8 +/- 0.24	***
Jarre	25	18	8.6 +/- 0.3	5.1 +/- 0.26	****
Figuier	23	16	6.2 +/- 0.25	5.5 +/- 0.24	ns
3PP	25	18	6.3 +/- 0.24	3.8 +/- 0.25	****

Group	species (37)	Méjean	Jarre	Figuier	3PP
1	*Crambe crambe*				
	Dictyonella incisa				
	Haliclona lacazei				
	Haliclona cratera				
	Haliclona sarai				
	Hemimycale columella				
	Hexadella pruvoti				
	Myceliospongia araneosa				
	Scopalina lophyropoda				
	Plakina crypta				
	Pseudocorticium jarrei				
	Scalarispongia scalaris				
	Spongia officinalis				
2	*Acanthella acuta*			-1.2	-4.5
	Clathrina clathrus		-1.3		-5.2
	Crella pulvinar	-1.8		-1.9	-1.6
	Axinella damicornis	-3.2	-6.9	-3.8	
	Ircinia oros		-3.6		
	Oscarella balibaloi		-5.7		-2.2
	Petrosia ficiformis	-1.3	-1.1	-1.3	-4.8
3	*Haliclona fulva*		-1.6	1.9	
	Phorbas tenacior	2.0	1.7		
	Aplysina cavernicola				6.1
	Raspaciona aculeata				
	Plakina jani			-8.4	2.6
	Ircinia dendroides				
	Pleraplysilla spinifera		-4.2	4.0	1.0
	Diplastrella bistellata	2.0	-2.2	-4.5	1.8
	Ircinia variabilis	1.1	-1.6	2.9	-2.7
4	Dysideidae spp.	-3.6	1.5	1.3	-1.2
	Dendroxea lenis	-2.6	1.0	-1.2	1.1
	Oscarella spp.	1.1	-1.7	2.1	-1.5
	Agelas oroides	-1.2	-1.6	1.2	-1.5
5	*Haliclona mucosa*	1.4	1.0	1.3	
	Chondrosia reniformis			5.0	
	Hippospongia communis				1.0
	Thymosiopsis sp.	3.3			

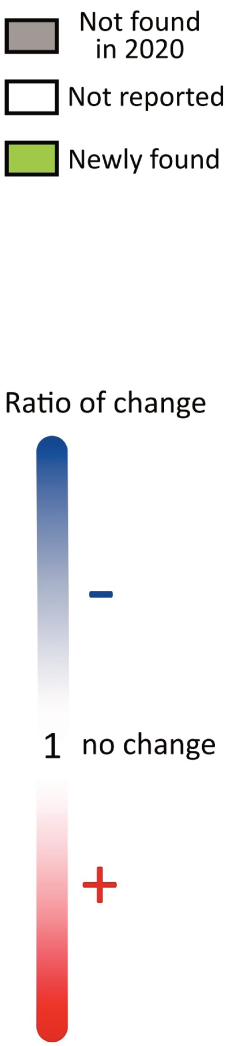


Fig. 8: Heatmap presenting the rates of change for each sponge taxa occurrence between 2015 and 2020 in the Semi-Dark Cave community (based on the species list from Grenier *et al.,* 2018). Group 1: 13 sponge taxa initially reported to occur in fewer than 20% of the 2015 photoquadrats but which were no longer found in the 2020 photoquadrats. Group 2: 7 sponge taxa whose occurrence decreased in all the sites where they were initially recorded in 2015. Group 3: sponge taxa with occurrences in photoquadrats that have increased or decreased, depending on the site. Group 4: sponge taxa with quite moderate variations in their occurrence. Group 5: sponge taxa whose presence seems to have increased in most sites.

representative taxa of cave communities and have been particularly well studied (Sarà, 1968; Pouliquen, 1972; Bibiloni *et al.*, 1989; Corriero *et al.*, 2000; Bell, 2002; Gerovasileiou & Voultsiadou, 2012, 2016; Grenier *et al.*, 2018; Longo *et al.*, 2023). Bryozoans and cnidarians are also well represented (Harmelin, 1969, 1985, 2000; Pérès, 1967; Zibrowius, 1978, 1980; Rosso *et al.*, 2019). However, few studies have qualitatively and quantitatively compared the benthic composition and the biodiversity indices between Semi-Dark and Dark communities, and between caves (Martí *et al.*, 2004; Bussotti *et al.*, 2006; Gerovasileiou *et al.*, 2017). In the present study, we assess how the environmental settings and the geomorphology of caves participate in structuring the SD and D communities, thus highlighting the singularities of each cave. We also assess short-term changes in sponge biodiversity, possibly resulting from climate change effects, for the first-time.

Comparison of abiotic factors between caves

The geomorphology and the environment render our four cave habitats very distinct and thus likely to host different benthic assemblages. The three caves of the CNP are bathed by the Northern Mediterranean Current, while Méjean is mostly influenced by the Rhone River plume and other more local currents which are induced by the dominant NW wind (Mistral) of the Marseille area (Castelbon, 1972). In addition, Jarre, Figuier and Méjean caves were formed from the karstic dissolution of limestone which often results in a great number of micro- to macro-crevices and holes. The non-karstic 'poudingue' nature of 3PP has resulted in a more friable rocky substrate, smoothed by marine currents, with many fewer crevicular habitats. The morphology of a cave (depth and size of the entrance, profile of the cave) determines the degree of light penetration as well as the circulation of water within, therefore controlling the supply of nutrients and/or colonists (Pouliquen, 1972; Harmelin *et al.*, 1985; Martí *et al.*, 2004; Radolović *et al.*, 2015). For instance, Méjean and 3PP present very contrasted configurations. Méjean is the smallest, narrowest and shallowest cave, with an ascending profile, favouring water renewal. Conversely, 3PP has the largest volume and its descending profile is responsible for trapping cold-water within the cave. This leads to a constant water temperature in the Dark part of the cave (Vacelet *et al.*, 1994, Vacelet, 1996) and to a water density barrier which limits food/colonist supply during most of the year. Figuier benefits from two entrances, one of which is very wide with a low ceiling, ensuring better light penetration into the Semi-Dark part of the cave and great water renewal (Pouliquen, 1972). The geomorphology of a cave thus determines the gradients of numerous environmental parameters in the cave habitat and shapes the detailed composition of the benthic biodiversity (Martí *et al.*, 2004; Bussotti *et al.*, 2006; Dimarchopoulou *et al.*, 2018). As a result, each cave harbours a distinct species assemblage, which partly explains the variation in numbers of taxa between caves, including the presence of unique species.

General comparison of benthic biodiversity

In all four studied caves there is a clear change in biodiversity between the Semi-Dark and Dark zones. Erect, colourful and massive sponges, corals and bryozoans of the SD community are replaced by encrusted and less colourful specimens of sponges, bryozoans and serpulids in the D community. This pattern of biodiversity was first highlighted in pioneer studies of the Marseille area (Laborel & Vacelet, 1958; Harmelin *et al.*, 1985) and again more recently in other Mediterranean and tropical caves (Vasseur, 1984; Bianchi & Morri, 1994; Harmelin *et al.*, 2003; Pérez *et al.*, 2016; Dimarchopoulou *et al.*, 2018), testifying that the confinement gradient, resulting from reduced light, hydrodynamics and nutrient availability, modulates the biodiversity distribution along a horizontal zonation. Of the 52 identified taxa, eleven species (see section 2.1 of the results) are common to all four caves and are recognized as characteristic species of Mediterranean caves (Pérès & Picard, 1964; Manconi et *al.*, 2013; Grenier *et al.*, 2018; Gerovasileiou & Bianchi, 2021; Longo *et al.*, 2023). Other taxa are found exclusively in the SD community (*A. oroides*, *Ircinia* spp., *C. rubrum*) or in D communities (e.g., *Rhabderemia* sp.) and are considered as characteristic taxa of the underwater cave ecosystem (Harmelin *et al.*, 2003; Grenier *et al.*, 2018). However, taxa distribution is not always exclusive to one of these two cave communities. The sponges *D. lenis*, *D. bistellata*, *H. mucosa*, *Oscarella* sp., *P. ficiformis*, *P. massiliana*, the coral *L. pruvoti* and the foraminiferan *Miniacina miniacea* have been reported in both communities, as demonstrated in previous studies (Vacelet *et al.*, 1959; Pérès, 1967; Balduzzi & Cattaneo, 1985; Gerovasileiou & Voultsiadou, 2016; Longo *et al.*, 2023), suggesting a rather patchy distribution depending on their affinity with the environmental conditions and the absence of sessile competitors (Harmelin *et al.*, 1985; Corriero *et al.*, 2000; Manconi *et al.*, 2009). Moreover, a good number of taxa are shared between SD caves and adjacent habitats of the littoral zone, and some D cave dwellers may also be found under boulders in shallow waters or in deep-sea ecosystems (see for instance Pérez *et al.*, 2017; Cárdenas *et al.*, 2018 or Grenier *et al.*, 2018 for sponges).

The cumulative richness curves demonstrate that the sampling effort per station was satisfactory, except for the Figuier D community. For this station, a few more photoquadrats might reveal higher species richness, a point which should be considered for any future sampling.

SD vs. D cave communities

In the SD community, sponges represent nearly 50% (in abundance) of the assemblage, a percentage in line with previous studies (Corriero *et al.*, 2000, Digenis *et al.*, 2022). Each cave harbours a specific assemblage which may be related to the cave-specific environmental conditions. The Figuier SD community is the most diverse and the most heterogeneous of the four caves, offering an extremely colourful seascape. The depth of the entrance, the height and large development of the ceiling, and the absence of competitors such as algae provide ideal conditions for the establishment of *C. rubrum*, which is particularly well represented and thus develops one of the main facies of this community (Laborel, 1960; Pouliquen, 1972). In addition, the sponges *P. spinifera* and *Haliclona fulva* are also well represented, which appears to be in line with their listing among the species frequently associated with the *C. rubrum* facies (Michez *et al.*, 2017). The Méjean SD community is very different from the other three, which isprobably linked to its geographical location in the north of our study area where it is under the influence of the Rhone River plume. In this area, the Northern Current plays only a minor role, compared to in the three other sites. The Côte Bleue water mass has been shown to be somehow distinct from that of the Calanques Coast, the two being separated by a noteworthy barrier

to gene flow (Lejeusne & Chevaldonné, 2006). This may explain the greater diversity of ascidians and the abundance of some sponge species such as *C. pulvinar* in the Méjean SD community. In the D cave communities the contrast between caves is even more pronounced. Jarre's D community appears to be the most diverse, marked by the presence of sponges such as *D. bistellata* and *P. ficiformis* which are usually found in abundance in the SD community. The high values of benthic diversity of the Jarre D cave community suggests a regular water circulation (Chevaldonné & Lejeusne, 2003; Rastorgueff *et al.*, 2014), ensuring a sufficient food supply (Fichez, 1991; M. Derrien, unpublished data) for the establishment of these species. Furthermore, the presence of a dense population of mysids (*Hemimysis margalefi*) in the back of the cave may also contribute to mitigating the oligotrophy of the D community (Fichez, 1991; Rastorgueff *et al.*, 2011) by performing daily migrations between the Dark zone and the outside. Conversely, the peculiar environmental conditions of the 3PP cave are responsible for the low species diversity recorded in the Dark zone, and also of the occurrence of cold-water species usually found in deep-sea ecosystems (Vacelet *et al.*, 1994, Vacelet & Boury-Esnault, 1995; Harmelin & Vacelet, 1997).

Temporal change in the sponge assemblage

Significant changes have occurred in the sponge assemblage of the SD community since 2015. In each cave, species richness has decreased and some sponge taxa, initially well represented in 2015, were rarely or not recorded in 2020. Changes in Mediterranean sponge assemblages have been reported in previous studies and related to climate change and anthropogenic disturbances (Goodwin *et al.*, 2013; Bertolino *et al.*, 2016; Nepote *et al.*, 2017; Costa *et al.*, 2018). Garrabou *et al.* (2022) have notably shown that during the 2015-2019 period, the Mediterranean Sea experienced exceptional thermal conditions (+ 0.7°C on average in the Marseille area compared to 1984), resulting in five consecutive years of widespread mass mortality events (MMEs) across the basin and affecting sponge species down to 45 m depth. Sponges of the subclass Keratosa (e.g., Dysideidae, Irciniidae and Spongiidae) have been reported as particularly affected by MMEs (Pérez *et al*., 2000; Garrabou *et al*., 2009; Costa *et al*., 2019). Six of the 37 species considered in Figure 8 showed reduced occurrence in 2020 in all the caves where they were initially recorded: *Crambe crambe*, *Scalarispongia scalaris*, *S. officinalis*, *A. acuta*, *A. damicornis*, *Clathrina clathrus*, *Ircinia oros* and *P. ficiformis*. The sensitivity of a great number of species to marine heat waves has been documented in several previous studies (Pérez *et al.*, 2000; Garrabou *et al.*, 2009; Bertolino *et al.*, 2016; Gómez-Gras *et al.*, 2019; Verdura *et al.*, 2019; Grenier *et al.*, 2023) and is likely to explain the observed variations in occurrence between 2015 and 2020. Moreover, the decrease in abundance of some of these species might impact the survival of other species. For example, Pérez *et al.* (2011) reported that *O. balibaloi* usually overgrows other invertebrate species, with *S. officinalis* and *I. oros* being among its preferred biological supports. The observed decrease in the occurrence of these two species may thus also partly explain the reduced occurrence of *O. balibaloi* in our studied caves. Our temporal change assessment has also highlighted taxa for which occurrence increased in at least some caves in 2020. *Chondrosia reniformis* appears to be among the species whose occurrence has increased since 2015, particularly in the SD community of Figuier and has been newly reported in the SD communities of Méjean and 3PP. The ecological success and the resistance of *C. reniformis* when faced with diverse disturbances (including temperature increase) has been reported (Garrabou & Zabala, 2001; Idan *et al.*, 2020), suggesting that this species likely benefits from the availability of space after the death of other species.

Given the extent of the changes recorded between 2015 and 2020, and considering the devastating marine heat waves which occurred in summer 2022 (Grenier *et al.*, 2023), it is crucial to maintain surveys of the benthic diversity in underwater caves. These surveys should include the D zones, and monitoring frequency should perhaps be increased to target other biological compartments (e.g., mobile fauna, soft bottom benthic fauna). We strongly emphasize herein the importance of biodiversity monitoring in the context of a rapidly changing environment, and in poorly resilient marine ecosystems in particular. More frequent monitoring of this kind should make it possible to measure more accurately the direct impact of climate change on marine species richness and to better evaluate the putative impacts on marine ecosystem functioning. Given the likelihood that any change in species composition and/or abundance will impact biotic interactions, there is a clear need for new methods to more accurately monitor ecosystem functioning and eventually the services provided to human societies.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Biodiversa + project SPONBIODIV (ANR-22-EBIP-0004-06) and to the AMIDEX project MARRIO (AMX-22-IN1-46) for funding our research. We thank Dorian Guillemain and the diving service of OSU Institut Pythéas, the captains and crews of R/V Antedon 2 and Astroides, and Sacha Molinari for their help in the field. We thank Robin Gauff and Christophe Lejeusne for discussions about photoquadrat treatments. We are also grateful to Jean Vacelet, Nicole Boury-Esnault, Jean-Georges Harmelin and Marie Grenier for providing their precious help in the taxonomic identification of some species.

Author contribution statement: TP took the photoquadrats. TP, MD, PC sampled the specimens needed for identification. MD analysed the data. MD, PC and TP wrote the manuscript, all authors revised and approved the final text.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

References

Balduzzi, A., Cattaneo, R., 1985. Estimation par relèvements photographiques de la distribution de *Miniacina miniacea* (Sarcomastigophora, Foraminiferida) dans une grotte sous-marine du Golfe de Naples. *Rapports de la Commission Internationale pour la Mer Méditerranée*, 29 (5), 127-129.

Bell, J.J., 2002. The Sponge Community in a Semi-Submerged Temperate Sea Cave: Density, Diversity and Richness. *Marine Ecology*, 23 (4), 297-311.

Bell, J.J., 2008. The functional roles of marine sponges. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 79 (3), 341-353.

Bertolino, M., Betti, F., Bo, M., Cattaneo-Vietti, R., Pansini, M. *et al.*, 2016. Changes and stability of a Mediterranean hard bottom benthic community over 25 years. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 96 (2), 341-350.

Bianchi, C.N., Morri, C., 1994. Studio bionomico comparativo di alcune grotte marine sommerse; definizione di una scala di confinamento. *Memorie dell'Istituto italiano di Speleologia*, 6, 107-123.

Bianchi, C.N., Morri, C., 2000. Marine Biodiversity of the Mediterranean Sea: Situation, Problems and Prospects for Future Research. *Marine Pollution Bulletin*, 40 (5), 367-376.

Bibiloni, M.A., Uriz, M.J., Gili, J.M., 1989. Sponge communities in three submarine caves of the Balearic Islands (western Mediterranean): adaptations and faunistic composition. *Marine Ecology – Pubblicazioni della Stazione Zoologica di Napoli I*, 10, 317-334.

Boury-Esnault, N., Rützler, K., 1997. Thesaurus of sponge morphology. *Smithsonian Contributions to Zoology*, 596, 1-55.

Bussotti, S., Terlizzi, A., Fraschetti, S., Belmonte, G., Boero, F., 2006. Spatial and temporal variability of sessile benthos in shallow Mediterranean marine caves. *Marine Ecology Progress Series*, 325, 109-119.

Cárdenas, P., Vacelet, J., Chevaldonné, P., Pérez, T., Xavier, J.R., 2018. From marine caves to the deep sea, a new look at *Caminella* (Demospongiae, Geodiidae) in the Atlanto-Mediterranean region. *Zootaxa*, 4466 (1), 174-196.

Castelbon, C., 1972. Etude de la circulation des masses d'eau dans le golfe de Marseille. *Téthys*, 4, 269-312.

Chevaldonné, P., Lejeusne, C., 2003. Regional warming-induced species shift in north-west Mediterranean marine caves. *Ecology Letters*, 6 (4), 371-379.

Coll, M., Piroddi, C., Steenbeek, J., Kaschner, K., Ben Rais Lasram, F. *et al.*, 2010. The Biodiversity of the Mediterranean Sea: Estimates, Patterns, and Threats. *PLoS ONE*, 5 (8), e11842.

Corriero, G., Scalera Liaci, L., Ruggiero, D., Pansini, M., 2000. The Sponge Community of a Semi-Submerged Mediterranean Cave. *Marine Ecology*, 21 (1), 85-96.

Costa, G., Bavestrello, G., Micaroni, V., Pansini, M., Strano, F. *et al.*, 2019. Sponge community variation along the Apulian coasts (Otranto Strait) over a pluri-decennial time span. Does water warming drive a sponge diversity increasing in the Mediterranean Sea? *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 99 (7), 1519-1534.

Costa, G., Betti, F., Nepote, E., Cattaneo-Vietti, R., Pansini, M. *et al.*, 2018. Sponge community variations within two semi-submerged caves of the Ligurian Sea (Mediterranean Sea) over a half-century time span. *The European Zoological Journal*, 85 (1), 381-391.

De Cáceres, M., Sol, D., Lapiedra, O., Legendre, P., 2011. A framework for estimating niche metrics using the resemblance between qualitative resources. *Oikos*, 120 (9), 1341-1350.

Digenis, M., Arvanitidis, C., Dailianis, T., Gerovasileiou, V., 2022. Comparative Study of Marine Cave Communities in a Protected Area of the South-Eastern Aegean Sea, Greece. *Journal of Marine Science and Engineering*, 10 (5), 660.

Dimarchopoulou, D., Gerovasileiou, V., Voultsiadou, E., 2018. Spatial variability of sessile benthos in a semi-submerged marine cave of a remote Aegean Island (eastern Mediterranean Sea). *Regional Studies in Marine Science*, 17, 102-111.

Fichez, R. 1989. *Phénomènes d'oligotrophie en milieu aphotique. Étude des grottes sous-marines, comparaison avec les milieux profonds et bilans énérgetiques*. Thèse de Doctorat, Université d'Aix-Marseille II, France.

Fichez, R., 1991. Suspended particulate organic matter in a Mediterranean submarine cave. *Marine Biology*, 108 (1), 167-174.

Garrabou, J., Zabala, M., 2001. Growth Dynamics in Four Mediterranean Demosponges. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 52 (3), 293-303.

Garrabou, J., Coma, R., Bensoussan, N., Bally, M., Chevaldonné, P. *et al.*, 2009. Mass mortality in Northwestern Mediterranean rocky benthic communities: Effects of the 2003 heat wave. *Global Change Biology*, 15 (5), 1090-1103.

Garrabou, J., Gómez-Gras, D., Medrano, A., Cerrano, C., Ponti, M. *et al.*, 2022. Marine heatwaves drive recurrent mass mortalities in the Mediterranean Sea. *Global Change Biology*, 28 (19), 5708-5725.

Gauff, R.P.M., Davoult, D., Greff, S., Bohner, O., Coudret, J. *et al.*, 2022. Pollution gradient leads to local adaptation and small-scale spatial variability of communities and functions in an urban marine environment. *Science of The Total Environment*, 838, 155911.

Gerovasileiou, V., Voultsiadou, E., 2012. Marine Caves of the Mediterranean Sea: A Sponge Biodiversity Reservoir within a Biodiversity Hotspot. *PLoS one*, 7 (7), e39873.

Gerovasileiou, V., Voultsiadou, E., 2016. Sponge diversity gradients in marine caves of the eastern Mediterranean. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 96 (2), 407-416.

Gerovasileiou, V., Bianchi, C.N., 2021. Mediterranean Marine Caves: A Synthesis of Current Knowledge. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 59, 1-88.

Gerovasileiou, V., Dimitriadis, C., Arvanitidis, C., Voultsiadou, E., 2017. Taxonomic and functional surrogates of sessile benthic diversity in Mediterranean marine caves. *PLoS one*, 12 (9), e0183707.

Giakoumi, S., Sini, M., Gerovasileiou, V., Mazor, T., Beher, J. *et al*., 2013. Ecoregion-Based Conservation Planning in the Mediterranean: Dealing with Large-Scale Heterogeneity. *PLoS ONE*, 8 (10), e76449.

Gómez-Gras, D., Linares, C., de Caralt, S., Cebrian, E., Frleta-Valić, M. *et al*., 2019. Response diversity in Mediterranean coralligenous assemblages facing climate change: Insights from a multispecific thermotolerance experiment. *Ecology and Evolution*, 9 (7), 4168-4180.

Goodwin, C., Rodolfo-Metalpa, R., Picton, B., Hall-Spencer, J.M., 2014. Effects of ocean acidification on sponge communities. *Marine Ecology*, 35 (s1), 41-49.

Grenier, M., Ruiz, C., Fourt, M., Santonja, M., Dubois, M. *et al*., 2018. Sponge inventory of the French Mediterranean waters, with an emphasis on cave-dwelling species. *Zootaxa*, 4466 (1), 205-228.

Grenier, M., Idan, T., Chevaldonné, P., Pérez, T., 2023. Mediterranean marine keystone species on the brink of extinction. *Global Change Biology*, 29 (7), 1681-1683.

Harmelin, J.-G., 1969. Bryozoaires des grottes sous-marines obscures de la région marseillaise, faunistique et écologie. *Téthys*, 1, 793-806.

Harmelin, J.-G. 1985. Bryozoan dominated assemblages in Mediterranean cryptic environments. p. 143. In: *Bryozoa: Ordovician to recent*, C. Nielsen & G. P. Larwood (Eds). Olsen & Olsen, Fredensborg.

Harmelin, J.-G., Vacelet, J., 1997. Clues to deep-sea biodiversity in a nearshore cave. *Vie et Milieu*, 47, 351-354.

Harmelin, J. G., Vacelet J., Vasseur, P., 1985. Les grottes sous-marines obscures : Un milieu extrême et un remarquable biotope refuge. *Téthys*, 11, 214-229.

Harmelin, J.-G., 2000. Ecology of cave and cavity dwelling bryozoans. p. 38–55. In: *Proceedings of the 11th International Bryozoology Association Conference*, C.A. Herrera & J.B.C. Jackson (Eds). Smithsonian Tropical Research Institute, Panama.

Harmelin, J.-G., Boury-Esnault, N., Fichez, R., Vacelet, J., Zibrowius, H., 2003. Peuplement de la grotte sous-marine de l'ile de Bagaud (Parc National de Port-Cros, France, Méditerranée). *Scientific Reports of the Port-Cros National Park*, 19, 117-134.

Idan, T., Goren, L., Shefer, S., Brickner, I., Ilan, M., 2020. Does Depth Matter? Reproduction Pattern Plasticity in Two Common Sponge Species Found in Both Mesophotic and Shallow Waters. *Frontiers in Marine Science*, 7, 610565.

Laborel, J., Vacelet, J., 1958. Étude des peuplements d'une grotte sous-marine du Golfe de Marseille. *Bulletin de l'Institut Océanographique de Monaco*, 55 (1120), 1-20.

Laborel, J., Vacelet, J., 1959. Les grottes sous-marines obscures en Méditerranée. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences*, 248, 2619-2621.

Laborel, J., 1960. Contribution à l'étude des peuplements benthiques sciaphiles sur substrat rocheux en Méditerranée. *Recueil des Travaux de la Station Marine d'Endoume*, 20 (33), 117-173.

Lejeusne, C., Chevaldonné, P., 2006. Brooding crustaceans in a highly fragmented habitat: The genetic structure of Mediterranean marine cave-dwelling mysid populations. *Molecular Ecology,* 15 (13), 4123-4140.

Lejeusne, C., Chevaldonné, P., Pergent-Martini, C., Boudouresque, C.F., Pérez, T., 2010. Climate change effects on a miniature ocean: The highly diverse, highly impacted Mediterranean Sea. *Trends in Ecology & Evolution*, 25 (4), 250-260.

Longo, C., Giménez, G., Miscioscia, F., Corriero, G., 2023. Sponge Fauna of the Apulian Marine Caves (Southern Italy): Current State of Knowledge. *Diversity*, 15 (5), 641.

Manconi, R., Ledda, F.D., Serusi, A., Corso, G., Stocchino, G.A., 2009. Sponges of marine caves: Notes on the status of the Mediterranean palaeoendemic *Petrobiona massiliana* (Porifera: Calcarea: Lithonida) with new records from Sardinia. *Italian Journal of Zoology*, 76 (3), 306-315.

Manconi, R., Cadeddu, B., Ledda, F., Pronzato, R., 2013. An overview of the Mediterranean cave-dwelling horny sponges (Porifera, Demospongiae). *ZooKeys*, 281, 1-68.

Martí, R., Uriz, M.J., Ballesteros, E., Turon, X., 2004. Benthic assemblages in two Mediterranean caves: Species diversity and coverage as a function of abiotic parameters and geographic distance. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 84 (3), 557-572.

Michez, N., Aish, A., Amouroux, J-M., Bellan, G., Bellan-Santini, D. *et al.*, 2017. Inventaire national du patrimoine naturel (INPN). https://inpn.mnhn.fr/habitat/cd_hab/978/tab/especes (Accessed 2 August 2024).

Millet, J., 1977. *Levés des grottes immergées sur les côtes de la Provence, de Carry-le-Rouet à Bandol*. DRASM / Laboratoire de Géologie et de Paléontologie du Quaternaire, Marseille, France.

Nepote, E., Bianchi, C.N., Morri, C., Ferrari, M., Montefalcone, M., 2017. Impact of a harbour construction on the benthic community of two shallow marine caves. *Marine Pollution Bulletin*, 114 (1), 35-45.

Oksanen, J., Blanchet, F-G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R. *et al*., 2018. Vegan: Community ecology package. R package version 2.5-2. https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html (Accessed on July 23, 2024).

Parravicini, V., Guidetti, P., Morri, C., Montefalcone, M., Donato, M. *et al.*, 2010. Consequences of sea water temperature anomalies on a Mediterranean submarine cave ecosystem. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 86 (2), 276-282.

Pérès, J.M., Picard, J., 1949. Notes sommaires sur le peuplement des grottes sous-marines de la région de Marseille. *Comptes Rendus de la Société de Biogéographie*, 227, 42-45.

Pérès, J.M., Picard, J., 1964. Nouveau manuel de bionomie benthique de la Mer Méditerranée*. Recueil des Travaux de la Station Marine d'Endoume* 47, 3-137.

Pérès, J.M., 1967. Mediterranean benthos. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* 5, 449-533.

Pérez, T., Garrabou, J., Sartoretto, S., Harmelin, J.-G., Francour, P. *et al.*, 2000. Mortalité massive d'invertébrés marins : Un événement sans précédent en Méditerranée Nord - Occidentale. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie*, 323 (10), 853-865.

Pérez, T., Wafo, E., Fourt, M., Vacelet, J., 2003. Marine Sponges as Biomonitor of Polychlorobiphenyl Contamination: Concentration and Fate of 24 Congeners. *Environmental Science & Technology*, 37 (10), 2152-2158.

Pérez, T., Ivanisevic, J., Dubois, M., Pedel, L., Thomas, O.P. *et al.*, 2011. *Oscarella balibaloi*, a new sponge species (Homoscleromorpha: Plakinidae) from the Western Mediterranean Sea: cytological description, reproductive cycle and ecology. *Marine Ecology*, 32 (2), 174-187.

Pérez, T., Albenga, L., Starmer, J., Chevaldonné, P., 2016. Biodiversité des grottes sous-marines des îles Marquises : Un

patrimoine naturel caché et méconnu. pp. 287–310. In: *Biodiversité terrestre et marine des îles Marquises, Polynésie française.* Galzin R., Duron S.-D. & Meyer J.-Y. (Eds). Société Française d'Ichtyologie, Paris.

Pérez, T., Díaz, M.-C., Ruiz, C., Cóndor-Luján, B., Klautau, M. *et al.*, 2017. How a collaborative integrated taxonomic effort has trained new spongiologists and improved knowledge of Martinique Island (French Antilles, eastern Caribbean Sea) marine biodiversity. *PLOS ONE*, 12 (3), e0173859.

Pouliquen, L., 1972. Les spongiaires des grottes sous-marines de la région de Marseille : écologie et systématique. *Téthys*, 3 (4), 717-758.

Radolović, M., Bakran-Petricioli, T., Petricioli, D., Surić, M., Perica, D., 2015. Biological response to geochemical and hydrological processes in a shallow submarine cave. *Mediterranean Marine Science*, 16 (2), 305-324.

Rastorgueff, P., Harmelin-Vivien, M., Richard, P., Chevaldonné, P., 2011. Feeding strategies and resource partitioning mitigate the effects of oligotrophy for marine cave mysids. *Marine Ecology Progress Series*, 440, 163-176.

Rastorgueff, P.-A., Chevaldonné, P., Arslan, D., Verna, C., Lejeusne, C., 2014. Cryptic habitats and cryptic diversity: Unexpected patterns of connectivity and phylogeographical breaks in a Mediterranean endemic marine cave mysid. *Molecular Ecology*, 23 (11), 2825-2843.

Rosso, A., Gerovasileiou, V., Sanfilippo, R., Guido, A., 2019. Bryozoan assemblages from two submarine caves in the Aegean Sea (Eastern Mediterranean). *Marine Biodiversity*, 49, 707-726.

Sarà, M., 1968. Stratification d'éponges à recouvrement total dans certaines grottes du niveau superficiel. *Rapport Commission Internationale sur la Mer Méditerranée* 19 (2), 83-85.

Topçu, N.E., Pérez, T., Grégori, G., Harmelin-Vivien, M., 2010. In situ investigation of *Spongia officinalis* (Demospongiae) particle feeding: Coupling flow cytometry and stable isotope analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 389 (1-2), 61-69.

Trygonis, V., Sini, M., 2012. photoQuad: A dedicated seabed image processing software, and a comparative error analysis of four photoquadrat methods. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 424-425, 99-108.

Vacelet, J., 1959. Répartition générale des éponges et systématique des éponges cornées de la région de Marseille et de quelques stations méditerranéennes. *Recueil des Travaux de la Station Marine d'Endoume*, 16 (26), 39-101.

Vacelet, J., 1976. Les spongiaires des grottes sous-marines obscures de la Méditerranée et des régions tropicales. *Pubblicazioni della Stazione Zoologica di Napoli*, 40 (2), 506-515.

Vacelet J., Boury-Esnault N., Harmelin J.G., 1994. Hexactinellid cave, a unique habitat in the scuba zone. *Deep Sea Research Part I*, 41, 965-973.

Vacelet J., Boury-Esnault N., Harmelin J.G., 1995. Carnivorous sponges. *Nature*, 373, 333-335.

Vacelet, J., Boury-Esnault, N., 1996. A new species of carnivorous sponge (Demospongiae: Cladorhizidae) from a Mediterranean cave. *Bulletin de l'Institut royal des Sciences naturelles de Belgique, Biologie*, 66, 109-115.

Vasseur, P., 1984. Les peuplements sessiles sciaphiles des récifs coralliens de la région de Tuléar (S.W. de Madagascar). *Oceanis*, Paris, 10 (1), 51-83.

Verdura, J., Linares, C., Ballesteros, E., Coma, R., Uriz, M.J. *et al.*, 2019. Biodiversity loss in a Mediterranean ecosystem due to an extreme warming event unveils the role of an engineering gorgonian species. *Scientific Reports*, 9 (1), 5911.

Zibrowius, H., 1978. Les scléractiniaires des grottes sous-marines en Méditerranée et dans l'Atlantique Nord - Oriental (Portugal, Madère, Canaries, Açores). *Pubblicazioni della Stazione Zoologica di Napoli,* 40, 516-545.

Zibrowius, H., 1980. Les Scléractiniaires de la Méditerranée et de l'Atlantique Nord - Oriental *Mémoires de l'Institut Océanographique de Monaco*, 11, 284.

2.3. Conclusions & Perspectives

Les résultats de ces travaux illustrent que :

(1) La diversité des conditions morphologiques et environnementales des grottes façonne la composition de leurs communautés benthiques, une relation qui avait déjà été mise en évidence dans plusieurs études (Martí et al., 2004 ; Bussotti et al., 2006 ; Dimarchopoulou et al., 2018 ; Digenis et al., 2022).

(2) Conformément aux patrons de diversité déjà rapportés dans d'autres grottes (Vasseur, 1984 ; Harmelin et al., 1985, 2003 ; Bianchi & Morri, 1994, Pérez et al., 2016 ; Dimarchopoulou et al., 2018), on retrouve les mêmes tendances pour chaque site : les formes érigées, massives et colorées des communautés GSO sont remplacées en GO par des spécimens ou des espèces de taille plus discrète, à tendance encroûtante, moins colorés et de moins en moins abondants. Les éponges dominent les communautés GSO pour toutes les grottes et pour les GO de Jarre et Méjean. Pour les autres grottes, un faciès à bryozoaires représente majoritairement la GO de Figuier tandis que les vers serpulidés (vivants ou morts) dominent celle de 3PP.

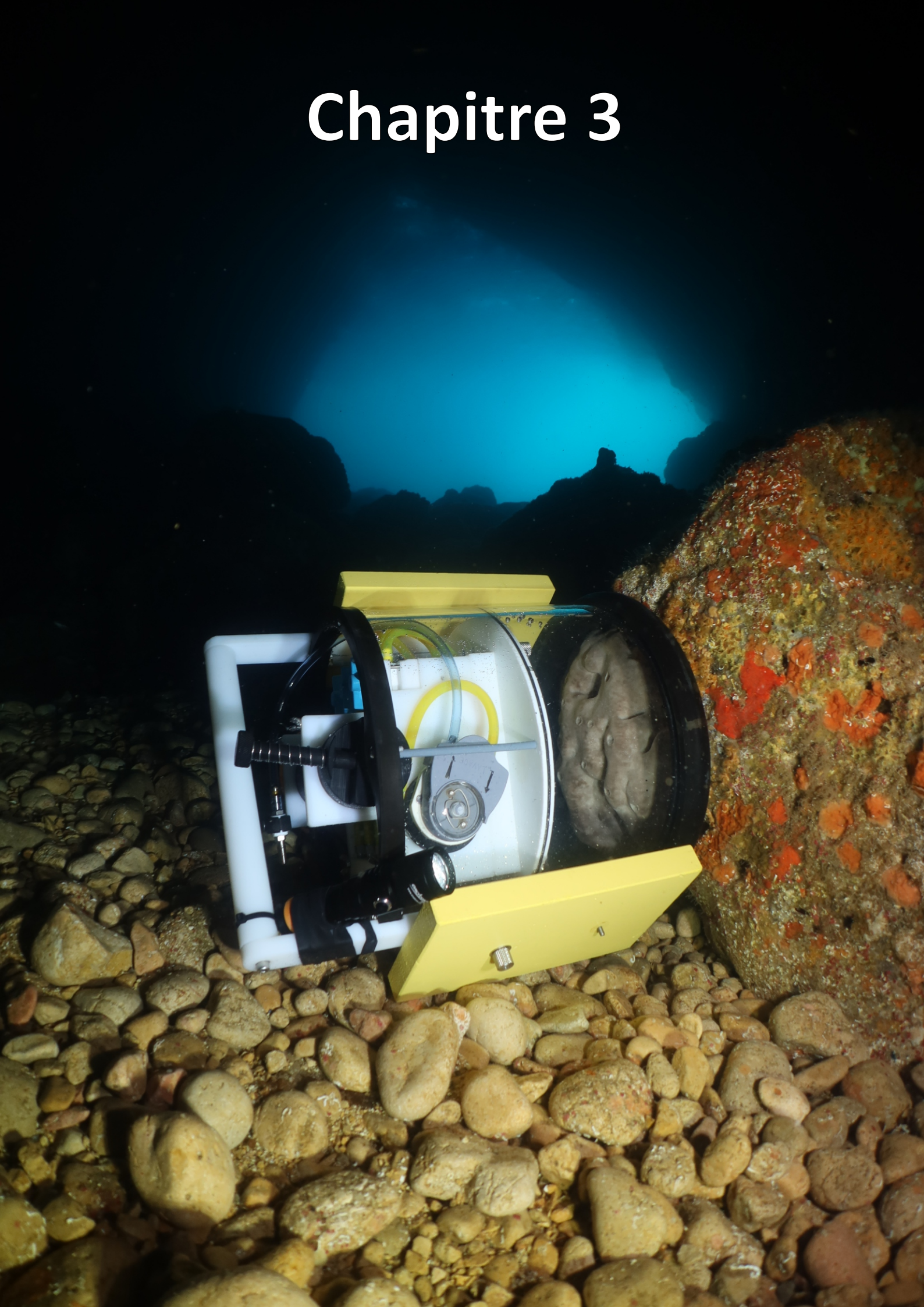
(3) Pour chaque grotte, la communauté GSO est plus diversifiée et abrite beaucoup plus d'espèces que la communauté GO (entre 35 et 46 taxons différents en GSO *vs.* entre 9 et 17 en GO). Chaque grotte présente un assemblage d'espèces qui lui est propre (en diversité et en abondance). La majorité des espèces sont communes à plusieurs grottes mais sont présentes en proportions différentes d'une grotte à l'autre. Les communautés (GSO et GO) de chaque grotte se distinguent entre elles par la présence d'espèces dominantes différentes, renforçant ainsi la singularité de chaque site étudié.

(4) L'évaluation des changements à 5 ans dans les assemblages d'éponges a montré une forte diminution du nombre d'espèces pour chaque grotte, possiblement en lien avec l'augmentation de la fréquence des vagues de chaleur marine au cours de la dernière décennie (Garrabou et al., 2022).

En considérant l'ampleur des changements enregistrés entre 2015 et 2020, et compte tenu des vagues de chaleur marines dévastatrices survenues à l'été 2022 (Grenier et al., 2023), il est crucial de maintenir des suivis temporels de la diversité benthique dans les grottes sous-marines, y compris dans les communautés GO où pour le moment aucun suivi n'est en place. Cette étude souligne donc l'importance des suivis de la biodiversité dans un contexte de changement rapide de l'environnement, en particulier dans les écosystèmes peu résilients tels

que les grottes sous-marines. Des changements dans la composition et/ou l'abondance des espèces sont susceptibles d'impacter les interactions biotiques, y compris celles relevant de la médiation chimique (Lecchini et al., 2014). Parmi les espèces affectées par des changements au cours de mon travail, on trouve celles que Santonja et al. (2018) ont manipulées pour montrer le rôle potentiel des exométabolites d'éponges sur la capacité de reconnaissance de l'habitat des mysidacés. On peut donc imaginer que des réductions d'effectifs, voire même la disparition de certaines espèces des communautés, modifient leur contribution au paysage chimique de l'écosystème. Ce travail justifie donc à la fois des suivis de biodiversité à haute fréquence, mais aussi des méthodes efficaces pour analyser les variations des paysages chimiques marins dans l'espace et dans le temps. Ainsi et seulement ainsi, il sera alors possible de répondre aux questions récurrentes de la société, à savoir mesurer, ou mieux prédire, comment les changements de biodiversité affectent le fonctionnement des écosystèmes et les services écosystémiques.

Chapitre 3



Développement d'un outil de capture de paysages chimiques sous-marins *in situ* (I-SMEL) pour capter la signature chimique de la biodiversité benthique

3.1. Introduction

Afin de mesurer la contribution des organismes benthiques à la composition du paysage chimique marin des grottes, nous avions besoin de mettre au point une technique de prélèvement *in situ* capable de capter rapidement les molécules constitutives de ces paysages. L'objectif était de concentrer les molécules relarguées par les espèces benthiques, de manière aussi instantanée que possible, pour éviter les transformations possibles entre le prélèvement et l'arrivée au laboratoire. Pour cela, l'instrument I-SMEL (*In Situ* Marine moleculE Logger) a été développé au sein du laboratoire. Cet instrument portable et manipulable par un plongeur est doté d'une pompe péristaltique permettant de filtrer un volume d'eau donné (débit, 1L/min) en se plaçant au plus près des organismes ou communautés ciblés. Equipé de 3 filtres SPE (pour *Solid Phase Extraction*), I-SMEL assure au cours de la filtration, une adsorption des molécules diluées dans l'eau.

L'objectif de cette étude était d'évaluer la capacité d'I-SMEL à capter, en un laps de temps compatible avec une plongée, la diversité chimique de l'eau de mer, et d'enregistrer la signature chimique d'espèces ciblées de manière reproductible. Les expériences ont porté sur l'évaluation de la contribution chimique de trois espèces d'éponges massives, représentatives des entrées de grottes et dont les métabolites spécialisés sont bien décrits dans la littérature, à savoir *Aplysina cavernicola*, *Agelas oroides* et *Spongia officinalis* (Bauvais et al., 2017 ; Sauleau et al., 2017 ; Kovalerchik et al., 2020 ; Mauduit et al., 2022 ; Grenier et al., 2024).

Les résultats de ces expériences ont fait l'objet d'un article publié en 2023 :

Mauduit M.#, Derrien M.#, Grenier M.#, Greff S., Molinari S., Chevaldonné P., Simmler C., Pérez T. (2023). ***In Situ* Capture and Real-Time Enrichment of Marine Chemical Diversity.** *ACS Central Science,* DOI : 10.1021/acscentsci.3c00661

co-premières autrices

3.2. Article : Capture et enrichissement *in situ* de la diversité chimique marine

ACS central science

Open Access

This article is licensed under CC-BY 4.0

http://pubs.acs.org/journal/acscii

Article

In Situ Capture and Real-Time Enrichment of Marine Chemical Diversity

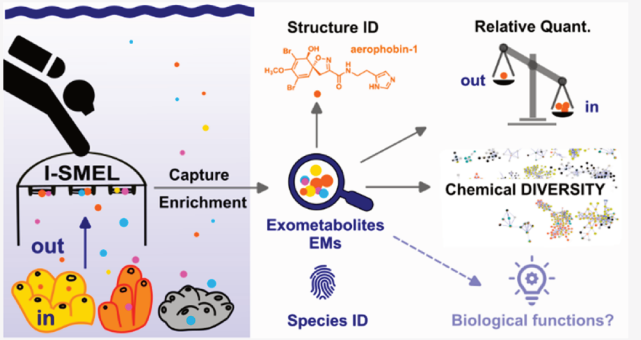
Morgane Mauduit,[†] Marie Derrien,[†] Marie Grenier,[†] Stéphane Greff, Sacha Molinari, Pierre Chevaldonné, Charlotte Simmler,*[,‡] and Thierry Pérez[‡]

Cite This: *ACS Cent. Sci.* 2023, 9, 2084−2095

Read Online

ACCESS | Metrics & More | Article Recommendations | Supporting Information

ABSTRACT: Analyzing the chemical composition of seawater to understand its influence on ecosystem functions is a long-lasting challenge due to the inherent complexity and dynamic nature of marine environments. Describing the intricate chemistry of seawater requires optimal *in situ* sampling. Here is presented a novel underwater hand-held solid-phase extraction device, I-SMEL (In Situ Marine moleculE Logger), which aims to concentrate diluted molecules from large volumes of seawater in a delimited zone targeting keystone benthic species. Marine benthic holobionts, such as sponges, can impact the chemical composition of their surroundings possibly through the production and release of their specialized metabolites, hence termed exometabolites (EMs). I-SMEL was deployed in a sponge-dominated Mediterranean ecosystem at a 15 m depth. Untargeted MS-based metabolomics was performed on enriched EM extracts and showed (1) the chemical diversity of enriched seawater metabolites and (2) reproducible recovery and enrichment of specialized sponge EMs such as aerothionin, demethylfurospongin-4, and longamide B methyl ester. These EMs constitute the chemical identity of each targeted species: *Aplysina cavernicola*, *Spongia officinalis*, and *Agelas oroides*, respectively. I-SMEL concentrated sponge EMs from 10 L of water in a 10 min sampling time. The present proof of concept with I-SMEL opens new research perspectives in marine chemical ecology and sets the stage for further sustainable efforts in natural product chemistry.



INTRODUCTION

What lies in a drop of seawater? To the analytical chemist or marine ecologist, the answer is an ocean of molecules of diverse structures and origins, all diluted in trace quantities. In 1965, Wangersky wrote, "Seawater is a medium of a complexity sufficient to dismay any right-thinking analytical chemist".[1] Nevertheless, ocean scientists have tirelessly tried to unravel its complex nature, measuring how it has changed and interacted with the biosphere since the first life forms appeared on earth.[2] Specialized sensors have been developed for the detection of known chemicals, whether they be natural or xenobiotic.[3] Sample preparation has also evolved to capture diluted (e.g., emerging pollutants) and unknown molecules in aquatic environments using solid-phase extraction (SPE) devices.[4−6] Such seawater enrichment led to complex extracts containing a wide and dynamic range of structurally diverse molecules. Advances in analytical chemistry enabled better chromatographic resolution with more sensitive and accurate mass spectrometry detection.[5,7] As such, untargeted liquid chromatography tandem mass spectrometry (MS^2), with the democratized use of open access software,[8] led to the high-throughput detection of thousands of molecular signals, yielding dense metabolomic data sets interpreted with bioinformatic tools such as those in the Global Natural Products Social Molecular Networking systems (GNPS).[9] When combined with *in silico*-based spectral annotation, these tools enable a deeper description of dense molecular data sets increasing the possible number of characterized chemical features.[10−12] In marine ecology, such metabolomic approaches are deployed to study the composition of dissolved organic matter (DOM), a complex chemical mixture partially derived from metabolic activities of micro- and macroorganisms. Consequently, the field of marine metabolomics has expanded in environmental sciences, marine ecology,[13−15] and natural product chemistry.[16,17] Nevertheless, molecules diluted in seawater remain challenging to identify accurately due to (1) their unknown or multiple biosynthetic origins impeding taxonomical guidance for structural assignment, (2) their possible (bio)transformations, (3) the paucity of available

Received: May 30, 2023
Published: November 8, 2023



Downloaded via AIX-MARSEILLE UNIV on October 24, 2024 at 11:49:40 (UTC).
See https://pubs.acs.org/sharingguidelines for options on how to legitimately share published articles.

© 2023 The Authors. Published by American Chemical Society

https://doi.org/10.1021/acscentsci.3c00661
ACS Cent. Sci. 2023, 9, 2084−2095

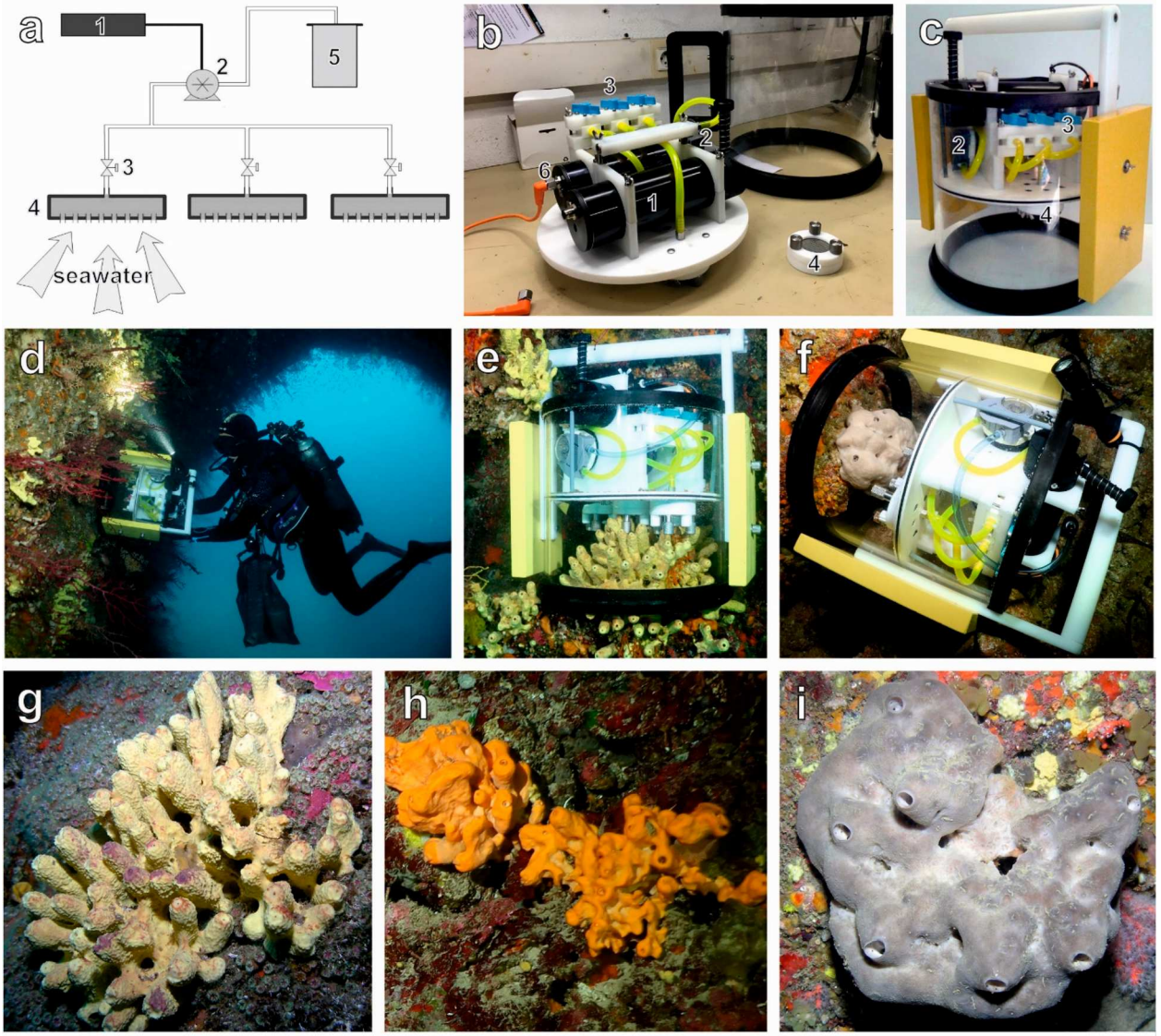


Figure 1. Representation of the I-SMEL instrument and its deployment in a Mediterranean marine ecosystem. Schematic view of the main functioning items (a) and views of the disassembled (b) and assembled (c) instrument (1. electronic controller of the pump, 2. peristaltic pump, 3. valves, 4. SPE ports, 5. pump outlet to connect a flexible tank, and 6. battery). See also S1 for more details. I-SMEL operated by a SCUBA diver in a coralligenous community (d) and then above the studied sponges (e, f). *In situ* pictures of the three targeted sponge species, *Aplysina cavernicola* (g), *Agelas oroides* (h), and *Spongia officinalis* (i).

commercial standards or related spectral data in open access libraries, and (4) their low abundance in collected samples precluding any purification. To date, Wangersky's statement stands because identifying unknown molecules from seawater remains a daunting task.

Benthic marine holobionts are known to produce a plethora of structurally diverse specialized metabolites whose structural class and relative proportions are often taxonomically determined. These molecules contribute to the adaptation of an organism within an ecosystem, being involved in its defensive, growth, and communication strategies. Through their metabolic activities and cellular renewal, marine organisms may release part of their metabolites, hence termed exometabolites (EMs),[18,19] which, either dissolved or bound to particles (e.g., cellular debris), may serve as nutrients and/or may be perceived as cues (i.e., allelochemicals sustaining communication between marine organisms).[20] Deciphering chemical signatures within a pool of marine molecules requires studying the discrete metabolic contributions of marine organisms exuding their metabolites.[15,21] However, once released, individual marine EMs are added to a pool of other chemicals, defining complex chemical seascapes equivalent to busy highways of putative allelochemicals. In light of the multiple transformations that diluted molecules may undergo in seawater, the composition of marine chemical seascapes is constantly changing in time and space.[20,21] Consequently, techniques that enable immediate capture of molecules upon their release before extended biotransformations occur are critical to better understand the origins of such molecules and their functional roles. Such techniques would greatly support ecologists in their quest to identify key molecules that structure communication between organisms, thus providing arguments for the preservation of marine ecosystem functions. The structural diversity of marine specialized metabolites has also inspired drug discovery efforts. However, the global concern for biological resources management and biodiversity con-

https://doi.org/10.1021/acscentsci.3c00661
ACS Cent. Sci. 2023, 9, 2084−2095

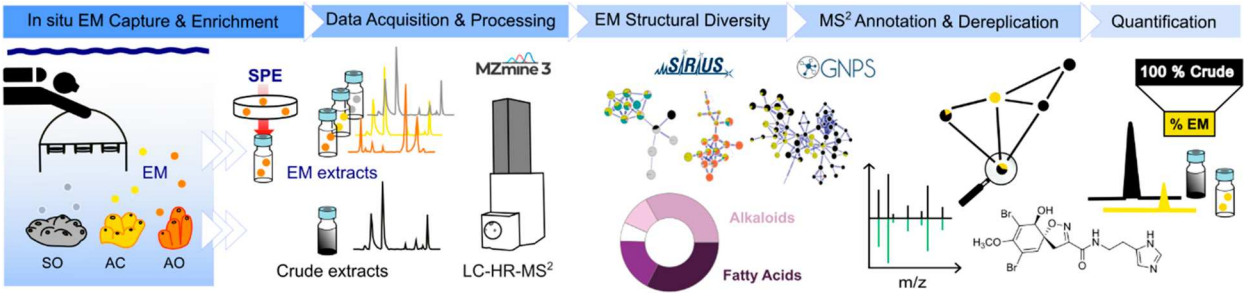


Figure 2. Sample preparation and analytical pipeline to characterize the structural diversity of captured marine exometabolites (EMs) and determine the proportion of sponge-specialized EMs. SO: *Spongia officinalis*. AC: *Aplysina cavernicola*. AO: *Agelas oroides*. HR-MS^2: High-resolution tandem mass spectrometry. SPE: Solid-phase extraction.

servation[22] has significantly slowed down natural product chemistry in the past, whereas attempts to cultivate marine organisms have not provided sustainable biosourcing yet. Therefore, the idea of alternative SPE approaches to sustainably access marine specialized EMs under natural conditions emerged[23−28] with the objective of trapping the molecules of interest without harvesting the producing organisms.

The present work aims at evaluating the ability of a hand-held underwater SPE instrument to rapidly capture molecules within chemical seascapes and enrich specialized EMs released by keystone marine species in their ecosystems. This instrument has been named I-SMEL (In Situ Marine moleculE Logger) (Figure 1). It was deployed and tested in the coralligenous, a Mediterranean ecosystem similar in many ways to tropical coral reefs in terms of species richness and functionality. The shaded parts of this ecosystem are made up of species assemblages dominated by sponges, which are prolific producers of specialized metabolites.[29,30] Our experiments targeted three common and rather large species, whose specialized metabolites are well described in the literature, namely, *Aplysina cavernicola* (Vacelet, 1959), *Agelas oroides* (Schmidt, 1864), and *Spongia officinalis* (Linneus, 1759).[19,31−34] Following *in situ* sampling and building on previous work,[15,19,35] our analytical workflow (Figure 2) combines untargeted MS-based metabolomics, a description of molecular diversity using molecular class predictions with CANOPUS,[36,37] and metabolite dereplication through molecular networking.[9,38,39]

RESULTS

Presentation of the Instrument. I-SMEL was designed to (1) be easily handled underwater by a single user at different depths accessible by SCUBA diving, (2) facilitate the enrichment of molecules by filtering large (>10 L) volumes of seawater in a delimited zone within a short time (10−30 min), and (3) be versatile in its use depending on the configuration of the ecosystem to be sampled. The instrument is made of six primary components organized in two equal parts (Figure 1a−c, S1). The upper one encloses all of the electronics (peristaltic pump and its controller), tubing, and valves. The lower part is the 10 L chamber to be placed above the targeted benthic community or species (Figure 1d−f). Three separate supports for the SPE disk are fixed on the top of this chamber and can be replaced underwater (S1). They are individually connected to the peristaltic pump via independent valves, allowing three *in situ* captures either simultaneously or sequentially. I-SMEL can be placed in the water column, on horizontal bottoms, overhangs, or walls of different inclinations, and even on the ceiling of underwater caves. Once in place, seawater filtration starts by activating the pump with a simple push button at a defined duration and flow rate (here 1 min at 1 L/min), preset before the dive. SPE disks were preferred over more widely used cartridges as they are more appropriate when the water to be filtered is charged with different types of particulates. They also offer a larger surface of exchange, allowing faster flow rates to be applied, compatible with shorter sampling time. The disks, herein used, were made of one layer of glass fiber to retain particles and one layer of divinylbenzene polymer (DVB) to adsorb dissolved metabolites. DVB was chosen due to its demonstrated capacity to adsorb a wide range of nonpolar and semipolar DOM or specialized EMs.[40,41]

***In Situ* Experiments.** Three types of underwater experiments were performed. In the first type (EXP1), I-SMEL was deployed in the coralligenous ecosystem without targeting any benthic organism in particular. EXP1 aimed at concentrating molecules defining an average chemical seascape (ACS) of the target ecosystem. Three replicate captures were performed randomly by cumulatively filtering 10 L of water over five different communities. In the next experiments (EXP2-3), I-SMEL was placed above the targeted sponge species: *Aplysina cavernicola*, *Spongia officinalis*, and *Agelas oroides*. The objective of EXP2 was to concentrate sponge-specialized EMs on the SPE disks and thus evaluate whether I-SMEL could capture and enrich any EM if released by sponges. Each collection replicate of EXP2 accumulated a total of 10 L filtered on 3 DVB disks simultaneously by moving over five different sponge individuals. EXP3 was designed to identify EMs that can be reproducibly recorded and to assess individual variability in sponge EM production. Each sampling replicate of EXP3 was performed by filtering 10 L of water on three DVB disks simultaneously over the same individual sponge. A total of three independent capture replicates was obtained per sponge species (see S2 and S3). Samples of the sponge were taken in order to prepare crude extracts that served as analytical references for the identification of specialized metabolites.

Untargeted Detection of Chemical Features by Tandem Mass Spectrometry. Back in the laboratory, metabolites adsorbed on SPE disks were eluted by using an automatic SPE instrument. Individual disk extracts were pooled per capture replicate, yielding a total of three replicates of the EM extracts for each series of experiments. All extracts were analyzed by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight tandem mass

https://doi.org/10.1021/acscentsci.3c00661
ACS Cent. Sci. 2023, 9, 2084−2095

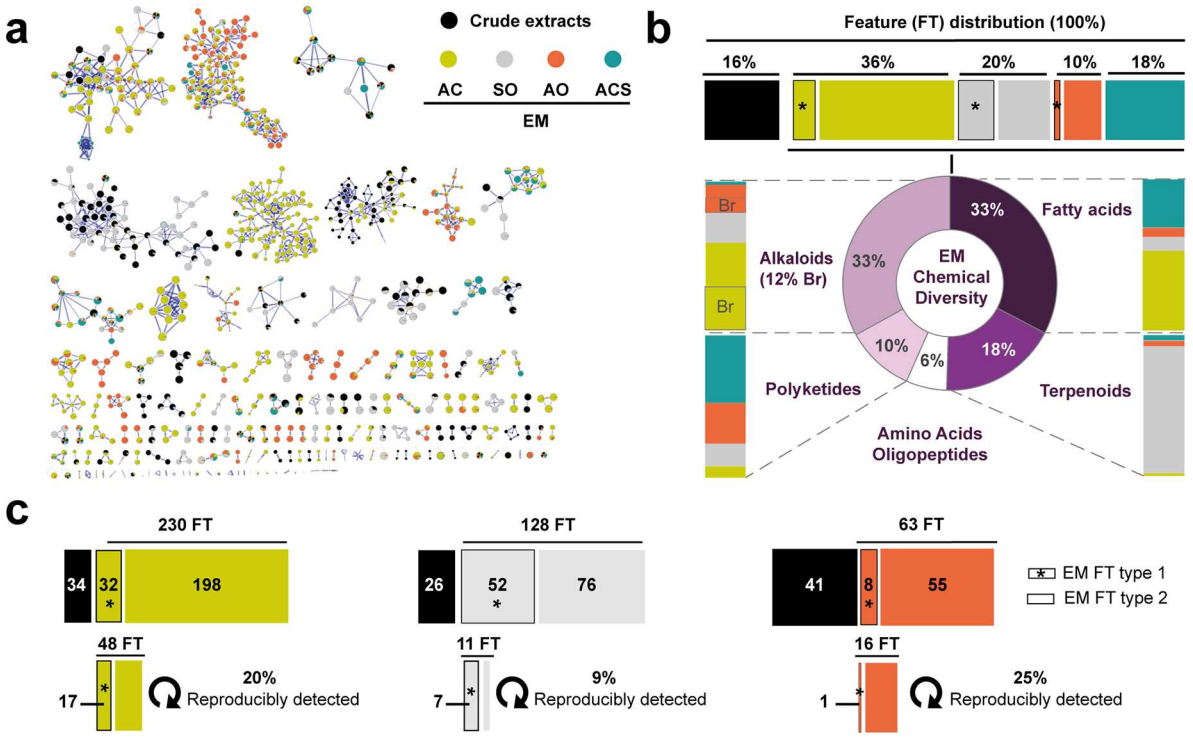


Figure 3. Chemical diversity of captured EMs. (a) Feature-based molecular network with ion identity containing 805 nodes organized in 137 spectral families (see also S4). The size of the node is proportional to the retention time. The pie chart represents relative intensities of features (FT) in each sample (ACS = average chemical seascape, AO = *Agelas oroides*, SO = *Spongia officinalis*, and AC = *Aplysina cavernicola*). (b) FT distribution and chemical diversity based on natural product pathway probabilities (>0.8) determined with CANOPUS.[42] Sponge EM extracts contained three types of FT: identical to those from their crude extract (type 1), uniquely found as sponge-specific EMs (type 2), and clustering with features from ACS (type 3 in green). (c) Total number of FT for each sponge species and their distribution showing reproducibly captured EMs in sampling replicates (EXP2-3).

spectrometry detection with positive electrospray ionization. For comparison, all of the data were acquired during the same analytical sequence. The subsequent raw data were processed with MZmine 3[8] to obtain a matrix characterized by a comparative listing of chemical features (MS^1) with their corresponding ion intensities distinguished by their mass-to-charge ratio (m/z) and retention times. A matrix containing 2248 unique mass-retention time features with their ion intensities was subjected to GNPS together with the spectral MS^2 data. Subsequently, a feature based molecular network[38] (FBMN, Figure 3a) with ion identity[39] was built to cluster together ion features (nodes) harboring similar MS^2 spectra based on cosine scores (edge). This analysis was combined with a systemic interrogation of GNPS associated reference libraries. FBMN expands the interpretability of untargeted MS^2 as it allows visualization of the spectral diversities and similarities within the studied data set, thus representing the chemical diversity of captured molecules.

Characterization of EM Chemical Diversity and Variability Using FBMN. A total of 805 features were distributed in 137 spectral families (clusters; Figure 3a). With SIRIUS,[10] we additionally focused on higher confidence assignment of molecular formulas in each targeted FBMN spectral family and looked into the distribution of predicted chemical class with CANOPUS.[36,42] This led to a deeper molecular annotation of our data sets to describe the chemical diversity of collected molecules (Figure 3b). Sponge EM extracts contained three types of features: identical to those from their corresponding sponge extract (type 1), uniquely found as sponge-specific EMs (type 2), and clustering with features from ACS (in green, type 3). EM extracts from repeated seawater filtering around each species displayed distinct molecular compositions. In particular, type 1 features clearly suggested the presence of sponge-specialized metabolites as EMs. Type 2 features revealed the presence of EMs either structurally related to sponge-specialized metabolites or resulting from metabolic activities of other syntopic species (e.g., corals, bryozoans, and free-living micro-organisms) within the sponge community. Among all three species, *A. cavernicola* provided the highest number of detected features (230 features, Figure 3c). EMs obtained above *A. cavernicola* and *A. oroides* were found to be rich in alkaloids, including brominated ones, in addition to fatty acids and polyketide derivatives. Both sponge species are known to produce bromotyrosine spiroisoxazolines and bromopyrroles.[19,31] Likewise, EMs collected around *S. officinalis*, known to produce diverse furanoterpenes and other terpenoids,[33] were found to belong principally to the terpenoid structural class (Figure 3b). Overall, the accumulated captures (EXP2) recorded 52 EM features identical to those of *S. officinalis* specialized metabolites, 32 for *A. cavernicola*, and only 8 for *A. oroides* (Figure 3c). When focusing on reproducibly detected features (EXP2-3), these numbers decreased to 7 for *S. officinalis*, 17 for *A. cavernicola*, and only 1 for *A. oroides*. Finally, type 3 features accounted for 18% of all assigned signals, mainly in the fatty acid and polyketide structural classes. Such ACS features highlighted the presence of coralligenous EMs and other molecules that are not specifically related to the targeted sponge species. I-SMEL has thus demonstrated its capacity to capture a high chemical diversity around sponge species, with

https://doi.org/10.1021/acscentsci.3c00661
ACS Cent. Sci. 2023, 9, 2084−2095

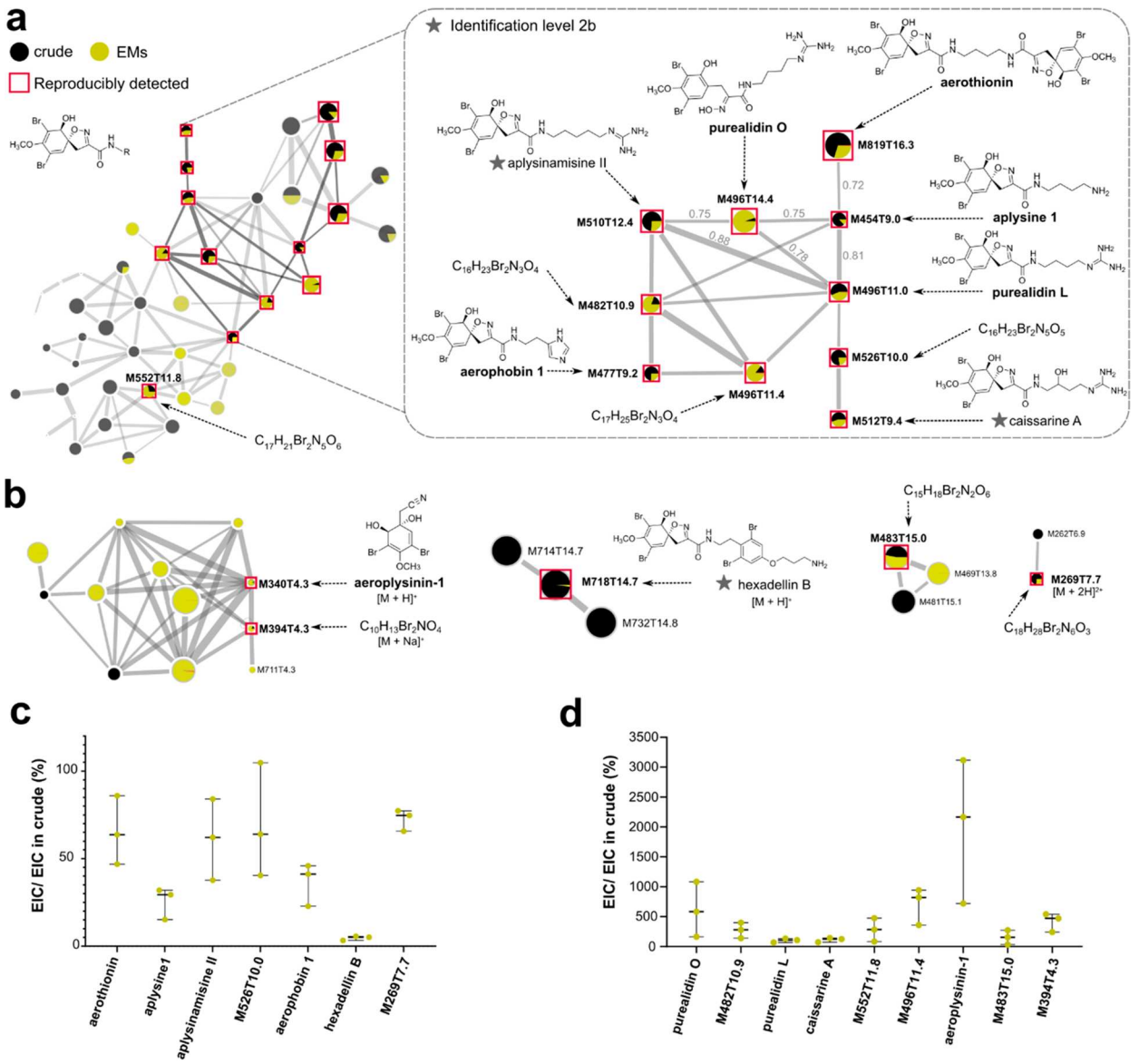


Figure 4. Spectral families and structural diversity of reproducibly enriched *A. cavernicola* specialized EMs. (a) Focus on the major bromo-spiroisoxazoline spectral family with the reproducibly detected features used for structural dereplication. Each feature is identified by its *m*/*z* (M) and retention time (T). The pie chart represents relative intensities of features in each sample. (b) Focus on four other spectral families, each containing one brominated alkaloid detected in both crude and EM extracts (confidence of identification level 2b for molecules associated with a star). (c and d) The relative concentration of each annotated EM was determined by measuring the area under the curve (AUC) of extracted ion chromatograms (EIC) in each extract and using the crude extract as reference (100%). (d) Metabolites more concentrated in EM extracts than in the crude extracts.

several specialized EMs defining the chemical fingerprint of each species' surrounding seawater.

Identification and Relative Proportion of Captured Sponge-Specialized EMs. To determine the structural identity and proportion of reproducibly captured specialized EMs for each sponge species, MS-based dereplication was performed using spectral data available either from previously identified compounds or in GNPS libraries, showcasing the usefulness of raw data sharing.[9] When precise structural identification could not be achieved due to the lack of available reference raw data, we performed manual annotation of MS^2 spectra corroborated with information disclosed in publications and with *in silico* prediction of molecular structures from MetFrag or CSI:FingerID embedded in SIRIUS.[10−12] Metabolites identified using library match and *in silico* analyses are proposed with level 2b confidence as described previously.[43] The proportion of each annotated EM was determined by measuring the area under the curve (AUC) of extracted ion chromatograms (EIC) in each extract from EXP2, using the crude as reference.

The sponge *A. cavernicola* was found to reproducibly release the highest number of specialized EMs. They corresponded to 16 brominated alkaloids (Figure 4), distributed in 5 spectral families. Six were previously described as EMs in aquarium experiments.[19] In adequation with previous results, the most abundant bromo-spiroisoxazoline alkaloids characterizing the crude extract (Figure S5.1) were reproducibly detected as EMs, namely, aerothionin, purealidin L, aerophobin 1, aplysine 1, aplysinamisine II, and aeroplysinin-1. The nine other metabolites were either putatively identified by analyzing

https://doi.org/10.1021/acscentsci.3c00661
ACS Cent. Sci. 2023, 9, 2084−2095

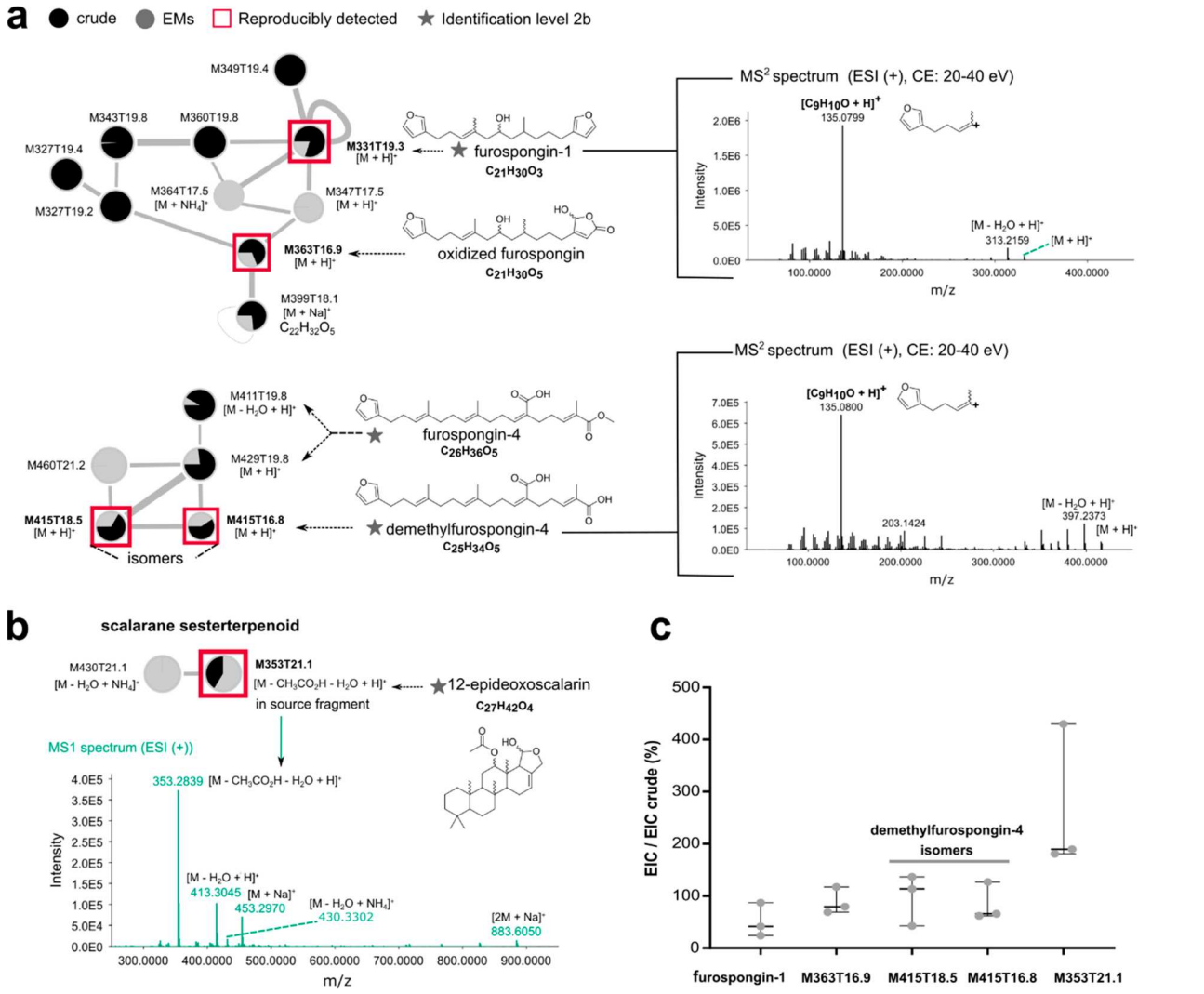


Figure 5. Spectral families of reproducibly released *Spongia officinalis* EMs. Each feature is identified by its m/z (M) and retention time (T). The pie chart represents relative intensities of features in each sample. (a) Focus on the furanoterpenoid spectral families with MS^2 spectra of putative furospongin-1 and demethylfurospongin-4 showing a characteristic fragment at m/z 135.0800 corresponding to the furan fragment $[C_9H_{10}O + H]^+$. Structural dereplication was performed in agreement with previously reported data[33,44] (confidence level 2b). (b) M353T21.1 is an in-source fragment of the same molecule as M430T21.1, a scalarane sesterterpenoid. (c) The relative concentration of each annotated EM was determined by measuring the area under the curve (AUC) of extracted ion chromatograms (EIC) in each extract (EXP2) and using the crude extract as a reference (100%).

their MS^2 spectra with regard to data available in the literature (Figure S6.1)[43] or simply annotated with their molecular formula. Therefore, I-SMEL succeeded in concentrating a series of yet unknown bromotyrosine derivatives. Reproducibly detected specialized EMs belong to two groups based on their relative proportions: those with similar or lower concentration as in the crude extract (Figure 4c) and those whose concentration was significantly higher (Figure 4d). Among them, aeroplysinin-1, the most polar EM, was found to be present in the highest proportion. Such a difference could have been due to (1) different SPE extraction procedures between EM and crude extracts and (2) a higher solubility of aeroplysinin-1 favoring its enrichment from seawater.

Around *Spongia officinalis* (SO), seven features representing seven molecules were reproducibly identical to those detected in the crude extract. Their MS^2 spectra belonged to five distinct spectral families (Figure 5). The most representative ones encompass the highest number of MS^2 spectra related to furanoterpenoids, as previously reported (Figure 5a).[33] In this spectral family, furospongin-1, one of the most abundant specialized metabolites in *S. officinalis* (Figure S5.2), and an oxidized furospongin M363T16.9, were reproducibly identified as specialized EMs. Two isomers of dereplicated demethylfurospongin-4[33] were also reproducibly detected in another spectral family encompassing furospongin-4, their methylated analogue. Another reproducibly released EM, M353T21.1, was found to be an in-source fragment ($[C_{27}H_{42}O_4 - CH_3CO_2H - H_2O + H]^+$, m/z 353.2840) of the same molecule as M430T21.1 ($[C_{27}H_{42}O_4 - H_2O + NH_4]^+$, m/z 430.3317), annotated as 12-epideoxoscalarin, which was previously reported in *Spongia lamella* (Figure 5b, Figure S6.2).[44] The last two metabolites were putative fatty acid derivatives (Table S6.2), and thus, they were not considered *stricto sensu* as specialized metabolites. The relative proportion of the oxidized furospongin M363T16.9 as well as both demethylfurospongin-4 isomers was found to be equivalent to those in the crude

https://doi.org/10.1021/acscentsci.3c00661
ACS Cent. Sci. 2023, 9, 2084−2095

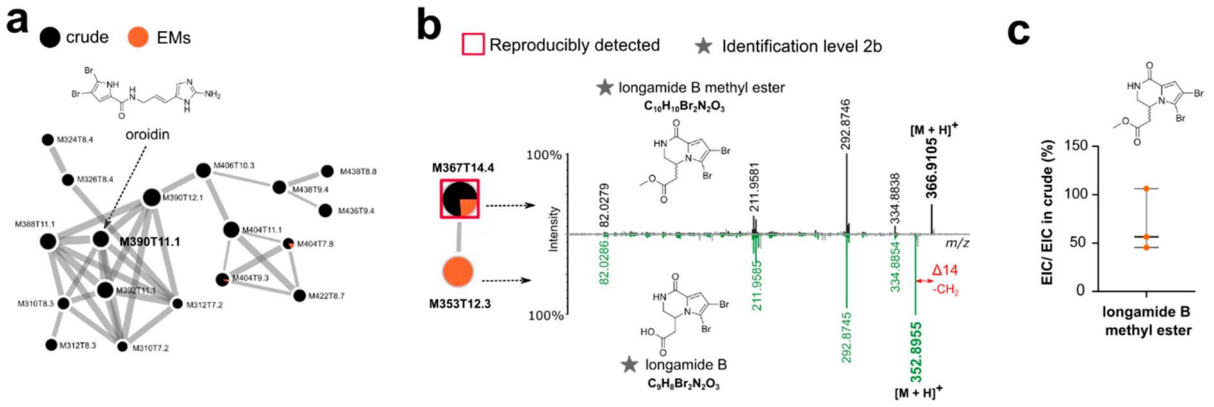


Figure 6. Spectral families representing the reproducibly enriched specialized EM from *Agelas oroides*. Each feature is identified by its *m*/*z* (M) and retention time (T). The pie chart represents the relative intensities of features in each sample. (a) Main spectral family related to AO and containing the oroidin MS^2 spectrum. (b) Putative longamide B methyl ester, clustering with longamide B, is reproducibly detected as EM around the sponge (confidence level 2b). (c) The relative concentration of such EM is twice lower on average than in the crude extracts.

extracts (Figure 5c), whereas the relative concentration of M353T21.1 was on average twice as high in the EM extracts, emphasizing the enrichment capacity of I-SMEL.

Among the bromopyrrole 2-amino-imidazole derivatives reported to be produced by *A. oroides* (AO), oroidin is by far the most abundant (Figure S5.3). In both the cumulative captures (EXP2) and individual replicates (EXP3), oroidin was not recovered as a specialized EM (Figure 6a). Only one brominated feature was repeatedly detected as EM (Figure 6b). Its molecular formula was calculated as $[C_{10}H_{10}Br_2N_2O_3 + H]^+$ (*m*/*z* 366.9105). Structural dereplication of its MS^2 spectrum by manual annotation and using either SIRIUS or MetFrag[10,11] led us to propose longamide B methyl ester (syn: hanishin methyl ester) as a putative structure (Figure S6.3). This compound was previously described in different *Agelas* species[31,45,46] and clustered with the sporadically detected unique EM feature M353T12.3 ($[C_9H_8Br_2N_2O_3 + H]^+$, *m*/*z* 350.8974) assigned as longamide B.[45] The relative concentration of longamide B methyl ester was found to be on average twice lower in the EM extracts than in the crude extracts.

