

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN PRODUCTIVITÉ AQUATIQUE

par

CHRISTIAN HARVEY
B. SC. BIOLOGIE

ANALYSE CHIMIQUE DES ASTÉROSAPONINES CHEZ Leptasterias polaris
ET LEUR RÔLE DANS LA RÉPONSE DÉFENSIVE DE Buccinum undatum



Mise en garde/Advice

Afin de rendre accessible au plus grand nombre le résultat des travaux de recherche menés par ses étudiants gradués et dans l'esprit des règles qui régissent le dépôt et la diffusion des mémoires et thèses produits dans cette Institution, **l'Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** est fière de rendre accessible une version complète et gratuite de cette œuvre.

Motivated by a desire to make the results of its graduate students' research accessible to all, and in accordance with the rules governing the acceptance and diffusion of dissertations and theses in this Institution, the **Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** is proud to make a complete version of this work available at no cost to the reader.

L'auteur conserve néanmoins la propriété du droit d'auteur qui protège ce mémoire ou cette thèse. Ni le mémoire ou la thèse ni des extraits substantiels de ceux-ci ne peuvent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

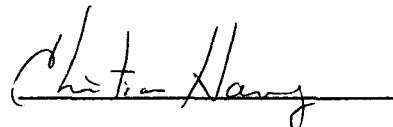
The author retains ownership of the copyright of this dissertation or thesis. Neither the dissertation or thesis, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

RÉSUMÉ

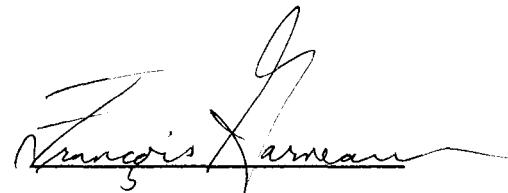
Des études chimiques et biologiques ont été réalisées avec les mélanges de saponines extraits des différentes structures anatomiques de l'étoile de mer Leptasterias polaris.

De ces travaux, les principaux résultats obtenus démontrent que:

- 1- la composition des mélanges de saponines varie selon la structure anatomique
- 2- le xylose, le fucose, le quinovose et le galactose sont les quatre sucres formant la partie hydrate de carbone des saponines extraites
- 3- la quantité totale et les proportions relatives de chaque sucres diffèrent selon l'origine du mélange
- 4- il existe une relation prédateur-proie évidente entre Leptasterias polaris et Buccinum undatum, et que le facteur d'alarme impliqué dans celle-ci est de nature chimique
- 5- la réponse de retrait du pied du buccin et le comportement de fuite manifestés suite à l'application des extraits supposent une implication de ceux-ci dans la relation étudiée
- 6- la réaction défensive typique aux gastéropodes face aux étoiles de mer n'a pu être provoquée d'une façon significative par les mélanges de saponines
- 7- la réponse de fuite semble être le comportement défensif privilégié par le buccin en présence des extraits et que les extraits des structures externes semblent les plus actifs à ce niveau
- 8- la réponse défensive du buccin est spécifique aux étoiles de mer prédatrices de mollusques
- 9- la taille du buccin influence son comportement défensif.



Christian Harvey



François-Xavier Garneau

REMERCIEMENTS

L'auteur tient à remercier toutes les personnes qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce projet. Ses remerciements vont principalement à son directeur de thèse, le Dr. François-Xavier Garneau pour sa disponibilité, son esprit critique et son enthousiasme manifestés lors de la réalisation de l'ensemble du projet. L'auteur voudrait également remercier le Dr. John H. Himmelman, qui par son esprit de synthèse, a permis une révision efficace et constructive des différents textes.

Les remerciements s'adressent aussi à M. Jean-Luc Simard, qui grâce à son esprit développé de la recherche et à sa facilité à transmettre ses connaissances, a contribué grandement à la réalisation de la section analyse chimique du projet. Et enfin, un merci spécial à M. Yves Boivin pour son support et son aide précieuse lors des périodes d'échantillonnage.

Les remerciements vont également au ministère des Affaires Indiennes et du Nord (M.A.I.N.), au ministère de l'éducation du Québec (MEQ-FCAC) ainsi qu'à la fondation de l'Université du Québec à Chicoutimi (FUQAC) pour leurs subventions à F.-X. Garneau, au programme d'aide institutionnelle à la recherche (P.A.I.R.) pour ses bourses d'études accordées à C. Harvey, ainsi qu'au Conseil de recherche en sciences naturelles et de génie du Canada pour ses subventions à J. H. Himmelman.

TABLE DES MATIÈRES

	page
RÉSUMÉ.....	iii
REMERCIEMENTS.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
PARTIE I. INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
PARTIE II. MATERIEL ET MÉTHODE.....	6
2.1 Analyse quantitative et qualitative des saponines dans différentes structures anatomiques de <u>Leptasterias polaris</u>	7
2.1.1 Matériel.....	7
2.1.2 Les organismes.....	8
2.1.3 L'extraction des saponines.....	10
2.1.4 La purification des saponines.....	10
2.1.5 L'extraction quantitative des saponines.....	14
2.1.6 La relation entre la chromatographie sur couche mince phase normale et la chromatographie liquide à haute pression phase renversée.....	15
2.1.7 L'analyse des mélanges de saponines par chromatographie liquide à haute pression phase renversée	16
2.1.8 L'analyse de la partie hydrate de carbone des saponines.....	16
2.2 Rôle des saponines dans la réponse défensive du buccin face à son prédateur <u>Leptasterias</u>	20
2.2.1 Introduction.....	20
2.2.2 Les études préliminaires sur le comportement du buccin.....	21
2.2.3 Les descripteurs biologiques.....	22
2.2.4 Les bioessais utilisant des étoiles de mer comme traitement.....	23
2.2.5 Les bioessais utilisant les extraits de saponines comme traitement.....	24

PARTIE III. L'ANALYSE CHIMIQUE DES EXTRAITS DE SAPONINES.....	26
3.1 Introduction.....	27
3.2 Résultats.....	34
3.2.1 La caractérisation des extraits.....	34
3.2.2 La correspondance entre CCM et CLHPPR.....	39
3.2.3 La quantification du contenu en saponines de chaque structure.....	40
3.2.4 L'analyse des sucres des mélanges de saponines.....	40
3.2.5 L'activité antivirale des saponines.....	45
3.3 Discussion.....	50
3.3.1 Caractérisation des extraits et correspon- dance entre CCM et CLHPPR.....	50
3.3.2 Estimation du contenu en saponines de cha- que structure.....	54
3.3.3 L'analyse des sucres.....	58
3.3.4 L'activité antivirale.....	60
PARTIE IV. L'ANALYSE DU COMPORTEMENT DE <u>Buccinum undatum</u> EN PRÉSENCE DE <u>Leptasterias polaris</u> ET DES DIFFÉRENTS EXTRAITS.....	61
4.1 Introduction.....	62
4.2 Résultats.....	64
4.2.1 Le comportement du buccin face aux étoiles de mer.....	64
4.2.1.1 Réaction défensive du buccin face à <u>Leptasterias</u>	66
4.2.1.2 Démonstration de la nature chimique de l'initiateur de la réaction dé- fensive.....	66
4.2.1.3 La spécificité moléculaire des saponines.....	67
4.2.1.4 L'influence de la taille du buccin sur son comportement défensif.....	68
4.2.2 Le comportement défensif du buccin en présence des saponines.....	69
4.3 Discussion.....	77
4.3.1 La réaction de défense du buccin.....	77
4.3.2 La nature chimique du stimulus.....	77
4.3.3 La spécificité moléculaire.....	78

4.3.4 Modification du comportement de défense du buccin reliée à sa taille.....	79
4.3.5 Le comportement du buccin face aux extraits de saponines.....	80
PARTIE V. CONCLUSION GÉNÉRALE.....	93
BIBLIOGRAPHIE.....	97

