

# CONTEXTE ET PROTOCOLE D'INTERVENTION

## ANNEXE AUX CERFA n°13 617\*0102

### 1. Description du projet

Ce projet de recherche est associé à deux doctorant.e.s bénéficiaires d'un financement du CNRS avec le programme MITI et du programme GINKO ainsi qu'à une personne en post-doctorat (Amélie Saunier) financé par une bourse AMIDEX. Ce projet est porté par Catherine Fernandez au sein de l'Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie (IMBE) avec la collaboration de plusieurs chercheurs de l'IMBE, du Laboratoire Chimie Environnement (LCE), de Biodiversité marine, exploitation et conservation (MARBEC) et de laboratoire de Sciences Pour l'Environnement (SPE). Les objectifs de recherche et les prélèvements demandés ci-dessous seront associés aux projets de recherche « **BenthicVOC** » et « **SCREAM** ».

#### 1.1. Contexte du projet de recherche

Les métabolites spécialisés (*Plant specialized metabolites*, PSM) sont des molécules produites par les espèces végétales terrestres et marines (Rieseberg et al., 2023). Parmi les PSM, on trouve des composés non volatils (e.g. composés phénoliques) et volatils (appelés « composés organiques volatils biogéniques » ou COVB). Ces deux types de composés sont considérés comme des molécules de défense face aux stress environnementaux (abiotiques et biotiques) et leur étude permet de mieux comprendre la résistance et la résilience des écosystèmes marins face aux changements globaux (Ahmad et al., 2018; Niinemets, 2010). Il est donc essentiel de caractériser les PSM et de comprendre comment les facteurs abiotiques (e.g. température) et biotiques (e.g. herbivorie) vont affecter la production des PSM et ainsi prédire les dynamiques des écosystèmes dans un environnement changeant. À ce jour, la majeure partie des connaissances sur les PSM volatils et non-volatils proviennent de l'étude des écosystèmes terrestres, contrairement aux écosystèmes marins où encore très peu de choses sont connues, notamment au niveau des COV (Saunier et al., 2025). Or, de récents travaux ont montré que la plupart des espèces marines benthiques produisaient des COVB (Saha & Fink, 2022) et que ces derniers pourraient avoir des rôles de défense similaires à ceux mis en évidence en milieu terrestre (Saunier et al., 2025). C'est également le cas pour les espèces d'herbiers marins qui produisent un large cocktail de COVB dans des quantités équivalentes à celles détectées en milieu terrestre (Coquin et al., 2024; Saunier et al., 2025). Ainsi, l'étude des COVB, couplée à celle sur les métabolites spécialisés non volatils, permettraient de mieux évaluer la trajectoire de ces écosystèmes de fort intérêt écologique dans un contexte de changement climatique mais également, de mieux comprendre quelles sont les causes de leur actuel déclin. Néanmoins, on manque encore de connaissances sur les métabolites spécialisés des herbiers marins et de leurs variations en fonction de facteurs abiotiques et biotiques. Cette demande pour le prélèvement d'espèces protégées se fait dans le cadre deux projets visant à (i) caractériser le volatilome (tous les composés volatils produits par un individu) et le métabolome (tous les composés non-volatils produits par un individu) des principales espèces méditerranéennes d'herbiers marins en laboratoire et *in situ* et (ii) de déterminer l'effet de la température et de l'herbivorie sur le volatilome et le métabolome. Ainsi, ce projet permettra de combler cette lacune fondamentale dans les connaissances en utilisant pour la première fois une nouvelle approche interdisciplinaire, grâce aux objectifs suivants.

#### 1.2. Objectifs du projet de recherche et réalisations prévues

Pour les projets **BenthicVOC** (variations saisonnières de lumière, température et salinité) et **CRACC** (avec un focus sur la température), traitant de l'impact saisonnier des principaux paramètres environnementaux (e.g. lumière, température, salinité) sur les émissions de COVB des herbiers marins, nous chercherons à répondre aux questions suivantes :

*Question 1:* Comment les émissions de COVB des herbiers marins répondent aux principaux paramètres environnementaux susceptibles de drastiquement variés à cause du changement climatique ?

*Question 2:* Est-ce que ces potentiels changements sont liés à une réorganisation métabolique indiquant une acclimatation physiologique aux stress environnementaux ?