DISCUSSION

Some 40 years ago, the first submersible apparatus was designed to capture metabolites around corals[23] but was operated only in shallow water and with a relatively long sampling time, which together with the technical limitations of the time restrained the scope of its applications. Nevertheless, such a record illustrates clearly the persistant need for versatile *in situ* instruments capable of concentrating efficiently diluted metabolites in seawater. As opposed to previously developed *in situ* instruments, I-SMEL is hand-held and can thus travel with scientific divers. It can be deployed at various depths (here 15−20 m), under different configurations, allowing experiments to be perfomed in a time frame compatible with SCUBA diving. I-SMEL does not need to stay flat or be maintained on a flat surface to work. Collectively, these technical characteristics make I-SMEL stand out compared to previously developed *in situ* devices.[23,26,28]

The results presented herein showcase the ability of I-SMEL to recover structurally diverse metabolites including specialized EMs from the seawater surrounding a benthic ecosystem. We demonstrated that implementing I-SMEL followed by the described extraction process afforded samples significantly enriched in specialized EMs produced by sponges, such as brominated alkaloids and furanoterpenoid derivatives. Collectively, these EMs constitute the seawater chemical fingerprint of targeted sponge species, as also observed by ^1H NMR analyses (Figure S7). The diversity and proportion of recovered specialized EMs were found to greatly differ between species but also between biological replicates of the same species, prefiguring an individual varability in EM production that would require a more thorough evaluation, as has been done for several other examples of sponge global metabolite production.[47,48] Also, only a fraction of the known specialized metabolites characterizing a sponge crude extract were recovered as EMs. Some of them might have remained undetected due to (1) their presence in trace quantities below the detection threshold or (2) potential ionization suppression attributed to residual sea salts. A significant part of those specialized metabolites is also likely retained within the sponge body mass as a potential defense mechanism against predators or competitors.[49]

For the two most productive species studied here, *S. officinalis* and *A. cavernicola*, the most abundant specialized metabolites characterizing the crude extract were reproducibly recovered as EMs: furospongin-1 and demethylfurospongin-4 for *S. officinalis* and aerothionin and aerophobin-1 for *A. cavernicola*. This was not the case for *A. oroides*, considering that the most abundant specialized metabolite, oroidin, was not recovered as an EM. Instead, longamide B methyl ester, produced by different *Agelas* species, was reproducibly detected. EMs structurally deriving from well-known specialized metabolites were also sporadically detected around each of the three sponge species. Such results suggest that part of their released specialized metabolites may have been readily (bio)transformed before their capture. Possible (bio)-transformation could produce more polar, water-soluble compounds, as observed with longamide B around *A. oroides* but also with oxidized furanoterpenes around *S. officinalis*. In line with such observations, aeroplysinin-1, a well-known bioactive bromotyrosine derivative,[50] was proportionally more abundant in seawater extracts. To that extent, studying marine EMs helps revisit marine natural product chemistry, raising new questions regarding structural stability and water solubility and opening new prospects for the discovery of natural products. Even though this instrument has so far been tested only on keystone Mediterranean sponge species, I-SMEL could easily be deployed to explore the chemical diversity of EMs

https://doi.org/10.1021/acscentsci.3c00661
ACS Cent. Sci. 2023, 9, 2084−2095

that might be released by other marine organisms (e.g., corals and algae).

The results gathered herein confirmed that I-SMEL can be used as a noninvasive/destructive technique facilitating the standardized sampling of seawater to efficiently capture, rapidly enrich, and thereafter monitor over time and space the diversity of EMs released by marine organisms. Using I-SMEL will enable the progressive mapping of chemical seascapes in various marine ecosystems and the qualitative and quantitative monitoring of EM production by specific marine organisms. The chemical knowledge gained from such future time-series studies could illuminate metabolic changes in the composition of the water column above benthic marine organisms. It may thus allow the highlighting of the chemical fluxes regulating organismal interactions (e.g., spawning, organism movements, and settlements) but also resolve new aspects of physiological responses, some of them induced by environmental stressors (e.g., pollutants and ocean warming).[51] Moreover, stress biomarkers released in response to environmental disturbances could be directly captured with I-SMEL without manipulation or the destruction of marine organisms, thereby providing noninvasive means of early detection and monitoring.[14,52] These applications represent game-changing advancements in the fields of marine and chemical ecology. I-SMEL could also be deployed to access and track *in situ* the distribution of dilute anthropogenic pollutants,[53] opening new perspectives of investigations in the field of environmental chemistry. When combined with a thorough untargeted metabolomics workflow, the deployment of I-SMEL will assist in gaining knowledge of key marine ecosystems, including those harboring endangered species such as *Spongia officinalis*.[54]

In conclusion, geographical and seasonal investigations of enriched EMs from a given ecosystem become possible with I-SMEL. Results from such studies will provide crucial insights into the structuration of chemical mediation that underpins ecological interactions.[21] Such results will also guide chemists in identifying the most productive periods during which appropriate seawater sampling above targeted marine organisms will provide higher quantities of extracts compatible with natural product discoveries. New generations of the easy-to-build I-SMEL will be of different sizes and autonomous and/or remotely operated and can be produced in order to adapt to different needs and logistical settings. With a collaborative network of marine researchers, these I-SMELs could be deployed simultaneously in different ecosystems, providing synchronized knowledge on chemical seascapes.

METHODS

***In Situ* Solid Phase Adsorption Instrument.** The main functioning items are contained in a 30-cm-diameter, 32-cm-high plexiglass cylinder (total volume 22 L). Most technical elements are in the upper part (Figure 1b,c), while the lower part forms a 10 L chamber holding three SPE supports (Figure 1a−c, S1). The upper part consists of an ERDEMIL peristaltic dosing pump coupled to a Maxon microreductor motor, powered by a 12 V, 250 mA rechargeable NiMH battery and controlled by a Pic16F electronic card. Such a system ensures repeatable and precise peristaltic pumping and can be operated regardless of the external pressure, thus without the diving depth affecting the volume of pumped seawater. All of these elements are contained in custom-built waterproof stainless steel housings. The microcontrollers on the electronic card allow the pumping parameters (i.e. pumping duration, volume of pumped seawater, and therefore the flow rate) to be set. The parameters are set before the dive, and the exact delivered volume can be checked at the beginning of each dive by connecting a flexible tank to the pump outlet (Figure 1a, S1). A defined volume of seawater can be pumped repeatedly as many times as needed. A simple waterproof magnetic push button triggers pumping (short press) whatever the position of the device. The pump is connected to three suction ports that can be opened or closed by small valves operated underwater. Each suction port is equipped with a filter holder in which a stainless steel grid with a 2 mm mesh retains the coarsest particles, with the SPE disks being right behind the grid. With the exception of the stainless steel grids and the plexiglass chamber, all of the components in contact with the pumped seawater are made of PTFE.

***In Situ* Adsorption and Concentration of Sponge Exometabolites (EMs).** *In situ* experiments were performed by SCUBA diving in the Marseille area in Calanques National Park. This study targeted the coralligenous community distributed at the entrance of underwater caves. During each dive, the instrument was placed above an assemblage of species that are, under such conditions, dominated by marine invertebrates, mostly sponges, but also corals and bryozoans. DVB disks (47 mm Atlantic Disk Biotage) were mounted on the SPE supports after being individually conditioned with 10 mL of ethyl acetate (EtOAc), followed by 10 mL of methanol (MeOH) and ending with 10 mL of distilled water (H_2O). The first experiment aimed at obtaining the average chemical seascape of this marine ecosystem by performing a 10 min capture in total, with I-SMEL being moved at least five times in close contact with random parts of the ecosystem (EXP1). A second series of 10 min captures (10 L of pumped seawater) was performed by targeting the sponges *Aplysina cavernicola*, *Spongia officinalis*, and *Agelas oroides* in order to obtain three average seascapes respectively enriched in the exometabolites of these three species (EXP2). To maximize our chance to trace the impact of each target species on the chemical seascape, 2 L of seawater (2 min duration) was repeatedly sampled above 5 parts of the ecosystem dominated by each species. Each capture replicate was performed with all valves opened on the three DVB disks to yield one enriched sponge EM extract. A total of three extract replicates were produced for each sponge species. The last type of experiment (EXP3) was performed to get biological replicates and therefore preliminarily assess the individual variability by realizing three replicate captures of 10 min each on different specimens of sponge species (sampling Scheme S2).

Extraction of *In Situ* Adsorbed and Enriched EMs. The extraction of metabolites adsorbed on the DVB disks was processed on an automatic solid phase extraction instrument (Dionex Autotrace 280, Thermo Scientific). The disks were washed with 30 mL of deionized H_2O as the desalting step. EM extraction was performed by eluting the DVB disks with 10 mL of MeOH, followed by 10 mL of MeOH/EtOAc (50:50 v/v) and ending with 10 mL of EtOAc. A 30 mL EM extract was obtained, evaporated to dryness (SpeedVac, Savant SPD111 V), rediluted in 1 mL of MeOH MS-grade, and kept for at least 2 h at −20 °C to precipitate the residual sea salts. After centrifugation (5 min at −4 °C, 14K rpm), the supernatants were filtered on PTFE luer-lock filters (0.22 μm, cat. no. 26142, Restek). Extracts from the three DVB disks used per capture experiment were pooled to produce one EM extract replicate, thus yielding three ACS extracts (EXP1) and

https://doi.org/10.1021/acscentsci.3c00661
ACS Cent. Sci. 2023, 9, 2084−2095

three EM extracts per sponge species and type of experiment (total 18 EM extracts EXP2-3).

Preparation of Sponge Crude Extracts. All samples were collected in agreement with French national regulations and the Nagoya Protocol, processing with a French national declaration under receipt no. TREL2022990S I 392 and the internationally recognized certificate of compliance (IRCC) number ABSCH-IRCC-FR-253848-1 available from the Access and Benefit-Sharing Clearing-House (https://absch.cbd.int/about/). Soon after collection, all sponges were transported in sealed jars of seawater without exposure to air. In the laboratory, sponges were flash frozen in liquid nitrogen, stored at −80 °C, and then freeze-dried for at least 48 h. The dried sponge was reduced to a thin powder with a knife mill for domestic use. Approximately 1 g of each sponge powder was mixed with 10 mL of MeOH LC-grade and sonicated for 30 min (ultrasonic cleaner TUC-70). The mixture was filtered under vacuum, and the remaining sponge powder was rinsed with 10 mL of MeOH. Crude salted extracts adsorbed on 100 mg of C-18 powder (Polygoprep 60-50, Macherey-Nagel) were further processed on Strata C18-E SPE cartridges to remove residual sea salts. Extracts were washed with 18 mL of LC-MS-grade water and then eluted with 12 mL of MS-grade MeOH, thereby leading to the production of desalted sponge crude extracts. These extracts were used as analytical references.

UHPLC-UV HR-MS Acquisition. Sponge crude extracts were prepared at 0.2 mg·mL^{-1} in MS-grade MeOH and filtered on PTFE luer-lock filters (0.22 μm, catalog no. 26142, Restek) prior to injection. Chromatographic separations were achieved on a Luna Omega Polar C18 UHPLC column (Phenomenex), maintained at 42 °C, with an elution gradient composed of (A) water and (B) MeCN both with 0.1% formic acid under the following conditions: from 10% (B) during 2 min to 29.5% (B) at 13.3 min and then to 95% (B) at 17 min and during 4.5 min (flow rate 0.45 mL·min^{-1}, injection volume 2 μL). Mass spectrometry detection parameters (ESI-Q-ToF, Bruker Impact II) in ESI positive mode were set as follows: nebulizer gas N_2 at 3.5 bar; dry gas at 12 L·min^{-1}; capillary temperature at 200 °C; and voltage at 4500 V. MS/MS acquisition mode was set with a scan rate of 8 Hz (full scan from 50 to 1200 m/z) and a mixed collision energy of 20−40 eV (50% time at each collision energy, stepping mode). A sodium formate/acetate solution forming clusters in the studied mass range was used as the calibrant and automatically injected before each sample for internal mass calibration, ensuring a precision of m/z lower than 2 ppm in the mass range. Extracts were randomly injected to integrate any memory effect on the column and time-dependent MS drift. Pooled samples, injected every six samples from the beginning to the end of the series, were used for further ion filtering. See S6 for UHPLC-MS data processing with MZmine 3.2.8.[55]

Molecular Networking and Analysis of Chemical Diversity. The feature quantification table and the corresponding list of MS^2 spectra linked to the 2248 MS1 features (mgf file format) were exported from MZmine[55] for feature based molecular networking on the GNPS platform (https://gnps.ucsd.edu).[9,38] The precursor ion mass tolerance was set to 0.02 Da, and the MS/MS fragment ion tolerance was set to 0.02 Da. A molecular network was then created where edges were filtered to have a cosine score above 0.7 and more than 10 matched peaks in the MS^2 spectra. Furthermore, edges between two nodes were kept in the network only if each of the nodes appeared in each other's respective top eight most similar nodes. Finally, the maximal size of a molecular family was set at 100, and the lowest scoring edges were removed from molecular families until the molecular family size was below this threshold. The acquired MS^2 spectra in the network were then searched against GNPS spectral libraries.[9] The resulting network was visualized and interpreted using Cytoscape 3.8.2.[56] Spectral families were individually processed using *in silico* tools in SIRIUS 5.6.[10] Higher confidence assignment of molecular formulas for features within each spectral families and structural predictions were made using embedded as well as in-house-built databases with the simplified molecular input line-entry system [SMILES]. CANOPUS was then used for systematic annotation of the compound class of each selected structural prediction. Chemical distribution and classification of all clustered features were performed using outcomes from NPclassifier and using anatural product pathway probabilities of >0.8.[36,42]

Proportion of Sponge-Specialized EMs. The relative proportion of sponge-specialized metabolites detected as EMs from EXP2 was determined by comparing the area under the curve (AUC) of their extracted ion chromatograms (EIC). The corresponding AUC measured in the sponge crude extract was used as reference (100%). Both EIC and their measured AUC were obtained using Compass DataAnalysis software (Bruker version 5.0). Results were interpreted by taking into account the concentration of sponge crude extracts (0.2 mg in 1 mL) and the volume used to reconstitute seawater EMs extracts (1.5 mL of concentrated extract from three DVB disks and 10 L of filtered seawater).

Safety Statement. No unexpected or unusually high safety hazards were encountered.

■ ASSOCIATED CONTENT

Data Availability Statement

Raw MS^2 data (*.mzML) are freely available from the UCSD Center for Computational Mass Spectrometry database with the MassIVE identifier MSV000091465. The molecular networking job can be publicly accessed at https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=cff712297d024e52a2c03bac310af869. The raw (*mzML) MS data, .mol files of all represented structures, Excel files used to determine the distribution of molecular features, the cytoscape file, Excel files pertaining to data presented in each figure, and ^{1}H NMR data are available on ZENODO at https://doi.org/10.5281/zenodo.7820941.

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscentsci.3c00661.

Further details on the I-SMEL instrument; scheme of the sampling protocol; extracts codes and masses; complementary information to Figure 3; base peak chromatograms of representative sponge crude extracts; MS data processing as well as annotated MS^2 spectra and corresponding data of (putatively) identified EMs; and ^{1}H NMR spectra of sponge EM extracts (PDF)

Transparent Peer Review report available (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Charlotte Simmler − *IMBE, UMR CNRS 7263, IRD 237, Aix Marseille Université, Avignon Université, Station Marine d'Endoume, Chemin de la batterie des lions, 13007 Marseille,*

https://doi.org/10.1021/acscentsci.3c00661
ACS Cent. Sci. 2023, 9, 2084−2095

France; orcid.org/0000-0002-6923-2630;
Email: charlotte.simmler@imbe.fr

Authors

Morgane Mauduit − *IMBE, UMR CNRS 7263, IRD 237, Aix Marseille Université, Avignon Université, Station Marine d'Endoume, Chemin de la batterie des lions, 13007 Marseille, France*; orcid.org/0000-0003-4583-5389

Marie Derrien − *IMBE, UMR CNRS 7263, IRD 237, Aix Marseille Université, Avignon Université, Station Marine d'Endoume, Chemin de la batterie des lions, 13007 Marseille, France*; orcid.org/0000-0003-1210-4547

Marie Grenier − *IMBE, UMR CNRS 7263, IRD 237, Aix Marseille Université, Avignon Université, Station Marine d'Endoume, Chemin de la batterie des lions, 13007 Marseille, France*

Stéphane Greff − *IMBE, UMR CNRS 7263, IRD 237, Aix Marseille Université, Avignon Université, Station Marine d'Endoume, Chemin de la batterie des lions, 13007 Marseille, France*; orcid.org/0000-0001-9156-5194

Sacha Molinari − *IMBE, UMR CNRS 7263, IRD 237, Aix Marseille Université, Avignon Université, Station Marine d'Endoume, Chemin de la batterie des lions, 13007 Marseille, France*

Pierre Chevaldonné − *IMBE, UMR CNRS 7263, IRD 237, Aix Marseille Université, Avignon Université, Station Marine d'Endoume, Chemin de la batterie des lions, 13007 Marseille, France*; orcid.org/0000-0003-0507-7747

Thierry Pérez − *IMBE, UMR CNRS 7263, IRD 237, Aix Marseille Université, Avignon Université, Station Marine d'Endoume, Chemin de la batterie des lions, 13007 Marseille, France*

Complete contact information is available at:
https://pubs.acs.org/10.1021/acscentsci.3c00661

Author Contributions

†Co-first authors.

Author Contributions

‡Co-last authors.

Author Contributions

The original idea of the research program came from T.P. and C.S. T.P., P.C., and C.S. designed the research experiments. M.M., M.D., and M.G. performed the research experiments in the laboratory. T.P., M.D., P.C., and S.M. collected the exometabolites. T.P. and P.C. identified the sponge species *in situ*. M.D., M.M., M.G., S.G., and C.S. analyzed the data. All coauthors contributed to the manuscript and approved its revised and final version.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge financial support by the ANR (ANR-20-CE43-0003), Total Foundation, the CNRS INEE PEPS "Paysages", the MITI of the CNRS for M.M.'s Ph.D. fellowship, and the ANRT for M.G.'s Ph.D. fellowship (CIFRE no. 2019/1375). The authors thank O. P. Thomas, National University of Ireland, Galway, for stimulating conversations on the research topic. We are also grateful to G. Pachoud, S. Bricout, and J. C. Demunck of COMEX S. A. for their contribution to the construction of I-SMEL and to the sailors and divers of the Institute Pytheas for their support during the work at sea. The authors also acknowledge the four reviewers for their constructive comments and advice, which significantly improved the quality of this manuscript.

■ REFERENCES

(1) Wangersky, P. J. The Organic Chemistry of Sea Water. *Am. Sci.* **1965**, *53* (3), 358−374.
(2) Fyfe, W. S. Effects on Biological Evolution of Changes in Ocean Chemistry. *Nature* **1977**, *267* (5611), 510−510.
(3) Moore, T. S.; Mullaugh, K. M.; Holyoke, R. R.; Madison, A. S.; Yücel, M.; Luther, G. W. Marine Chemical Technology and Sensors for Marine Waters: Potentials and Limits. *Annu. Rev. Mar. Sci.* **2009**, *1* (1), 91−115.
(4) Liška, I. Fifty Years of Solid-Phase Extraction in Water Analysis − Historical Development and Overview. *J. Chromatogr. A* **2000**, *885* (1), 3−16.
(5) da Costa Filho, B. M.; Duarte, A. C.; Rocha-Santos, T. A. P. Environmental Monitoring Approaches for the Detection of Organic Contaminants in Marine Environments: A Critical Review. *Trends Environ. Anal. Chem.* **2022**, *33*, No. e00154.
(6) Kamali, N.; Abbas, F.; Lehane, M.; Griew, M.; Furey, A. A Review of In Situ Methods—Solid Phase Adsorption Toxin Tracking (SPATT) and Polar Organic Chemical Integrative Sampler (POCIS) for the Collection and Concentration of Marine Biotoxins and Pharmaceuticals in Environmental Waters. *Molecules* **2022**, *27* (22), 7898.
(7) Magi, E.; Di Carro, M. Marine Environment Pollution: The Contribution of Mass Spectrometry to the Study of Seawater. *Mass Spectrom. Rev.* **2018**, *37* (4), 492−512.
(8) Schmid, R.; Heuckeroth, S.; Korf, A.; Smirnov, A.; Myers, O.; Dyrlund, T. S.; Bushuiev, R.; Murray, K. J.; Hoffmann, N.; Lu, M.; Sarvepalli, A.; Zhang, Z.; Fleischauer, M.; Dührkop, K.; Wesner, M.; Hoogstra, S. J.; Rudt, E.; Mokshyna, O.; Brungs, C.; Ponomarov, K.; Mutabdžija, L.; Damiani, T.; Pudney, C. J.; Earll, M.; Helmer, P. O.; Fallon, T. R.; Schulze, T.; Rivas-Ubach, A.; Bilbao, A.; Richter, H.; Nothias, L.-F.; Wang, M.; Orešič, M.; Weng, J.-K.; Böcker, S.; Jeibmann, A.; Hayen, H.; Karst, U.; Dorrestein, P. C.; Petras, D.; Du, X.; Pluskal, T. Integrative Analysis of Multimodal Mass Spectrometry Data in MZmine 3. *Nat. Biotechnol.* **2023**, *41*, 447−449.
(9) Wang, M.; Carver, J. J.; Phelan, V. V.; Sanchez, L. M.; Garg, N.; Peng, Y.; Nguyen, D. D.; Watrous, J.; Kapono, C. A.; Luzzatto-Knaan, T.; Porto, C.; Bouslimani, A.; Melnik, A. V.; Meehan, M. J.; Liu, W.-T.; Crüsemann, M.; Boudreau, P. D.; Esquenazi, E.; Sandoval-Calderón, M.; Kersten, R. D.; Pace, L. A.; Quinn, R. A.; Duncan, K. R.; Hsu, C.-C.; Floros, D. J.; Gavilan, R. G.; Kleigrewe, K.; Northen, T.; Dutton, R. J.; Parrot, D.; Carlson, E. E.; Aigle, B.; Michelsen, C. F.; Jelsbak, L.; Sohlenkamp, C.; Pevzner, P.; Edlund, A.; McLean, J.; Piel, J.; Murphy, B. T.; Gerwick, L.; Liaw, C.-C.; Yang, Y.-L.; Humpf, H.-U.; Maansson, M.; Keyzers, R. A.; Sims, A. C.; Johnson, A. R.; Sidebottom, A. M.; Sedio, B. E.; Klitgaard, A.; Larson, C. B.; Boya P, C. A.; Torres-Mendoza, D.; Gonzalez, D. J.; Silva, D. B.; Marques, L. M.; Demarque, D. P.; Pociute, E.; O'Neill, E. C.; Briand, E.; Helfrich, E. J. N.; Granatosky, E. A.; Glukhov, E.; Ryffel, F.; Houson, H.; Mohimani, H.; Kharbush, J. J.; Zeng, Y.; Vorholt, J. A.; Kurita, K. L.; Charusanti, P.; McPhail, K. L.; Nielsen, K. F.; Vuong, L.; Elfeki, M.; Traxler, M. F.; Engene, N.; Koyama, N.; Vining, O. B.; Baric, R.; Silva, R. R.; Mascuch, S. J.; Tomasi, S.; Jenkins, S.; Macherla, V.; Hoffman, T.; Agarwal, V.; Williams, P. G.; Dai, J.; Neupane, R.; Gurr, J.; Rodríguez, A. M. C.; Lamsa, A.; Zhang, C.; Dorrestein, K.; Duggan, B. M.; Almaliti, J.; Allard, P.-M.; Phapale, P.; Nothias, L.-F.; Alexandrov, T.; Litaudon, M.; Wolfender, J.-L.; Kyle, J. E.; Metz, T. O.; Peryea, T.; Nguyen, D.-T.; VanLeer, D.; Shinn, P.; Jadhav, A.; Müller, R.; Waters, K. M.; Shi, W.; Liu, X.; Zhang, L.; Knight, R.; Jensen, P. R.; Palsson, B. Ø.; Pogliano, K.; Linington, R. G.; Gutiérrez, M.; Lopes, N. P.; Gerwick, W. H.; Moore, B. S.; Dorrestein, P. C.; Bandeira, N. Sharing and Community Curation of Mass Spectrometry Data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat. Biotechnol.* **2016**, *34* (8), 828−837.

(10) Dührkop, K.; Fleischauer, M.; Ludwig, M.; Aksenov, A. A.; Melnik, A. V.; Meusel, M.; Dorrestein, P. C.; Rousu, J.; Böcker, S. SIRIUS 4: A Rapid Tool for Turning Tandem Mass Spectra into Metabolite Structure Information. *Nat. Methods* **2019**, *16* (4), 299−302.
(11) Ruttkies, C.; Schymanski, E. L.; Wolf, S.; Hollender, J.; Neumann, S. MetFrag Relaunched: Incorporating Strategies beyond in Silico Fragmentation. *J. Cheminformatics* **2016**, *8* (1), 3.
(12) Dührkop, K.; Shen, H.; Meusel, M.; Rousu, J.; Böcker, S. Searching Molecular Structure Databases with Tandem Mass Spectra Using CSI:FingerID. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112* (41), 12580−12585.
(13) Petras, D.; Koester, I.; Da Silva, R.; Stephens, B. M.; Haas, A. F.; Nelson, C. E.; Kelly, L. W.; Aluwihare, L. I.; Dorrestein, P. C. High-Resolution Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Enables Large Scale Molecular Characterization of Dissolved Organic Matter. *Front. Mar. Sci.* **2017**, *4*, DOI: 10.3389/fmars.2017.00405.
(14) Wegley Kelly, L.; Nelson, C. E.; Aluwihare, L. I.; Arts, M. G. I.; Dorrestein, P. C.; Koester, I.; Matsuda, S. B.; Petras, D.; Quinlan, Z. A.; Haas, A. F. Molecular Commerce on Coral Reefs: Using Metabolomics to Reveal Biochemical Exchanges Underlying Holobiont Biology and the Ecology of Coastal Ecosystems. *Front. Mar. Sci.* **2021**, *8*, DOI: 10.3389/fmars.2021.630799.
(15) Wegley Kelly, L.; Nelson, C. E.; Petras, D.; Koester, I.; Quinlan, Z. A.; Arts, M. G. I.; Nothias, L.-F.; Comstock, J.; White, B. M.; Hopmans, E. C.; van Duyl, F. C.; Carlson, C. A.; Aluwihare, L. I.; Dorrestein, P. C.; Haas, A. F. Distinguishing the Molecular Diversity, Nutrient Content, and Energetic Potential of Exometabolomes Produced by Macroalgae and Reef-Building Corals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2022**, *119* (5), e2110283119.
(16) Goulitquer, S.; Potin, P.; Tonon, T. Mass Spectrometry-Based Metabolomics to Elucidate Functions in Marine Organisms and Ecosystems. *Mar. Drugs* **2012**, *10* (4), 849−880.
(17) Bayona, L. M.; de Voogd, N. J.; Choi, Y. H. Metabolomics on the Study of Marine Organisms. *Metabolomics* **2022**, *18* (3), 17.
(18) Ternon, E.; Zarate, L.; Chenesseau, S.; Croué, J.; Dumollard, R.; Suzuki, M. T.; Thomas, O. P. Spherulization as a Process for the Exudation of Chemical Cues by the Encrusting Sponge C. Crambe. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 29474.
(19) Mauduit, M.; Greff, S.; Herbette, G.; Naubron, J.-V.; Chentouf, S.; Huy Ngo, T.; Nam, J.-W.; Molinari, S.; Mabrouki, F.; Garayev, E.; Baghdikian, B.; Pérez, T.; Simmler, C. Diving into the Molecular Diversity of *Aplysina cavernicola*'s Exometabolites: Contribution of Bromo-Spiroisoxazoline Alkaloids. *ACS Omega* **2022**, *7* (47), 43068−43083.
(20) Hay, M. E. Marine Chemical Ecology: Chemical Signals and Cues Structure Marine Populations, Communities, and Ecosystems. *Annu. Rev. Mar. Sci.* **2009**, *1* (1), 193−212.
(21) Saha, M.; Berdalet, E.; Carotenuto, Y.; Fink, P.; Harder, T.; John, U.; Not, F.; Pohnert, G.; Potin, P.; Selander, E.; Vyverman, W.; Wichard, T.; Zupo, V.; Steinke, M. Using Chemical Language to Shape Future Marine Health. *Front. Ecol. Environ.* **2019**, *17* (9), 530−537.
(22) Sigwart, J. D.; Blasiak, R.; Jaspars, M.; Jouffray, J.-B.; Tasdemir, D. Unlocking the Potential of Marine Biodiscovery. *Nat. Prod. Rep.* **2021**, *38* (7), 1235−1242.
(23) Coll, J. C.; Bowden, B. F.; Tapiolas, D. M.; Dunlap, W. C. In Situ Isolation of Allelochemicals Released from Soft Corals (Coelenterata: Octocorallia): A Totally Submersible Sampling Apparatus. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **1982**, *60* (2−3), 293−299.
(24) Vlachou, P.; Goff, L.; Alonso, C.; Pedro, A. Á.; Gallard, J.; Fokialakis, N.; Ouazzani, J. Innovative Approach to Sustainable Marine Invertebrate Chemistry and a Scale-Up Technology for Open Marine Ecosystems. *Mar. Drugs* **2018**, *16*, 152.
(25) Bojko, B.; Onat, B.; Boyaci, E.; Psillakis, E.; Dailianis, T.; Pawliszyn, J. Application of in Situ Solid-Phase Microextraction on Mediterranean Sponges for Untargeted Exometabolome Screening and Environmental Monitoring. *Front. Mar. Sci.* **2019**, *6*, DOI: 10.3389/fmars.2019.00632.
(26) La Clair, J. J.; Loveridge, S. T.; Tenney, K.; O'Neil−Johnson, M.; Chapman, E.; Crews, P. In Situ Natural Product Discovery via an Artificial Marine Sponge. *PLoS One* **2014**, *9* (7), e100474.
(27) Tuttle, R. N.; Demko, A. M.; Patin, N. V.; Kapono, C. A.; Donia, M. S.; Dorrestein, P.; Jensen, P. R. Detection of Natural Products and Their Producers in Ocean Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **2019**, *85* (8), e02830.
(28) Bogdanov, A.; Salib, M. N.; Chase, A. B.; Hammerlindl, H.; Muskat, M. N.; Luedtke, S.; da Silva, E. B.; O'Donoghue, A. J.; Wu, L. F.; Altschuler, S. J.; Molinski, T. F.; Jensen, P. R. Small Molecule in Situ Resin Capture − A Compound First Approach to Natural Product Discovery. *bioRxiv* **2023**, DOI: 10.1101/2023.03.02.530684.
(29) Mehbub, M.; Lei, J.; Franco, C.; Zhang, W. Marine Sponge Derived Natural Products between 2001 and 2010: Trends and Opportunities for Discovery of Bioactives. *Mar. Drugs* **2014**, *12* (8), 4539−4577.
(30) Carroll, A. R.; Copp, B. R.; Davis, R. A.; Keyzers, R. A.; Prinsep, M. R. Marine Natural Products. *Nat. Prod. Rep.* **2022**, *39* (6), 1122−1171.
(31) Sauleau, P.; Moriou, C.; Al Mourabit, A. Metabolomics Approach to Chemical Diversity of the Mediterranean Marine Sponge *Agelas Oroides*. *Nat. Prod. Res.* **2017**, *31* (14), 1625−1632.
(32) Kovalerchik, D.; Singh, R. P.; Schlesinger, P.; Mahajni, A.; Shefer, S.; Fridman, M.; Ilan, M.; Carmeli, S. Bromopyrrole Alkaloids of the Sponge *Agelas Oroides* Collected Near the Israeli Mediterranean Coastline. *J. Nat. Prod.* **2020**, *83* (2), 374−384.
(33) Bauvais, C.; Bonneau, N.; Blond, A.; Pérez, T.; Bourguet-Kondracki, M.-L.; Zirah, S. Furanoterpene Diversity and Variability in the Marine Sponge *Spongia officinalis*, from Untargeted LC−MS/MS Metabolomic Profiling to Furanolactam Derivatives. *Metabolites* **2017**, *7* (2), 27.
(34) Chen, Q.; Mao, Q.; Bao, M.; Mou, Y.; Fang, C.; Zhao, M.; Jiang, W.; Yu, X.; Wang, C.; Dai, L.; He, W.; Dong, J.; Wu, J.; Yan, P. Spongian Diterpenes Including One with a Rearranged Skeleton from the Marine Sponge *Spongia Officinalis*. *J. Nat. Prod.* **2019**, *82* (6), 1714−1718.
(35) Petras, D.; Minich, J. J.; Cancelada, L. B.; Torres, R. R.; Kunselman, E.; Wang, M.; White, M. E.; Allen, E. E.; Prather, K. A.; Aluwihare, L. I.; Dorrestein, P. C. Non-Targeted Tandem Mass Spectrometry Enables the Visualization of Organic Matter Chemotype Shifts in Coastal Seawater. *Chemosphere* **2021**, *271*, 129450.
(36) Dührkop, K.; Nothias, L.-F.; Fleischauer, M.; Reher, R.; Ludwig, M.; Hoffmann, M. A.; Petras, D.; Gerwick, W. H.; Rousu, J.; Dorrestein, P. C.; Böcker, S. Systematic Classification of Unknown Metabolites Using High-Resolution Fragmentation Mass Spectra. *Nat. Biotechnol.* **2021**, *39*, 462−471.
(37) Quinlan, Z. A.; Koester, I.; Aron, A. T.; Petras, D.; Aluwihare, L. I.; Dorrestein, P. C.; Nelson, C. E.; Wegley Kelly, L. ConCISE: Consensus Annotation Propagation of Ion Features in Untargeted Tandem Mass Spectrometry Combining Molecular Networking and In Silico Metabolite Structure Prediction. *Metabolites* **2022**, *12* (12), 1275.
(38) Nothias, L.-F.; Petras, D.; Schmid, R.; Dührkop, K.; Rainer, J.; Sarvepalli, A.; Protsyuk, I.; Ernst, M.; Tsugawa, H.; Fleischauer, M.; Aicheler, F.; Aksenov, A. A.; Alka, O.; Allard, P.-M.; Barsch, A.; Cachet, X.; Caraballo-Rodriguez, A. M.; Da Silva, R. R.; Dang, T.; Garg, N.; Gauglitz, J. M.; Gurevich, A.; Isaac, G.; Jarmusch, A. K.; Kameník, Z.; Kang, K. B.; Kessler, N.; Koester, I.; Korf, A.; Le Gouellec, A.; Ludwig, M.; H, C. M.; McCall, L.-I.; McSayles, J.; Meyer, S. W.; Mohimani, H.; Morsy, M.; Moyne, O.; Neumann, S.; Neuweger, H.; Nguyen, N. H.; Nothias-Esposito, M.; Paolini, J.; Phelan, V. V.; Pluskal, T.; Quinn, R. A.; Rogers, S.; Shrestha, B.; Tripathi, A.; van der Hooft, J. J. J.; Vargas, F.; Weldon, K. C.; Witting, M.; Yang, H.; Zhang, Z.; Zubeil, F.; Kohlbacher, O.; Böcker, S.; Alexandrov, T.; Bandeira, N.; Wang, M.; Dorrestein, P. C. Feature-Based Molecular Networking in the GNPS Analysis Environment. *Nat. Methods* **2020**, *17* (9), 905−908.

(39) Schmid, R.; Petras, D.; Nothias, L.-F.; Wang, M.; Aron, A. T.; Jagels, A.; Tsugawa, H.; Rainer, J.; Garcia-Aloy, M.; Dührkop, K.; Korf, A.; Pluskal, T.; Kameník, Z.; Jarmusch, A. K.; Caraballo-Rodríguez, A. M.; Weldon, K. C.; Nothias-Esposito, M.; Aksenov, A. A.; Bauermeister, A.; Albarracin Orio, A.; Grundmann, C. O.; Vargas, F.; Koester, I.; Gauglitz, J. M.; Gentry, E. C.; Hövelmann, Y.; Kalinina, S. A.; Pendergraft, M. A.; Panitchpakdi, M.; Tehan, R.; Le Gouellec, A.; Aleti, G.; Mannochio Russo, H.; Arndt, B.; Hübner, F.; Hayen, H.; Zhi, H.; Raffatellu, M.; Prather, K. A.; Aluwihare, L. I.; Böcker, S.; McPhail, K. L.; Humpf, H.-U.; Karst, U.; Dorrestein, P. C. Ion Identity Molecular Networking for Mass Spectrometry-Based Metabolomics in the GNPS Environment. *Nat. Commun.* **2021**, *12* (1), 3832.
(40) Dittmar, T.; Koch, B.; Hertkorn, N.; Kattner, G. A Simple and Efficient Method for the Solid-Phase Extraction of Dissolved Organic Matter (SPE-DOM) from Seawater. *Limnol. Oceanogr. Methods* **2008**, *6* (6), 230−235.
(41) Berlinck, R. G. S.; Crnkovic, C. M.; Gubiani, J. R.; Bernardi, D. I.; Ióca, L. P.; Quintana-Bulla, J. I. The Isolation of Water-Soluble Natural Products − Challenges, Strategies and Perspectives. *Nat. Prod. Rep.* **2022**, *39*, 596.
(42) Kim, H. W.; Wang, M.; Leber, C. A.; Nothias, L.-F.; Reher, R.; Kang, K. B.; Van Der Hooft, J. J. J.; Dorrestein, P. C.; Gerwick, W. H.; Cottrell, G. W. NPClassifier: A Deep Neural Network-Based Structural Classification Tool for Natural Products. *J. Nat. Prod.* **2021**, *84* (11), 2795−2807.
(43) Schymanski, E. L.; Jeon, J.; Gulde, R.; Fenner, K.; Ruff, M.; Singer, H. P.; Hollender, J. Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48* (4), 2097−2098.
(44) Noyer, C.; Thomas, O. P.; Becerro, M. A. Patterns of Chemical Diversity in the Mediterranean Sponge *Spongia lamella*. *PLoS One* **2011**, *6* (6), e20844.
(45) Freire, V. F.; Gubiani, J. R.; Spencer, T. M.; Hajdu, E.; Ferreira, A. G.; Ferreira, D. A. S.; de Castro Levatti, E. V.; Burdette, J. E.; Camargo, C. H.; Tempone, A. G.; Berlinck, R. G. S. Feature-Based Molecular Networking Discovery of Bromopyrrole Alkaloids from the Marine Sponge *Agelas Dispar*. *J. Nat. Prod.* **2022**, *85* (5), 1340−1350.
(46) Srinivasa Reddy, N.; Venkateswarlu, Y. S-(+)-Methyl Ester of Hanishin from the Marine Sponge *Agelas ceylonica*. *Biochem. Syst. Ecol.* **2000**, *28* (10), 1035−1037.
(47) Ivanisevic, J.; Thomas, O. P.; Pedel, L.; Pénez, N.; Ereskovsky, A. V.; Culioli, G.; Pérez, T. Biochemical Trade-Offs: Evidence for Ecologically Linked Secondary Metabolism of the Sponge *Oscarella balibaloi*. *PLoS One* **2011**, *6* (11), e28059.
(48) Reverter, M.; Perez, T.; Ereskovsky, A. V.; Banaigs, B. Secondary Metabolome Variability and Inducible Chemical Defenses in the Mediterranean Sponge *Aplysina cavernicola*. *J. Chem. Ecol.* **2016**, *42* (1), 60−70.
(49) Puglisi, M. P.; Sneed, J. M.; Ritson-Williams, R.; Young, R. Marine Chemical Ecology in Benthic Environments. *Nat. Prod. Rep.* **2019**, *36* (3), 410−429.
(50) García-Vilas, J. A.; Martínez-Poveda, B.; Quesada, A. R.; Medina, M. Á. Aeroplysinin-1, a Sponge-Derived Multi-Targeted Bioactive Marine Drug. *Mar. Drugs* **2016**, *14* (1), 1.
(51) Wilke, C. Climate Change Could Alter Undersea Chemical Communication. *ACS Cent. Sci.* **2021**, *7* (7), 1091−1094.
(52) Vad, J.; Barnhill, K. A.; Kazanidis, G.; Roberts, J. M. Human Impacts on Deep-Sea Sponge Grounds: Applying Environmental Omics to Monitoring. *Advances in Marine Biology*; Elsevier, 2021; Vol. *89*, pp 53−78.
(53) Häder, D.-P.; Banaszak, A. T.; Villafañe, V. E.; Narvarte, M. A.; González, R. A.; Helbling, E. W. Anthropogenic Pollution of Aquatic Ecosystems: Emerging Problems with Global Implications. *Sci. Total Environ.* **2020**, *713*, 136586.
(54) Grenier, M.; Idan, T.; Chevaldonné, P.; Pérez, T. Mediterranean Marine Keystone Species on the Brink of Extinction. *Glob. Change Biol.* **2023**, *29*, 1681.
(55) Pluskal, T.; Castillo, S.; Villar-Briones, A.; Orešič, M. MZmine 2: Modular Framework for Processing, Visualizing, and Analyzing Mass Spectrometry-Based Molecular Profile Data. *BMC Bioinformatics* **2010**, *11* (1), 395.
(56) Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N. S.; Wang, J. T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res.* **2003**, *13* (11), 2498−2504.

https://doi.org/10.1021/acscentsci.3c00661
ACS Cent. Sci. 2023, 9, 2084−2095

In situ Capture and Real Time Enrichment of Marine Chemical Diversity

Morgane Mauduit[#], Marie Derrien[#], Marie Grenier[#], Stéphane Greff, Sacha Molinari, Pierre Chevaldonné, Charlotte Simmler[¤,*], Thierry Pérez[¤]

[1] IMBE, UMR CNRS 7263, IRD 237, Aix Marseille Université, Avignon Université, Endoume Marine Station, Chemin de la batterie des lions, 13007 Marseille, France

[#] co-first authors

[¤] co-last authors

* corresponding author

Correspondence to: charlotte.simmler@imbe.fr; ORCID ID: 0000-0002-6923-2630.

Supporting Information

All the raw MS^2 data (*mzML) are freely available at the UCSD Center for Computational Mass Spectrometry database with the MassIVE identifier MSV000091465. MS and NMR data presented in this manuscript are also available on ZENODO at https://doi.org/10.5281/zenodo.7820941.

Contents

S1. Further technical details on I-SMEL S3

S1.1. Detailed pictures of the different parts S3

S1.2. Description of the SPE supports S4

S1.3. Change of SPE supports during a SCUBA dive S5

S2. *In situ* sampling protocol (EXP1-3) S6

S3. EM extracts from EXP1-3: codes and extraction yields S8

S4. Complement to Figure 3: Marine Chemodiversity through the analysis of FBMN S10

S5. Annotated Base Peak Chromatograms of sponge crude extracts S11

Figure S5.1. *Aplysina cavernicola* S11

Figure S5.2. *Spongia officinalis* S11

Figure S5.3. *Agelas oroides* S11

S6. MS data processing and annotated MS^2 spectra of reproducibly detected EMs S12

S6.1. *Aplysina cavernicola* S13

S6.2. *Spongia officinalis* S19

S6.3. *Agelas oroides* S25

S7. ^{1}H NMR spectra of sponge EM extracts (EXP2) S25

S7.1. *Aplysina cavernicola* S26

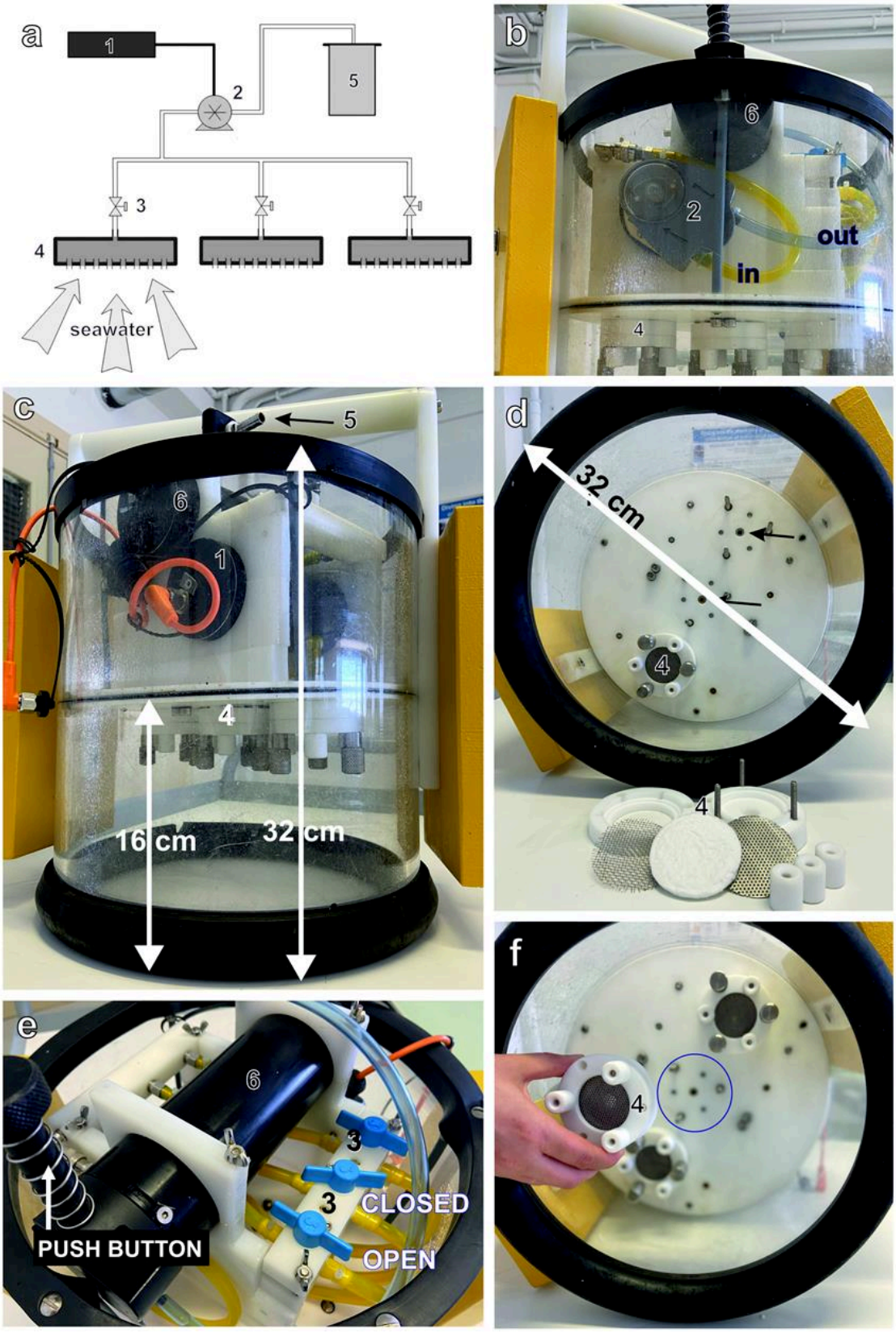
S7.2. *Spongia officinalis* S28

S7.3. *Agelas oroides* S28

S7.4. Stacked ^{1}H NMR spectra of all EM extracts (EXP2) S29

S1. Further technical details on I-SMEL

S1.1. Detailed pictures of the different parts



(a) Schematic view of the main items within I-SMEL: identification of the instrument items: **1** electronic controller of the pump, **2** peristaltic pump, **3** valves, **4** SPE supports, **5** pump outlet where a flexible container can be adapted, **6** the battery, (b) zoom in the upper part of I-SMEL containing the peristaltic pump, its controller and the battery in stainless steel enclosures, (c) closer overview on the entire instrument divided in two parts: the upper one with all the electronics and the pump outlet, and the lower one, where the SPE supports are tightly screwed and turned toward the bottom, thus toward the organisms to sample, (c-f) view inside the chamber, where the SPE supports have to be fixed one by one, (e) upside view of I-SMEL with the battery, the waterproof magnetic push button activating the pump and the three valves that can be maintained closed or opened allowing the seawater to go through a selected SPE disk.

Peristaltic dosing pump: ERDEMIL™ coupled to a Maxon™ microreductor motor
Battery: 12 V, 250 mA rechargeable NiMH battery
Controller: Pic16F electronic card
Connecting tubing: flexible PTFE tubing 8/11 mm diameter.
I-SMEL chamber is delimited by plexiglass. All the other parts are made of PTFE.

Notes The instrument is made of six primary components as shown here and in figure 1 of the manuscript. The dimensions of the capture chamber can be adjusted according to the research objectives or the target organism. Similarly, the peristaltic pump's specificity (*e.g.* flow rate) can be tailored to match the intended purpose. The sizes of the two stainless steel enclosures that house respectively the battery and electronic controller are also contingent upon the desired level of autonomy. These two enclosures, along with the electronic controller, were constructed in-house.

S1.2. Description of the SPE supports

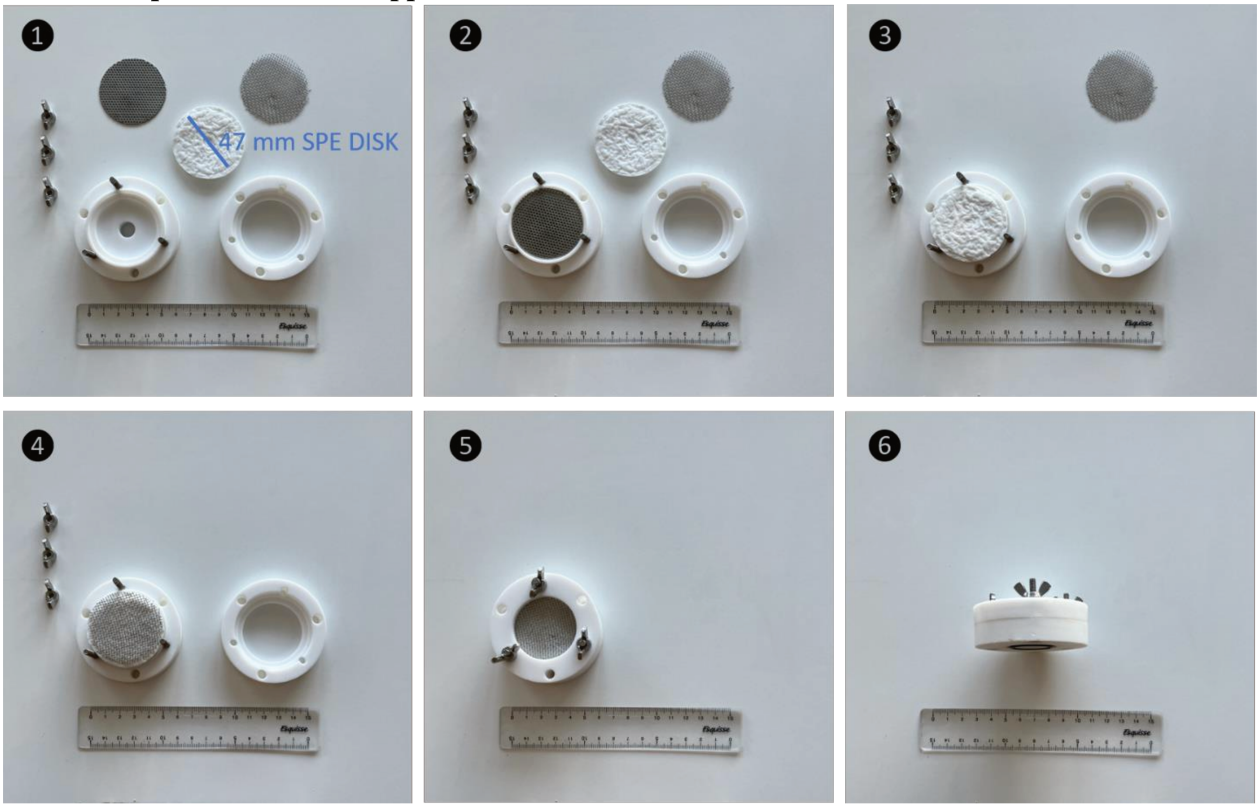


Figure S1.2. Illustration of how the SPE disks (47 mm diameter) are installed inside the SPE supports, which are made of 4 different parts to assemble. Two PTFE cases and two stainless steel grids of different mesh. The grid on top of the SPE disk has a 2 mm mesh which retains the coarsest particles (4). The preconditioned SPE disk is placed inside the holder prior to the dive. All four parts enclosing the disk are maintained tightly together by outside screws (5, 6).

S1.3. Change of SPE supports during a SCUBA dive



Figure S1.3. SCUBA diver changing the SPE supports prefilled with new SPE disks. The photo on the right shows the large stainless steel screws used to fix the SPE support inside I-SMEL. The diver has to remove then replace these screws to change the SPE holders.

S2. *In situ* sampling protocol (EXP1-3)

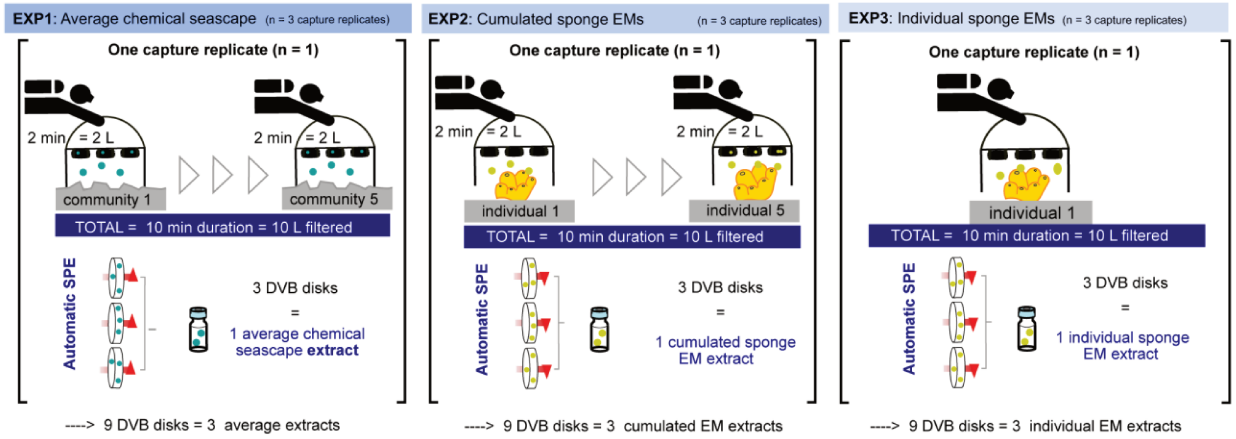


Figure S2.1. Sampling protocol used in this study for EXP1 to EXP3.

For EXP1 and 2: one replicate experiment corresponds to the filtration of a total of 2 L of seawater repeated above either 5 different community (EXP1) or 5 different sponge specimens (EXP2). During the sampling all three valves are opened. Therefore, for one replicate a total of 10 L of seawater is passed through 3 SPE disks simultaneously.

The three disks are then eluted individually then pooled to provide an average extract of marine chemical seascape (n = 1, EXP1) or an average extract of cumulated sponge EMs (n = 1, EXP2). Both EXP1 and 2 were replicated three times, resulting in 3 replicate extracts for each EXP.

- 1 replicate experiment = one average extract from 3 SPE disks simultaneously from **5 different substrates**. *In situ* sampling duration 5 x 2 min = sampling volume 10 L (5 x 2 L).

For EXP3: one replicate experiment corresponds to the filtration of 10 L of seawater above one sponge individual, on three SPE disks simultaneously. After individual elution of these disks, the solvents are combined to obtain one single extract enriched in individual sponge EMs. EXP3 was replicated three times to obtain 3 individual EM extracts/sponge species.

- 1 replicate experiment = one average extract from 3 SPE disks simultaneously from **1 single sponge individual**. *In situ* sampling duration 1 x 10 min = sampling volume 10 L.

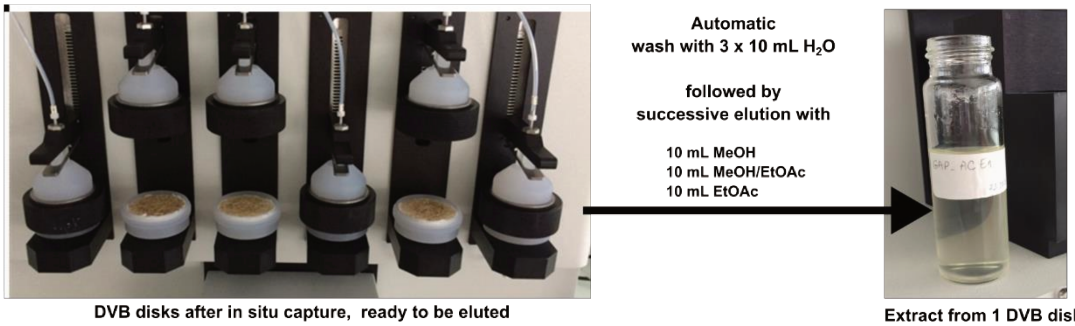


Figure S2.2. depicts three SPE disks from *in situ* capture ready to be eluted. Each elution provides a 30 mL extract/disk. These extracts are then pooled and dried to constitute one replicate sample, which is diluted in 1.5 mL MeOH MS-grade prior to LC-MS analysis.

S2.3. Notes on the rationale behind the choice of SPE DVB disks

DVB polymeric matrix: Among the different polymeric solid phases, DVB is the most used to enrich water-soluble natural products (Berlinck *et al*. 2021)[1] because it is able to retain structurally diverse dissolved metabolites of wide polarity range. As such, DVB solid phase (*e.g.* Bond-Elut-PPL) is used to capture Dissolved Organic Matter (DOM) from filtered seawater (Dittmar *et al.* 2008, Petras *et al.* 2017)[2,3]. DVB resins have also been previously deployed in device aiming at passively sampling microalgae toxins *in situ* (SPATT Solid Phase Adsorption Toxin Tracking [Roué *et al*. 2018])[4]. More recently, DVB resin (HP-20) lead to the isolation of metabolite directly enriched in the ecosystem (Bogdanov *et al.* 2023)[5]. Finally, previous work focusing on collecting EMs released by sponge in aquarium used DVB polymeric SPE (Vlachou *et al.* 2018)[6]. For all those reasons, we chose DVB as a polymeric phase.

The disks were preferred compared to the cartridges as they offer a larger surface of exchange, allowing faster flow rate to be applied, compatible with shorter sampling time. Also, in general, SPE disks are more appropriate when the water to be filtered is charged with different types of particulates. The disks were chosen instead of resins as they are, for now, easier to use and to change underwater and more importantly, compatible with a standardized SPE elution/extraction in the laboratory using automated SPE instruments.

As I-SMEL encloses three distinct SPE supports, it would be possible to perform *in situ* enrichment of exometabolites using different, yet complementary, SPE matrices (*e.g.* HLB and DVB).

S3. EM extracts from EXP1-3: codes and extraction yields

Table S3.1. Mass of eluted EM extracts from EXP1 and 2

EXP	Sample	CAPT	Replicate code/ DVB disk	Qty (mg)	Mean qty (mg)	Stand. Dev.
1	ACS	1	EXP1_ACS_CAPT1_R1	14.5	25.1	10.0
			EXP1_ACS_CAPT1_R2	34.4		
			EXP1_ACS_CAPT1_R3	26.3		
		2	EXP1_ACS_CAPT2_R1	86	45.4	35.4
			EXP1_ACS_CAPT2_R2	29.8		
			EXP1_ACS_CAPT2_R3	20.5		
		3	EXP1_ACS_CAPT3_R1	21.4	21.0	6.3
			EXP1_ACS_CAPT3_R2	27.1		
			EXP1_ACS_CAPT3_R3	14.5		
2	AC*	1	EXP2_AC_CAPT1_R1	16.7	16.5	1.3
			EXP2_AC_CAPT1_R2	15.1		
			EXP2_AC_CAPT1_R3	17.6		
		2	EXP2_AC_CAPT2_R1	3.5	17.2	19.3
			EXP2_AC_CAPT2_R2	8.7		
			EXP2_AC_CAPT2_R3	39.3		
	SO	1	EXP2_SO_CAPT1_R1	28.5	22.6	17.6
			EXP2_SO_CAPT1_R2	36.4		
			EXP2_SO_CAPT1_R3	2.8		
		2	EXP2_SO_CAPT2_R1	1.6	15.6	10.0
			EXP2_SO_CAPT2_R2	31.1		
			EXP2_SO_CAPT2_R3	12.1		
		3	EXP2_SO_CAPT3_R1	12.9	21.8	15.4
			EXP2_SO_CAPT3_R2	22.1		
			EXP2_SO_CAPT3_R3	14		
	AO	1	EXP2_AO_CAPT1_R1	29.6	19.6	11.9
			EXP2_AO_CAPT1_R2	22.8		
			EXP2_AO_CAPT1_R3	6.4		
		2	EXP2_AO_CAPT2_R1	16	11.2	5.2
			EXP2_AO_CAPT2_R2	11.9		
			EXP2_AO_CAPT2_R3	5.7		
		3	EXP2_AO_CAPT3_R1	32.2	23.4	11.5
			EXP2_AO_CAPT3_R2	27.7		
			EXP2_AO_CAPT3_R3	10.4		

* We had an experimental mishap with the third replicate and did not measure the extraction yields.

EXP: type of Experiment; CAPT: *in situ* capture replicate, n = 3, R: technical Replicate of DVB disk. Each capture was performed on the three DVB disks simultaneously. ACS = Average Chemical Seascape, SO = *Spongia officinalis*, AC = *Aplysina cavernicola*, AO = *Agelas oroides*.

Table S3.2. Mass of eluted EM extracts from EXP3

EXP	Community	CAPT	Replicate code/ DVB disk	Qty (mg)	Mean qty (mg)	Stand. Dev
3	AC	4	EXP3_AC_CAPT4_R1	25.2	27.4	9.2
			EXP3_AC_CAPT4_R2	19.5		
			EXP3_AC_CAPT4_R3	37.5		
		5	EXP3_AC_CAPT5_R1	20.4	30.1	11.8
			EXP3_AC_CAPT5_R2	26.6		
			EXP3_AC_CAPT5_R3	43.3		
		6	EXP3_AC_CAPT6_R1	17	18.0	12.2
			EXP3_AC_CAPT6_R2	6.3		
			EXP3_AC_CAPT6_R3	30.7		
	SO	4	EXP3_SO_CAPT4_R1	12.4	26.8	21.8
			EXP3_SO_CAPT4_R2	17.1		
			EXP3_SO_CAPT4_R3	52.3		
		5	EXP3_SO_CAPT5_R1	33	26.4	8.0
			EXP3_SO_CAPT5_R2	28.6		
			EXP3_SO_CAPT5_R3	17.5		
		6	EXP3_SO_CAPT6_R1	21.7	27.0	11.5
			EXP3_SO_CAPT6_R2	40.2		
			EXP3_SO_CAPT6_R3	19.1		
	AO	4	EXP3_AO_CAPT4_R1	43	34.1	15.5
			EXP3_AO_CAPT4_R2	43.2		
			EXP3_AO_CAPT4_R3	16.2		
		5	EXP3_AO_CAPT5_R1	51.9	38.5	12.0
			EXP3_AO_CAPT5_R2	28.7		
			EXP3_AO_CAPT5_R3	34.9		
		6	EXP3_AO_CAPT6_R1	52.3	31.4	22.3
			EXP3_AO_CAPT6_R2	33.9		
			EXP3_AO_CAPT6_R3	7.9		

EXP: type of Experiment; CAPT: *in situ* capture replicate, n = 3, R: technical Replicate of DVB disk. Each capture was performed on the three DVB disks simultaneously. ACS = Average Chemical Seascape, SO = *Spongia officinalis*, AC = *Aplysina cavernicola*, AO = *Agelas oroides*.

S4. Complement to Figure 3: Marine Chemodiversity through the analysis of FBMN

Table S4.1. Global FBMN node distribution

Total features (FT) = Total nodes	2248
Total single nodes, single loop	1376
Total single nodes included in spectral families	80
Total nodes distributed in 137 spectral families	872
Total nodes corresponding to technical contaminants	67
Total nodes in spectral families without contaminants	805

Table S4.2. Distribution[a] of features (FT) or nodes in the MN between identified groups

Species	Groupe (FT type)	Qty of Nodes	% / species	% of classified FT[b]
AC	crude only	34	13	5
	crude & EM (1)	32	12	**5**
	EM only (2)	198	75	**31**
Unique to AC		264	100	41
SO	crude only	26	17	4
	crude & EM (1)	52	34	**8**
	EM only (2)	76	49	**12**
Unique to SO		154	100	24
AO	crude only	41	39	6
	crude & EM (1)	8	8	**1.0**
	EM only (2)	55	53	**9**
Unique to AO		104	100	16
Marine ACS Metabolites (3)		116		**18**
TOTAL		643		100

[a]For all EXP1 to 3, [b]Values used in figure 3b.

A total of 764 FT was attributed to different sample groups. Out of them, 119 features were found to be detected in two or three sponge EMs, and did not cluster with any crude extracts or ACS samples. These features were not included in the representation of feature distribution as they were not specific to a given sponge community. See Excel spreadsheet 103 exomet_fig3R1vf_MN on ZENODO at https://doi.org/10.5281/zenodo.7820941.

Table S4.3. Evaluation of molecular diversity within the classified features

	Number of features per sample type				
NP pathway	**ACS**	**SO**	**AC**	**AO**	**TOTAL**
alkaloids	2	21	60	19	102
amino acids-oligopeptides	1	1	17	0	19
polyketides	15	5	3	9	32
terpenoids	2	50	1	2	55
fatty acids	32	10	53	6	101
TOTAL NP > 0.8	52	87	134	36	309

A total of 744 features were annotated using SIRIUS, 488 of them had a Natural Product (NP) pathway probability score > 0.8 and 309 of them (41%) were specific to each group as represented here.

S5. Annotated Base Peak Chromatograms of sponge crude extracts

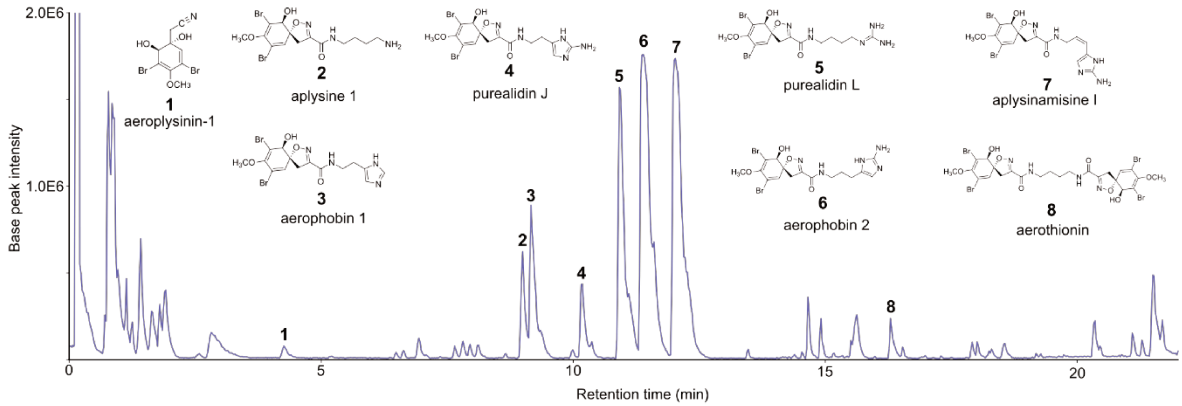


Figure S5.1. ***Aplysina cavernicola*** Annotated Base Peak Chromatogram (positive electrospray ionization) of a representative crude extract with identified brominated alkaloids (confidence level 1).

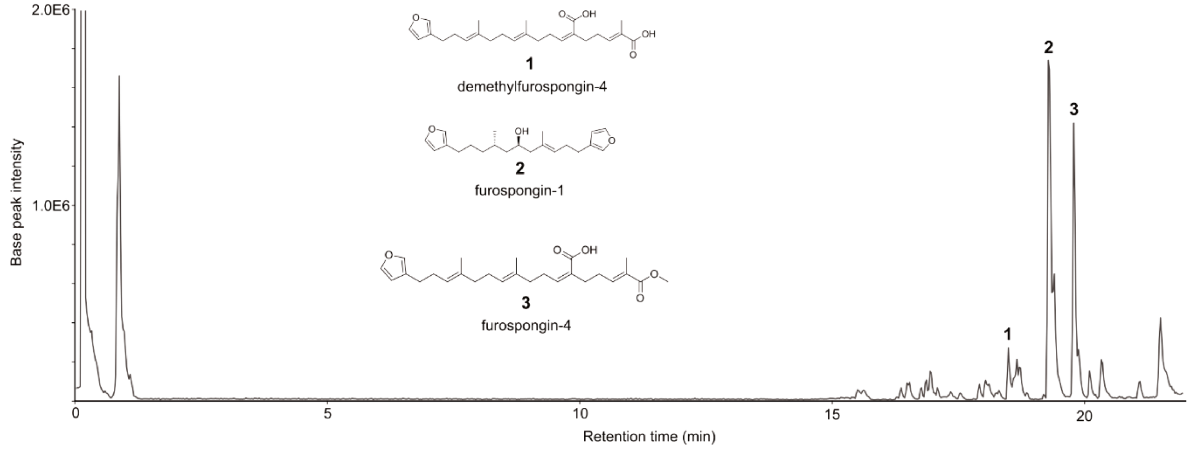


Figure S5.2. ***Spongia officinalis*** Annotated Base Peak Chromatogram (positive electrospray ionization) of a representative crude extract with its most abundant furanoterpenoids (confidence level 2b).

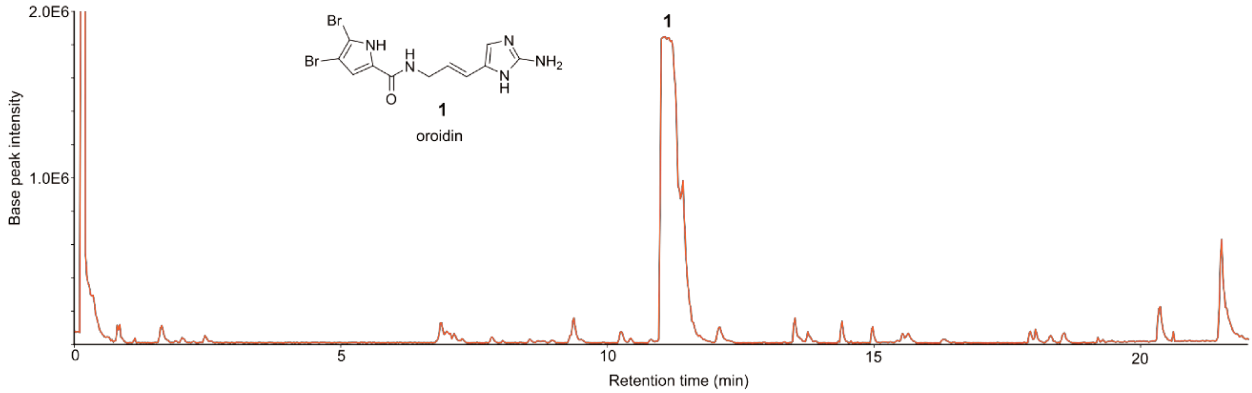


Figure S5.3. ***Agelas oroides*** Annotated Base Peak Chromatogram (positive electrospray ionization) BPC of a representative crude extract with oroidin its major brominated alkaloid (confidence level 1).

S6. MS data processing and annotated MS^2 spectra of reproducibly detected EMs

All MS^2 data were acquired with a Bruker Impact II (ESI-Q-ToF) using positive electrospray ionization (ESI+) as follows: nebulizer gas N_2 at 3.5 bar; dry gas at 12 $L.min^{-1}$, capillary temperature at 200°C and voltage at 4500 V. MS/MS acquisition mode was set with a scan rate of 8 Hz (full scan from 50-1200 *m/z*), and a mixed collision energy (CE) at 20-40 eV (50% time at each collision energy, stepping mode).

UHPLC-MS data processing Following their calibration, the acquired MS data were converted to the open format *.mzXML using MSConvert (Proteowizard)[7] and further processed on MZmine 3.2.8[8] for feature detection, as follows: (1) mass detection (centroid, MS1, noise level 1E4, and MS2 noise level 0), (2) ADAP chromatogram builder52 (2 scans, group intensity threshold 3E2, minimum highest intensity 3E2, m/z tolerance 10 ppm), (3) chromatogram resolving (baseline resolver: minimum peak height 1E4, peak duration range 0.0-2.0 min, baseline level 1E3, RT range for MS2 scan pairing 0.03 min, number of data point 2), (4) isotopic grouper (13C isotope filter: m/z tolerance 10 ppm, RT tolerance 0.1 min, representative isotope most intense), (5) join aligner (m/z tolerance 10 ppm, weight for m/z 75%, weight for RT 25%, RT tolerance 0.1 min), (6) feature list rows filter (RT 0.5-22.0 min, and keep only peaks with MS2 scans). MetaCorrelate (RT tolerance 0.03 min, minimum height 0, intensity correlation threshold 1E4, correlation grouping: measure PEARSON, minimum feature shape correlation 85%). Features detected only in MeOH were deleted. The generated MS2 feature list contained 2248 signals.

S6.1. *Aplysina cavernicola*

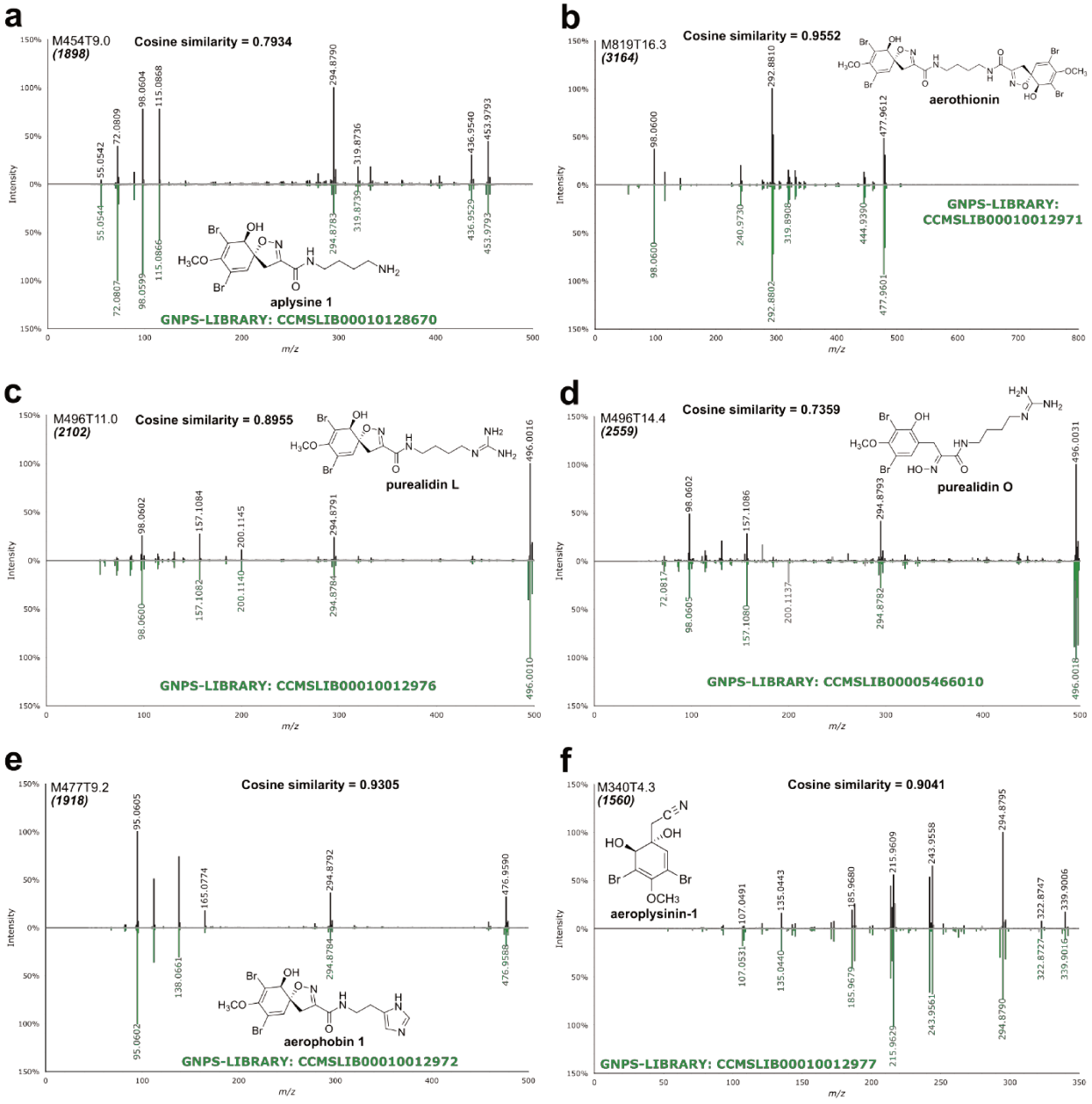


Figure S6.1.1. GNPS-library mirror image of MS^2 spectra of identified brominated alkaloids.

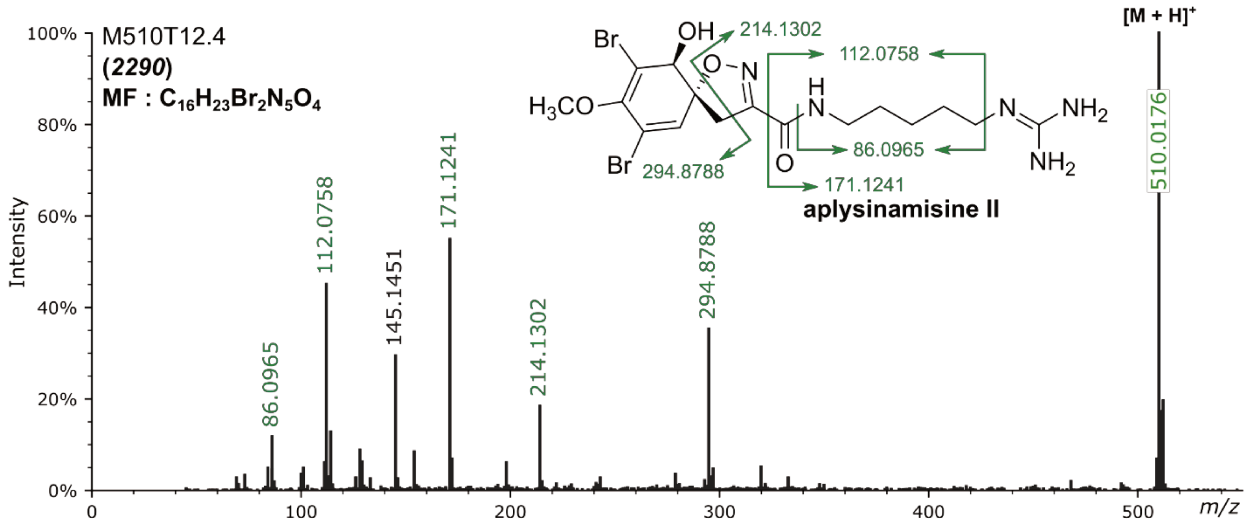


Figure S6.1.2. MS^2 spectrum of putative aplysinamisine II.

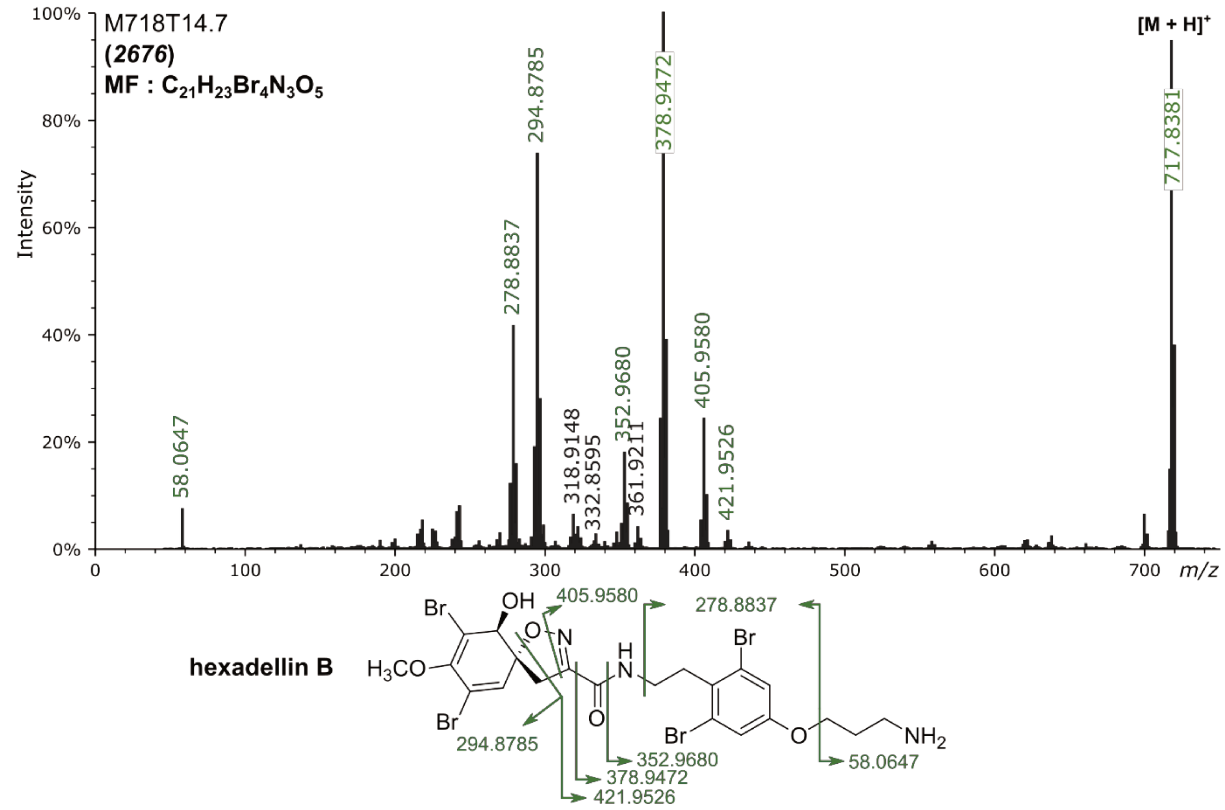


Figure S6.1.3. MS^2 spectrum of putative hexadellin B**.**

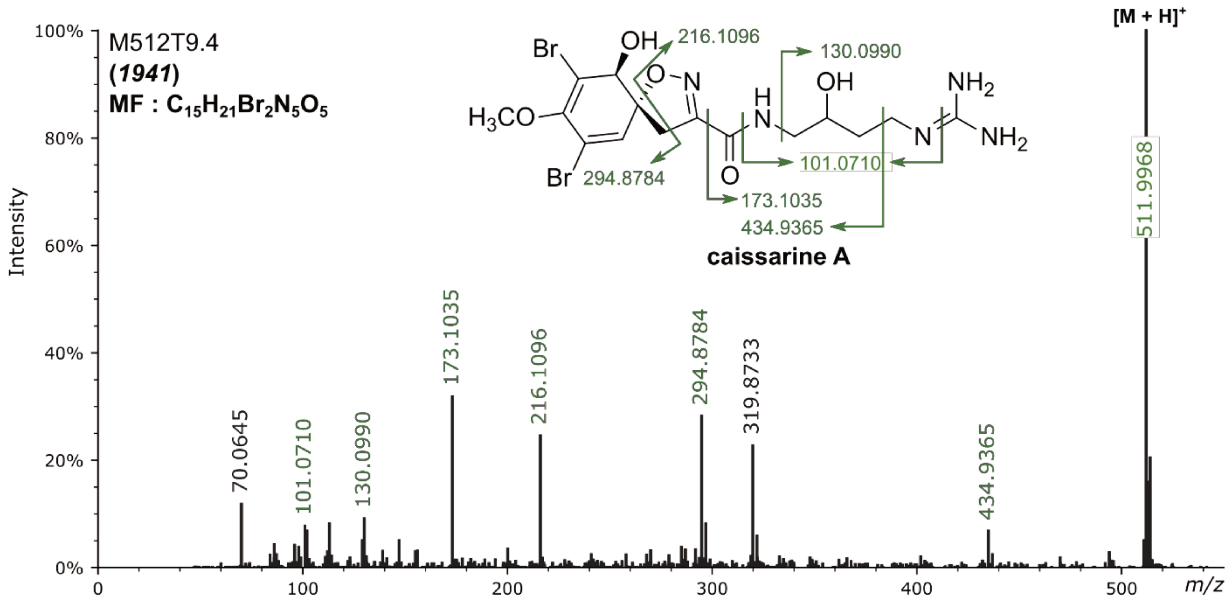


Figure S6.1.4. MS^2 spectrum of putative caissarine A.