LISTE DES FIGURES

	page
Partie II	
Figure 1 : Carte de l'estuaire et golfe du St-Laurent montrant les sites d'échantillonnage (Les Escoumins) et de réalisation des bioessais (Hôvre-St-Pierre)	9
Figure 2 : Procédure générale d'extraction et de purification des saponines.....	11
Partie III	
Figure 3 : Astérosaponine du type cholestène: Thornastéroside A extraite de <u>Acanthaster planci</u> (Kitagawa et Kobayashi, 1978).....	28
Figure 4 : Astérosaponine du type prégnène: Astérosaponine A extraite de <u>Asterias amurensis</u> (Ikegami et al .., 1972).....	28
Figure 5 : Chromatogramme par CLHPPR de l'extrait de la partie aborale.....	35
Figure 6 : Chromatogramme par CLHPPR de l'extrait de la partie orale.....	35
Figure 7 : Chromatogramme par CLHPPR de l'extrait de l'estomac.....	36
Figure 8 : Chromatogramme par CLHPPR de l'extrait des gonades.....	36
Figure 9 : Chromatogramme par CLHPPR de l'extrait du caecum pylorique.....	37
Figure 10 : Chromatogramme par CLHPPR de l'extrait de la partie aborale.....	41
Figure 11 : Chromatogramme par CCM des produits composant l'extrait de la partie aborale séparé par CLHPPR.....	41
Figure 12 : Chromatogramme par CG des dérivés TMS des sucres de la partie aborale.....	42
Figure 13 : Chromatogramme par CG des dérivés TMS des sucres de la partie orale.....	42
Figure 14 : Chromatogramme par CG des dérivés TMS des sucres de l'estomac.....	43

Figure 15 : Chromatogramme par CG des dérivés TMS des sucres de l'extrait des gonades.....	43
Figure 16 : Chromatogramme par CG des dérivés TMS des sucres de l'extrait du caecum pylorique.....	44

Partie IV

Figure 17 : Durée de la réaction de soulèvement du pied du buccin en fonction du logarithme de la concentration de l'extrait.....	72
---	----

LISTE DES TABLEAUX

page

Partie III

Tableau 1 :	Présentation des temps de rétention des différents produits composant les mélanges de saponines extraits de <u>Leptasterias polaris</u>	38
Tableau 2 :	Quantité de saponines par structure anatomique pour quatre groupes d'individus.....	47
Tableau 3 :	Distribution des sucres dans les différentes structures anatomiques chez <u>Leptasterias polaris</u>	48
Tableau 4 :	Données sur l'effet des saponines de <u>Leptasterias polaris</u> sur la réPLICATION du virus influenza.....	49
Tableau 5 :	Analyses du contenu en saponines de différentes espèces d'étoiles de mer.....	56

Partie IV

Tableau 6 :	Comportement des buccins en présence d'étoiles de mer.....	65
Tableau 7 :	Durée moyenne de la réACTION de soulèvement du pied chez le buccin en fonction du traitement appliqué.....	71
Tableau 8 :	Données comparatives sur la fréquence de manifestation des différents types de réponses par les buccins pour les quatre extraits utilisés dans les bioessais.....	74
Tableau 9 :	RéACTIONS défensives des mollusques face aux étoiles de mer.....	88

PARTIE I

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Dans tout écosystème la prédatation est le mécanisme de transfert d'énergie d'un niveau inférieur à un niveau supérieur de la chaîne alimentaire. La sélection d'une proie par un prédateur peut être influencée par plusieurs facteurs, incluant la détectabilité, l'accessibilité, la facilité de capture, le contenu énergétique et le temps de manipulation (Hugues et al., 1984). Les organes des sens impliqués dans cette sélection fonctionnent à la manière de filtres hautement sélectifs analysant une gamme étendue de stimuli chimiques et physiques existants dans l'environnement. La chémoréception signifie la perception sensorielle et la discrimination de produits chimiques spécifiques entraînant des patrons de comportement particuliers (Grant et Mackie, 1974). Il est maintenant accepté que des produits chimiques jouent un rôle important comme médiateurs dans les relations inter- et intra-spécifiques. L'étude de ces interactions et des substances qui en sont responsables constitue une partie du domaine de l'écologie chimique (Sondheimer et Simone, 1970). Une connaissance de ces facteurs est essentielle pour une meilleure compréhension des paramètres complexes impliqués dans la sélection naturelle et dans la régulation de l'équilibre dynamique des écosystèmes naturels (Grant et Mackie, 1974). La complexité des relations inter-spécifiques a conduit à l'élaboration d'un langage et d'une classification permettant une synthèse de ces interactions. Ainsi, Whittaker et Feeny (1971) proposèrent une terminologie où sont considérés en premier lieu le caractère inter- ou intra-spécifique et par la suite, les effets résultants qui peuvent être bénéfiques ou nuisibles à l'espèce qui émet ou qui reçoit les substances.

La survie est la résultante de la lutte contre le manque de nourriture, contre la prédation et contre les différents facteurs abiotiques. La proie voit souvent et inévitablement son habitat chevaucher celui d'au moins un prédateur. La coexistence des proies et des prédateurs a pour effet de maintenir les populations relativement constantes. Cette constance dans les populations est attribuable au fait qu'un même milieu soit partagé par plusieurs espèces de proies et de prédateurs. Ainsi, aucune proie n'est consommée exclusivement et il n'existe aucun carnivore n'ayant un droit exclusif sur les proies présentes. Le nombre d'individus consommés chez une espèce dépendra de nombreux facteurs biotiques et abiotiques dont l'efficacité de ses sens de détection est un élément important. La chémodétection et les comportements adaptatifs de réponse de fuite représentent pour la proie des facteurs essentiels à la survie de l'espèce. De plus, bon nombre d'exemples d'évolution convergente, où différentes espèces de proies ont développé face aux prédateurs des réponses similaires, démontrent bien l'importance et l'efficacité de la chémodétection et de la réponse défensive des proies.

La forte réponse de nombreux organismes face aux étoiles de mer est reconnue depuis plusieurs années (tableau 9). Ainsi, une des plus spectaculaire réponse de défense fut décrite pour la première fois par Fisher (1869) en étudiant la réaction des pétoncles en présence d'étoiles de mer. Bauer (1912) démontra que la réponse était induite par un produit chimique émis par l'étoile de mer et de plus, Mackie et al. (1968) identifièrent ce produit comme étant une saponine. Cependant, les

premières identifications de saponines dans des tissus autres que ceux de plantes terrestres ont été réalisées par Yamanouchi (1942) et par Nigrelli (1952) lors d'études sur le principe toxique présent chez les concombres de mer Holothuria leucospilata et Actinopyga agassizi. Des travaux subséquents sur les échinodermes ont également démontré la présence de saponines chez d'autres espèces de concombre de mer (Yasumato et al., 1967) ainsi que la présence d'autres saponines de composition différente tant au niveau de la partie aglycone que de la partie hydrate de carbone chez les étoiles de mer (Yasumato et Hashimoto, 1965; Rio et al., 1965).

L'objectif principal de ce travail portait sur l'étude de l'importance des saponines émises par Leptasterias polaris dans la relation Leptasterias - Buccinum undatum et plus particulièrement sur l'étude de:

- 1- la distribution des saponines dans les différentes structures anatomiques de l'étoile de mer;
- 2- la réaction de défense de Buccinum undatum face à Leptasterias polaris ;
- 3- la réaction du buccin commun en présence des différents extraits.

La méthode expérimentale utilisée portait sur les deux aspects de l'écologie chimique: la nature des produits chimiques et leur implication dans le monde vivant. Pour ce faire, une extraction et une purification de ces produits furent réalisées. Par la suite, une identification partielle des produits extraits fut effectuée pour s'assurer de la nature glycosidique de ces substances. Enfin, l'implication de ces

saponines fut étudiée par le biais de bioessais où les comportements du gastéropode Buccinum undatum en présence de ces produits et face à l'étoile de mer Leptasterias polaris furent analysés et comparés.

Les principaux résultats obtenus sont les suivants:

1- Les mélanges de produits extraits des différentes structures anatomiques de Leptasterias sont peu différents dans leur composition mais diffèrent grandement au niveau des quantités relatives de chaque produit constituant les mélanges.

2- La partie hydrate de carbone des saponines est composée de xylose, de galactose, de quinovose et de fucose: les sucres normalement rencontrés dans les astérosaponines.

3- Le buccin démontre un comportement de défense face à Leptasterias et ce comportement est initié par des produits chimiques émis par Leptasterias. De plus, l'absence de réponse défensive face à Henricia scabrior révèle que la réaction de défense du buccin est spécifique à son prédateur. Et enfin, les buccins immatures montrent un comportement de défense différent de celui des buccins matures.

4- Les saponines sont actives et ce en modifiant d'une façon significative le comportement du buccin. Cependant, aucune différence d'activité au niveau du soulèvement du pied n'est observée selon l'origine des saponines, mais il semble que le comportement de fuite soit plus fréquent avec les extraits des structures externes.