Pour répondre à cette question, nous collecterons les composés volatils et non-volatils sur plusieurs espèces d'herbiers marins méditerranéens, en laboratoire et dans un second temps *in situ*, à la suite de l'application de différents gradients de stress suivi d'une période de rétablissement. Les espèces modèles pour cette

expérimentation seront *Posidonia oceanica*, *Zostera noltei*, *Zostera marina* et *Cymodocea nodosa* pour lesquelles une cinquantaine de faisceaux seront prélevés. *P. oceanica* sera prélevée dans la Baie de Marseille tandis que les prélèvements pour les trois autres espèces seront effectués à l'anse de Carteau.

Pour le projet **SCREAM**, traitant de l'effet de l'herbivorie sur la production de métabolites spécialisés (volatils et non volatils), nous chercherons à répondre aux questions suivantes :

**Question 1:** Est-ce que l'exposition à l'herbivorie entraîne une modification des émissions de COVB de la part des herbiers marins ?

**Question 2:** Est-ce que les concentrations en metabolites non-volatils changent avec l'herbivorie ?

**Question 3:** Est-ce que les COVB peuvent modifier le comportement des herbivores ?

**Question 4:** Est-ce que le COVB peuvent induire des défenses chez des individus sains ? (Q5).

Pour répondre à cette question, nous collecterons les composés volatils et non-volatils sur plusieurs espèces d'herbiers marins méditerranéens, en laboratoire, après exposition à différents traitements d'herbivorie. Les espèces modèles pour cette expérimentation seront *Posidonia oceanica*, *Zostera noltei*, *Zostera marina* et *Cymodocea nodosa* pour lesquelles une quarantaine de faisceaux seront prélevés. *P. oceanica* sera prélevé dans la Baie de Marseille tandis que les prélèvements pour les trois autres espèces seront effectués à l'anse de Carteau.

**Pour tous ces objectifs** nous nous appuierons sur les Services Communs (SC) de l'IMBE : SC Dispositifs Expérimentaux pour les prélèvements et l'utilisations d'aquarium pour le maintien des organismes et le SC Écologie Chimique pour les analyses chimiques.

## 2. Protocole d'extraction des molécules

Pour mettre en évidence les COVB, deux méthodes peuvent être utilisées. La première utilise des fibres de SPME (microextraction sur phase solide, Lancioni et al., 2022) et permet de mettre en évidence la composition des volatilomes des individus. Cette méthode consiste à disposer une certaine quantité de matière végétale, souvent découpée en morceaux, dans un flacon scellé. La fibre SPME est introduite dans le flacon *via* un septum et va capter les COVB émis par l'échantillon, contenu dans l'espace de tête du flacon. La fibre est par la suite analysée par GC-MS. Cette technique est largement utilisée dans la littérature actuelle (Jerković et al., 2018; Li et al., 2023; Rubiño et al., 2022; Zhu et al., 2022). La deuxième méthode consiste à collecter les COVB de manière dynamique grâce à un système d'enfermement avec un flux d'air circulant dans une enceinte contenant l'échantillon. Les COVB peuvent être soit directement analysés en ligne par PTR-ToF-MS ou bien captés sur des tubes contenant des adsorbants puis analysés en GC-MS. Cette méthode permet d'obtenir les quantités émises par les individus et est classiquement utilisée dans l'étude des COVB (Saunier et al., 2017, 2025) et peut être utilisée aussi bien en laboratoire qu'*in situ*.

L'extraction et l'analyse des métabolites non volatils sont adaptées de l'approche de Renault et al., (2017). Les feuilles sont congelées et lyophilisées puis broyées. Dix milligrammes de masse sèche (MS) de chaque échantillon est pesée et mis dans un tube Eppendorf. Les molécules contenues dans les feuilles des Magnoliophytes sont extraites à l'aide de solvant (Abdel-Aal et al., 2015; Jones & Kinghorn, 2012). Dans chaque tube, 400 µL de méthanol sont ajoutés et mis au bain ultrassons à température ambiante pendant 5 min. Ensuite, un volume de 200 µL de chloroforme sont ajoutés à l'extrait et vortexé pendant 10 s. Le surnageant (environ 300 µL) est transféré dans des microtubes UHPLC de 2 mL avant analyse.