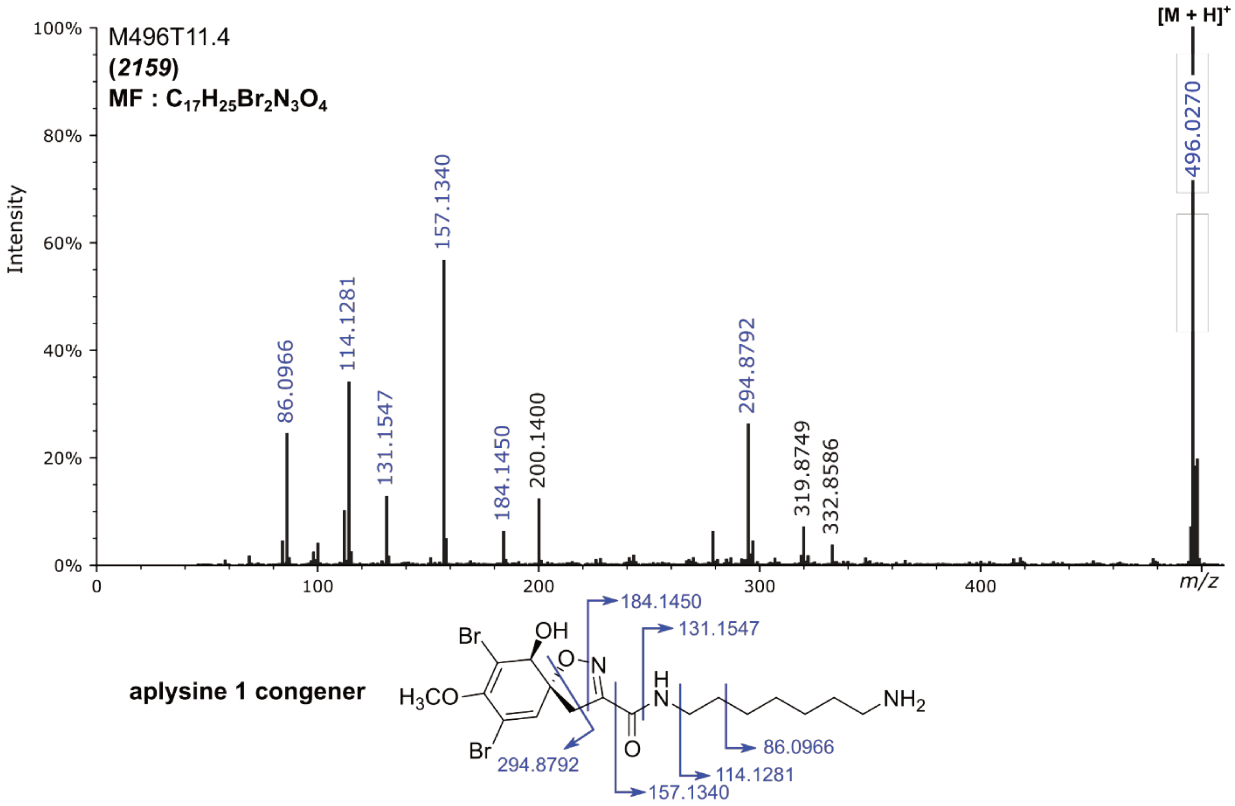


Figure S6.1.5. MS^2 spectrum of putative aplysine 1 congener M496T11.4.

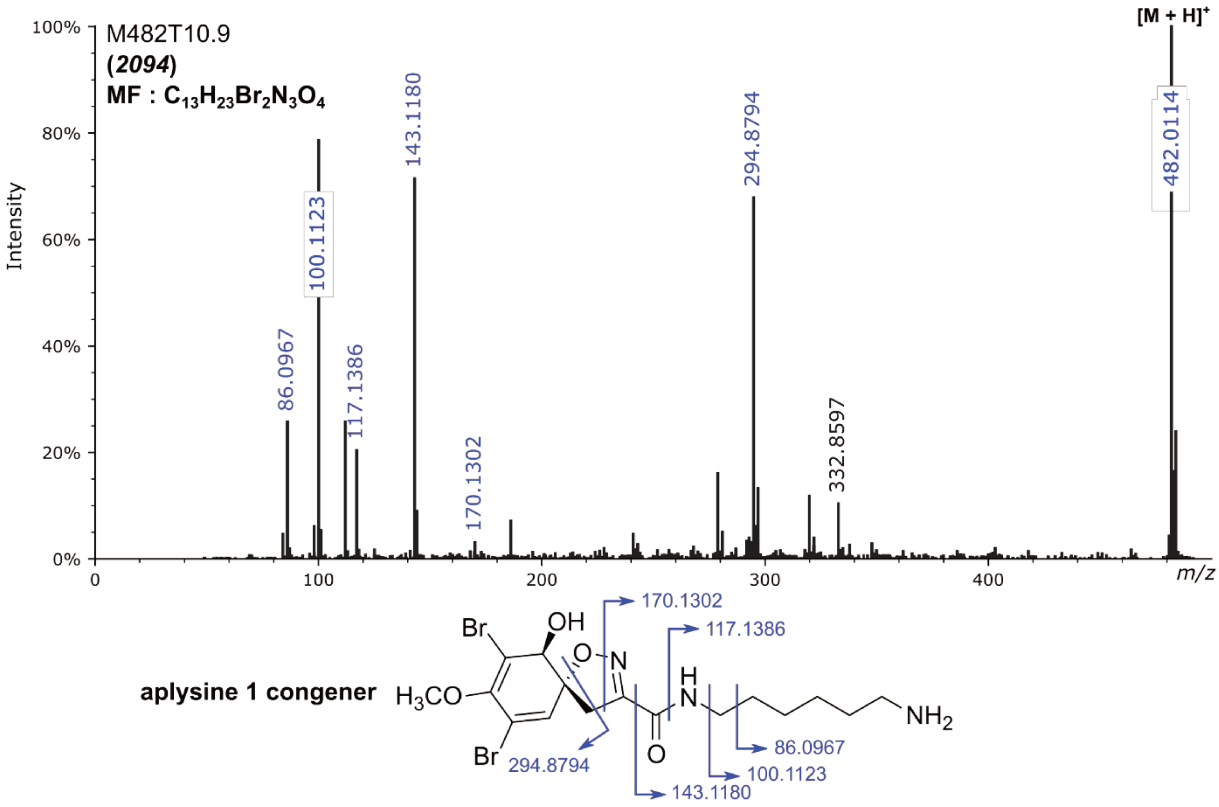


Figure S6.1.6. MS^2 spectrum of putative aplysine 1 congener M482T10.9.

Table S6.1. MS data of identified or annotated exometabolites found in *Aplysina cavernicola* crude extracts and reproducibly detected as exometabolites

Common Name	Code (Cluster index)[a]	RT (min)	Molecular formula	Ion status	Measured[b]	Calculated	MS^2 fragments & intensities[c]	ID[d]
					m/z			
Aeroplysinin-1	M340T4.3 (1560)	4.28	$C_9H_9Br_2NO_3$	$[M + H]^+$	337.9014	337.9022	121.0282 5.3 135.0443 16.0 187.9658 25.6 213.9631 44.2 241.9578 53.5 294.8795 100.0	1
Methyl acetamide of aeroplysinin-1	M394T4.3 (1563)	4.3	$C_{10}H_{13}Br_2NO_4$	$[M + Na]^+$	391.9105	391.9104	282.9627 16.6 334.8713 7.8 392.9110 5.8	3
-	M269T7.7 (1763)	7.65	$C_{18}H_{28}Br_2N_6O_3$	$[M + 2H]^{2+}$	268.0376	268.0368	72.0818 58.1 98.0604 90.3 131.1291 58.1 157.1090 100.0 184.1205 45.2 264.8652 37.1 362.9536 48.4 406.9417 21.0	3
Aplysine 1	M454T9.0 (1898)	9.0	$C_{14}H_{19}Br_2N_3O_4$	$[M + H]^+$	451.9813	451.9815	55.0542 4.0 72.0809 38.9 98.0604 77.8 115.0868 77.8 294.8790 100.0 319.8736 17.8 436.9540 30.0	1
Aerophobin 1	M477T9.2 (1918)	9.2	$C_{15}H_{16}Br_2N_4O_4$	$[M + H]^+$	474.9611	476.9611	95.0605 100.0 112.0872 50.7 138.0663 73.9 165.0774 17.4 294.8792 36.2	1
Caissarine A	M512T9.4 (1941)	9.4	$C_{15}H_{21}Br_2N_5O_5$	$[M + H]^+$	509.9977	509.9982	70.0645 11.8 101.0710 7.7 130.0990 9.1 173.1035 31.8 216.1096 24.5 294.8784 28.2 319.8733 22.7 434.9365 6.8	2b
Caissarine A analogue	M526T10.0 (1996)	10.0	$C_{16}H_{23}Br_2N_5O_5$	$[M + H]^+$	524.0122	524.0139	84.0805 8.7 130.0985 10.0 161.1400 12.6 169.1082 13.9 187.1191 33.5 214.1303 8.7 230.1264 28.3 294.8790 24.8	3
Aplysine 1 congener 1	M482T10.9 (2094)	10.9	$C_{16}H_{23}Br_2N_3O_4$	$[M + H]^+$	480.0124	480.0128	86.0967 25.7 100.1123 78.6 117.1386 20.4 143.1180 71.4 170.1302 3.1 294.8794 67.9 332.8597 10.4	3
Purealidin L	M496T11.0 (2102)	10.93	$C_{15}H_{21}Br_2N_5O_4$	$[M + H]^+$	494.0037	494.0033	98.0602 25.5 114.1029 6.4 131.1293 8.5 157.1084 27.3 200.1145 10.9 294.8791 23.6	1
Aplysine 1 congener 2	M496T11.4 (2159)	11.4	$C_{17}H_{25}Br_2N_3O_4$	$[M + H]^+$	494.0269	494.0285	86.0966 24.3 114.1281 33.9 131.1547 12.6 157.1340 56.5 184.1450 6.1 200.1400 12.2 294.8792 26.1	3

Common Name	Code (Cluster index)[a]	RT (min)	Molecular formula	Ion status	Measured[b]	Calculated	MS² fragments & intensities[c]		ID[d]
					m/z				
-	M552T11.8 (2214)	11.8	$C_{17}H_{21}Br_2N_5O_6$	$[M + H]^+$	549.9930	549.9931	96.0446 138.0664 155.0926 181.0723 208.0836 294.8795 519.9669	5.8 100.0 9.2 53.1 16.2 6.5 12.3	3
Aplysinamisine II	M510T12.4 (2290)	12.4	$C_{16}H_{23}Br_2N_5O_4$	$[M + H]^+$	508.0198	508.0190	86.0965 112.0758 171.1241 214.1302 294.8788	11.8 45.1 54.9 18.4 35.3	2b
Purealidin O	M496T14.4 (2559)	14.36	$C_{15}H_{21}Br_2N_5O_4$	$[M + H]^+$	494.0035	494.0033	98.0602 114.1028 131.1294 157.1086 294.8793	48.7 10.5 20.8 28.2 41.0	2b
Hexadellin B	M718T14.7 (2676)	14.7	$C_{21}H_{23}Br_4N_3O_5$	$[M + H]^+$	713.8431	713.8444	278.8837 294.8785 352.9580 361.9211 378.9472 405.9580	41.6 73.7 17.9 4.1 100.0 24.2	2b
-	M483T15.0 (2827)	15.0	$C_{15}H_{18}Br_2N_2O_6$	$[M + H]^+$	480.9590	480.9604	86.0598 101.0597 112.0391 130.0500 144.0659 294.8782 319.8717 332.8574 347.8775	45.7 23.9 18.5 78.3 26.1 100.0 17.6 23.9 80.4	3
Aerothionin	M819T16.3 (3164)	16.3	$C_{24}H_{26}Br_4N_4O_8$	$[M + H]^+$	814.8529	814.8557	98.0603 115.0870 294.8790 479.9596	33.8 12.8 100.0 50.7	1

[a]The Cluster index identifies nodes in the GNPS molecular network, the most intense peak of the isotopic pattern was used for feature codification. [b]The monoisotopic peak was selected for molecular formula determination. [c]Major MS² fragments and their intensities were selected using the GNPS Metabolomics USI tool. [d]Confidence level of metabolite identification according to Schymanski *et al.* 2014.[9]

S6.2. *Spongia officinalis*

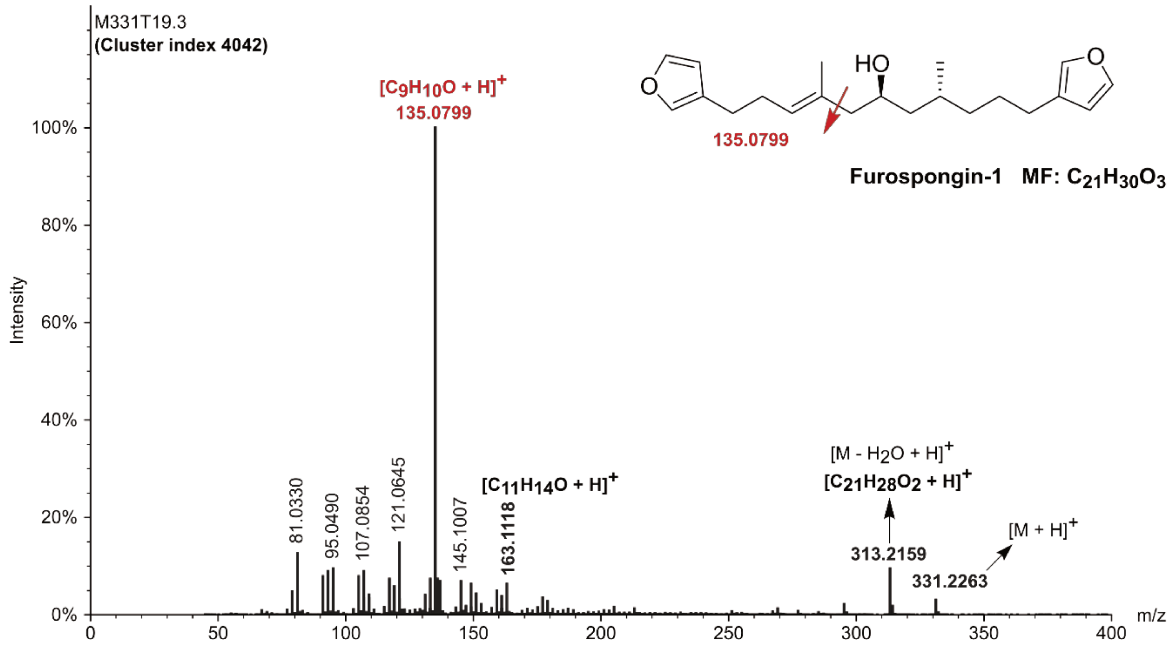


Figure S6.2.1. Annotated MS^2 spectrum of putative furospongin-1.

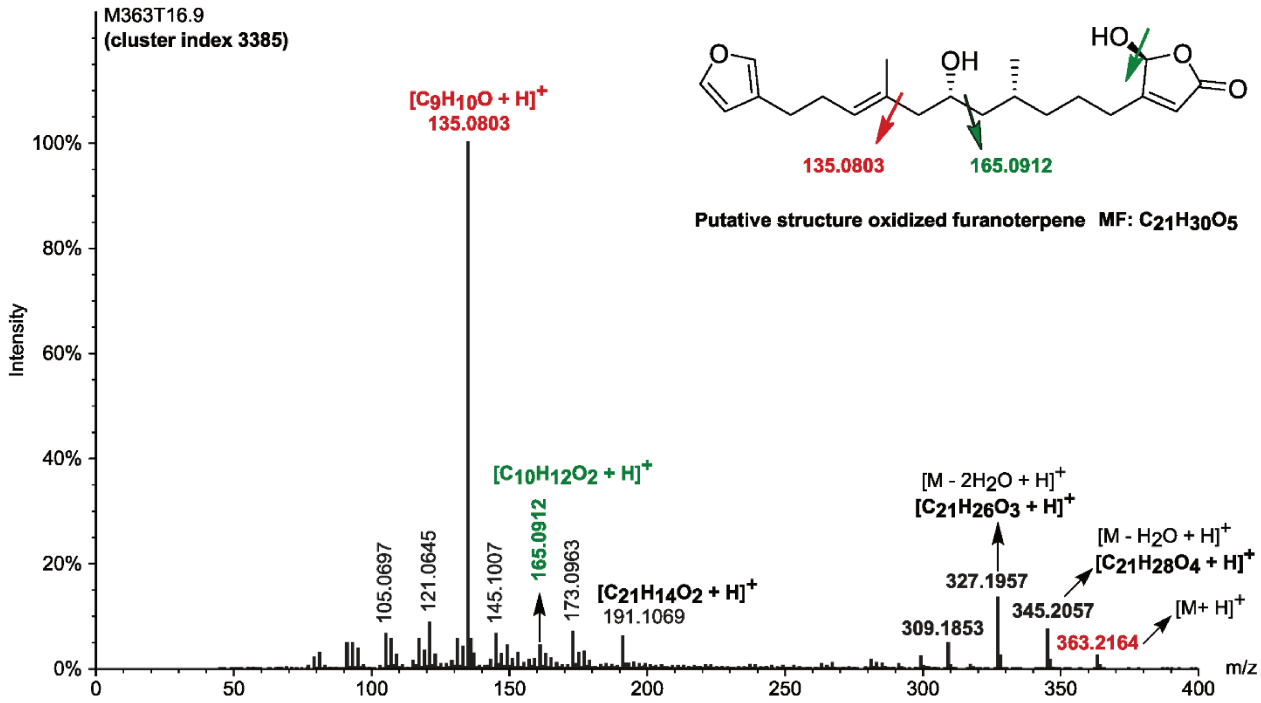


Figure S6.2.2. Annotated MS^2 spectrum of putative oxidized furospongin derivative.

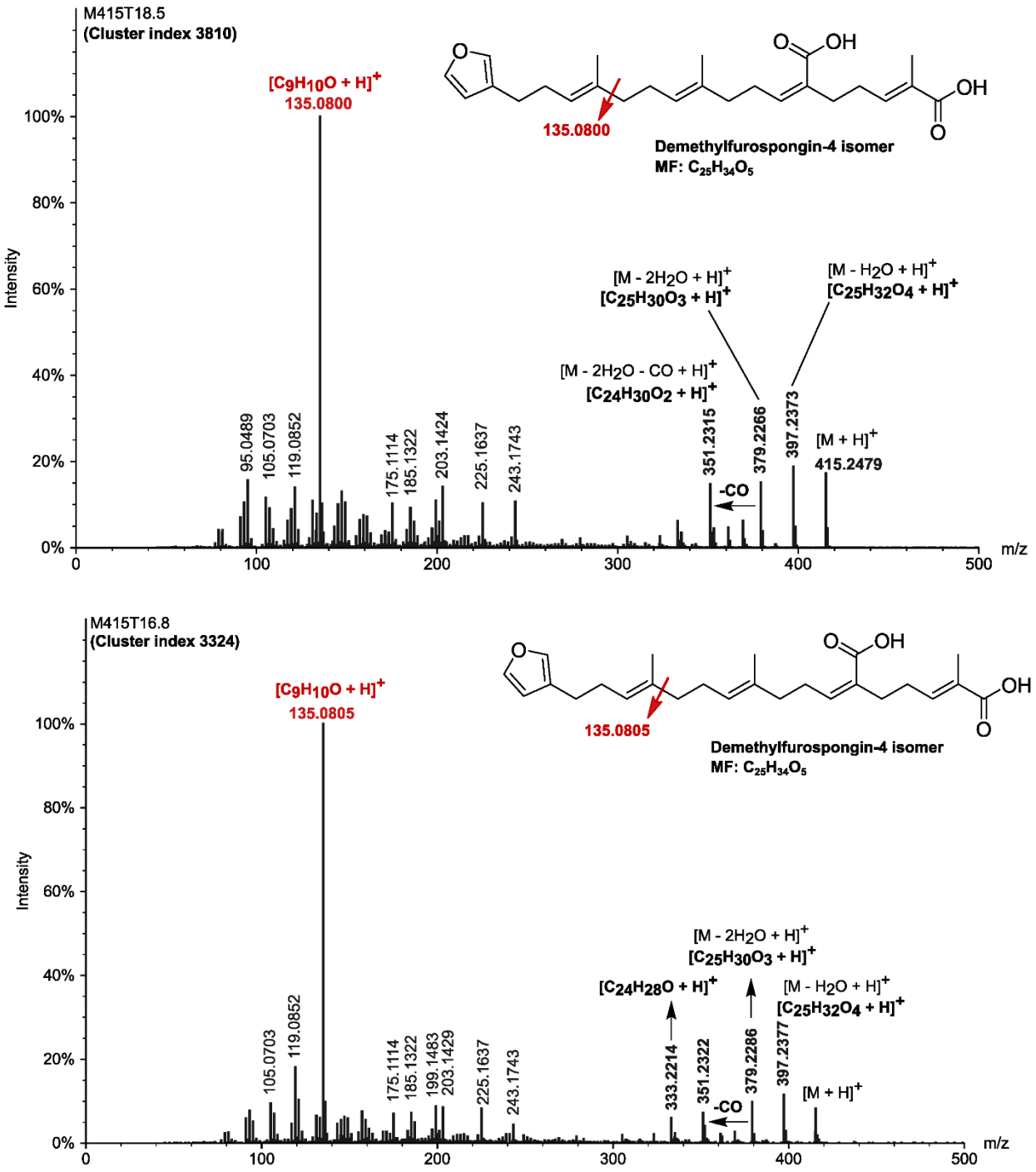


Figure S6.2.3. Annotated MS^2 spectra of putative demethylfurospongin-4 isomers.

The MS^2 spectra for the proposed demethylfurospongin-4 isomers, agree with data previously published by Bauvais *et al*. 2017.[10] Demethylfurospongin-4 is one of the most abundant furanoterpene in *Spongia officinalis* extract.[10] Double bond isomerism could explain the difference in retention time.

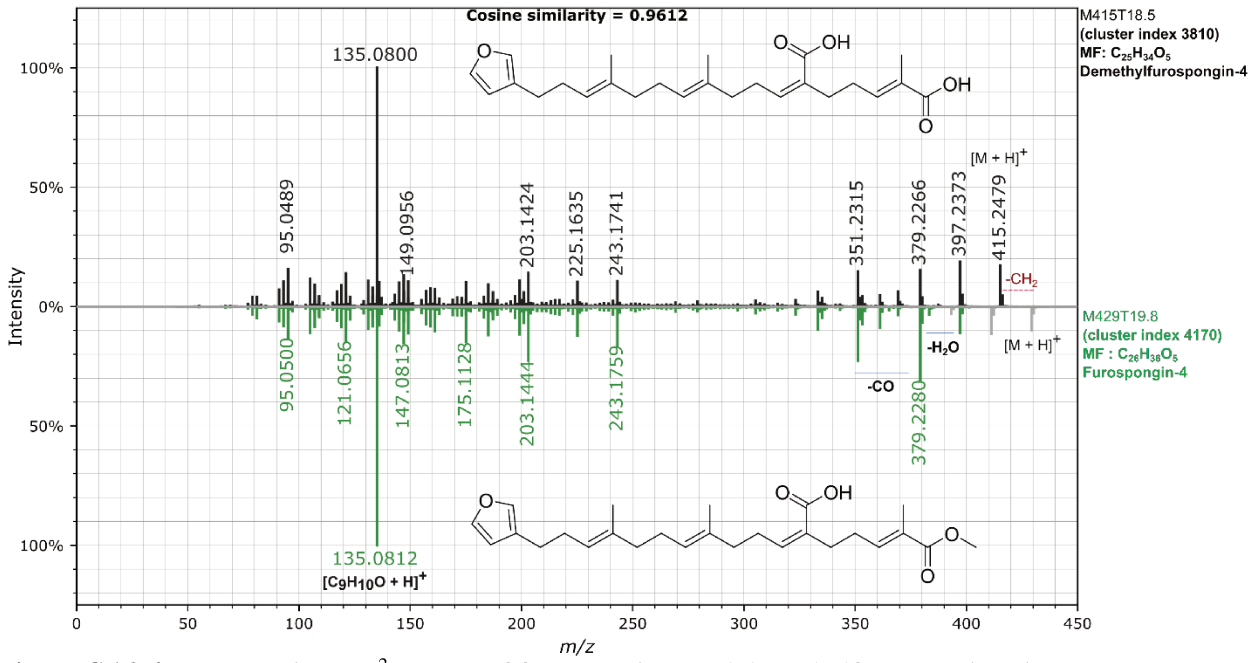


Figure S6.2.4. Comparative MS^2 spectra of furospongin-4 and demethylfurospongin-4 isomer.

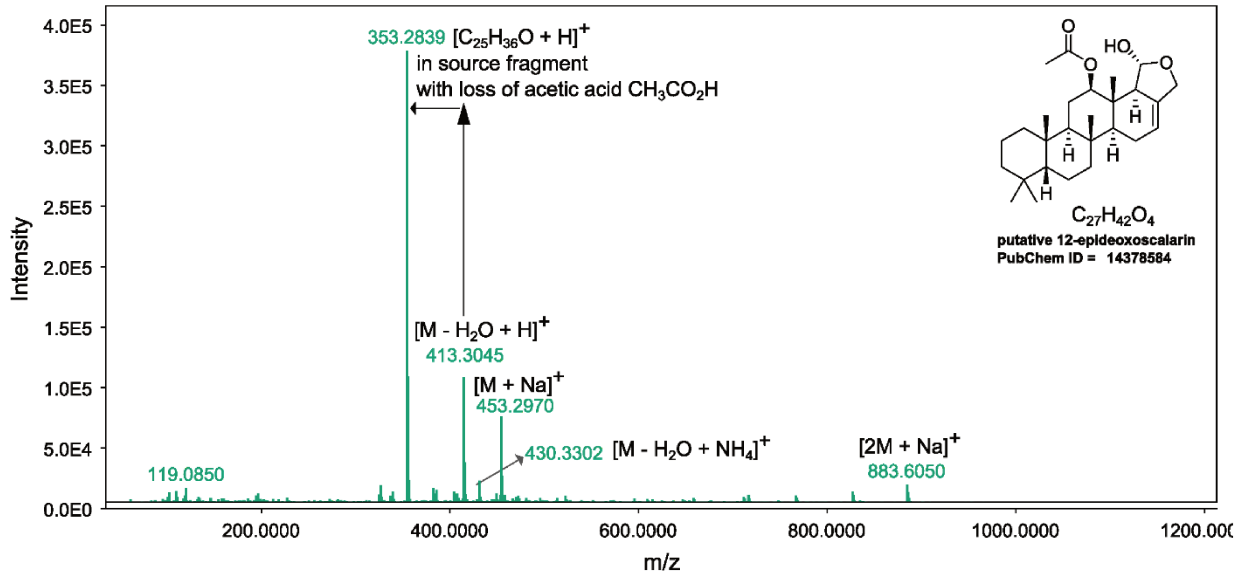


Figure S6.2.5. Annotated MS^1 spectra of M353T21.1 as putative 12-epideoxoscalarin.

The described MS^1 spectrum for the proposed scalarane sesterterpene, 12-epideoxoscalarin, agrees with data previously published (Noyer *et al.* 2011).[11]

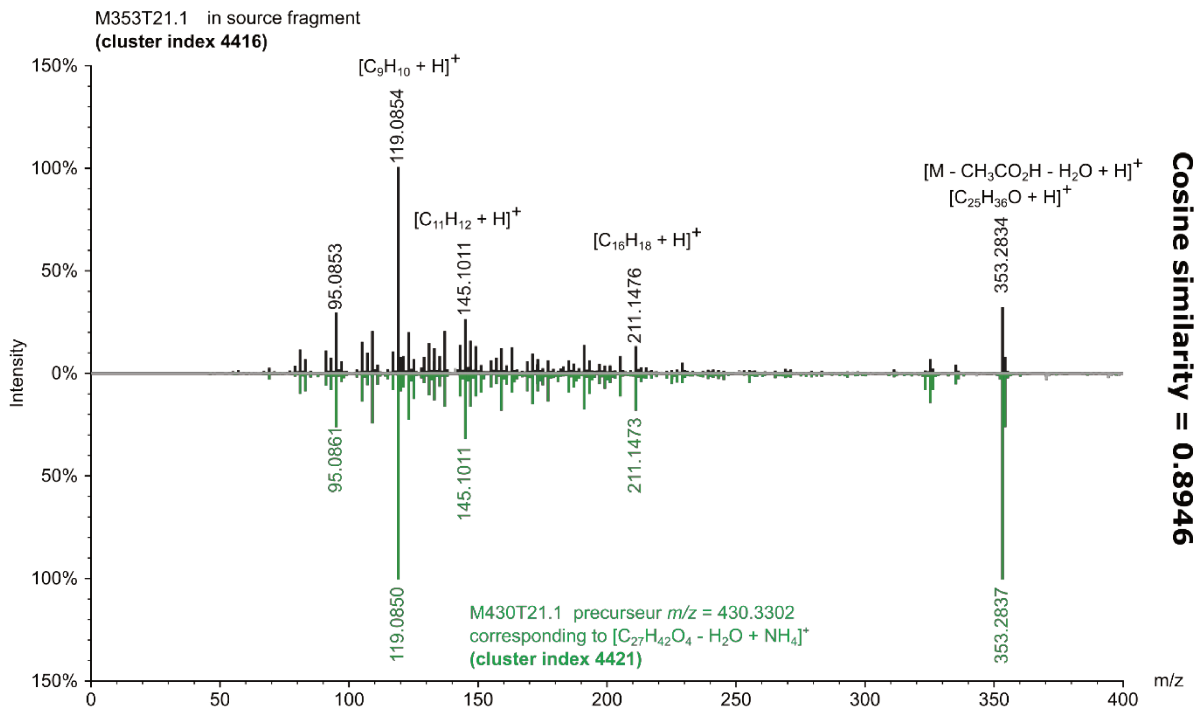


Figure S6.2.6. Comparative MS^2 spectra of M353T21.1 and M430T21.1.

Annotated MS^2 spectrum for the proposed scalarane sesterterpene, 12-epideoxoscalarin detected as *Spongia officinalis* exometabolite.

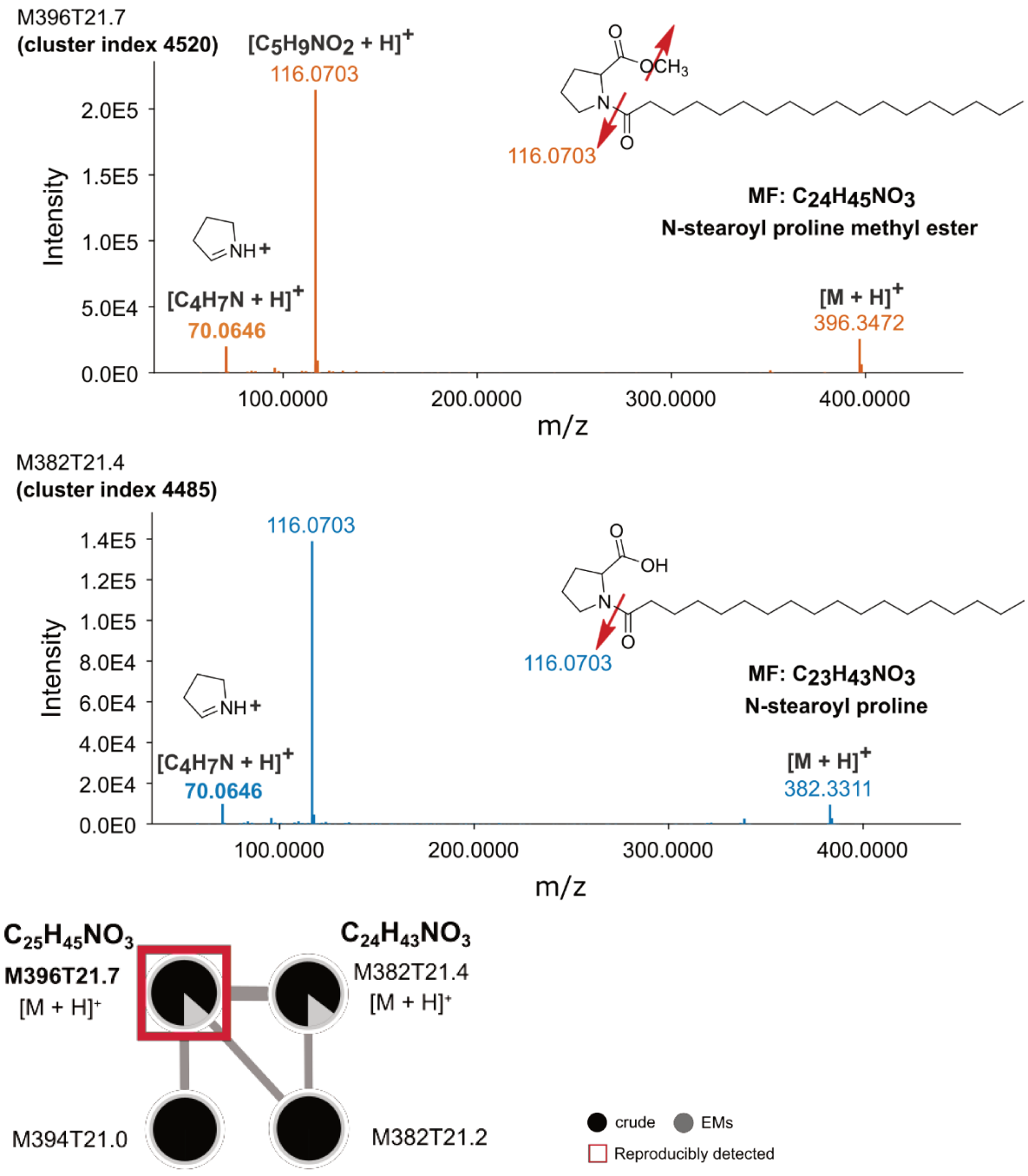


Figure S6.2.7. Annotated MS^2 spectrum of M396T21.7 (putative N-stearoyl proline methyl ester).

Table S6.2. MS data of putatively identified exometabolites found in *Spongia officinalis* crude extract and reproducibly detected as exometabolite

Common Name	Code (Cluster index)[a]	RT (min)	Molecular formula	Ion status	Measured	Calculated	MS² fragments & intensities[b]		ID[c]
					m/z				
Demethyl furospongin-4 isomer	M415T16.8 (3324)	16.8	$C_{25}H_{34}O_5$	$[M + H]^+$	415.2483	415.2479	105.0703 119.0852 **135.0805** 199.1483 379.2286 397.2377	9.4 18.1 100.0 8.7 9.7 11.5	2b
Oxidized furanoterpene	M363T16.9 (3385)	16.9	$C_{21}H_{30}O_5$	$[M + H]^+$	363.2168	363.2166	105.0697 121.0645 **135.0803** 145.1007165.0912 173.0963 327.1957 345.2057	6.5 8.7 100.0 6.5 6.5 7.0 13.5 7.4	3
Demethyl furospongin-4 isomer	M415T18.5 (3810)	18.5	$C_{25}H_{34}O_5$	$[M + H]^+$	415.2484	415.2479	95.0489 **135.0800** 203.1424 351.2315 379.2266 397.2373 415.2479	15.6 100.0 14.1 14.7 15.2 18.8 17.2	2b
Furospongin-1	M331T19.3 (4042)	19.3	$C_{21}H_{30}O_3$	$[M + H]^+$	331.2271	331.2268	81.0330 95.0490 107.0854121.0645 **135.0799** 313.2159	12.6 9.5 8.9 14.7 100.0 9.5	2b
-	M353T20.1 (4229)	20.1	$C_{21}H_{36}O_4$	$[M + H]^+$	353.2676	353.2686	167.1432 168.1463	100.0 10.9	3
12-epideoxoscalarin	M353T21.1 (4416)	21.1	$C_{27}H_{42}O_4$	$[M - CH_3CO_2H - H_2O + H]^+$ $[M - H_2O + H]^+$ $[M + Na]^+$	353.2834 413.3045 453.2970	353.2844 413.3055 453.2975	95.0853 109.1010 119.0854 137.1321 145.1011 353.2834	28.9 20.0 100.0 20.0 25.8 31.6	2b
N-stearoyl proline methyl ester	M396T21.7 (4520)	21.7	$C_{24}H_{45}NO_3$	$[M + H]^+$	396.3472	396.3472	70.06461116.0703 396.3472	9.5 100.0 12.4	3

[a]The Cluster index identifies nodes in the GNPS molecular network, the most intense peak of the isotopic pattern was used for feature codification. [b]Major MS² fragments and their intensities were selected using the GNPS Metabolomics USI tool. [c]Confidence level of metabolite identification according to Schymanski *et al.* 2014.[9]

S6.3. *Agelas oroides*

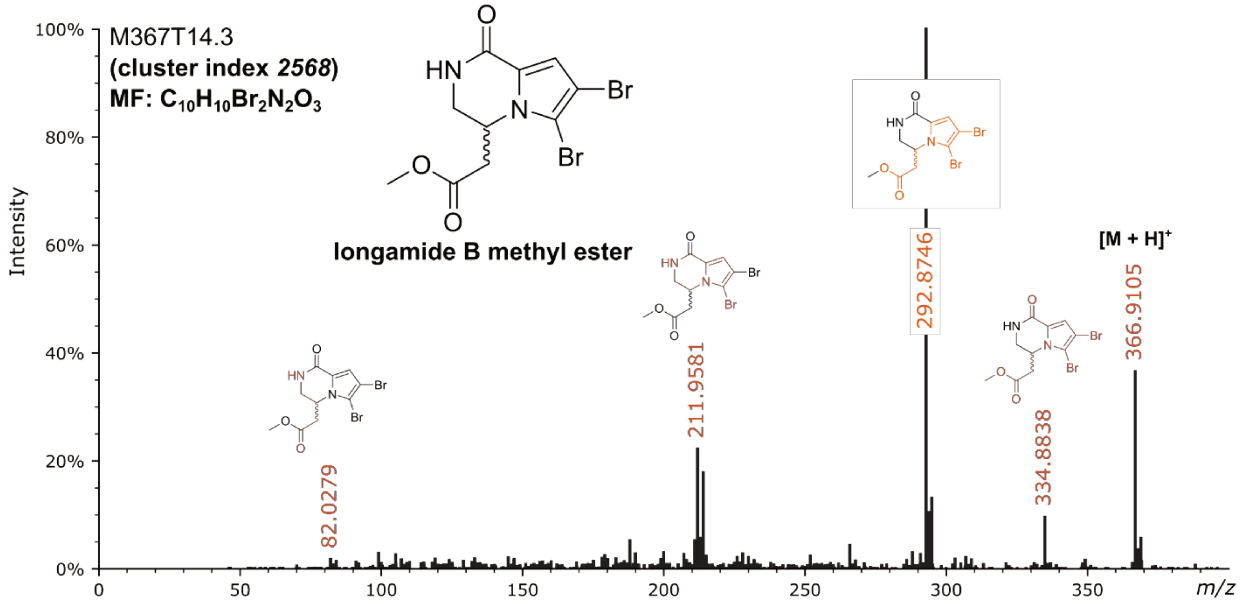


Figure S6.3.1. MS^2 spectrum of putative Longamide B methyl ester.

The proposed structure for M367T14.3 is in agreement with previously reported data.[12] The corresponding cluster index is between brackets (see also table below).

Table S6.3. MS data of putatively identified exometabolites found in *Agelas oroides* crude extract and reproducibly detected as exometabolite

Common Name	Code (Cluster index)[a]	RT (min)	Molecular formula	Ion status	Measured[b]	Calculated	MS^2 fragments & intensities[c]		ID[d]
					m/z				
Longamide B	M353T12.3 (2284)	12.3	$C_9H_8Br_2N_2O_3$	$[M + H]^+$	352.8955	352.8979	82.0283 211.9583 292.8744 334.8838	3.0 23.3 91.7 5.4	2b
Longamide B methyl ester	M367T14.3 (2568)	14.3	$C_{10}H_{10}Br_2N_2O_3$	$[M + H]^+$	364.9120	364.9131	82.0279 211.9581 292.8746 334.8838	1.8 22.2 100.0 9.6	2b

[a]The Cluster index identifies nodes in the GNPS molecular network, the most intense peak of the isotopic pattern was used for feature codification. [b]The monoisotopic peak was selected for molecular formula determination. [c]Major MS^2 fragments and their intensities were selected using the GNPS Metabolomics USI tool. [d]Confidence level of metabolite identification according to Schymanski *et al.* 2014.[9]

S7. ^{1}H NMR spectra of sponge EM extracts (EXP2)

Acquisitions parameters:
NMR analyses were performed on a Bruker Avance II+ spectrometer at 600 MHz equipped with a TCI Cryoprobe at 300 K. The probe frequency was tuned and impedance matched before each acquisition. The acquired spectra were processed using Topspin 4.3 NMR software package (Bruker BioSpin). Samples were exactly weighed and diluted in 100 µL of deuterated MeOH (CD_3OD 99.95%-d, MagniSolv, Merck) then transferred in 2 mm o.d. Match NMR tubes (Bruker # 67539).

The ^{1}H NMR acquisition parameters were set up as follows for all EM extracts:

Total duration of acquisition: 27 min

Pulse program	**zgcppr (1D sequence with presaturation of water signal)**
P1 (90 pulse)	6.59 µsec for AC_EM, 6.61 µsec for SO_EM, 6.90 µsec for AO_EM
O1P-SW	4.969 ppm (2982.09 Hz), SW:22 ppm
D1	3 sec
NS	384
RG	32
AQ	1.27 sec

P1: 90-degree transmitter high power pulse, SW: Spectral Width, O1P: Transmitter frequency offset (ppm), D1: relaxation delay (sec), NS: number of scans, RG: receiver gain, AQ: Acquisition time (sec).

S7.1. *Aplysina cavernicola*

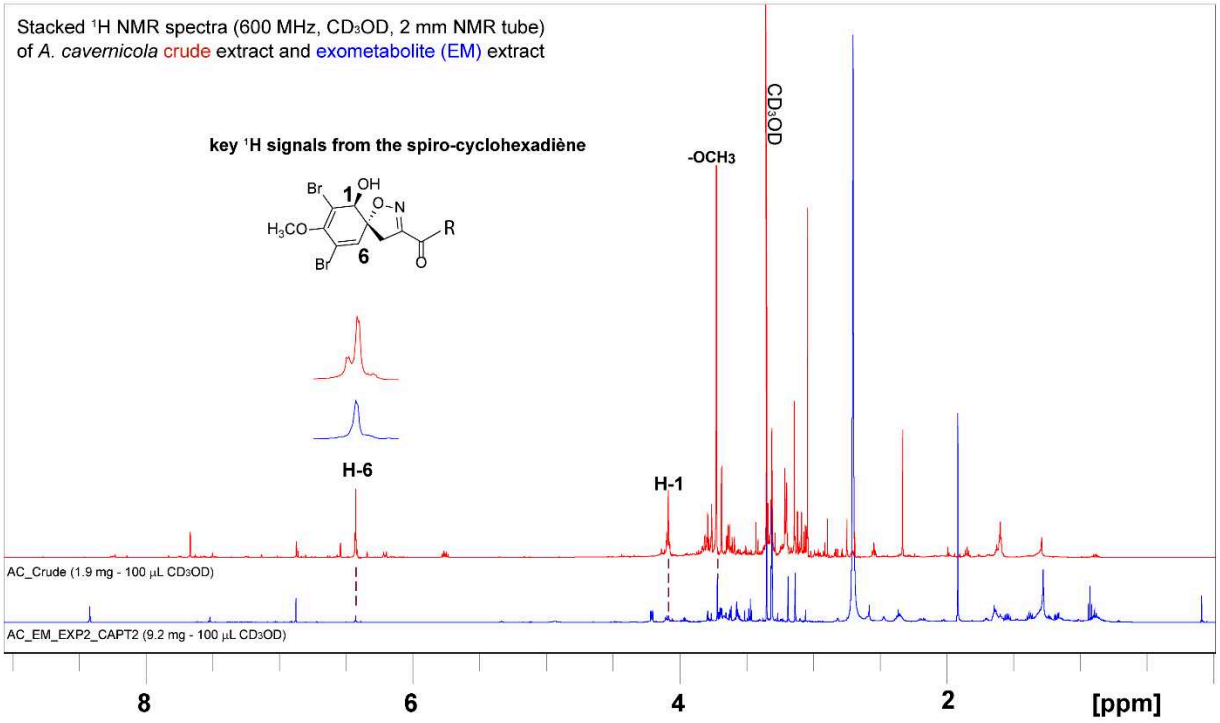


Figure S7.1.1. Stacked ^{1}H NMR spectra of *Aplysina cavernicola* crude extract with one EM extract.

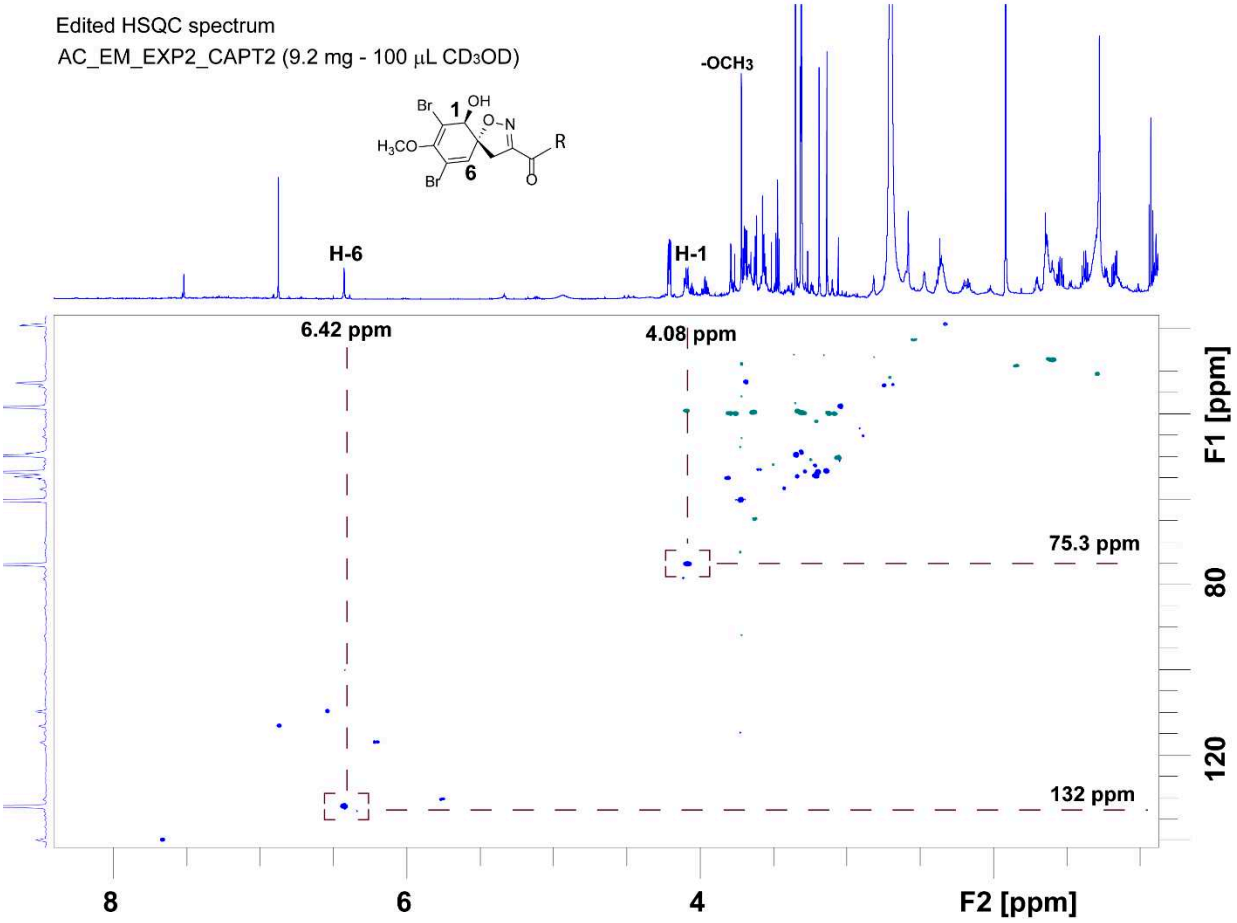


Figure S7.1.2. Key HSQC ^{1}H-^{13}C correlations, confirming the identity of H-6 and H-1, in agreement with previously published information (Mauduit *et al*. 2022, raw data accessible at https://zenodo.org/record/6375672)[135]

Table S7.1. 2D gHSQC NMR acquisition parameters (duration 2h56 min)

Pulse program	Hsqcedetgpsisp2.4 (NUSAmount = 25%) Non-uniform sampling
P1 (90 pulse)	6.59 usec
SW (O1P)	F2: 14 (5) ppm, F1: 165 (75) ppm
D1	1.5 sec
NS	100
DS	16
RG	2050
AQ	0.121 sec (F2), 0.005 sec (F1)

NUSAmount : Amount of sparse sampling set at 25%, P1: 90-degree transmitter high power pulse, SW: Spectral Width, O1P: Transmitter frequency offset (ppm), D1: relaxation delay (sec), NS: number of scans, DS: Dummy scans, RG: receiver gain, AQ: Acquisition time (sec), S/N: signal to noise ratio.

S7.2. *Spongia officinalis*

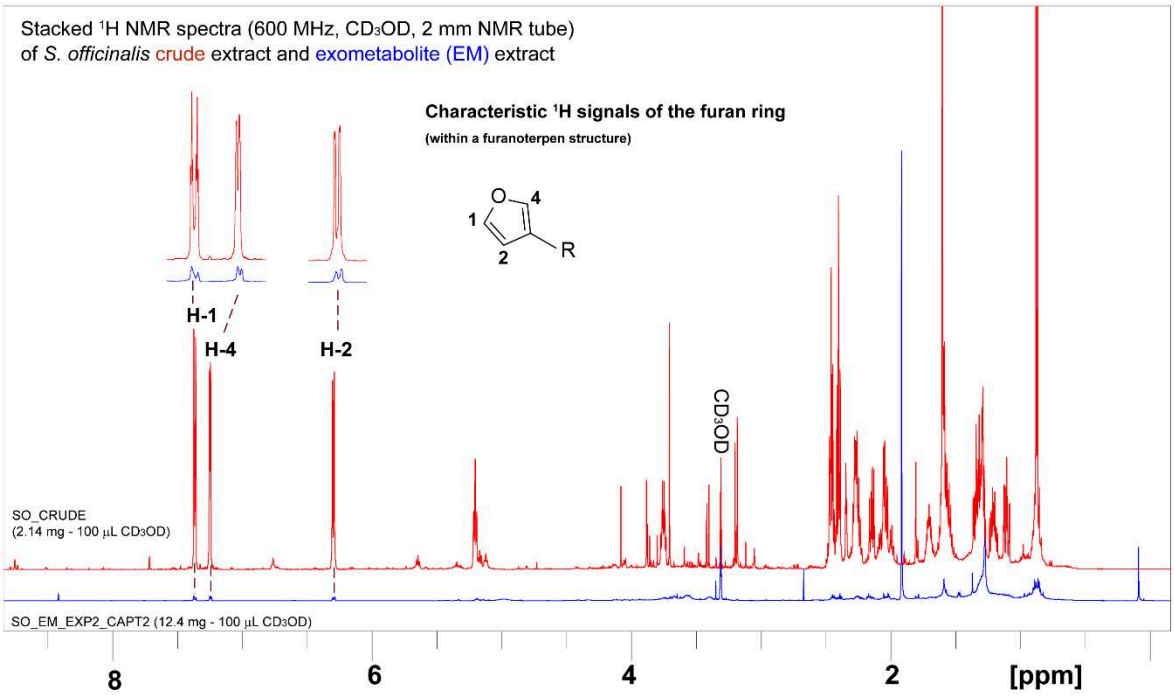


Figure S7.2.1 Stacked ^{1}H NMR spectra of *Spongia officinalis* crude extract with one EM extract. The ^{1}H chemical shifts from the furan ring are in agreement with previously published data in Bauvais *et al.* 2017.[10] See also information at Natural Product NMR-DB "CH-NMR-NP" (https://www.j-resonance.com/en/nmrdb/).

S7.3. *Agelas oroides*

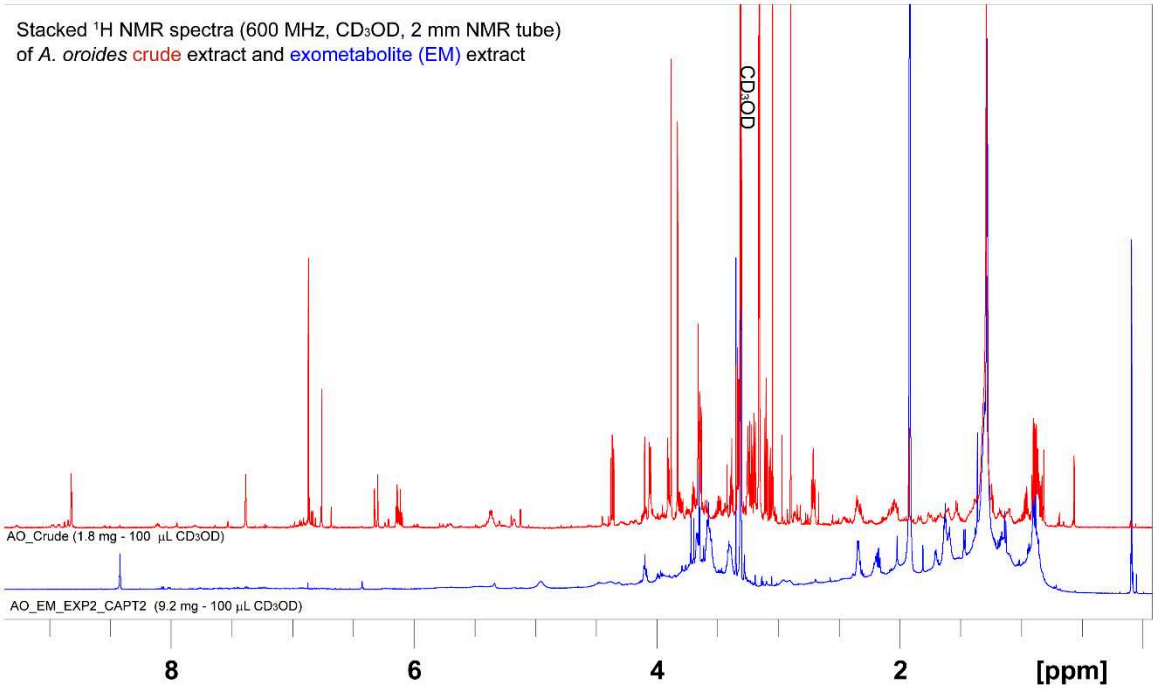


Figure S7.3.1 Stacked ^{1}H NMR spectra of *Agelas oroides* crude extract with one EM extract. Using the ^{1}H NMR set-up acquisition parameters, we could not observe any significant ^{1}H signal corresponding to the reproducibly released longamide B methyl ester in the NMR spectrum of *A. oroides* EM extracts.

S7.4. Stacked ^{1}H NMR spectra of all EM extracts (EXP2)

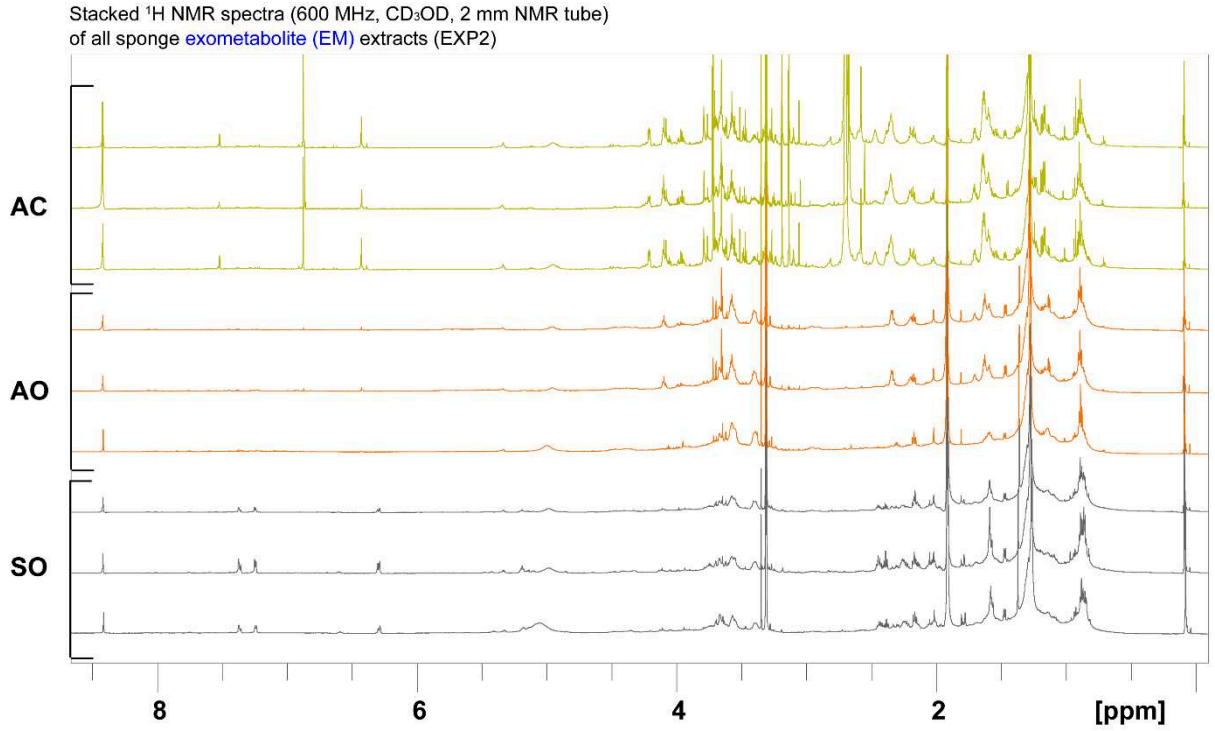


Figure S7.4. Stacked ^{1}H NMR spectra of all EM extracts from EXP2. The figure shows that each averaged sponge EM extract showed unique ^{1}H NMR fingerprints. Characteristic NMR signals corresponding to sponge specialized metabolites were observed for *A. cavernicola* and *S. officinalis*. For both sponges, several metabolites with a common core structure were identified in all EM extracts. Consequently, these metabolites collectively contributed to detectable ^{1}H signals in the NMR spectrum. For *A. oroides*, the only detection of longamide B methyl ester as reproducible EM poses a challenge for its detection by NMR.

REFERENCES:

1. Berlinck, R. G. S. *et al.* The isolation of water-soluble natural products – challenges, strategies and perspectives. *Nat. Prod. Rep.* 10.1039.D1NP00037C (2021)
2. Dittmar, T., Koch, B., Hertkorn, N. & Kattner, G. A simple and efficient method for the solid-phase extraction of dissolved organic matter (SPE-DOM) from seawater. *Limnol. Oceanogr. Methods* **6**, 230–235 (2008).
3. Petras, D. *et al.* High-Resolution Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Enables Large Scale Molecular Characterization of Dissolved Organic Matter. *Front. Mar. Sci.* **4**, (2017).
4. Roué, M., Darius, H. & Chinain, M. Solid Phase Adsorption Toxin Tracking (SPATT) Technology for the Monitoring of Aquatic Toxins: A Review. *Toxins* **10**, 167 (2018).
5. Bogdanov, A. *et al.* Small Molecule in situ Resin Capture – A Compound First Approach to Natural Product Discovery. 2023.03.02.530684 Preprint at https://doi.org/10.1101/2023.03.02.530684 (2023).
6. Vlachou, P. *et al.* Innovative Approach to Sustainable Marine Invertebrate Chemistry and a Scale-Up Technology for Open Marine Ecosystems. *Mar. Drugs* **16**, 0152–0152 (2018).
7. Chambers, M. C. *et al.* A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nat. Biotechnol.* **30**, 918–920 (2012).
8. Schmid, R. *et al.* Integrative analysis of multimodal mass spectrometry data in MZmine 3. *Nat. Biotechnol.* 1–3 (2023)
9. Schymanski, E. L. *et al.* Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. *Environ. Sci. Technol.* **48**, 2097–2098 (2014).
10. Bauvais, C. *et al.* Furanoterpene Diversity and Variability in the Marine Sponge *Spongia officinalis*, from Untargeted LC–MS/MS Metabolomic Profiling to Furanolactam Derivatives. *Metabolites* **7**, 27 (2017).
11. Noyer, C., Thomas, O. P. & Becerro, M. A. Patterns of Chemical Diversity in the Mediterranean Sponge S*pongia lamella*. *PLoS ONE* **6**, e20844 (2011).
12. Freire, V. F. *et al.* Feature-Based Molecular Networking Discovery of Bromopyrrole Alkaloids from the Marine Sponge *Agelas dispar*. *J. Nat. Prod.* **85**, 1340–1350 (2022).
13. Mauduit, M. *et al.* Diving into the Molecular Diversity of *Aplysina cavernicola'*s Exometabolites: Contribution of Bromo-Spiroisoxazoline Alkaloids. *ACS Omega* **7**, 43068–43083 (2022).

3.3. Conclusions & Perspectives

A travers cette étude, nous démontrons que l'utilisation de cet outil en plongée permet :

(1) un échantillonnage *in situ* rapide, non destructif et standardisé des exométabolites marins ;

(2) une fixation et une concentration efficace d'exométabolites labiles, de structures variées et libérés par des espèces benthiques ciblées.

A l'issue du traitement des données, nous sommes capables de retrouver de manière significative et reproductible, la signature chimique de 3 espèces d'éponges (*A. cavernicola, S. officinalis, A. oroides*) caractéristiques des entrées de grottes sous-marines de la région (Grenier et al., 2018). Pour chaque espèce, il a été possible de mettre en évidence des exométabolites spécifiques à chacune d'elles et constituant ainsi leur empreinte chimique dans l'environnement. Ces résultats m'ont ainsi permis (1) de valider l'emploi d'I-SMEL pour capter la diversité des paysages chimiques marins au-dessus des communautés benthiques cavernicoles décrites dans le Chapitre 2, et (2) d'établir mon protocole de préparation des extraits enrichis sur lesquels les analyses métabolomiques comparatives devaient être effectuées. Il serait ainsi possible d'évaluer une possible corrélation entre la biodiversité fixée et la chimiodiversité de l'eau de mer environnante (voir chapitre suivant).

Ce travail montre aussi que les champs d'applications d'I-SMEL en écologie chimique peuvent être nombreux. Il conviendrait ainsi d'évaluer plus systématiquement l'emploi d'I-SMEL sur différentes espèces benthiques ciblées, afin de mesurer plus finement la contribution de chacune des espèces à la chimiodiversité marine. Selon les résultats obtenus, il deviendrait possible avec I-SMEL, d'étudier les changements métaboliques des organismes au sein leur environnement, apportant ainsi une série d'informations plus globale et complémentaire que celles mesurées sur des organismes isolés en aquarium. A l'instar de nombreuses études passées qui ont porté sur la variabilité du métabolisme spécialisé d'éponges (*e.g.* Ivanisevic et al., 2011a, 2011b ; Reverter et al., 2018) ou d'autres invertébrés vivant dans les grottes (Cachet et al., 2015), on pourrait par exemple, suivre les réponses métaboliques en relation avec les variations des conditions environnementales (*e.g.* Sogin et al., 2016), ou encore face à l'arrivée d'un agent pathogène (Ochsenkühn et al., 2018).

Dans le cadre de cette thèse, la démonstration étant faite qu'il était possible de tracer la contribution de trois espèces dans l'eau des grottes, le moment était alors venu d'essayer d'analyser plus en détail les paysages chimiques des quatre grottes étudiées.



Chapitre 4

Paysages chimiques marins et possible contribution des communautés benthiques

4.1. Introduction

Le contexte écologique posé (Chapitre 2) et la méthode mise au point (Chapitre 3), l'objectif de cette partie du travail était d'évaluer les relations entre la diversité des paysages chimiques des 4 grottes et le niveau de diversité des communautés benthiques.

Pour ces 4 grottes, les contrastes de biodiversité étant particulièrement marqués entre la communauté des GSO (forte biodiversité) et celle des GO (faible biodiversité), on pouvait s'attendre à observer des fortes variations de composition chimique entre l'eau des GSO et l'eau des GO. Les éponges étant le groupe taxonomique majoritairement représenté dans la communauté des GSO, on supposait retrouver leur contribution dans le paysage chimique environnant. Chaque communauté de grotte ayant un assemblage d'espèces (en diversité et en abondance) qui leur est propre, on émettait l'hypothèse que l'eau de chacune d'elles ait une empreinte chimique distincte, révélant la contribution chimique des espèces dominantes. Sur la base des analyses de photoquadrats, on supposait notamment que 5 espèces d'éponges particulièrement représentatives de la communauté GSO (*Ircinia variabilis*, *Haliclona mucosa*, *Oscarella tuberculata*, *Petrosia ficiformis*, *Haliclona fulva* et *Aplysina cavernicola*) auraient une contribution significative dans le paysage chimique. De plus, le nombre d'espèces recensées variant d'une GSO à une autre, et d'une GO à une autre, on s'attendait à observer une corrélation positive entre le nombre d'espèces dans la communauté et le nombre de classes structurales caractérisant la complexité du paysage chimique de l'eau environnante.

Les résultats de cette étude font l'objet d'un manuscrit en préparation :

Derrien M., Chevaldonné P., Simmler C., & Pérez T. *(in prep)* **Putative contribution of benthic communities to chemical seascapes: a case study in Mediterranean underwater caves.**

4.2. Article : Paysages chimiques marins et possible contribution des communautés benthiques : étude de cas dans les grottes sous-marines de la Méditerranée

Putative contribution of benthic communities to the chemical seascapes: a case study in Mediterranean underwater caves

Authors

Marie Derrien[1], Pierre Chevaldonné[1], Charlotte Simmler[1‡*] and Thierry Pérez[1‡]

Affiliations

1. IMBE, UMR CNRS 7263, IRD 237, Aix Marseille Université, Avignon Université, Station Marine d'Endoume, Chemin de la batterie des lions, 13007 Marseille, France

‡ Co-last authors

* Corresponding author: charlotte.simmler@imbe.fr

Keywords

Chemodiversity; Biodiversity; Porifera; Metabolomics; Underwater caves

Abstract

To apprehend marine chemical ecology and processes such as chemical mediation in the marine ecosystems, it is important to evaluate the influence and potential contribution of the sessile biodiversity on the measured chemical composition of seawater. For that purpose, we used the underwater device I-SMEL (In Situ Marine moleculE Logger) to be as close as possible to benthic organisms, and therefore to rapidly capture marine exometabolites through *in situ* adsorption in four Mediterranean underwater caves. This ecosystem is known for the contrasting levels of biodiversity between the communities at the entrance (SD, Semi-Dark) and at the back-end (D, Dark) of the cave, at either side of a confinement gradient. Mass-spectrometry (MS)-based analyses combined with chemometrics and molecular identifications led to the comparison of seawater chemical diversities. Our results revealed that the level of confinement drives the major chemical differences across the four investigated caves. The measured chemical seascape at the entrance was found to harbor mainly alkaloids and terpenoids, possibly deriving from the specialized metabolisms of sponge species that dominate the community. Conversely, fatty acids and polyketides with high degree of oxidation dominated the seawater composition at the back of the cave. Therefore, the four caves were more differentiated by their chemical seascape at the entrance (SD community) than at their back-end (D community). The mean species richness used to characterize the benthic biodiversity tends to correlate positively with the total number of chemical structural classes measured in the surrounding water. This study provides molecular-level insights towards further understanding the interplay between marine exometabolites and the structuring of benthic biodiversity, as well as their role in the functioning of marine ecosystems.

Introduction

Seawater comprises a plethora of organic molecules, some dissolved in the water column and some aggregated as colloidal or small diluted particles. All these compounds participate in the composition of seawater for a given environment, and define a chemical seascape (Mauduit et al., 2023; 2025; Derrien et al., 2024a). Many of these molecules originate from the metabolic activities of marine organisms which, once released in the environment (*i.e.* exometabolites), contribute to the local pool of Dissolved Organic Matter (DOM). These molecules may convey potential signals for the whole ecosystem (Cassier et al., 2000; Mauduit et al., 2025), thus regulating inter and intra-specific distant interactions. For instance, several studies demonstrated that they could act as chemical cues for reproduction (Yen & Lasley, 2011), defense (Pohnert, 2004), feeding (Zimmer et al., 1999; Kamio & Derby, 2017), habitat selection and recognition (Lecchini et al., 2005, 2014; Lecchini & Nakamura, 2013; Santonja et al., 2018; Quinlan et al., 2023). Through these interactions, they contribute significantly to the whole ecosystem functioning (Burks & Lodge, 2002; Hay, 2009).

Keystone benthic species (algae, sponges, corals) are known to produce structurally diverse metabolites (Carroll et al., 2022). Some of them are exudated in the seawater and contribute to enrich the surrounding chemical seascape (Ternon et al., 2016; Fiore et al., 2017; Powers et al., 2019; Weber et al., 2022; Wegley Kelly et al., 2022; Mauduit et al., 2023; Pozas-Schacre et al., 2025). The democratization of untargeted mass spectrometry (MS)-based metabolomics, along with the development of chemoinformatic tools for spectral annotations enable a more thorough description of marine exometabolite diversity (Petras et al., 2017; Nothias et al., 2020; Dührkop et al., 2019; Quinlan et al., 2022; Schmid et al., 2023). These advances ultimately open new opportunities to understand chemical exchanges and interactions in the ocean. Despite these significant analytical advances, only a few studies have focused on deciphering the molecular complexity of seawater to characterize the pool of exometabolites that may govern benthic ecosystem species interactions (Quinlan et al., 2023; Santonja et al., 2018) distinct from nutrient

exchanges (Weber et al., 2020, 2022; Wegley Kelly et al., 2022; Hildebrand et al., 2022; Becker et al., 2023).

Consequently, interactions in the ocean are too often only considered under the angle of trophic relationships, rather than considering other functional processes such as the role of chemical mediation or the interplay between seawater chemical diversity and the structuring of benthic biodiversity. In terrestrial ecosystems, chemical mediation is nowadays acknowledged as an invaluable ecosystem service (Silva et al., 2018) that should inspire marine scientists to invest time and energy in such research topics. This necessary improvement in knowledge on marine chemical exchanges can be achieved in several stages, from case studies under controlled conditions (*e.g.* Santonja et al., 2018), to *in situ* measurements starting with relatively stable ecosystems.

Coastal underwater caves are rather accessible ecosystems in the Mediterranean Sea which make up ideal stable experimental conditions compared to the open sea. They are often considered as natural mesocosms of the deep-sea ecosystems (*e.g.* Vacelet et al., 1994), as little or no light entering in the caves limit the development of photosynthetic organisms, which are subject to important seasonal variations. Low water movements inside the cave also lead to a limited nutrient supply creating a confinement gradient from the entrance to the back-end of the cave (Harmelin et al., 1985; Bussotti et al., 2006), associated with a decrease of biomass and species richness (Laborel & Vacelet, 1958; Riedl, 1966). Numerous large, erect growth forms at the entrance of the cave are progressively replaced by more scarce encrusting species coping with the darkness at the back-end (Harmelin et al., 1985). At each extreme of the confinement gradient, two communities are therefore acknowledged: the Semi-Dark (SD) and the Dark (D) cave communities (Pérès et Picard, 1964). Sponges dominate the benthic assemblages of these communities and share the substrate with bryozoans, cnidarians, ascidians and serpulid polychaetes (Pérès 1967, Vacelet et al., 1976; Harmelin et al., 1985, Grenier et al., 2018; Derrien et al., 2024b). Recently, it has been hypothesized that sponge exometabolites could act as chemical cues in the homing behavior of crustaceans (Ashur & Dixon, 2019),

including cave-dwelling mysids (Santonja et al., 2018, Derrien et al., 2024a). In Mediterranean underwater caves, this homing behavior has been related to the chemical composition of the seawater, described through untargeted tandem MS metabolomic analyses. This research highlighted a specific chemical signature for each analysed cave seawater with putative markers likely released by benthic organisms including cave-dwelling sponges.

Since a relationship between benthic assemblages and chemical seascapes has been demonstrated in coral reef ecosystems (Weber et al., 2020; Wegley Kelly et al., 2022; Becker et al., 2023; Garcia et al., 2024), the present study aimed at correlating the benthic biodiversity to the molecular composition of its surrounding seawater in the Mediterranean cave ecosystem. The recent description of the benthic species composition of four of such underwater caves (Derrien et al., *2024b*) showed significant differences in benthic assemblages across them, but with even more marked differences when comparing their SD communities on the one hand and their D communities on the other. In the four studied caves, the SD community is the most diverse and harbors the highest number of species, compared to the D community. Each cave presents a different species assemblage with distinct dominant species for their SD and D communities. Here, we hypothesize that the species composition of each sessile community may partially shape varying chemical seascapes.

We investigated the relationship between the chemical diversity of waterborne compounds detected in delimited areas of underwater caves, and the diversity of observable sessile organisms. To achieve this objective, we deployed I-SMEL (*In Situ* Marine moleculE Logger) device (Mauduit et al., 2023) to rapidly capture and enrich diluted exometabolites occurring in the close vicinity of SD and D benthic communities (EXP 1). Using untargeted tandem MS-based metabolomics combined with *in-silico* and manual spectral annotations, we sought to determine whether the organic molecular composition of seawater significantly varied between caves. Additionally, we examined whether the measured chemical diversity was influenced by the confinement level within each cave (between SD and D communities). If so, we tried to

identify which structural classes contributed the most to this discrimination. Hence, we tested the hypothesis that the more diversified the benthic communities are, the richer the chemical composition and the nutritional quality of the surrounding seawater is. Among the diverse molecules present in the seawater associated with both benthic communities, we intended to identify chemical markers of cave seawater and to link them to their specific benthic producers. To that end, additional exometabolite captures were performed in aquaria (EXP 2) with representative and abundant sponge species characterizing the investigated caves. Such experiments allowed us to assess the chemical contribution of these species to each investigated chemical seascape.

Materials and Methods

The deployed analytical pipeline is presented in Figure 1.

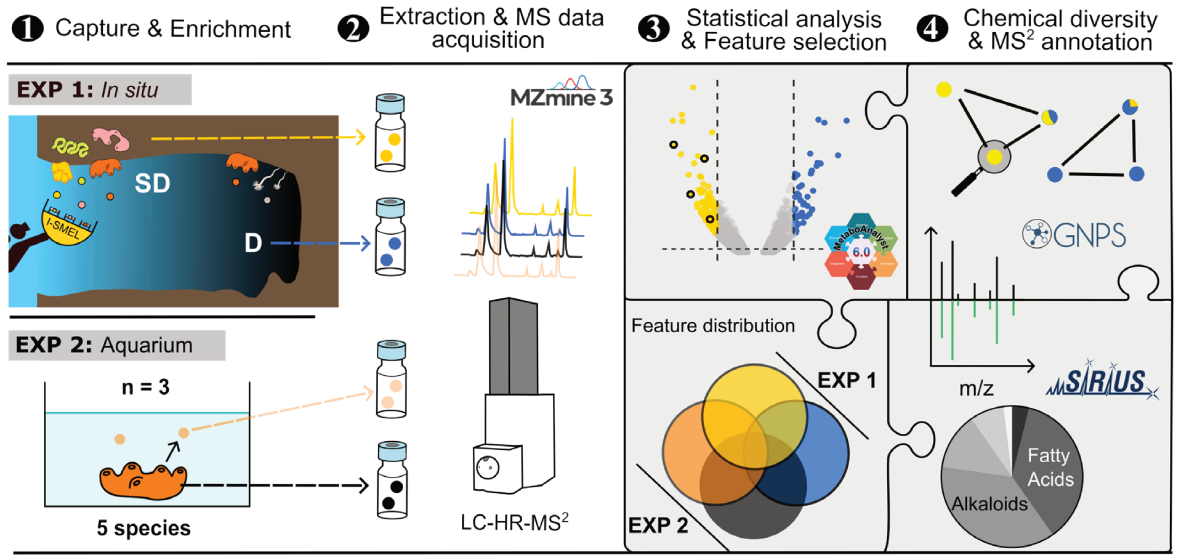


Figure 1: Sample preparation and analytical pipeline to characterize the seawater chemical diversity associated with the Semi-Dark (SD) and Dark (D) benthic communities of different underwater caves. EXP: Experiment, LC-HR-MS: Liquid-Chromatography High-Resolution Mass-Spectrometry

1. Study sites & sampling stations

The seawater sampling was performed above the SD and D communities of four underwater caves, leading to a total of 8 sampled stations. The caves, Méjean (43° 19.7' N, 5° 13.2' E), Jarre (43° 11.8' N, 5° 21.9' E), Figuier (43° 12.4' N, 5° 26.3' E) and 3PP (43° 9.8' N, 5° 36.0'

E) are distributed from the North of Marseille to the eastern extremity of the Calanques National Park (South of France) and are located at 11 to 22 m depth.

For all 4 caves, a biodiversity description for each SD and D community is provided in Derrien et al. (2024b). These data were used here to be compared to the chemodiversity of the SD and D chemical seascapes.

In addition, concentrations in chlorophyll a, nutrients (nitrites, nitrates and phosphates) and total Carbon and Nitrogen were measured by sampling 500 mL of seawater in each station, above the communities, to characterize the degree of oligotrophy for each cave (Table 1) (See Raimbault et al., 1999, 2004; Aminot & Kérouel, 2004, 2007 for detailed methods).

Table 1: Chemical parameters of seawater sampled in the marine cave habitat at the level of the two distinct communities (Semi-Dark and Dark). Chl.: Chlorophyll, C: Carbone, N: Nitrogen

Cave	**Community**	**Chl. A** $\mu g.L^{-1}$	**Nitrites** $\mu mol.L^{-1}$	**Nitrates** $\mu mol.L^{-1}$	**Phosphates** $\mu mol.L^{-1}$	**C total** $\mu mol.L^{-1}$	**N total** $\mu mol.L^{-1}$
Méjean	Semi-Dark	0.40	0.104	0.713	0.035	138.970	7.010
	Dark	0.24	0.102	1.093	0.052	384.849	9.340
Jarre	Semi-Dark	0.38	0.097	0.889	0.046	203.090	8.500
	Dark	0.19	0.112	1.147	0.061	287.920	9.980
Figuier	Semi-Dark	0.33	0.092	0.416	0.028	134.130	7.140
	Dark	0.13	0.086	1.230	0.040	435.070	8.840
3PP	Semi-Dark	0.29	0.083	0.333	0.032	221.540	7.030
	Dark	0.14	0.201	0.988	0.054	293.090	7.060

2. Capture and enrichment of chemical seascapes and sponge exometabolites

2.1 Experiment 1 (EXP1): In situ *capture of waterborne molecules*

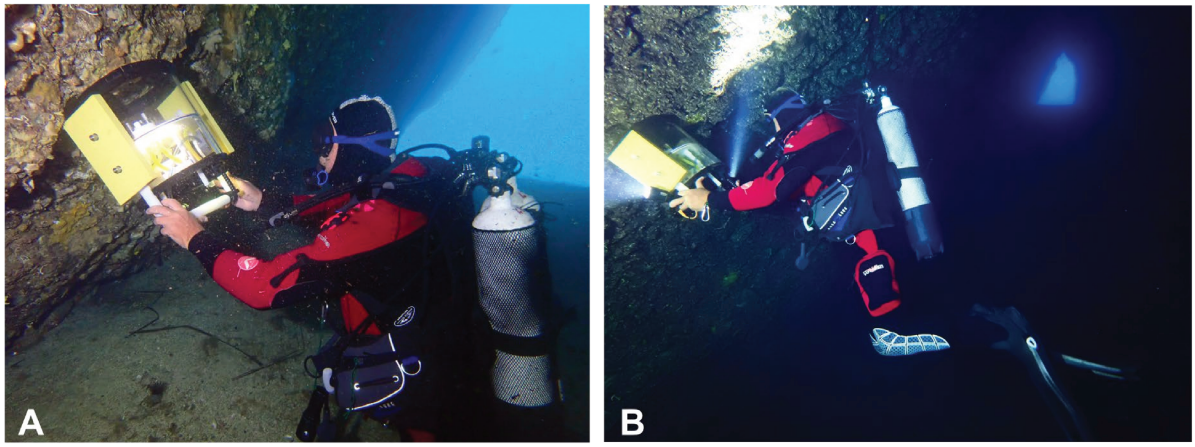


Figure 2: Deployment of the I-SMEL instrument in marine caves above **(A)** the SD community and **(B)** the D community inside the 3PP cave

In the four underwater caves, *in situ* captures were performed by using the I-SMEL device (Mauduit et al, 2023) holding three conditioned Solid Phase Extraction (SPE) disks made of divinylbenzene polymer (DVB, 47 mm Atlantic Disk Biotage). These captures were achieved 4 times over a year in order to integrate the seasonal variability. Each time, 6 captures of seawater-diluted molecules were performed in each cave by deploying I-SMEL above 3 random areas of both communities (SD and D) (Figure 2).