PARTIE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 ANALYSE QUANTITATIVE ET QUALITATIVE DES SAPONINES DANS DIFFÉRENTES STRUCTURES ANATOMIQUES DE Leptasterias

2.1.1 Matériel

Tous les solvants utilisés pour la réalisation de ce projet, à l'exception de ceux employés pour la chromatographie liquide à haute pression phase renversée (CLHPPR), étaient de grade analytique et préalablement distillés sur verre. Pour la CLHPPR, le méthanol était de grade chromatographique et filtré sur un filtre de nylon ($0,45\ \mu$).

Les chromatographies sur couches minces (CCM) furent réalisées sur des plaques de gel de silice phase normale d'une épaisseur de 0,25 mm et dont les dimensions du support de verre étaient de 5 cm sur 10 cm. Les purifications des astérosaponines par chromatographie liquide basse pression (CLBP) furent réalisées sur du gel de silice phase normale LPS-1 ($13-24\ \mu$, Whatman). Toutes les études de caractérisation des mélanges de saponines par CLHPPR furent effectuées sur une colonne Altex Ultrasphère-ODS (D.P. $5\ \mu$, D.I. 4,6 mm, L. 25 cm, N=20,000). L'analyse par CLHPPR du mélange extrait de la partie aborale, pour fin de comparaison avec les résultats obtenus par CCM, fut réalisée sur une colonne Whatman Partisil 10-ODS-3 (D.P. $10\ \mu$, D.I. 4,6 mm, L. 25 cm). Les analyses des sucres par chromatographie gazeuse ont été réalisées sur une colonne OV-17 (4' x 0.125" D.E.) et sur une colonne capillaire DBI (30 m).

Pour la réalisation des études par chromatographie liquide haute pression, un détecteur à longueur d'onde variable Varian UV-50 couplé à un intégrateur Hewlett-Packard model HP3390A furent utilisés avec une pompe Altex. Pour les analyses par chromatographie liquide gazeuse, un appareil Hewlett-Packard model 5730A et un autre de marque Perkin-Elmer Sigma-3 couplé à un spectre de masse Kratos-AE1 MS-25 avec un intégrateur DS-555 (Nova 3) ont été employés.

2.1.2 Les organismes

Les étoiles de mer, Leptasterias polaris, utilisées pour ce projet provenaient d'une récolte faite en plongée sous-marine à la mi-mai à l'Anse à la Barque, près de Les Escoumins sur la Côte Nord de l'estuaire du Saint-Laurent (fig. 1). La profondeur d'échantillonnage variait entre 4 et 10 m à marée basse. La taille des individus récoltés (mâle et femelle) variait entre 14 et 28 cm, et selon l'indice gono-somatique (Larrivée et Boivin, 1983, comm. pers.) tous les spécimens étaient matures. Les 135 spécimens, en attendant la phase de dissection, ont été conservés dans un aquarium d'eau de mer pendant environ une semaine à une température de 1 °C.

Lors de la dissection, les étoiles de mer, indépendamment du sexe, ont été séparées en 5 constituantes anatomiques: la partie aborale, la partie orale, l'estomac, les gonades et le caecum pylorique. Par la suite, le matériel fut congelé à -30 °C jusqu'à son utilisation

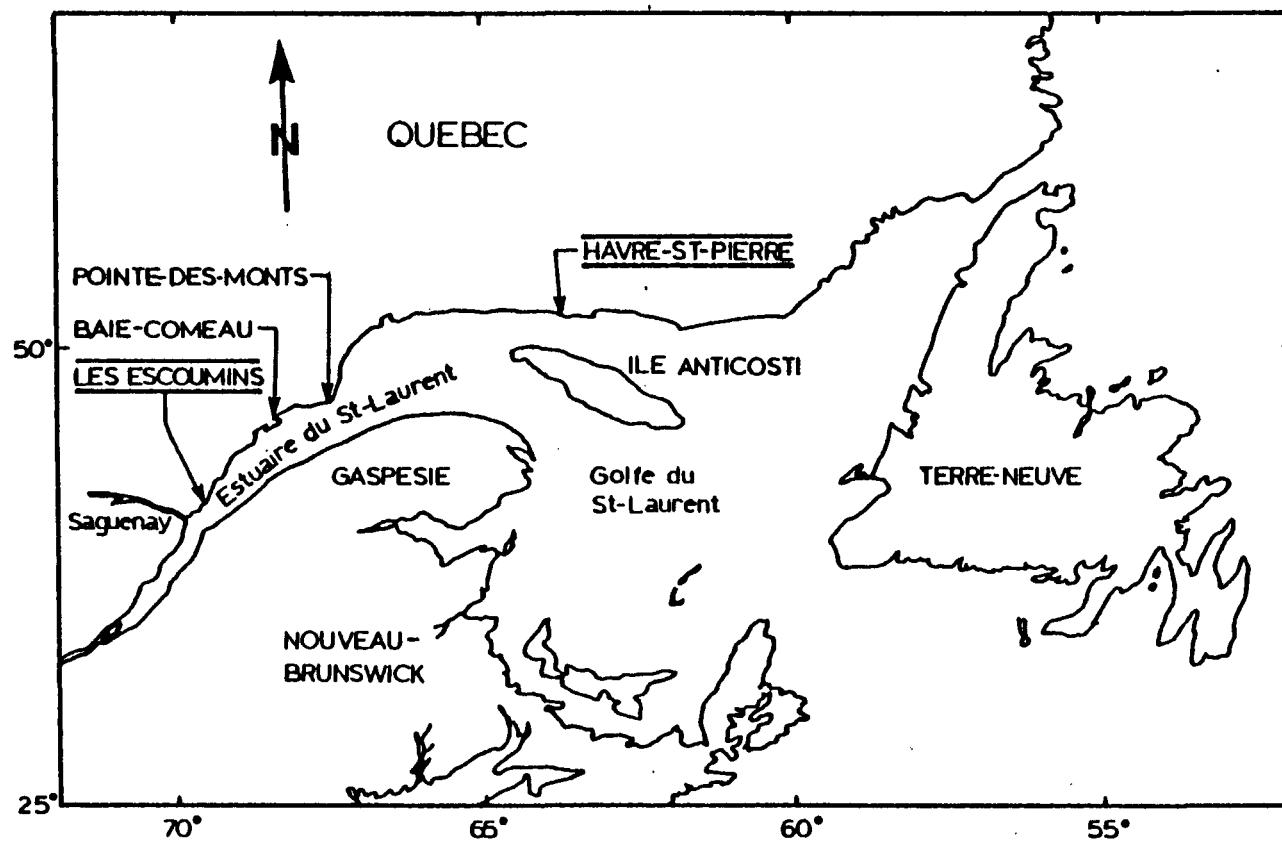


Figure 1. Carte de l'estuaire et golfe du St-Laurent montrant les sites d'échantillonnage (Les Escoumins) et de réalisation des bioessais (Havre-St-Pierre)

pour fin d'extraction.

2.1.3 L'extraction des saponines

La procédure d'extraction utilisée (fig. 2) pour chaque structure est une version modifiée d'une technique développée par d'autres chercheurs (Pike et al., 1974; Burns et al., 1977). Les tissus et organes décongelés furent homogénéisés au mélangeur et extraits avec du méthanol 70 % dans de l'eau. Typiquement, les volumes de solvant utilisés étaient de 3 ml de solvant par gramme de poids humide. La durée d'extraction a été fixée à 2 h avec agitation continue. Par la suite, le mélange fut centrifugé pendant 30 min à 18,000 G. Le surnageant fut récupéré par décantation et les culots subirent une seconde extraction avec du méthanol à 70 % dans l'eau pendant 1 h, puis furent recentrifugés aux conditions citées précédemment. Les deux extraits furent combinés et subirent une extraction liquide-liquide avec du benzène (1 ml/3 ml de surnageant) et la phase méthanolique aqueuse fut récupérée et évaporée sous pression réduite à l'aide d'un rotavapeur.