## 3. Protocole de prélèvements

Pour l'ensemble des espèces, des individus sains seront prélevés à l'aide de ciseaux. Un individu comprendra les faisceaux (i.e. feuilles) ainsi qu'un bout de rhizome, afin de le maintenir en aquarium. Au total, nous aurons besoin pour l'ensemble des projets de :

-**BenthicVOC** : 40 individus de *Z. marina*, *Z. noltei*, *C. nodosa* et *P. oceanica*

-**SCREAM** : 50 individus de *Z. marina*, *Z. noltei*, *C. nodosa* et *P. oceanica*

-**CRACC** : 50 individus de *Z. marina*, *Z. noltei*, *C. nodosa* et *P. oceanica*

Une fois prélevés, les faisceaux seront transportés à la faculté de saint Jérôme (**52, Avenue Escadrille Normandie Niemen, 13397 Marseille cedex 20**) où ils seront mis en aquarium afin de mettre en place les différentes

expérimentations prévues lors des deux projets. Les **dates de prélèvements** s'étaleront de janvier 2026 à décembre 2027.

Les projets **BenthicVOC** et **SCREAM** permettront d'obtenir des connaissances sur la nature, la quantité et le rôle des métabolites spécialisés volatils et non-volatils des espèces d'herbiers marins soumis à différents facteurs abiotiques et biotiques grâce à une approche multidisciplinaire basée sur l'écophysiologie, l'écologie fonctionnelle et chimique marine. Ainsi, les données collectées seront utiles à un large éventail de communautés scientifiques.

#### 4. Liste des participants et rôle dans le projet

Une équipe restreinte sera en charge des prélèvements au sein de herbiers marins (tableau 1).

**Tableau 1** : Liste des personnes impliquées dans le projet qui manipuleront directement les espèces.

Doctorant.e.s	Prélèvement, analyses, traitement
Amélie Saunier (Post-doctorante)	Prélèvement, analyses, traitement
Virgile Calvert (Tech Aquariums)	Maintenance organismes en aquariums
Dorian Guillemain (Tech plongeurs)	Prélèvements en plongée
Catherine Fernandez (Directrice de these)	Prélèvement, analyses, traitement

#### 5. Choix des zones de prélèvement

Pour évaluer la santé et la position des herbiers de *C. nodosa*, *Z. marina* et *Z. noltei* dans l'anse de Carteau, nous nous sommes basés sur le rapport de GALATEA et de la préfecture des Bouches du Rhône : « Cartographie des phanérogames marines en fond de Darse 2 et analyse des incidences du projet sur ces espèces – Complément à l'étude d'impact suite à l'avis de la MRAe » publié en 2022 (Figure 1). Par la suite, des visites sur sites nous ont permis de choisir les meilleurs sites d'échantillonnage dont les points GPS sont répertoriés dans le tableau 2. Concernant le site d'échantillonnage de *P. oceanica*, nous avons sollicité nos collègues du service de plongée scientifique de l'OSU Pythéas qui nous ont indiqué un herbier en bonne santé dans la baie de Marseille (Endoume).



**Figure 1** : Synthèse des zones d'observation de *C. nodosa*, *Z. noltei* et *Z. marina* le rapport de GALATEA et de la préfecture des Bouches du Rhône.

**Tableau 2** - Localisation des points de prélèvement des Magnoliophytes et nombre de faisceaux prélevés pour les 4 saisons. Entre parenthèse le nombre de point GPS concernés pour un site par espèce. Code couleur par espèce et point GPS où on les retrouve.

Départements	Bouches du Rhône		Hérault	Corse (2B)	Total
Sites	Anse de Carteau	Marseille (Endoume)	Etang de Thau	Etang d'Urbino	
Point 1	43°22'34.7"N 4°51'04.8"E ( <i>Z. noltei</i> )	43°16'46.4"N 5°20'56.4"E	43°24'24.7"N 3°39'18.6"E	42°3'11.8"N 9°28'6.7"E	
Point 2	43°22'35.3"N 4°51'06.0"E ( <i>Z. marina</i> )				
Point 3	43°22'37.3"N 4°51'46.3"E ( <i>C. nodosa</i> )				
<i>P. oceanica</i>	0	140	0	0	<b>140</b>
<i>Z. noltei</i>	90	0	50	0	<b>140</b>
<i>Z. marina</i>	90	0	50	0	<b>140</b>
<i>C. nodosa</i>	90	0	0	50	<b>140</b>