Each capture corresponded to 2.5 L of seawater filtered on one single SPE Disk (duration: 3 min / capture). In total, 96 captures were conducted (n = 24 captures / cave).

2.2 Experiment 2 (EXP2): Captures of sponge exometabolites

- *Sponge collection*

The most represented sponge species of the SD community were collected in order to evaluate their exometabolite composition and further decipher their contribution to the recorded chemical seascapes from EXP1. Abundant sponge species for which exometabolite compositions are not referenced in the literature (or are unknown) were collected for this experiment. These species were *Haliclona fulva*, *Haliclona mucosa*, *Oscarella tuberculata*, *Ircinia variabilis* and *Petrosia ficiformis* (Figure 3). Among the other sponge species commonly

found in the SD community, the exometabolite profiles of *Aplysina cavernicola*, *Agelas oroides, Crambe crambe* and *Spongia officinalis* have already been partly investigated by previous authors (Ternon et al., 2016; Mauduit et al., 2022, 2023).

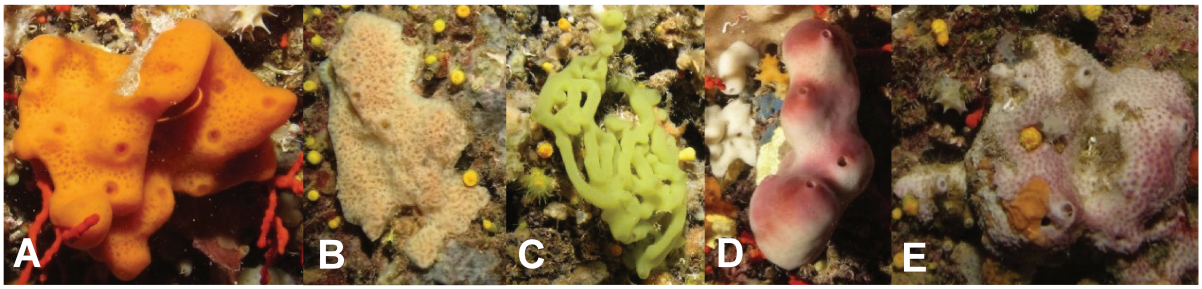


Figure 3: The five cave sponge species from the Semi-Dark community, sampled for exometabolite captures in aquarium. **(A)** *Haliclona fulva,* **(B)** *Haliclona mucosa*, **(C)** *Oscarella tuberculata*, **(D)** *Petrosia ficiformis*, **(E)** *Ircinia variabilis*.

Sponges were transported to the laboratory in sealed jars filled with seawater and without exposure to air. Upon arrival, they were maintained in several 50 L-aquaria with a constant renewal of natural seawater maintained at 15 °C for the duration of the experiments. Organisms were also kept protected from light, in semi-darkness, to mimic the light conditions of the caves from which they were harvested. Daily visual inspections were performed to check their apparent health: maintenance of their coloration, opening of oscula, production of mucus by *H. mucosa*, absence of either possible epibiosis, white bacterial veil or tissue necrosis. An acclimation period of minimum 16 h was respected before initiating exometabolite enrichment experiments.

- *Exometabolite enrichment in aquarium*

Between 4 and 8 specimens of each species, representing collectively a volume of ~ 120 cm^3 were placed in smaller 13 L aquaria with continuous renewal of natural seawater. After an acclimation period of 5h, seawater arrival was then stopped to allow the concentration of exometabolites in the aquaria during 16 h (Santonja et al., 2018; Mauduit et al., 2022). The same enrichment process was repeated three times independently with the same set of selected specimens. An aquarium without sponge was used as a negative control (CTRL). This aquarium was filled with the same volume of natural seawater and kept under the same

experimental conditions than the other aquaria. After the 16 h seawater enrichment period, 6 L of each conditioned seawater was directly filtered on pre-conditioned divinyl benzene (DVB) solid phase extraction (SPE) disks to adsorb diluted molecules (1 disk for 6L with a flow rate of 20 mL/min) using the automatic solid phase extraction instrument (Dionex Autotrace 280, Thermo Scientific). Disks were eluted with a flow rate of 5 mL/min to recover the adsorbed metabolites as described below.

3. Preparation of extracts

3.1 Preparation of exometabolite enriched extracts

The Autotrace 280 instrument was used to condition the DVB disks, to filter the collected seawater from EXP 2 and finally to extract the molecules adsorbed onto it. The DVB disks were conditioned with 10 mL of ethyl acetate (EtOAc), followed by 10 mL of methanol (MeOH), and ending with 10 mL of distilled water (H_2O).

All the DVB SPE disks from EXP1 and EXP2 were eluted following the sample protocol as described hereafter. The disks were washed with 30 mL deionized H_2O as desalting step. The extraction of dissolved molecules was performed by eluting the DVB disks with 10 mL of MeOH, followed by 10 mL of MeOH/EtOAc (50:50 v/v) ending with 10 mL of EtOAc. The solvent elution rate was set at 5 mL/min. A total of 30 mL of extract enriched in waterborne molecules was obtained, evaporated to dryness in an evaporator concentrator MiVac Quattro (Genevac, Biopharma Technologies, France), rediluted in 1 mL of MeOH MS-grade, kept at least 2 h at 20 °C to precipitate the residual sea salts. After centrifugation (5 min, at – 4 °C 14 K rpm), the supernatants were filtered on PTFE luer-lock filters (0.22 μm, cat#26142, Restek). Final extracts were concentrated in 500 µL of MeOH-MS-grade. An additional DVB disk was eluted and prepared following the same protocol to generate a technical blank for downstream metabolomic analysis. For the EXP1 captures, three replicate extracts from each underwater cave community were also pooled, thereby yielding a total of eight average extracts (AVG) per cave (n = 4 seasons x 2 communities), that will be further used as analytical reference.

3.2 Preparation of sponge crude extracts

After the series of exometabolite captures, sponges were flash frozen in liquid nitrogen, stored at - 80 °C then freeze-dried for at least 48 h. Dried sponges were reduced to a thin powder with a knife mill for domestic use. Approximately one gram of each sponge powder was mixed with 10 mL of MeOH LC-grade, and sonicated for 30 min (Ultrasonic cleaner TUC-70). The mixture was filtered under vacuum, and the remaining sponge powder was rinsed with 15 mL MeOH. The total 25 mL sponge MeOH crude extract was then evaporated to dryness under vacuum. These crude extracts were resuspended in 1.5 mL MeOH/dichloromethane (50:50 v/v) and deposited evenly on the surface of conditioned DVB SPE disks and dried under the hood. The DVB disks were then eluted following the same protocol as described above (see 2.1). All extracts evaporated to dryness were prepared at concentration in compliance with the ionization capacity of the molecules: 0.2 $mg.mL^{-1}$ for *O. tuberculata*, *I. variabilis*, *H. mucosa,* and at 1 $mg.mL^{-1}$ for *H. fulva*, *P. ficiformis* with MS-grade MeOH. They were filtered on PTFE luer-lock filters (0.22 μm, cat#26142, Restek). These extracts were used as analytical reference for MS-based structural dereplication of marine exometabolites.

4. UHPLC-UV HR-MS/MS acquisitions

Two analytical sequences were developed in parallel. The first one concerned the MS-based analysis of extracts enriched in seawater molecules from EXP1, the second one was set up with sponge exometabolite extracts from EXP2, whose chemical compositions were compared with the AVG extracts from EXP1. Chromatographic separations were achieved on a Luna® Omega Polar C18 UHPLC column (Phenomenex), maintained at 42 °C, with an elution gradient composed of (A) water and (B) acetonitrile (MeCN) both with 0.1% formic acid, under the following conditions: from 1% (B) during 1 min up to 95% (B) at 17 min and during 4.5 min (flow rate 0.45 $mL.min^{-1}$, injection volume 5 μL) leading to a reconditioning at 1% (B) for 24.5 min. Mass spectrometry detection parameters (ESI-Q-ToF, Bruker Impact II) in ESI positive and negative modes were set as follows: nebulizer gas N_2 at 3.5 bars; dry gas at 12 $L.min^{-1}$,

capillary temperature at 200 °C and voltage at 4500 V. MS/MS acquisition mode was set with a scan rate of 4 Hz (full scan from 50-1200 *m/z*), and a mixed collision energy 20 - 40 eV (25/75% time at each collision energy, stepping mode). A sodium formate/acetate solution forming clusters on the studied mass range was used as calibrant and automatically injected before each sample for internal mass calibration ensuring a precision of *m/z* lower than 2 ppm on the mass range. Extracts were randomly injected to integrate any memory effect on the column and time dependent MS drift. Pooled samples used as quality control (QC) of MS acquisitions were injected every 6 samples from the beginning to the end of the series, and were used for further ion filtering.

5. Data processing on MZmine 3.4.0

Following their calibration, the acquired MS data were converted to the open format *.mzXML using MSConvert (Proteowizard) (Chambers et al., 2012) and further processed on MZmine 3.4.0 (Schmid et al., 2023) for feature (FT) detection, as follows: (1) mass detection (centroid, MS1, noise level 8E3, and MS2 noise level 0), (2) ADAP chromatogram builder (Myers et al., 2017) (3 scans, group intensity threshold 8E3, minimum highest intensity 1E4, m/z tolerance 10 ppm), (3) chromatogram resolving (local minimum FT resolver: minimum relative FT height 25%, minimum required signals 1, MS1 to MS2 precursor tolerance 0-10, retention time filter 0.030, chromatographic threshold 95%, minimum search range (RT) 0.035, minimum absolute height 1E4, min ratio peak top/edge 1.2, peak duration range 0-1min, number of data point 3), (4) isotopic grouper (13C isotope filter: m/z tolerance 10 ppm, RT tolerance 0.1 min, representative isotope most intense), (5) join aligner (m/z tolerance 10 ppm, weight for m/z 75%, weight for RT 25%, RT tolerance 0.1 min), (6) FT list rows filter (RT 0.70-22 min). (7) Gap filling (Intensity tolerance 0.1, m/z tolerance 5 ppm, RT tolerance 0.1 minutes, minimum scan 1). MetaCorrelate (RT tolerance 0.03 min, minimum height 0, intensity correlation threshold 1E4, correlation grouping: measure PEARSON, minimum FT shape correlation

85%). FT detected in MeOH, in the SPE blank and CTRL from EXP1 were removed from the matrix.

The FT list generated from EXP1 contained 2626 chemical signals, whereas MS data processing from EXP2 led to the production of a matrix with 2421 FT.

6. Multivariate data analysis

The generated FT list from EXP1 was imported on MetaboAnalyst 5.0 (Pang et al., 2022) for multivariate data analyses. The data matrix was further processed as follows: FT presenting an intensity variation above 20% of the QC samples were removed from the analysis. All FT intensities were then log-transformed and Pareto-scaled (mean-centred and divided by the square root of the standard deviation of each variable) leading to a final matrix of 1304 normalized FT.

- *Determining the main condition influencing data distribution*

Principal Component Analysis (PCA) were conducted to preview the disparity of the chemical composition of samples for each seawater condition (cave, SD or D community, sampled stations). Associated to the PCAs, Permanova tests (999 permutations) followed by post hoc pairwise tests, were performed to assess which condition was primarily responsible for the chemical discrimination between samples.

- *Chemical fingerprint of the seawater from SD and D communities*

A volcano plot was built to highlight the FT that were significantly more represented in the seawater of each community (SD *vs*. D) using the following criteria: a fold change threshold of 2 and Mann-Whitney test with a p-value ≤ 0.05 (Goedhart & Luijsterburg, 2020).

- *Contribution of the cave in the SD and D chemical fingerprints*

A heatmap (distance measure: Euclidean, clustering method: Ward) was created to hierarchize, based on their average intensity, the FT contributing to the discrimination of underwater caves.

7. FT based molecular network and spectral annotation

FT quantification table (cvs file) of EXP 1 and 2 and their corresponding MS^2 spectra (mgf file), exported from MZmine (Schmid et al., 2023), were implemented on the GNPS platform (https://gnps.ucsd.edu) (Nothias et al., 2020) leading to two independent FT Based Molecular Networks (FBMN). The precursor ion mass tolerance was set to 0.02 Da and the MS/MS fragment ion tolerance to 0.02 Da. The resulting network was visualized and interpreted using Cytoscape 3.8.2. (Shannon et al., 2003). Data were further interrogated using Cytoscape filtering options, leading to selection of FT for each seawater sampling condition along with the identification of FT reproducibly detected in all seawater sampling conditions (*i.e.* SD and D communities and 4 caves, as well as FT recorded in all 4 seasons), thus considered as putative cave markers.

Within the FBMN, identification of chemical signals was performed through MS^2 spectra spectral library matches (Wang et al., 2016) within GNPS. It was complemented by *in silico* spectral annotations with tools embedded in SIRIUS 5.8 (Dührkop et al., 2019) which include molecular formula predictions using HR-MS1 data and analysis of MS^2 fragmentation patterns with CSI:FingerID (Dührkop et al., 2015). To guide structural proposition through *in silico* MS annotations, an in-house molecular database was constructed using the simplified molecular-input line-entry system [SMILES] outputs from molecules referenced in the literature as being produced by identified species in each SD or D community. For that purpose, data mining outputs from open access databases such as Sci-Finder, LOTUS (Rutz et al., 2022) and WIKIDATA (Bielefeldt et al., 2018) were combined. MS^2 spectra of statistically significant FT within each SD or D seawater were manually checked. If needed, the proposed molecular formula and MS^2 fragmentation data were subjected to MetFrag software (Ruttkies et al., 2016) for complementary spectral annotations. Confidence Level (CL) was attributed to each proposed MS-based identification according to Schymanski et al. (2014): when a putative structure could be proposed through spectral library matches and after manual inspection, FT

received a CL 2b, or 3 when several structural candidates were envisioned. When only one chemical formula could be provided, a CL 4 was given. The SMILES of each proposed structure, for which careful manual MS spectrum annotation were performed, were submitted to the NP classifier web interface (Kim et al., 2021) to register their attributed chemical class, based on natural product pathway probabilities. The molecular data were also complemented using Classyfire to add a classification layer pertaining to structural functionalities and elemental composition (Djoumbou et al., 2016). FT weakly detected with noisy MS spectra precluding accurate annotations, along with FT corresponding to phthalate pollutants, deriving from inherent experimental technical contaminations, were removed from the matrix.

A Venn diagram was generated using the MS FT list from EXP2 to identify sponge exometabolites contributing to the chemical composition of averaged seawater extracts from EXP1. The objective was to highlight those shared FT detected in both the sponges and the *in situ* seawater extracts. Those FT correspond to metabolites produced by sponge and released in seawater. Further MS^2 spectral annotations were performed to putatively identify the molecules, corresponding to those FT, following the same process as described above.

8. Chemodiversity - Biodiversity correlations

8.1 Molecular composition and nutritional quality of the seawater vs. biodiversity

Determining the total carbon and the nitrogen content (C/N ratio) of a seawater sample inform of the nutrient quality of a given environment, which may contribute to shaping biodiversity assemblages. Molecular formula of compounds discriminating the seawater of SD and D communities (n = 209) are used to estimate the C/N ratio for each station. To assess the reliability of the method, these values were then compared to those acquired by the standardized dosage method (Raimbault et al., 1999) (See Supplementary S7 for the comparison).

For each station (n = 8), C/N values were then correlated to mean Species Richness (S) (from Derrien et al., 2024b) performing a Spearman's correlation.

8.2 Comparison of diversity indices

In order to highlight the part of the SD and D chemical fingerprints influenced by the benthic biodiversity, putatively identified molecules that were reproducibly detected in all samples (*e.g.* cave markers, see the section 7), were removed from the data matrix. The final matrix thus contained 87 compounds (60 in SD and 27 in D). Spearman correlation was calculated between the different structural classes as proposed by Classyfire from the putatively identified compounds, and the values of mean Species Richness (S) of each sampling station (n = 8) (from Derrien et al., 2024b).

Results

1. Contrasted chemical seascape compositions close to SD and D communities

2.1 Comparative chemical diversity

Multivariate data analyses were performed on the data matrix from EXP 1 containing 1304 FT to evaluate the distribution of chemical FT as function of the degree of confinement and underwater cave localization (Figure 4).

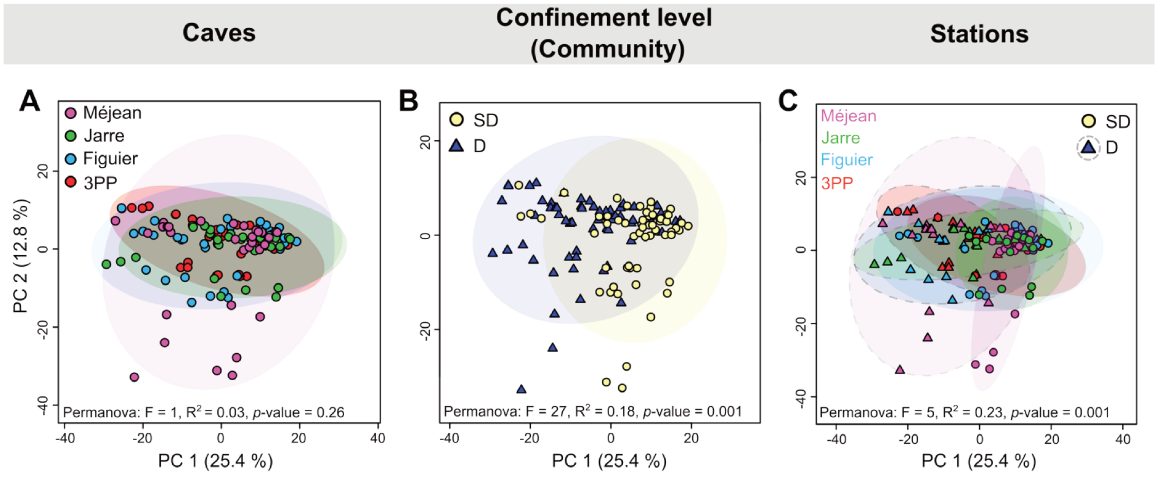


Figure 4 : Score plots of PCA comparing chemical fingerprints of seawater samples analyzed by UHPLC-HRMS/MS: **(A)** between caves, **(B)** according to the confinement level (SD vs D community) and **(C)** between sampled stations. A permanova test (999 permutations) was performed to evaluate the differentiation between chemical fingerprints of each condition: F is the ratio between inter group variance and intra group variance, R^2 is the proportion of total variance explained by the independent variable. Data were auto-scaled and log transformed.

Principal Component Analysis (PCA), combined with Permanova analysis demonstrated that the chemical composition of seawater from SD and D communities were significantly different for three of the caves, namely Jarre, Méjean and 3PP (Figure 4B, Supplementary S1). No significant discrimination between the SD and D seawater compositions could be measured for Figuier (Supplementary S1).

The total number of detected FT varied between caves as follows: Figuier (1026) > Méjean (1009) > Jarre (950) and 3PP (886) but also according to the confinement level with 1253 FT in the SD seawater and 1119 in the D one. A total of 468 FT (36% of all FT) was reproducibly detected in all seawater samples (SD and D communities, 4 caves and 4 seasons). We further wanted to know which of these FT contributed to the discrimination of seawater samples as per the SD or D communities are concerned. Therefore, a volcano plot was constructed to evaluate the distribution of the FT according to their relative intensity between SD and D seawater extracts (Figure 5).

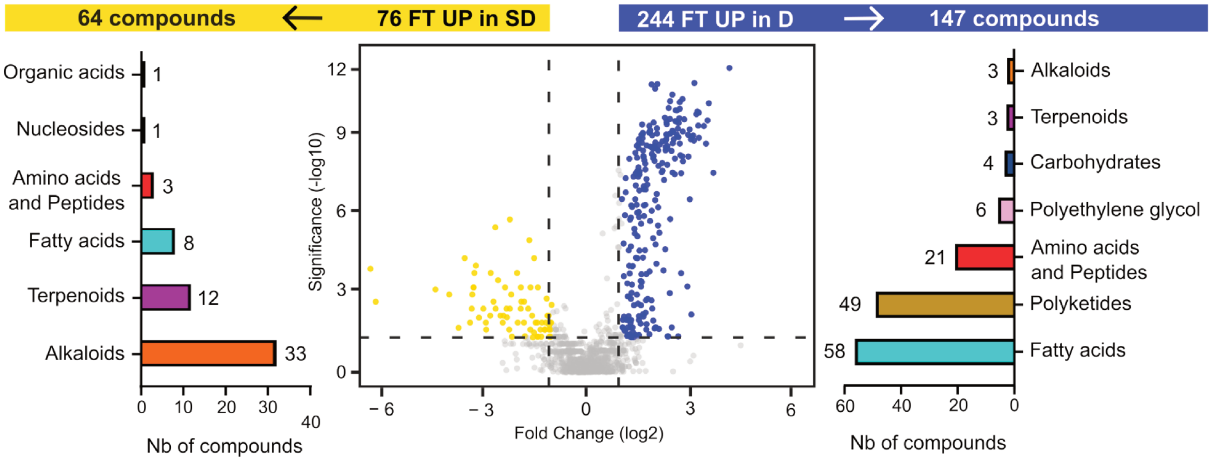


Figure 5: Comparative chemical diversity of semi dark (SD, yellow, left side) and dark (D, blue, right side) cave seawaters. The volcano plot represents the distribution of features that were significantly more abundant in either SD or D communities (Fold change = 2, Mann-Whitney test with a *p*-value = 0.05). Spectral annotations of these features enabled the putative identification of compounds, for which natural product chemical classes were attributed with NP Classifier (Kim et al., 2021). FT: features, SD: Semi-Dark cave seawater, D: Dark cave seawater, Nb: number, "UP" means "significantly more represented".

A total of 76 FT with significantly higher intensities in the SD samples are represented on the left side of the plot in yellow, whereas 244 FT more intensely detected in the seawater around the D communities are illustrated in blue. Among these 317 FT, 3 were reproducibly detected in seawater around the SD community as opposed to 216 (68%) for the D community, suggesting that the seawater of the D community encompasses more molecules of possibly rather stable structures. The MS^2 spectra of the 76 selected FT were further annotated after regrouping ion adducts and in source fragments corresponding to the same molecule. Such data processing led to a total of 64 molecules, among which molecular formulas and putative structures could be proposed for 58 of them. These compounds were distributed in 6 types of natural product chemical classes. The majority of them were found to belong to alkaloids (33/58) and terpenoids (12/58). Following the same analytical process, in the D seawaters, the 244 FT (blue dots, Figure 5) corresponded to a total of 147 compounds, among which 144 were putatively identified. They were distributed in 7 types of natural product chemical classes, with a predominance of molecules putatively identified as fatty acids (55/144), polyketides (49/144) amino acids and low molecular weight peptides (21/144). As opposed to the composition of SD samples, alkaloids and terpenoids were poorly represented in the D cave seawaters.

- ***Fingerprint of the cave habitat in the SD and D chemical seascapes***

A heatmap was built with the significant FT selected from the volcano plot to further evaluate the difference in the chemical composition across the caves as per their SD or D communities are concerned (Figure 6). The distribution and hierarchization of the selected significant FT confirmed that each cave can be differentiated according to their seawater chemical fingerprint characterizing either the SD (73 FT) or the D community (144 FT). Only 10 FT detected in the seawater around the SD community were found to be shared between the four caves (Figure 6A), as opposed to 221 FT (90% of detected FT) in the seawater around the D community (Figure 6B). This observation hereby revealed that, qualitatively, the underwater cave chemical seascapes pertaining to the D community are more similar to each other. The seawater

composition around Figuier SD community was found to be qualitatively more diverse than for the three other caves, with 20 unique FT detected. In contrast, only the seawater around the D community of Jarre discriminated itself from the three other samples.

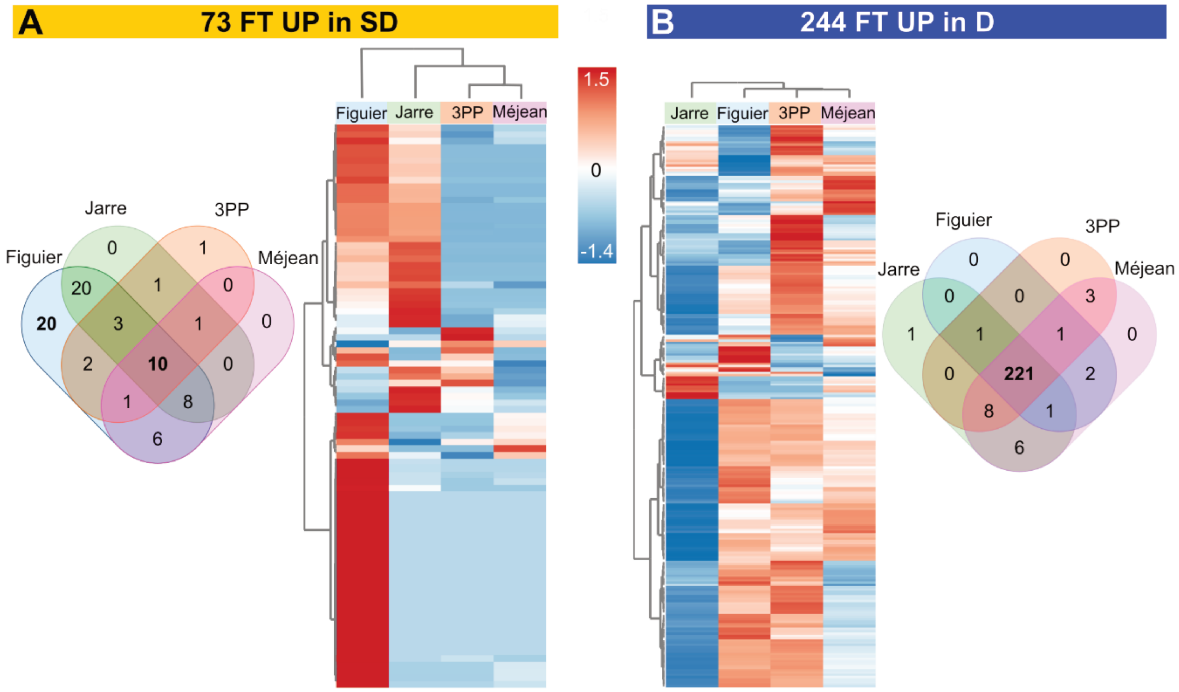


Figure 6 : Comparative chemical fingerprint of feature distribution between caves for each **(A)** SD and **(B)** D communities. The heatmap presents the comparative average intensity of each significant feature, depicted in horizontal lines, across the four cave seawater extracts. The color indicates the normalized level of detection intensity for each feature, on a scale from -1.4 to +1.5, from blue to red. The associated Venn Diagrams present the number of features shared or specific to the seawater of each cave. FT: features, SD: Semi-Dark cave seawater, D: Dark cave seawater, "UP" means "significantly more represented".

2.2 Nutritional quality (C/N) of the seawater and correlation with the benthic biodiversity

The molecular formulae measured for each compound were then used to calculate the mean C/N values indicating the nutritional quality of the seawater around each community (Figure 7). C/N ratios were found to be significantly lower in the waters of the SD community than in the D community (Mann Whitney test, p-value = 0.03) (Figure 7A).

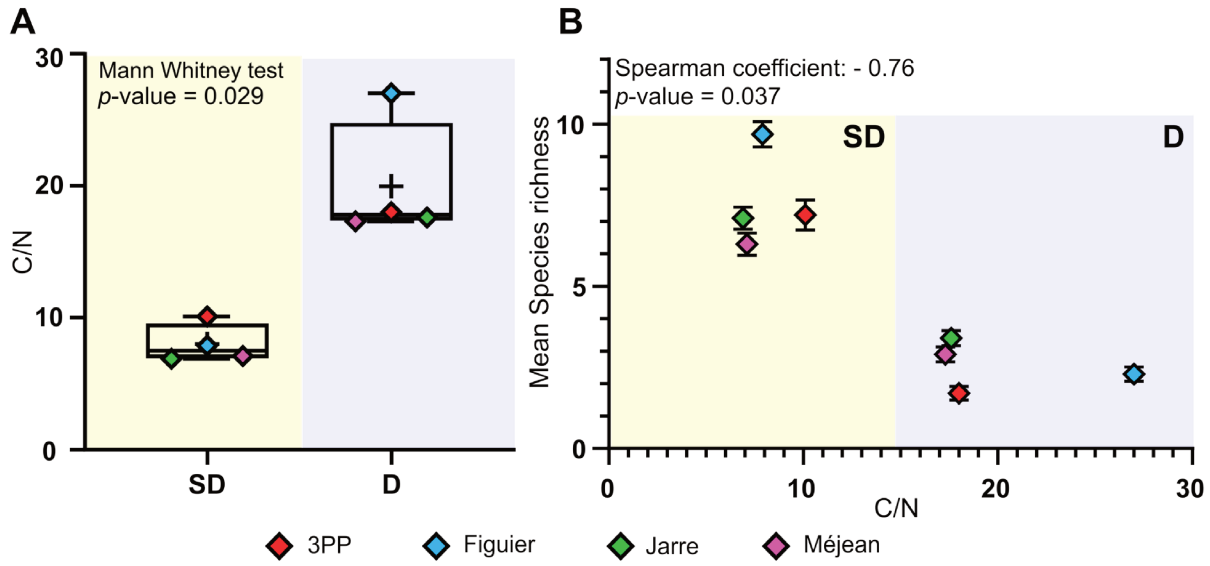


Figure 7: **(A)** C/N ratio characterizing the nutritional value of seawater from each sampled marine cave station, grouped per community (SD or D). C/N values were calculated from the molecular formula of the 63 discriminant compounds in SD and 147 discriminant ones in D cave seawaters, as observed on the volcano plot. Boxes and whiskers represent first to last quartiles, and maximum and minimum values, respectively. Crosses indicate the mean value of C/N for each community chemical seascape. **(B)** Spearman's correlation between the mean species richness of the community, previously calculated (from Derrien et al., 2024b), and C/N values, herein determined.

The lowest C/N value was recorded in the seawater of Jarre SD community (6.9), while in this type of community, the highest value was found in 3PP cave (10.1). With regards to the D communities, the highest C/N ratio was found for Figuier (27), while this value was rather similar in all other seawaters (around 18). These C/N values were thus found to be significantly negatively correlated to the mean species richness (Figure 7B). For each station, the C/N increased when the mean species richness decreased.

3. Chemodiversity - Biodiversity Correlation

We then further explored the link between the recorded benthic species richness and the structural diversity defining the chemical composition of the surrounding seawater in each sampling station. To represent the seawater chemical diversity of each sampling site, we calculated the total number of structural classes grouping the putatively identified molecules (Figure 8). Molecules that were reproducibly present in all collected seawater samples, whether from the SD or the D community, were thus not considered. For each cave, the increase in mean species richness (from D to SD) tended to correspond to a greater number of chemical structural classes.

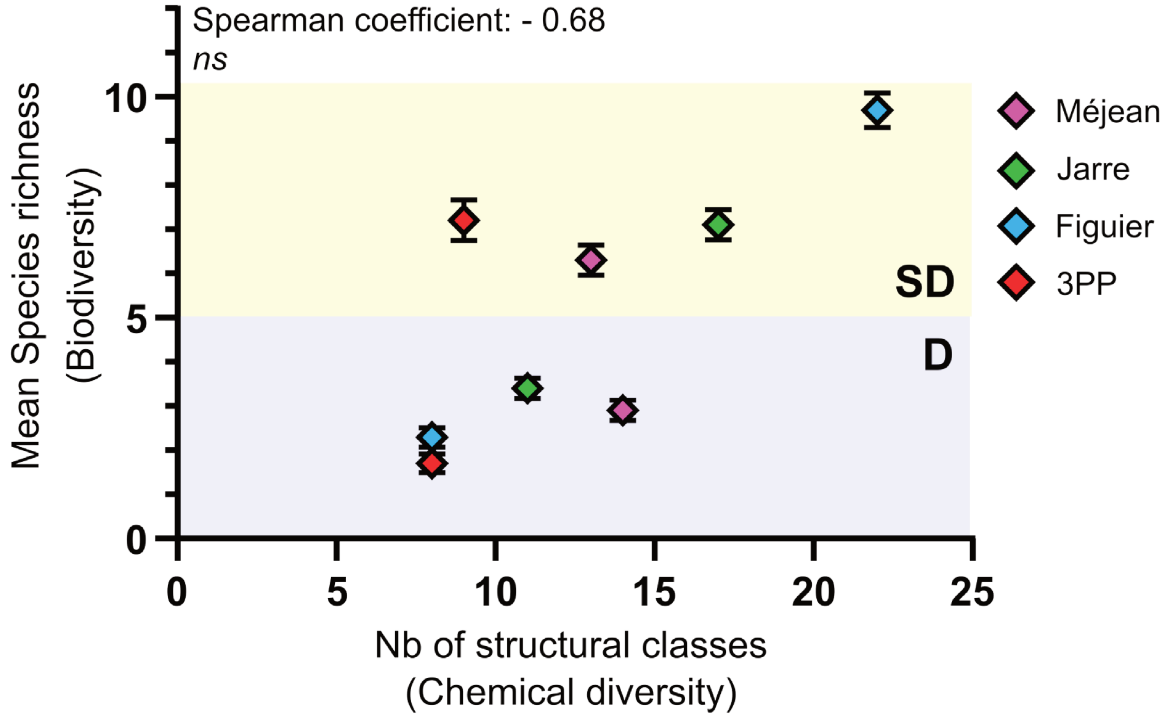


Figure 8: Biodiversity *vs.* Chemical diversity. Spearman's correlation between the Mean S (Species richness), as previously calculated (Derrien et al., 2024b), and the chemical diversity of molecules in seawater considering the number of structural classes per cave in each community. Structural classes of the discriminant compounds explaining the differences between SD and D chemical seascapes (n = 88) were determined using Classyfire (Djoumbou et al., 2016). Nb: number

No significant correlation was obtained between the recorded number of species and the corresponding seawater chemical diversity for Méjean and 3PP caves. In the case of Méjean, the chemical diversity measured in seawater around the D community was found to be slightly

greater than its corresponding value in the SD community, although the latter displays a higher species richness. For 3PP, the number of structural classes found in the seawaters from SD and D communities is rather similar, although these communities present rather different species richness values.

4. Contribution of the benthic biodiversity to the SD chemical seascape

The collected results as presented above illustrated that the composition of seawater around the SD communities is the most variable across the four studied underwater caves. Derrien et al. (2024b) demonstrated that each cave's SD community can be differentiated by its species assemblages, dominated by sponges. Therefore, we further looked for the specific metabolic contribution of these identified sponge species in the chemical fingerprint of SD seawater.

4.1 Chemical contribution of dominant sponge species

The Venn diagram generated using the MS feature list from EXP2 compared to EXP1 revealed 56 shared FT, corresponding to sponge exometabolites also detected in the sampled chemical seascapes. Sponges could be classified according to the number of detected shared FT as follows: *O. tuberculata* (16 FT) > *I. variabilis* (14) > for *H. mucosa* (12) > 7 *H. fulva* (7) = *P. ficiformis* (7) (Supplementary S2). Among them, a total of 6 FT, corresponding to 6 molecules, were significantly more abundant in the seawater of the SD communities. The other 55 features were not discriminative of the SD or D seawaters (grey dots on the volcano plots, Figure 5).

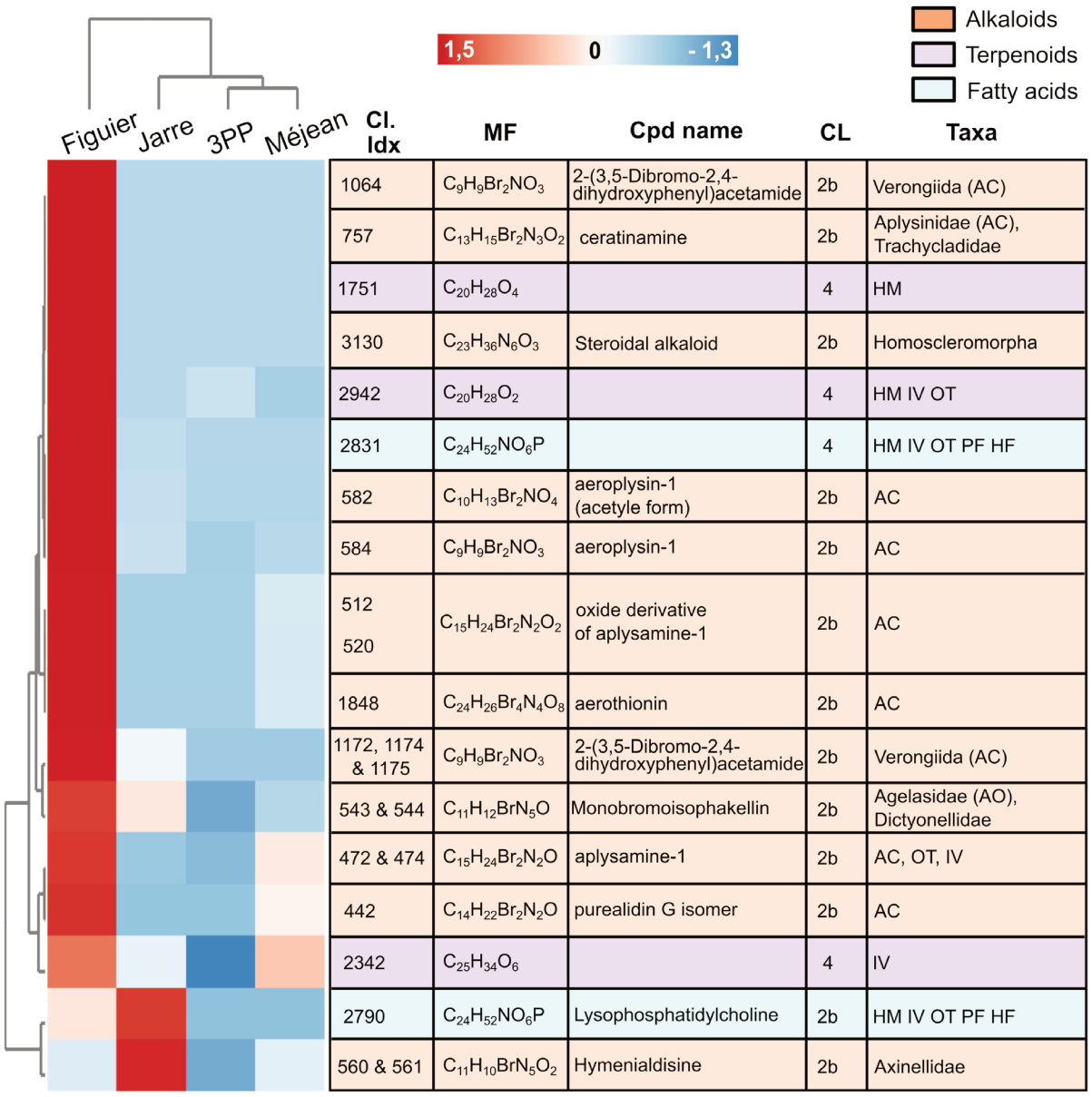
4.2 Identification of sponge exometabolites in the different SD cave seawaters.

We then further evaluated the MS^2 spectra to putatively identify significant FT, including the 6 selected above, that could be linked to either an identified species or a taxonomic entity of the SD community. A total of 23 FT corresponding to 17 molecules were putatively identified (Figure 9). Using FBMN, a first level of identification was reached for only 3 FT through spectral matches in the GNPS environment (Supplementary S3). These molecules identified with a confidence level of 2 were: aerothionin, aeroplysinin-1 and a glycerol-phosphocholine fatty acid. The latter is not considered as a specialized exometabolite. For the 14 remaining

compounds, the putative structural identification proposed by the SIRIUS tools were manually checked one by one (Supplementary S4-S5). Among them, 4 molecules from EXP2, were identified with a level 4 confidence, and only their putative molecular formula were proposed. These molecules were identified as terpenoids and fatty acids produced by one or more of the tested sponge species (HM, IV, OT, HF, PF).

A total of 12 molecules were identified as brominated alkaloids mostly with either a bromopyrrole or a bromotyrosine moiety. Hence, the majority of the reported alkaloids, such as aeroplysinin-1, the aplysamine-1, purealidin G and aerothionin, were previously identified as being characteristic exometabolites from *Aplysina cavernicola* (Mauduit et al., 2022, 2023). The putatively identified Hymenidine, and Monobromoisophakellin could derive from the metabolic activities of *Agelas* species (Freire et al., 2022), but also from sponges belonging to the Dictyonellidae (de Souza et al., 2018) and Axinellidae family. Lastly, the putative ceratinamine was reported as being produced by sponges from different families, namely Aplysinidae and Trachycladidae. Only one alkaloid was not brominated and attributed to a steroidal alkaloid derivative, possibly an androstanol and could be exuded from sponges belonging to the Homoscleromorpha class. These sponges' taxa have been reported in the SD communities of the studied caves.

Approximately 88% of the identified molecules were most abundant in the seawater collected at Figuier, which was previously described as having the highest species richness (see Figure 7) including high proportions of the following sponge species: *A. cavernicola*, *Agelas oroides* and *Haliclona* spp. in its SD community (Derrien et al., 2024b). According to the putative identification and proposed molecular formula, the majority of molecules were brominated alkaloids (12 in total). Both terpenoids and fatty acids were poorly represented. Such composition agreed with the global molecular diversity proposed above (see Figure 5) for the SD community.



Cl. Idx	MF	Cpd name	CL	Taxa
1064	$C_9H_9Br_2NO_3$	2-(3,5-Dibromo-2,4-dihydroxyphenyl)acetamide	2b	Verongiida (AC)
757	$C_{13}H_{15}Br_2N_3O_2$	ceratinamine	2b	Aplysinidae (AC), Trachycladidae
1751	$C_{20}H_{28}O_4$		4	HM
3130	$C_{23}H_{36}N_6O_3$	Steroidal alkaloid	2b	Homoscleromorpha
2942	$C_{20}H_{28}O_2$		4	HM IV OT
2831	$C_{24}H_{52}NO_6P$		4	HM IV OT PF HF
582	$C_{10}H_{13}Br_2NO_4$	aeroplysin-1 (acetyle form)	2b	AC
584	$C_9H_9Br_2NO_3$	aeroplysin-1	2b	AC
512 520	$C_{15}H_{24}Br_2N_2O_2$	oxide derivative of aplysamine-1	2b	AC
1848	$C_{24}H_{26}Br_4N_4O_8$	aerothionin	2b	AC
1172, 1174 & 1175	$C_9H_9Br_2NO_3$	2-(3,5-Dibromo-2,4-dihydroxyphenyl)acetamide	2b	Verongiida (AC)
543 & 544	$C_{11}H_{12}BrN_5O$	Monobromoisophakellin	2b	Agelasidae (AO), Dictyonellidae
472 & 474	$C_{15}H_{24}Br_2N_2O$	aplysamine-1	2b	AC, OT, IV
442	$C_{14}H_{22}Br_2N_2O$	purealidin G isomer	2b	AC
2342	$C_{25}H_{34}O_6$		4	IV
2790	$C_{24}H_{52}NO_6P$	Lysophosphatidylcholine	2b	HM IV OT PF HF
560 & 561	$C_{11}H_{10}BrN_5O_2$	Hymenialdisine	2b	Axinellidae

Figure 9: Heatmap represents the hierarchical distribution of putatively identified compounds in the different SD cave seawaters. Feature intensities corresponding to the same compound were summed. Normalized level of detection intensity for each compound is depicted on a scale from -1.4 to +1.5, from blue to red. The table references the features *i.e.* cluster indexes (Cl. Idx) pertaining to each identified compound (Cpd), for which natural product chemical classes attributed with NP Classifier (Kim et al., 2021) (in pastel color), molecular formulas (MF), confidence level of the annotations (CL) according to Schymanski et al., (2014), common names and taxonomic origins are informed. AC: *Aplysina cavernicola*, HF: *Haliclona fulva*, HM: *Haliclona mucosa*, IV: *Ircinia variabilis* OT: *Oscarella tuberculata*, PF: *Petrosia ficiformis.* Corresponding annotated MS^2 spectra are available in supporting information (S4 and S5).

Discussion

Sponges are keystone components of benthic ecosystems and have been described to release a great variety of structurally diverse molecules in seawater. As of today, few studies have sought to assess the contribution of benthic species to the composition of the surrounding chemical seascape (Weber et al. 2020, 2022, Wegley-Kelly et al., 2022; Becker et al. 2023; Garcia et al. 2024). In this study, we used the stable environmental conditions of underwater caves to explore the relationship between the structural diversity of dissolved molecules and the species richness of the benthic communities. Our findings demonstrate a clear chemical diversity pattern between SD and D cave chemical seascapes in accordance with the species richness of each cave community.

1. Contrasted SD and D cave chemical seascape compositions

The composition of the chemical seascape surrounding semi-dark (SD) or dark (D) cave communities was marked by the predominance of distinct chemical classes. Alkaloids and terpenoids represented the dominant classes of the SD chemical seascape, whereas they were scarcely represented in the D one. Such structural classes can originate from the secondary metabolism of sessile organisms, in particular sponges that are known to release part of their metabolites (Walker et al., 1985; Sjögren et al., 2011; Ternon et al., 2016; Mauduit et al., 2022, 2023) into their surroundings, possibly as a defense strategy (Garson, 2002; Bian et al., 2020; Carroll et al., 2024). In the SD cave chemical seascape, we recorded metabolites previously reported from sponge taxa such as *A. cavernicola* and *Agelas* sp. typically found in SD cave community. We also retrieved terpenes exuded by *I. variabilis*, *O. tuberculata* and *H. mucosa*. All six taxa were particularly abundant in the SD community of these 4 caves, compared to the D community (Grenier et al., 2018, Derrien et al., 2024b). We thus believe that the high level of biodiversity and the great abundance of sponges in the SD compared to the D community, may explain the higher proportion of alkaloids and terpenoids measured in the SD chemical seascape.

The chemical seascape of the D community was characterized by high proportions of fatty acids, polyketides and amino acids. Among these compounds, we did not retrieve the chemical signature of a potential benthic species. Fatty acids, amino acids and peptides are ubiquitous in living organisms and are rather characteristic of primary/basal metabolisms, and thus cannot be associated to a specific organism. These compound classes were found to be among the main contributors to the marine DOM pool (Wetzel & Likens, 2000; Hansell & Carlson, 2014). However, the origin of the high proportion of polyketides remains uncertain. They may originate from the secondary metabolism of marine bacteria (Carroll et al., 2024). For instance, Actinobacteria, which were found dominant in the seawater from the back of a Mediterranean cave (Busquets et al., 2014), are prolific sources of polyketides (Carroll et al., 2024). On the other hand, because of their high level of oxidation, these compounds could represent refractory matter resistant to bacterial degradation, accumulating along the confinement gradient (Hansell, 2013; Lambidis et al., 2023). Moreover, the increase in nitrite, nitrate and phosphate contents from the SD to the D community (Table 1) testifies of a greater mineralization of organic matter by the microbial loop in the back-end of the caves (Fichez, 1989). Higher mineralization rate in the dark part of caves is favored by lower seawater renewal time estimated between 8 to 10 days, compared to 24 hours in the SD parts (Fichez, 1991). Therefore, for the D cave chemical seascape, the measured chemical diversity likely reflects the contribution of seawater bacterial communities or the effect of the confinement level rather than the metabolic contribution of much smaller species dwelling in the darkest parts of a cave.

The difference in dominant chemical classes between the SD and D cave seawater provides insight into the nutritional quality of the seawater. Fatty acid and polyketide macrolactones have simple molecular formulas (C/H/O), while alkaloids are richer in nitrogen by definition. Based on these molecular formulas, we therefore observed a significantly higher C/N ratio in the D zones than in the SD zones. The increase in C/N ratio, from the entrance to the back of the cave, is consistent with previous reports (Fichez, 1989; Morri et al., 1994; Rastorgueff et

al., 2011). The decrease in seawater nutritional quality from SD to D zones, along with the reduction in Chlorophyll a content (Table 1), follows the oligotrophy gradient prevalent in underwater caves (Fichez, 1990). This gradient explains the observed correlation between seawater nutritional values and the number of species (Laborel & Vacelet, 1958, Riedl, 1966; Bianchi et al., 1996, Martí et al., 2004; Bussotti et al., 2006; Derrien et al., 2024b). In turn, the number of species in the communities seems positively correlated with the number of structural classes in the surrounding chemical seascape. This finding highlights the influence of the benthic species assemblage on the complexification of the surrounding chemical seascape, collectively contributing to distinguish one cave from another.

2. Variation of the SD and D chemical seascapes from cave to cave

Across all caves, the chemical composition was more variable between different SD seawaters than between different D ones. For instance, the SD chemical seascape of Figuier was characterized by a high abundance of *A. cavernicola's* exometabolites, which seems closely linked to the dominance of this species in the benthic SD community of this cave (Grenier et al., 2018). The exometabolites of the five species tested in aquarium (*H. fulva*, *H. muscosa*, *I. variabilis*, *O. tuberculata* and *P. ficiformis*) were more abundant in the SD chemical seascapes of Figuier and Jarre, which is consistent with the great occurrence of these species in the SD community of these two caves, compared to Méjean and 3PP (Grenier et al., 2018, Derrien et al., 2024b). However, it was also observed that not all sponge species equally contributed to the SD cave chemical seascape; the signature of *A. cavernicola* was very pronounced, while those of the five other species seemed more subtle. Two explanations are possible for this: (i) this marked signature results from the fact that *A. cavernicola* is a massive species, representing a significant biomass when present in the community, and that could influence its metabolic activity; (ii) the abundance and the diversity of released and detected exometabolites (specialized metabolites) are species-dependent parameters. Moreover, each species may contribute differently to the measured chemical seascapes and some species may release fewer

exometabolites than others at the time of their capture, whether *in situ* or in aquaria (Mauduit et al., 2022, 2023). Finally, the chemical seascape of each SD cave community reflects the singularity of each cave. Inversely, the D community chemical seascape harbors a more stable and similar composition across the different caves.

3. Chemical signature of the cave habitat

In the D cave chemical seascape, 88% of the most abundant compounds were reproducibly detected in the four caves, consistently over four seasons, and also detected at lower intensities in the SD seawater. This finding could highlight a general cave seawater signature that is predominantly found at the back-end of the habitat. Among these compounds, four have a molecular formula identical to those already determined in our previous studies on cave seawater composition (Santonja et al., 2018; Derrien et al., 2024a) (Supplementary S6). Three of these molecules are putative oxylipins ($C_{18}H_{30}O_3$, $C_{18}H_{34}O_5$, $C_{14}H_{26}O_3$) and the last one could be a tetrapeptide ($C_{24}H_{44}N_4O_4$). The recurrence of these compounds across different caves and over time suggests that they could be considered chemical markers of the cave environment, in addition to potentially playing a role as chemical cues in the homing behavior of cave mysids (Santonja et al., 2018, Derrien et al., 2024a).

Conclusion

This study provides deeper insights into the contribution of benthic communities to the formation of their surrounding chemical seascape. In underwater caves, we demonstrated that chemodiversity patterns are influenced by both the gradient of benthic biodiversity and the degree of water confinement. The contrasting biodiversity levels between the SD and D cave communities are reflected in the presence of dominant structural classes, enabling us to distinguish the seawater of each community. More broadly, the chemical uniqueness of each cave is mainly determined by the seawater composition in the SD community. On the other hand, the D cave zones were almost identical across all caves, thereby suggesting a unique chemical signature of Mediterranean caves' habitats. This study also emphasizes the significant

chemical contributions of certain sponge species (Ternon et al., 2016; Mauduit et al., 2022, 2023). It is likely that we also measured the contributions of other benthic species, whose chemical signatures in seawater are still undocumented. A more precise characterization of the influence of benthic species on the surrounding chemical seascape is needed, but challenging to achieve. Once emitted, labile molecules undergo biotransformation in seawater that makes their identification a complicated affair. Besides, the paucity of freely available spectral databases for the structural dereplication of marine natural products hampers the identification process, making it difficult to trace molecular structures back to their potential producer species.

Deciphering the contribution of sessile biodiversity to chemical seascapes is all the more crucial as global changes are causing rapid shifts in benthic assemblages, including those in underwater caves (Derrien et al., 2024b). In this context, any change in the composition of benthic biodiversity is likely to affect the chemical seascape (Becker et al., 2023; Ochsenkühn et al., 2018; Weber et al., 2022; Wegley Kelly et al., 2022; Derrien et al., 2024a) and thus, the resulting network of biotic interactions.

Author contribution statement

TP, CS and MD designed the research experiments. MD, TP, PC collected the samples. MD and CS analyzed the data. MD, CS, PC and TP wrote the manuscript, all authors revised and approved the final text.

Acknowledgements

The authors are grateful to the ANR (ANR-20-CE43-0003), CNRS Mission for Interdisciplinarity and to the AMIDEX project MARRIO (AMX-22-IN1-46) for funding our research. We thank Dorian Guillemain, the diving service of OSU Institut Pythéas, the captains and crews of R/V Antedon 2 and Astroides and Sacha Molinari for their help in the field. The authors deeply thank Stéphane Greff, in charge of the Metabolomics and Natural Product Chemistry joint resource within the Institute for Mediterranean Biodiversity and Ecology (IMBE, Marseille), for all his help with the qToF instrument and his advice on mass

spectrometry. We acknowledge Nicole Garcia, from the PACEM platform (MIO) for analyzing the nutrient salts and organic matter from seawater samples. We also thank Baptiste Bonneau for its help in the application of correlation tests.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval

Sponges were collected in agreement with French national regulations and the Nagoya Protocol, processing with a French national declaration under receipt Nr. TREL2022990S I 392, and the internationally recognized certificate of compliance (IRCC) number ABSCH-IRCC-FR-253848-1 available to the Access and Benefit-sharing Clearing-House (https://absch.cbd.int/about/).

Data Availability

Supporting Information

The supporting information file contains: the detailed results of the pair-wise permanova (999 permutations) comparing chemical fingerprints between sampled stations, the contribution of the 5 sponge species exometabolites (EXP 2) to the chemical seascapes (EXP1), the annotated MS^2 spectra and corresponding data of putatively identified exometabolites from sessile biodiversity, MS data of the compounds found in seawater from both our previous (Santonja et al., 2018; Derrien et al., 2024a) and current studies and the comparison of C/N values from the molecular formula *vs.* traditional method of dosage.

The molecular networking jobs can be publicly accessed for:

- EXP 1 (In situ capture of waterborne molecules) at:

https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=a83028140d194863b7142377011b8b9e

- EXP2 (Sponge exometabolite captures) at:

https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=6c268cd3e0a444b797427bc98f190690

References

Aminot, A., & Kérouel, R. (2004). *Hydrologie des écosystèmes marins: Paramètres et analyses*. Editions Quae.

Aminot, A., & Kérouel, R. (2007). *Dosage automatique des nutriments dans les eaux marines: Méthodes en flux continu*. Editions Quae.

Becker, C. C., Weber, L., Zgliczynski, B., Sullivan, C., Sandin, S., Muller, E., Clark, A. S., Kido Soule, M. C., Longnecker, K., Kujawinski, E. B., & Apprill, A. (2023). Microorganisms and dissolved metabolites distinguish Florida's Coral Reef habitats. *PNAS Nexus*, *2*(9), pgad287. https://doi.org/10.1093/pnasnexus/pgad287

Bian, C., Wang, J., Zhou, X., Wu, W., & Guo, R. (2020). Recent Advances on Marine Alkaloids from Sponges. *Chemistry & Biodiversity*, *17*(10), e2000186. https://doi.org/10.1002/cbdv.202000186

Bielefeldt, A., Gonsior, J., & Krötzsch, M. (2018). *Practical Linked Data Access via SPARQL: The Case of Wikidata*.

Burks, R. L., & Lodge, D. M. (2002). [No title found]. *Journal of Chemical Ecology*, *28*(10), 1901–1917. https://doi.org/10.1023/A:1020785525081

Busquets, A., Fornós, J., Zafra, F., Lalucat, J., & Merino, A. (2014). Microbial communities in a coastal cave: Cova des Pas de Vallgornera (Mallorca, Western Mediterranean). *International Journal of Speleology*, *43*(2), 205–216. https://doi.org/10.5038/1827-806X.43.2.8

Bussotti, S., Terlizzi, A., Fraschetti, S., Belmonte, G., & Boero, F. (2006). Spatial and temporal variability of sessile benthos in shallow Mediterranean marine caves. *Marine Ecology Progress Series*, *325*, 109–119. https://doi.org/10.3354/meps325109

Cassier, P., Descoins, C., & Bohatier, J. (2000). *Communication chimique et environnement: Les relations animales intraspécifiques et interspécifiques.*

Chambers, M. C., Maclean, B., Burke, R., Amodei, D., Ruderman, D. L., Neumann, S., Gatto, L., Fischer, B., Pratt, B., Egertson, J., Hoff, K., Kessner, D., Tasman, N., Shulman, N., Frewen, B., Baker, T. A., Brusniak, M.-Y., Paulse, C., Creasy, D., … Mallick, P. (2012). A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nature Biotechnology*, *30*(10), 918–920. https://doi.org/10.1038/nbt.2377

De Souza, R. T. M. P., Freire, V. F., Gubiani, J. R., Ferreira, R. O., Trivella, D. B. B., Moraes, F. C., Paradas, W. C., Salgado, L. T., Pereira, R. C., Amado Filho, G. M., Ferreira, A. G., Williams, D. E., Andersen, R. J., Molinski, T. F., & Berlinck, R. G. S. (2018). Bromopyrrole Alkaloid Inhibitors of the Proteasome Isolated from a Dictyonella sp. Marine Sponge Collected at the Amazon River Mouth. *Journal of Natural Products*, *81*(10), 2296–2300. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00533

Derrien, M., Santonja, M., Greff, S., Figueres, S., Simmler, C., Chevaldonné, P., & Pérez, T. (2024a). Circadian migrations of cave-dwelling crustaceans guided by their home chemical seascape. *Frontiers in Marine Science*, *11*. https://doi.org/10.3389/fmars.2024.1448616

Derrien, M., Chevaldonné, P., & Pérez, T. (2024b). Patterns of benthic diversity in marine underwater caves of the Marseille Region (France, North-Western Mediterranean Sea). *Mediterranean Marine Science*, *25*(3), 666–681. https://doi.org/10.12681/mms.38566

Djoumbou Feunang, Y., Eisner, R., Knox, C., Chepelev, L., Hastings, J., Owen, G., Fahy, E., Steinbeck, C., Subramanian, S., Bolton, E., Greiner, R., & Wishart, D. S. (2016). ClassyFire: Automated chemical classification with a comprehensive, computable taxonomy. *Journal of Cheminformatics*, *8*(1), 61. https://doi.org/10.1186/s13321-016-0174-y

Dührkop, K., Shen, H., Meusel, M., Rousu, J., & Böcker, S. (2015). Searching molecular structure databases with tandem mass spectra using CSI:FingerID. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(41), 12580–12585. https://doi.org/10.1073/pnas.1509788112

Dührkop, K., Fleischauer, M., Ludwig, M., Aksenov, A. A., Melnik, A. V., Meusel, M., Dorrestein, P. C., Rousu, J., & Böcker, S. (2019). SIRIUS 4: A rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. *Nature Methods*, *16*(4), 299–302. https://doi.org/10.1038/s41592-019-0344-8

Fichez, R. (1990). Decrease in allochthonous organic inputs in dark submarine caves, connection with lowering in benthic community richness. *Hydrobiologia*, *207*(1), 61–69. https://doi.org/10.1007/BF00041441

Fichez, R. (1991). Suspended particulate organic matter in a Mediterranean submarine cave. *Marine Biology*, *108*(1), 167–174. https://doi.org/10.1007/BF01313485

Fiore, C. L., Freeman, C. J., & Kujawinski, E. B. (2017). Sponge exhalent seawater contains a unique chemical profile of dissolved organic matter. *PeerJ*, *5*, e2870. https://doi.org/10.7717/peerj.2870

Freire, V. F., Gubiani, J. R., Spencer, T. M., Hajdu, E., Ferreira, A. G., Ferreira, D. A. S., de Castro Levatti, E. V., Burdette, J. E., Camargo, C. H., Tempone, A. G., & Berlinck, R. G. S. (2022). Feature-Based Molecular Networking Discovery of Bromopyrrole Alkaloids from the Marine Sponge Agelas dispar. *Journal of Natural Products*, *85*(5), 1340–1350. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.2c00094

Garcia, B. M., Becker, C. C., Weber, L., Swarr, G. J., Kido Soule, M. C., Apprill, A., & Kujawinski, E. B. (2024). Benzoyl Chloride Derivatization Advances the Quantification of Dissolved Polar Metabolites on Coral Reefs. *Journal of Proteome Research*, *23*(6), 2041–2053. https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.4c00049

Garson, M. J. (2002). Chemical Signals from Sponges and their Allelopathic Effects on Other Marine Animals. In B. Şener (Ed.), *Biodiversity: Biomolecular Aspects of Biodiversity and Innovative Utilization* (pp. 179–185). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9242-0_19

Goedhart, J., & Luijsterburg, M. S. (2020). VolcaNoseR is a web app for creating, exploring, labeling and sharing volcano plots. *Scientific Reports*, *10*(1), 20560. https://doi.org/10.1038/s41598-020-76603-3

Grenier, M., Ruiz, C., Fourt, M., Santonja, M., Dubois, M., Klautau, M., Vacelet, J., Boury-Esnault, N., & Pérez, T. (2018). Sponge inventory of the French Mediterranean waters, with an emphasis on cave-dwelling species. *Zootaxa*, *4466*(1), 205–228. https://doi.org/10.11646/zootaxa.4466.1.16

Hansell, D. A. (2013). Recalcitrant Dissolved Organic Carbon Fractions. *Annual Review of Marine Science*, *5*(Volume 5, 2013), 421–445. https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120710-100757

Hansell, D. A., & Carlson, C. A. (2014). *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter*. Academic Press.

Harmelin, J. G., J. Vacelet, P. Vasseur. (1985). *Les grottes sous-marines obscures: Un milieu extrême et un remarquable biotope refuge*. 214–229.

Hay, M. E. (2009). Marine Chemical Ecology: Chemical Signals and Cues Structure Marine Populations, Communities, and Ecosystems. *Annual Review of Marine Science*, *1*(1), 193–212. https://doi.org/10.1146/annurev.marine.010908.163708

Hildebrand, T., Osterholz, H., Bunse, C., Grotheer, H., Dittmar, T., & Schupp, P. J. (2022). Transformation of dissolved organic matter by two INDO-PACIFIC sponges. *Limnology and Oceanography*, *67*(11), 2483–2496. https://doi.org/10.1002/lno.12214

Kamio, M., & Derby, C. D. (2017). Finding food: How marine invertebrates use chemical cues to track and select food. *Natural Product Reports*, *34*(5), 514–528. https://doi.org/10.1039/C6NP00121A

Kim, H. W., Wang, M., Leber, C. A., Nothias, L.-F., Reher, R., Kang, K. B., Van Der Hooft, J. J. J., Dorrestein, P. C., Gerwick, W. H., & Cottrell, G. W. (2021). NPClassifier: A Deep Neural Network-Based Structural Classification Tool for Natural Products. *Journal of Natural Products*, *84*(11), 2795–2807. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c00399

Lambidis, S. P., Schramm, T., Steuer-Lodd, K., Farrell, S., Stincone, P., Schmid, R., Koester, I., Torres, R., Aluwihare, L., Simon, C., & Petras, D. (2023). *Two-Dimensional Liquid Chromatography Tandem-Mass Spectrometry Untangles the Deep Metabolome of Marine Dissolved Organic Matter*. ChemRxiv. https://doi.org/10.26434/chemrxiv-2023-j1bxh

Lecchini, D., Shima, J., Banaigs, B., & Galzin, R. (2005). Larval sensory abilities and mechanisms of habitat selection of a coral reef fish during settlement. *Oecologia*, *143*(2), 326–334. https://doi.org/10.1007/s00442-004-1805-y

Lecchini, D., & Nakamura, Y. (2013). Use of chemical cues by coral reef animal larvae for habitat selection. *Aquatic Biology*, *19*(3), 231–238. https://doi.org/10.3354/ab00532

Lecchini, D., Miura, T., Lecellier, G., Banaigs, B., & Nakamura, Y. (2014). Transmission distance of chemical cues from coral habitats: Implications for marine larval settlement in context of reef degradation. *Marine Biology*, *161*(7), 1677–1686. https://doi.org/10.1007/s00227-014-2451-5

Mauduit, M., Greff, S., Herbette, G., Naubron, J.-V., Chentouf, S., Huy Ngo, T., Nam, J.-W., Molinari, S., Mabrouki, F., Garayev, E., Baghdikian, B., Pérez, T., & Simmler, C. (2022). Diving into the Molecular Diversity of *Aplysina cavernicola's* Exometabolites: Contribution of Bromo-Spiroisoxazoline Alkaloids. *ACS Omega*, *7*(47), 43068–43083. https://doi.org/10.1021/acsomega.2c05415

Mauduit, M., Derrien, M., Grenier, M., Greff, S., Molinari, S., Chevaldonné, P., Simmler, C., & Pérez, T. (2023). *In Situ* Capture and Real-Time Enrichment of Marine Chemical Diversity. *ACS Central Science*, *9*(11), 2084–2095. https://doi.org/10.1021/acscentsci.3c00661

Myers, O. D., Sumner, S. J., Li, S., Barnes, S., & Du, X. (2017). One Step Forward for Reducing False Positive and False Negative Compound Identifications from Mass Spectrometry Metabolomics Data: New Algorithms for Constructing Extracted Ion Chromatograms and Detecting Chromatographic Peaks. *Analytical Chemistry*, *89*(17), 8696–8703. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00947

Noguer, A. C., Olsen, S. M., Hvilsted, S., & Kiil, S. (2016). Long-term stability of PEG-based antifouling surfaces in seawater. *JOURNAL OF COATINGS TECHNOLOGY AND RESEARCH*, *13*(4), 567–575. 11th Coatings Science International Conference (COSI). https://doi.org/10.1007/s11998-016-9801-9

Nothias, L.-F., Petras, D., Schmid, R., Dührkop, K., Rainer, J., Sarvepalli, A., Protsyuk, I., Ernst, M., Tsugawa, H., Fleischauer, M., Aicheler, F., Aksenov, A. A., Alka, O., Allard, P.-M., Barsch, A., Cachet, X., Caraballo-Rodriguez, A. M., Da Silva, R. R., Dang, T., … Dorrestein, P. C. (2020). Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. *Nature Methods*, *17*(9), 905–908. https://doi.org/10.1038/s41592-020-0933-6

Ochsenkühn, M. A., Schmitt-Kopplin, P., Harir, M., & Amin, S. A. (2018). Coral metabolite gradients affect microbial community structures and act as a disease cue. *Communications Biology*, *1*(1), 184. https://doi.org/10.1038/s42003-018-0189-1

Pang, Z., Zhou, G., Ewald, J., Chang, L., Hacariz, O., Basu, N., & Xia, J. (2022). Using MetaboAnalyst 5.0 for LC–HRMS spectra processing, multi-omics integration and covariate adjustment of global metabolomics data. *Nature Protocols*, *17*(8), 1735–1761. https://doi.org/10.1038/s41596-022-00710-w

Petras, D., Koester, I., Da Silva, R., Stephens, B. M., Haas, A. F., Nelson, C. E., Kelly, L. W., Aluwihare, L. I., & Dorrestein, P. C. (2017). High-Resolution Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Enables Large Scale Molecular Characterization of Dissolved Organic Matter. *Frontiers in Marine Science*, *4*, 405. https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00405

Pohnert, G. (2004). Chemical Defense Strategies of Marine Organisms. In S. Schulz (Ed.), *The Chemistry of Pheromones and Other Semiochemicals I* (pp. 179–219). Springer. https://doi.org/10.1007/b95453

Powers, L. C., Hertkorn, N., McDonald, N., Schmitt-Kopplin, P., Del Vecchio, R., Blough, N. V., & Gonsior, M. (2019). *Sargassum* sp. Act as a Large Regional Source of Marine Dissolved Organic Carbon and Polyphenols. *Global Biogeochemical Cycles*, *33*(11), 1423–1439. https://doi.org/10.1029/2019GB006225

Pozas-Schacre, C., Bischoff, H., Raviglione, D., Chaib, S., Clerissi, C., Bonnard, I., & Maggy, M. N. (2025). Invasive macroalgae shape chemical and microbial waterscapes on coral reefs. *Communications Biology*, *8*(1), 16. https://doi.org/10.1038/s42003-024-07433-6

Quinlan, Z. A., Koester, I., Aron, A. T., Petras, D., Aluwihare, L. I., Dorrestein, P. C., Nelson, C. E., & Wegley Kelly, L. (2022). ConCISE: Consensus Annotation Propagation of Ion Features in Untargeted Tandem Mass Spectrometry Combining Molecular Networking and In Silico Metabolite Structure Prediction. *Metabolites*, *12*(12), 1275. https://doi.org/10.3390/metabo12121275

Quinlan, Z. A., Bennett, M.-J., Arts, M. G. I., Levenstein, M., Flores, D., Tholen, H. M., Tichy, L., Juarez, G., Haas, A. F., Chamberland, V. F., Latijnhouwers, K. R. W., Vermeij, M. J. A., Johnson, A. W., Marhaver, K. L., & Kelly, L. W. (2023). Coral larval settlement induction using tissue-associated and exuded coralline algae metabolites and the identification of putative chemical cues. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *290*(2009), 20231476. https://doi.org/10.1098/rspb.2023.1476

Raimbault, P., Pouvesle, W., Diaz, F., Garcia, N., & Sempéré, R. (1999). Wet-oxidation and automated colorimetry for simultaneous determination of organic carbon, nitrogen and phosphorus dissolved in seawater. *Marine Chemistry*, *66*(3), 161–169. https://doi.org/10.1016/S0304-4203(99)00038-9

Raimbault, P., Lantoine, F., & Neveux, J. (2004). Dosage rapide de la chlorophylle a et des phéopigments a par fluorimétrie après extraction au méthanol. Comparaison avec la méthode classique d'extraction à l'acétone. *Océanis : Série de documents océanographiques*, *30 (2)*, 189.

Rastorgueff, P., Harmelin-Vivien, M., Richard, P., & Chevaldonné, P. (2011). Feeding strategies and resource partitioning -mitigate the effects of oligotrophy for marine cave mysids. *Marine Ecology Progress Series*, *440*, 163–176. https://doi.org/10.3354/meps09347

R. Carroll, A., R. Copp, B., Grkovic, T., A. Keyzers, R., & R. Prinsep, M. (2024). Marine natural products. *Natural Product Reports*, *41*(2), 162–207. https://doi.org/10.1039/D3NP00061C

Ruttkies, C., Schymanski, E. L., Wolf, S., Hollender, J., & Neumann, S. (2016). MetFrag relaunched: Incorporating strategies beyond in silico fragmentation. *Journal of Cheminformatics*, *8*(1), 3. https://doi.org/10.1186/s13321-016-0115-9

Rutz, A., Sorokina, M., Galgonek, J., Mietchen, D., Willighagen, E., Gaudry, A., Graham, J. G., Stephan, R., Page, R., Vondrášek, J., Steinbeck, C., Pauli, G. F., Wolfender, J.-L., Bisson, J., & Allard, P.-M. (2022). The LOTUS initiative for open knowledge management in natural products research. *eLife*, *11*, e70780. https://doi.org/10.7554/eLife.70780

Santonja, M., Greff, S., Le Croller, M., Thomas, O. P., & Pérez, T. (2018). Distance interaction between marine cave-dwelling sponges and crustaceans. *Marine Biology*, *165*(7), 121. https://doi.org/10.1007/s00227-018-3377-0

Schmid, R., Heuckeroth, S., Korf, A., Smirnov, A., Myers, O., Dyrlund, T. S., Bushuiev, R., Murray, K. J., Hoffmann, N., Lu, M., Sarvepalli, A., Zhang, Z., Fleischauer, M., Dührkop, K., Wesner, M., Hoogstra, S. J., Rudt, E., Mokshyna, O., Brungs, C., … Pluskal, T. (2023a). Integrative analysis of multimodal mass spectrometry data in MZmine 3. *Nature Biotechnology*, *41*(4), 447–449. https://doi.org/10.1038/s41587-023-01690-2

Schymanski, E. L., Jeon, J., Gulde, R., Fenner, K., Ruff, M., Singer, H. P., & Hollender, J. (2014). Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry:

Communicating Confidence. *Environmental Science & Technology*, *48*(4), 2097–2098. https://doi.org/10.1021/es5002105

Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., & Ideker, T. (2003). Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Research*, *13*(11), 2498–2504. https://doi.org/10.1101/gr.1239303

Silva, R. F., Rabeschini, G. B. P., Peinado, G. L. R., Cosmo, L. G., Rezende, L. H. G., Murayama, R. K., & Pareja, M. (2018). The Ecology of Plant Chemistry and Multi-Species Interactions in Diversified Agroecosystems. *Frontiers in Plant Science*, *9*. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01713

Sjögren, M., Jonsson, P. R., Dahlström, M., Lundälv, T., Burman, R., Göransson, U., & Bohlin, L. (2011). Two Brominated Cyclic Dipeptides Released by the Coldwater Marine Sponge *Geodia barretti* Act in Synergy As Chemical Defense. *Journal of Natural Products*, *74*(3), 449–454. https://doi.org/10.1021/np1008812

Ternon, E., Zarate, L., Chenesseau, S., Croué, J., Dumollard, R., Suzuki, M. T., & Thomas, O. P. (2016). Spherulization as a process for the exudation of chemical cues by the encrusting sponge *C. crambe*. *Scientific Reports*, *6*(1), 29474. https://doi.org/10.1038/srep29474

Vacelet J., Boury-Esnault N. & Harmelin J.G. (1994). *Hexactinellid cave, a unique habitat in the scuba zone. 41*, 965–973.

Walker, R. P., Thompson, J. E., & Faulkner, D. J. (1985). Exudation of biologically-active metabolites in the sponge *Aplysina fistularis*: II. Chemical evidence. *Marine Biology*, *88*(1), 27–32. https://doi.org/10.1007/BF00393040

Wang, M., Carver, J. J., Phelan, V. V., Sanchez, L. M., Garg, N., Peng, Y., Nguyen, D. D., Watrous, J., Kapono, C. A., Luzzatto-Knaan, T., Porto, C., Bouslimani, A., Melnik, A. V., Meehan, M. J., Liu, W.-T., Crüsemann, M., Boudreau, P. D., Esquenazi, E., Sandoval-Calderón, M., … Bandeira, N. (2016). Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology*, *34*(8), 828–837. https://doi.org/10.1038/nbt.3597

Weber, L., Armenteros, M., Kido Soule, M., Longnecker, K., Kujawinski, E. B., & Apprill, A. (2020). Extracellular Reef Metabolites Across the Protected Jardines de la Reina, Cuba Reef System. *Frontiers in Marine Science*, *7*, 582161. https://doi.org/10.3389/fmars.2020.582161

Weber, L., Soule, M. K., Longnecker, K., Becker, C. C., Huntley, N., Kujawinski, E. B., & Apprill, A. (2022). Benthic exometabolites and their ecological significance on threatened Caribbean coral reefs. *ISME Communications*, *2*(1), 101. https://doi.org/10.1038/s43705-022-00184-7

Wegley Kelly, L., Nelson, C. E., Aluwihare, L. I., Arts, M. G. I., Dorrestein, P. C., Koester, I., Matsuda, S. B., Petras, D., Quinlan, Z. A., & Haas, A. F. (2021). Molecular Commerce on Coral Reefs: Using Metabolomics to Reveal Biochemical Exchanges Underlying Holobiont Biology and the Ecology of Coastal Ecosystems. *Frontiers in Marine Science*, *8*, 630799. https://doi.org/10.3389/fmars.2021.630799

Wegley Kelly, L., Nelson, C. E., Petras, D., Koester, I., Quinlan, Z. A., Arts, M. G. I., Nothias, L.-F., Comstock, J., White, B. M., Hopmans, E. C., Van Duyl, F. C., Carlson, C. A., Aluwihare, L. I., Dorrestein, P. C., & Haas, A. F. (2022). Distinguishing the molecular diversity, nutrient content, and energetic potential of exometabolomes produced by macroalgae and reef-building corals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *119*(5), e2110283119. https://doi.org/10.1073/pnas.2110283119

Wetzel, R. G., & Likens, G. (2000). *Limnological Analyses*. Springer Science & Business Media.

Yen, J., & Lasley, R. (2011). Chemical Communication Between Copepods: Finding the Mate in a Fluid Environment. In T. Breithaupt & M. Thiel (Eds.), *Chemical Communication in Crustaceans* (pp. 177–197). Springer. https://doi.org/10.1007/978-0-387-77101-4_9

Zimmer, R. K., Commins, J. E., & Browne, K. A. (1999). REGULATORY EFFECTS OF ENVIRONMENTAL CHEMICAL SIGNALS ON SEARCH BEHAVIOR AND FORAGING SUCCESS. *Ecology*, *80*(4), 1432–1446. https://doi.org/10.1890/0012-9658(1999)080[1432:REOECS]2.0.CO;2

Supporting information

Putative contribution of benthic communities to the chemical seascapes: a case study in Mediterranean underwater caves

Authors

Marie Derrien[1], Pierre Chevaldonné[1], Charlotte Simmler[1‡*] and Thierry Pérez[1‡]

Affiliations

1. IMBE, UMR CNRS 7263, IRD 237, Aix Marseille Université, Avignon Université, Station Marine d'Endoume, Chemin de la batterie des lions, 13007 Marseille, France

* Co-last authors

‡ Corresponding author: charlotte.simmler@imbe.fr

Table of contents

S1. Results of the pair-wise Permanova (999 permutations) comparing chemical fingerprints between sampled stations. 147

S2. Contribution of the 5 sponge species exometabolites (EXP 2) to the recorded chemical seascape from EXP1. (A) number of FT shared between EXP 1 and EXP 2 and (B) Contribution to each species to the 61 FT 148

S3. GNPS-library mirror images of MS^2 spectra of identified compounds 149

S4. Annotated MS^2 spectra of detected compounds 150

- S4.1 MS^2 spectrum of putative purealidin G isomer (FT 442) 150
- S4.2 MS^2 spectrum of putative aplysamine-1 (FT 472-474) 151
- S4.3 MS^2 spectrum of putative oxide derivative of aplysamine-1 (FT 512-520) 151
- S4.4 MS^2 spectrum of putative 2-(3,5-Dibromo-2,4-dihydroxyphenyl) acetamide (FT 1064, 1174, 1175)..... 152
- S4.5 MS^2 spectrum of putative Monobromoisophakellin (FT 543 & 544)..... 153
- S4.6 MS^2 spectrum of putative Hymenialdisine (FT 560 & 561)..... 153
- S4.7 MS^2 spectrum of putative ceratinamine (FT 757)..... 154
- S4.8 MS^2 spectrum of putative steroidal alkaloid (FT 3130)..... 154

S5. MS data of annotated exometabolites associated to sponge taxa and significantly contributing to the chemical seascape of SD seawater 155

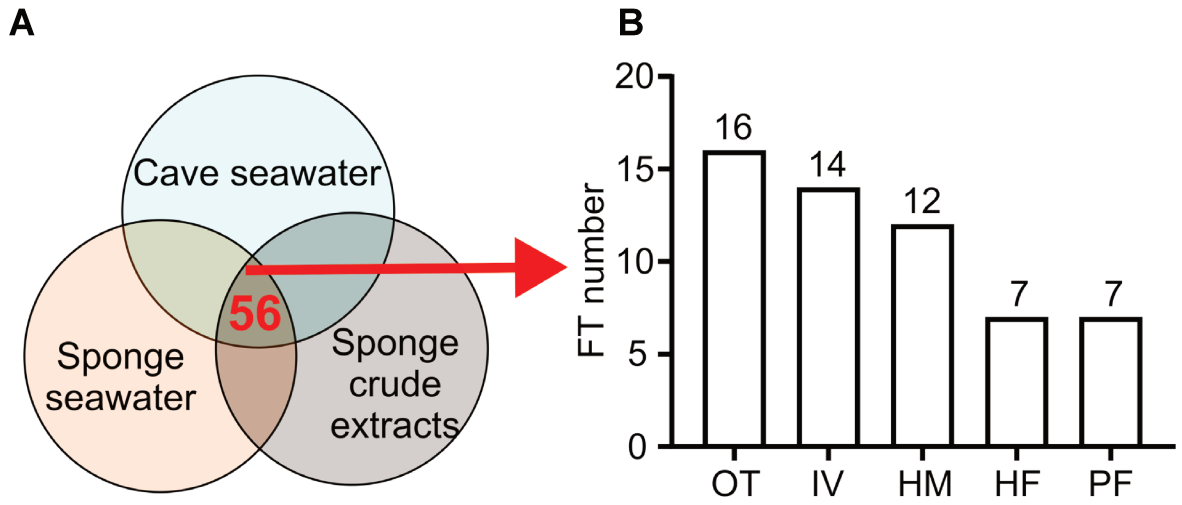
S6. Putative cave markers found in seawater from our previous (Santonja et al. 2018; Derrien et al., 2024) and in the current study 159

S7. Comparison of C/N values estimated from the molecular formula of detected compounds compared to the ones calculated from the traditional method of dosage of total Carbone (C) and Nitrogen (N) in seawater (Raimbault et al., 1999). 160

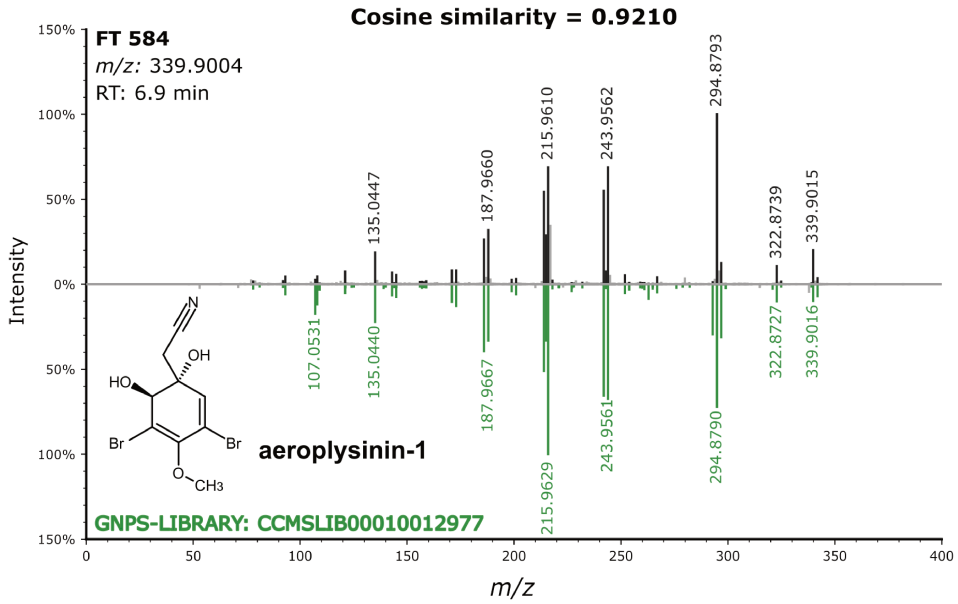
S1. Results of the pair-wise Permanova (999 permutations) comparing chemical fingerprints between sampled stations. Significative differences are mentioned by an asterisk. Comparisons of chemical composition: (orange) between SD and D seawater from the same cave, (yellow) between SD of different caves, (blue) between D of different caves and (white) for the others.