2.1.4 La purification des saponines

La méthode utilisée pour purifier les mélanges bruts de saponines obtenus des différentes structures comportait 2 étapes. La première étape consistait à mélanger dans un bêcher de 4 l une solution aqueuse de saponines à un volume d'environ 600 ml de résine Amberlite

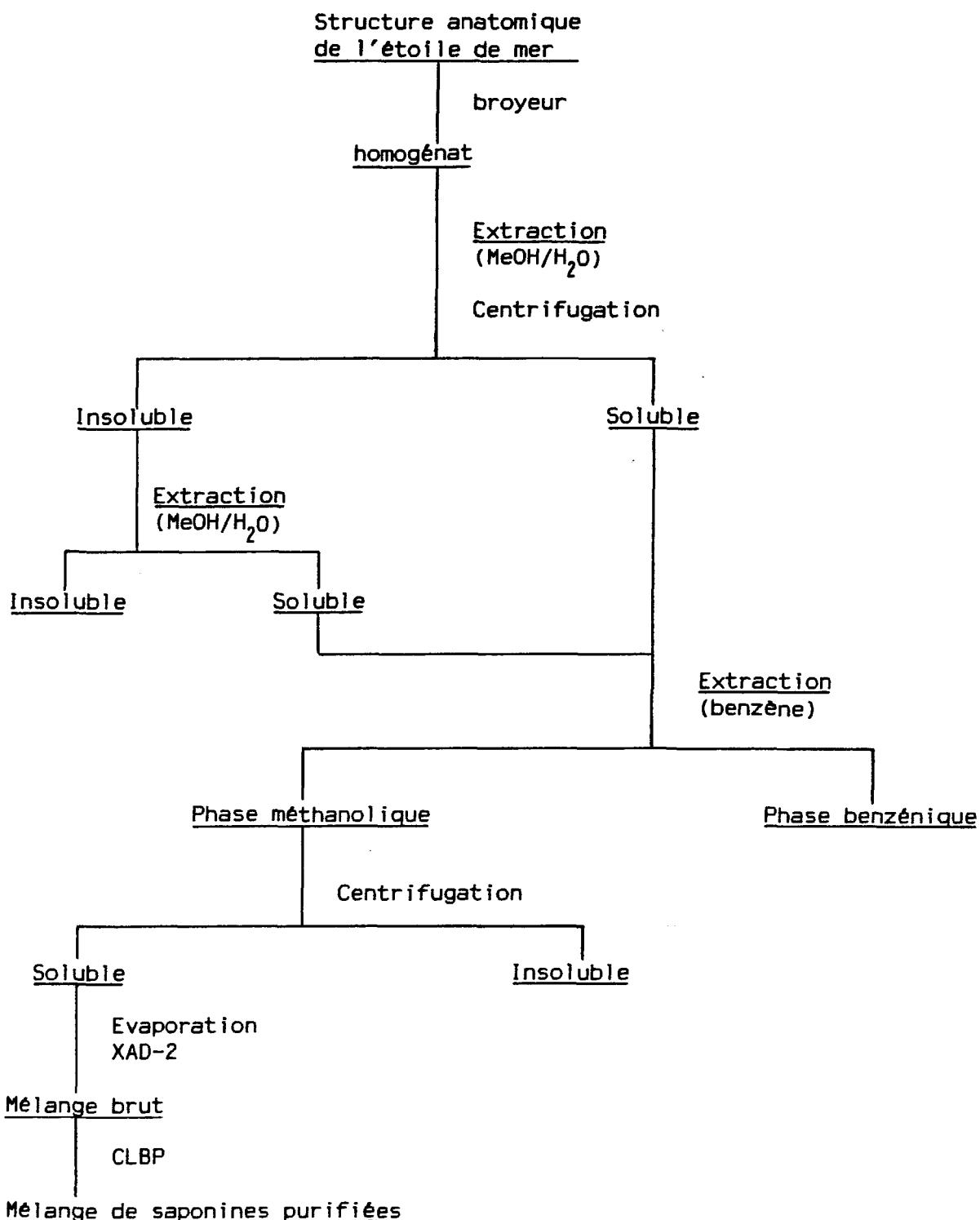


Figure 2. Procédure générale d'extraction et de purification des saponines

XAD-2 préalablement lavée au méthanol 100 % et conditionnée à l'eau distillée. L'adsorption des produits sur la résine se fit pendant une période de 2 h avec une agitation constante.

L'eau fut ensuite récupérée par décantation et la résine lavée avec de grands volumes d'eau distillée déminéralisée afin d'enlever les sels inorganiques. Par la suite, la récupération des saponines adsorbées sur la résine fut réalisée en effectuant 2 lavages successifs avec du méthanol 50 % dans l'eau et enfin 2 lavages avec du méthanol 100 %. Les solutions de lavage avec le méthanol 100 % furent récupérées et évaporées à sec nous donnant ainsi une quantité d'extrait brut de saponines partiellement purifiées pour chaque tissu et organe. Il est à noter que l'ajout d'une petite quantité de butanol-1 lors de toutes les évaporation par rotavapeur empêche la formation de mousse qu'ont tendance à produire les mélanges de saponines en solution dans du méthanol et particulièrement dans du méthanol aqueux. De plus, les mélanges bruts de saponines obtenus ne représentent pas nécessairement le matériel total qui puisse être extrait de chacune des structures. En effet, les extractions faites sur celles-ci et l'adsorption sur résine n'ont pas été réalisées d'une façon exhaustive mais seulement dans le but d'obtenir des quantités suffisantes de matériel brut pour chaque structure anatomique.

La seconde étape de purification des mélanges de saponines fut réalisée par chromatographie liquide à basse pression (CLBP). La procédure consistait à injecter une quantité connue d'un mélange de saponines

sur une colonne (36 x 4.5 cm) de gel de silice phase normale LPS-1 produit par Whatman (13-24 µm) et d'effectuer l'elution des produits à l'aide d'un mélange de dichlorométhane-méthanol-eau (60: 19,4: 3,4, v/v) à un débit de 22.4 ml/min et ce, en utilisant une pompe pour chromatographie liquide à haute pression (Altex, model 110A). La séparation des saponines des autres produits sans intérêt pour le projet, tels pigments et stéroïls, fut suivie par chromatographie sur couches minces (CCM) phase normale. La migration fut effectuée par un mélange de dichlorométhane-méthanol-eau (60: 35: 9, v/v) et la révélation des saponines réalisée en vaporisant sur les couches minces une solution saturée de sulfate cerrique dans l'acide sulfurique 60 % suivi d'un chauffage. Par la suite, le mélange final de saponines purifiées fut obtenu en regroupant les produits de R variant entre 0.20 et 0.40 pour chacun des mélanges de saponines. Le choix des R d'intérêt fut réalisé en se basant sur le comportement chromatographique d'autres saponines animales. De plus, chez Leptasterias, chaque extrait présentait une zone où l'on retrouvait une forte concentration de matériel formant un groupe de produits distincts. Cette région fut considérée comme la zone contenant les saponines. Ainsi, la quantité de saponine exprimée en pourcentage du poids d'extrait brut injecté sur la colonne de gel de silice pour chaque structure était: la partie aborale (54 %), la partie orale (62 %), l'estomac (54 %), le caecum pylorique (35 %) et les gonades (48 %).

2.1.5 L'extraction quantitative des saponines

Pour ce travail, 19 étoiles de mer ont été utilisées. Celles-ci furent récoltées au même endroit que les précédentes le 14 juin 1983 et disséquées en leurs différentes constituantes anatomiques, mais cette fois-ci en formant quatre groupes d'individus. Le poids humide par structure et pour chaque groupe était: la partie aborale (93.8 g, 137.3 g, 268.9 g, 202.2 g), la partie orale (122.8 g, 172.0 g, 281.2 g, 212.0 g), l'estomac (4.8 g, 6.9 g, 11.3 g, 8.1 g), le caecum pylorique (69.8 g, 83.7 g, 115.8 g, 95.6 g) et les gonades (14.1 g, 20.2 g, 87.7 g, 64.0 g). La procédure d'extraction des saponines utilisées dans ce cas-ci fut la même que celle employée précédemment avec cette différence que pour chaque structure, l'extraction fut réalisée jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de saponines détectables par CCM dans la dernière solution d'extraction. Typiquement, pour chaque structure trois extractions successives avec 300 ml de méthanol 70 % dans l'eau furent nécessaires. L'adsorption sur résine XAD-2 fut répétée également tant qu'il était possible de détecter par CCM la présence de saponines dans la phase aqueuse. Par la suite, toutes les fractions de lavage de résine au méthanol 100 % furent combinées pour obtenir la quantité de matériel brut pouvant être extraite de chaque structure et pour chaque groupe [aborale (152.4 mg, 268.4 mg, 506.1 mg, 584.1 mg), orale (200.4 mg, 499.1 mg, 685.7 mg, 375.7 mg), estomac (37.2 mg, 51.1 mg, 74.5 mg, 62.5 mg), caecum pylorique (257.6 mg, 372.5 mg, 501.0 mg, 363.9 mg), gonade (46.3 mg, 27.7 mg, 93.4 mg, 143.8 mg)]. A partir de ces résultats et grâce aux estimations par CLBP de la quantité de saponine contenue dans chaque

extrait brut (section 2.1.4), il fut possible d'évaluer la quantité moyenne de saponines contenue dans chaque structure anatomique.