## Référence

- Abdel-Aal, E. I., Haroon, A. M., & Mofeed, J. (2015). Successive solvent extraction and GC-MS analysis for the evaluation of the phytochemical constituents of the filamentous green alga *Spirogyra longata*. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 41(3), 233-246.
- Ahmad, P., Ahanger, M. A., Singh, V. P., Tripathi, D. K., Alam, P., & Alyemeni, M. N. (2018). *Plant metabolites and regulation under environmental stress*. Academic Press.
- Coquin, S., Ormeno, E., Pasqualini, V., Monnier, B., Culoli, G., Lecareux, C., Fernandez, C., & Saunier, A. (2024). Chemical Diversity of Mediterranean Seagrasses Volatilome. *Metabolites*, 14(12), 705.
- Jerković, I., Marijanović, Z., Roje, M., Kuš, P. M., Jokić, S., & Čož-Rakovac, R. (2018). Phytochemical study of the headspace volatile organic compounds of fresh algae and seagrass from the Adriatic Sea (single point collection). *PLoS One*, 13(5), e0196462.
- Jones, W. P., & Kinghorn, A. D. (2012). Extraction of plant secondary metabolites. *Natural products isolation*, 341-366.
- Lancioni, C., Castells, C., Candal, R., & Tascon, M. (2022). Headspace solid-phase microextraction : Fundamentals and recent advances. *Advances in Sample Preparation*, 3, 100035.
- Li, S., Hu, M., Tong, Y., Xia, Z., Tong, Y., Sun, Y., Cao, J., Zhang, J., Liu, J., & Zhao, S. (2023). A review of volatile compounds in edible macroalgae. *Food Research International*, 165, 112559.
- Niinemets, Ü. (2010). Mild versus severe stress and BVOCs : Thresholds, priming and consequences. *Trends in plant science*, 15(3), 145-153.
- Renault, H., Alber, A., Horst, N. A., Basilio Lopes, A., Fich, E. A., Kriegshauser, L., Wiedemann, G., Ullmann, P., Herrgott, L., & Erhardt, M. (2017). A phenol-enriched cuticle is ancestral to lignin evolution in land plants. *Nature communications*, 8(1), 14713.
- Rieseberg, T. P., Dadras, A., Fürst-Jansen, J. M., Ashok, A. D., Darienko, T., De Vries, S., Irisarri, I., & De Vries, J. (2023). *Crossroads in the evolution of plant specialized metabolism*. 134, 37-58.
- Rubiño, S., Peteiro, C., Aymerich, T., & Hortós, M. (2022). Brown macroalgae (Phaeophyceae) : A valuable reservoir of antimicrobial compounds on Northern coast of Spain. *Marine drugs*, 20(12), 775.
- Saha, M., & Fink, P. (2022). Algal volatiles—the overlooked chemical language of aquatic primary producers. *Biological Reviews*, 97(6), 2162-2173.
- Saunier, A., Coquin, S., Nguyen, X. M. A., Shili, A., Ormeno, E., & Fernandez, A. (2025). Biogenic Volatile Organic Compounds from marine benthic organisms : A review. *Marine Environmental Research*, 107162.
- Saunier, A., Kammer, J., Rocco, M., Wortham, H., Coquin, S., Raina, J.-B., Lecareux, C., Ormeno, E., & Fernandez, C. (2025). BVOC emissions from *Posidonia oceanica*, the most abundant Mediterranean seagrass species. *Chemosphere*, 378, 144392.
- Saunier, A., Ormeño, E., Boissard, C., Wortham, H., Temime-Roussel, B., Lecareux, C., Armengaud, A., & Fernandez, C. (2017). Effect of mid-term drought on *Quercus pubescens* BVOCs' emission seasonality

and their dependency on light and/or temperature. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 17(12), 7555-7566.

Zhu, X., Healy, L. E., Sevindik, O., Sun, D.-W., Selli, S., Kelebek, H., & Tiwari, B. K. (2022). Impacts of novel blanching treatments combined with commercial drying methods on the physicochemical properties of Irish brown seaweed *Alaria esculenta*. *Food chemistry*, 369, 130949.