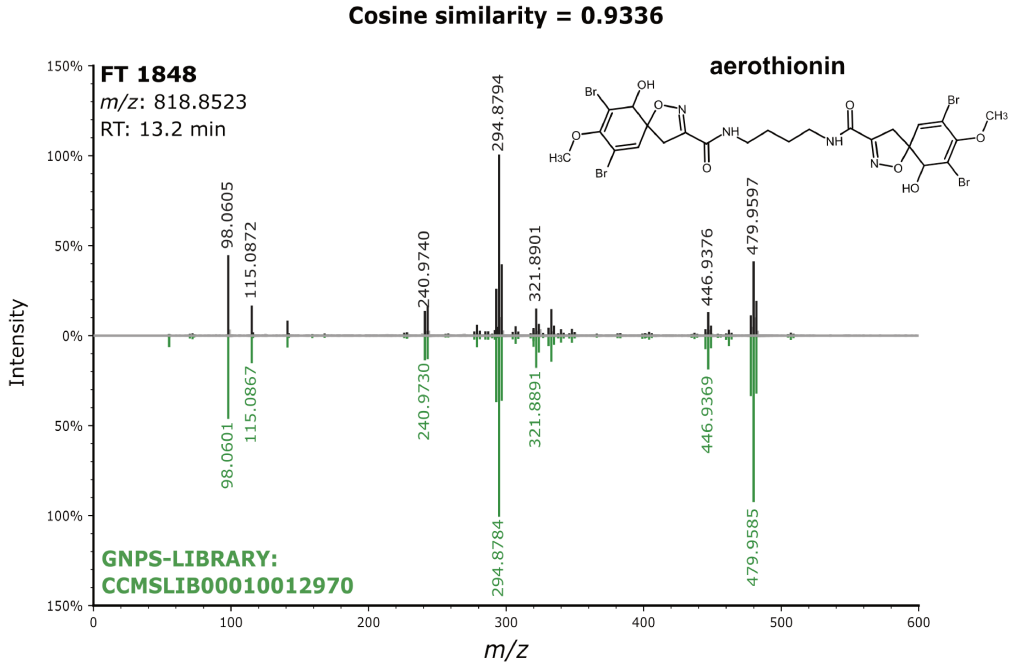
Comparisons	F	R^2	p-value	p-adjusted
Mejean_D *vs.* Mejean_SD	10.53	0.26639	**0.001***	0.0056
Jarre_D *vs.* Jarre_SD	9.1835	0.23437	**0.002***	0.0056
Figuier_D *vs.* Figuier_SD	2.0433	0.063768	0.14	0.21778
3PP_D *vs.* 3PP_SD	9.3549	0.2439	**0.002***	0.0056
3PP_SD *vs.* Figuier_SD	0.27815	0.0091864	0.707	0.73319
3PP_SD *vs.* Jarre_SD	1.6251	0.051386	0.192	0.2688
3PP_SD *vs.* Mejean_SD	2.2579	0.069995	0.11	0.1925
Figuier_SD *vs.* Jarre_SD	2.3263	0.071964	0.11	0.1925
Figuier_SD *vs*. Mejean_SD	2.1525	0.066948	0.122	0.20094
Jarre_SD *vs.* Mejean_SD	1.0143	0.032706	0.349	0.40544
3PP_D *vs.* Figuier_D	0.46124	0.015656	0.624	0.672
3PP_D *vs.* Jarre_D	0.97872	0.032647	0.341	0.40544
3PP_D *vs.* Mejean_D	1.0421	0.035884	0.362	0.40544
Figuier_D *vs.* Jarre_D	0.098435	0.0032704	0.858	0.858
Figuier_D *vs.* Mejean_D	1.2102	0.040058	0.306	0.38945
Jarre_D *vs.* Mejean_D	1.8763	0.060768	0.167	0.24611
3PP_SD *vs.* Figuier_D	4.3247	0.12599	0.033*	0.071077
3PP_D *vs.* Figuier_SD	4.8137	0.14236	0.023*	0.053667
3PP_SD *vs.* Jarre_D	3.1288	0.094443	0.075	0.15
3PP_D *vs.* Jarre_SD	22.706	0.43914	0.001*	0.0056
3PP_SD *vs.* Mejean_D	8.3165	0.22286	0.002*	0.0056
3PP_D *vs.* Mejean_SD	14.414	0.33201	0.001*	0.0056
Figuier_D *vs.* Jarre_SD	11.136	0.2707	0.002*	0.0056
Figuier_D *vs.* Mejean_SD	8.0694	0.21197	0.001*	0.0056
Figuier_SD *vs.* Jarre_D	1.3374	0.042676	0.231	0.308
Figuier_SD *vs*. Mejean_D	4.8592	0.14351	0.02*	0.050909
Jarre_D *vs.* Mejean_SD	6.8611	0.18613	0.002*	0.0056
Jarre_SD *vs.* Mejean_D	15.364	0.34631	0.001*	0.0056

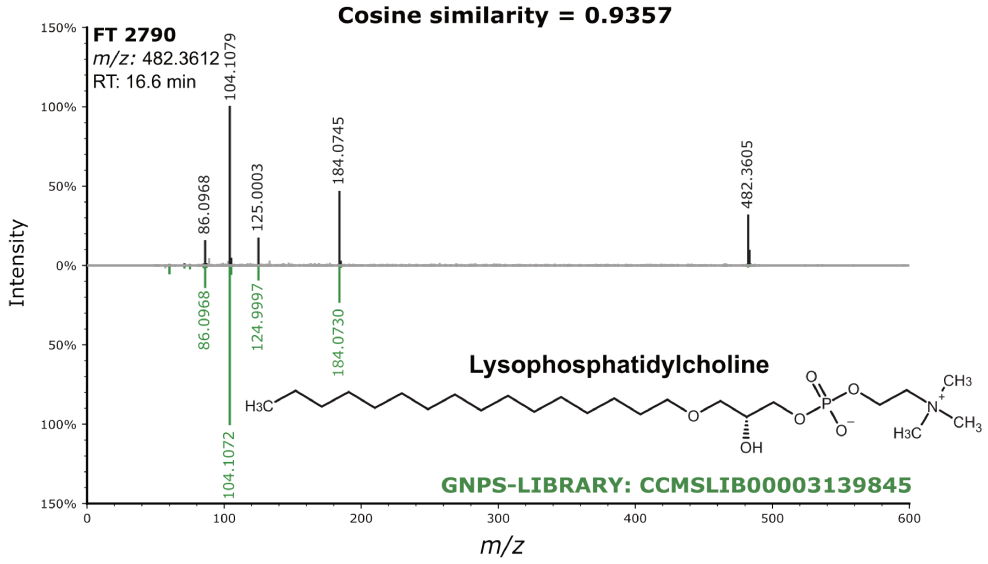
S2. Contribution of the 5 sponge species exometabolites (EXP 2) to the recorded chemical seascape from EXP1. (A) number of FT shared between EXP 1 and EXP 2 and **(B)** Contribution to each species to the 61 FT



S3. GNPS-library mirror images of MS^2 spectra of identified compounds

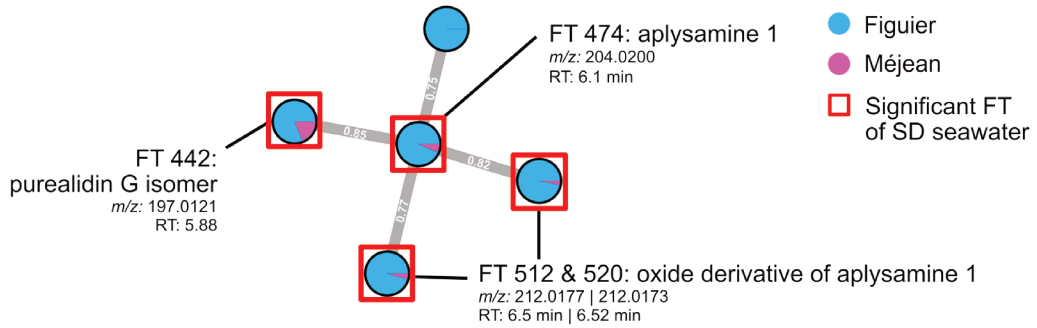




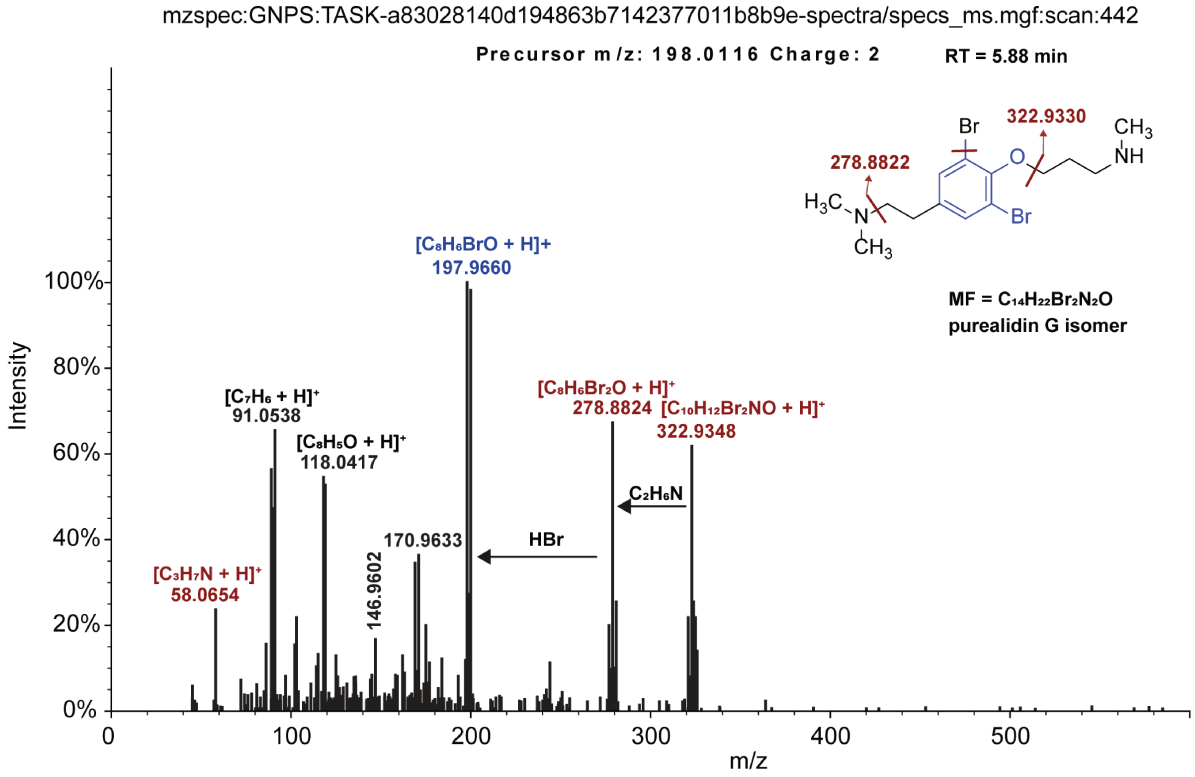


S4. Annotated MS^2 spectra of detected compounds

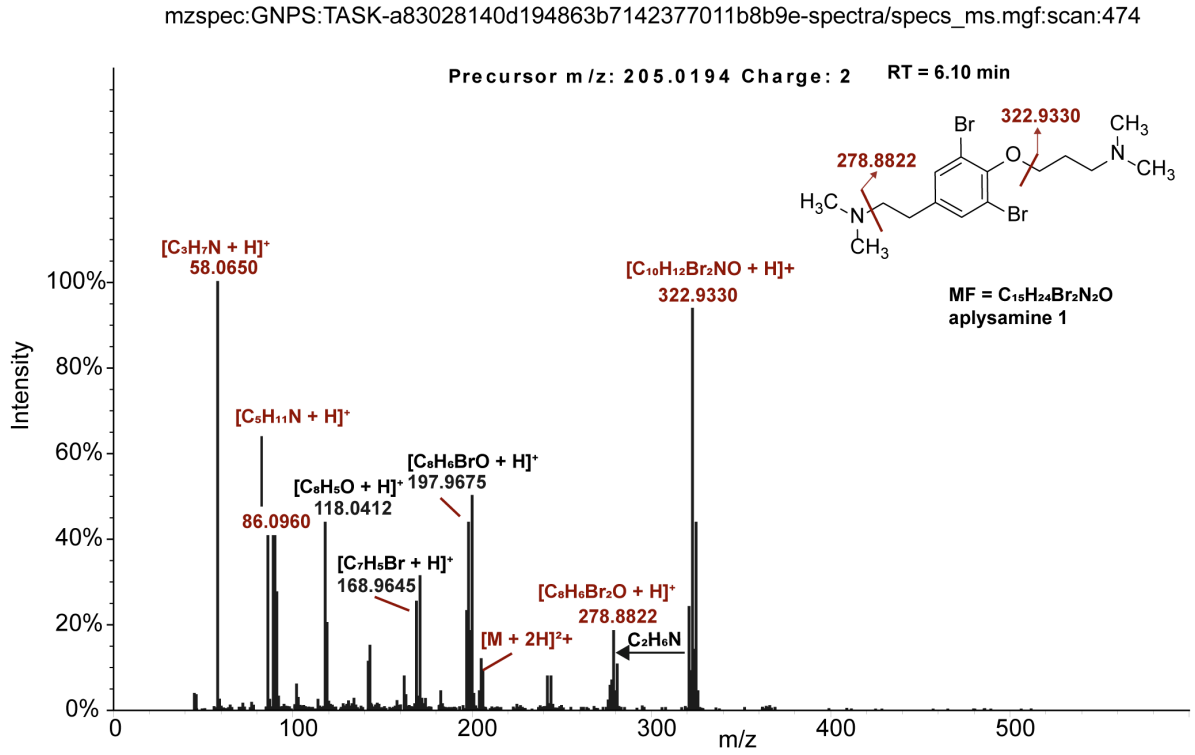
Among the annotated compounds, 4 of them belongs to the same cluster (component index 171 in the GNPS Feature Based Molecular Network):



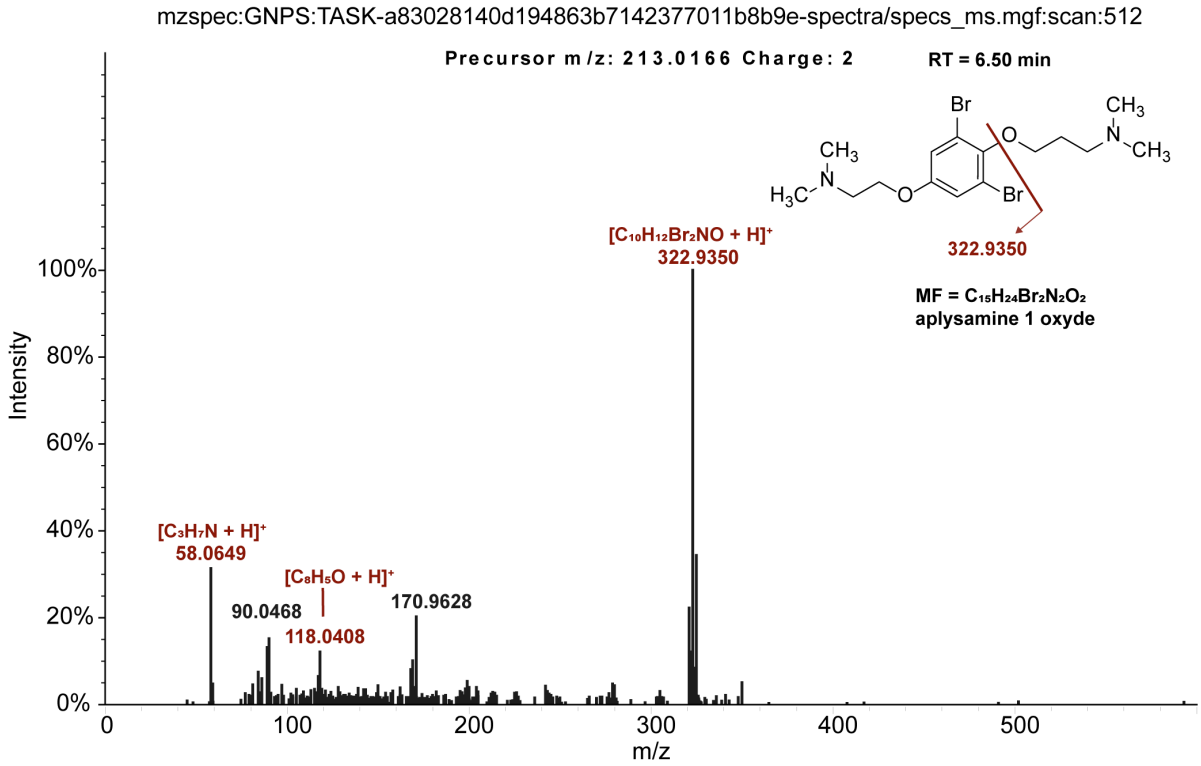
- **S4.1 MS^2 spectrum of putative purealidin G isomer (FT 442)**



- **S4.2 MS^2 spectrum of putative aplysamine-1 (FT 472-474)**

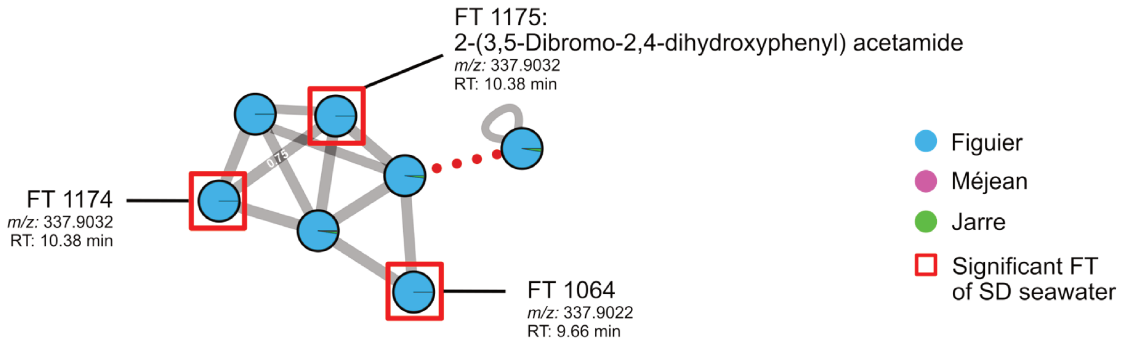


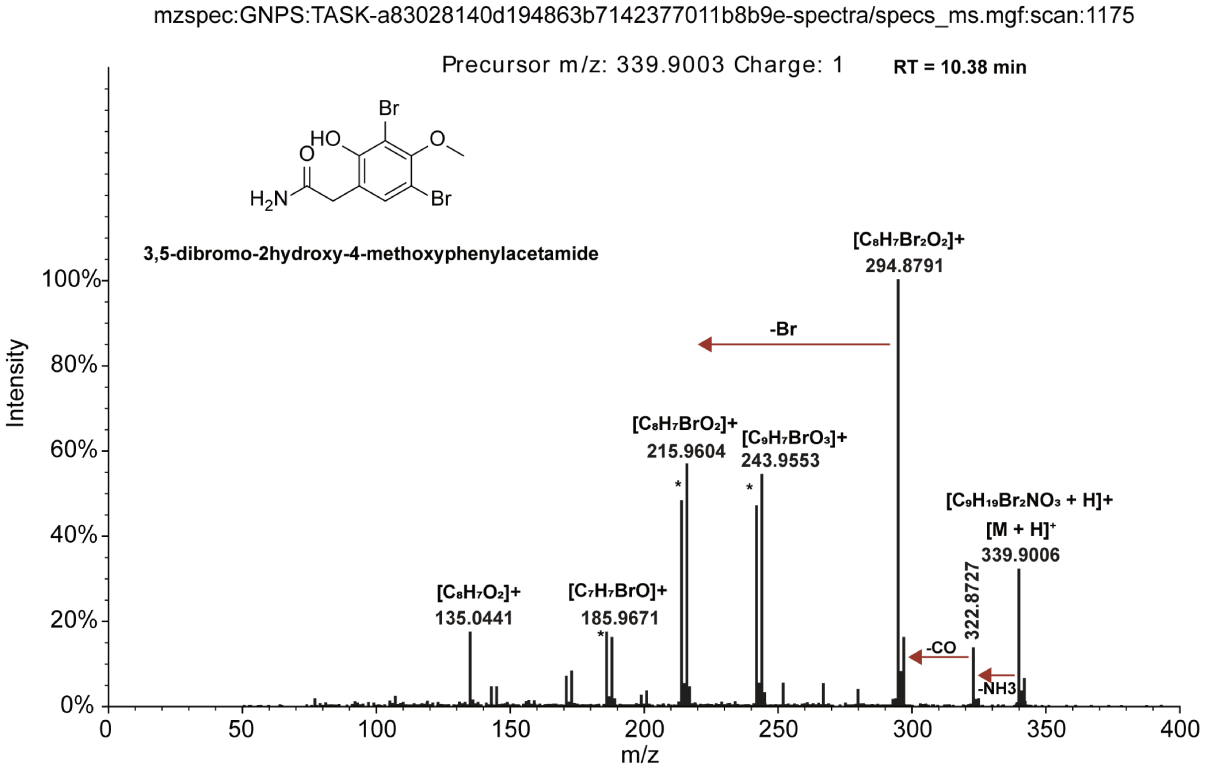
- **S4.3 MS^2 spectrum of putative oxide derivative of aplysamine-1 (FT 512-520)**



- **S4.4 MS^2 spectrum of putative 2-(3,5-Dibromo-2,4-dihydroxyphenyl) acetamide (FT 1064, 1174, 1175)**

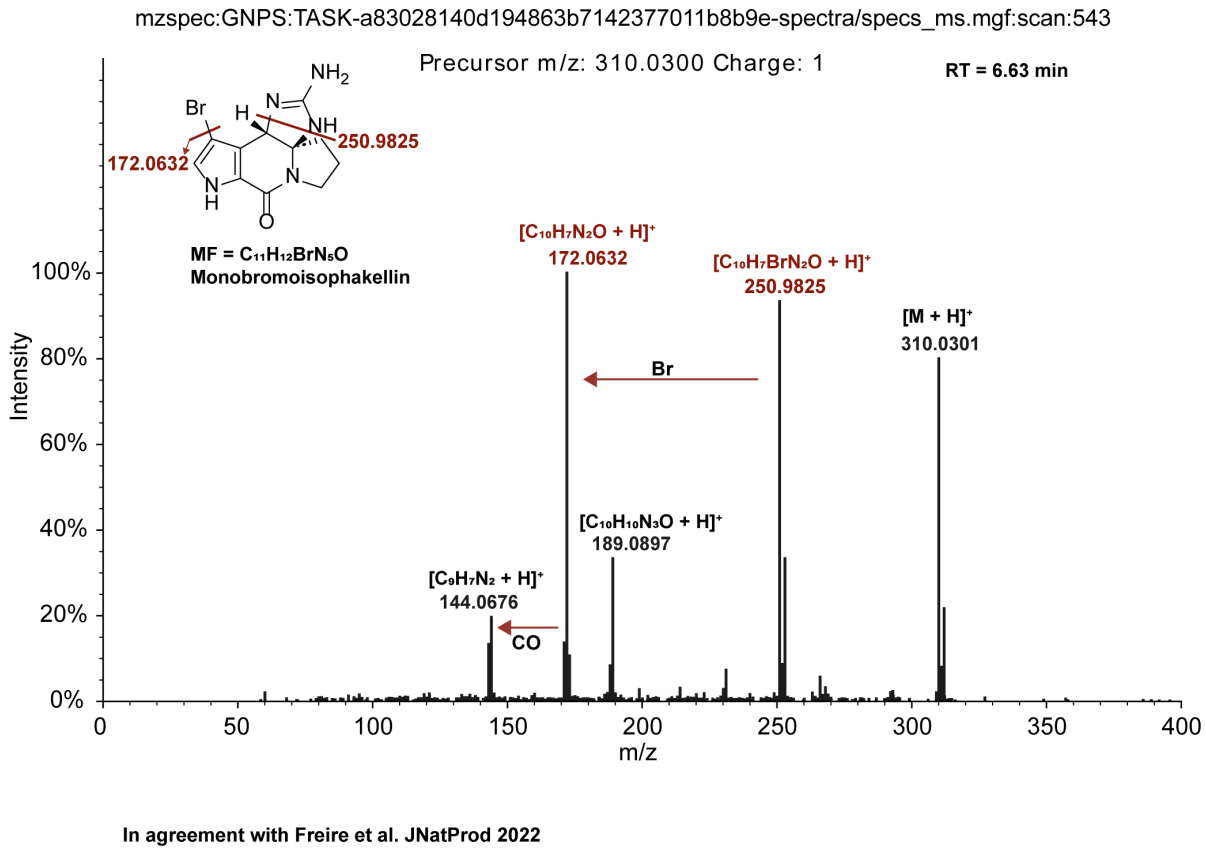
These FT appear in the same cluster (component index 150 in the GNPS Feature Based Molecular Network):





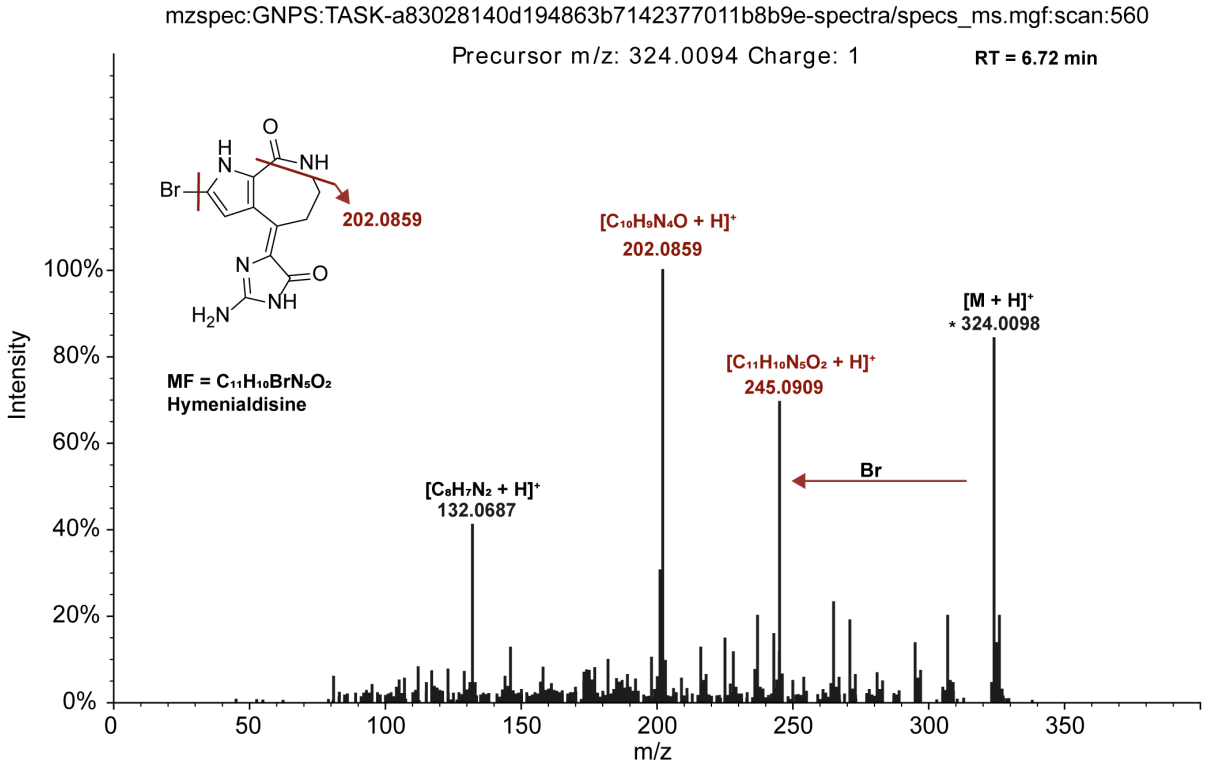
In agreement with Mauduit et al. 2022
***Monoisotopic signal used for the determination of molecular formula**

- **S4.5 MS^2 spectrum of putative Monobromoisophakellin (FT 543 & 544)**

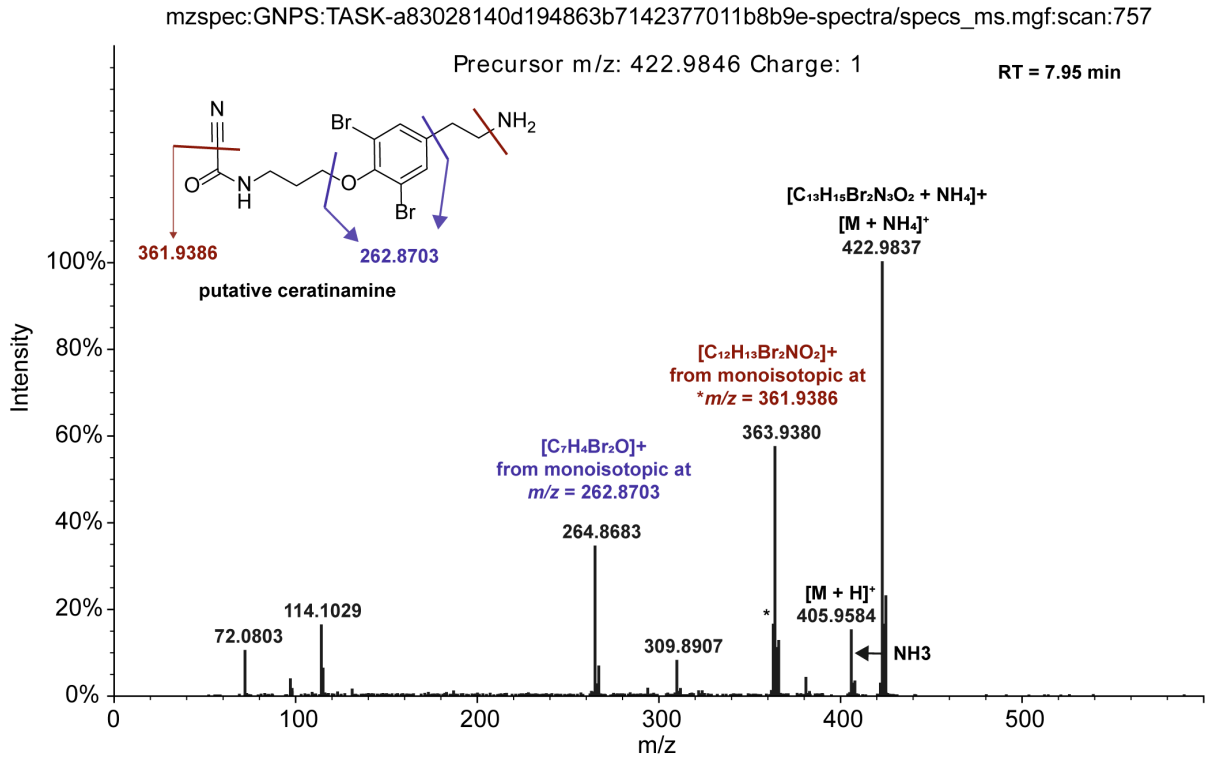


In agreement with Freire et al. JNatProd 2022

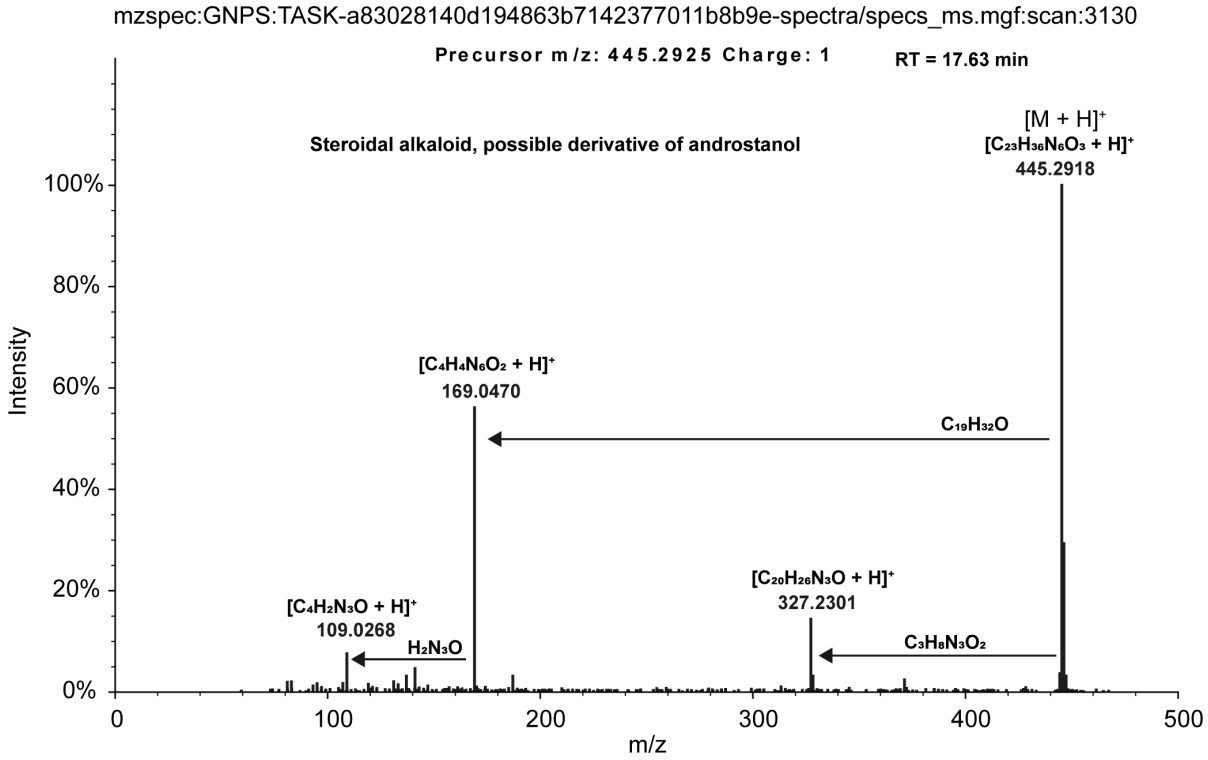
- **S4.6 MS^2 spectrum of putative Hymenialdisine (FT 560 & 561)**



- **S4.7 MS^2 spectrum of putative ceratinamine (FT 757)**



- **S4.8 MS^2 spectrum of putative steroidal alkaloid (FT 3130)**



S5. MS data of annotated exometabolites associated to sponge taxa and significantly contributing to the chemical seascape of SD seawater

- Feature (FT) name refers to the Cluster Index to identify nodes of EXP1 in the GNPS Feature Based Molecular Network: https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=a83028140d194863b7142377011b8b9e
- The features were associated to putative sponge producers including AC: *Aplysina cavernicola*, HF: *Haliclona fulva*, HM: *Haliclona mucosa*, IV: *Ircinia variabilis,* OT: *Oscarella tuberculata*, PF: *Petrosia ficiformis*
- In case of brominated molecules, the monoisotopic peak was selected for the determination of molecular formula.
- The natural product structural classes were determined using the classifications of NP Classifier (Kim et al., 2021) and the key structural moieties using Classyfire (Djoumbou et al., 2016).
- Retention Time (RT) and relative intensities of MS^2 fragments are exported from the MZmine data matrix.
- Annotations received a Confidence Level (CL) according to Schymanski et al. (2014): when a putative structural identification could be proposed for the selected features after manual inspection, feature received a confidence level 2b or 3 (several structural candidates possible). When only a chemical formula was provided, a confidence level 4 was given.

Annotation	**Taxa**	**FT name**	**RT (min)**	***m/z* meas.**	***m/z* calc.**	**Err (ppm)**	**Ion type**	**MS^2 fragments & Intensities**		**Molecular formula**	**Natural product class**	**Key structural moiety**	**CL**
purealidin G isomer	AC	**442**	5.88	197.0121	197.0122	0.6	$[M + 2H]^{2+}$	197.9660 199.9655 278.8824 91.0538 322.9348 118.0417 170.9633 58.0654	100 98 67 66 62 55 36 24	$C_{14}H_{22}Br_2N_2O$	Alkaloid	Dibromotyramine	2b
aplysamine-1	AC, OT, IV	**472**	6.09	407.0326	407.0328	0.5	$[M + H]^{+}$	86.0969 409.0320	100 60	$C_{15}H_{24}Br_2N_2O$	Alkaloid	Dibromotyramine	2b
	AC	**474**	6.10	204.0200	204.0200	0.2	$[M + 2H]^{2+}$	58.0650 322.9330 199.9651 118.0412 86.0960 170.9616 278.8822	100 94 50 44 41 31 18				
oxide derivative of aplysamine-1	AC	**512**	6.50	212.0177	212.0175	-0.7	$[M + 2H]^{2+}$	322.9350 58.0649 170.9628	100 31 20	$C_{15}H_{24}Br_2N_2O_2$	Alkaloid	Dibromotyramine	2b

								90.0468 118.0408	15 12				
oxide derivative of aplysamine-1	AC	**520**	6.52	212.0173	212.0175	-0.9	$[M + 2H]^{2+}$	58.0650 322.9323 199.9656 118.0418 170.9624	100 25 24 16 11	$C_{15}H_{24}Br_2N_2O_2$	Alkaloid	Dibromotyramine	2b
monobromoisophakellin	Agelasidae (AO) Dictyonellidae	**543**	6.63	310.0300	310.0298	-0.6	$[M + H]^+$	172.0632 250.9825 310.0301 189.0897 144.0676	100 93 80 33 20	$C_{11}H_{12}BrN_5O$	Alkaloid	Imidazole alkaloid (Bromopyrrole moiety)	2b
		544	6.64	310.0301	310.0298	-0.9	$[M + H]^+$	172.0631 252.9804 312.0277 189.0893 144.0686	100 100 73 33 17				
hymenialdisine	Axinellidae	**560**	6.72	324.0094	324.0091	0.9	$[M + H]^+$	202.0859 324.0098 245.0909 132.0687	100 84 70 41	$C_{11}H_{10}BrN_5O_2$	Alkaloid	Imidazole alkaloid (Bromopyrrole moiety)	2b
		561	6.72	324.0085	324.0091	1.8	$[M + H]^+$	202.0857 326.0074 245.0911 132.0679	100 93 67 43				
aeroplysinin-1 (under acetyle form)	AC	**582**	6.88	386.9563	386.9550	-3.5	$[M + NH_4]^+$	294.8793 339.9012 243.9561 215.9613 322.8746 121.0287 135.0450	100 75 70 64 20 9 6	$C_{10}H_{13}Br_2NO_4$	Alkaloid	Simple amide alkaloid	2b
aeroplysinin-1	AC	**584**	6.89	337.9030	337.9022	-2.3	$[M + H]^+$	294.8793 215.9610 243.9562 185.9679 339.9015	100 69 69 26 20	$C_9H_9Br_2NO_3$			
ceratinamine	Aplysinidae, Trachycladidae	**757**	7.95	420.9868	420.9869	0.3	$[M + H_3N + H]^+$	422.9837 363.938	100 57	$C_{13}H_{15}Br_2N_3O_2$	Alkaloid	Dibromotyramine	2b

								264.8683 114.1029 405.9584 72.0803 309.8907	34 16 15 10 8				
putative acetamide derivative of aeroplysinin-1 (2-(3,5-dibromo-2-hydroxy-4-methoxyphenyl) acetamide)	Verongiida (AC)	**1064**	9.66	337.9030	337.9022	-2.3	$[M + H]^+$	216.9682 241.9569 121.0287 187.9655 108.0572 93.0340	100 29 21 21 7 6	$C_9H_9Br_2NO_3$	Alkaloid	Simple amide alkaloid	2b
putative acetamide derivative of aeroplysinin-1 (2-(3,5-dibromo-2-hydroxy-4-methoxyphenyl) acetamide)	Verongiida (AC)	**1172**	10.37	337.9032	337.9022	-2.9	$[M + H]^+$	118.0613 223.9518 296.8773 215.9598 243.9551 86.0347 135.0451 187.9662	100 39 31 31 29 15 10 10	$C_9H_9Br_2NO_3$	Alkaloid	Aromatic amide	2b
		1175	10.38	337.9032	337.9022	-2.9	$[M + H]^+$	294.8791 215.9604 243.9553 339.9006 135.0441 185.9671 322.8727	100 57 54 32 17 17 14				
		1174	10.38	337.9032	337.9022	-2.9	$[M + H]^+$	213.9630 292.8805 241.9568 185.9679 135.0441 337.8994 170.9454 118.0615 320.8786	100 96 84 35 26 24 13 10 10				
		1751	12.84	355.1883	355.1880	-0.8	$[M + Na]^+$	355.1889	100	$C_{20}H_{28}O_4$	Terpenoid	Diterpenoid	4
aerothionin	AC	**1848**	13.20	814.8535	814.8557	2.7	$[M + H]^+$	294.8794	100	$C_{24}H_{26}Br_4N_4O_8$	Alkaloid	Dibromocyclohexa-	2b

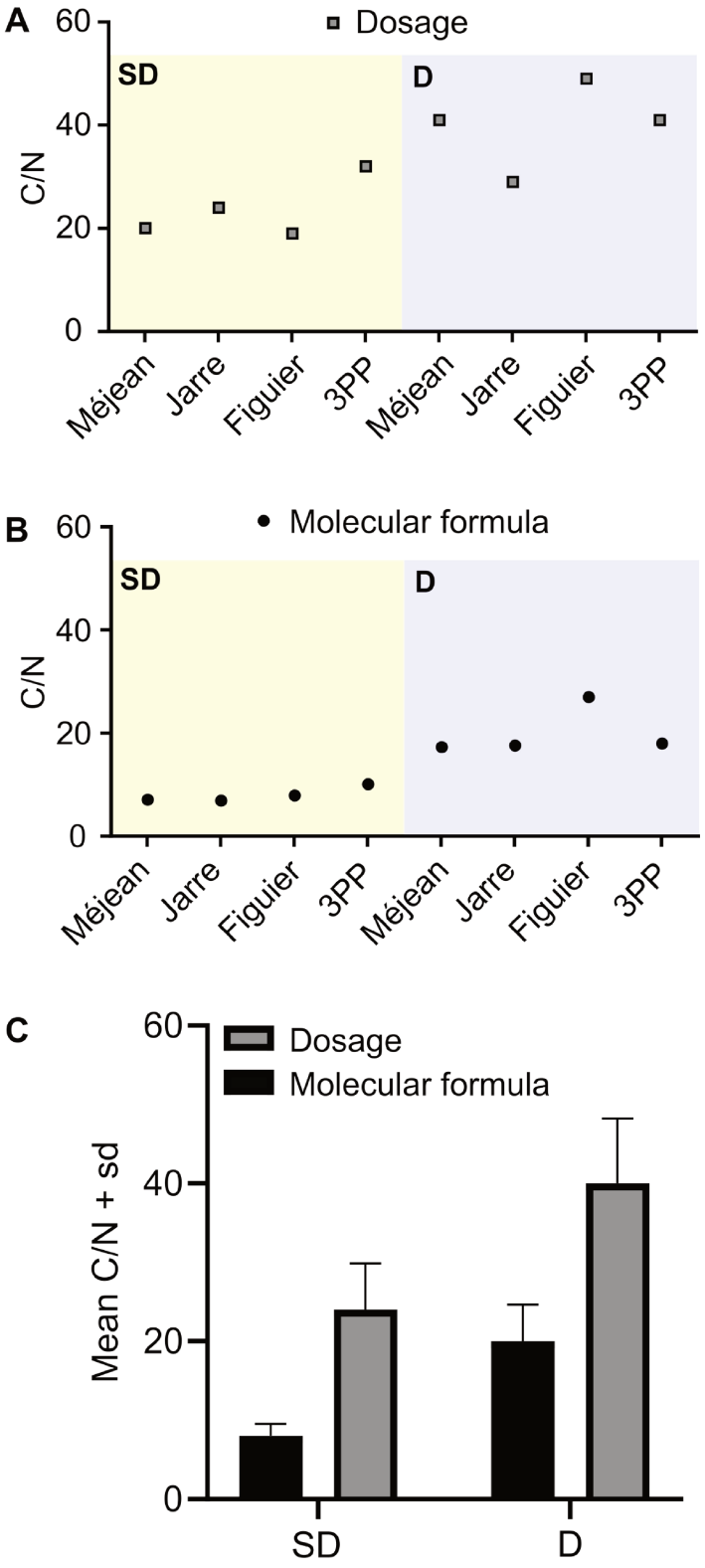
								98.0605 479.9597 115.0872 321.8901 240.9740 446.9376	44 41 16 14 13 12			diene spiroizoxazole	
	IV	**2342**	14.94	431.2432	431.2428	-0.8	$[M + H]^+$	131.0848 153.0539 177.0902 109.1011 145.1005 395.2218 95.0850 413.2321	100 72 43 37 37 37 32 30	$C_{25}H_{34}O_6$	Terpenoid	Sesquiterpenoid (lactone)	4
Lysophosphatidyl-choline	HM IV OT PF HF	**2790**	16.55	482.3591	482.3605	2.9	$[M + H]^+$	104.1079 184.0745 482.3605 125.0003 86.0968	100 46 32 17 15	$C_{24}H_{52}NO_6P$	Fatty acid	Glycerophospho-choline	2b
	HM IV OT PF HF	**2831**	16.63	482.3602	482.3605	0.6	$[M + H]^+$	104.1071 184.0735 482.3608 124.9997 86.0964	100 38 25 15 14	$C_{24}H_{52}NO_6P$	Fatty acid	Glycerophospho-choline	2b
	HM IV OT	**2942**	17.02	301.2165	301.2162	-0.8	$[M + H]^+$	105.0699 161.1325 119.0855 199.1482 95.0556 131.0854 143.0853 173.1324 255.2111 81.0696 185.1328	100 94 71 56 49 49 48 44 36 28 27	$C_{20}H_{28}O_2$	Terpenoid	Apocarotenoid	4
steroidal alkaloid	Homosclero-morpha	**3130**	17.63	445.2925	445.2941	-3.6	$[M + H]^+$	445.2918 169.0470 327.2301 109.0268	100 56 14 8	$C_{25}H_{38}N_3O_4$	Alkaloid	Guanidinium type alkaloid	2b

S6. Putative cave markers found in seawater from our previous (Santonja et al. 2018; Derrien et al., 2024) and in the current study

Cpd = compound. * Compounds also found in Derrien et al. 2024 and in the present study. RT: Retention Time. FT: feature. "pos" and "neg" correspond to the ionization type of the detected features in Derrien et al., 2024. F.: Frequence. Fauc.: Fauconnière (other cave from previous study). Comm.: Community. The ratio for seasons and communities was calculated by comparing the mean detection intensity of the feature, considering the most contrasted values for each.

MS data from Santonja et al., 2018 (Supplementary)							Data from Derrien et al., 2024 (Supplementary)			MS data from our current analysis							
Group	**Cpd**	**Molecular formula**	**RT mean (min)**	**Ion mass**	**Error (ppm)**	**Ion type**	**FT name**	**Cave**	**F. in sample**	**FT name**	**RT mean (min)**	**Ion mass**	**Ion type**	**Error (ppm)**	**Cave**	**F. (seasons)**	**Comm.**
PEPTIDES	**A***	**$C_{24}H_{44}N_4O_4$**	5.4	453.3435 475.3254	0.2 0	$[M+H]^+$ $[M+Na]^+$	**pos105**	Fauc. Jarre	1/6 1/6	**818**	8.34	453.3443	$[M+H]^+$	0.48	**4 caves**	**4 seasons**	SD < **D**
	B	$C_{30}H_{55}N_5O_5$	5.6	566.4279	-0.5	$[M+H]^+$	/			/							
	C	$C_{36}H_{66}N_6O_6$	5.8	679.5121 701.4940	-0.4 -0.5	$[M+H]^+$ $[M+Na]^+$	/			/							
	D	**$C_{42}H_{77}N_7O_7$**	5.9	396.8015	0.1	$[M+2H]^{2+}$	**pos114**	**Jarre 3PP Fauc.**	**6/6 4/4 6/6**	/							
OXYLIPIN derivatives	E	$C_{18}H_{36}O_6$	6.5	349.2583	-1.1	$[M+H]^+$	/			/							
	F*	**$C_{18}H_{30}O_3$**	7.0	295.2264	-0.6	$[M+H]^+$	**neg120**	**Fauc. Jarre** 3PP	1/6 **4/6** 1/4	**2018**	13.9	295.2267	$[M+H]^+$	-2.1	**4 caves**	**4 seasons**	SD ~ D
	G*	**$C_{18}H_{34}O_5$**	7.0	331.2479	0.8	$[M+H]^+$	**pos138**	Fauc. 3PP	1/6 1/4	**2433**	15.3	331.2477	$[M+H]^+$	0.5	**4 caves**	**4 seasons**	SD < **D**
	H*	**$C_{14}H_{26}O_3$**	7.2	243.1956	-0.5	$[M+H]^+$	**neg121**	Fauc. 3PP	3/6 1/4	**1949**	13.7	243.1957	$[M+H]^+$	-1	**4 caves**	**4 seasons**	**SD** > D

S7. Comparison of C/N values estimated from the molecular formula of detected compounds compared to the ones calculated from the traditional method of dosage of total Carbone (C) and Nitrogen (N) in seawater (Raimbault et al., 1999). Individual values per sampled station calculated with **(A)** the traditional method of dosage, **(B)** the molecular formula. **(C)** Mean value and standard deviation per community seawater comparing the 2 methods. SD: Semi-Dark, D: Dark



References

Djoumbou Feunang, Y., Eisner, R., Knox, C., Chepelev, L., Hastings, J., Owen, G., Fahy, E., Steinbeck, C., Subramanian, S., Bolton, E., Greiner, R., & Wishart, D. S. (2016). ClassyFire: Automated chemical classification with a comprehensive, computable taxonomy. *Journal of Cheminformatics*, *8*(1), 61. https://doi.org/10.1186/s13321-016-0174-y

Kim, H. W., Wang, M., Leber, C. A., Nothias, L.-F., Reher, R., Kang, K. B., Van Der Hooft, J. J. J., Dorrestein, P. C., Gerwick, W. H., & Cottrell, G. W. (2021). NPClassifier: A Deep Neural Network-Based Structural Classification Tool for Natural Products. *Journal of Natural Products*, *84*(11), 2795–2807. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c00399

Raimbault, P., Pouvesle, W., Diaz, F., Garcia, N., & Sempéré, R. (1999). Wet-oxidation and automated colorimetry for simultaneous determination of organic carbon, nitrogen and phosphorus dissolved in seawater. *Marine Chemistry*, *66*(3), 161–169. https://doi.org/10.1016/S0304-4203(99)00038-9

Schymanski, E. L., Jeon, J., Gulde, R., Fenner, K., Ruff, M., Singer, H. P., Hollender, J. (2014). Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. *Environ. Sci. & Technol.* 48 (4): 2097–98. https://doi.org/10.1021/es5002105.

4.3. Conclusions & Perspectives

4.3.1 Quelques avancées majeures dans la compréhension de la complexité des paysages chimiques marins

Dans cette étude, nous validons notre hypothèse d'un lien entre la composition du paysage chimique et la diversité des communautés benthiques. Ce lien s'exprime par :

(1) la prédominance de classes chimiques différentes entre l'eau des GSO et l'eau des GO. Le paysage chimique en GSO est marqué par la forte présence d'alcaloïdes et de terpénoïdes, alors que ces classes sont très peu représentées dans l'eau des GO. Dans le chapitre 2, nous avons vu que la communauté GSO abrite une forte biodiversité où les éponges dominent en biomasse et en espèces alors que la biodiversité benthique est beaucoup moins élevée en GO. Parmi les alcaloïdes et les terpénoïdes détectés dans l'eau des GSO, la moitié sont des exométabolites libérés par des espèces d'éponges représentatives de cette communauté, en incluant *Aplysina cavernicola* et les 5 espèces testées dans l'expérience 2 (*Haliclona fulva, Haliclona mucosa, Ircinia variabilis, Oscarella tuberculata*, et *Petrosia ficiformis*).

A l'inverse, en GO, on ne retrouve pas la signature d'espèces benthiques identifiées, probablement en raison de la faible biodiversité (richesse spécifique et abondance) caractérisant cette communauté. Par ailleurs, la connaissance du métabolisme de ces organismes vivant en fond de grotte, et notamment de leur capacité à exsuder des exométabolites, est aujourd'hui quasi nulle. Ainsi le chemin à parcourir pour annoter la totalité des molécules contenues dans des paysages chimiques est encore très long. Néanmoins, au regard de ces résultats, nous avons imaginé tester nos hypothèses dans des communautés cavernicoles immatures (voir ci-après).

(2) la détection de la signature chimique d'espèces benthiques caractéristiques de chaque grotte. Le paysage chimique de GSO de la Grotte du Figuier se caractérise par une forte abondance des composés d'*A. cavernicola*, ce qui semble être bien lié à la dominance de cette espèce dans la communauté benthique GSO de cette grotte (Grenier et al., 2018). Les exométabolites des 5 espèces testées sont plus abondants dans les paysages chimiques des GSO de la grotte du Figuier et de Jarre, conformément à la présence majoritaire de ces espèces dans ces deux grottes, en comparaison aux grottes de Méjean et des 3PP. Cependant, on constate également que toutes les éponges n'ont pas la même contribution au paysage chimique des GSO, la signature d'*A. cavernicola* étant très prononcée, quand celles des 5 espèces testées en aquarium semblent plus discrètes. Deux explications sont possibles à cela : (i) cette signature

marquée résulte du fait qu'*A. cavernicola* est généralement une espèce abondante, représentant une forte biomasse quand elle est présente dans la communauté ; (ii) l'abondance et la diversité des exometabolites (spécialisés) libérés et détectés sont des paramètres espèce-dépendants. Chaque espèce contribue différemment aux paysages chimiques mesurés, certaines espèces libéreraient moins d'exometabolites que d'autres au moment de la capture, que celle-ci soit *in situ* ou en aquarium. La diversité d'exométabolites libérés par *A. cavernicola*, comparée à 2 autres espèces d'éponges présentes dans la communauté GSO (*Agelas oroides, Spongia officinalis*), a déjà été mise en évidence dans Mauduit et al. (2023) et pourrait être impliquée dans des processus de défense chimique contre des prédateurs, biofouleurs et agents pathogènes (Thompson, 1985 ; Weiss et al., 1996 ; Engel & Pawlik, 2000 ; Thoms et al., 2004 ; García-Vilas et al., 2016)

(3) les corrélations biodiversité & chimiodiversité :

- Le nombre d'espèces dans les communautés semble influencer le nombre de classes structurales présentes dans l'eau située à leur périphérie. Pour la majorité des stations échantillonnées, plus la richesse spécifique est grande, plus le nombre de classes chimiques détectées dans l'eau est grand. C'est pour la communauté benthique la plus riche et diversifiée (la GSO de Figuier) que la composition du paysage chimique marin est la plus diverse.

- Suite aux formules moléculaires proposées pour les composés impliqués dans la signature chimique des paysages de GSO et GO, le rapport C/N, qui reflète la qualité nutritive, a été calculé et corrélé au niveau de diversité des communautés benthiques. D'une manière générale, plus la qualité nutritive de l'eau est grande, plus la richesse spécifique de la communauté benthique est grande.

En utilisant des formules moléculaires issues de l'annotation des composés, il a été possible de calculer un rapport C/N dont les valeurs suivent la même tendance que celles déterminées à partir des méthodes traditionnelles de dosage. Cette méthode pourrait ainsi être plus amplement employée dans les études en écologie chimique en apportant une information complémentaire à la caractérisation d'un paysage chimique donné (Hildebrand et al., 2022).

Par ailleurs, on a démontré que la composition chimique de l'eau est plus variable entre les GSO qu'entre les GO. La similarité de composition chimique entre l'eau des GO de chaque grotte démontre qu'il existerait une signature chimique de l'eau de mer cavernicole, dominée par la présence d'acides gras et de polycétides dont l'origine est encore incertaine. On la détecte majoritairement en fond de grotte, probablement en raison du gradient de confinement plus prononcé. A l'image de ce qu'on observe dans l'océan profond mais cette fois ci, sous l'effet

d'un gradient vertical, la diversité chimique de l'eau des GO résulterait , en grande partie, de la dégradation de la matière organique par les boucles microbiennes (Zark & Dittmar, 2018). Le paysage chimique de l'eau des différentes grottes se distingue donc principalement par la composition de l'eau en entrée de grotte plutôt que par celle du fond de grotte. Ce constat témoigne encore un peu plus de l'importance de la contribution de la faune benthique dans le paysage chimique d'un écosystème cavernicole, au moins quand les communautés GSO abritent une grande biodiversité.

4.3.2 Paysages chimiques au sein de communautés cavernicoles immatures

Depuis près de 20 ans, des grottes d'un genre particulier sont étudiées en Principauté de Monaco. Au début des années 2000, un chantier considérable se conclut par l'extension du Port de la Condamine. Pour agrandir le port, il a fallu s'étendre vers des eaux profondes et mettre en place une jetée semi-flottante de plus de 350 m ancrée sur le Rocher et une contre-jetée de près de 150 m de long, portée par un grand pilier au-dessus du tombant coralligène des Spélugues. On découvre alors des habitats artificiels totalement inédits dans les parties creuses du pilier supportant la contre-jetée. Il s'agit de chambres totalement obscures, presque totalement isolées de la mer ouverte, communiquant avec l'extérieur uniquement par des trous de la largeur d'un plongeur (Figure 4.1).

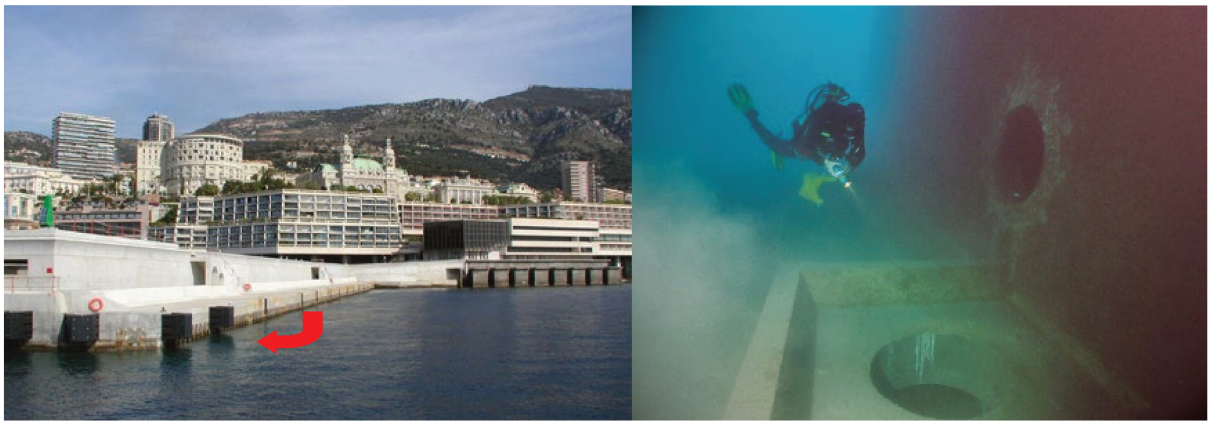


Figure 4.1 : Les grottes artificielles de Monaco

A l'intérieur de la gigantesque structure de béton, quatre types de grottes artificielles sont rencontrées : deux types relativement profondes et deux autres plus superficielles. Depuis, des plongées régulières sont réalisées dans les cavités les plus profondes qui offrent de nombreux recoins aux degrés variés de confinement et piègent de l'eau froide presque tout au long de l'année à la manière des grottes naturelles telles que celle des 3PP étudiée dans cette thèse. Ici, le gradient de confinement est vertical depuis les parages des entrées des grottes situées à 22 m jusqu'à près de 40 m au fond.

Depuis 2005, ces grottes font l'objet d'un suivi de l'installation de la biodiversité, basé notamment sur des recensements sur photoquadrats, selon la même méthode que celle employée dans le Chapitre 2. Après une installation rapide d'un contingent d'espèces, là encore dominé par des éponges, la dynamique de colonisation a considérablement ralenti. Ainsi plus de 20 ans après l'immersion de ces grottes artificielles, les communautés benthiques observées restent relativement pauvres en comparaison de celles rencontrées dans des grottes naturelles, la richesse spécifique et surtout l'abondance en macroorganismes étant beaucoup plus faibles. Dans ces conditions très contrastées par rapport à celles des grottes naturelles étudiées, il paraissait intéressant de voir ce que serait le paysage chimique et si l'on serait capable d'y retrouver la signature d'un environnement cavernicole, éventuellement marquée par les contributions chimiques de certaines des espèces présentes.

Les molécules diluées dans l'eau au voisinage des communautés d'une grotte artificielle ont été concentrées et enrichies avec l'instrument I-SMEL. En suivant le même protocole d'échantillonnage que pour les grottes naturelles, 3 captures de paysages chimiques ont été effectuées à chaque profondeur : 20 m à proximité de l'entrée et où se situe la plus forte diversité, ainsi qu'à 25 m et 35 m, où la faune fixée est presque inexistante (Figure 4.2).

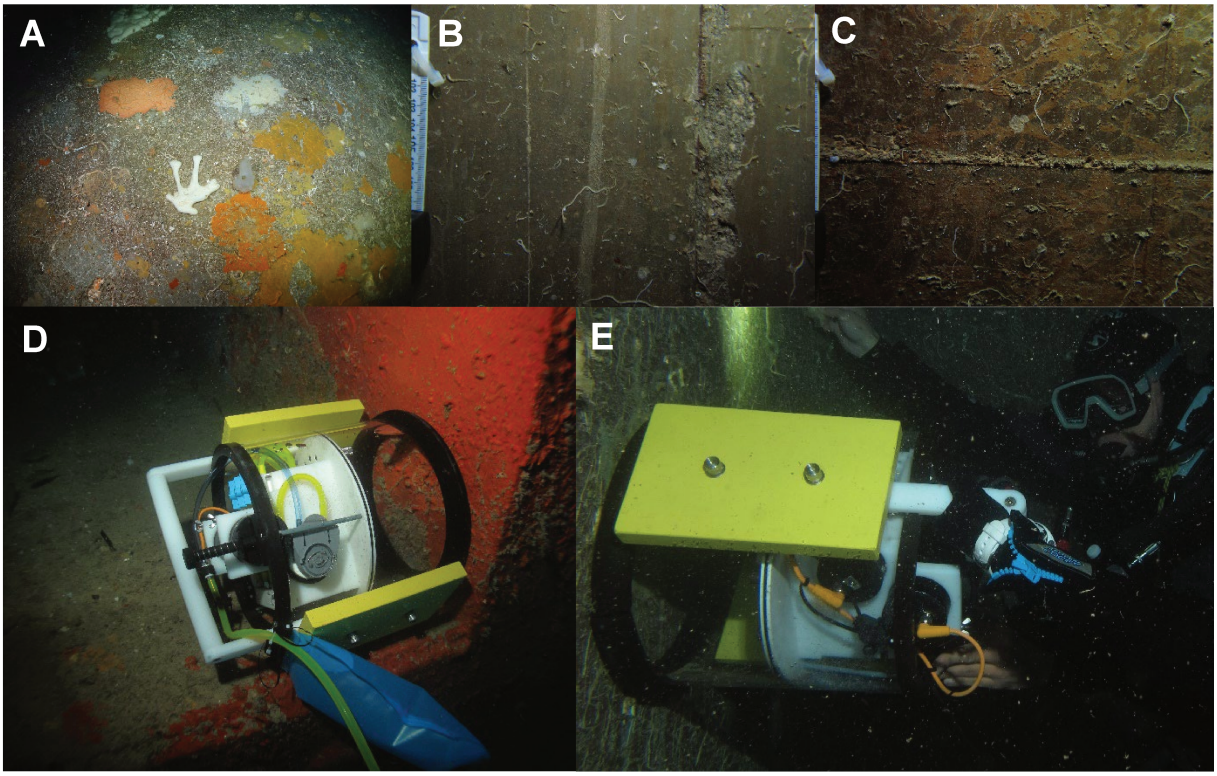


Figure 4.2 : Photos des communautés benthiques à ***(A)*** *20 m,* ***(B)*** *25 m et* ***(C)*** *35 m et déploiement d'I-SMEL pour la capture de paysages chimiques dans une grotte artificielle de Monaco.*

Au total, 9 extraits ont été préparés et leur profil chimique a été acquis par UHPLC-ESI-MS/MS. Les données métabolomiques ont été traitées de la même manière que lors des précédentes expériences.

La matrice extraite de MzMine comprend un total de 596 signaux chimiques différents distribués en fonction des niveaux de profondeurs analysés avec : 501 signaux uniquement détectés à 20 m, 442 à 25 m, et 543 signaux à 35 m. Sur la base de l'abondance moyenne de chaque signal par profondeur, une *heatmap* a été construite afin d'évaluer plus précisément la répartition hiérarchisée des signaux constituant un paysage chimique en fonction du degré de confinement (Figure 4.3A).

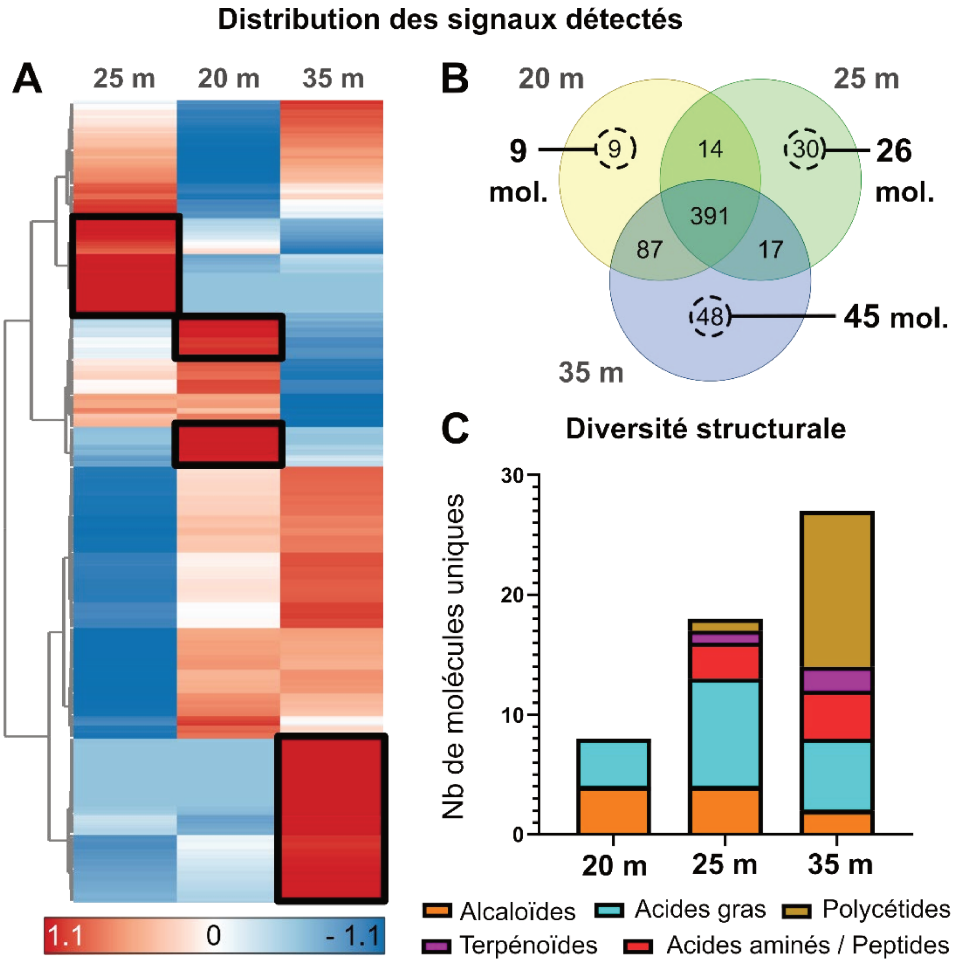


Figure 4.3 : ***(A)*** *Comparaison de la distribution des signaux chimiques (=* features*) entre les 3 profondeurs étudiées dans les grottes artificielles de Monaco (20 m, 25 m et 35 m). La* heatmap *présente l'intensité moyenne chaque signal détecté, représentée par des lignes horizontales, dans les 3 extraits d'eau de la grotte. La couleur indique l'intensité normalisée de détection pour chaque signal, sur une échelle de -1,1 à +1,1, du bleu au rouge.* ***(B)*** *Le diagramme de Venn associé présente le nombre de signaux communs ou uniques au paysage chimique de chaque profondeur de la grotte.* ***(C)*** *Les annotations spectrales* in silico *de ces signaux ont permis l'identification putative de composés, pour lesquels des classes chimiques de substances naturelles ont été attribuées avec l'outil NP Classifier pour un seuil de confiance > 50% (Kim et al., 2021). Mol. : molécules, Nb : Nombre*

La distribution et la hiérarchisation des signaux confirment des paysages chimiques différents aux trois profondeurs échantillonnées. Certains signaux semblent plus caractéristiques d'une profondeur, en comparaison des deux autres (Figure 3, encadrés noirs). Même si 391 signaux sont communs aux paysages chimiques des 3 profondeurs, chaque zone échantillonnée comprend des signaux uniques (Figure 4.3B). Une première annotation spectrale de ces signaux utilisant les résultats prédictifs de SIRIUS, suivie du regroupement des signaux (ions adduits ou fragments *in source*) appartenant au même composé, a permis d'identifier un total de 9 molécules uniquement présentes dans le paysage chimique à 20 m, 30 molécules dans celui à 25 m et 45 molécules dans celui à 35 m.

La diversité structurale de ces molécules est illustrée dans la Figure 4.3C. Sur les 9 molécules uniques du paysage chimique à 20 m, 8 molécules ont pu être assignées à une classe chimique : 4 sont des alcaloïdes et 4 autres sont des acides gras. Pour le paysage chimique à 25 m, 19 des 26 molécules uniques du paysage chimique ont été assignées à une classe chimique : la majorité (9) sont des acides gras, 4 sont des alcaloïdes, 4 sont des acides aminés et peptides et les deux derniers sont assignés aux terpénoïdes et polycétides. Concernant le paysage à 35 m, 27 des 45 molécules uniques putativement identifiées appartiendraient majoritairement aux polycétides (13 molécules), puis à des acides gras (6), et enfin à des acides aminés (4).

Par ailleurs, dans ce jeu de données, nous retrouvons la présence de 2 composés communs aux eaux de grottes de la région marseillaise (Santonja et al., 2018 ; Derrien et al., 2024a : Chapitre 5, voir l'article de ce Chapitre). Il s'agit des dérivés d'oxylipines F ($C_{18}H_{30}O_3$) et G ($C_{18}H_{34}O_5$). Le détail de leur présence et de l'annotation est donné dans le Tableau 4.1 :

Tableau 4.1 : Marqueurs d'eau de grottes trouvés dans chacune des études réalisées au sein de l'équipe (Santonja et al. 2018 ; Derrien et al., 2024a : ce chapitre). Cps = composé, FM : Formule Moléculaire, Ech. : Echantillon, Prof. : Profondeur, Fauc. : Grotte de Fauconnière, Com. : Communauté, GSO : Grotte Semi-Obscure, GO : Grotte Obscure

Santonja et al., 2018			**Chapitre 5**		**Chapitre 4**		**Etude complémentaire (Monaco)**			
Cps code	**FM**	**m/z théorique (FM)**	**Grotte**	**Ech.**	**Grotte**	**Saison & com.**	**m/z mesurée (Ion)**	**Ion (type)**	**Erreur (ppm)**	**Prof. (m)**
F	**$C_{18}H_{30}O_3$**	294.2195	Fauc. Jarre 3PP	1/6 4/6 1/4	Méjean Jarre Figuier 3PP	4 saisons GSO & GO	295.2268	$[M+H]^+$	-1.8	20 25 35
G	**$C_{18}H_{34}O_5$**	330.2406	Fauc. 3PP	1/6 1/4	Méjean Jarre Figuier 3PP	4 saisons GSO & GO	331.2483	$[M+H]^+$	-0.45	20 35

En résumé, en comparant ces résultats préliminaires à ceux de l'analyse des paysages chimiques des grottes naturelles, on peut noter que :

(1) en fonction du gradient de confinement (de 20 m à 35 m de profondeur), il y a une augmentation du nombre de signaux uniques détectés, ce qui n'était pas le cas pour les grottes naturelles. Cependant, le nombre de signaux uniques détectés à 35 m (48) est sensiblement le même que celui des 4 communautés GO (52) des grottes naturelles. La différence majeure est enregistrée à 20 m, où l'on capte seulement 9 signaux uniques contre 186 en GSO pour les grottes naturelles. Cette différence pourrait s'expliquer par la plus forte biodiversité benthique présente dans l'entrée des grottes naturelles, comparée à celle de cette cavité artificielle, et ce qui se répercuterait sur le nombre de signaux uniques.

(2) on constate une augmentation de la diversité de classes structurales entre 20 et 35 m, ce qui n'était pas le cas entre GSO et GO pour les grottes naturelles. Les résultats indiquent qu'il y a bien un effet du gradient de confinement vertical sur la diversité du paysage chimique. L'augmentation de la complexité du paysage chimique avec la profondeur a été mis en évidence dans l'océan ouvert (Zark & Dittmar, 2018), où le gradient de confinement est aussi vertical. Nous supposons donc que sous l'effet du gradient de confinement, les composés présents aux différentes profondeurs, s'accumulent vers le fond. Pendant leur transfert, ces composés sont dégradés par l'activité de minéralisation des communautés bactériennes, ce qui produit de nouveaux composés (Zark & Dittmar, 2018). Ces derniers sont de classes structurales plus diversifiées et contribuent donc à la complexification du paysage chimique au fond (Osterholz et al., 2015 ; Zark & Dittmar, 2018). Pour les grottes naturelles, l'effet du gradient de confinement (cette fois-ci horizontal) sur la diversité du paysage chimique de l'eau est le même pour les GO. Par contre en GSO, la biodiversité benthique qui est proche du monde extérieur, étant beaucoup plus développée que dans la grotte de Monaco à 20m, la complexification du paysage chimique observé relève plutôt de la contribution des espèces fixées.

(3) on observe une tendance similaire en ce qui concerne la prédominance de classes chimiques différentes entre l'entrée et le fond des grottes. Près de l'entrée des grottes, que l'on soit en GSO ou à 20 m, on retrouve davantage d'alcaloïdes qu'en GO ou qu'à 35 m, ce qui pourrait témoigner du développement de communautés benthiques de type GSO à 20 m. De l'autre côté du gradient de confinement, en GO ou à 35 m, on retrouve majoritairement des acides gras et des polycétides, ce qui n'est pas le cas en GSO ou à 20 m. Ces composés ont des formules moléculaires simples (CHO) dépourvues d'azotes, et donc participent à la faible valeur nutritive du milieu. Une augmentation du degré d'oxydation est observée pour les structures tels que les polycétides, ainsi que des dérivés d'acides gras s'accumulant à 35 m.

Dans ce contexte, on a retrouvé des composés de formules brutes identiques à celles déjà déterminées dans les eaux de grottes naturelles (Santonja et al., 2018 ; Derrien et al., 2024 : Chapitre 5, voir l'article de ce Chapitre). Ces molécules sont potentiellement des oxylipines, c'est-à-dire des formes oxydées d'acides gras initialement polyinsaturés. Ces résultats concourent à dire que ces molécules seraient plutôt stables et pourraient donc rentrer dans la composition de la DOM réfractaire à la dégradation bactérienne (Lambidis et al., 2023). A l'image de ce que l'on observait dans les grottes naturelles, mais aussi à ce qui est rapporté en milieu abyssal (Hansell, 2013), il y aurait une accumulation des composés réfractaires à l'extrémité la plus prononcée du gradient de confinement, ici à la plus grande profondeur (35 m) et en réponse au faible hydrodynamisme à l'intérieur de la structure. Ces gradients d'hydrodynamisme et d'oligotrophie, superposés à celui de la lumière, pourraient freiner l'arrivée et l'installation des larves aux profondeurs supérieures à 20 m.

En conclusion, que l'on considère le paysage chimique de grottes naturelles dont la biodiversité représente le climax de cet écosystème, ou celui de grottes artificielles dont la colonisation du substrat par la biodiversité benthique n'a démarré qu'il y a 20 ans, on observe une similarité dans la répartition de la diversité chimique structurale de l'eau de grotte selon son degré de confinement. Ce qui signifie que même à ce stade d'immaturité des communautés benthiques, on commence à retrouver la signature chimique d'un environnement cavernicole, ouvrant alors de nouvelles opportunités de compréhension du fonctionnement de ces écosystèmes à n'importe quel stade de leur évolution. En effet, la présence de marqueurs chimiques de l'habitat « Grottes sous-marines », résultant de la colonisation des parois par des espèces benthiques pionnières et résultant de la dégradation de la matière organique, semble être un stade important de « conditionnement » ou de « fonctionnalisation » de l'écosystème créé artificiellement. Bien que dans un stade bien plus avancé, il s'agit d'un processus bien connu des études du *biofouling* en milieu marin (Maki & Mitchell, 2003). On peut ainsi imaginer que ce stade permette alors l'installation de tout un contingent d'organismes mobiles cavernicoles, capables de « reconnaître » l'habitat, parmi lequel on retrouve le mysidacé *H. margalefi*.



Chapitre 5

Etude de l'influence du paysage chimique dans la reconnaissance de l'habitat de mysidacés cavernicoles

5.1. Introduction

Avant le démarrage de ma thèse, les résultats de Santonja et al. (2018) ont suggéré le rôle potentiel des métabolites libérés par les éponges dans l'orientation des mysidacés *Hemimysis margalefi*, lors de leurs migrations nycthémérales entre l'intérieur et l'extérieur des grottes. A l'aide d'un dispositif de choix en Y, ces auteurs ont évalué la réponse préférentielle des mysidacés face à de l'eau de mer conditionnée par 4 espèces d'éponges caractéristiques de la communauté GSO (Figure 5.1). Dans leur étude, les mysidacés passaient significativement plus de temps dans l'eau conditionnée par cet assemblage d'éponges que dans de l'eau de mer contrôle.

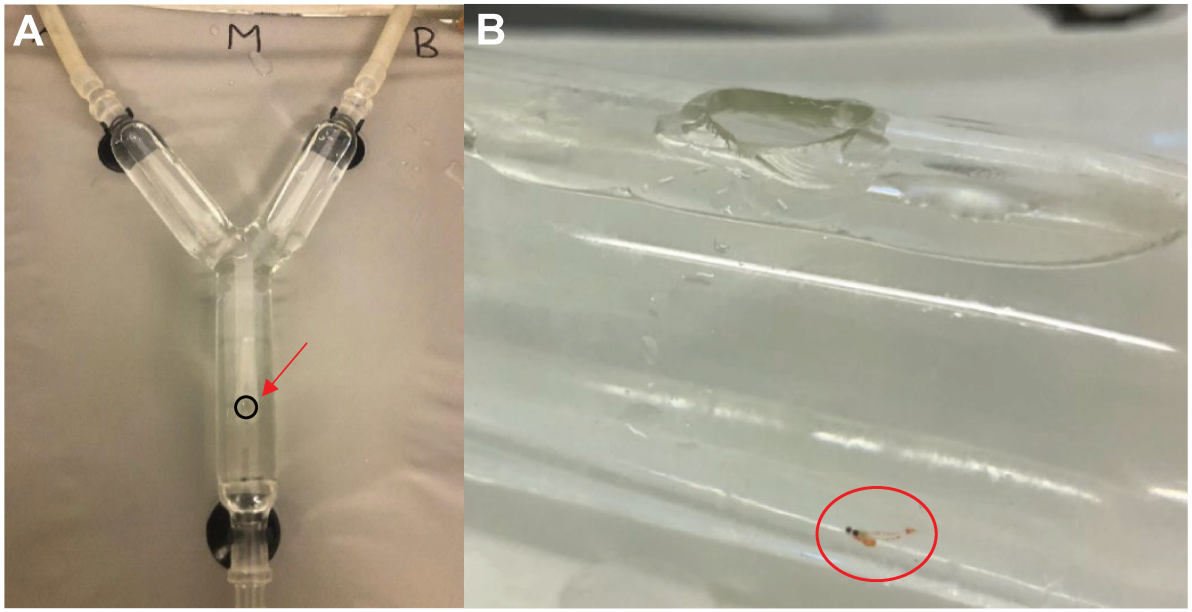


Figure 5.1 : ***(A)*** *Le dispositif de choix utilisé pour enregistrer le temps passé dans chaque bras du tube en Y par les mysidacés. Chaque bras est alimenté en amont par une condition d'eau de mer différente, réglée au même débit. La réponse comportementale des mysidacés à chacune des deux conditions est mesurée individuellement pendant 5 min. Chaque individu est inséré dans un petit trou (flèche rouge) situé en bas du compartiment de mélange.* ***(B)*** H. margalefi *dans le dispositif de choix.*

Les analyses métabolomiques par MS avaient permis de déterminer les formules moléculaires de composés susceptibles de guider les mysidacés lors de leurs migrations nocturnes. En outre, les réponses comportementales étaient plus prononcées lors des expériences matinales. Cela suggérait que les métabolites libérés par les éponges pouvaient agir comme des signaux de reconnaissance de l'habitat lorsque *H. margalefi* retourne dans sa grotte à l'aube.