2.1.6 La relation entre la chromatographie sur couche mince phase normale, et la chromatographie liquide à haute pression phase renversée

Pour cette analyse par chromatographie liquide à haute pression (CLHP), une colonne préparative Altex $5\ \mu$ (25 cm x 1 cm) fut utilisée permettant d'obtenir en quelques injections une quantité suffisante de matériel pour chacun des pics afin d'effectuer la correspondance de ceux-ci avec les taches obtenues par CCM.

La procédure expérimentale utilisée fut d'injecter successivement des volumes de 100 μ l du mélange purifié de saponines extrait de la partie aborale sur une colonne de gel de silice C-18 et d'éluer le matériel avec du méthanol 60 % dans l'eau à un débit de 6 ml/min et en utilisant une longueur d'onde de 202 nm (U.V.) pour la détection. Par la suite, au cours de l'élution, la partie supérieure de chaque pic fut recueillie, concentrée et analysée par CCM en comparant le R_f de chaque produit avec ceux des différents produits qui composent le mélange initial injecté sur la colonne (Figures 10 et 11).

2.1.7 L'analyse des mélanges de saponines par chromatographie liquide à haute pression phase renversée

Cette partie du projet, qui consistait à comparer d'une façon qualitative les mélanges de saponines extraits des différentes structures anatomiques et qui servirent lors des bioessais, fut réalisée par chromatographie liquide à haute pression. Pour ce faire, une solution de concentration connue pour chaque extrait fut préparée avec du méthanol 60 % (v/v) dans l'eau (partie aborale, partie orale et caecum pylorique: 16.67 mg/ml, estomac: 15 mg/ml, gonade: 10 mg/ml) et injectée sur une colonne de gel de silice phase renversée (Altex, ultrasphère ODS, d.p. 5 μ , 4.6 mm x 25 cm). Le volume d'injection pour chaque structure était de 10 μ l sauf dans le cas du caecum pylorique où 4.5 l ont été injectés. L'élution, dans tous les cas, a été réalisée avec du méthanol 60 % (v/v) dans l'eau et à un débit de 1 ml/min.

2.1.8 L'analyse de la partie hydrate de carbone des saponines

L'analyse qualitative et quantitative de la partie hydrate de carbone des saponines fut réalisée par chromatographie liquide gazeuse. La démarche utilisée, comprenant plusieurs étapes, est dérivée de celle utilisée par Garneau et al. (1983). Une première étape, consistant à obtenir les monosaccharides sous la forme de méthyles glycosides, fut réalisée par une méthanolysé. Il est important pour cette réaction, devant être réalisée en milieu anhydre pour éviter la

formation de monosaccharides sous les formes hexoses ou pentoses, d'utiliser du méthanol anhydre obtenu selon une méthode décrite par Vogel (1961).

Typiquement, la formation des méthyles glycosides fut réalisée en utilisant 2 mg d'un mélange de saponine auquel on ajoute une solution comprenant 850 µl de méthanol anhydre et 150 µl de chlorure d'acétyle distillé. La réaction fut effectuée avec reflux à une température de 61 °C pendant 5 h tout en maintenant une agitation permanente. Lorsque l'on ajoute le chlorure d'acétyle au méthanol pour former l'acide chlorhydrique, il est important, pour éviter des éclaboussures et la perte de matériel, de le faire très lentement et de maintenir une agitation continue. Lorsque le temps de méthanolysé prévu fut atteint, la réaction a été arrêtée par neutralisation avec 0,5 g de carbonate d'argent ajouté au milieu réactionnel refroidi à la température de la pièce. Par la suite, la solution neutralisée fut filtrée sur filtre de nylon (0.45 µ), évaporée à sec sous pression réduite et conservée sous cet état jusqu'à la prochaine étape.

L'étape suivante, consistant en la silylation des méthyles glycosides, fut réalisée selon les indications fournies par la compagnie Pierce (1981) pour l'agent de silylation utilisé. Ainsi, une quantité connue du produit de la méthanolysé (aborale: 1.0 mg, orale: 0.7 mg, caecum pylorique: 1.1 mg, estomac: 0.9 mg, gonade: 1.0 mg) fut solubilisée dans 50 µl de pyridine distillée à laquelle on ajoute par la suite 11 µl de N-triméthylsilylimidazole (TMSI). La solution fut agitée

vigoureusement pendant 15 sec au début de la réaction d'une durée de 15 min à la température de la pièce.

La troisième étape, consistant en l'analyse par chromatographie liquide gazeuse des méthyles glycosides pour chaque structure, fut réalisée en injectant ceux-ci sur un chromatographe à gaz muni d'une colonne OV-17 (4' x 0.125" OD). Pour chaque injection, la température initiale du chromatographe fut fixée à 120⁰ C pendant 4 min et suivie d'une augmentation à un taux de 1⁰ C/min jusqu'à 160⁰ C. Dans le cas des ports d'injection et de détection, la température était de 240⁰ C. Le débit du gaz porteur (He) était de 30 ml/min.

La quatrième et dernière étape fut d'identifier les sucres retrouvés dans les différents extraits et de déterminer leur quantité relative à l'aide de courbes standards obtenues de méthyles D-glycosides. Pour ce faire, différents sucres commerciaux (galactose, fucose, quinovose, xylose) furent utilisés auxquels les mêmes procédures de méthanolysé, de silylation et d'analyse par chromatographie liquide gazeuse furent appliquées.

L'identification des sucres composant chaque mélange fut par la suite réalisée par comparaison des temps de rétention de chaque sucre dans les différents mélanges avec ceux des méthyles D-glycosides authentiques. La confirmation de l'identité des sucres a également été réalisée par une analyse sur chromatographe à gaz couplé à un spectro-mètre de masse sur une colonne capillaire DBI (30 m). Les conditions de

chromatographie étaient une température initiale de 60 °C pendant 1 min, suivie d'une augmentation de température jusqu'à 280 °C à un taux de 8 °C/min.

2.2 RÔLE DES SAPONINES DANS LA RÉPONSE DÉFENSIVE DU BUCCIN FACE A SON PRÉDATEUR Leptasterias

2.2.1 Introduction

Cette partie du projet, qui avait comme but l'étude biologique et chimique de la relation prédateur-proie impliquant d'une part l'étoile de mer Leptasterias polaris et d'autre part le gastéropode Buccinum undatum, fut réalisée à l'été 1983 à Havre-St-Pierre sur la côte nord du golfe du St-Laurent (fig.1).

La taille des étoiles de mer utilisées fut déterminée en mesurant le bras le plus long du centre du disque à l'extrémité distale de celui-ci. Ainsi, pour Leptasterias la taille moyenne des individus était de 102 cm ($S=15.3$), $N=47$ et de 93 cm ($S=28.7$) pour les trois Henricia utilisées. Elles furent recueillies en plongée sous-marine à différents endroits autour des îles de l'Archipel de Mingan près de Havre-St-Pierre.

La procédure utilisée et qui fut inspirée des travaux réalisés par Mackie et al. (1968) comportait deux grandes divisions. Une première division consistait à étudier les manifestations présentées par le gastéropode lorsque celui-ci était en présence du prédateur Leptasterias. Une seconde division visait à déterminer l'activité biologique des différents produits naturels (saponines) extraits de l'étoile de mer en étudiant leur effet sur le comportement du buccin. Les buccins utilisés

furent séparés en deux groupes, soit matures (>7 cm) et immatures (<7 cm) (Martel, 1983, comm. pers.).

Tous les organismes utilisés furent capturés au moyen de cages à une profondeur d'environ 10 m et provenaient tous de l'extrémité ouest de l'île du Fantôme. Les collectes étaient journalières et s'effectuaient en fin d'après-midi. Par la suite, les individus étaient conservés dans de grands bassins aérés dans lesquels l'eau était continuellement renouvelée au moyen d'une pompe tirant l'eau directement du fleuve. Le lendemain, pour l'expérience prévue, chaque buccin était mesuré et placé seul dans un contenant en plastique de 2 l pour subir le traitement nécessaire à la réalisation de l'expérience. Dans la majorité des cas, chaque expérience fut réalisée dans la même journée et dans tous les cas un même individu n'était utilisé qu'une seule fois.

2.2.2 Les études préliminaires sur le comportement du buccin

Ces études préliminaires avaient pour but d'analyser le comportement du buccin en présence de Leptasterias et des extraits afin d'en connaître les différentes manifestations comportementales face aux différents traitements et, par la suite, d'élaborer un plan d'observations et de manipulations pour la collecte des différentes données nécessaires à la réalisation des objectifs fixés pour cette étude.

2.2.3 Les descripteurs biologiques

Suite aux études préliminaires, les descripteurs suivants furent sélectionnés:

1. L'agitation du buccin représentée par des mouvements de va-et-vient latéraux de la coquille.
2. La torsion violente du pied.
3. La réaction de fuite manifestée par un changement de direction et une augmentation de la vitesse de déplacement.
4. Le début et la fin d'une réaction.
5. Le soulèvement de la partie antérieure du pied choisie comme site d'application des extraits.
6. Plissement de la marge du pied au site d'application de l'extrait.

Pour le soulèvement et le plissement de la marge du pied, une échelle d'intensité fut déterminée et comportait cinq niveaux: (Voir tableau 8)

1. Réaction très forte provoquant la chute du buccin.
2. Réaction forte se manifestant par une disparition sous la coquille de la partie antérieure du pied.
3. Réaction moyenne se traduisant par un soulèvement de 1 cm.
4. Réaction faible avec un soulèvement de 0.5 cm à perceptible.

5. Aucune réaction.

De plus, la réaction fut qualifiée de locale lorsqu'elle se limitait à la partie touchée par l'extrait, ou propagée si elle se déplaçait vers l'arrière du pied.

2.2.4 Les bioessais utilisant des étoiles de mer comme traitement

Pour chaque essai, 30 buccins furent utilisés et un temps maximal de 5 min leurs fut alloué pour manifester une réaction. Les différents traitements appliqués aux buccins furent les suivants:

1. Introduction du buccin mature (>7 cm) seul dans un contenant où seront réalisés les bioessais afin de connaître l'effet de cette manipulation sur le comportement de l'organisme (organismes témoins).
2. Mise en contact direct du buccin mature avec Leptasterias pour étudier la réponse défensive du buccin face à ce prédateur.
3. Mise en présence, sans contact, du buccin mature et de Leptasterias pour vérifier la rapidité de détection du buccin.

4. Introduction du buccin mature dans un milieu où a sé-journé pendant 3 h une Leptasterias (eau parfumée), afin de vérifier l'hypothèse d'une émission par le prédateur de produits biologiquement actifs et d'une détection à distance de ces substances par la proie.
5. Mise en contact direct du buccin mature avec l'étoile de mer Henricia scabrior produisant des saponines (Burnell, 1978) et qui n'est pas reconnue comme un prédateur de mollusque (Anderson, 1960; Thomas, 1971) pour vérifier la spécificité des saponines.
6. Les expériences 1,3,4 furent répétées avec des buccins immatures (<7 cm) pour étudier le comportement de ces derniers.

2.2.5 Les bioessais utilisant les extraits de saponines comme traitement

Cette partie fut réalisée en utilisant les produits extraits des différents tissus et organes de Leptasterias. Pour fin de comparaison, la procédure utilisée fut la même pour chaque extrait. Ainsi, 16 mg de produits furent dissous dans 800 μ l d'eau de mer filtrée et les solutions diluées aux concentrations suivantes: 400, 200, 100, 50, 25, 10, 5, 2.5, 1, 0.5 μ g/20 μ l. Par la suite, un volume de 20 μ l était injecté délicatement au moyen d'une seringue à environ 3 mm de la partie antérieure du pied du buccin. Pour chaque structure, 100 individus

furent testés à raison de 10 organismes par concentration. Par la suite, pendant une période de 2 min les différents paramètres cités précédemment furent observés et notés, tout comme pour les bioessais utilisant des étoiles de mer comme traitement avec la différence que pour ces bioessais la durée des observations était fixée à 5 min.

PARTIE III

L'ANALYSE CHIMIQUE DES EXTRAITS DE SAPONINES

3.1 INTRODUCTION

Dans le monde végétal, les saponines sont largement répandues. Cependant, dans le règne animal, on n'a retrouvé ces produits que chez les échinodermes. Ainsi, de grandes quantités de ceux-ci ont été retrouvées dans les tissus d'étoiles de mer et de concombres de mer, tandis que chez les ophiures, les échinoides et les crinoïdes ces substances n'ont été retrouvées qu'en traces (Mackie et al., 1977; Yasumoto et al., 1966a, Rugieri et Nigrelli, 1972). Récemment, Schmitz, F. J. (1984) (comm. pers.) isolait chez une éponge de mer, Asteropus sp., une saponine qui serait un dérivé d'une astérosaponine isolée de l'étoile de mer Marthasterias glacialis.

Les astérosaponines ont une structure complexe consistant en une partie stéroïdale à laquelle s'ajoute un groupe sulfate ainsi qu'un oligosaccharide. En général, on s'accorde pour classer les astérosaponines en deux grands types en se basant sur la structure de la partie aglycone de la molécule. Ainsi, les saponines d'étoiles de mer se divisent en types cholestène et prégnène (figures 3 et 4). Plusieurs de ces aglycones ont été décrites par différents chercheurs. Cependant, certains ont émis l'hypothèse qu'un certain nombre de celles-ci seraient des artefacts se produisant spécialement lors de l'hydrolyse acide (Kitagawa et al., 1975; Shimizu, 1973). De plus, Kitagawa et al. (1975) démontrent que l'astérone C pourrait être un artefact produit durant les procédures d'isolation. En effet, le thornastérol A obtenu d'une hydrolyse enzymatique des saponines extraites de Acanthaster planci

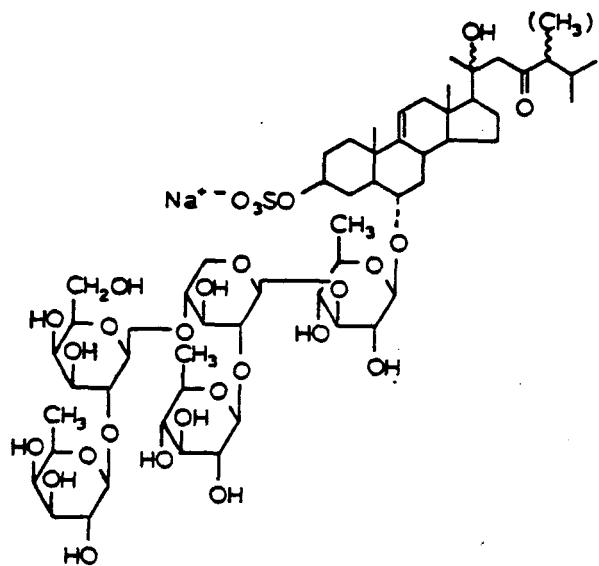


Figure 3. Astérosaponine du type cholestène: Thor-nasteroside A extraite de Acanthaster planci (Kitagawa et Kobayashi, 1978).

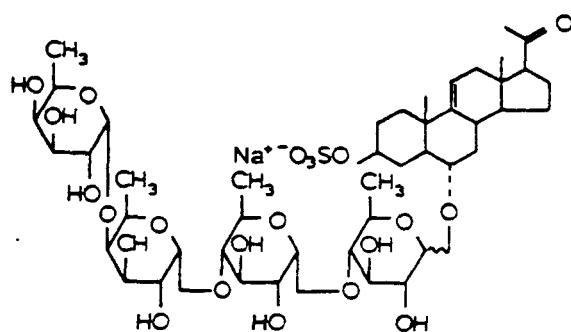


Figure 4. Astérosaponine du type prégnène: Asterosaponine A extraite de Asterias amurensis (Ikegami et al., 1972).

produisit, lorsque traité à l'acide, l'astérone du type prégnène ainsi qu'un stéroïde du type cholestan. Cependant, certaines observations, dont la transformation métabolique du cholestérol en dérivés prégnènes chez Astéries rubens, suggèrent que les aglycones du type prégnène peuvent se retrouver dans les astérosaponines (Teshima et al., 1977).

Un groupement sulfate, pour la plupart des astérosaponines, est lié au groupement 3β -hydroxyl de l'aglycone, sauf dans le cas de Patiria pectinifera (Kicha et al., 1983) où celui-ci est attaché à un sucre. Dans le cas de Protreaster nodosus, il n'y a pas de sulfate (Riccio et al., 1982). Les sucres sont attachés par un lien glycosidique en C-6 sur la partie aglycone. La chaîne de sucres peut être simple comme chez Asterias amurensis (Ikegami et Kamiya, 1972) ou branchée comme chez Acanthaster planci (Kitagawa et Kobayashi, 1977). Les sucres les plus souvent rencontrés sont le fucose, le quinovose, le xylose, le galactose et le glucose avec différentes combinaisons selon l'espèce ou même à l'intérieur d'une même espèce.