Ces premiers résultats demandaient à être confirmés en testant plusieurs eaux de grottes naturelles et plusieurs populations de la même espèce de mysidacés. En croisant les conditions expérimentales, cette partie de ma thèse permettait aussi de tester une nouvelle hypothèse, celle d'un comportement de *homing* chez les mysidacés *H. margalefi*. Ainsi, on souhaitait montrer que la réponse comportementale des mysidacés face un paysage chimique complexe ne conditionnait pas seulement une simple reconnaissance de l'habitat cavernicole, mais une véritable capacité à reconnaître la signature chimique de « la maison » à partir de laquelle étaient effectuées les migrations journalières. Chaque grotte abritant des assemblages d'éponges particuliers (Grenier et al., 2018 ; Derrien et al, 2024b), on espérait lier la biodiversité benthique spécifique à chaque grotte à l'écologie des mysidacés. Par ailleurs, considérant le comportement grégaire des mysidacés (Passelaigue & Bourdillon, 1986), il était aussi concevable que des signaux chimiques émis par les conspécifiques puissent participer au paysage chimique et surtout jouer un rôle dans l'orientation d'*H. margalefi* lors de ses migrations.

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'un article publié en 2024 :

Derrien M.#, Santonja M.#, Greff S., Figueres S., Simmler C., Chevaldonné P. & Pérez T. (2024). **Circadian migrations of cave-dwelling crustaceans guided by their home chemical seascape.** *Frontiers in Marine Science*, DOI : 10.3389/fmars.2024.1448616

#co-premiers auteurs

5.2 Article : Migrations circadiennes des crustacés cavernicoles influencées par le paysage chimique de leur grotte

frontiers | Frontiers in Marine Science

TYPE Original Research
PUBLISHED 17 September 2024
DOI 10.3389/fmars.2024.1448616

Check for updates

OPEN ACCESS

EDITED BY
Elva G. Escobar-Briones,
National Autonomous University of Mexico, Mexico

REVIEWED BY
Ernesto Maldonado,
National Autonomous University of Mexico, Mexico
Marcel Jaspars,
University of Aberdeen, United Kingdom

*CORRESPONDENCE
Thierry Pérez
thierry.perez@imbe.fr

†These authors have contributed equally to this work and share first authorship

RECEIVED 13 June 2024
ACCEPTED 02 August 2024
PUBLISHED 17 September 2024

CITATION
Derrien M, Santonja M, Greff S, Figueres S, Simmler C, Chevaldonné P and Pérez T (2024) Circadian migrations of cave-dwelling crustaceans guided by their home chemical seascape. *Front. Mar. Sci.* 11:1448616. doi: 10.3389/fmars.2024.1448616

COPYRIGHT
© 2024 Derrien, Santonja, Greff, Figueres, Simmler, Chevaldonné and Pérez. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Circadian migrations of cave-dwelling crustaceans guided by their home chemical seascape

Marie Derrien†, Mathieu Santonja†, Stéphane Greff, Soizic Figueres, Charlotte Simmler, Pierre Chevaldonné and Thierry Pérez*

Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale (IMBE), UMR CNRS 7263, IRD 237, Aix Marseille Université, Avignon Université, Station Marine d'Endoume, Chemin de la batterie des lions, Marseille, France

Organisms release and detect molecules for defense, reproduction, feeding strategies and finding suitable habitats. For some migratory species, homing behavior could be related to the recognition of their home chemical fingerprint made of an assemblage of molecules from their habitat. In the marine realm, the functioning of ecosystems such as underwater caves largely depends on trophic interactions between the caves and the outside environment. A key feature of these interactions relies on the circadian migration of small crustaceans (Mysida) from the cave habitat to the open sea. Recently, it has been hypothesized that these migrations could involve chemical mediation. Behavioral experiments using a two-choice system have shown that cave mysids significantly detect cave seawater rather than a control water from the open sea. Here, we used the same experimental system to investigate habitat recognition by two populations of the cave mysid *Hemimysis margalefi*. Both populations were submitted to a choice between three distinct cave seawaters *vs.* a control seawater. Additionally, experiments tested the water preference of a non-cave mysid species (*Leptomysis* sp.) between control and cave seawaters. To evaluate whether the choice of mysids was influenced by chemical cues from conspecifics, a complementary experiment on *H. margalefi* was conducted. Results demonstrated that each studied mysids population significantly recognizes the water of its own home habitat, and that this behavior is not influenced by the occurrence of *H. margalefi*'s exudates. Mass spectrometry-based metabolomic analyses revealed that each cave seawater had a specific chemical fingerprint with only a few reproducibly detected signals belonging to different chemical classes: peptides, alkaloids, fatty acids, steroids but also inorganic molecules. Organic pollutants have also been reproducibly detected. Among the detected compounds, one oxylipin derivative and one peptide could be considered as chemical markers of the cave ecosystem. Therefore, we postulate that the chemical seascape of each cave participates to mysid circadian migrations which are analogous to a daily-based homing behavior.

KEYWORDS

marine ecology, chemical seascape, homing behavior, underwater cave, Mysida

1 Introduction

Chemical mediation is the most widely used mode of communication in the living world and is commonly considered as the "language of life" (Wyatt, 2010, 2014). Exchanges of molecules as chemical cues between organisms are involved in reproduction, defense or feeding and therefore, significantly contribute to the organization and functioning of ecosystems (Burks and Lodge, 2002; Hay, 2009; Hentley and Wade, 2016). Pollination is one of the most famous examples of a chemosensory-mediated network of biotic interactions, plant odors thus structuring the biodiversity of a plethora of arthropods and flying vertebrates (Parachnowitsch and Manson, 2015). More generally, chemical mediation structures the spatial distribution of many animal species capable of orienting themselves within a complex mosaic of odors, often defined as a chemical landscape (Dyer et al., 2018). In the marine environment, the potential existence of a similarly complex chemical seascape, made of a great diversity of molecules transported by water currents, is highly probable. Many of these molecules originate from the metabolic activities of marine organisms. Exudated in the surrounding water, they are named exometabolites and they may carry potential signals for the whole ecosystem (Cassier et al., 2000; Mauduit et al., 2023).

Several studies highlighted that the recruitment of marine species requires the use of chemical cues. For instance, Atema et al. (2002) presented the first evidence that larval reef fishes (primarily apogonids) were able to distinguish between the chemical seascapes from the lagoon and the open ocean. Lecchini et al. (2013) also observed that several fish, crustacean and cephalopod larvae actively selected settlement habitats, assuming the use of chemical cues. The presence of conspecifics, food, the nature of the biodiversity assemblage or the healthy state of an ecosystem, all produce cues susceptible to attract juveniles to a suitable environment for settlement. For example, Coppock et al. (2013) found that juvenile reef fishes exhibited a significant preference for the water conditioned by conspecifics or by some reef-building species. Similarly, Lecchini et al. (2014) showed that various marine larvae were significantly more attracted by the chemical seascape of living corals than by that of dead colonies.

Depending on their fate (*e.g.* adsorption on particles, solubility), molecules may be transported over long distances and be perceived by chemo-sensitive organisms (Mollo et al., 2014, 2017). Lecchini et al. (2014) found that molecules emitted by corals can be transported over 2 km in the ocean and that they could be detected more than 1 km away by fish larvae searching for their recruitment habitat. Distant chemical cues also mediate habitat selection for migratory species such as salmonid fish and turtles (Stabell, 1992; Endres et al., 2016). They follow chemical corridors to accurately return to their natal habitat, a specific behavior known as homing (Scholz et al., 1976).

However, none of these pioneer studies in marine chemical ecology has addressed the chemical nature of these seascapes, influencing the behavior of many mobile marine organisms. Access to this chemical information is even more crucial as global change alters the environmental quality, and thus, putatively chemical mediation and ecosystem functioning (Munday et al., 2009; Saha et al., 2019; Wilke, 2021; Roggatz et al., 2022). Advances in mass spectrometry (MS)-based metabolomics, including data processing and spectral annotation, have improved the characterization of mixtures of unknown molecules originating from different environments, such as seawater. The knowledge gained from such analyses greatly benefits marine chemical ecology research and provides new opportunities to understand the marine ecosystem functioning (Santonja et al., 2018; Wegley Kelly et al., 2022; Mauduit et al., 2023; Nelson et al., 2023; Quinlan et al., 2023).

Underwater cave ecosystems allow working on simplified processes compared to the open sea, thus providing experimental conditions such as natural mesocosms to study chemical mediation. Of reduced size, they provide a stable environment with little or no light or water movement leading to a low food supply (Harmelin et al., 1985). Among the most successful inhabitants of marine caves, sponges (Porifera) are known to produce a great diversity of metabolites (Carroll et al., 2022), some of them being released into the environment (Ternon et al., 2016; Mauduit et al., 2022, Mauduit et al., 2023) and contributing to a complex chemical seascape. Mobile dwellers of the cave ecosystem include teleost fishes and various crustaceans, such as mysids (Crustacea: Mysida) (Rastorgueff et al., 2011). Mysids can form dense swarms with millions of individuals in a single cave (Passelaigue and Bourdillon, 1986; Coma et al., 1997; David et al., 1999).

Cave mysids including *Hemimysis* species display circadian horizontal migrations outside their caves to find food and avoid predation at night (Macquart-Moulin and Passelaigue, 1982; Passelaigue and Bourdillon, 1986; Riera et al., 1991). At the end of the night, they return from the open-sea to their cave habitat. In their study, Santonja et al. (2018) used the context of underwater marine caves to address the potential role of sponge-produced metabolites on the migratory behavior of *Hemimysis margalefi*. MS-based metabolomics led to the determination of molecular formulae of chemical cues suspected to participate in the swimming behavior of cave mysids as well as of shrimps (Crustacea: Decapoda). These compounds were found both in experimental waters potentially containing sponge exometabolites and also naturally occurring in seawater collected in an underwater cave. They were thus hypothesized as possible chemical cues guiding cave mysids during their nocturnal migrations. Furthermore, as the behavioral responses were most pronounced during morning experiments, Santonja et al. (2018) hypothesized that sponge metabolites might act as recognition cues when *H. margalefi* return to their cave at dawn. Given that each marine cave harbors an original combination of sponge assemblages (Grenier et al., 2018) and that *H. margalefi* populations display high spatial genetic structuring (Lejeusne and Chevaldonné, 2006; Rastorgueff et al., 2014), it could even be conceivable that a given *H. margalefi* population could recognize the chemical composition of its own cave water. This would constitute an interesting homing behavior (Brönmark and Hansson, 2000), a case worth of investigation.

The aim of the present study was to evaluate individual cave seawater recognition by cave-dwelling mysids and to compare the

overall chemical composition of each tested cave seawater in an attempt to correlate a choice behavior with reproducibly detected molecules. The behavioral response of different populations of two mysid species was evaluated on seawaters naturally occurring in three different underwater caves. The selected species are the cave-dwelling *H. margalefi* and a non-cave mysid, *Leptomysis* sp. living in nearby shallow water environments. Hence, the two species have contrasting ecological habits.

Previous studies highlighted the chemical influence of conspecifics on habitat selection for crustaceans such as barnacle larvae (Matsumura et al., 1998), shrimp larvae (Lecchini et al., 2017) and spiny lobsters, where sex pheromones such as conspecific urine of both sexes acted as aggregation signals (Horner et al., 2006). Considering the gregarious behavior of mysids, one might conceive that conspecific chemical signals could play a role in orienting *H. margalefi* migrations. Therefore, we also tested their choice behavior on seawater originating from aquaria where the same species of mysids were kept. To conduct the experiments, we combined the use of (i) an experimental two-choice device to assess the behavioral response of the crustaceans, and (ii) MS-based metabolomics to decipher the chemical composition of each tested seawater condition.

2 Material and methods

2.1 Study sites

The three underwater caves Fauconnière (43°9.3'N, 5°41.0'E), 3PP (43°9.8'N, 5°36.0'E) and Jarre (43°11.8'N, 5°21.9'E) are distributed from the bay of La Ciotat to the Calanques coast near Marseille (Calanques National Park, South of France). These caves are 11 to 24 m deep and harbor a specialized biodiversity where sponges dominate the sessile benthic assemblages (see Gerovasileiou and Bianchi, 2021 for a list of representative sponge species; Gerovasileiou and Bianchi, 2021). *Hemimysis* spp. populations have been well studied in these three caves (Chevaldonné and Lejeusne, 2003; Lejeusne and Chevaldonné, 2005, Lejeusne and Chevaldonné, 2006; Rastorgueff et al., 2011, 2014) and the relative abundance of *H. margalefi* is particularly high in Jarre and Fauconnière.

2.2 Behavioral experiments

Behavioral laboratory experiments were conducted using the aquarium facilities of the Marine Station of Endoume in Marseille (France).

2.2.1 Sample collection and seawater preparation

The different seawaters were collected by SCUBA diving in each of the selected underwater caves with a 20 L polyvinyl chloride tube. The experimental control seawater (Control) was collected in shallow waters (8 m depth) dominated by macrophytes such as *Posidonia oceanica* and devoid of any characteristic cave benthic organisms. Hence, this control, collected nearby the Marine Station (43°16.80'N, 5°20.95'E), was expected to harbor a totally different chemical composition.

Hemimysis margalefi individuals were collected by SCUBA diving in the Jarre and Fauconnière caves. Although the 3PP cave seawater was collected and used as a "generic" cave water, different from either Jarre or Fauconnière cave waters, *H. margalefi* were not harvested in 3PP because of the risk to mistake them with a very similar species (*H. speluncola*) co-occurring in that cave. Indeed, only an examination under a dissecting microscope can tell them apart, which would cause a significant stress to each individual. *Leptomysis* sp. individuals were sampled from the shallow waters adjacent to the Marine Station. Prior to the experiments, the three mysid populations were kept separately in aquaria, under a controlled circadian cycle, and fed with *Artemia salina* nauplii every 2 days.

To prepare the seawater conditioned by *H. margalefi*, individuals from Jarre were maintained in a 30 L aerated tank during 24 h in order to enrich seawater with the products of their metabolic activities, herein called exometabolites (*H. margalefi* seawater).

2.2.2 Chemosensory experiments

A Y-shaped glass flume providing a two-channel choice system was set up to assess the crustacean behavioral response when faced with two different seawaters (see Santonja et al. (2018) for more details). Two 10 L tanks were connected to the flume by pipes, creating a constant gravity-driven flow of 50 mL min^{-1} in the Y-channels. The mysids were introduced at the downstream end of the apparatus, where they were free to remain or to swim towards and select one of the two channels connected to the tanks. Each assay was performed with a single specimen which was maintained for a 1 –min acclimation period followed by a 5–min testing period. During the test, the position of the mysid in the downstream compartment or in the right/left channels was recorded at 5-sec intervals. After each test, the flume was emptied and rinsed with the Control water. The seawater treatments were then switched between the two-channel system, preventing any memory effect due to previously tested seawater or any system bias. After that switch, the entire assay was repeated with new individuals, each individual being used in a single assay. The time (in seconds) spent by the individual in each of the three compartments of the flume (*i.e.* the downstream compartment and the two channels) was recorded.

A total of 286 mysid individuals were tested, in 9 experiments (Table 1) conducted both in the morning (7 – 11 AM) and in the afternoon (2 – 6 PM) in order to encompass the daily variability of the crustacean response to the seawater treatments.

2.3 Metabolomic analyses

Prior to each chemosensory experiment, a volume of 500 mL of seawater was collected from the aquarium tanks for the metabolomic analyses. These water samples were passed

10.3389/fmars.2024.1448616

TABLE 1 Details of the 9 behavioral experiments conducted with different combinations of seawaters, mysid species and populations. Numbers of tested individuals per experiment are also given.

Tested waters	Species	Population	Number of individuals
Jarre *vs* Control	*H. margalefi*	Jarre	32
3PP *vs* Control	*H. margalefi*	Jarre	34
Fauconnière *vs* Control	*H. margalefi*	Jarre	32
Jarre *vs* Control	*H. margalefi*	Fauconnière	30
3PP *vs* Control	*H. margalefi*	Fauconnière	35
Fauconnière *vs* Control	*H. margalefi*	Fauconnière	30
Jarre *vs* Control	*Leptomysis* sp.	Marine Station	31
Fauconnière *vs* Control	*Leptomysis* sp.	Marine Station	25
H. margalefi seawater *vs* Control	*H. margalefi*	Jarre	37

successively through 0.45 μm pore-sized filters (polyamide 47 mm, Sartorius®) and octadecyl-bonded silica extraction discs (Empore™ C_{18} 47 mm SPE discs, Sigma-Aldrich®) to obtain their particulate and dissolved phases. The filters were extracted for particulate phase (or eluted for dissolved phase) with 10 mL of methanol (anhydrous grade, Carlo Erba®). The extracts were then concentrated to dryness and frozen at -20 °C for 24 hours to precipitate salts. Supernatant of each extract was dissolved in 1 mL methanol (MS grade, Carlo Erba®) and filtered on 0.2 μm polytetrafluoroethylene (PTFE) luer-lock filters (13 mm, Restek®) (Supplementary S1.1 for further details). A total of 67 samples were prepared for LC-MS analysis (Table 2).

Ultra-High-Performance Liquid Chromatography coupled to High-Resolution Mass Spectrometer (UHPLC-HR-MS) analyses were performed using a Dionex Ultimate 3000 system equipped with an autosampler and connected to a quadrupole Time of Flight (qToF) mass spectrometer equipped with an electrospray ionization interface (Bruker Impact II) to record mass spectra in the positive and negative modes (see Supplementary S1.2 for detailed methods). Chromatographic separation was achieved using Kinetec® Phenylhexyl column (150 × 2 mm, 1.7 µm, Thermo Scientific) at 0.5 $mL.min^{-1}$ flow rate using a linear elution gradient of water: acetonitrile (Carlo Erba®, LC/MS grade) with 0.1% formic acid (Carlo Erba®, LC/MS grade) from 95:5 (v:v, isocratic from 0 to 2 min) to 0:100 in 8 min (v:v, isocratic from 10 to 13 min) with a return to initial conditions from 13.01 to 17 min. The injected volume was set to 1 µL. The mass spectrometer parameters were set as follows: nebulizer sheath gas, N^2 (3.5 bar); dry gas, N^2 (12 $L.min^{-1}$); capillary temperature, 200 °C; capillary voltage, 2500 V in positive mode and 3000 V in negative mode; end plate offset, 500 V; collision gas, N^2; collision energy, 4 eV. Data were acquired at 2 Hz in the 50 to 1200 m/z range in full scan mode. For MS/MS acquisitions the collision energy was set at 20 eV. Two independent analytical sequences were injected: the first one aimed at highlighting metabolic differences between the control and the cave seawaters (N extracts = 67, 2 groups were compared) without trying to annotate chemical signals and a second sequence included only the three cave seawater samples (N extracts = 31, 3 groups were compared) in order to evaluate difference in their chemical composition and annotate cave-specific and reproducibly-detected chemical features.

Following the two UHPLC-HR-MS data acquisitions of seawaters, two different feature detection methods were performed (see detailed methods in Supplementary S1.3).

Files for the cave seawater comparisons were converted into the open format *.mzXML using MSConvert (Proteowizard version 3.0.23332) (Chambers et al., 2012). Positive and negative modes were separately processed on MZmine 3.9 (Schmid et al., 2023) for data matrix generation.

TABLE 2 Details of cave and control seawater extracts per condition used in the metabolomic analyses.

Seawater conditions	Number of samples	Extracted fraction	Total number of extracts
Control	18	Particulate + Dissolved	36
Jarre	6	Particulate + Dissolved*	11
3PP	4	Particulate + Dissolved	8
Fauconnière	6	Particulate + Dissolved	12

Here is presented the number of samples, types of generated extracts and the total number of extracts per seawater conditions. *one dissolved extract was missing for Jarre.

2.4 Multivariate data analyses

Multivariate analyses were performed with the combined feature lists resulting from both acquisition modes. Dissolved and particulate fractions of extracts were combined for analysis keeping the sample origin for each feature. The combined list was imported on MetaboAnalyst 5.0 (Pang et al., 2022). Data were log-transformed and Pareto-scaled (*i.e.* mean-centered and divided by the square root of the standard deviation of each variable). Partial-Least Square Discriminant Analyses (PLS-DA) were conducted to preview the disparity of the chemical composition of samples for each group of seawater sample. Associated to the PLS-DA, permutation tests ($1E^4$ permutations, PLS-DA models, based on a double cross-validation, outer loop = 30 or 7-fold cross-validation, and inner loop = 21 or 6-fold cross-validation) was performed and followed by *post hoc* permutational pairwise test (Hervé, 2021). The generated Classification Error Rate (CER, 0 – 100%) was calculated to estimate the strength of group differentiation: a CER close to zero suggests a low error rate, thus testifying of a high group separation.

The CER associated *p*-value gives an information on the level of confidence obtained on the CER value.

2.5 Molecular networking and analysis of chemical diversity

The two feature lists acquired from positive and negative acquisitions, the feature quantification tables (csv file format) and the corresponding lists of MS^2 spectra (mgf file format) were exported from MZmine 3.9 for Feature Based Molecular Networking on the GNPS platform (https://gnps.ucsd.edu) (Nothias et al., 2020). Positive and negative networks were then gathered on the same platform using the "merge network polarity" workflow (ppm tolerance: 10 and RT tolerance: 0.18 min).

The resulting network was visualized and interpreted using Cytoscape 3.8.2 (Shannon et al., 2003), where each chemical feature corresponding to a MS^2 spectrum is represented by a node (Supplementary S5). By using the Cytoscape filter tab, we determined the number of features detected in each cave seawater (*e.g.* column filter: cave, number of nodes containing "3PP") to have a first overview of the chemical diversity.

To delineate the chemical fingerprint of each cave seawater, we counted the features reproducibly detected in all samples of each cave seawater. SIRIUS software was used to blindly annotate the features using standard parameters (Dührkop et al., 2019). Then, a manual check of these annotations based on MS^1/MS^2 spectra was performed using the Bruker DataAnalysis 5.0 software to verify and correct the first automatic SIRIUS annotations. Annotations received a Confidence Level (CL) according to Schymanski et al. (2014): When a putative structural identification could be proposed for the selected features after manual inspection, feature received a confidence level 2b or 3 (several possible structural candidates). When only a chemical formula was provided, a confidence level 4 was given. If several features referred to the same molecule, these features were counted as a single compound. The INCHI of each proposed putative structure was used for the assignment of structural class based on natural biosynthesis pathway predictions from NPClassifier web interface (Kim et al., 2021). However, NP Classifier was not employed for inorganic salts (see SI S6.4) and substances suspected to be pollutants (*e.g.* Dialkyl phosphate).

Chemical class of each annotated molecule were given and bar plots were built to represent the chemical diversity of reproducible molecules specific to each cave.

2.6 Statistical analyses of chemosensory results

For each of the nine experiments (Table 1), paired *t*-tests (or paired Wilcoxon tests when normality and homoscedasticity conditions were not met) were performed to compare the time spent in each of the two upstream channels (control *vs* cave seawater) in order to assess the differences between the selected seawaters. The time spent in the downstream compartment was removed from the data because it symbolized the mixing chamber of the two upper stream channels and not a choice made by the mysids.

Two-sample *t*-tests (or Mann-Whitney when normality and homoscedasticity conditions were not met) were performed to compare the time spent in the channels between morning and afternoon, in order to evaluate whether mysid residence duration was affected by the time of day.

3 Results

3.1 Behavioral experiments

In all conducted experiments in the Y channels, the time spent by all tested mysid populations was not affected by the time of the day (morning *vs* afternoon, Supplementary S2.1; S2.2; S2.3). Thus, the following results present all individual replicates of a given experiment without considering any specific time of the day exposure.

3.1.1 Residence times of *H. margalefi* and *Leptomysis* sp. subjected to cave seawaters

Hemimysis margalefi from Jarre cave significantly spent more time in the cave seawater collected in its own cave, staying 16 times longer in this channel, than in the control channel (Figure 1A). In contrast, *H. margalefi* from Jarre cave demonstrated no significant preference for cave seawaters relative to the control when the channel was filled with Fauconnière or 3PP cave seawaters (Figures 1B, C).

Hemimysis margalefi from Fauconnière cave also stayed longer in the cave seawater collected in its own cave, but this behavioral response was less pronounced as the individuals stayed only 3 times longer in this channel than in the control channel (Figure 2A). Finally, *H. margalefi* from Fauconnière cave were non-responsive to the two other cave seawaters compared to the controls (Figures 2A, C).

In contrast, the non-cave mysid *Leptomysis* sp. significantly spent more time in the control channel, staying respectively 4 and 7 times longer in this channel than in the channels filled with Jarre or Fauconnière cave seawaters (Figures 3A, B).

3.1.2 Residence times of *H. margalefi* from Jarre subjected to conspecific-conditioned seawater

Hemimysis margalefi from Jarre did not show significant preference for seawater supposed to contain its conspecific exometabolites (Figure 4).

3.2 Seawater chemical compositions

Untargeted MS-based metabolomic analyses were performed upon noticing a significant time spent in a cave seawater in order to compare the chemical composition of seawater conditions and possibly, identify molecules that could be involved in the observed behavior. As no difference in residence time was

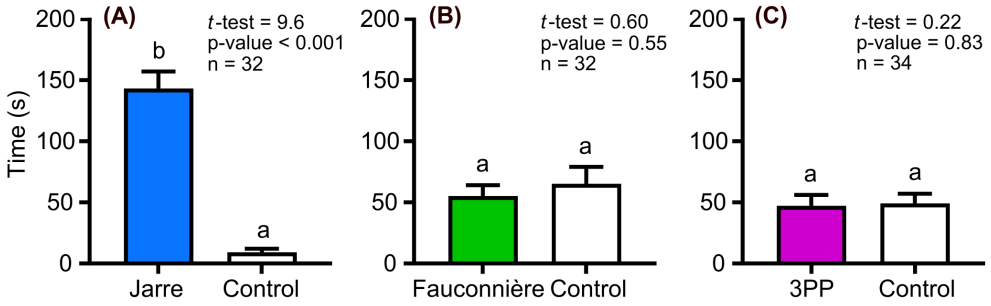


FIGURE 1
Residence time of *Hemimysis margalefi* from Jarre cave subjected to: **(A)** Jarre cave seawater *vs* Control, **(B)** Fauconnière cave seawater *vs* Control and **(C)** 3PP cave seawater *vs* Control. Results are mean time ± Standard Error (SE) in seconds spent by each mysid individual in the channel filled with cave seawater (colored bar) and the control channel (white bar). Different letters indicate significant difference between treatments.

observed when *H. margalefi* were faced to the control *vs* their own seawater, metabolomic analyses were not performed on these samples.

PLS-DA results (Supplementary S3) comparing the chemical composition of the control seawater to those of the three cave seawaters showed that cave seawaters significantly displayed a different chemical fingerprint compared to control [Classification Error Rate (CER) = 2%, p-value < 0.001]. For each experiment, the tested seawater conditions were chemically different, suggesting that the recorded residence durations could be triggered by chemical signals from the selected seawater medium. As the behavioral response of *Leptomysis* sp. was used as control, we did not further characterize the chemical diversity of the control water. Thus, the following part focuses on the metabolomic comparison of the three cave seawaters.

3.2.1 Chemical diversity of the three cave seawaters

Multivariate analyses were performed and combined with annotations of recorded MS^2 spectra in order to describe and compare the chemical diversity of each cave water. A second PLS-DA (Figure 5A) was performed with data originating from a newly generated Mzmine feature containing 499 chemical signals detected in both positive (283) and negative (216) ionization modes. In this case, the chemical composition of only Jarre seawater was statistically different from the seawater of Fauconnière cave (Pairwise permutation statistical analyses, p-value = 0.0003, Supplementary Table S4), while the composition of 3PP seawater was not statistically different from the two other cave waters (Supplementary Table S4). For each cave, the composition of the particulate phases of extracts appeared distinct from the dissolved phases.

The total number of detected features was calculated for each cave seawater to initiate a comparative analysis of chemical diversity. Jarre seawater harbored the lowest number with 272 features while Fauconnière and 3PP seawaters had higher numbers with 462 and 411 respectively (Figure 5B).

In order to establish the specific chemical fingerprint of these three caves, we counted the number of reproducible features specific to each cave. Forty chemical signals were obtained and MS spectra of each of these signals were further annotated to putatively identify 20 underlying compounds, collectively organized by structural class (Figure 6).

3PP seawater harbored 3 times more reproducibly detected compounds (15) than Jarre and Fauconnière seawaters (5). The chemical composition of 3PP seawater appeared to be the most diversified, its reproducibly detected compounds belonging to 9 different structural classes. For Fauconnière and Jarre seawaters,

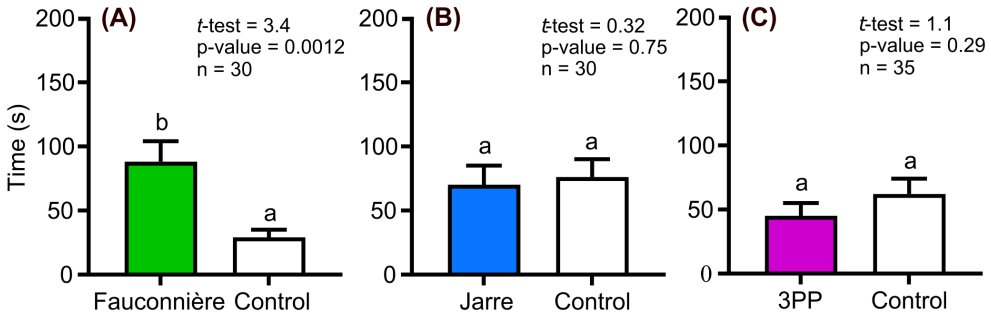


FIGURE 2
Residence time of *Hemimysis margalefi* from Fauconnière cave subjected to: **(A)** Fauconnière cave seawater *vs* Control, **(B)** Jarre cave seawater *vs* Control and **(C)** 3PP cave seawater *vs* Control. Results are mean time (± SE) in seconds spent by each mysid individual in the channel filled with cave seawater (colored bars) and the control channel (white bar). Different letters indicate significant difference between treatments.

10.3389/fmars.2024.1448616

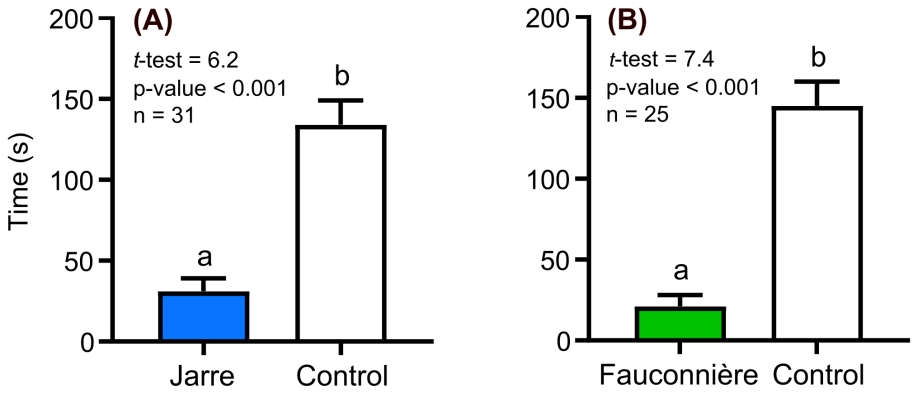


FIGURE 3
Residence time of *Leptomysis* sp. subjected to **(A)** Jarre cave seawater *vs* Control, and **(B)** Fauconnière cave *vs* Control. Results are mean time (± SE) in seconds spent by each mysid individual in the channel filled with cave seawater (colored bars) and the control channel (white bar). Different letters indicate significant difference between treatments.

their reproducibly detected compounds were distributed in only 4 and 2 different structural classes, respectively. For each cave seawater, more than a half of these molecules were related to either inorganic compounds or to organic pollutants (see Supplementary S6.1; S6.2; S6.3 for details). Among them, some pollutants were possibly related to surfactants (Acyl glycerols, Alkyl ethoxy sulfate), flame retardants (Dialkyl phosphates) and organic polymers such as nylon (Polyamides) and polyethylene glycol (Polymeric organic alcohol). Among the reported organic compounds that could derive from a biosynthetic origin, fatty acids were reproducibly found in the chemical signature of Jarre and 3PP. Alkaloids were detected in 3PP and Fauconnière seawaters. One peptide was reproducibly detected in Fauconnière seawater and putatively identified as cyclo(leucylleucyl). One steroid was reproducibly reported in 3PP seawater and annotated as sulfated cholesterol. MS data of these molecules and further details are available in Supplementary S6.1; S6.2; S6.3.

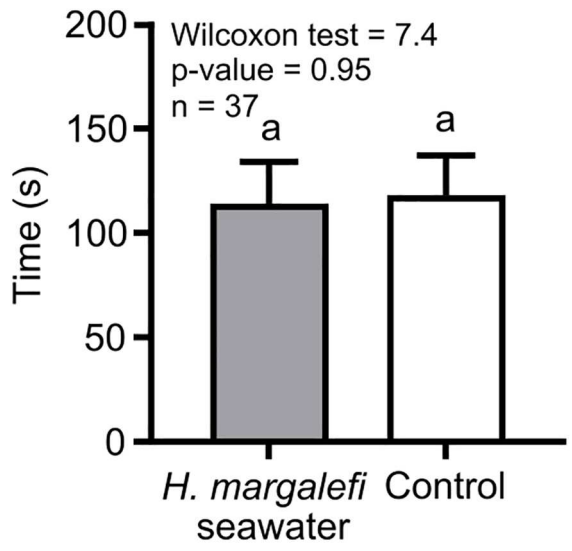


FIGURE 4
Residence times of *Hemimysis margalefi* from Jarre cave to their own conditioned seawater *vs* Control. Results are mean time (± SE) in seconds spent by each crustacean individual in the channel filled with *H. margalefi* conditioned seawater channel (grey bar) and the control channel (white bar). Same letters indicate no significant difference between treatments.

4 Discussion

Previous studies on Mediterranean caves led to the proposal of a first functioning model based on trophic exchanges (Russo and Bianchi, 2003; Rastorgueff et al., 2011, 2015). In this model, crustaceans living in dense swarms, such as mysids, are a keystone component driving organic matter transfers from the open sea to the back of the caves, thus mitigating the usual oligotrophy of the ecosystem. These horizontal migrations are similar to the vertical migrations of zooplankton (Hutchinson, 1967; Hays, 2003) and some pelagic mysid species (Viherluoto and Viitasalo, 2001) occurring at night. They navigate between the upper water column and deeper zones, a behavioral strategy to limit predation pressure while accessing to food resources (Lampert, 1993). Through their circadian migrations, whether vertical or horizontal, these small crustaceans are also vectors of organic matter supplying lower and upper levels of the trophic network (Rastorgueff et al., 2011; Kelly et al., 2019), thus playing an important role in the ecosystem functioning.

Few studies investigated the mechanisms behind the swimming behavior of cave-dwelling mysids. Previous laboratory observations (Macquart-Moulin, 1979; Bourdillon et al., 1980) showed that the movements of *H. speluncola* (a species closely related to *H. margalefi*, also found at 3PP cave) responded to light intensity. After *in-situ* experiments, Passelaigue and Bourdillon (1986) and then Riera et al. (1991) confirmed that light was the initial factor triggering the migration of *H. speluncola*. Other environmental factors could also influence the orientation (geotaxis) of migratory mysids such as temperature variation (Bourdillon and Castelbon, 1983) and current velocity (Crouau, 1986). Some studies also reported that chemical cues could influence mysid swimming

10.3389/fmars.2024.1448616

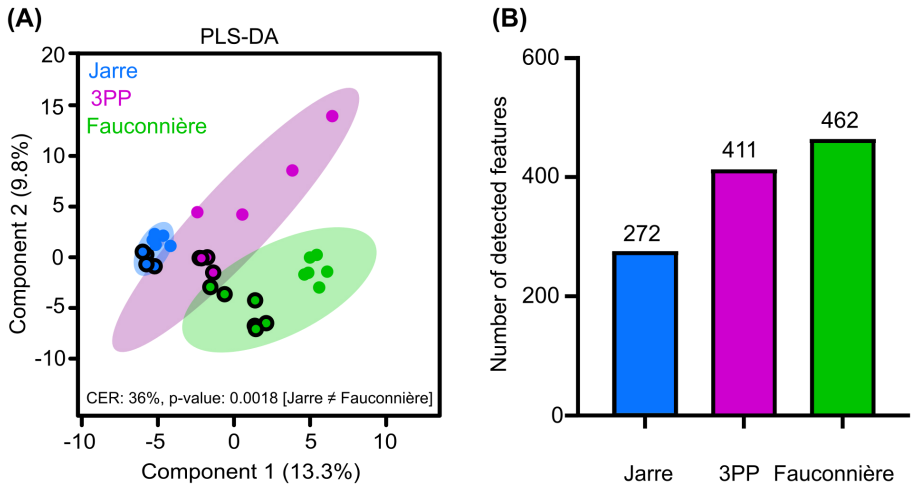


FIGURE 5
Chemical diversity of the cave seawaters. **(A)** Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) based on the chemical features detected in the different cave seawater samples analyzed by UHPLC-HRMS/MS. Differentiation between chemical fingerprints was tested using a permanova test (PPLS-DA model, $1E^4$ permutations with double-cross validation) followed by a *post-hoc* permutation pairwise test given in Supplementary Table S4. The strength of group differentiation was evaluated using the classification error rate (CER, 0 – 100%). Dots circled represent the fraction of the sample associated with the particulate extracts when remaining dots correspond to the dissolved fraction. **(B)** Number of detected features per cave.

behavior (Mauchline, 1980; Hamrén and Hansson, 1999). As chemical cues are among the main detection mechanisms involved in marine habitat recognition, notably in crustaceans (Boudreau et al., 1993; Castañeda-Fernández De Lara et al., 2005; Arvedlund and Kavanagh, 2009; Lecchini et al., 2010), it could be assumed that chemical mediation could also be involved in the habitat recognition of *H. margalefi*.

Santonja et al. (2018) tested this hypothesis in a previous study and showed that *H. margalefi* could significantly recognize a cave seawater or a seawater conditioned by syntopic cave-dwelling sponge species compared to a control seawater. This study suggested the possible involvement of recognized chemical signals from the mysid's habitat. The present study intended to further investigate whether this recognition could be considered as a homing behavior and whether each cave displayed a singular chemical seascape that could play a role.

These new series of experiments showed that a given mysid population could recognize its home cave seawater. Furthermore, they showed no preference when exposed to a seawater from a different cave and a control seawater. These results suggest that the circadian migrations of *H. margalefi*, although most likely triggered by light, could use chemical recognition to ensure that mysids return to their home cave. Such homing behavior consequently constrains genetic exchanges with individuals from other caves. The

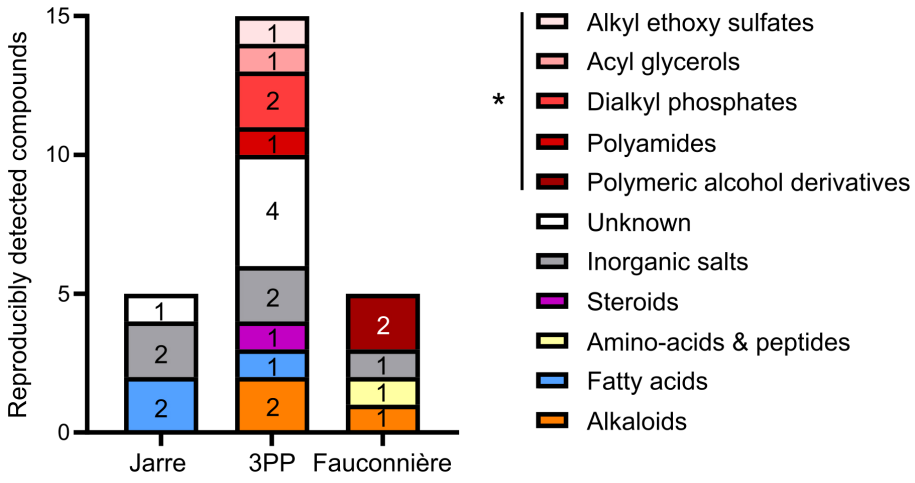


FIGURE 6
The barplots represent the chemical diversity of reproducibly detected compounds in each cave seawater. Structural classes were determined using outcomes from NP Classifier web interface, except for inorganic salts and substances suspected to be pollutants. *Compounds with a dubious biosynthetic origin possibly related to organic pollutants (*e.g.* surfactants, flame retardants).

consequences of homing behavior on the genetic structure of populations have already been demonstrated for salmons (Neville et al., 2006) and reef fishes (Gerlach et al., 2007; Salles et al., 2016) and could also contribute, in addition to parental brooding and natural habitat fragmentation, to explain the strong structuring of *H. margalefi* populations across Mediterranean caves (Lejeusne and Chevaldonné, 2006; Rastorgueff et al., 2014). To further explore the interactions between habitat recognition and genetic structuring of populations, it would be interesting to compare the behavioral responses of mysid populations with different degrees of genetic similarity (*e.g.* belonging to different caves within a single metapopulation or across genetic boundaries).

In the present study, we did not observe differences in behavioral responses between morning and afternoon, thereby suggesting that although *H. margalefi* homing must occur before daybreak, habitat chemical recognition might be independent of the time of the day. This result contrasts with those of Santonja et al. (2018) who recorded a greater capacity for habitat recognition during the morning experiments. Reproducibility of behavioral responses through time is a recurring problem in chemosensory experiments (Stamps et al., 2012; O'Neill et al., 2018; Hardege et al., 2024). Variations in time are anticipated among wild populations over the years separating our experiments. For example, microevolution in wild salmons can occur rapidly in response to global warming (Kovach, 2012; Piou and Prevost, 2013). In this sense, Kovach et al. (2012) demonstrated significant changes in genetic diversity associated to late-migration timing after only 17 generations. For *H. margalefi*, 4 cohorts are produced per year (Lejeusne and Chevaldonné, 2005), resulting in frequent turnover of the local population, which is increasingly exposed to environmental changes. This turnover may lead to small changes in the behavior of mysids, although the main migratory pattern is conserved over time.

Conspecific exometabolites in the seawater do not seem to influence the behavior of *H. margalefi* during its migrations. This result is in line with those from Lecchini et al. (2010), who showed that out of 9 studied crustaceans, 6 performed an active habitat selection for settlement without considering the presence or absence of conspecifics. They also found that in the case of conspecific attraction, visual cues are rather mobilized. These results strengthen the hypothesis of a homing behavior that could result from the detection of specific signals in the chemical seascape of their habitat.

Each of the three caves studied here harbors a specific chemical seascape. 3PP seawater is the most diverse, but also the one with the largest number of organic pollutants such as the alkyl ethoxy sulfate compound (Supplementary S6.3). This compound is a surfactant notably used as detergent and has been detected in river sediments after being released into the environment *via* wastewater (Sanderson et al., 2006). Its putative presence in the 3PP seawater samples could be explained by the proximity of the sewage outlet of La Ciotat city. Conversely, no organic pollutant was reproducibly found in Jarre, potentially because this cave, located on an island, has its entrance towards the offshore and is therefore less exposed to pollution. A few reproducibly detected compounds could derive from biological origin belonging to four chemical class: peptide, fatty acids, steroids and alkaloids. In crustaceans, peptides are reported to have signaling functions to coordinate homing and settlement (Rittschof and Cohen, 2004). Here, the peptide annotated as cyclo(leucylleucyl) has been reported in several bacterial taxa, including microbes associated with macroalgae (Anjali Das et al., 2023) but no ecological role has been associated with it so far. Lipids (Sakata et al., 1988) and steroids (Dulka et al., 1987) could also act as marine chemical cues. The sulfated fatty acid (molecular formula: $C_{32}H_{65}NO_6S$) detected in Jarre may be a sphingolipid known from *Cytophaga johnsona* (Abbanat et al., 1988), bacteria commonly found in marine environments (Reichardt et al., 1983). In 3PP seawater, the reproducibly found steroid identified as a sulfated cholesterol (molecular formula $C_{27}H_{46}O_4S$), represents a family of compound known from various benthic macroorganisms such as sea cucumbers, brittle stars (Levina et al., 1991; Makarieva et al., 1993) and sponges (Dai et al., 2010; Mioso et al., 2017). For instance, the amaroxocane B is a sulfated sterol produced by the coral reef sponge *Phorbas amaranthus* and interestingly, the Mediterranean sponge *Phorbas tenacior* is a common inhabitant of cave entrances (Grenier et al., 2018).

Santonja et al. (2018) hypothesized that 4 peptides and 4 oxylipin derivatives, potentially released by sponge holobionts, could play a major role in the habitat recognition for *H. margalefi*. In our dataset, we found 5 of these compounds, but they were neither reproducibly found (i.e. not present in all cave seawater replicates) nor specific to a particular cave (Supplementary S7), and thus did not appear in Figure 6. For instance, the peptide $C_{24}H_{44}N_4O_4$ was detected in Jarre (1/6 samples) and Fauconnière (1/6 samples) but never in 3PP seawater. Two oxylipins, $C_{18}H_{34}O_5$ and $C_{14}H_{26}O_3$, were found in 3PP (1/4 samples) and Fauconnière (1/6 samples and 3/6 samples) but never in Jarre seawater. Moreover, 2 compounds were detected in more than a half of the replicates of each of the 3 cave seawaters. The putative peptide $C_{42}H_{77}N_7O_7$ was reproducibly found in all seawater replicates of the 3 caves. The oxylipin $C_{18}H_{30}O_3$ has been detected in 3PP (1/4 samples), Fauconnière (1/6 samples) and in Jarre (4/6 samples) but below the detection intensity limit ($1E^2$, whereas the noise level for MS^1 detection was fixed at $5E^3$). These last two compounds could thus be considered as cave chemical markers. The difficulty to reproducibly find the same dissolved compound, from one sample to another, has already been reported by Mauduit et al. (2023). In their study, they suggest that possible biotransformations could take place in the seawater for some structural families. Indeed, oxylipins are polyunsaturated fatty acids, which once dissolved in the seawater, may be subject to oxidation or hydroxylation of their carbon chain.

In conclusion, the present study provides new evidence that the migratory behavior of *H. margalefi* might mostly refer to daily-based homing rather than to an occasional habitat recognition. We suggest that this behavior could be related to a specific chemical recognition which is not due to the involvement of *H. margalefi*'s exudates, but rather to the presence of a singular combination of compounds from its home habitat. Each unique chemical seascape is composed of a complex mixture of compounds belonging to different structural classes, of possible natural origin. A more precise characterization of these chemical seascapes is difficult to achieve because a majority of compounds are present in trace

amounts and the fate of the majority of biosynthesized metabolites in seawater is yet unknown. The referencing of marine structural diversity is widely documented in various molecular databases (*e.g.* Marinlit, Lotus). Accurate identification of already known molecule requires access to raw spectral data both MS and NMR. The paucity of freely available spectral data of marine natural products slow down the dereplication process (syn. Confirming the identify of already known compounds). Such identification is further complicated by seawater biotransformation that a waterborne metabolite may undergo. Freely available marine spectral databases are urgently needed to help decipher further the exometabolite composition of seawater.

Determining the origin of biosynthesized molecules and their contribution to chemical seascapes is truly crucial. The availability of new devices enabling to concentrate diluted molecules and to trace fingerprints of keystone species represent a new hope to show how chemical mediation plays a central role in marine ecosystems (Mauduit et al., 2023). In the current context of global change and major threats on marine biodiversity, any change in species composition and/or abundance (*e.g.* sponges or corals frequently subject to mortality events) is likely to impact the composition of the chemical seascape and thus marine ecosystem functioning.

Supporting information

The Supplementary Material contains further details on the experimental details for MS-based Metabolomic analyses, responses of mysids according to the time of the day (morning vs. afternoon) with detailed statistical results, Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) comparing chemical features detected in the control and cave seawater samples, detailed statistical results of PLSDA analysis of Figure 5A, the merged feature-based molecular network combining data acquired in both positive and negative modes with publicly accessible job ID, MS data of reproducible features with proposed structural classes and MS data of the compounds found in seawater from both our previous (Santonja et al., 2018) and current studies.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

Ethics statement

The manuscript presents research on animals that do not require ethical approval for their study.

Author contributions

MD: Writing – original draft, Writing – review & editing. MS: Writing – original draft, Writing – review & editing. SG: Writing – original draft, Writing – review & editing. SF: Writing – original draft. CS: Writing – original draft, Writing – review & editing. PC: Writing – original draft, Writing – review & editing. TP: Writing – original draft, Writing – review & editing.

Funding

The author(s) declare that financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article. TOTAL Foundation ANR (ANR-707 20-CE43-0003) AMIDEX Foundation (AMX-22-IN1-46).

Acknowledgments

The authors are grateful to the TOTAL Foundation, the ANR (ANR-707 20-CE43-0003) and AMIDEX Foundation (AMX-22-IN1-46) for funding our research program. We warmly thank Laurent Vanbostal for his help in collecting samples. We thank J-C. Martin (BIOMET/CRIBIOM) for home-made filter scripts used to clean metabolomic data matrix and F. Mercier for the home-made Y-shaped glass deployed in our experiment.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2024.1448616/full#supplementary-material

References

Abbanat, D. R., Godchaux, W., and Leadbetter, E. R. (1988). Surface-induced synthesis of new sulfonolipids in the gliding bacterium *Cytophaga johnsonae*. *Arch. Microbiol.* 149, 358–364. doi: 10.1007/BF00411656

Anjali Das, C. G., Ganesh Kumar, V., Dharani, G., Stalin Dhas, T., Karthick, V., Vineeth Kumar, C. M., et al. (2023). Macroalgae-associated halotolerant marine bacteria *Exiguobacterium aestuarii* ADCG SIST3 synthesized gold nanoparticles and its anticancer activity in breast cancer cell line (MCF-7). *J. Mol. Liq.* 383, 122061. doi: 10.1016/j.molliq.2023.122061

Arvedlund, M., and Kavanagh, K. (2009). "The Senses and Environmental Cues Used by Marine Larvae of Fish and Decapod Crustaceans to Find Tropical Coastal Ecosystems," in *Ecological Connectivity among Tropical Coastal Ecosystems*. Ed. I. Nagelkerken (Springer Netherlands, Dordrecht), 135–184. doi: 10.1007/978-90-481-2406-0_5

Atema, J., Kingsford, M., and Gerlach, G. (2002). Larval reef fish could use odour for detection, retention and orientation to reefs. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 241, 151–160. doi: 10.3354/meps241151

Boudreau, B., Bourget, E., and Simard, Y. (1993). Behavioural responses of competent lobster postlarvae to odor plumes. *Mar. Biol.* 117, 63–69. doi: 10.1007/BF00346426

Bourdillon, A., and Castelbon, C. (1983). Influence des variations de température sur la géotaxie de deux espèces de mysidacés. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 71, 105–117. doi: 10.1016/0022-0981(93)90067-X

Bourdillon, A., Castelbon, C., and Macquart-Moulin, C. (1980). Écophysiologie comparée des mysidacés *Hemimysis speluncola ledoyer* (Cavernicole) et *Leptomysis lingvura* G.O. Sars (non-cavernicole). L'orientation à la lumière: Tests de longue durée. Étude expérimentale des mouvements nycthéméraux. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 43, 61–86. doi: 10.1016/0022-0981(80)90147-1

Brönmark, C., and Hansson, L.-A. (2000). Chemical communication in aquatic systems: an introduction. *Oikos* 88, 103–109. doi: 10.1034/j.1600-0706.2000.880112.x

Burks, R. L., and Lodge, D. M. (2002). Cued in: Advances and opportunities in freshwater chemical ecology. *J. Chem. Ecol.* 28, 1901–1917. doi: 10.1023/A:1020785525081

Carroll, A. R., Copp, B. R., Davis, R. A., Keyzers, R. A., and Prinsep, M. R. (2022). Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 39, 1122–1171. doi: 10.1039/D1NP00076D

Cassier, P., Descoins, C., and Bohatier, J. (2000). *Communication chimique et environnement: les relations animales intraspécifiques et interspécifiques* (Paris: Belin).

Castañeda-Fernández De Lara, V., Butler, M., Hernández-Vázquez, S., Guzmán Del Próo, S., and Serviere-Zaragoza, E. (2005). Determination of preferred habitats of early benthic juvenile California spiny lobster, *Panulirus interruptus*, on the Pacific coast of Baja California Sur, Mexico. *Mar. Freshw. Res.* 56, 1037. doi: 10.1071/MF04284

Chambers, M. C., Maclean, B., Burke, R., Amodei, D., Ruderman, D. L., Neumann, S., et al. (2012). A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nat. Biotechnol.* 30, 918–920. doi: 10.1038/nbt.2377

Chevaldonné, P., and Lejeusne, C. (2003). Regional warming-induced species shift in north-west Mediterranean marine caves. *Ecol. Lett.* 6, 371–379. doi: 10.1046/j.1461-0248.2003.00439.x

Coma, R., Carola, M., Riera, T., and Zabala, M. (1997). Horizontal transfer of matter by a cave-dwelling mysid. *Mar. Ecol.* 18, 211–226. doi: 10.1111/j.1439-0485.1997.tb00438.x

Coppock, A. G., Gardiner, N. M., and Jones, G. P. (2013). Olfactory discrimination in juvenile coral reef fishes: Response to conspecifics and corals. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 443, 21–26. doi: 10.1016/j.jembe.2013.02.026

Crouau, Y. (1986). Étude du comportement rhéotaxique d'un Mysidacé Cavernicole. *Crustac* 50, 7–10. doi: 10.1163/156854085X00026

Dai, J., Sorribas, A., Yoshida, W. Y., Kelly, M., and Williams, P. G. (2010). Topsentinols, 24-isopropyl steroids from the marine sponge *Topsentia* sp. *J. Nat. Prod.* 73, 1597–1600. doi: 10.1021/np100374b

David, P. M., Guerin-Ancey, O., and Van Cuyck, J. P. (1999). Acoustic discrimination of two zooplankton species (mysid) at 38 and 120kHz. *Deep Sea Res.* 46, 319–333. doi: 10.1016/S0967-0637(98)00064-8

Dührkop, K., Fleischauer, M., Ludwig, M., Aksenov, A. A., Melnik, A. V., Meusel, M., et al. (2019). SIRIUS 4: A rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. *Nat. Methods* 16, 299–302. doi: 10.1038/s41592-019-0344-8

Dulka, J. G., Stacey, N. E., Sorensen, P. W., and Kraak, G. J. V. D. (1987). A steroid sex pheromone synchronizes male–female spawning readiness in goldfish. *Nature* 325, 251–253. doi: 10.1038/325251a0

Dyer, L. A., Philbin, C. S., Ochsenrider, K. M., Richards, L. A., Massad, T. J., Smilanich, A. M., et al. (2018). Modern approaches to study plant–insect interactions in chemical ecology. *Nat. Rev. Chem.* 2, 50–64. doi: 10.1038/s41570-018-0009-7

Endres, C. S., Putman, N. F., Ernst, D. A., Kurth, J. A., Lohmann, C. M. F., and Lohmann, K. J. (2016). Multi-modal homing in sea turtles: modeling dual use of geomagnetic and chemical cues in island-finding. *Front. Behav. Neurosci.* 10. doi: 10.3389/fnbeh.2016.00019

Gerlach, G., Atema, J., Kingsford, M. J., Black, K. P., and Miller-Sims, V. (2007). Smelling home can prevent dispersal of reef fish larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 858–863. doi: 10.1073/pnas.0606777104

Gerovasileiou, V., and Bianchi, C. N. (2021). "Mediterranean Marine Caves: A Synthesis of Current Knowledge," in *Oceanography and Marine Biology*. Ed. S. J. Hawkins, et al (CRC Press, Boca Raton, FL), 1–87. doi: 10.1201/9781003138846-1

Grenier, M., Ruiz, C., Fourt, M., Santonja, M., Dubois, M., Klautau, M., et al. (2018). Sponge inventory of the French Mediterranean waters, with an emphasis on cave-dwelling species. *Zootaxa*, 4466, 205–228. doi: 10.11646/zootaxa.4466.1.16

Hamrén, U., and Hansson, S. (1999). A mysid shrimp *(Mysis mixta)* is able to detect the odour of its predator *(Clupea harengus)*. *Ophelia* 51, 187–191. doi: 10.1080/00785326.1999.10409408

Hardege, J. D., Fletcher, N., Burnett, J. W., Ohnstad, H., and Bartels-Hardege, H. D. (2024). Bioassay complexities exploring challenges in aquatic chemosensory research. *Front. Ecol. Evol.* 11. doi: 10.3389/fevo.2023.1293585

Harmelin, J.-G., Vacelet, J., and Vasseur, P. (1985). Les grottes sous-marines obscures: un milieu extrême et un remarquable biotope refuge. *Téthys* 1, 214–229.

Hay, M. E. (2009). Marine chemical ecology: chemical signals and cues structure marine populations, communities, and ecosystems. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 1, 193–212. doi: 10.1146/annurev.marine.010908.163708

Hays, G. C. (2003). A review of the adaptive significance and ecosystem consequences of zooplankton diel vertical migrations. *Hydrobiologia* 503, 163–170. doi: 10.1023/B:HYDR.0000008476.23617.b0

Hentley, W. T., and Wade, R. N. (2016). "Global Change, Herbivores and Their Natural Enemies," in *Global Climate Change and Terrestrial Invertebrates*. Eds. S. N. Johnson and T. H. Jones (Wiley, New York), 177–200. doi: 10.1002/9781119070894.ch10

Hervé, M. (2021). *Aide-mémoire de statistique appliquée à la biologie - Construire son étude et analyser les résultats à l'aide du logiciel R*. Accessed December 13, 2021. Available online at: https://www.maximeherve.com/r-et-statistiques.

Horner, A. J., Nickles, S. P., Weissburg, M. J., and Derby, C. D. (2006). Source and specificity of chemical cues mediating shelter preference of Caribbean spiny lobsters (*Panulirus argus*). *Biol. Bull.* 211, 128–139. doi: 10.2307/4134587

Hutchinson, G. E. (1967). *A treatise on limnology: Introduction to lake biology and the limnoplankton* (New York: Wiley).

Kelly, T. B., Davison, P. C., Goericke, R., Landry, M. R., Ohman, M. D., and Stukel, M. R. (2019). The importance of mesozooplankton diel vertical migration for sustaining a mesopelagic food web. *Front. Mar. Sci.* 6. doi: 10.3389/fmars.2019.00508

Kim, H. W., Wang, M., Leber, C. A., Nothias, L.-F., Reher, R., Kang, K. B., et al. (2021). NPClassifier: A deep neural network-based structural classification tool for natural products. *J. Nat. Prod.* 84, 2795–2807. doi: 10.1021/acs.jnatprod.1c00399

Kovach, R. P. (2012). *Salmonid phenology, microevolution, and genetic diversity in a warming Alaskan stream* (University of Alaska: ProQuest Dissertations Publishing). Available at: https://go.exlibris.link/9x0ZhrpY.

Kovach, R. P., Gharrett, A. J., and Tallmon, D. A. (2012). Genetic change for earlier migration timing in a pink salmon population. *Proc. Biol. Sci.* 279, 3870–3878. doi: 10.1098/rspb.2012.1158

Lampert, W. (1993).Ultimate causes of diel vertical migration of zooplankton: New evidence for the predator-avoidance hypothesis. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* 39, 79–88. Available online at: https://pure.mpg.de/pubman/faces/ViewItemOverviewPage.jsp?itemId=item_1508686.

Lecchini, D., Dixson, D. L., Lecellier, G., Roux, N., Frédérich, B., Besson, M., et al. (2017). Habitat selection by marine larvae in changing chemical environments. *Mar. pollut. Bull.* 114, 210–217. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.08.083

Lecchini, D., Mills, S. C., Brié, C., Maurin, R., and Banaigs, B. (2010). Ecological determinants and sensory mechanisms in habitat selection of crustacean postlarvae. *Behav. Ecol.* 21, 599–607. doi: 10.1093/beheco/arq029

Lecchini, D., Miura, T., Lecellier, G., Banaigs, B., and Nakamura, Y. (2014). Transmission distance of chemical cues from coral habitats: implications for marine larval settlement in context of reef degradation. *Mar. Biol.* 161, 1677–1686. doi: 10.1007/s00227-014-2451-5

Lecchini, D., Waqalevu, V., Parmentier, E., Radford, C., and Banaigs, B. (2013). Fish larvae prefer coral over algal water cues: implications of coral reef degradation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 475, 303–307. doi: 10.3354/meps10094

Lejeusne, C., and Chevaldonné, P. (2005). Population structure and life history of *Hemimysis margalefi* (Crustacea: Mysidacea), a thermophilic cave-dwelling species benefiting from the warming of the NW Mediterranean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 287, 189–199. doi: 10.3354/meps287189

Lejeusne, C., and Chevaldonné, P. (2006). Brooding crustaceans in a highly fragmented habitat: the genetic structure of Mediterranean marine cave-dwelling mysid populations. *Mol. Ecol.* 15, 4123–4140. doi: 10.1111/j.1365-294X.2006.03101.x

Levina, E. V., Fedorov, S. N., Stonik, V. A., Andriyashchenko, P. V., Kalinovskii, A. I., and Isakov, V. V. (1991). Steroid compounds from ophiuroids II. Sulfated steroids from

Ophiura sarsi and *Ophiura leptoctenia*. *Chem. Nat. Compd.* 26, 408–411. doi: 10.1007/BF00598993

Macquart-Moulin, C. (1979). Écophysiologie comparée des Mysidacés *Hemimysis speluncola ledoyer* (cavernicole) et *Leptomysis lingvura* G.O. Sars (non-cavernicole). L'orientation à la lumière: Tests ponctuels. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 38, 287–299. doi: 10.1016/0022-0981(79)90073-X

Macquart-Moulin, C., and Passelaigue, F. (1982). Mouvements nychtéméraux d'*Hemimysis speluncola Ledoyer*, espèce cavernicole, et de *Leptomysis lingvura* GO Sars, espèce non-cavernicole (Crustacea, Mysidacea). *Tethys* 10, 221–228.

Makarieva, T. N., Stonik, V. A., Kapustina, I. I., Boguslavsky, V. M., Dmitrenoik, A. S., Kalinin, V. I., et al. (1993). Biosynthetic studies of marine lipids. 42. Biosynthesis of steroid and triterpenoid metabolites in the sea cucumber *Eupentacta fraudatrix*. *Steroids* 58, 508–517. doi: 10.1016/0039-128X(93)90026-J

Matsumura, K., Nagano, M., and Fusetani, N. (1998). Purification of a larval settlement-inducing protein complex (SIPC) of the barnacle, *Balanus amphitrite*. *J. Exp. Zool.* 281, 12–20. doi: 10.1002/(ISSN)1097-010X

Mauchline, J. (1980). "The biology of mysids and euphausids," in *Advances in marine biology*, ed. J. H. S. Blaxter, F. S. Russell and Yonge. (London: Academic Press) 3–369.

Mauduit, M., Greff, S., Herbette, G., Naubron, J.-V., Chentouf, S., Huy Ngo, T., et al. (2022). Diving into the Molecular Diversity of Aplysina cavernicola's Exometabolites: Contribution of Bromo-Spiroisoxazoline Alkaloids. *ACS Omega* 7, 43068–43083. doi: 10.1021/acsomega.2c05415

Mauduit, M., Derrien, M., Grenier, M., Greff, S., Molinari, S., Chevaldonné, P., et al. (2023). *In situ* capture and real-time enrichment of marine chemical diversity. *ACS Cent. Sci.* 9, 2084–2095. doi: 10.1021/acscentsci.3c00661

Mioso, R., Marante, F., Bezerra, R., Borges, F., Santos, B., and Laguna, I. (2017). Cytotoxic compounds derived from marine sponges. A revierevіew, (2010–2012). *Molecules* 22, 208. doi: 10.3390/molecules22020208

Mollo, E., Fontana, A., Roussis, V., Polese, G., Amodeo, P., and Ghiselin, M. T. (2014). Sensing marine biomolecules: smell, taste, and the evolutionary transition from aquatic to terrestrial life. *Front. Chem.* 2. doi: 10.3389/fchem.2014.00092

Mollo, E., Garson, M. J., Polese, G., Amodeo, P., and Ghiselin, M. T. (2017). Taste and smell in aquatic and terrestrial environments. *Nat. Prod. Rep.* 34, 496–513. doi: 10.1039/C7NP00008A

Munday, P. L., Dixson, D. L., Donelson, J. M., Jones, G. P., Pratchett, M. S., Devitsina, G. V., et al. (2009). Ocean acidification impairs olfactory discrimination and homing ability of a marine fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 1848–1852. doi: 10.1073/pnas.0809996106

Nelson, C. E., Wegley Kelly, L., and Haas, A. F. (2023). Microbial interactions with dissolved organic matter are central to coral reef ecosystem function and resilience. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 15, 431–460. doi: 10.1146/annurev-marine-042121-080917

Neville, H. M., Isaak, D. J., Dunham, J. B., Thurow, R. F., and Rieman, B. E. (2006). Fine-scale natal homing and localized movement as shaped by sex and spawning habitat in Chinook salmon: insights from spatial autocorrelation analysis of individual genotypes. *Mol. Ecol.* 15, 4589–4602. doi: 10.1111/j.1365-294X.2006.03082.x

Nothias, L.-F., Petras, D., Schmid, R., Dührkop, K., Rainer, J., and Sarvepalli, A. (2020). Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. *Nat Methods* 17, 905–908. doi: 10.1038/s41592-020-0933-6

O'Neill, S. J., Williamson, J. E., Tosetto, L., and Brown, C. (2018). Effects of acclimatisation on behavioural repeatability in two behaviour assays of the guppy *Poecilia reticulata*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 72, 166. doi: 10.1007/s00265-018-2582-7

Pang, Z., Zhou, G., Ewald, J., Chang, L., Hacariz, O., Basu, N., et al. (2022). Using MetaboAnalyst 5.0 for LC–HRMS spectra processing, multi-omics integration and covariate adjustment of global metabolomics data. *Nat. Protoc.* 17, 1735–1761. doi: 10.1038/s41596-022-00710-w

Parachnowitsch, A. L., and Manson, J. S. (2015). The chemical ecology of plant-pollinator interactions: recent advances and future directions. *Curr. Opin. Insect Sci.* 8, 41–46. doi: 10.1016/j.cois.2015.02.005

Passelaigue, F., and Bourdillon, A. (1986). Distribution and circadian migrations of the cavernicolous mysid *Hemimysis speluncola Ledoyer*. *Stygologia* 2, 112–118.

Piou, C., and Prévost, E. (2013). Contrasting effects of climate change in continental vs. oceanic environments on population persistence and microevolution of Atlantic salmon. *Glob. Change Biol.* 19, 711–723. doi: 10.1111/gcb.12085

Quinlan, Z. A., Bennett, M.-J., Arts, M. G. I., Levenstein, M., Flores, D., Tholen, H. M., et al. (2023). Coral larval settlement induction using tissue-associated and exuded coralline algae metabolites and the identification of putative chemical cues. *Proc. R. Soc B.* 290, 20231476. doi: 10.1098/rspb.2023.1476

Rastorgueff, P.-A., Bellan-Santini, D., Bianchi, C. N., Bussotti, S., Chevaldonné, P., Guidetti, P., et al. (2015). An ecosystem-based approach to evaluate the ecological quality of Mediterranean undersea caves. *Ecol. Indic.* 54, 137–152. doi: 10.1016/j.ecolind.2015.02.014

Rastorgueff, P.-A., Chevaldonné, P., Arslan, D., Verna, C., and Lejeusne, C. (2014). Cryptic habitats and cryptic diversity: unexpected patterns of connectivity and phylogeographical breaks in a Mediterranean endemic marine cave mysid. *Mol. Ecol.* 23, 2825–2843. doi: 10.1111/mec.12776

Rastorgueff, P., Harmelin-Vivien, M., Richard, P., and Chevaldonné, P. (2011). Feeding strategies and resource partitioning mitigate the effects of oligotrophy for marine cave mysids. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 440, 163–176. doi: 10.3354/meps09347

Reichardt, W., Gunn, B., and Colwell, R. R. (1983). Ecology and taxonomy of chitinoclastic *Cytophaga* and related chitin-degrading bacteria isolated from an estuary. *Microb. Ecol.* 9, 273–294. doi: 10.1007/BF02097742

Riera, T., Zabala i Limousin, M., and Peñuelas, J. (1991). Mysids from a submarine cave emerge each night to feed. *Sci. Mar.* 55, 605–609.

Rittschof, D., and Cohen, J. H. (2004). Crustacean peptide and peptide-like pheromones and kairomones. *Peptides* 25, 1503–1516. doi: 10.1016/j.peptides.2003.10.024

Roggatz, C. C., Saha, M., Blanchard, S., Schirrmacher, P., Fink, P., Verheggen, F., et al. (2022). Becoming nose-blind—Climate change impacts on chemical communication. *Glob. Change Biol.* 28, 4495–4505. doi: 10.1111/gcb.16209

Russo, G. F., and Bianchi, C. N. (2003). "Organizzazione trofica," in *Grotte Marine: Cinquant'Anni di Ricerca in Italia*. Ed. F. Cicogna, et al (Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio, Rome), 313–320.

Saha, M., Berdalet, E., Carotenuto, Y., Fink, P., Harder, T., John, U., et al. (2019). Using chemical language to shape future marine health. *Front. Ecol. Environ.* 17, 530–537. doi: 10.1002/fee.2113

Sakata, K., Sakura, T., and Ina, K. (1988). Algal phagostimulants for marine herbivorous gastropods. *J. Chem. Ecol.* 14, 1405–1416. doi: 10.1007/BF01020144

Salles, O. C., Pujol, B., Maynard, J. A., Almany, G. R., Berumen, M. L., Jones, G. P., et al. (2016). First genealogy for a wild marine fish population reveals multigenerational philopatry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 13245–13250. doi: 10.1073/pnas.1611797113

Sanderson, H., Price, B. B., Dyer, S. D., De Carvalho, A. J., Robaugh, D., Waite, S. W., et al. (2006). Occurrence and hazard screening of alkyl sulfates and alkyl ethoxysulfates in river sediments. *Sci. Total Environ.* 367, 312–323. doi: 10.1016/j.scitotenv.2005.11.021

Santonja, M., Greff, S., Le Croller, M., Thomas, O. P., and Pérez, T. (2018). Distance interaction between marine cave-dwelling sponges and crustaceans. *Mar. Biol.* 165, 121. doi: 10.1007/s00227-018-3377-0

Schmid, R., Heuckeroth, S., Korf, A., Smirnov, A., Myers, O., Dyrlund, T. S., et al. (2023). Integrative analysis of multimodal mass spectrometry data in MZmine 3. *Nat. Biotechnol.* 41, 447–449. doi: 10.1038/s41587-023-01690-2

Scholz, A. T., Horrall, R. M., Cooper, J. C., and Hasler, A. D. (1976). Imprinting to chemical cues: the basis for home stream selection in salmon. *Science* 192, 1247–1249. doi: 10.1126/science.1273590

Schymanski, E. L., Jeon, J., Gulde, R., Fenner, K., Ruff, M., Singer, H. P., et al. (2014). Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: communicating confidence. *Environ. Sci. Technol.* 48, 2097–2098. doi: 10.1021/es5002105

Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., et al. (2003). Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 13, 2498–2504. doi: 10.1101/gr.1239303

Stabell, O. B. (1992). "Olfactory control of homing behaviour in salmonids," in *Fish Chemoreception*. Ed. T. J. Hara (Springer Netherlands, Dordrecht), 249–270. doi: 10.1007/978-94-011-2332-7_12

Stamps, J. A., Briffa, M., and Biro, P. A. (2012). Unpredictable animals: individual differences in intraindividual variability (IIV). *Anim. Behav.* 83, 1325–1334. doi: 10.1016/j.anbehav.2012.02.017

Ternon, E., Zarate, L., Chenesseau, S., Croué, J., Dumollard, R., Suzuki, M. T., et al. (2016). Spherulization as a process for the exudation of chemical cues by the encrusting sponge *C. crambe*. *Sci. Rep.* 6, 29474. doi: 10.1038/srep29474

Viherluoto, M., and Viitasalo, M. (2001). Effect of light on the feeding rates of pelagic and littoral mysid shrimps: a trade-off between feeding success and predation avoidance. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 261, 237–244. doi: 10.1016/S0022-0981(01)00277-5

Wegley Kelly, L., Nelson, C. E., Petras, D., Koester, I., Quinlan, Z. A., Arts, M. G. I., et al. (2022). Distinguishing the molecular diversity, nutrient content, and energetic potential of exometabolomes produced by macroalgae and reef-building corals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 119, e2110283119. doi: 10.1073/pnas.2110283119

Wilke, C. (2021). Climate change could alter undersea chemical communication. *ACS Cent. Sci.* 7, 1091–1094. doi: 10.1021/acscentsci.1c00819

Wyatt, T. D. (2010). Pheromones and signature mixtures: defining species-wide signals and variable cues for identity in both invertebrates and vertebrates. *J Comp Physiol A* 196, 685–700. doi: 10.1007/s00359-010-0564-y

Wyatt, T. D. (2014). Pheromones and animal behavior: chemical signals and signatures. New York: Cambridge University Press.

Supporting Information

Table of Contents

S1. Experimental details for MS-based metabolomic analyses ---------- 3

S1.1 Sample preparation ---------- 3

S1.2 Data acquisition ---------- 3

S1.3 Feature detection methods ---------- 4

S2. Response of mysid populations according to the time of day (morning *vs*. afternoon) 5

S2.1 *Hemimysis margalefi*'s behavior ---------- 5

S2.2 *Leptomysis* sp.'s behavior ---------- 5

S2.3 Response of *H. margalefi* to their own conditioned seawater ---------- 6

S3. Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) comparing chemical fingerprints of the control and cave seawater samples. ---------- 7

S4. Post-hoc permutational pairwise tests related to PLS-DA analysis of Figure 5a ------ 8

S5. Merged Feature Based Molecular Network (FBMN) ---------- 9

S6. MS data of reproducible features with proposed structural classes ---------- 10

Table S6.1 Fauconnière ---------- 10

Table S6.2 Jarre ---------- 12

Table S6.3 3PP ---------- 14

S6.4 Detection of the Mg-salt and inorganic compounds ---------- 18

S7. Putative peptides and oxylipins found in seawater from both our previous (Santonja et al. 2018) and current studies ---------- 20

S1. Experimental details for MS-based metabolomic analyses

S1.1 Sample preparation

The polyamide filter was conditioned with two successive volumes of 10 mL of H_2O at very low vacuum and kept wet until the sample was deposited. Samples were passed through the filter under vacuum. Each filter was then placed in a 20 mL glass vial with 10 mL of methanol (Sigma-Aldrich) and was sonicated (35 kHz) for 5 min for particulate extraction. The filter was then removed from the vial and discarded while the solvent was evaporated to dryness in an evaporator concentrator (SpeedVac^{TM} Thermosavant, SPD111V). The dried particulate extract was solubilized in 1 mL of MeOH MS grade and stored in a freezer (-20 °C) for 24 h to precipitate salts.
The C_{18} extraction disc was washed with 10 mL of MeOH under vacuum and dried at higher vacuum for 1 min. The disc was then conditioned with two successive volumes of 10 mL of H_2O at very low vacuum and kept wet until the sample was deposited. Samples initially passed through polyamide filters were filtered on the C_{18} disc under vacuum. After filtration, the discs were dried under high vacuum for 5 min to reach complete dryness and metabolites were eluted with 10 mL of MeOH. This elution step was then repeated twice with 5 mL of MeOH. The solvent containing the total organic extract was evaporated to dryness, and the resulting dried extract was solubilized in 1 mL of MeOH MS-grade and stored in the freezer (-20 °C) for 24 h to induce salt precipitation.
The supernatant of each extract (*i.e.* particulate and dissolved phases) was filtered on 0.2 μm PTFE luer-lock filters (13 mm, Restek®) and then transferred to 2 mL vials for UHPLC-HRMS analyses.

S1.2 Data acquisition

UHPLC-MS metabolomic analyses were performed on a Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 UHPLC system equipped with a diode array detector and connected to an electrospray-ionisation-quadrupole time-of flight (ESI-Q-TOF) IMPACT II mass spectrometer (software Bruker OtofControl version 4.1). Chromatographic separation was achieved using Kinetec® Phenylhexyl column (150 × 2 mm, 1.7 μm, Thermo Scientific) at 0.5 mL.min^{-1} flow rate using a linear elution gradient of water:acetonitrile (Carlo Erba®, LC/MS grade) with 0.1% formic acid (Carlo Erba®, LC/MS grade) from 95:5 (v:v, isocratic from 0 to 2 min) to 0:100 in 8 min (v:v, isocratic from 10 to 13 min) with a return to initial conditions from 13.01 to 17 min. The injected volume was set to 1 μL. The mass spectrometer parameters were set as follows: nebulizer sheath gas, N_2 (3.5 bar); dry gas, N_2 (12 L.min^{-1}); capillary temperature, 200 °C; capillary voltage, 2500 V in positive mode and 3000 V in negative mode; end plate offset, 500 V; collision gas, N_2; collision energy, 4 eV. Data were acquired at 2 Hz in the 50 to 1200 *m/z* range in full scan mode. Extracts were randomly injected to compensate any memory effect on the column and time dependent MS drift. Pooled samples injected every 6 samples from the beginning to the end of the series were used for further ion filtering. For MS/MS acquisitions the collision energy was set at 20 eV. Mass spectrometer was calibrated before the analysis sequence and for each sample with a solution of formic acid (25 μL)/acetic acid (75 μL) in 50 mL isopropanol/H_2O (1:1 v:v) with 0.5 mL NaOH 1 M forming formate/acetate clusters along the mass range.

S1.3 Feature detection methods

***MS^1** data processing with XCMS: First overview of data distribution*

Following the UHPLC-HRMS data acquisition, constructor files were converted into the netCDF file format to process data in centroid mode with XCMS (Smith et al. 2006) on R software (3.6.3). The XCMS approach involved peak picking and integration, chromatogram alignment to avoid retention time deviation, peak grouping for identification between samples and, finally, peak filling to avoid missing values in chromatograms. XCMS generated a matrix (ions/retention time × sample) that was exported on Microsoft Excel. Data were normalized according to injection order to consider possible MS drift with time. Home-made scripts were then used to clean the data matrix, removing 1) ions detected in MeOH (includes all ions with a mean intensity ratio in MeOH *vs* pooled samples > 10), 2) ions presenting a mean intensity variation above 20% in pooled samples, and 3) ions with same retention time presenting correlated intensities in pooled samples (threshold = 0.8) to clean the matrix from isotopes, adducts and multiple-charged ions. The final matrix harbors 2777 features loaded on MetaboAnalyst platform for data analysis.

***MS^2** data processing with MZmine 3.9: Evaluation of chemodiversity*

Following the UHPLC-HRMS/MS data acquisition of seawater treatments, constructor files were converted into the open format *.mzXML using MSConvert (Proteowizard) (Chambers et al., 2012). Positive and negative modes were separately processed on MZmine 3.9 (Schmid et al., 2013) for feature detection as follows: (1) mass detection (centroid, MS^1, noise level 5E3, and MS^2 noise level 0), (2) ADAP chromatogram builder (Myers et al., 2017) (1 scan, group intensity threshold 5E3, minimum highest intensity 5E3, *m/z* tolerance 10 parts per million (ppm), (3) chromatogram resolving (ADAP feature resolver: minimum peak height 8E3, peak duration range 0-10 min, Retention Time (RT) range for MS^2 scan pairing 0.18 min, (4) isotopic grouper (13C isotope filter: *m/z* tolerance 10 ppm, RT tolerance 0.18 min, maximum charge: 2, representative isotope most intense), (5) join aligner (*m/z* tolerance 10 ppm, weight for *m/z* 75%, weight for RT 25%, RT tolerance 0.18 min), (6) gap-filling (intensity tolerance 0.1, *m/z* tolerance 5 ppm, RT tolerance 0.18, minimum scan: 1) , (7) feature list blank subtraction (MeOH sample, min scan of detection: 1), (8) feature list rows filter (minimum aligned features: 2, RT 0.4 - 16.0 min, and keep only peaks with MS^2 scans). The final matrix harbors 499 features loaded on GNPS and MetaboAnalyst platforms for data analysis.

S2. Response of mysid populations according to the time of day (morning *vs.* afternoon)

S2.1 *Hemimysis margalefi*'s behavior

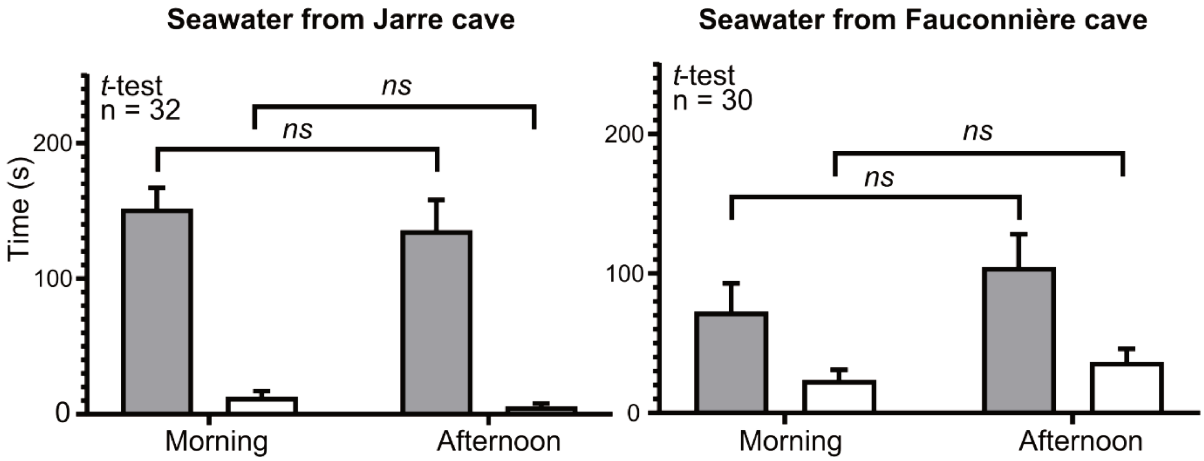


Figure S2.1. Results are mean time (± SE) in seconds spent by each mysid in the channel filled with their own cave seawater (grey) and the control seawater channel (white). Two-sample t-tests were performed to compare the time spent in the cave seawater channels between morning and afternoon. *ns* = no significant difference

S2.2 *Leptomysis* sp.'s behavior

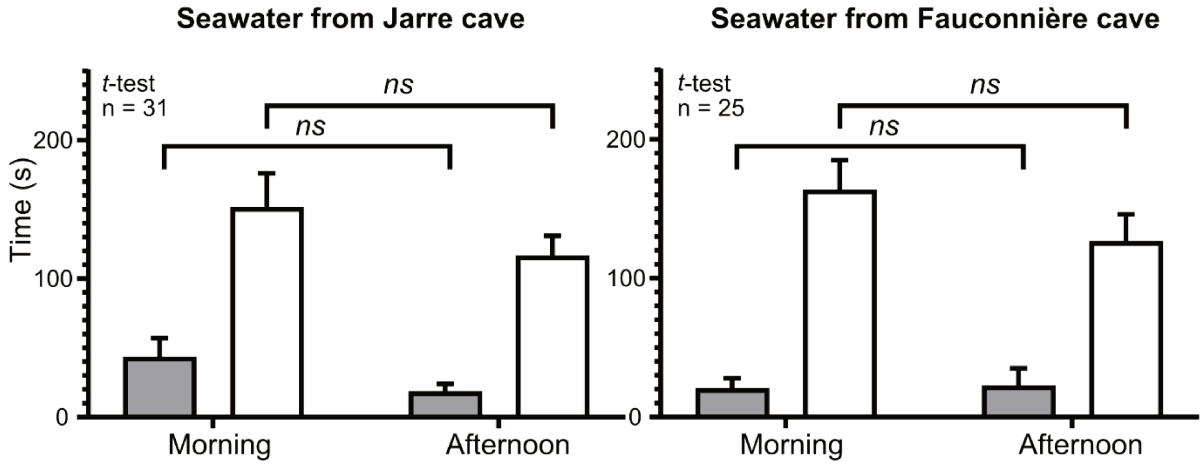


Figure S2.2. Results are mean time (± SE) in seconds spent by each mysid in the channel filled with cave seawater (grey) and the control channel (white). Two-sample t-tests were performed to compare the time spent in the control channels between morning and afternoon. *ns* = no significant difference

S2.3 Response of *H. margalefi* to their own conditioned seawater

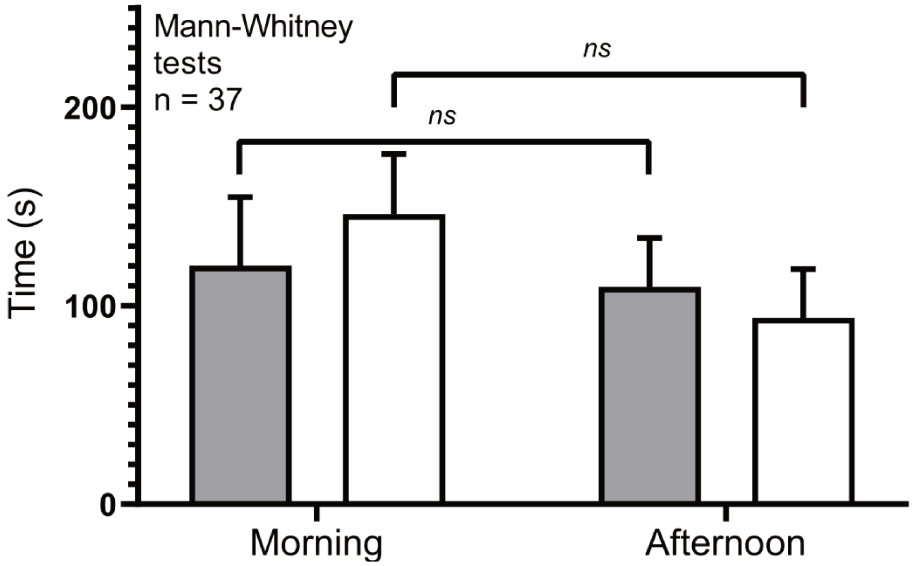


Figure S2.3. Response of *H. margalefi* to their own conditioned seawater *vs* control seawater during the morning and the afternoon. Results are mean time (± SE) in seconds spent by each mysid individual in the channel filled with *H. margalefi* conditioned seawater channel (grey) and the control channel (white). Two-sample Mann-Whitney tests were performed to compare the time spent in the control channels between morning and afternoon. *ns* = no significant difference

S3. Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) comparing chemical fingerprints of the control and cave seawater samples.

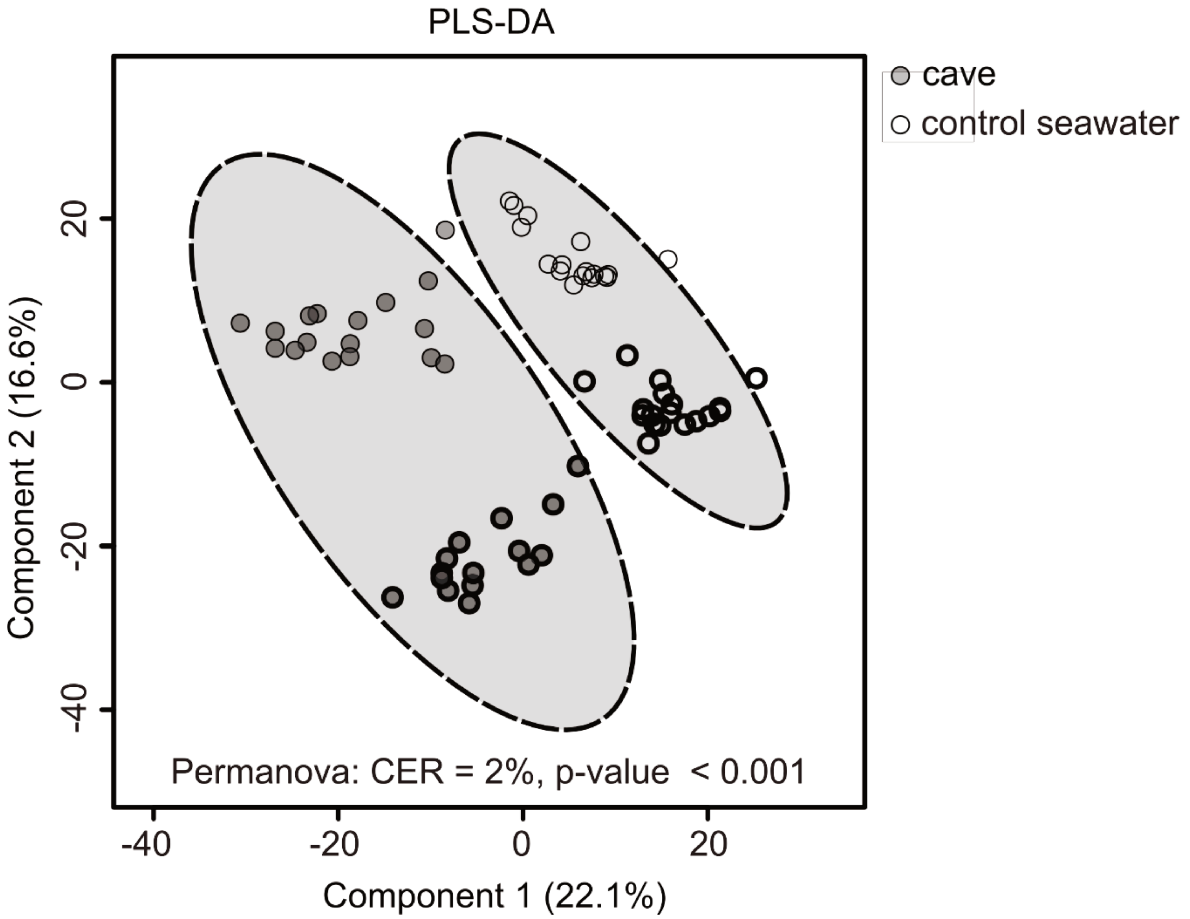


Figure S3. Scores plot of the PLS-DA comparing chemical fingerprints of the control and cave seawater samples analyzed by UHPLC-HRMS/MS. A permanova test (PPLS-DA models, $1E^4$ permutations with double-cross validation, $k_{out} = 30$, $k_{in} = 29$) was performed to evaluate the differentiation between chemical fingerprints. Data were auto-scaled and log transformed. The classification error rate (CER, 0 – 100 %, with the associated *p*-value) was calculated to estimate the strength of group differentiation. Dots with bold borders represent the samples from the particulate fraction whereas the others are related to the dissolved fraction

S4. Post-hoc permutational pairwise tests related to PLS-DA analysis of Figure 5a

Values in the table represent the *p*-value of pairwise permutation test with FDR (false discovery rate) adjustment ($1E^4$ permutations, model: PPLS-DA, based on a double cross-validation, outer loop = 7-fold cross-validation and inner loop = 6-fold cross-validation), *p*-value adjustment method: fdr) testing differences between cave seawater metabolomic fingerprints. Significant *p*-values (< 0.05) are indicated in bold.

	3PP	Fauconnière
Fauconnière	0.4742	-
Jarre	0.0927	**0.0003**

S5. Merged Feature Based Molecular Network (FBMN)

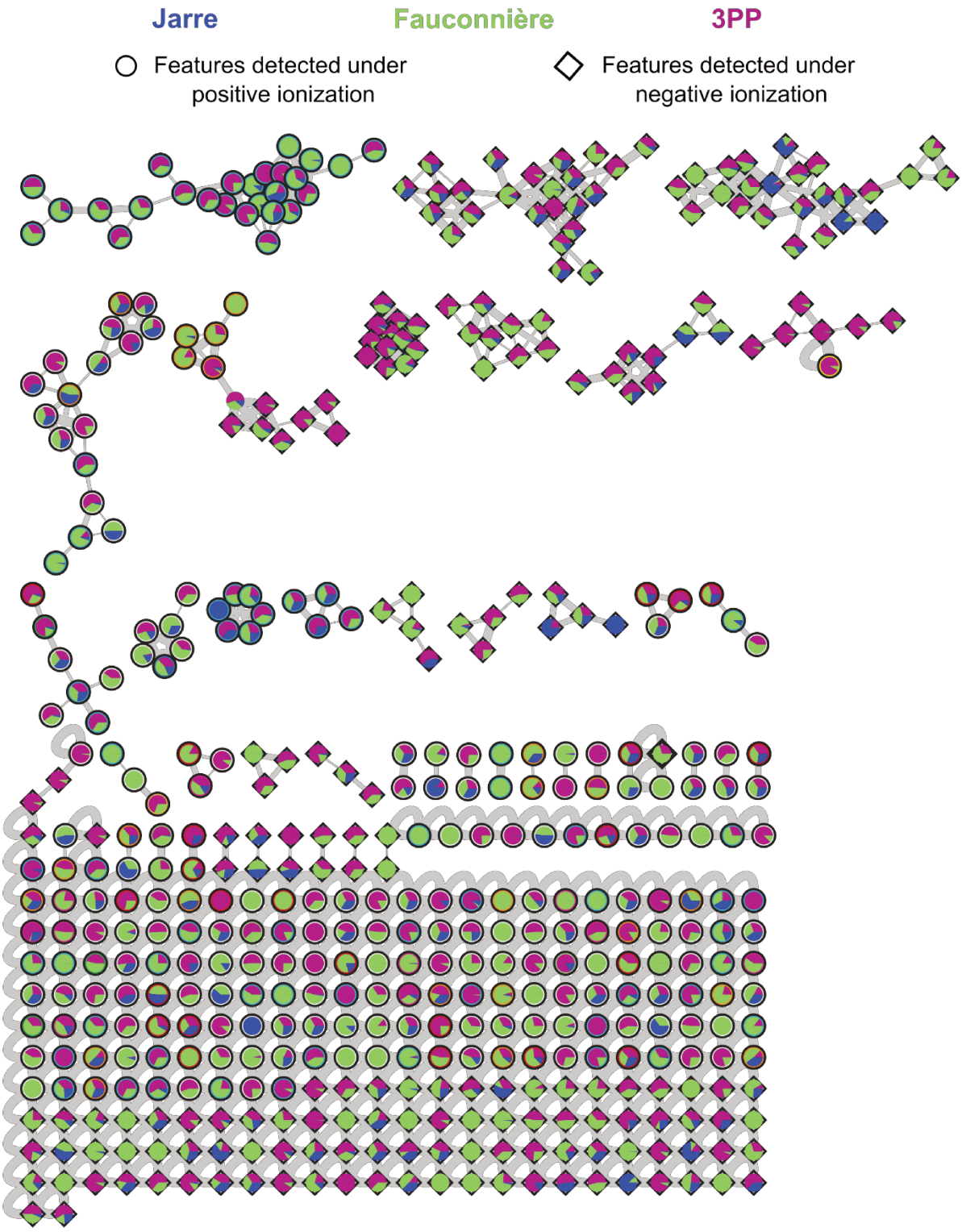


Figure S5. Feature-based molecular network with positive and negative merged features containing 216 nodes in negative mode and 283 in positive mode (available in: https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=0f87436bf7c6424782aa0603eb2bd1f5. These nodes are organized in 237 spectral families. The edge width is proportional to the cosine score (0 - 1) indicating similarities in the fragmentation patterns of MS^2 spectra of the different features. Two identical spectra are linked by an edge with a cosine score of 1.

S6. MS data of reproducible features with proposed structural classes

- Shared name is manually composed with the ionization mode coupled to the feature number (determined by the MZmine treatment and retrieved in the GNPS jobs). Shared names identify nodes in the GNPS Feature Based Molecular Network. For features detected under positive ionization: https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=4ced2c0d866c44f1bb56cbe7343d6406 and for negative ionization: https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=91dd8d9750644a03849d3403486f7579
- Values of ion exact mass (*m/z*) and Retention Time (RT) are value generated from the MZmine matrix and could be retrieved on GNPS.
- Manuals annotations and major MS^2 fragments and their relative intensities were defined in Bruker DataAnalysis using raw data (.d)
- The molecular formulae assignments were performed using three successive criteria:
  (1) the error (calculated in ppm), corresponding to difference between a calculated m/z ion formula and the measured m/z. This error should be minimal and ideally below 5 ppm.
  (2) among the best proposed molecular formulae associated with the minimal error, we analyzed the isotopic pattern of each proposed molecular ion compared to the measured one.
  (3) We then analyzed the fragmentation for each MS2 spectrum and determined the ion formula of each fragment and the neutral loss formula. Such analyses led us to narrow down the list of proposed molecular formulae and in some cases, propose a putative structure.
- For two different adducts of the same chemical compound, the fragment intensities are only indicated for the feature colored in blue.
- Annotations received a Confidence Level (CL) according to Schymanski et al. (2014): when a putative structural identification could be proposed for the selected features after manual inspection, feature received a confidence level 2b or 3 (several structural candidates possible). When only a chemical formula was provided, a confidence level 4 was given.

Table S6.1 Fauconnière

#	Shared name	RT (min)	*m/z* meas.	*m/z* calc.	Error (ppm)	Ion Type	MS^2 fragments & intensities	Ion or Molecular formula	Chemical class	Annotation	CL
1	negative-19	0.78	152.884	150.8861	-1.3	Isotope of 150.884	92.9280 100 94.9251 42.5	$[Cl_3Na_2]^-$	Inorganic salts	Sodium chloride salt	3
2	positive-47 positive-48	3.32 3.33	227.1759 249.1577	227.1760 249.1579	- 0.2 - 0.8	$[M + H]^+$ $[M + Na]^+$	55.0548 3.4 83.0859 6.2 100.1127 100 209.1656 9.7	$C_{12}H_{22}N_2O_2$	Small Peptides	Cyclo (leucylleucyl)	2b

							227.1762 108.0814 134.0606 150.0919 164.0717 174.0920 192.1026	8.4 1.4 0.8 9.0 0.8 1.1 100			
3	positive-56	4.9	192.1024	192.1025	- 0.3	$[M + H]^+$			$C_{11}H_{13}NO_2$	Alkaloid	Dihydro-quinoline derivative	3
4	positive-205	10.27	350.3271	350.3270	- 0.3	IS-Fragment of $[M + NH_4]^+$	57.0699 71.0854 85.1009 89.0594 103.0386 103.0751 107.0702 119.0699 133.0857 151.0962 165.0755 333.2989	34.1 39.3 29.4 43.1 32.6 35.4 24.4 34 17.7 100 17.7 18.9	$C_{19}H_{40}O_4$	Polymeric organic alcohol derivative	Possibly Synthetic PEG coupled with carbon long chain	3
5	positive-222	10.65	369.2979	369.2981	- 0.5	IS-Fragment of $[M + Na]^+$	57.0697 71.0854 85.1012 89.0596 107.0701 113.0960 133.0857 151.0963 177.1108 195.1221 377.3252 394.3515	3.5 2.1 1.8 13.2 3.8 2.1 18.9 5.0 7.9 100 14.4 0.0	$C_{20}H_{42}O_5$	Polymeric organic alcohol derivative	Possibly Synthetic PEG coupled with carbon long chain	3

IS: In-Source, PEG: Poly Ethylene Glycols

Table S6.2 Jarre

#	Shared name	RT (min)	*m/z* meas.	*m/z* calc.	Error (ppm)	Ion Type	MS^2 fragments & intensities	Ion or Molecular formula	Chemical class	Annotation	CL
1	negative-15	0.78	160.8424	160.8415	5.6	/	/	$[FeCl_3]^-$	Inorganic salts	Iron chloride salts	3
	negative-21	0.78	162.8394	/		Isotope of 160.8424					
	negative-22	0.78	195.8114	195.8104	5.4	/		$[FeCl_4]^-$			
	negative-14	0.78	197.8083	/		Isotope of 195.8114					
	negative-30	0.80	164.8366	/		Isotope of 160.8424					
2	negative-38	0.96	194.9278	194.9269	4.5	$[2M - H]^-$	/	$[H_3S_2O_8]^-$	Inorganic salts	Sulfated salts	3
3	positive-75	5.54	171.1018	171.1021	-0.8	$[M + H]^+$	55.0544 58.8 69.0694 26.0 79.0539 19.7 81.0701 18.7 83.0854 47.8 93.0699 27.4 97.1010 22.4 107.0855 37.2 111.0806 100 123.0808 16.3 125.0960 47.1	$C_9H_{14}O_3$	Fatty acid (short chain)	/	4

#	Shared name	RT (min)	*m/z* meas.	*m/z* calc.	Error (ppm)	Ion Type	MS^2 fragments & intensities	Molecular formula	Chemical class	Annotation	CL
4	negative-138	10.96	590.4465	590.4454	1.8	$[M - H]^-$	79.9576 10.8 80.9651 13.2 112.9857 29.4 333.2114 7.8 350.2380 100 392.2467 38.0 572.4310 2.2 590.4466 58.3	$C_{32}H_{65}NO_6S$	Sulfated Fatty acid	3-hydroxy-2-(2-hydroxy-13-methyltetradecanamido)-15-methylhexadecane-1-sulfonic acid **(sphingolipids)**	2b
5	positive-273	15.34	84.9600	/		IS-Fragment of $[M + 2H]^{2+}$	/				
	positive-272	15.34	88.0236	/		IS-Fragment of $[M + 2H]^{2+}$	/				
	positive-260	15.32	108.5184	/		IS-Fragment of $[M + 2H]^{2+}$	/				
	positive-268	15.34	125.9868	/		IS-Fragment of $[M + 2H]^{2+}$	/				

IS: In-Source

Table S6.3 3PP

#	Shared name	RT (min)	*m/z* meas.	*m/z* calc.	Error (ppm)	Ion Type	MS^2 fragments & intensities	Ion or Molecular formula	Chemical class	Annotation	CL
1	positive-3 positive-4	0.603	80.0346 91.5427	/ 91.5429	/ -2.2	IS-Fragment $[M + Mg]^{2+}$	77.0082 22.5 95.0195 100 118.0355 9.3	$C_6H_{13}N_3O_2$	Alkaloid	/	4
2	negative-16 negative-26 negative-24	0.78	150.8869 212.8651 234.8594	/			96.9602 100 120.9450 83.3 122.9420 25.0 136.9403 23.3	$[Cl_2Na_3O_4S]^-$ $[Cl_4Na_3]^-$ $[Cl_3Na_2]^-$	Inorganic Salts	Sodium Sulfate Chloride	/
3	negative-31	0.95	195.8109	195.8103	3	$[M + Cl]^-$	78.9585 2.9 79.9562 6.3 96.9601 44.5 160.8421 90.5	$FeCl_3$	Inorganic Salts	Iron chloride	3
4	positive-57 positive-59	4.93 4.95	143.0708 183.0635	/ 183.0633	/ 0.93	IS-Fragment $[M + Na]^+$	/	$C_7H_{12}O_4$	Fatty acid	/	4
5	negative-57	6.82	209.0951	209.0943	3.8	$[M - H]^-$	78.9589 100 151.0165 3.6	$C_8H_{19}O_4P$	Dialkyl phosphate	Flame retardant organic pollutant Dibutyl phosphate	3

#	Shared name	RT (min)	*m/z* meas.	*m/z* calc.	Error (ppm)	Ion Type	MS² fragments & intensities	Molecular formula	Chemical class	Annotation	CL
6	positive-119 negative-67 negative-68	7.12 7.14 7.15	453.3446 939.6430 949.6720	453.3435 939.6414 949.6702	-3 1.7 1.9	$[M + 2H]^{2+}$ $[M + Cl]^-$ $[M + HCOO]^-$	130.0875 7.3 225.1610 24.2 338.2443 6.9 451.3345 4.3 564.4150 3.3 677.4944 3.1 790.5717 0.9 885.6570 6.5 903.6664 100 939.6437 16.7	$C_{48}H_{88}N_8O_8$	Polyamide	Organic pollutant Possible Nylon derivative and/or Poly (ethylene terephthalate) oligomers (Zahn H. & Kush P., 1967)	2b
7	negative-83	8.3	232.0438	232.0432	2.5	$[M - H]^-$	63.9626 3.7 77.0397 1.3 91.0427 100 92.0504 95.6 123.0317 0.8 141.0017 1.8 155.0042 0.7 166.0662 9 168.0818 5.8	$C_{12}H_{11}NO_2S$	Alkaloid	Possible organic pollutant sulfoxide pyridine alkaloid derivative	4
8	negative-88	8.5	293.1761	293.1753	2.8	$[M - H]^-$	71.0141 10.4 148.053 15 164.0847 6.5 177.0922 29.2 192.1159 16.1 205.1236 54.2 220.1469 96.7 221.1546 100 293.1761 0	$C_{17}H_{26}O_4$	/	/	4

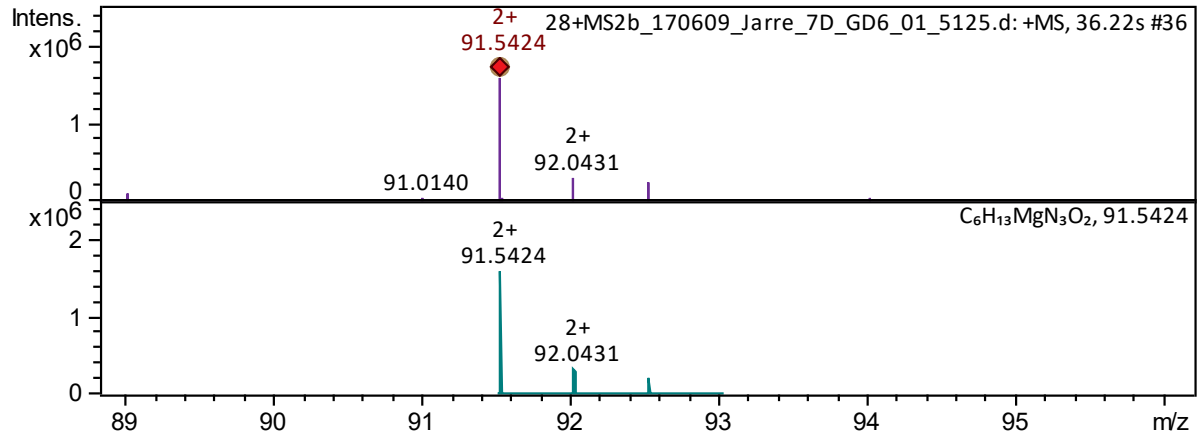
#	Shared name	RT (min)	*m/z* meas.	*m/z* calc.	Error (ppm)	Ion Type	MS^2 fragments & intensities	Molecular formula	Chemical class	Annotation	CL
9	negative-100 negative-101	9.04	84.9907 376.9693	/	/	IS-Fragment /	/				
10	negative-105	9.18	265.1578	265.1569	3.5	$[M - H]^-$	62.9639 0.2 78.9589 100 151.0161 2.2	$C_{12}H_{27}O_4P$	Dialkyl phosphate	Flame retardant organic pollutant Butyl octyl hydrogen phosphate	2b
11	positive-221	10.6	413.3243	413.3243	0.02	$[M + Na]^+$	123.1179 0.9 174.1277 1.1 302.2859 3.6 413.3246 100	$C_{22}H_{46}O_5$	Acyl glycerol	Surfactant	3
12	negative-172	11.9	381.2322	381.2311	2.9	$[M - H]^-$	79.9575 12.9 96.9603 100 122.9761 6.4 138.9711 0.5 167.0023 0.5 182.9972 0.4 211.2071 0.2 253.0756 0.1 381.2329 7.5	$C_{18}H_{38}O_6S$	Alkyl ethoxy sulfate	Surfactant organic pollutant 2-(2-tetradecoxyethoxy) ethyl hydrogen sulfate (Sanderson et al., 2006)	2b
13	negative-199	14.8	465.3051	465.3039	2.7	$[M - H]^-$	79.9575 12.9 96.9603 100 122.9761 6.4 138.9711 0.5 167.0023 0.5 182.9972 0.4 381.2329 7.5	$C_{27}H_{46}O_4S$	Steroid	Sulfated Cholesterol	2b

14	positive-240	14.9	59.0606	/	IS-Fragment	/	
15	negative-212	15.3	170.8711	/	/	126.8813 100 134.8666 42.9 128.8787 40.0 44.9978 35.3 99.9255 32.1	/

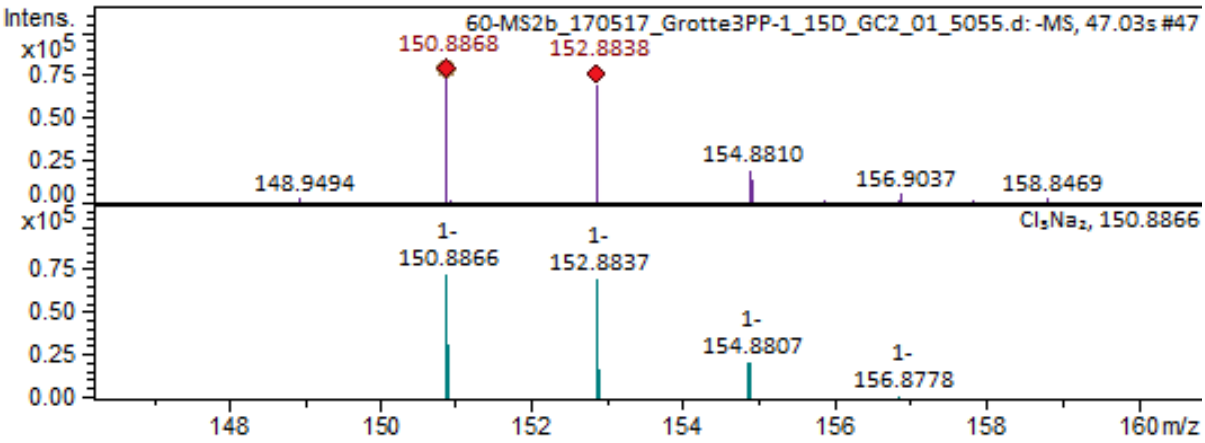
IS: In-Source

S6.4 Detection of the Mg-salt and inorganic compounds

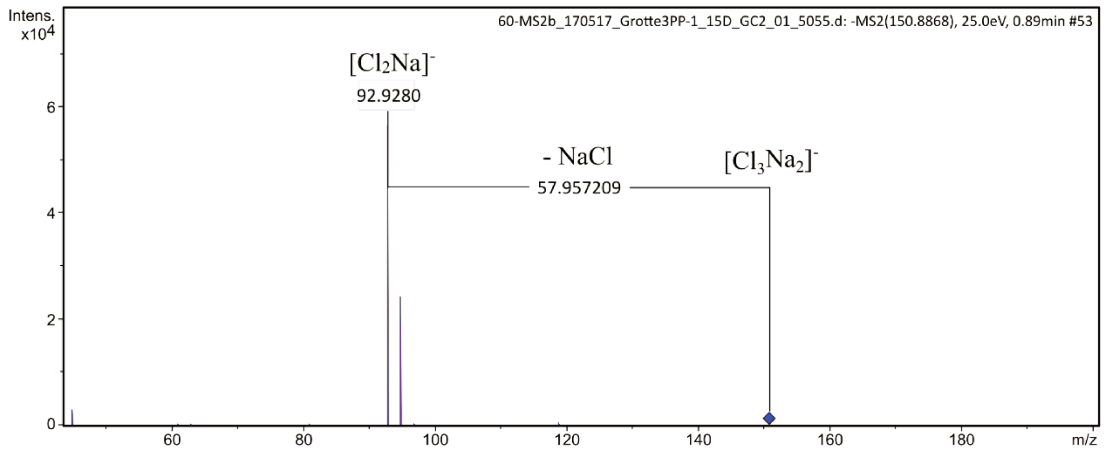
For the alkaloid $C_6H_{13}N_3O_2$ detected as a magnesium salt (*m/z* 91.5424), the isotopic pattern and charge (2+) were characteristic of the presence of a magnesium adduct (^{24}Mg, ^{25}Mg, et ^{26}Mg in proportion 79/10/11) that could not be detected by SIRIUS tools using standard parameters (see figure below, in red: experimental isotopic pattern, in green the theorical isotopic pattern for $[C_6H_{13}N_3O_2Mg]^{2+}$).



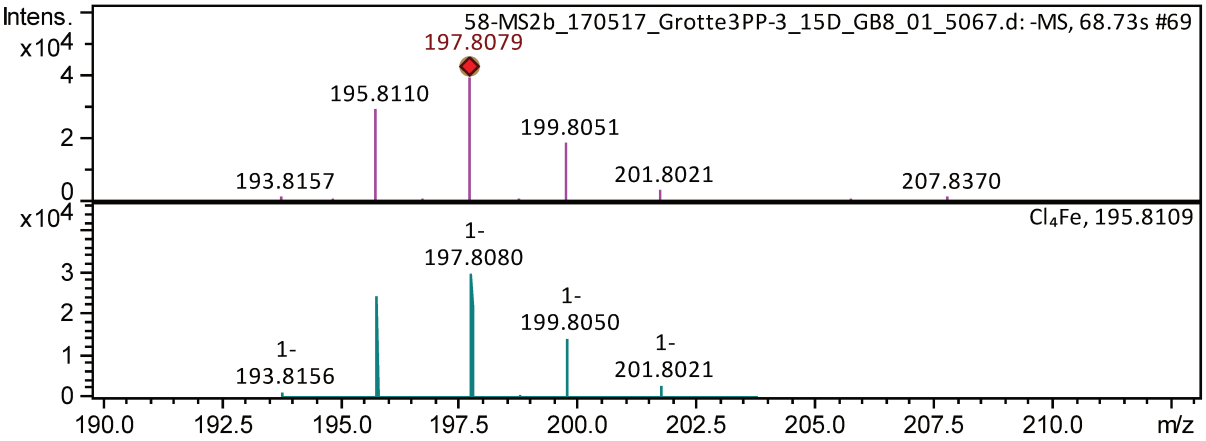
The inorganic compounds were annotated in the same way. For example, we noticed that some ions presented an exact mass below the closest nominal mass (152.8840 < 153) opposite to general organic compounds (CHONPS) that generally highlight an exact mass above the closest nominal mass in the studied mass range. Starting from this point, we hypothesized the absence of carbon and search a match with an inorganic substance studying isotopic pattern of the ion and its fragmentation pattern. The *m/z* 152.8838 was likely an isotope of the *m/z* 150.8868 with possible presence of chlore atoms (see figure below, on top, experimental isotopic pattern of 152.8838, below the theorical isotopic pattern for $[Na_2Cl_3]^-$).



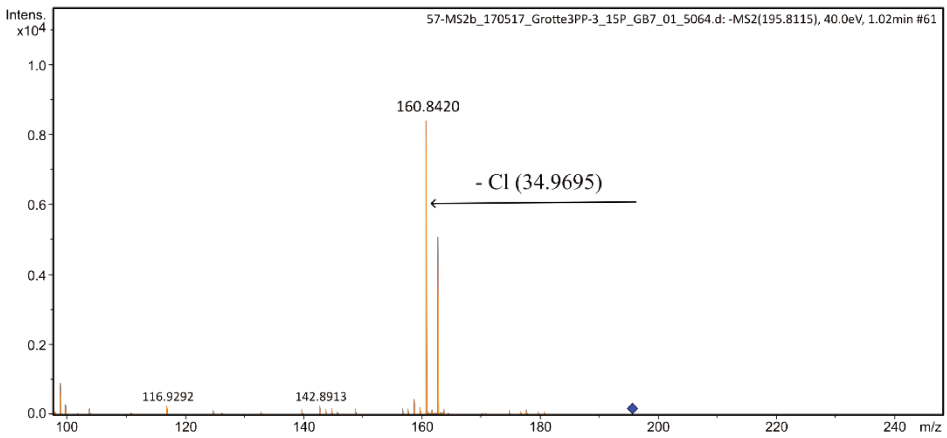
The MS^2 fragmentation spectra of 150.8868 demonstrated a loss of NaCl to give an ion at 92.9280 corresponding to $[Cl_2Na]^-$ (Error 0.0 ppm, mSigma Bruker 11.4).



We processed similarly for m/z 197.8082 (< 198). Starting from this, we searched for common metals other than Na or Mg that could explain isotopic pattern of the ion. Trying to integrate Fe (with natural isotopes ^{54}Fe, ^{56}Fe, ^{57}Fe, ^{58}Fe with abundances 5.8, 91.7, 2.1, 0.3) as we know that soils are rich in ferric oxide near the sampling caves), we obtained good matches between experimental data and theorical formula (see figure below: on top, experimental mass spectra for 197.8079, below, theorical isotopic pattern for $[FeCl_4]^-$.



From the MS^2, we could also detect a loss of chlore atom increasing our confidence in our annotation.



S7. Putative peptides and oxylipins found in seawater from both our previous (Santonja et al. 2018) and current studies

Cpd = compound. ***** Compounds commonly recorded in the three caves and reproducibly detected in at least 50% of the cave replicates.

MS data from Santonja et al., 2018 (Supplementary)								MS data from our current analysis						
Group	**Cpd**	**Feature code**	**RT mean (min)**	**Ion mass**	**Error (ppm)**	**Ion type**	**Molecular formula**	**Feature code**	**RT mean (min)**	**Ion mass**	**Ion type**	**Error (ppm)**	**Cave**	**Frequency in sample**
Putative PEPTIDES	**A**	M453T323 M475T323	5.4	453.3435 475.3254	**0.2** 0.0	$[M+H]^+$ $[M+Na]^+$	**$C_{24}H_{44}N_4O_4$**	**positive-105**	7.2	453.3443	$[M+H]^+$	0.5	Fauconnière Jarre	1/6 1/6
	B	M566T337	5.6	566.4279	**-0.5**	$[M+H]^+$	$C_{30}H_{55}N_5O_5$	/						
	C	M680T345 M701T346	5.8	679.5121 701.4940	**-0.4** -0.5	$[M+H]^+$ $[M+Na]^+$	$C_{36}H_{66}N_6O_6$	/						
	D*	M397T352	5.9	396.8015	**0.1**	$[M+2H]^{2+}$	**$C_{42}H_{77}N_7O_7$**	**positive-114**	7.1	396.8025	$[M+2H]^{2+}$	2.5	**Fauconnière** **Jarre** **3PP**	**6/6** **6/6** **4/4**
OXYLIPIN derivatives	E	M349T387	6.5	349.2583	-1.1	$[M+H]^+$	$C_{18}H_{36}O_6$	/						
	F*	M295T419	7.0	295.2264	-0.6	$[M+H]^+$	**$C_{18}H_{30}O_3$**	**negative -120**	9.9	295.2281	$[M-H]^-$	-0.8	Fauconnière **Jarre** (under level of detection) 3PP	1/6 **4/6** 1/4
	G	M331T421	7.0	331.2479	0.8	$[M+H]^+$	**$C_{18}H_{34}O_5$**	**positive-138**	8.1	331.2484	$[M+H]^+$	-0.2	Fauconnière 3PP	1/6 1/4
	H	M243T429	7.2	243.1956	-0.5	$[M+H]^+$	**$C_{14}H_{26}O_3$**	**negative -121**	10.1	243.1974	$[M-H]^-$	3.3	Fauconnière 3PP	3/6 1/4

REFERENCES:

Sanderson, H., Price, B. B., Dyer, S. D., DeCarvalho, A. J., Robaugh, D., Waite, et al. (2006). Occurrence and Hazard Screening of Alkyl Sulfates and Alkyl Ethoxysulfates in River Sediments. *Sci. Total Environ.* 367 (1): 312–23. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.11.021.

Schymanski, E. L., Jeon, J., Gulde, R., Fenner, K., Ruff, M., Singer, H. P., Hollender, J. (2014). Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. *Environ. Sci. & Technol.* 48 (4): 2097–98. https://doi.org/10.1021/es5002105.

Zahn. H. & Kush, P. (1967). Nylon and poly (ethylene terephthalate) oligomers. *Zeitschrift fuer die Gesamte Textil industrie*. 69: 880 – 884.

5.3. Conclusion & Perspectives

5.3.1 Démonstration d'un comportement de *homing* en lien avec la médiation chimique

Dans cette étude qui fait suite aux travaux de Santonja et al (2018), nous montrons que :

(1) une population donnée de mysidacés peut reconnaître l'eau de sa grotte d'origine, démontrant que les migrations d'*H. margalefi* relèvent d'un comportement de *homing* participant à la forte structuration spatiale des populations de mysidacés dans les grottes méditerranéennes (Lejeusne & Chevaldonné, 2006 ; Rastorgueff et al., 2014).

(2) ce comportement n'est pas influencé par les exométabolites des conspécifiques. Ce constat renforce l'hypothèse d'une potentielle contribution chimique provenant de la biodiversité benthique, y compris les éponges qui dominent ces communautés.

(3) l'eau de chaque grotte testée présente un paysage chimique spécifique, plus ou moins diversifié. Parmi les composés retrouvés de manière reproductible pour une même eau de grotte, on recense la présence de classes chimiques variées telles que des peptides, alcaloïdes, acides gras, stéroïdes, mais aussi de potentiels polluants.

Ces résultats démontrent que le comportement de *homing* observé peut être médié par la reconnaissance d'une combinaison spécifique de composés présents dans l'eau de chaque grotte. Ainsi, une nouvelle série d'expériences a été réalisée dont l'objectif était de déterminer quelle part du paysage chimique pouvait influencer la réponse comportementale d'*H. margalefi*.

5.3.2 Composition et activité des extraits enrichis en molécules issues d'eau de grotte

Dans une première expérience, nous avons préparé un extrait enrichi de molécules présentes dans l'eau de la grotte de Jarre. Pour cela, 30 L d'eau de Jarre ont été filtrés sur des disques SPE (6 L d'eau / filtre, matrice : Divinylbenzène, débit : 20 mL/min sur Autotrace® 280) et les molécules adsorbées ont été éluées comme décrit précédemment (Chapitres 3 & 4). A l'issue de cette filtration, 153 mg d'extraits de l'eau de Jarre ont été repris dans 1 mL de Méthanol. Afin d'identifier des molécules possiblement perçues comme signal à distance, cet extrait enrichi a été dilué dans un volume d'eau de mer équivalent. L'eau de la calanque de la station

marine, ayant déjà été utilisée comme contrôle lors des expériences comportementale, a été choisie comme eau de dilution pour les extraits de Jarre.

La reconnaissance de la chimiodiversité de l'eau de Jarre par les mysidacés de la même grotte a ensuite été évaluée dans les mêmes conditions que celles de l'article du présent chapitre. L'eau contrôle utilisée était l'eau de la calanque. A l'issue de cette première expérience, les mysidacés n'ont pas effectué de choix préférentiel entre l'eau de la calanque contenant les molécules extraites de l'eau de Jarre et le contrôle (l'eau de la calanque seule). Afin de regarder si les compositions chimiques des deux eaux testées étaient suffisamment différentes pour induire un choix, les profils chimiques de ces conditions ont été acquis par LC-MS. Les profils chromatographiques des deux eaux testées étaient très similaires, et les signaux de l'eau Jarre se retrouvaient masqués par ceux de l'eau de la calanque. Suite à cette observation, nous en avons déduit que les conditions de dilution des extraits n'avaient pas été suffisamment optimales pour retrouver le paysage chimique de Jarre, expliquant potentiellement l'absence de choix des mysidacés. Nous avons donc réitéré l'expérience en améliorant, à chaque fois, les conditions de dilution des extraits :

- Dans l'expérience 2, nous avons (i) changé l'eau contrôle en préparant un extrait enrichi de l'eau de la calanque (de la même manière que pour l'eau de Jarre) et (ii) utilisé de l'eau de mer artificielle (Aquavitro® 38 g/L) pour diluer les extraits enrichis.
- Dans l'expérience 3, nous avons (i) dilué 2 fois plus d'extraits enrichis dans l'eau et (ii) changé l'eau de dilution par de l'eau de la calanque dite « nettoyée ». Cette dernière elle a été filtrée en continu durant 24 h sur du sable de Fontainebleau (pour enlever les particules) et des billes de résines XAD-4 (pour retenir et concentrer les métabolites et les polluants organiques de l'eau de mer).

Le détail des 3 expériences est représenté dans le Tableau 5.2.

Tableau 5.2 : Série d'expériences de médiation menées en faisant varier la concentration des extraits enrichis et en changeant la nature de l'eau de dilution

Expériences (EXP)	**Vol. filtré (L)**	**Vol. final (L)**	**Eau de dilution**	**n ind. testés (*H. margalefi*)**
EXP 1 : Eau de calanque + extraits de Jarre *vs*. Eau de calanque	30 /	30 /	Eau de calanque /	40
EXP 2 : Eau de mer artificielle + extraits de Jarre *vs.* Eau de mer artificielle + extraits de calanque	17 17	17 17	Eau de mer Artificielle (Aquavitro® 38 g/L)	20
EXP 3 : Eau de calanque « nettoyée » + extraits de Jarre *vs.* Eau de calanque « nettoyée » + extraits de calanque	60 60	30 30	Eau de calanque "nettoyée »	30

D'une expérience à l'autre, il n'y a pas eu de choix préférentiel des mysidacés pour l'eau de Jarre reconstituée ou l'eau de mer contrôle, même dans le cas de l'EXP3 où il y avait deux fois plus d'extraits enrichis. Ces résultats viennent conforter l'hypothèse que les conditions testées n'ont pas permis de reproduire le paysage chimique initial associé à une différence de choix des mysidacés.

Toutes les eaux reconstituées ont à nouveau été filtrées sur disques SPE afin de comparer leurs profils chimiques avant et après les expériences de médiation. Les profils chimiques de chaque extrait ont été une nouvelle fois analysés par LC-MS. La figure 5.2 présente les profils chromatographiques des échantillons de l'EXP3, avant le lancement des expériences de médiation.

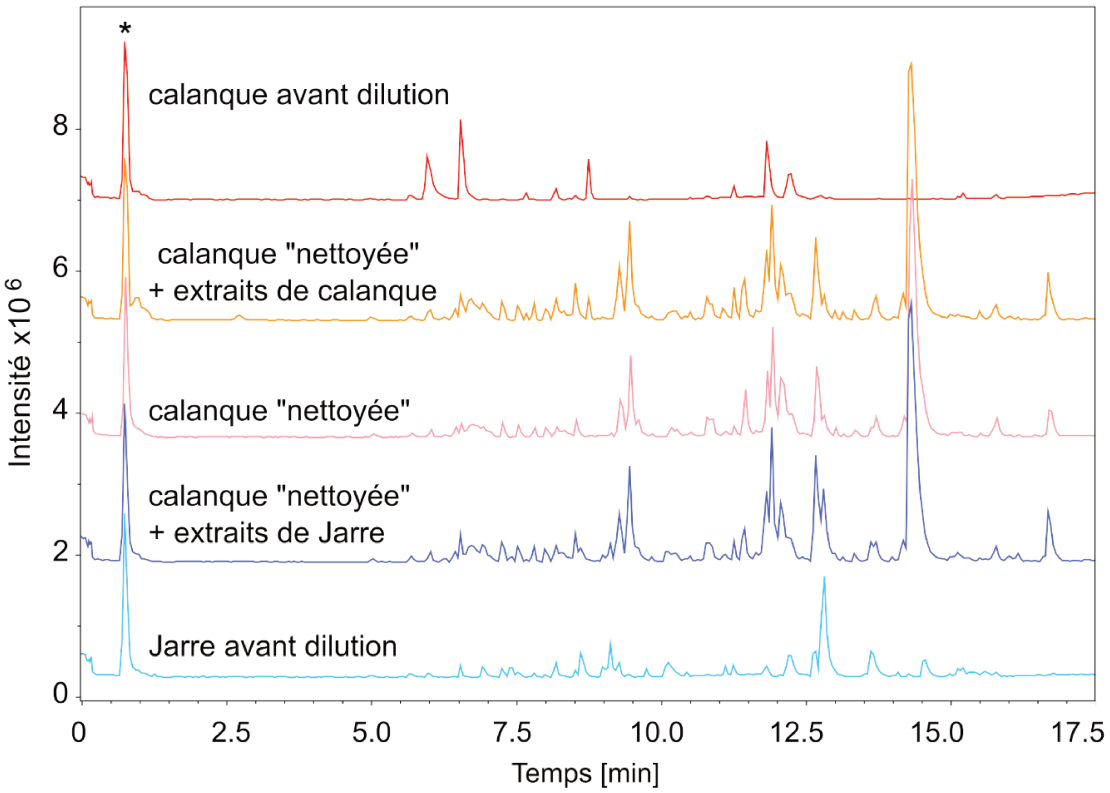


*Figure 5.2 : Comparaison des chromatogrammes des extraits d'eau de la calanque avant dilution, « nettoyée » seule / enrichie en extraits de calanque et de l'eau de Jarre avant dilution et dont les extraits ont été dilués dans l'eau de calanque « nettoyée » *correspond au pic de détection du calibrant*

Les profils chromatographiques des eaux enrichies en extraits ou « nettoyée » sont très similaires entre eux et diffèrent de ceux des extraits enrichis avant dilution, ce qui corrobore aussi l'absence de choix mesuré. Ces profils sont beaucoup plus chargés puisqu'ils contiennent, en plus des molécules initialement extraites des eaux testées, celles qui étaient contenues dans les eaux de dilution. Dans ce cas précis, l'absence de choix pourrait résulter (i) d'une surcharge d'informations chimiques, ou (ii) de la perte de molécules plus polaires, voir labiles, qui n'auraient pas été récupérées lors du premier passage de l'eau sur les disques SPE.

Pour répondre à ces questions, un traitement de données chromatographiques a été effectué sur Mzmine. La matrice de données générée permettait de comparer objectivement la diversité chimique de l'ensemble des échantillons, et d'évaluer la proportion de signaux chimiques issus de l'eau de Jarre ou de la calanque et retrouvés dans les eaux enrichies.

Plus précisement, sur les 155 signaux propres à l'eau de Jarre, seuls 54 signaux, soit 35% de la signature chimique de Jarre, semblaient présents dans la composition de l'eau enrichie (Figure 5.3A). Pour l'eau de la calanque, sur les 211 signaux détectés dans cette condition, seulement 28 signaux, soit 10% de la signature de l'eau de calanque, semblaient présents dans la composition de l'eau enrichie (Figure 5.3B).

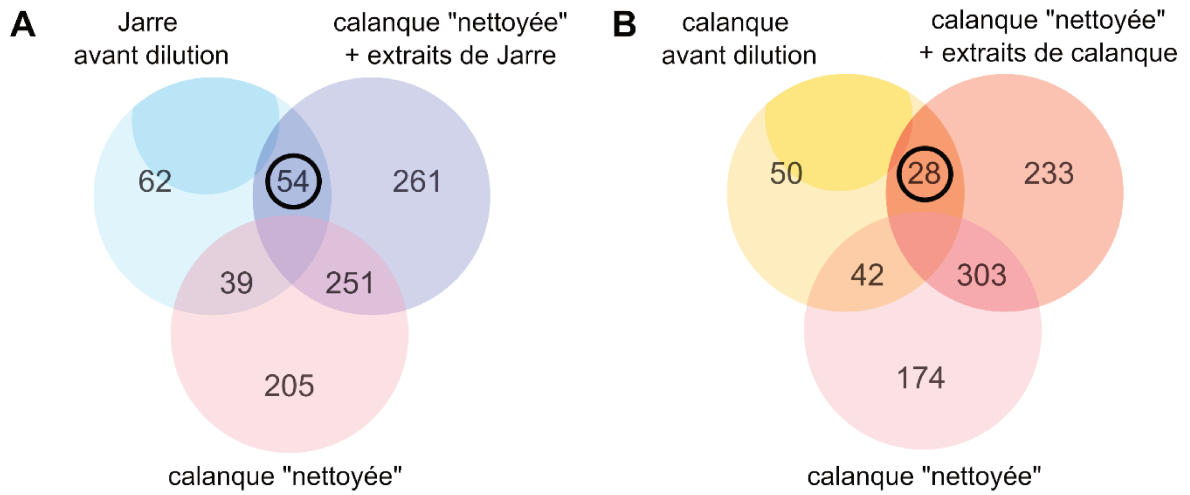


Figure 1.3 : Nombre de signaux détectés par condition après l'analyse des données métabolomiques en ciblant (A) l'eau de la grotte de Jarre et (B) l'eau de la calanque.

On observe donc qu'il y a eu une perte de composés entre les extraits avant dilution et les extraits des 2 eaux enrichies. Cette modification joue sur la composition du paysage chimique mais aussi sur la concentration des composés dans le mélange, ce qui a pu affecter la capacité des mysidacés à reconnaitre la chimiodiversité de l'eau de Jarre. Le problème de la reconstitution d'un mélange de molécules issues du milieu aquatique, avec pertes de molécules très polaires ou initialement à l'état de traces, voire labiles, est récurrent du fait du passage sur un support SPE. Cette perte de molécules (de nature inconnue) peut donc altérer notre capacité à identifier avec précision les molécules perçues comme signal chimique dans les expériences de médiation. De plus, il est nécessaire de connaître les conditions dans lesquelles ces molécules extraites doivent être rediluées en considérant la concentration finale nécessaire, les pertes par biodégradation, l'homogénéité d'une dilution dans un large volume et le degré de stabilité des molécules dans l'eau de mer (Mauduit et al., 2023). Une fois les conditions de dilution fixées, il sera alors possible de tester l'influence de la chimiodiversité d'une eau de grotte sur le comportement de *homing* des mysidacés.


Chapitre 6

Conclusions générales & perspectives

Ce chapitre final dresse le bilan des résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse. En s'appuyant sur les connaissances nouvellement acquises, plusieurs perspectives de recherche sont proposées.

6.1. Synthèse des nouvelles connaissances

Mes travaux de thèse s'attachaient à décrire l'importance de la médiation chimique dans les écosystèmes marins et son potentiel rôle clé dans leur fonctionnement. En choisissant les grottes sous-marines comme écosystèmes modèles, l'objectif général était de mieux comprendre le rôle fonctionnel des espèces composant les communautés benthiques et leur implication dans les interactions chimiques.

Ainsi, cette thèse s'est articulée autour de deux ambitions : (i) étudier la corrélation entre la diversité des communautés benthiques et la complexité du paysage chimique des grottes, et (ii) évaluer comment ces paysages chimiques influencent le comportement d'organismes cavernicoles nageurs. Les volets expérimentaux de ces deux axes ont été réalisés en parallèle, et ont abouti à plusieurs conclusions illustrées dans la figure 6.1.

(1) Ces travaux ont apporté une vision détaillée des deux grands types de communautés cavernicoles, celles des Grottes Semi-Obscures et des Grottes Obscures, dont les compositions ont été comparées dans 4 sites offrant des situations environnementales différentes. Si des patrons de biodiversité communs aux milieux cavernicoles ont été confirmés, ce travail a aussi permis de révéler la singularité de chaque site étudié. Dans chaque grotte, la communauté GSO abrite une plus forte biodiversité que la communauté GO. De nombreuses espèces sont retrouvées de grotte en grotte, mais leur occurrence peut varier énormément dans une communauté. Ces variations, en quantité et/ou en qualité de la composition des assemblages benthiques sont liées aux conditions environnementales spécifiques de chaque site.

(2) L'instrument de capture *in situ*, I-SMEL a été développé pour évaluer la contribution des organismes benthiques à la complexité du paysage chimique marin. La preuve de concept a été réalisée en mettant en lumière la signature chimique de 3 espèces d'éponges au sein d'un paysage chimique de GSO.

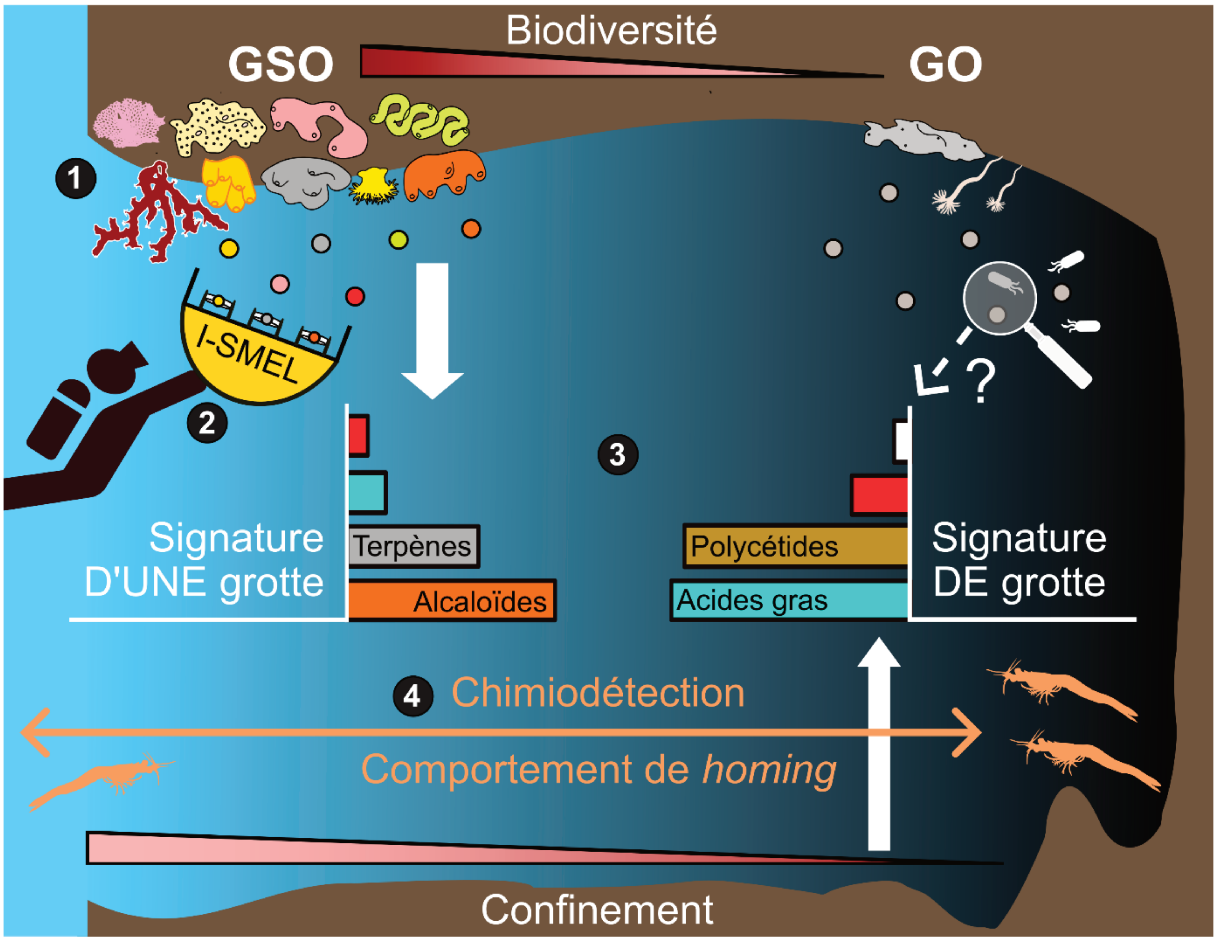


Figure 6.1 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus. ***(1)*** *Description de l'environnement cavernicole et de la biodiversité des communautés benthiques GSO et GO pour les 4 grottes étudiées.* ***(2)*** *Déploiement d'I-SMEL dans l'eau au-dessus de ces communautés pour enregistrer la signature chimique de la biodiversité.* ***(3)*** *Caractérisation des patrons de diversité chimique dans les grottes sous-marines et identification des potentiels contributeurs. En rouge : proportions d'acides aminés et de peptides, en blanc : proportion de potentiels polluants anthropiques.* ***(4)*** *Influence du paysage chimique dans la reconnaissance de l'habitat de mysidacés cavernicoles.*

(3) De la même façon qu'il conditionne la richesse des communautés, le gradient de confinement explique les principales différences de composition chimique des paysages de grottes. Dans les entrées de grotte où les communautés benthiques sont riches (GSO), le paysage chimique de l'eau environnante est marqué par l'occurrence d'alcaloïdes et de terpénoïdes qui dérivent probablement des métabolites spécialisés des espèces d'éponges dominant la communauté. Dans les fonds de grottes (GO), les acides gras et les polycétides à haut degré d'oxydation dominent la composition du paysage chimique. Dans ces parties des grottes, plus

qu'une contribution des petites espèces sessiles locales, ces métabolites oxydés pourraient refléter une contribution du métabolisme bactérien. Ils pourraient aussi partiellement correspondre à des composés réfractaires à la biodégradation et s'accumulant dans les parties les plus confinées des grottes. Par conséquent, les quatre grottes naturelles se distinguent plus par leur paysage chimique en GSO qu'en GO. Au sein des GSO, la composition du paysage chimique varie ainsi d'une grotte à l'autre en fonction de la composition spécifique des communautés. Il peut être ainsi considéré comme la signature chimique **d'une** grotte. La similarité des compositions chimiques des paysages en GO de chaque site, et avec celle de la grotte artificielle de Monaco, suggère qu'il existe une signature chimique **de l'habitat** grotte. Par ailleurs, quand on s'intéresse à la part du paysage chimique influencée par la biodiversité (sans considérer la signature chimique **de l'habitat** grotte), on constate que le nombre de classes structurales augmente avec la richesse spécifique des communautés.

(4) Les migrations horizontales d'*H. margalefi,* entre l'intérieur et l'extérieur des grottes, relèvent d'un comportement de *homing* journalier, conditionné par la reconnaissance du paysage chimique spécifique de la grotte dont elles sont issues : leur « maison ». Cette reconnaissance n'étant pas liée à la détection des exsudats de mysidacés, l'hypothèse d'une contribution chimique de la biodiversité benthique (Santonja et al., 2018) est renforcée. Dans la mesure où une population donnée de mysidacés ne choisit pas le paysage chimique spécifique d'une grotte étrangère, on voit mieux comment des changements de biodiversité benthique en GSO peuvent avoir des conséquences sur le fonctionnement de l'écosystème. Des variations de la composition des peuplements benthiques affectent apparemment la nature des paysages chimiques, donc potentiellement le comportement de la faune mobile, et ainsi l'ensemble du modèle de fonctionnement des grottes sous-marines.

Ainsi, ces résultats ouvrent la porte à de nombreuses suites possibles à cette histoire, ainsi qu'à d'autres démonstrations du rôle fonctionnel de la médiation chimique dans l'océan. Ces études demeurent cruciales pour mieux comprendre le fonctionnement des écosystèmes, particulièrement dans un contexte où la biodiversité est fortement affectée par les changements environnementaux en cours.

6.2 Perte de biodiversité : une menace pour le fonctionnement des écosystèmes

Dans le chapitre 2, nous avons mesuré en seulement 5 ans (couvrant la période 2015 – 2020), des changements de biodiversité importants au sein des assemblages d'éponges de GSO. Pour chaque grotte, il a été observé une diminution du nombre moyen d'espèces ainsi que de

leur abondance dans la communauté. Cette tendance est malheureusement retrouvée dans de nombreux écosystèmes sous l'effet du changement climatique (Poloczanska et al., 2016). C'est d'ailleurs dans les océans que les changements de biodiversité sont les plus forts (jusqu'à environ +/- 20 % par an) (Blowes et al., 2019). Les vagues de chaleur sous-marines représentent les principales menaces pour la biodiversité dans les écosystèmes côtiers de Méditerranée. Au cours des dernières décennies, leur fréquence a augmenté et leurs effets se sont exprimés sur des milliers de kilomètres de côtes, de la surface à 70 m de profondeur, et à travers un grand nombre d'habitats marins et de taxons (50 taxons, 8 phyla) (Perez et al., 2000 ; Chevaldonné & Lejeusne, 2003 ; Lejeusne et al., 2010 ; Garrabou et al., 2022 ; Grenier et al., 2023). Des événements de mortalité massive sont surtout rapportés pour les éponges et les cnidaires, les espèces autochtones les plus sensibles laissant peu à peu la place à des espèces plus tolérantes, parmi lesquelles on trouve des non indigènes (Galil, 2009 ; Garrabou et al., 2009 ; Cebrian et al., 2012 ; Grenier et al., 2023). Mais c'est également le cas pour les mysidacés du genre *Hemimysis*, étudiés dans cette thèse (Chevaldonné & Lejeusne, 2003 ; Lejeusne & Chevaldonné, 2005). Ces remaniements contribuent à des changements marqués dans les assemblages de biodiversité (Bertolino et al., 2017 ; Gómez-Gras et al., 2019, 2021). En conséquence, on observe depuis plusieurs décennies, une modification de l'aire de répartition de nombreuses espèces marines (Chevaldonné & Lejeusne, 2003 ; Lejeusne et al., 2010 ; Pinsky et al., 2020). Certaines, majoritairement sessiles, reculent à plus grande profondeur (Idan et al., 2020) et d'autres majoritairement mobiles, migrent vers les pôles en parcourant autour de 70 km par décennie (Poloczanska et al., 2013).

Ces changements de biodiversité impactent considérablement le fonctionnement des écosystèmes en perturbant les interactions biotiques (García Molinos et al., 2016). En milieu marin, les conséquences de ces changements sont surtout rapportées sur l'organisation des réseaux trophiques (Kortsch et al., 2015 ; Du Pontavice et al., 2020). En considérant le modèle de fonctionnement trophique des grottes sous-marines proposé par Rastorgueff et al. (2015), et le rôle clé des éponges dans l'approvisionnement continuel en matière organique pour l'écosystème (sponge loop) (De Goeij et al., 2013), une diminution de leur abondance entrainerait une augmentation des conditions d'oligotrophie dans les grottes. Outre leur rôle dans les apports nutritifs, les éponges assurent de nombreuses fonctions écologiques au sein du benthos (Bell, 2008). Entre autres, elles peuvent être une source de substrat secondaire pour les zoanthaires (Bo et al., 2012), et de microhabitats pour les invertébrés (Henkel & Pawlik, 2005 ; Baeza et al., 2016 ; Chin et al., 2020). En raison de leur croissance érigée, certaines éponges contribuent à créer des habitats tridimensionnels complexes. Cela forme des abris pour de nombreux animaux mobiles tels que des échinodermes et des poissons, notamment dans des

environnements exposés à des taux élevés de sédimentation (Bo et al., 2012). Ces fonctions structurantes conférées aux grandes espèces dressées sont la plupart du temps attribuées à des fonctions physiques, par exemple le système aquifère des éponges offrant de « mini-grottes » à une multitude d'invertébrés associés, ou encore un abri sous ce que l'on peut considérer comme une canopée. Ainsi, même si de tels effets secondaires n'ont jamais été documentés, il est fort à parier que la disparition de certaines éponges entraine dans le même temps, la disparition de tout un contingent d'espèces vivant en contact direct avec les éponges.

Enfin, mes travaux et d'autres plus anciens montrent que ces fonctions structurantes pourraient être au moins partiellement liées à la capacité des éponges à libérer des exométabolites (Thompson et al., 1985 ; Duque et al., 2001 ; Sjögren et al., 2011 ; Ternon et al., 2016 ; Santonja et al., 2018 ; Ashur & Dixson, 2019). Par conséquent, une diminution de l'abondance des éponges dans des écosystèmes aussi variés que les grottes sous-marines, les récifs coralliens et les habitats profonds peut entrainer des pertes considérables de biodiversité et de fonctionnalité de ces écosystèmes (Hogg et al., 2010 ; Gerovasileiou & Voultsiadou, 2012 ; Bo et al., 2012 ; Schönberg & Fromont, 2012 ; Pomponi et al., 2019). Jusqu'à présent malheureusement, ces pertes de fonctionnalité ne sont pas assez documentées en milieu marin.

En milieu terrestre au contraire, le rôle fonctionnel et la diversité chimique des composés organiques volatiles (COVs) émis par les fleurs est bien connu (Massalha et al., 2017 ; Huang et al., 2020). En plus de leur fonction d'attraction des pollinisateurs, ils servent également de défense directe ou indirecte contre les florivores, comme par exemple les fourmis voleuses de nectar et les pathogènes (Galen et al., 2011 ; Kessler et al., 2011). Selon les espèces, les composés peuvent être relativement spécifiques en termes de composition, de taux d'émission et de moment d'émission (Raguso, 2008). En retour, les insectes ont développé des systèmes olfactifs finement ajustés et certains d'entre eux présentent des réponses spécifiques à des substances chimiques propres à leurs plantes hôtes (Hansson & Stensmyr, 2011). En 150 ans, l'urbanisation a considérablement altéré le paysage sauvage (Jepsen et al., 2015), modifiant ainsi le paysage chimique associé. Ces changements ont mené à la perte et la fragmentation des habitats, diminuant le nombre et la diversité des pollinisateurs dans les zones naturelles adjacentes (Kremen et al., 2002). Rajoutée à cela, la pollution atmosphérique affecte la capacité des pollinisateurs à détecter les COVs et donc à assurer leur fonction de butinage (Vanderplanck et al., 2021). Les plantes ayant moins de facultés à se disséminer, on assiste à une perte de biodiversité qui n'est pas sans conséquence sur le fonctionnement des écosystèmes concernés (Vamosi et al., 2006). Par ailleurs, les effets du changement climatique sur la communication chimique des insectes sont plutôt bien renseignés. Sentis et al., (2015) ont montré que les larves

de coccinelles produisent deux fois plus de substances sémiochimiques lors d'une augmentation soudaine de la température (de 15°C à 25°C). Une fois émises, les phéromones peuvent se dégrader rapidement sous l'effet de la chaleur (van Oudenhove et al., 2011). Elles sont ainsi moins facilement détectables par leurs congénères, d'autant plus que les récepteurs olfactifs deviennent déficients (Groot & Zizzari, 2019). Ces perturbations de la communication chimique peuvent donc entraîner une réduction de la capacité des individus à se localiser à distance et à identifier des partenaires potentiels. Chez les pucerons, une augmentation du taux de CO_2 atmosphérique (de 450 à 800 ppm) entrainerait une diminution (-35%) de libération de leur phéromone d'alarme (E)-β-farnesene) en cas d'attaque par un prédateur (Boullis et al., 2017). Ce changement diminue leur comportement de fuite face à un prédateur, les rendant donc plus vulnérables à une attaque. Ces conséquences engendrent donc potentiellement des effets en cascade sur les interactions avec les niveaux trophiques supérieurs.

Une différence majeure entre les milieux terrestre et marin tient dans le niveau de connaissance qu'il existe sur l'influence et la diversité des COVs simplement parce qu'ils sont plus facilement accessibles, et ce, depuis plus longtemps (Frérot et al., 2017 ; Zhou & Jander, 2022). Mes travaux montrent une voie qui pourrait réellement combler le manque de connaissances en milieu marin à court terme. Face aux menaces pesant sur la biodiversité marine, il est urgent de pouvoir décrypter la chimiodiversité de l'eau, et cela, pour continuer à révéler l'importance de la médiation chimique dans le fonctionnement des écosystèmes marins.

6.3 Vers une meilleure caractérisation du paysage chimique marin & de ses contributeurs

Les résultats des chapitres 3 et 4 montrent qu'il est possible de relier la contribution métabolique de la biodiversité benthique à la chimiodiversité de l'eau associée. La configuration de l'instrument I-SMEL permet d'être au plus près des organismes benthiques, et donc de capter instantanément les exométabolites émis. Ainsi, on accède plus facilement à la diversité structurale composant un paysage chimique.

6.3.1 D'autres applications possibles

Cet appareil de capture a seulement été déployé au-dessus de communautés dominées en biomasse et en diversité par les éponges. Il pourrait également être utilisé dans d'autres écosystèmes où l'importance de la médiation chimique demande à être mise en lumière.

En Méditerranée, on pourrait facilement déployer I-SMEL au-dessus des herbiers de posidonie ou du coralligène, les deux écosystèmes les plus emblématiques de cette partie de l'Océan mondial. Ces deux écosystèmes sont eux aussi très touchés par les changements globaux actuels qui modifient petit à petit la composition des communautés benthiques (Gómez-Gras et al., 2021 ; Cantasano, 2023). Cependant peu d'études ont cherché à mesurer comment ces perturbations pouvaient influencer les interactions chimiques entre les espèces qui structurent ces écosystèmes (la phanérogame *Posidonia oceanica* dans les herbiers, les algues calcaires ou les gorgones dans le coralligène) et la flore et la faune associées (Mutalipassi et al., 2022). Dans le cadre d'une perturbation (*e.g.* vagues de chaleur sous-marines), notre dispositif permettrait d'évaluer l'influence d'une perte de biodiversité sur la composition du paysage chimique (Wegley Kelly et al., 2022 ; Becker et al., 2023). Cela permettrait de mettre en avant quels composés sont essentiels au maintien de la fonctionnalité de ces écosystèmes.

De l'autre côté de l'Océan, il serait intéressant de déployer notre dispositif au-dessus des récifs coralliens pour mieux caractériser les paysages chimiques de ces écosystèmes en pleine mutation. Les travaux de Lecchini et al. (2013a, 2013b, 2014, 2017) ont supposé que des signaux chimiques étaient impliqués dans le recrutement des juvéniles des poissons et de crustacés, mais ce, sans jamais avoir tenté d'étudier la composition chimique de l'eau baignant les récifs coralliens. Suite à ces travaux, plusieurs questions restaient en suspens : le paysage chimique de l'eau de mer est-il significativement différent d'un habitat (herbier) à un autre (récif) ? Entre un récif dominé par des coraux morts / malades et celui d'un récif en bonne santé ? Jusqu'à quelle distance / profondeur détecte-on la signature chimique de ces habitats ? De la même manière que ce qui a été fait dans le cadre des grottes sous-marines, on pourrait établir la signature chimique de chaque habitat et identifier les contributeurs majoritaires. Déployer I-SMEL dans ce contexte, permettrait de mieux comprendre de quels signaux dépend la faune associée à ces écosystèmes pour s'orienter vers un habitat favorable. A l'échelle de l'écosystème, ces travaux expliqueraient, en partie, sur quoi repose la productivité et le fonctionnement des récifs coralliens, aujourd'hui en grand danger. Il serait alors possible d'ajouter le rôle de la médiation chimique à la liste des services écosystémiques procurés par des coraux en bonne santé.

I-SMEL apparait donc comme un outil clé pour caractériser la diversité chimique des paysages marins. Le rendre accessible à la communauté scientifique ouvrirait les portes de nombreuses opportunités de recherche sur la diversité des paysages chimiques marins.

6.3.2 Vers de nouvelles générations d'I-SMEL

Dans un objectif d'augmenter nos connaissances sur la diversité des paysages chimiques marins, de nouvelles générations d'I-SMEL sont à l'étude et un nouveau prototype est en fabrication.

Afin d'adapter la capture d'exométabolites à la morphologie de différentes espèces *(e.g.* éponges encroutantes de GO, gorgones dans le coralligène) et réduire l'empreinte chimique de l'eau de mer, on pourrait construire un appareil dont le volume de la chambre de filtration serait ajustable à chaque morphologie.

On pourrait aussi imaginer développer une version autonome, qui filtrerait de l'eau de mer en continu pour concentrer les exométabolites. Il sera alors possible de réaliser la caractérisation structurale de molécules d'intérêt, sans avoir à prélever la biomasse d'un producteur hypothétique.

Ce dispositif autonome, monté sur un ROV, permettrait d'enregistrer le paysage chimique d'écosystèmes non accessibles à la plongée. L'exploration des écosystèmes profonds est très récente. On sait peu de choses sur la diversité du vivant à grande profondeur et sur son adaptabilité face aux pressions environnementales actuelles (*e.g.* dérèglement climatique, exploitation minière, surpêche, pollution plastique,…) (Paulus, 2021). Les grands fonds constituent un réservoir de biodiversité où les éponges et les hexa/octocoralliaires sont très représentés dans les communautés benthiques (Bo et al., 2012). On pourrait donc supposer que leur exométabolites, trop peu connus (Slattery et al., 1997 ; Sjögren et al., 2011), jouent un rôle important dans le fonctionnement de ces écosystèmes. Par ailleurs, les conditions environnementales et les assemblages benthiques de GO sont très similaires à ceux que l'on retrouve dans l'étage bathyal. Pour cette raison, les grottes sont considérées comme des enclaves d'environnements profonds dans le littoral (Harmelin et al., 1985). Il paraitrait donc évident d'essayer de comparer les patrons de diversité chimique des grands fonds avec ceux des communautés GO des grottes sous-marines.

6.4 Rôle de la médiation chimique dans le fonctionnement des écosystèmes marins

6.4.1 Le cas des grottes sous-marines

Dans les grottes sous-marines, les résultats de cette recherche devraient permettre de rapidement proposer un nouveau modèle de fonctionnement écosystémique prenant en compte le rôle de la médiation chimique dans les interactions biotiques. Pour compléter le modèle proposé par Rastorgueff et al. (2011, 2015) qui est essentiellement basé sur les relations trophiques, il s'agira de préciser le rôle de la médiation chimique dans d'autres interactions, mais aussi de mieux comprendre comment les paysages chimiques sont construits.

D'après les résultats des chapitres 3 et 4, les éponges de GSO sont des contributeurs majeurs du paysage chimique d'entrée de grotte. Par contre en GO, il semblerait que la contribution de la biodiversité benthique soit plus anecdotique. L'hypothèse selon laquelle le métabolisme microbien expliquerait la majeure partie du paysage chimique semble très plausible dans cette partie de l'écosystème cavernicole qui s'apparente le plus aux environnements de l'océan profond (Zark & Dittmar, 2018 ; Noriega-Ortega et al., 2019). Aussi, en guise de complément à mes travaux, il parait prioritaire de caractériser les communautés de procaryotes que l'on trouve dans l'eau des grottes sous-marines. Ces analyses pourront être faites par *metabarcoding* de l'ADN environnemental récolté en GSO et en GO. Ces analyses pourraient permettre par exemple, de confirmer l'occurrence d'actinobactéries dans le fond de nos grottes (Busquets et al., 2014) et ainsi d'expliquer une partie du paysage chimique. *A minima*, il sera ainsi possible de corréler la complexité des paysages chimiques à la diversité des communautés procaryotiques, et d'évaluer les contributions relatives des différents compartiments de l'écosystème cavernicole. Cela permettra aussi de mieux comprendre les relations qui existent entre deux catégories d'acteurs clés dans la transformation de la matière organique dans les systèmes oligotrophiques, les macroorganismes suspensivores et les microorganismes (Weber et al., 2022; Becker et al., 2023).

Au-delà de ces études corrélatives, les grottes sous-marines pourraient représenter un terrain de choix pour développer des travaux en génomique fonctionnelle s'appuyant sur les séquençages de génomes et d'hologénomes. En effet, les nouvelles connaissances générées par le nombre grandissant de génomes annotés permettront de préciser les voies de biosynthèse à l'origine des métabolites constituant la majeure partie des paysages chimiques sous-marins.

Par ailleurs, les résultats de ma recherche ont permis de renforcer l'hypothèse d'une chimio-réception des molécules exsudées par les éponges vivant en GSO par les mysidacés (Derrien et al., 2024), et probablement d'autres organismes nageurs telle que la crevette *Palaemon serratus,* et les apogons (Bussotti et al., 2018 ; Santonja et al., 2018). A l'image de ce qui est déjà connu pour d'autres familles de crustacés (Derby et al., 2016), il s'agirait maintenant d'explorer la nature des chimiorécepteurs impliqués dans cette capacité de reconnaissance. Chez les crustacés de la classe des Malacostracés, à laquelle appartiennent les mysidacés et les crevettes, on connait deux familles de gènes impliquées dans la chimio-réception : les gènes codant pour des récepteurs ouvrants des canaux ioniques (IR), et d'autres pour des protéines solubles chimio-sensibles (CSP) (Eyun et al., 2017). Chez *P. serratus*, que l'on retrouve également dans les grottes sous-marines, le chimiorécepteur IR25 est potentiellement impliqué dans l'olfaction et serait principalement présent dans les flagelles latéraux des antennules (Zbinden et al., 2017). Chez les mysidacés, il n'y a, à ce jour, aucune information concernant le type de chimiorécepteur impliqué. Ainsi, des techniques moléculaires (séquençage du transcriptome, PCR quantitative) pourraient être déployées dans le but d'identifier les gènes codant pour les chimiorécepteurs engagés dans la réponse des mysidacés. La capacité d'évaluer et de quantifier l'expression des gènes dans les cellules est possible grâce à l'analyse de l'expression différentielle des gènes (DGE). L'analyse DGE utilise le séquençage de l'ARN pour déterminer quels gènes sont exprimés ou inhibés dans une cellule ayant une fonction particulière (*e.g.* chémorécepteur). On pourrait donc employer cette technique pour déterminer quels gènes s'expriment lorsque le mysidacé répond à un stimulus chimique tel que l'odeur de son habitat, de ses proies ou de ses prédateurs. Ces analyses permettraient ainsi de lier un mécanisme moléculaire à une interaction biotique observable à l'œil nu.

Si certaines molécules permettent aux mysidacés de s'orienter dans un vaste environnement, d'autres pourraient servir de signaux d'alarme face à la proximité d'un prédateur. Dans l'océan ouvert, Hamrén et Hansson (1999) ont montré que l'espèce *Mysis mixta* était capable de détecter l'odeur d'un de ses prédateurs, le hareng *Clupea harengus*. En retour, il ajusterait son comportement pour éviter de se faire repérer. Dans les grottes, les mysidacés sont chassées par des petits poissons, des décapodes, des cérianthes (cnidaires) et lorsqu'elles sont présentes, par des éponges carnivores (Coma et al., 1997 ; Bianchi, 2003 ; Vacelet & Duport, 2004 ; Rastorgueff et al., 2011). On peut donc imaginer qu'*H. margalefi* utilise également les molécules émises par ses prédateurs pour s'orienter et éviter de se faire manger. Cette hypothèse a été testée avant mon arrivée en thèse, en évaluant le comportement d'*H. margalefi* au contact de l'eau conditionnée par les éponges carnivores. Ces premiers tests ont révélé que les mysidacés pourraient avoir un comportement d'évitement lorsqu'ils se retrouvent en présence

de signaux provenant de l'un de ses prédateurs, l'éponge carnivore *Lycopina hypogea*. Ces résultats préliminaires pourraient ainsi révéler une nouvelle contribution de la médiation chimique dans la distribution des organismes au sein de l'habitat des grottes sous-marines.

Compte tenu des changements importants de biodiversité, constatés en seulement 5 ans sur les assemblages d'éponges de GSO, il est nécessaire de se soucier de l'impact occasionné par la disparition d'espèces clés (*e.g. Spongia officinalis*, Grenier et al., 2023). En effet, les photos quadrats ayant permis de montrer ces changements ont été réalisées une année avant mes premières captures de paysages chimiques. Par ailleurs, les mortalités massives de 2022 sont survenues alors que toutes mes expériences *in situ* étaient terminées. Ainsi le choix d'un bon référentiel s'impose quand il s'agit d'apprécier des changements dans le temps, ce qui est dans tous les cas un véritable défi dans la durée d'une thèse en 3 ans. Cependant, sans pouvoir en mesurer directement les conséquences fonctionnelles, les changements observés au cours de ma thèse permettent d'imaginer de nouvelles expériences pour mieux montrer le lien entre changement global et son effet sur le fonctionnement des écosystèmes.

Si l'hypothèse d'une chimio-réception de molécules d'éponges par les mysidacés se confirme, alors on peut imaginer que la disparition de ces éponges vienne désorienter les mysidacés. Perdant leur capacité de retour à la « maison », les mysidacés pourraient être plus sujets à la prédation et finir par disparaître des habitats cavernicoles. Pourraient-ils trouver refuge dans d'autres habitats potentiellement détectables par qu'ils présentent des paysages chimiques comparables aux entrées de grotte ? A l'heure actuelle, de tels habitats n'ont pas encore été trouvés. Cette théorie des refuges est aujourd'hui testée dans des écosystèmes (ou portions d'écosystème) situés dans la zone mésophotique (> 30m) qui seraient plus stables et plus préservés des perturbations intenses à faible profondeur (Bongaerts et al., 2010 ; Bongaerts & Smith, 2019). Cette théorie demanderait à être explorée dans le cas des grottes pour les similitudes existant avec les environnements profonds. Dans les grottes, la réduction des effectifs ou la disparition des mysidacés pourraient entrainer une augmentation de l'oligotrophie et donc menacerait la survie des espèces syntopiques. Cependant, on peut aussi imaginer que les mysidacés aient la capacité de s'adapter au changement de paysage chimique dans les grottes sous-marines. Dans ce cas, il serait important de surveiller les variations génétiques pouvant se produire rapidement au sein des populations d'*H. margalefi*, cette espèce étant susceptible de se reproduire jusqu'à 4 fois par année et ayant déjà connu des fluctuations importantes de ses effectifs (Chevaldonné & Lejeusne, 2003 ; Lejeusne & Chevaldonné, 2005).