Récemment, trois nouveaux types d'astérosaponines étaient trouvés. De Simone, et al. (1981) ainsi que Riccio et al. (1982a) trouvèrent chez deux espèces du genre Echinaster, une astérosaponine du type $\Delta^7 - 3\beta, 6\beta$ -dihydroxystéroidal sans sulfate et avec un oligosaccharide formant un cycle entre les carbones 3 et 6 de la partie aglycone. Riccio et al. (1982b), identifièrent chez Protreaster nodosus un nouveau stéroïde glycosidique dont la structure inclue une partie stéroïdale $3\beta, 5\alpha, 6\beta, 8\beta, 15\alpha, 24\zeta$ -hexahydroxy et une partie hydrate de carbone

(2-O-méthyl- β -D-Xylopyranosyl-(1-2)- α -L-arabinofuranosyl) liée en C-24.

La molécule ne contient ni sulfate, ni de double lien 9(11) normalement rencontrés chez les astérosaponines. Enfin, Kicha et al. (1983) isolèrent chez Patiria pectinifera l'astérosaponine P du type cholestane [5'-O-sulfate 24-(α -3-O-méthyl-L-arabinofuranosyl)-3 β , 6 α , 8 β , 15 α , 24 ζ -pentahydroxy-5 α -cholestane]. Le seul sucre présent, lié en C-24, est le L-arabinose auquel est lié le groupe sulfate. La structure ne contient également pas de lien double 9(11).

Les travaux réalisés par différents chercheurs sur plusieurs espèces d'étoile de mer ont démontré que les astérosaponines n'étaient pas uniformément distribuées entre les différentes constituantes anatomiques à l'intérieur d'une espèce et entre les différentes espèces. Ainsi, de fortes concentrations ont été trouvées dans l'estomac, le caecum pylorique et les gonades chez A. rubens (Yasumoto et al., 1966b). Chez A. amurensis, toujours selon Yasumoto et al. (1966b), les concentrations les plus élevées, se basant sur l'activité hémolytique des extraits, se retrouveraient dans l'estomac et les gonades. Tandis que chez M. glacialis l'épiderme, les podia et l'estomac contiendraient les plus grandes quantités de saponines (Feder, 1967; Mackie et al., 1977). Les oocytes de A. rubens contiendraient également une forte concentration de ces produits (Voogt et Huiskamp, 1979). Chez Crossaster papposus, les podia seraient les plus riches en astérosaponines et chez Solaster endeca, les sillons des épines marginales en contiendraient le plus (Mayo et Mackie, 1976). Selon Voogt et Huiskamp (1979), elles seraient absentes ou non détectables dans les testicules et le liquide périvicéral de A.

rubens. Enfin, chez A. planci, Howden et al. (1975) ont démontré que des saponines du même type chimique étaient présentes en quantités comparables dans les oeufs, les ovaires et l'étoile de mer entière.

Plusieurs auteurs ont montré que les astérosaponines présentaient des fluctuations saisonnières au niveau de leur abondance dans les différentes structures anatomiques. Gilgan et al. (1976), démontrent que la concentration des saponines sous forme d'aglycone après hydrolyse acide, variait chez A. vulgaris en fonction de la période de l'année. Les mêmes résultats furent obtenus par Burns et al. (1977). Chez A. amurensis, le contenu en saponines des ovaires atteindrait des valeurs minimales durant l'hiver quand l'organisme est en période de reproduction (Ikegami et al., 1972b). Cependant, selon Mackie et al. (1977), la concentration des saponines dans les gonades de M. glacialis serait au maximum en été, durant sa période de reproduction. Voogt et Huisman (1979) démontrent que les saponines dans les gonades mâles chez A. rubens étaient à de très faibles concentrations immédiatement après la ponte et qu'elles étaient absentes durant le reste de l'année. Dans les ovaires, la concentration serait faible en été, augmente en automne, et est haute en hiver jusqu'à la ponte.

Plusieurs astérosaponines isolées de différentes espèces d'étoile de mer possèdent un certain nombre de propriétés pharmacologiques. Certaines ont démontré une activité antibactérienne, antivirale et fongicide. Or, toutes les saponines ne présentent pas ces propriétés. Comme l'ont démontré Goldsmith et Carlson (1974), une saponine extraite

de Asterias forbesi ne présente pas ces propriétés, mais démontre des caractéristiques analgésiques, antiflamatoires et hypotensives.

Selon Ikegami et al. (1972a,b, 1973), les astérosaponines chez A. amurensis seraient des substances inhibant la ponte et la maturation des oocytes. Cependant, Burns et al. (1977), chez A. vulgaris, et Mackie et al. (1977), chez M. glacialis, montrèrent que la présence de concentrations élevées de saponines dans les organes reproducteurs juste avant et pendant la période de reproduction ne pouvait donc inhiber la ponte chez ces espèces. Voogt et Huiskamp (1979), arrivèrent aux mêmes conclusions en étudiant A. rubens. Mackie et al. (1977) avancèrent l'hypothèse que les saponines pourraient être des activateurs de l'absorption des stéroïdes dans l'estomac et le caecum pylorique. Pour leurs parts, Lucas et al. (1979) démontrèrent que les saponines contenues dans les œufs et les larves de A. plancti pouvaient servir de défense chimique contre les poissons planctivores.

L'utilisation de la chromatographie liquide haute pression (CLHP) pour l'étude des saponines stéroïdales d'étoiles de mer est très peu répandue. Différentes procédures sont généralement utilisées pour l'obtention des astérosaponines. Ainsi, la plupart des travaux réalisés dans ce domaine font mention de la filtration sur différents types de gel, de la chromatographie liquide basse pression (CLBP), de la chromatographie sur couche mince (CCM), de la dialyse et de la recristallisation comme méthodes de purification des astérosaponines. Minale et al. (1978), De Simone (1979a,b), Riccio et al. (1982b) et enfin Komori

et al. (1983) utilisèrent la chromatographie liquide haute pression phase renversée (CLHPPR) pour la séparation et la purification d'astérosaponines chez différentes espèces d'étoile de mer.

Le problème majeur dans l'utilisation du CLHP est la limite de détection photométrique des saponines, qui ne montrent pas une forte absorption de la lumière dans le visible ou dans l'ultra violet à longue longueur d'onde. Dans le cas des saponines, la longueur d'onde utilisée se situe aux environs de 200 nm. Cependant, dans cette région de l'ultra violet, les systèmes de solvants utilisables sont très limités. Ainsi, pour la CLHPPR, les seuls systèmes pouvant résoudre le problème sont des mélanges eau-acétonitrile ou eau-méthanol. La CLHPPR a été également utilisée dans l'étude des glycosides cardiaques (Seiber et al. 1981) et des saponines végétales (Kesselmeier et Strack, 1981).

3.2 RÉSULTATS

3.2.1 La caractérisation des extraits

Le but de cette étude était de caractériser à l'aide de la chromatographie liquide haute pression phase renversée (CLHPPR) les différents mélanges de saponines extraits de Leptasterias. Tel que déjà cité dans l'introduction, peu de chercheurs utilisent la CLHPPR pour l'étude des astérosaponines. De plus, parmi ceux cités, très peu ont utilisé cette technique pour séparer les astérosaponines (Riccio et al., 1982), les autres employant cette méthode pour isoler la partie aglycone de la molécule obtenue par hydrolyse acide ou enzymatique des mélanges de saponines.

Chez Leptasterias, chaque mélange extrait et purifié et n'ayant subit aucune transformation due à des réactions chimiques a été analysé par CLHPPR. Les chromatogrammes ainsi obtenus représentent le patron de saponines contenues dans chaque structure de l'étoile de mer pour une période donnée de l'année (figures 5 à 9). Pour chaque mélange, la concentration et le volume injecté sont des valeurs connues, ce qui permet une comparaison qualitative et quantitative entre chaque extrait.