Dans un contexte d'environnement changeant, et en considérant les possibles conséquences sur le fonctionnement de cet écosystème, il demeure essentiel d'élucider quelles autres interactions

reposent sur des interactions biotiques potentiellement médiées par des molécules présentes dans les paysages chimiques. Dans les grottes, les apogons réalisent également des migrations quotidiennes entre l'intérieur et l'extérieur. Comme les mysidacés, ils ont donc un rôle essentiel dans le fonctionnement de l'écosystème et particulièrement dans les échanges de matière avec l'extérieur (Bussotti et al., 2018). Ont-ils la même capacité de reconnaissance de l'habitat, sachant que leur distribution est bien plus large que celle d'*H. margalefi* ? S'agit-il de *homing* ? Qu'en est-il de toutes les autres espèces mobiles inféodées aux grottes sous-marines ? Est-ce que des espèces strictement cavernicoles possèdent les mêmes capacités de reconnaissance de l'habitat que des espèces qui ont des distributions plus larges ?

6.4.2 D'autres interactions à distance relevant de la médiation chimique à révéler

Ces travaux de recherche mêlant écologie expérimentale et métabolomique ouvrent de nombreuses perspectives. Les éponges sont dans tous les écosystèmes, et dominent même par endroits par leur exubérance. Assez naturellement, on serait donc tenté de transposer ces recherches au sein des peuplements d'éponges tropicales. Les espèces les plus massives peuvent faire office d'habitat pour une petite faune mobile, composée par exemple d'une grande diversité d'annélides, de crustacés et d'ophiures. Les auteurs de plusieurs études ont remarqué par exemple que l'ophiure *Ophiothrix oleata* et la crevette *Lysmata pederseni* choisissent systématiquement, parmi plusieurs espèces d'éponges tubulaires, *Callyspongia vaginalis* comme habitat (Henkel & Pawlik, 2005, 2011 ; Baeza et al., 2016 ; Ashur & Dixson, 2019). Les auteurs suggèrent qu'il existerait un mécanisme de reconnaissance envers cette espèce d'éponge / leur habitat, et que ce comportement serait potentiellement basé sur la détection de signaux spécifiques émis par cette espèce. La crevette *L. pederseni* effectuant des migrations circadiennes, ce comportement pourrait notamment être considéré comme du *homing* et guidé par la présence de signaux chimiques émis par les éponges elles-mêmes (Ashur & Dixson, 2019). Cependant, aucune de ces études ne s'est intéressée à la composition chimique de l'eau exhalée par l'éponge. La méthodologie développée dans le cadre de ma thèse pourrait ainsi permettre de répondre à ces questions restées en suspens.

En Méditerranée, d'autres exemples d'interaction pourraient être étudiés. Les poissons de l'espèce *Anthias anthias* sont des poissons affectionnant particulièrement les forêts de gorgones ou d'antipathaires (Bo et al., 2012). Une récente étude (Bo et al., 2024) s'est intéressée aux

rythmes diurnes d'*A. anthias* au sein d'un habitat mésophotique dominé par des antipathaires. Des enregistrements vidéo ont permis de montrer que les mouvements verticaux opérés par les poissons entre la colonne d'eau (le jour) et la canopée (la nuit) étaient régulés par les variations d'intensité lumineuse. Sur 21 jours de suivi, ils ont aussi observé que les individus ont toujours choisi trois sites de repos spécifiques dans la canopée. Dans ce cas de figure, on peut se demander si (i) ce comportement pourrait être associé à un comportement de reconnaissance de l'habitat constitué par des gorgones ou des antipathaires, voire même du *homing* et (ii), si cette reconnaissance de sites spécifiques peut relever d'une interaction chimique variant avec les variations à petites échelles spatiales du paysage chimique. En l'occurrence, pour le moment, aucune étude ne s'est intéressée aux exométabolites potentiellement libérés par les gorgonaires ou antipathaires interagissant avec *A. anthias*, alors que ces espèces dites structurantes sont menacées par les activités anthropiques et surtout le changement climatique. Ainsi, étudier ce type d'interaction pourrait révéler de nouveaux processus fonctionnels au sein d'écosystèmes emblématiques, et par ailleurs actuellement fortement impactés par les successions de vagues de chaleur.



Bibliographie

Bibliographie

Aceret, T. L., Sammarco, P. W., & Coll, J. C. (1995). Effects of diterpenes derived from the soft coral Sinularia flexibilis on the eggs, sperm and embryos of the scleractinian corals *Montipora digitata* and *Acropora tenuis*. Marine Biology, 122(2), 317–323. https://doi.org/10.1007/BF00348945

Amon, R. M. W., & Benner, R. (1994). Rapid cycling of high-molecular-weight dissolved organic matter in the ocean. Nature, 369(6481), 549–552. https://doi.org/10.1038/369549a0

Anderson, J. R., & Behringer, D. C. (2013). Spatial dynamics in the social lobster *Panulirus argus* in response to diseased conspecifics. Marine Ecology Progress Series, 474, 191–200. https://doi.org/10.3354/meps10091

Arvedlund, M., & Kavanagh, K. (2009). The Senses and Environmental Cues Used by Marine Larvae of Fish and Decapod Crustaceans to Find Tropical Coastal Ecosystems. In I. Nagelkerken (Ed.), Ecological Connectivity among Tropical Coastal Ecosystems (pp. 135–184). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-90-481-2406-0_5

Asai, N., Fusetani, N., Matsunaga, S., & Sasaki, J. (2000). Sex Pheromones of the Hair Crab *Erimacrus isenbeckii*. Part 1: Isolation and Structures of Novel Ceramides. Tetrahedron, 56(51), 9895–9899. https://doi.org/10.1016/S0040-4020(00)00959-5

Ashur, M. M., & Dixson, D. L. (2019). Multiple environmental cues impact habitat choice during nocturnal homing of specialized reef shrimp. Behavioral Ecology, 30(2), 348–355. https://doi.org/10.1093/beheco/ary171

Atema, J., Kingsford, M., & Gerlach, G. (2002). Larval reef fish could use odour for detection, retention and orientation to reefs. Marine Ecology Progress Series, 241, 151–160. https://doi.org/10.3354/meps241151

Baeza, J. A., Guéron, R., Simpson, L., & Ambrosio, L. J. (2016). Population distribution, host-switching, and chemical sensing in the symbiotic shrimp *Lysmata pederseni*: Implications for its mating system in a changing reef seascape. Coral Reefs, 35(4), 1213–1224. https://doi.org/10.1007/s00338-016-1467-3

Bagnères, A-G., & Hossaert McKey, M. (2017). Ecologie chimique. ISTE editions.

Bakran-Petricioli, T., Vacelet, J., Zibrowius, H., Petricioli, D., Chevaldonné, P., & Rada, T. (2007). New data on the distribution of the 'deep-sea' sponges *Asbestopluma hypogea* and *Oopsacas minuta* in the Mediterranean Sea. Marine Ecology, 28(s1), 10–23. https://doi.org/10.1111/j.1439-0485.2007.00179.x

Balduzzi, A., Bianchi, C. N., Boero, F., Cattaneo Vietti, R., Pansini, M., & Sará, M. (1989). The suspension-feeder communities of a Mediterranean Sea cave. Scientia Marina, 53(2–3), 387–395.

Bauer, J. E., Williams, P. M., & Druffel, E. R. M. (1992). 14C activity of dissolved organic carbon fractions in the north-central Pacific and Sargasso Sea. Nature, 357(6380), 667–670. https://doi.org/10.1038/357667a0

Bauvais, C., Bonneau, N., Blond, A., Pérez, T., Bourguet-Kondracki, M.-L., & Zirah, S. (2017). Furanoterpene Diversity and Variability in the Marine Sponge *Spongia officinalis*, from Untargeted LC–MS/MS Metabolomic Profiling to Furanolactam Derivatives. Metabolites, 7(2), Article 2. https://doi.org/10.3390/metabo7020027

Becker, C. C., Weber, L., Zgliczynski, B., Sullivan, C., Sandin, S., Muller, E., Clark, A. S., Kido Soule, M. C., Longnecker, K., Kujawinski, E. B., & Apprill, A. (2023). Microorganisms and dissolved metabolites distinguish Florida's Coral Reef habitats. PNAS Nexus, 2(9), pgad287. https://doi.org/10.1093/pnasnexus/pgad287

Behringer, D. C., Butler, M. J., & Shields, J. D. (2006). Avoidance of disease by social lobsters. Nature, 441(7092), 421–421. https://doi.org/10.1038/441421a

Bell, J. J. (2008). The functional roles of marine sponges. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 79(3), 341–353. https://doi.org/10.1016/j.ecss.2008.05.002

Bertolino, M., Costa, G., Carella, M., Cattaneo-Vietti, R., Cerrano, C., Pansini, M., Quarta, G., Calcagnile, L., & Bavestrello, G. (2017). The dynamics of a Mediterranean coralligenous sponge assemblage at decennial and millennial temporal scales. PLOS ONE, 12(5), e0177945. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177945

Bett, N. N., & Hinch, S. G. (2015). Attraction of migrating adult sockeye salmon to conspecifics in the absence of natal chemical cues. Behavioral Ecology, 26(4), 1180–1187. https://doi.org/10.1093/beheco/arv062

Bianchi, C.N. & Morri, C., (1994). Studio bionomico comparativo di alcune grotte marine sommerse; definizione di una scala di confinamento. Memorie dell'Istituto italiano di Speleologia 6, 107–123

Bianchi, C. N., & Morri, C. (2000). Marine Biodiversity of the Mediterranean Sea: Situation, Problems and Prospects for Future Research. Marine Pollution Bulletin, 40(5), 367–376. https://doi.org/10.1016/S0025-326X(00)00027-8

Bianchi, C.N. (2003). Flora e fauna: Lineamenti generali e prospettive. In Grotte Marine: Cinquant'Anni di Ricerca in Italia, F. Cicogna et al. (eds). Rome: Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio, 137–14 6.

Bianchi, C.N. & Sanfilippo, R. (2003). Policheti serpuloidei . In Grotte marine: cinquant'anni di ricerca in Italia, F. Cicogna et al. (eds). Rome: Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio, 175–185.

Bianchi, C. N., Gerovasileiou, V., Morri, C., & Froglia, C. (2022). Distribution and Ecology of Decapod Crustaceans in Mediterranean Marine Caves: A Review. Diversity, 14(3), Article 3. https://doi.org/10.3390/d14030176

Blowes, S. A., Supp, S. R., Antão, L. H., Bates, A., Bruelheide, H., Chase, J. M., Moyes, F., Magurran, A., McGill, B., Myers-Smith, I. H., Winter, M., Bjorkman, A. D., Bowler, D. E., Byrnes, J. E. K., Gonzalez, A., Hines, J., Isbell, F., Jones, H. P., Navarro, L. M., … Dornelas, M. (2019). The geography of biodiversity change in marine and terrestrial assemblages. Science, 366(6463), 339–345. https://doi.org/10.1126/science.aaw1620

Bo, M., Bertolino, M., Bavestrello, G., Canese, S., Giusti, M., Angiolillo, M., Pansini, M., & Taviani, M. (2012). Role of deep sponge grounds in the Mediterranean Sea: A case study in southern Italy. Hydrobiologia, 687(1), 163–177. https://doi.org/10.1007/s10750-011-0964-1

Bo, M., Costa, A., Coppari, M., Enrichetti, F., Bavestrello, G., Di Caro, A., Canese, S., & Betti, F. (2024). Diel rhythms of fish frequentation in a temperate mesophotic antipatharian forest and sleeping behaviour of the red swallowtail perch *Anthias anthias* (Linnaeus, 1758). Marine Biology, 171(9), 166. https://doi.org/10.1007/s00227-024-04484-5

Bogdanov, A., Salib, M. N., Chase, A. B., Hammerlindl, H., Muskat, M. N., Luedtke, S., Da Silva, E. B., O'Donoghue, A. J., Wu, L. F., Altschuler, S. J., Molinski, T. F., & Jensen, P. R. (2024). Small molecule in situ resin capture provides a compound first approach to natural product discovery. Nature Communications, 15(1), 5230. https://doi.org/10.1038/s41467-024-49367-x

Bongaerts, P., Ridgway, T., Sampayo, E. M., & Hoegh-Guldberg, O. (2010). Assessing the 'deep reef refugia' hypothesis: Focus on Caribbean reefs. Coral Reefs, 29(2), 309–327. https://doi.org/10.1007/s00338-009-0581-x

Bongaerts, P., & Smith, T. B. (2019). Beyond the "Deep Reef Refuge" Hypothesis: A Conceptual Framework to Characterize Persistence at Depth. In Y. Loya, K. A. Puglise, & T. C. L. Bridge (Eds.), Mesophotic Coral Ecosystems (pp. 881–895). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-92735-0_45

Bouchard, B., Barnagaud, J.-Y., Poupard, M., Glotin, H., Gauffier, P., Torres Ortiz, S., Lisney, T. J., Campagna, S., Rasmussen, M., & Célérier, A. (2019). Behavioural responses of humpback whales to food-related chemical stimuli. PLOS ONE, 14(2), e0212515. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212515

Boudreau, B., Bourget, E., & Simard, Y. (1993). Behavioural responses of competent lobster postlarvae to odor plumes. Marine Biology, 117(1), 63–69. https://doi.org/10.1007/BF00346426

Boullis, A., Fassotte, B., Sarles, L., Lognay, G., Heuskin, S., Vanderplanck, M., Bartram, S., Haubruge, E., Francis, F., & Verheggen, F. J. (2017). Elevated Carbon Dioxide Concentration Reduces Alarm Signaling in Aphids. Journal of Chemical Ecology, 43(2), 164–171. https://doi.org/10.1007/s10886-017-0818-z

Bourdillon, A., & Castelbon, C. (1983). Influence des variations de température sur la géotaxie de deux espèces de mysidacés. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 71(2), 105–117. https://doi.org/10.1016/0022-0981(93)90067-X

Burks, R. L., & Lodge, D. M. (2002). [No title found]. Journal of Chemical Ecology, 28(10), 1901–1917. https://doi.org/10.1023/A:1020785525081

Busquets, A., Fornós, J., Zafra, F., Lalucat, J., & Merino, A. (2014). Microbial communities in a coastal cave: Cova des Pas de Vallgornera (Mallorca, Western Mediterranean). International Journal of Speleology, 43(2), 205–216. https://doi.org/10.5038/1827-806X.43.2.8

Bussotti, S., Guidetti, P., & Belmonte, G. (2003). Distribution patterns of the cardinal fish, Apogon imberbis , in shallow marine caves in southern Apulia (SE Italy). Italian Journal of Zoology, 70(2), 153–157. https://doi.org/10.1080/11250000309356509

Bussotti, S., Terlizzi, A., Fraschetti, S., Belmonte, G., & Boero, F. (2006). Spatial and temporal variability of sessile benthos in shallow Mediterranean marine caves. Marine Ecology Progress Series, 325, 109–119. https://doi.org/10.3354/meps325109

Bussotti, S., & Guidetti, P. (2009). Do Mediterranean fish assemblages associated with marine caves and rocky cliffs differ? Estuarine, Coastal and Shelf Science, 81(1), 65–73. https://doi.org/10.1016/j.ecss.2008.09.023

Bussotti, S., Di Franco, A., Bianchi, C. N., Chevaldonné, P., Egea, L., Fanelli, E., Lejeusne, C., Musco, L., Navarro-Barranco, C., Pey, A., Planes, S., Vieux-Ingrassia, J. V., & Guidetti, P. (2018). Fish mitigate trophic depletion in marine cave ecosystems. Scientific Reports, 8(1), 9193. https://doi.org/10.1038/s41598-018-27491-1

Simmler, C., Kulakowski, D., Lankin C. D., McAlpine B. J., Chen S-N., & Guido, F.P. (2016). Holistic Analysis Enhances the Description of Metabolic Complexity in Dietary Natural Products. Advances in Nutrition (Bethesda, Md.), 7(1). https://doi.org/10.3945/an.115.009928

Cachet, N., Genta-Jouve, G., Ivanisevic, J., Chevaldonné, P., Sinniger, F., Culioli, G., Pérez, T., & Thomas, O. P. (2015). Metabolomic profiling reveals deep chemical divergence between two morphotypes of the zoanthid *Parazoanthus axinellae*. Scientific Reports, 5(1), 8282. https://doi.org/10.1038/srep08282

Cantasano, N. (2023). The effects of climate changes on *Posidonia oceanica* meadows in the Mediterranean Basin. Natural Resources Conservation and Research, 6(1), Article 1. https://doi.org/10.24294/nrcr.v6i1.1961

Carroll, A., R. Copp, B., Grkovic, T., A. Keyzers, R., & R. Prinsep, M. (2024). Marine natural products. Natural Product Reports, 41(2), 162–207. https://doi.org/10.1039/D3NP00061C

Castañeda-Fernández De Lara, V., Butler, M., Hernández-Vázquez, S., Guzmán Del Próo, S., & Serviere-Zaragoza, E. (2005). Determination of preferred habitats of early benthic juvenile California spiny lobster, *Panulirus interruptus*, on the Pacific coast of Baja California Sur, Mexico. Marine and Freshwater Research, 56(7), 1037. https://doi.org/10.1071/MF04284

Catalá, T. S., Shorte, S., & Dittmar, T. (2021). Marine dissolved organic matter: A vast and unexplored molecular space. Applied Microbiology and Biotechnology, 105(19), 7225–7239. https://doi.org/10.1007/s00253-021-11489-3

Cebrian, E., Linares, C., Marschal, C., & Garrabou, J. (2012). Exploring the effects of invasive algae on the persistence of gorgonian populations. Biological Invasions, 14(12), 2647–2656. https://doi.org/10.1007/s10530-012-0261-6

Chevaldonné, P., & Lejeusne, C. (2003). Regional warming-induced species shift in north-west Mediterranean marine caves. Ecology Letters, 6(4), 371–379. https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2003.00439.x

Chevaldonné, P., Rastorgueff, P.-A., Arslan, D., & Lejeusne, C. (2015). Molecular and distribution data on the poorly known, elusive, cave mysid *Harmelinella mariannae* (Crustacea: Mysida). Marine Ecology, 36(3), 305–317. https://doi.org/10.1111/maec.12139

Coll, J. C., Bowden, B. F., Tapiolas, D. M., & Dunlap, W. C. (1982). In situ isolation of allelochemicals released from soft corals (Coelenterata: Octocorallia): A totally submersible sampling apparatus. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 60(2–3), 293–299. https://doi.org/10.1016/0022-0981(82)90166-6

Coll, M., Piroddi, C., Steenbeek, J., Kaschner, K., Ben Rais Lasram, F., Aguzzi, J., Ballesteros, E., Bianchi, C. N., Corbera, J., Dailianis, T., Danovaro, R., Estrada, M., Froglia, C., Galil, B. S., Gasol, J. M., Gertwagen, R., Gil, J., Guilhaumon, F., Kesner-Reyes, K., … Voultsiadou, E.

(2010). The Biodiversity of the Mediterranean Sea: Estimates, Patterns, and Threats. PLoS ONE, 5(8), e11842. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011842

Coma, R., Carola, M., Riera, T., & Zabala, M. (1997). Horizontal Transfer of Matter by a Cave-Dwelling Mysid. Marine Ecology, 18(3), 211–226. https://doi.org/10.1111/j.1439-0485.1997.tb00438.x

Coppock, A. G., Gardiner, N. M., & Jones, G. P. (2013). Olfactory discrimination in juvenile coral reef fishes: Response to conspecifics and corals. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 443, 21–26. https://doi.org/10.1016/j.jembe.2013.02.026

Corriero, G., Scalera Liaci, L., Ruggiero, D., & Pansini, M. (2000). The Sponge Community of a Semi-Submerged Mediterranean Cave. Marine Ecology, 21(1), 85–96. https://doi.org/10.1046/j.1439-0485.2000.00655.x

Crouau, Y. (1986). Étude du comportement rhéotaxique d'un mysidacé cavernicole. Crustaceana, 50(1), 7–10. https://doi.org/10.1163/156854085X00026

Da-Anoy, J. P., Villanueva, R. D., Cabaitan, P. C., & Conaco, C. (2017). Effects of coral extracts on survivorship, swimming behavior, and settlement of *Pocillopora damicornis* larvae. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 486, 93–97. https://doi.org/10.1016/j.jembe.2016.10.006

Dacey, J. W. H., & Wakeham, S. G. (1986). Oceanic Dimethylsulfide: Production During Zooplankton Grazing on Phytoplankton. Science, 233(4770), 1314–1316. https://doi.org/10.1126/science.233.4770.1314

De Goeij, J. M., Van Oevelen, D., Vermeij, M. J. A., Osinga, R., Middelburg, J. J., De Goeij, A. F. P. M., & Admiraal, W. (2013). Surviving in a Marine Desert: The Sponge Loop Retains Resources Within Coral Reefs. Science, 342(6154), 108–110. https://doi.org/10.1126/science.1241981

DeBose, J. L., & Nevitt, G. A. (2008). The use of odors at different spatial scales: comparing birds with fish. Journal of Chemical Ecology, 34(7), 867–881. https://doi.org/10.1007/s10886-008-9493-4

DeBose, J. L., & Paul, V. J. (2014). Chemical signatures of multi-species foraging aggregations are attractive to fish. Marine Ecology Progress Series, 498, 243–248. https://doi.org/10.3354/meps10617

Degnan, B. M., & Johnson, C. R. (1999). Inhibition of Settlement and Metamorphosis of the Ascidian *Herdmania curvata* by Non-Geniculate Coralline Algae. Biological Bulletin, 197(3), 332–340. https://doi.org/10.2307/1542787

Derby, C. D., Kozma, M. T., Senatore, A., & Schmidt, M. (2016). Molecular Mechanisms of Reception and Perireception in Crustacean Chemoreception: A Comparative Review. Chemical Senses, 41(5), 381–398. https://doi.org/10.1093/chemse/bjw057

Derrien, M., Santonja, M., Greff, S., Figueres, S., Simmler, C., Chevaldonné, P., & Pérez, T. (2024a). Circadian migrations of cave-dwelling crustaceans guided by their home chemical seascape. Frontiers in Marine Science, 11. https://doi.org/10.3389/fmars.2024.1448616

Derrien, M., Chevaldonné, P., & Pérez, T. (2024b). Patterns of benthic diversity in marine underwater caves of the Marseille Region (France, North-Western Mediterranean Sea). Mediterranean Marine Science, 25(3), 666–681. https://doi.org/10.12681/mms.38566

Devine, B. M., Munday, P. L., & Jones, G. P. (2012). Homing ability of adult cardinalfish is affected by elevated carbon dioxide. Oecologia, 168(1), 269–276. https://doi.org/10.1007/s00442-011-2081-2

Digenis, M., Arvanitidis, C., Dailianis, T., & Gerovasileiou, V. (2022). Comparative Study of Marine Cave Communities in a Protected Area of the South-Eastern Aegean Sea, Greece. Journal of Marine Science and Engineering, 10(5), 660. https://doi.org/10.3390/jmse10050660

Dimarchopoulou, D., Gerovasileiou, V., & Voultsiadou, E. (2018). Spatial variability of sessile benthos in a semi-submerged marine cave of a remote Aegean Island (eastern Mediterranean Sea). Regional Studies in Marine Science, 17, 102–111. https://doi.org/10.1016/j.rsma.2017.11.015

Dove, A. D. M. (2015). Foraging and ingestive behaviors of whale sharks, *rhincodon typus*, in response to chemical stimulus cues. The Biological Bulletin, 228(1), 65–74. https://doi.org/10.1086/BBLv228n1p65

Dührkop, K., Fleischauer, M., Ludwig, M., Aksenov, A. A., Melnik, A. V., Meusel, M., Dorrestein, P. C., Rousu, J., & Böcker, S. (2019). SIRIUS 4: A rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. Nature Methods, 16(4), 299–302. https://doi.org/10.1038/s41592-019-0344-8

Duque, C., Bonilla, A., Bautista, E., & Zea, S. (2001). Exudation of low molecular weight compounds (thiobismethane, methyl isocyanide, and methyl isothiocyanate) as a possible chemical defense mechanism in the marine sponge *Ircinia felix*. Biochemical Systematics and Ecology, 29(5), 459–467. https://doi.org/10.1016/S0305-1978(00)00081-8

Duran, S., Giribet, G., & Turon, X. (2004). Phylogeographical history of the sponge *Crambe crambe* (Porifera, Poecilosclerida): Range expansion and recent invasion of the Macaronesian islands from the Mediterranean Sea. Molecular Ecology, 13(1), 109–122. https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.02022.x

Dyer, L. A., Philbin, C. S., Ochsenrider, K. M., Richards, L. A., Massad, T. J., Smilanich, A. M., Forister, M. L., Parchman, T. L., Galland, L. M., Hurtado, P. J., Espeset, A. E., Glassmire, A. E., Harrison, J. G., Mo, C., Yoon, S., Pardikes, N. A., Muchoney, N. D., Jahner, J. P., Slinn, H. L., … Jeffrey, C. S. (2018). Modern approaches to study plant–insect interactions in chemical ecology. Nature Reviews Chemistry, 2(6), 50–64. https://doi.org/10.1038/s41570-018-0009-7

Endres, C. S., Putman, N. F., Ernst, D. A., Kurth, J. A., Lohmann, C. M. F., & Lohmann, K. J. (2016). Multi-Modal Homing in Sea Turtles: Modeling Dual Use of Geomagnetic and Chemical Cues in Island-Finding. Frontiers in Behavioral Neuroscience, 10. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2016.00019

Engel, S., & Pawlik, J. (2000). Allelopathic activities of sponge extracts. Marine Ecology Progress Series, 207, 273–281. https://doi.org/10.3354/meps207273

Eyun, S., Soh, H. Y., Posavi, M., Munro, J. B., Hughes, D. S. T., Murali, S. C., Qu, J., Dugan, S., Lee, S. L., Chao, H., Dinh, H., Han, Y., Doddapaneni, H., Worley, K. C., Muzny, D. M., Park, E.-O., Silva, J. C., Gibbs, R. A., Richards, S., & Lee, C. E. (2017). Evolutionary History of Chemosensory-Related Gene Families across the Arthropoda. Molecular Biology and Evolution, 34(8), 1838–1862. https://doi.org/10.1093/molbev/msx147

Fearon, R. J., & Cameron, A. M. (1996). Larvotoxic extracts of the hard coral *goniopora tenuidens:* Allelochemicals that limit settlement of potential competitors? Toxicon, 34(3), 361–367. https://doi.org/10.1016/0041-0101(95)00137-9

Fearon, R. J., & Cameron, A. M. (1997). Preliminary Evidence Supporting the Ability of Hermatypic Corals to Affect Adversely Larvae and Early Settlement Stages of Hard Coral Competitors. Journal of Chemical Ecology, 23(7), 1769–1780. https://doi.org/10.1023/B:JOEC.0000006450.55638.b2

Fichez, R. 1989. Phénomènes d'oligotrophie en milieu aphotique. Étude des grottes sous-marines, comparaison avec les milieux profonds et bilans énergétiques. Thèse de Doctorat, Université d'Aix-Marseille II, France.

Fichez, R. (1990). Decrease in allochthonous organic inputs in dark submarine caves, connection with lowering in benthic community richness. Hydrobiologia, 207(1), 61–69. https://doi.org/10.1007/BF00041441

Fichez, R. (1991). Suspended particulate organic matter in a Mediterranean submarine cave. Marine Biology, 108(1), 167–174. https://doi.org/10.1007/BF01313485

Fiore, C. L., Freeman, C. J., & Kujawinski, E. B. (2017). Sponge exhalent seawater contains a unique chemical profile of dissolved organic matter. PeerJ, 5, e2870. https://doi.org/10.7717/peerj.2870

Francesch, A. M., Glaser, K. B., Jaspars, M., Jiménez, C., Luesch, H., Mayer, A. M., Newman, D. J., Pierce, M. L., & Jaspars, O. T.-S. author M. (2024, July 30). Pharmaceuticals from marine sources: Past, present and future. The Pharmaceutical Journal. https://pharmaceutical-journal.com/article/research/pharmaceuticals-from-marine-sources-past-present-and-future

Frérot, B., Leppik, E., Groot, A. T., Unbehend, M., & Holopainen, J. K. (2017). Chapter Five—Chemical Signatures in Plant–Insect Interactions. In N. Sauvion, D. Thiéry, & P.-A. Calatayud (Eds.), Advances in Botanical Research (Vol. 81, pp. 139–177). Academic Press. https://doi.org/10.1016/bs.abr.2016.10.003

Galen, C., Kaczorowski, R., Todd, S. L., Geib, J., & Raguso, R. A. (2011). Dosage-Dependent Impacts of a Floral Volatile Compound on Pollinators, Larcenists, and the Potential for Floral Evolution in the Alpine Skypilot *Polemonium viscosum*. The American Naturalist, 177(2), 258–272. https://doi.org/10.1086/657993

Galil, B. S. (2009). Taking stock: Inventory of alien species in the Mediterranean Sea. Biological Invasions, 11(2), 359–372. https://doi.org/10.1007/s10530-008-9253-y

García-Vilas, J. A., Martínez-Poveda, B., Quesada, A. R., & Medina, M. Á. (2016). aeroplysinin-1, a Sponge-Derived Multi-Targeted Bioactive Marine Drug. Marine Drugs, 14(1), Article 1. https://doi.org/10.3390/md14010001

Garrabou, J., Coma, R., Bensoussan, N., Bally, M., Chevaldonné, P., Cigliano, M., Diaz, D., Harmelin, J. G., Gambi, M. C., Kersting, D. K., Ledoux, J. B., Lejeusne, C., Linares, C., Marschal, C., Pérez, T., Ribes, M., Romano, J. C., Serrano, E., Teixido, N., … Cerrano, C. (2009). Mass mortality in Northwestern Mediterranean rocky benthic communities: Effects of the 2003 heat wave. Global Change Biology, 15(5), 1090–1103. https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2008.01823.x

Garrabou, J., Gómez-Gras, D., Medrano, A., Cerrano, C., Ponti, M., Schlegel, R., Bensoussan, N., Turicchia, E., Sini, M., Gerovasileiou, V., Teixido, N., Mirasole, A., Tamburello, L.,

Cebrian, E., Rilov, G., Ledoux, J.-B., Souissi, J. B., Khamassi, F., Ghanem, R., … Harmelin, J.-G. (2022). Marine heatwaves drive recurrent mass mortalities in the Mediterranean Sea. Global Change Biology, 28(19), 5708–5725. https://doi.org/10.1111/gcb.16301

Garson, M. J. (2002). Chemical Signals from Sponges and their Allelopathic Effects on Other Marine Animals. In B. Şener (Ed.), Biodiversity: Biomolecular Aspects of Biodiversity and Innovative Utilization (pp. 179–185). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9242-0_19

Gerovasileiou, V., & Voultsiadou, E. (2012). Marine Caves of the Mediterranean Sea: A Sponge Biodiversity Reservoir within a Biodiversity Hotspot. PLoS ONE, 7(7), e39873. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039873

Gerovasileiou, V., & Voultsiadou, E. (2016). Sponge diversity gradients in marine caves of the eastern Mediterranean. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 96(2), 407–416. https://doi.org/10.1017/S0025315415000697

Gerovasileiou, V., & Bianchi, C. N. (2021). Mediterranean Marine Caves: A Synthesis of Current Knowledge. In S. J. Hawkins, A. J. Lemasson, A. L. Allcock, A. E. Bates, M. Byrne, A. J. Evans, L. B. Firth, E. M. Marzinelli, B. D. Russell, I. P. Smith, S. E. Swearer, & P. A. Todd, Oceanography and Marine Biology (1st ed., pp. 1–87). CRC Press. https://doi.org/10.1201/9781003138846-1

Giakoumi, S., Sini, M., Gerovasileiou, V., Mazor, T., Beher, J., Possingham, H. P., Abdulla, A., Çinar, M. E., Dendrinos, P., Gucu, A. C., Karamanlidis, A. A., Rodic, P., Panayotidis, P., Taskin, E., Jaklin, A., Voultsiadou, E., Webster, C., Zenetos, A., & Katsanevakis, S. (2013). Ecoregion-Based Conservation Planning in the Mediterranean: Dealing with Large-Scale Heterogeneity. PLoS ONE, 8(10), e76449. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076449

Gómez-Gras, D., Linares, C., de Caralt, S., Cebrian, E., Frleta-Valić, M., Montero-Serra, I., Pagès-Escolà, M., López-Sendino, P., & Garrabou, J. (2019). Response diversity in Mediterranean coralligenous assemblages facing climate change: Insights from a multispecific thermotolerance experiment. Ecology and Evolution, 9(7), 4168–4180. https://doi.org/10.1002/ece3.5045

Gómez-Gras, D., Linares, C., Dornelas, M., Madin, J. S., Brambilla, V., Ledoux, J., López-Sendino, P., Bensoussan, N., & Garrabou, J. (2021). Climate change transforms the functional identity of Mediterranean coralligenous assemblages. Ecology Letters, 24(5), 1038–1051. https://doi.org/10.1111/ele.13718

Granum, E., Kirkvold, S., & Myklestad, S. (2002). Cellular and extracellular production of carbohydrates and amino acids by the marine diatom *Skeletonema costatum*: Diel variations and effects of N depletion. Marine Ecology Progress Series, 242, 83–94. https://doi.org/10.3354/meps242083

Grenier, M., Ruiz, C., Fourt, M., Santonja, M., Dubois, M., Klautau, M., Vacelet, J., Boury-Esnault, N., & Pérez, T. (2018). Sponge inventory of the French Mediterranean waters, with an emphasis on cave-dwelling species. Zootaxa, 4466(1), 205–228. https://doi.org/10.11646/zootaxa.4466.1.16

Grenier, M., Tal, I., Pierre, C., & Thierry, P. (2023). Mediterranean marine keystone species on the brink of extinction. Global Change Biology, 29(7), 1681–1683. https://doi.org/10.1111/gcb.16597

Grenier, M., Simmler, C., Chevaldonné, P., Callizot, N., & Pérez, T. (2024). Searching for Mediterranean bath sponges (Demospongiae: Dictyoceratida: Spongiidae) in the Northeast Atlantic reveals a new species: an integrative taxonomic approach. Zoological Journal of the Linnean Society, 202(1), zlad166. https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlad166

Groot, A. T., & Zizzari, Z. V. (2019). Does climate warming influence sexual chemical signaling? Animal Biology, 69(1), 83–93. https://doi.org/10.1163/15707563-20191103

Gunn, J. 2004. Encyclopedia of Caves and Karst Science. New York: Fitzroy Dearborn.

Hamrén, U., & Hansson, S. (1999). A mysid shrimp (*Mysis mixta*) is able to detect the odour of its predator (*Clupea harengus*). Ophelia, 51(3), 187–191. https://doi.org/10.1080/00785326.1999.10409408

Hansell, D., Carlson, C., Repeta, D., & Schlitzer, R. (2009). Dissolved Organic Matter in the Ocean: A Controversy Stimulates New Insights. Oceanography, 22(4), 202–211. https://doi.org/10.5670/oceanog.2009.109

Hansell, D. A. (2013). Recalcitrant Dissolved Organic Carbon Fractions. Annual Review of Marine Science, 5(Volume 5, 2013), 421–445. https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120710-100757

Hansell, D. A., & Carlson, C. A. (2014). Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter. Academic Press.

Hansson, B. S., & Stensmyr, M. C. (2011). Evolution of Insect Olfaction. Neuron, 72(5), 698–711. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.11.003

Hardege, J. D., Bartels-Hardege, H. D., Fletcher, N., Terschak, J. A., Harley, M., Smith, M. A., Davidson, L., Hayden, D., Müller, C. T., Lorch, M., Welham, K., Walther, T., & Bublitz, R. (2011). Identification of a female sex pheromone in *Carcinus maenas*. Marine Ecology Progress Series, 436, 177–189. https://doi.org/10.3354/meps09226

Harmelin, J.-G. 1969. Bryozoaires des grottes sous-marines obscures de la région marseillaise, faunistique et écologie. Téthys 1, 793–806.

Harmelin, J.-G. 1985. Bryozoan dominated assemblages in Mediterranean cryptic environments. p. 143. In: Bryozoa: Ordovician to recent, C. Nielsen & G. P. Larwood (Eds). Olsen & Olsen, Fredensborg.

Harmelin, J. G., J. Vacelet, P. Vasseur. (1985). Les grottes sous-marines obscures : Un milieu extrême et un remarquable biotope refuge. Téthys, 11, 214–229.

Harmelin, J. G., J. Vacelet. (1997). Clues to deep sea biodiversity in a nearshore cave. Vie et Milieu, 47, 351–354.

Harmelin, J.-G., Boury-Esnault, N., Fichez, R., Vacelet, J. & Zibrowius H. (2003). Peuplement de la grotte sous-marine de l'ile de Bagaud (Parc National de Port-Cros, France, Méditerranée). Scientific Reports of the Port-Cros National Park, 19, 117–134.

Hay, M. E. (2009). Marine Chemical Ecology: Chemical Signals and Cues Structure Marine Populations, Communities, and Ecosystems. Annual Review of Marine Science, 1(1), 193–212. https://doi.org/10.1146/annurev.marine.010908.163708

Henkel, T. P., & Pawlik, J. R. (2005). Habitat use by sponge-dwelling brittlestars. Marine Biology, 146(2), 301–313. https://doi.org/10.1007/s00227-004-1448-x

Henkel, T., & Pawlik, J. (2011). Host specialization of an obligate sponge-dwelling brittlestar. Aquatic Biology, 12(1), 37–46. https://doi.org/10.3354/ab00322

Heuschele, J., & Selander, E. (2014). The chemical ecology of copepods. Journal of Plankton Research, 36(4), 895–913. https://doi.org/10.1093/plankt/fbu025

Hildebrand, T., Osterholz, H., Bunse, C., Grotheer, H., Dittmar, T., & Schupp, P. J. (2022). Transformation of dissolved organic matter by two INDO-PACIFIC sponges. Limnology and Oceanography, 67(11), 2483–2496. https://doi.org/10.1002/lno.12214

Hogg, M., Tendal, O., Conway, K., Pomponi, S., van Soest, R., Gutt, J., Krautter, M., & Roberts, J. (2010). Deep-sea sponge grounds: Reservoirs of biodiversity. UNEP-WCMC biodiversity series, 32, 1-86.

Huang, D., Sun, M., Han, M., Zhang, Z., Miao, Y., Zhang, J., & Yao, Y. (2020). Volatile organic compounds (VOCs) regulate the spatial distribution of Lepidoptera insects in an orchard ecosystem. Biological Control, 149, 104311. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104311

Idan, T., Shefer, S., Feldstein, T., Yahel, R., Huchon, D., & Ilan, M. (2018). Shedding light on an East-Mediterranean mesophotic sponge ground community and the regional sponge fauna. Mediterranean Marine Science, 19(1), Article 1. https://doi.org/10.12681/mms.13853

Idan, T., Goren, L., Shefer, S., Brickner, I., & Ilan, M. (2020). Does Depth Matter? Reproduction Pattern Plasticity in Two Common Sponge Species Found in Both Mesophotic and Shallow Waters. Frontiers in Marine Science, 7, 610565. https://doi.org/10.3389/fmars.2020.610565

Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services, I. P. B. E. S. (2019). Summary for policymakers of the global assessment report on biodiversity and ecosystem services

Ivanisevic, J., Pérez, T., Ereskovsky, A. V., Barnathan, G., & Thomas, O. P. (2011a). Lysophospholipids in the Mediterranean Sponge *Oscarella tuberculata*: Seasonal Variability and Putative Biological Role. Journal of Chemical Ecology, 37(5), 537–545. https://doi.org/10.1007/s10886-011-9943-2

Ivanišević, J., Thomas, O. P., Lejeusne, C., Chevaldonné, P., & Pérez, T. (2011b). Metabolic fingerprinting as an indicator of biodiversity: Towards understanding inter-specific relationships among Homoscleromorpha sponges. Metabolomics, 7(2), 289–304. https://doi.org/10.1007/s11306-010-0239-2

Jepsen, M. R., Kuemmerle, T., Müller, D., Erb, K., Verburg, P. H., Haberl, H., Vesterager, J. P., Andrič, M., Antrop, M., Austrheim, G., Björn, I., Bondeau, A., Bürgi, M., Bryson, J., Caspar, G., Cassar, L. F., Conrad, E., Chromý, P., Daugirdas, V., … Reenberg, A. (2015). Transitions in European land-management regimes between 1800 and 2010. Land Use Policy, 49, 53–64. https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2015.07.003

John, U., Tillmann, U., Hülskötter, J., Alpermann, T. J., Wohlrab, S., & Van De Waal, D. B. (2015). Intraspecific facilitation by allelochemical mediated grazing protection within a toxigenic dinoflagellate population. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 282(1798), 20141268. https://doi.org/10.1098/rspb.2014.1268

Paul J., V., & Puglisi P., M. (2004). Chemical mediation of interactions among marine organisms. Natural Product Reports, 21(1), 189–209. https://doi.org/10.1039/B302334F

Kamio, M., Schmidt, M., Germann, M. W., Kubanek, J., & Derby, C. D. (2014). The smell of moulting: N-acetylglucosamino-1,5-lactone is a premoult biomarker and candidate component of the courtship pheromone in the urine of the blue crab, *Callinectes sapidus*. Journal of Experimental Biology, 217(8), 1286–1296. https://doi.org/10.1242/jeb.099051

Kamio, M., & Derby, C. D. (2017). Finding food: How marine invertebrates use chemical cues to track and select food. Natural Product Reports, 34(5), 514–528. https://doi.org/10.1039/C6NP00121A

Kamio, M., Yambe, H., & Fusetani, N. (2022). Chemical cues for intraspecific chemical communication and interspecific interactions in aquatic environments: Applications for fisheries and aquaculture. Fisheries Science, 88(2), 203–239. https://doi.org/10.1007/s12562-021-01563-0

Kessler, A., Halitschke, R., & Poveda, K. (2011). Herbivory-mediated pollinator limitation: Negative impacts of induced volatiles on plant–pollinator interactions. Ecology, 92(9), 1769–1780. https://doi.org/10.1890/10-1945.1

Kim, H. W., Wang, M., Leber, C. A., Nothias, L.-F., Reher, R., Kang, K. B., Van Der Hooft, J. J. J., Dorrestein, P. C., Gerwick, W. H., & Cottrell, G. W. (2021). NPClassifier: A Deep Neural Network-Based Structural Classification Tool for Natural Products. Journal of Natural Products, 84(11), 2795–2807. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c00399

Kittredge JS, Terry M, Takahashi FT (1971) Sex pheromone activity of the molting hormone, crustecdysone, on male crabs. Fish Bull 69:337–343

Kovalerchik, D., Singh, R. P., Schlesinger, P., Mahajni, A., Shefer, S., Fridman, M., Ilan, M., & Carmeli, S. (2020). Bromopyrrole Alkaloids of the Sponge *Agelas oroides* Collected Near the Israeli Mediterranean Coastline. Journal of Natural Products, 83(2), 374–384. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00863

Kremen, C., Williams, N. M., & Thorp, R. W. (2002). Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification. Proceedings of the National Academy of Sciences, 99(26), 16812–16816. https://doi.org/10.1073/pnas.262413599

Laborel, J. & Vacelet, J. 1958. Étude des peuplements d'une grotte sous-marine du Golfe de Marseille. Bulletin de l'Institut Océanographique de Monaco, 1120, 1–20

Laborel, J. & Vacelet, J. 1959. Les grottes sous-marines obscures en Méditerranée. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, 248, 2619–2621.

La Barre, S. (2014). Marine Biodiversity and Chemodiversity—The Treasure Troves of the Future. In O. Grillo (Ed.), Biodiversity—The Dynamic Balance of the Planet. InTech. https://doi.org/10.5772/57394

Lambidis, S. P., Schramm, T., Steuer-Lodd, K., Farrell, S., Stincone, P., Schmid, R., Koester, I., Torres, R., Aluwihare, L., Simon, C., & Petras, D. (2023). Two-Dimensional Liquid Chromatography Tandem-Mass Spectrometry Untangles the Deep Metabolome of Marine Dissolved Organic Matter. ChemRxiv. https://doi.org/10.26434/chemrxiv-2023-j1bxh

Law, K. P., He, W., Tao, J., & Zhang, C. (2021). Characterization of the Exometabolome of *Nitrosopumilus maritimus* SCM1 by Liquid Chromatography–Ion Mobility Mass Spectrometry. Frontiers in Microbiology, 12, 658781. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.658781

Lecchini, D., Mills, S. C., Brié, C., Maurin, R., & Banaigs, B. (2010). Ecological determinants and sensory mechanisms in habitat selection of crustacean postlarvae. Behavioral Ecology, 21(3), 599–607. https://doi.org/10.1093/beheco/arq029

Lecchini, D., & Nakamura, Y. (2013). Use of chemical cues by coral reef animal larvae for habitat selection. Aquatic Biology, 19(3), 231–238. https://doi.org/10.3354/ab00532

Lecchini, D., Waqalevu, V., Parmentier, E., Radford, C., & Banaigs, B. (2013). Fish larvae prefer coral over algal water cues: Implications of coral reef degradation. Marine Ecology Progress Series, 475, 303–307. https://doi.org/10.3354/meps10094

Lecchini, D., Miura, T., Lecellier, G., Banaigs, B., & Nakamura, Y. (2014). Transmission distance of chemical cues from coral habitats: Implications for marine larval settlement in context of reef degradation. Marine Biology, 161(7), 1677–1686. https://doi.org/10.1007/s00227-014-2451-5

Lecchini, D., Dixson, D. L., Lecellier, G., Roux, N., Frédérich, B., Besson, M., Tanaka, Y., Banaigs, B., & Nakamura, Y. (2017). Habitat selection by marine larvae in changing chemical environments. Marine Pollution Bulletin, 114(1), 210–217. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.08.083

Ledoyer, M. (1989). Les mysidacés (Crustacea) des grottes sous-marines obscures de Méditerranée nord-occidentale et du proche Atlantique (Portugal et Madère). Marine Nature, 2, 39−62

Lejeusne, C., & Chevaldonné, P. (2005). Population structure and life history of *Hemimysis margalefi* (Crustacea: Mysidacea), a thermophilic cave-dwelling species benefiting from the warming of the NW Mediterranean. Marine Ecology Progress Series, 287, 189–199. https://doi.org/10.3354/meps287189

Lejeusne, C., & Chevaldonné, P. (2006). Brooding crustaceans in a highly fragmented habitat: The genetic structure of Mediterranean marine cave-dwelling mysid populations: Mediterranean cave mysid genetic structure. Molecular Ecology, 15(13), 4123–4140. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03101.x

Lejeusne, C., Chevaldonné, P., Pergent-Martini, C., Boudouresque, C. F., & Pérez, T. (2010). Climate change effects on a miniature ocean: The highly diverse, highly impacted Mediterranean Sea. Trends in Ecology & Evolution, 25(4), 250–260. https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.10.009

Lozano-Álvarez, E., Cid-González, L. N., Candia-Zulbarán, R. I., Negrete-Soto, F., Barradas-Ortiz, C., & Briones-Fourzán, P. (2018). Avoiding disease *vs.* avoiding predation: Testing the trade-off in *Panulirus argus*. Bulletin of Marine Science, 94(3), 657–674. https://doi.org/10.5343/bms.2017.1128

Macquart-Moulin C. & Passelaigue F. (1982). Mouvements nychtéméraux *d'Hemimysis speluncola* Ledoyer, espèce cavernicole, et de *Leptomysis lingvura* GO Sars, espèce non-cavernicole (Crustacea, Mysidacea). Tethys 10, 221.

Maki, J. S., & Mitchell, R. (2003). Biofouling in the Marine Environment. https://doi.org/10.1002/0471263397.env275

Martí, R., Uriz, M. J., Ballesteros, E., & Turon, X. (2004). Benthic assemblages in two Mediterranean caves: Species diversity and coverage as a function of abiotic parameters and

geographic distance. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 84(3), 557–572. https://doi.org/10.1017/S0025315404009567h

Massalha, H., Korenblum, E., Tholl, D., & Aharoni, A. (2017). Small molecules below-ground: The role of specialized metabolites in the rhizosphere. The Plant Journal, 90(4), 788–807. https://doi.org/10.1111/tpj.13543

Mauduit, M., Greff, S., Herbette, G., Naubron, J.-V., Chentouf, S., Huy Ngo, T., Nam, J.-W., Molinari, S., Mabrouki, F., Garayev, E., Baghdikian, B., Pérez, T., & Simmler, C. (2022). Diving into the Molecular Diversity of *Aplysina cavernicola's* Exometabolites: Contribution of Bromo-Spiroisoxazoline Alkaloids. ACS Omega, 7(47), 43068–43083. https://doi.org/10.1021/acsomega.2c05415

Mauduit, M., Derrien, M., Grenier, M., Greff, S., Molinari, S., Chevaldonné, P., Simmler, C., & Pérez, T. (2023). In Situ Capture and Real-Time Enrichment of Marine Chemical Diversity. ACS Central Science, 9(11), 2084–2095. https://doi.org/10.1021/acscentsci.3c00661

Mauduit, M., Greff, S., Derrien, M., & Simmler, C. (2025). Describing the complex chemistry of benthic seawater: From exometabolite sampling strategies to MS-based metabolomics. Natural Product Reports, 10.1039. D4NP00064A. https://doi.org/10.1039/D4NP00064A

Meinwald, J., Leal, W. S., & Kubanek, J. (2018). Molecules as Biotic Messengers. ACS Omega, 3(4), 4048–4053. https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00268

Michener, C. D. (2007). The Bees of the World. JHU Press.

Morri, C., Bianchi, C.N., Degl'Innocenti, F., Diviacco, G., Forti, S., Maccarone, M., Niccolai, I., Sgorbini, S. & Tucci, S. 1994a. Gradienti fisico-chimici e ricoprimento biologico nella Grotta Marina di Bergeggi (Mar Ligure). Memorie dell'Istituto Italiano di Speleologia serie II, 6, 85–94.

Munday, P. L., Dixson, D. L., Donelson, J. M., Jones, G. P., Pratchett, M. S., Devitsina, G. V., & Døving, K. B. (2009). Ocean acidification impairs olfactory discrimination and homing ability of a marine fish. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(6), 1848–1852. https://doi.org/10.1073/pnas.0809996106

Mutalipassi, M., Mazzella, V., Schott, M., Fink, P., Glaviano, F., Porzio, L., Lorenti, M., Buia, M. C., von Elert, E., & Zupo, V. (2022). Ocean acidification affects volatile infochemicals production and perception in fauna and flora associated with *Posidonia oceanica* (L.) Delile. Frontiers in Marine Science, 9. https://doi.org/10.3389/fmars.2022.809702 /

Nelson, C. E., Goldberg, S. J., Wegley Kelly, L., Haas, A. F., Smith, J. E., Rohwer, F., & Carlson, C. A. (2013). Coral and macroalgal exudates vary in neutral sugar composition and differentially enrich reef bacterioplankton lineages. The ISME Journal, 7(5), 962–979. https://doi.org/10.1038/ismej.2012.161

Nelson, C. E., Wegley Kelly, L., & Haas, A. F. (2023). Microbial Interactions with Dissolved Organic Matter Are Central to Coral Reef Ecosystem Function and Resilience. Annual Review of Marine Science, 15(1), 431–460. https://doi.org/10.1146/annurev-marine-042121-080917

Nevitt, G. (2000). Olfactory foraging by Antarctic procellariiform seabirds: Life at high Reynolds numbers. The Biological Bulletin, 198(2), 245–253. https://doi.org/10.2307/1542527

Nocchi, N., Soares, A. R., Souto, M. L., Fernández, J. J., Martin, M. N., & Pereira, R. C. (2017). Detection of a chemical cue from the host seaweed *Laurencia dendroidea* by the associated mollusc *Aplysia brasiliana*. PLOS ONE, 12(11), e0187126. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187126

Noriega-Ortega, B. E., Wienhausen, G., Mentges, A., Dittmar, T., Simon, M., & Niggemann, J. (2019). Does the Chemodiversity of Bacterial Exometabolomes Sustain the Chemodiversity of Marine Dissolved Organic Matter? Frontiers in Microbiology, 10. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00215

Nothias, L.-F., Petras, D., Schmid, R., Dührkop, K., Rainer, J., Sarvepalli, A., Protsyuk, I., Ernst, M., Tsugawa, H., Fleischauer, M., Aicheler, F., Aksenov, A. A., Alka, O., Allard, P.-M., Barsch, A., Cachet, X., Caraballo-Rodriguez, A. M., Da Silva, R. R., Dang, T., … Dorrestein, P. C. (2020). Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. Nature Methods, 17(9), 905–908. https://doi.org/10.1038/s41592-020-0933-6

Ochsenkühn, M. A., Schmitt-Kopplin, P., Harir, M., & Amin, S. A. (2018). Coral metabolite gradients affect microbial community structures and act as a disease cue. Communications Biology, 1(1), 184. https://doi.org/10.1038/s42003-018-0189-1

O'Connor, J. J., Lecchini, D., Beck, H. J., Cadiou, G., Lecellier, G., Booth, D. J., & Nakamura, Y. (2016). Sediment pollution impacts sensory ability and performance of settling coral-reef fish. Oecologia, 180(1), 11–21. https://doi.org/10.1007/s00442-015-3367-6

Olinger, L. K., Strangman, W. K., McMurray, S. E., & Pawlik, J. R. (2021). Sponges With Microbial Symbionts Transform Dissolved Organic Matter and Take Up Organohalides. Frontiers in Marine Science, 8, 665789. https://doi.org/10.3389/fmars.2021.665789

Osterholz, H., Niggemann, J., Giebel, H.-A., Simon, M., & Dittmar, T. (2015). Inefficient microbial production of refractory dissolved organic matter in the ocean. Nature Communications, 6(1), 7422. https://doi.org/10.1038/ncomms8422

Papi, F. (2012). Animal Homing. Springer Science & Business Media.

Parachnowitsch, A. L., & Manson, J. S. (2015). The chemical ecology of plant-pollinator interactions: Recent advances and future directions. Current Opinion in Insect Science, 8, 41–46. https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.02.005

Parravicini, V., Guidetti, P., Morri, C., Montefalcone, M., Donato, M., & Bianchi, C. N. (2010). Consequences of sea water temperature anomalies on a Mediterranean submarine cave ecosystem. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 86(2), 276–282. https://doi.org/10.1016/j.ecss.2009.11.004

Passelaigue, F. & Bourdillon, A. (1985). Les migrations nycthémérales du Mysidacé *Hemimysis speluncola* Ledoyer. Rapports de la Commission Internationale pour la Mer Méditerranée 29(5), 157–158.

Passelaigue, F & Bourdillon, A. (1986). Distribution and circadian migrations of the cavernicolous mysid *Hemimysis speluncola* Ledoyer. Stygologia, 2.

Passelaigue, F. (1989). Les migrations journalières du Mysidacé marin cavernicole *Hemimysis speluncola*. Comparaison avec les migrations verticales du plancton. Thèse d'Etat, Université d'Aix-Marseille II, France.

J. Paul, V., & P. Puglisi, M. (2004). Chemical mediation of interactions among marine organisms. Natural Product Reports, 21(1), 189–209. https://doi.org/10.1039/B302334F

Paulus, E. (2021). Shedding Light on Deep-Sea Biodiversity—A Highly Vulnerable Habitat in the Face of Anthropogenic Change. Frontiers in Marine Science, 8. https://doi.org/10.3389/fmars.2021.667048

Pauw, A. (2007). Collapse of a pollination web in small conservation areas. Ecology, 88(7), 1759–1769. https://doi.org/10.1890/06-1383.1

Pereira, R. C., Nocchi, N., Souto, M. L., Fernández, J. J., Norte, M., Duarte, H. M., & Soares, A. R. (2020). The sea-hare *Aplysia brasiliana* promotes induction in chemical defense in the seaweed *Laurencia dendroidea* and in their congeneric neighbors. Plant Physiology and Biochemistry, 154, 295–303. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.05.020

Pérès, J.M. & Picard, J. (1949). Notes sommaires sur le peuplement des grottes sous-marines de la région de Marseille. Comptes Rendus de la Société de Biogéographie 227, 42–45

Pérès, J.M. & Picard, J. (1964). Nouveau manuel de bionomie benthique de la Mer Méditerranée. Recueil des Travaux de la Station Marine d'Endoume 47, 3–137.

Pérès, J.M. (1967). Mediterranean benthos. Oceanography and Marine Biology: An Annual Review 5, 449–533.

Pérez, T., Garrabou, J., Sartoretto, S., Harmelin, J.-G., Francour, P., & Vacelet, J. (2000). Mortalité massive d'invertébrés marins : Un événement sans précédent en Méditerranée nord-occidentale. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie, 323(10), 853–865. https://doi.org/10.1016/S0764-4469(00)01237-3

Pérez, T., Wafo, E., Fourt, M., & Vacelet, J. (2003). Marine Sponges as Biomonitor of Polychlorobiphenyl Contamination: Concentration and Fate of 24 Congeners. Environmental Science & Technology, 37(10), 2152–2158. https://doi.org/10.1021/es026234v

Pérez, T., Albenga, L., Starmer, J., Chevaldonné, P., (2016). Biodiversité des grottes sous-marines des îles Marquises : Un patrimoine naturel caché et méconnu. pp. 287–310. In: Biodiversité terrestre et marine des îles Marquises, Polynésie française. Galzin R., Duron S.-D. & Meyer J.-Y. (Eds). Société Française d'Ichtyologie, Paris.

Petras, D., Koester, I., Da Silva, R., Stephens, B. M., Haas, A. F., Nelson, C. E., Kelly, L. W., Aluwihare, L. I., & Dorrestein, P. C. (2017). High-Resolution Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Enables Large Scale Molecular Characterization of Dissolved Organic Matter. Frontiers in Marine Science, 4, 405. https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00405

Pinsky, M. L., Selden, R. L., & Kitchel, Z. J. (2020). Climate-Driven Shifts in Marine Species Ranges: Scaling from Organisms to Communities. Annual Review of Marine Science, 12, 153–179. https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010419-010916

Pohnert, G. (2004). Chemical Defense Strategies of Marine Organisms. In S. Schulz (Ed.), The Chemistry of Pheromones and Other Semiochemicals I (pp. 179–219). Springer. https://doi.org/10.1007/b95453

Poloczanska, E. S., Brown, C. J., Sydeman, W. J., Kiessling, W., Schoeman, D. S., Moore, P. J., Brander, K., Bruno, J. F., Buckley, L. B., Burrows, M. T., Duarte, C. M., Halpern, B. S., Holding, J., Kappel, C. V., O'Connor, M. I., Pandolfi, J. M., Parmesan, C., Schwing, F.,

Thompson, S. A., & Richardson, A. J. (2013). Global imprint of climate change on marine life. Nature Climate Change, 3(10), 919–925. https://doi.org/10.1038/nclimate1958

Poloczanska, E. S., Burrows, M. T., Brown, C. J., García Molinos, J., Halpern, B. S., Hoegh-Guldberg, O., Kappel, C. V., Moore, P. J., Richardson, A. J., Schoeman, D. S., & Sydeman, W. J. (2016). Responses of Marine Organisms to Climate Change across Oceans. Frontiers in Marine Science, 3. https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00062

Pomponi, S. A., Diaz, M. C., Van Soest, R. W. M., Bell, L. J., Busutil, L., Gochfeld, D. J., Kelly, M., & Slattery, M. (2019). Sponges. In Y. Loya, K. A. Puglise, & T. C. L. Bridge (Eds.), Mesophotic Coral Ecosystems (Vol. 12, pp. 563–588). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-92735-0_32

Porter, J. W., & Targett, N. M. (1988). Allelochemical Interactions Between Sponges and Corals. The Biological Bulletin, 175(2), 230–239. https://doi.org/10.2307/1541563

Potts, S. G., Biesmeijer, J. C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., & Kunin, W. E. (2010). Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. Trends in Ecology & Evolution, 25(6), 345–353. https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007

Poulin, R. X., Lavoie, S., Siegel, K., Gaul, D. A., Weissburg, M. J., & Kubanek, J. (2018). Chemical encoding of risk perception and predator detection among estuarine invertebrates. Proceedings of the National Academy of Sciences, 115(4), 662–667. https://doi.org/10.1073/pnas.1713901115

Pouliquen, L. (1969). Remarques sur la présence d'éponges de l'étage bathyal dans les grottes sous-marines obscures en Méditerranée. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Série C 268, 1324–1326.

Powers, L. C., Hertkorn, N., McDonald, N., Schmitt-Kopplin, P., Del Vecchio, R., Blough, N. V., & Gonsior, M. (2019). Sargassum sp. Act as a Large Regional Source of Marine Dissolved Organic Carbon and Polyphenols. Global Biogeochemical Cycles, 33(11), 1423–1439. https://doi.org/10.1029/2019GB006225

Powney, G. D., Carvell, C., Edwards, M., Morris, R. K. A., Roy, H. E., Woodcock, B. A., & Isaac, N. J. B. (2019). Widespread losses of pollinating insects in Britain. Nature Communications, 10(1), 1018. https://doi.org/10.1038/s41467-019-08974-9

Quinlan, Z. A., Koester, I., Aron, A. T., Petras, D., Aluwihare, L. I., Dorrestein, P. C., Nelson, C. E., & Wegley Kelly, L. (2022). ConCISE: Consensus Annotation Propagation of Ion Features in Untargeted Tandem Mass Spectrometry Combining Molecular Networking and In Silico Metabolite Structure Prediction. Metabolites, 12(12), 1275. https://doi.org/10.3390/metabo12121275

Quinlan, Z. A., Bennett, M.-J., Arts, M. G. I., Levenstein, M., Flores, D., Tholen, H. M., Tichy, L., Juarez, G., Haas, A. F., Chamberland, V. F., Latijnhouwers, K. R. W., Vermeij, M. J. A., Johnson, A. W., Marhaver, K. L., & Kelly, L. W. (2023). Coral larval settlement induction using tissue-associated and exuded coralline algae metabolites and the identification of putative chemical cues. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 290(2009), 20231476. https://doi.org/10.1098/rspb.2023.1476

Raguso, R. A. (2008). Wake Up and Smell the Roses: The Ecology and Evolution of Floral Scent. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 39, 549–569. https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095601

Rastorgueff, P., Harmelin-Vivien, M., Richard, P., & Chevaldonné, P. (2011). Feeding strategies and resource partitioning -mitigate the effects of oligotrophy for marine cave mysids. Marine Ecology Progress Series, 440, 163–176. https://doi.org/10.3354/meps09347

Rastorgueff, P.-A., Chevaldonné, P., Arslan, D., Verna, C., & Lejeusne, C. (2014). Cryptic habitats and cryptic diversity: Unexpected patterns of connectivity and phylogeographical breaks in a Mediterranean endemic marine cave mysid. Molecular Ecology, 23(11), 2825–2843. https://doi.org/10.1111/mec.12776

Rastorgueff, P.-A., Bellan-Santini, D., Bianchi, C. N., Bussotti, S., Chevaldonné, P., Guidetti, P., Harmelin, J.-G., Montefalcone, M., Morri, C., Perez, T., Ruitton, S., Vacelet, J., & Personnic, S. (2015). An ecosystem-based approach to evaluate the ecological quality of Mediterranean undersea caves. Ecological Indicators, 54, 137–152. https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.02.014

Reigel, A. M., Easson, C. G., Apprill, A., Freeman, C. J., Bartley, M. M., & Fiore, C. L. (2024). Sponge-derived matter is assimilated by coral holobionts. Communications Biology, 7(1), 146. https://doi.org/10.1038/s42003-024-05836-z

Reverter, M., Tribalat, M.-A., Pérez, T., & Thomas, O. P. (2018). Metabolome variability for two Mediterranean sponge species of the genus Haliclona: Specificity, time, and space. Metabolomics, 14(9), 114. https://doi.org/10.1007/s11306-018-1401-5

Riedl, R. (1966). Biologie der Meereshöhlen. Hamburg: Paul Parey.

Riera T., Zabala i Limousin M., & Peñuelas J. (1991). Mysids from a submarine cave emerge each night to feed. Scientia Marina, 55(num. 4), 605–609.

Rittschof, D., & Cohen, J. H. (2004). Crustacean peptide and peptide-like pheromones and kairomones. Peptides, 25(9), 1503–1516. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2003.10.024

Rix, L., De Goeij, J., Van Oevelen, D., Struck, U., Al-Horani, F., Wild, C., & Naumann, M. (2018). Reef sponges facilitate the transfer of coral-derived organic matter to their associated fauna via the sponge loop. Marine Ecology Progress Series, 589, 85–96. https://doi.org/10.3354/meps12443

Roggatz, C. C., Saha, M., Blanchard, S., Schirrmacher, P., Fink, P., Verheggen, F., & Hardege, J. D. (2022). Becoming nose-blind—Climate change impacts on chemical communication. Global Change Biology, 28(15), 4495–4505. https://doi.org/10.1111/gcb.16209

Romero, A. (2009). Cave Biology: Life in Darkness. New York: Cambridge University Press.

Ros, J.D., Romero, J., Ballesteros, E. & Gili, J.M. (1985). Diving in blue water. The benthos. In Western Mediterranean, R. Margalef (ed.). Oxford: Pergamon Press, 233–295.

Ross, E., & Behringer, D. (2019). Changes in temperature, pH, and salinity affect the sheltering responses of Caribbean spiny lobsters to chemosensory cues. Scientific Reports, 9(1), 4375. https://doi.org/10.1038/s41598-019-40832-y

Ryan, E. P. (1966). Pheromone: Evidence in a Decapod Crustacean. Science, 151(3708), 340–341. https://doi.org/10.1126/science.151.3708.340

Ryan, C., Martins, M. C. I., Healy, K., Bejder, L., Cerchio, S., Christiansen, F., Durban, J., Fearnbach, H., Fortune, S., Friedlaender, A., Koski, W. R., Miller, C., Rodríguez-González, F. M., Segre, P. S., R, J. U., Vivier, F., Weir, C. R., & Moore, M. J. (2024). Morphology of nares

associated with stereo-olfaction in baleen whales. Biology Letters. https://doi.org/10.1098/rsbl.2023.0479

Saha, M., Berdalet, E., Carotenuto, Y., Fink, P., Harder, T., John, U., Not, F., Pohnert, G., Potin, P., Selander, E., Vyverman, W., Wichard, T., Zupo, V., & Steinke, M. (2019). Using chemical language to shape future marine health. Frontiers in Ecology and the Environment, 17(9), 530–537. https://doi.org/10.1002/fee.2113

Sanfilippo, R. & Mòllica, E. (2000). *Serpula cavernicola* Fassari & Mollica, 1991 (Annelida Polychaeta): Diagnostic features of the tubes and new Mediterranean records. Marine Life 10, 27–32.

Santonja, M., Greff, S., Le Croller, M., Thomas, O. P., & Pérez, T. (2018). Distance interaction between marine cave-dwelling sponges and crustaceans. Marine Biology, 165(7), 121. https://doi.org/10.1007/s00227-018-3377-0

Sauleau, P., Moriou, C., & Al Mourabit, A. (2017). Metabolomics approach to chemical diversity of the Mediterranean marine sponge *Agelas oroides*. Natural Product Research, 31(14), 1625–1632. https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1285298

Savoca, M. S., & Nevitt, G. A. (2014). Evidence that dimethyl sulfide facilitates a tritrophic mutualism between marine primary producers and top predators. Proceedings of the National Academy of Sciences, 111(11), 4157–4161. https://doi.org/10.1073/pnas.1317120111

Schmid, R., Heuckeroth, S., Korf, A., Smirnov, A., Myers, O., Dyrlund, T. S., Bushuiev, R., Murray, K. J., Hoffmann, N., Lu, M., Sarvepalli, A., Zhang, Z., Fleischauer, M., Dührkop, K., Wesner, M., Hoogstra, S. J., Rudt, E., Mokshyna, O., Brungs, C., … Pluskal, T. (2023). Integrative analysis of multimodal mass spectrometry data in MZmine 3. Nature Biotechnology, 41(4), 447–449. https://doi.org/10.1038/s41587-023-01690-2

Scholz, A. T., Horrall, R. M., Cooper, J. C., & Hasler, A. D. (1976). Imprinting to Chemical Cues: The Basis for Home Stream Selection in Salmon. Science, 192(4245), 1247–1249. https://doi.org/10.1126/science.1273590

Schönberg, C. H. L., & Fromont, J. (2012). Sponge gardens of Ningaloo Reef (Carnarvon Shelf, Western Australia) are biodiversity hotspots. In M. Maldonado, X. Turon, M. Becerro, & M. Jesús Uriz (Eds.), Ancient Animals, New Challenges: Developments in Sponge Research (pp. 143–161). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4688-6_13

Schymanski, E. L., Jeon, J., Gulde, R., Fenner, K., Ruff, M., Singer, H. P., & Hollender, J. (2014). Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. Environmental Science & Technology, 48(4), 2097–2098. https://doi.org/10.1021/es5002105

Selander, E., Kubanek, J., Hamberg, M., Andersson, M. X., Cervin, G., & Pavia, H. (2015). Predator lipids induce paralytic shellfish toxins in bloom-forming algae. Proceedings of the National Academy of Sciences, 112(20), 6395–6400. https://doi.org/10.1073/pnas.1420154112

Sentis, A., Ramon-Portugal, F., Brodeur, J., & Hemptinne, J.-L. (2015). The smell of change: Warming affects species interactions mediated by chemical information. Global Change Biology, 21(10), 3586–3594. https://doi.org/10.1111/gcb.12932

Shoji, T., Ueda, H., Ohgami, T., Sakamoto, T., Katsuragi, Y., Yamauchi, K., & Kurihara, K. (2000). Amino Acids Dissolved in Stream Water as Possible Home Stream Odorants for Masu Salmon. Chemical Senses, 25(5), 533–540. https://doi.org/10.1093/chemse/25.5.533

Shoji, T., Yamamoto, Y., Nishikawa, D., Kurihara, K., & Ueda, H. (2003). Amino acids in stream water are essential for salmon homing migration. Fish Physiology and Biochemistry, 28(1–4), 249–251. https://doi.org/10.1023/B:FISH.0000030544.64774.f6

Sjögren, M., Göransson, U., Johnson, A.-L., Dahlström, M., Andersson, R., Bergman, J., Jonsson, P. R., & Bohlin, L. (2004). Antifouling Activity of Brominated Cyclopeptides from the Marine Sponge *Geodia barretti*. Journal of Natural Products, 67(3), 368–372. https://doi.org/10.1021/np0302403

Sjögren, M., Jonsson, P. R., Dahlström, M., Lundälv, T., Burman, R., Göransson, U., & Bohlin, L. (2011). Two brominated cyclic dipeptides released by the coldwater marine sponge *Geodia barretti* act in synergy as chemical defense. Journal of Natural Products, 74(3), 449–454. https://doi.org/10.1021/np1008812

Slattery, M., Hamann, M., McClintock, J., Perry, T., Puglisi, M., & Yoshida, W. (1997). Ecological roles for water-borne metabolites from Antarctic soft corals. Marine Ecology Progress Series, 161, 133–144. https://doi.org/10.3354/meps161133

Sogin, E. M., Putnam, H. M., Anderson, P. E., & Gates, R. D. (2016). Metabolomic signatures of increases in temperature and ocean acidification from the reef-building coral, *Pocillopora damicornis*. Metabolomics, 12(4), 71. https://doi.org/10.1007/s11306-016-0987-8

Solomon, D. J. (1977). A review of chemical communication in freshwater fish. Journal of Fish Biology, 11(4), 363–376. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1977.tb04130.x

Stabell, O. B. (1992). Olfactory control of homing behaviour in salmonids. In T. J. Hara (Ed.), Fish Chemoreception (pp. 249–270). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-011-2332-7_12

Ternon, E., Zarate, L., Chenesseau, S., Croué, J., Dumollard, R., Suzuki, M. T., & Thomas, O. P. (2016). Spherulization as a process for the exudation of chemical cues by the encrusting sponge *Crambe crambe*. Scientific Reports, 6(1), 29474. https://doi.org/10.1038/srep29474

Thompson, J. E. (1985). Exudation of biologically-active metabolites in the sponge *Aplysina fistularis*. Marine Biology, 88(1), 23–26. https://doi.org/10.1007/BF00393039

Thompson, J. E., Walker, R. P., & Faulkner, D. J. (1985). Screening and bioassays for biologically-active substances from forty marine sponge species from San Diego, California, USA. Marine Biology, 88(1), 11–21. https://doi.org/10.1007/BF00393038

Thoms, C., Wolff, M., Padmakumar, K., Ebel, R., & Proksch, P. (2004). Chemical Defense of Mediterranean Sponges *Aplysina cavernicola* and *Aplysina aerophoba*. Zeitschrift Für Naturforschung C, 59(1–2), 113–122. https://doi.org/10.1515/znc-2004-1-222

Topçu, N. E., Pérez, T., Grégori, G., & Harmelin-Vivien, M. (2010). In situ investigation of Spongia officinalis (Demospongiae) particle feeding: Coupling flow cytometry and stable isotope analysis. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 389(1–2), 61–69. https://doi.org/10.1016/j.jembe.2010.03.017

Toth, G. B., & Pavia, H. (2000). Water-borne cues induce chemical defense in a marine alga (*Ascophyllum nodosum*). Proceedings of the National Academy of Sciences, 97(26), 14418–14420. https://doi.org/10.1073/pnas.250226997

Toth, G., & Lindeborg, M. (2008). Water-soluble compounds from the breadcrumb sponge *Halichondria panicea* deter attachment of the barnacle *Balanus improvisus*. Marine Ecology Progress Series, 354, 125–132. https://doi.org/10.3354/meps07275

Vacelet, J., (1976). Les spongiaires des grottes sous-marines obscures de la Méditerranée et des régions tropicales. Pubblicazioni della Stazione Zoologica di Napoli, 4.

Vacelet J., Boury-Esnault N. & Harmelin J.G. (1994). Hexactinellid cave, a unique habitat in the scuba zone. Deep Sea Research Part I, 41, 965–973.

Vacelet J., Boury-Esnault N. & Harmelin J.G. (1995). Carnivorous sponges. Nature, 333-335.

Vacelet, J., & Duport, E. (2004). Prey capture and digestion in the carnivorous sponge *Asbestopluma hypogea* (Porifera: Demospongiae). Zoomorphology, 123(4), 179–190. https://doi.org/10.1007/s00435-004-0100-0

Vacelet, J. & Boury-Esnault, N. (1996). A new species of carnivorous sponge (Demospongiae: Cladorhizidae) from a Mediterranean cave. Bulletin de l'Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique, 66(10) 9 –11 5.

Vamosi, J. C., Knight, T. M., Steets, J. A., Mazer, S. J., Burd, M., & Ashman, T.-L. (2006). Pollination decays in biodiversity hotspots. Proceedings of the National Academy of Sciences, 103(4), 956–961. https://doi.org/10.1073/pnas.0507165103

Van Oudenhove, L., Billoir, E., Boulay, R., Bernstein, C., & Cerdá, X. (2011). Temperature limits trail following behaviour through pheromone decay in ants. Naturwissenschaften, 98(12), 1009–1017. https://doi.org/10.1007/s00114-011-0852-6

Vanderplanck, M., Lapeyre, B., Brondani, M., Opsommer, M., Dufay, M., Hossaert-McKey, M., & Proffit, M. (2021). Ozone Pollution Alters Olfaction and Behavior of Pollinators. Antioxidants, 10(5), Article 5. https://doi.org/10.3390/antiox10050636

Verdura, J., Linares, C., Ballesteros, E., Coma, R., Uriz, M. J., Bensoussan, N., & Cebrian, E. (2019). Biodiversity loss in a Mediterranean ecosystem due to an extreme warming event unveils the role of an engineering gorgonian species. Scientific Reports, 9(1), 5911. https://doi.org/10.1038/s41598-019-41929-0

Vasseur P., (1984). Les peuplements sessiles sciaphiles des récifs coralliens de la région de Tuléar (S.W. de Madagascar). Oceanis, Paris, 10(1): 51 – 83

Walker, R. P., Thompson, J. E., & Faulkner, D. J. (1985). Exudation of biologically-active metabolites in the sponge *Aplysina fistularis*: II. Chemical evidence. Marine Biology, 88(1), 27–32. https://doi.org/10.1007/BF00393040

Walters, L. J., Hadfield, M. G., & Smith, C. M. (1996). Waterborne chemical compounds in tropical macroalgae: Positive and negative cues for larval settlement. Marine Biology, 126(3), 383–393. https://doi.org/10.1007/BF00354620

Weber, L., Armenteros, M., Kido Soule, M., Longnecker, K., Kujawinski, E. B., & Apprill, A. (2020). Extracellular Reef Metabolites Across the Protected Jardines de la Reina, Cuba Reef System. Frontiers in Marine Science, 7, 582161. https://doi.org/10.3389/fmars.2020.582161

Weber, L., Soule, M. K., Longnecker, K., Becker, C. C., Huntley, N., Kujawinski, E. B., & Apprill, A. (2022). Benthic exometabolites and their ecological significance on threatened

Caribbean coral reefs. ISME Communications, 2(1), 101. https://doi.org/10.1038/s43705-022-00184-7

Wegley Kelly, L., Nelson, C. E., Aluwihare, L. I., Arts, M. G. I., Dorrestein, P. C., Koester, I., Matsuda, S. B., Petras, D., Quinlan, Z. A., & Haas, A. F. (2021). Molecular Commerce on Coral Reefs: Using Metabolomics to Reveal Biochemical Exchanges Underlying Holobiont Biology and the Ecology of Coastal Ecosystems. Frontiers in Marine Science, 8, 630799. https://doi.org/10.3389/fmars.2021.630799

Wegley Kelly, L., Nelson, C. E., Petras, D., Koester, I., Quinlan, Z. A., Arts, M. G. I., Nothias, L.-F., Comstock, J., White, B. M., Hopmans, E. C., Van Duyl, F. C., Carlson, C. A., Aluwihare, L. I., Dorrestein, P. C., & Haas, A. F. (2022). Distinguishing the molecular diversity, nutrient content, and energetic potential of exometabolomes produced by macroalgae and reef-building corals. Proceedings of the National Academy of Sciences, 119(5), e2110283119. https://doi.org/10.1073/pnas.2110283119

Weiss, B., Ebel, R., Elbrächter, M., Kirchner, M., & Proksch, P. (1996). Defense metabolites from the marine sponge *Verongia aerophoba*. Biochemical Systematics and Ecology, 24(1), 1–12. https://doi.org/10.1016/0305-1978(95)00101-8

Weissburg, M., Poulin, R. X., & Kubanek, J. (2016). You Are What you Eat: A Metabolomics Approach to Understanding Prey Responses to Diet-Dependent Chemical Cues Released by Predators. Journal of Chemical Ecology, 42(10), 1037–1046. https://doi.org/10.1007/s10886-016-0771-2

Weisz, J. B., Lindquist, N., & Martens, C. S. (2008). Do associated microbial abundances impact marine demosponge pumping rates and tissue densities? Oecologia, 155(2), 367–376. https://doi.org/10.1007/s00442-007-0910-0

Wetzel, R. G., & Likens, G. (2000). Limnological Analyses. Springer Science & Business Media.

Wilke, C. (2021). Climate Change Could Alter Undersea Chemical Communication. ACS Central Science, 7(7), 1091–1094. https://doi.org/10.1021/acscentsci.1c00819

Wisby, W. J., & Hasler, A. D. (1954). Effect of Olfactory Occlusion on Migrating Silver Salmon (O. kisutch). Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 11(4), 472–478. https://doi.org/10.1139/f54-031

WoRMS Editorial Board (2024). World Register of Marine Species. Available from https://www.marinespecies.org at VLIZ. Accessed 2024-09-29. doi:10.14284/170

Wyatt, T. D. (2010). Pheromones and signature mixtures: Defining species-wide signals and variable cues for identity in both invertebrates and vertebrates. Journal of Comparative Physiology A, 196(10), 685–700. https://doi.org/10.1007/s00359-010-0564-y

Wyatt, T. D. (2014). Pheromones and animal behavior: Chemical signals and signatures.

Yen, J., & Lasley, R. (2011). Chemical Communication Between Copepods: Finding the Mate in a Fluid Environment. In T. Breithaupt & M. Thiel (Eds.), Chemical Communication in Crustaceans (pp. 177–197). Springer. https://doi.org/10.1007/978-0-387-77101-4_9

Zark, M., Christoffers, J., & Dittmar, T. (2017). Molecular properties of deep-sea dissolved organic matter are predictable by the central limit theorem: Evidence from tandem FT-ICR-MS. Marine Chemistry, 191, 9–15. https://doi.org/10.1016/j.marchem.2017.02.005

Zark, M., & Dittmar, T. (2018). Universal molecular structures in natural dissolved organic matter. Nature Communications, 9(1), 3178. https://doi.org/10.1038/s41467-018-05665-9

Zattara, E. E., & Aizen, M. A. (2021). Worldwide occurrence records suggest a global decline in bee species richness. One Earth, 4(1), 114–123. https://doi.org/10.1016/j.oneear.2020.12.005

Zbinden, M., Berthod, C., Montagné, N., Machon, J., Léger, N., Chertemps, T., Rabet, N., Shillito, B., & Ravaux, J. (2017). Comparative study of chemosensory organs of shrimp from hydrothermal vent and coastal environments. Chemical Senses, 42(4), 319–331. https://doi.org/10.1093/chemse/bjx007

Zhou (周绍群), S., & Jander, G. (2022). Molecular ecology of plant volatiles in interactions with insect herbivores. Journal of Experimental Botany, 73(2), 449–462. https://doi.org/10.1093/jxb/erab413

Zibrowius, H. (1968). Étude morphologique, systématique et écologique des Serpulidae (Annelida Polychaeta) de la région de Marseille. Recueil des Travaux de la Station Marine d'Endoume, 43, 81–252

Zibrowius, H. (1978). Les scleractiniaires des grottes sous-marines en Méditerranée et dans l'Atlantique nordoriental (Portugal, Madère, Canaries, Açores). Pubblicazioni della Stazione Zoologica di Napoli, 40, 516 –545.

Zimmer, R., & Butman, C. (2000). Chemical signaling processes in the marine environment. The Biological Bulletin, 198(2), 168–187. https://doi.org/10.2307/1542522

Zimmer, R. K., Commins, J. E., & Browne, K. A. (1999). Regulatory effects of environmental chemical signals on search behavior and foraging success. Ecology, 80(4), 1432–1446. https://doi.org/10.1890/0012-9658(1999)080[1432:REOECS]2.0.CO;2