L'analyse de ces chromatogrammes a été résumée au tableau 1. On y retrouve chacuns des principaux pics pour les différents extraits avec leur temps de rétention respectif. Pour fin de comparaison, l'extrait de la partie aborale fut considéré comme mélange de référence auquel ont été

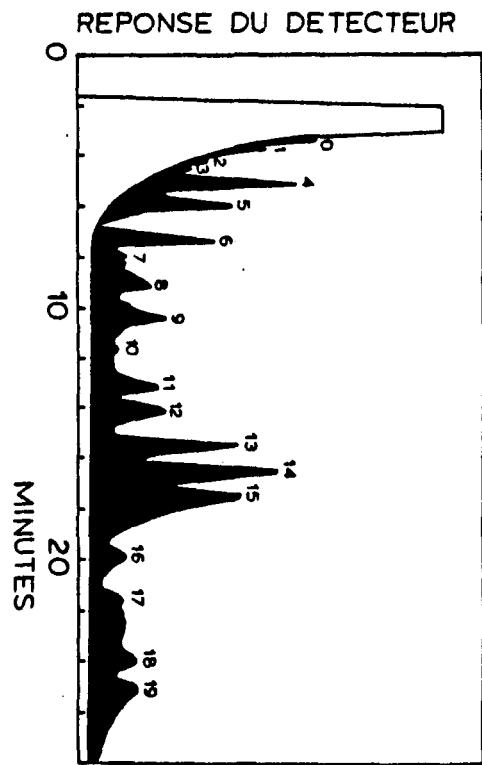


Figure 5. Chromatogramme par CLHPPR de l'extrait de la partie aborale

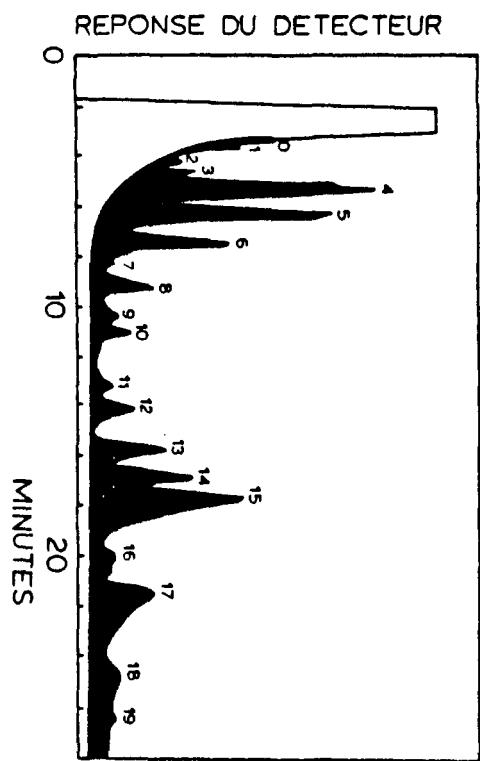


Figure 6. Chromatogramme par CLHPPR de l'extrait de la partie orale

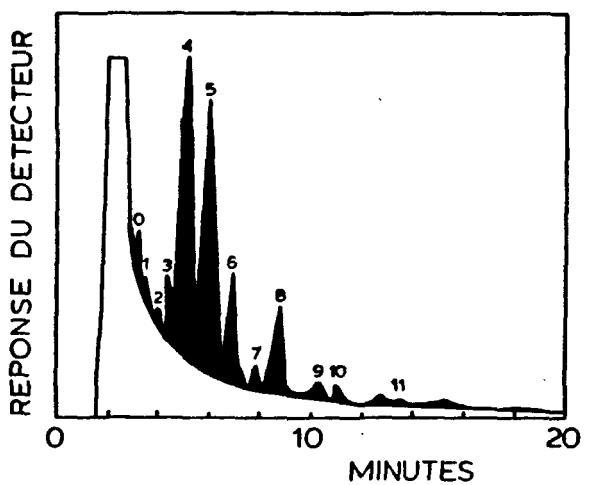


Figure 7. Chromatogramme par CLHPPR de l'extrait de l'estomac

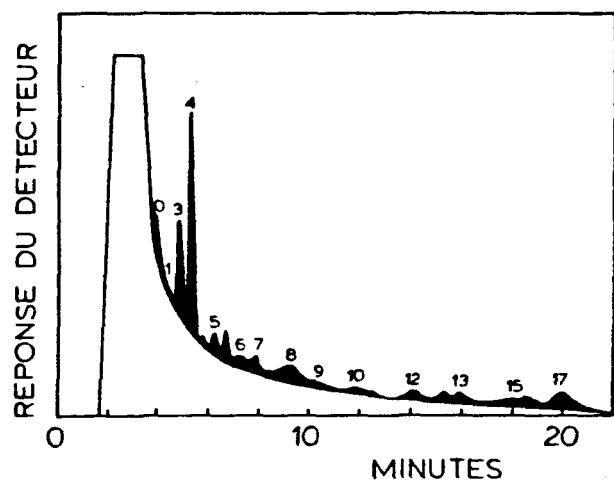


Figure 8. Chromatogramme par CLHPPR de l'extrait des gonades

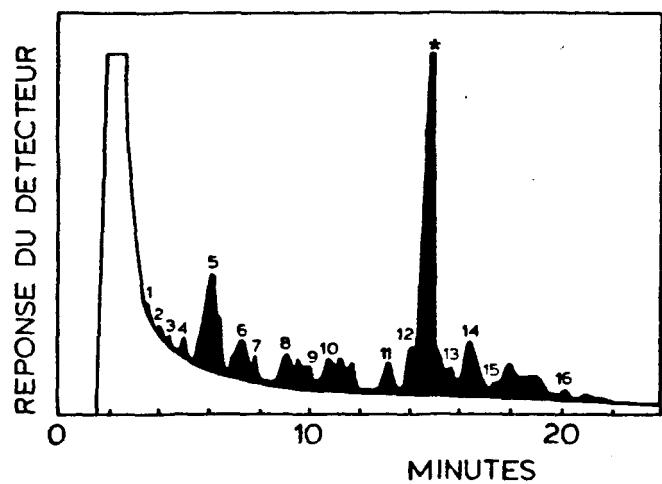


Figure 9. Chromatogramme par CLHPPR de l'extrait du caecum pylorique

TABLEAU I

Présentation des temps de rétention des différents produits composant les mélanges de saponines extraits de Leptasterias polaris

No. Pics	Tissus et organes				
	Partie aborale TR(min)	Partie orale TR(min)	Estomac TR(min)	Caecum pylorique TR(min)	Gonades TR(min)
0	3.3	3.4	3.3		3.3
1	3.7	3.7	3.5	3.6	
2	4.2	4.2	4.1	4.1	4.0
3	4.5	4.5	4.4	4.5	4.5
4	5.1	5.3	5.1	5.2	4.9
					5.6*
5	6.0	6.2	6.0	6.1	6.0
					6.5*
6	7.4	7.4	7.0	7.4	7.1
7	8.0	8.4	7.9	7.9	7.7
8	9.0	9.2	8.8	9.2	9.0
				9.6*	
9	10.4	10.4	10.4	10.2	10.2
10	11.8	11.1	11.1	11.1	11.6
				11.4*	
				11.9*	
11	13.4	13.2	13.6	13.3	
12	14.1	14.1		14.2	14.0
				14.8*	15.0*
13	15.4	15.8		15.8	15.6
14	16.4	16.8		16.4	
15	17.4	17.6		17.4	17.8
				18.1*	18.4*
				19.2*	19.6*
16	19.8	20.1		20.2	
17	21.4	21.5			
18	22.8				
19	25.0	24.7			
		26.4			

* : Les temps de rétention n'ayant pas de correspondance dans la partie aborale.

comparé les autres chromatogrammes. En général, on observe une très bonne correspondance entre les mélanges au niveau des temps de rétention. De plus, les chromatogrammes des parties aborale et orale montrent une très forte similitude aux niveaux quantitatif et qualitatif avec des pics importants entre 3 et 26 min de temps de rétention ainsi que deux groupes de produits majeurs entre 5.1 et 7.4 min et entre 15.4 et 17.6 min. Dans le cas du caecum pylorique, on ne retrouve qu'un produit majeur à 14.8 min et qui de plus n'a aucune correspondance avec les produits des autres mélanges. Pour les gonades et l'estomac, on n'observe qu'un groupe de produits majeurs de polarité élevée. Ainsi, l'estomac contiendrait deux produits majeurs se situant entre 5.1 et 8.8 min, et les gonades, pour leur part, montrent aussi deux produits majeurs à 4.5 et 4.9 min de temps de rétention.

3.2.2 La correspondance entre CCM et CLHPPR

La chromatographie sur couche mince a été utilisée pour regrouper les fractions obtenues par CLBP lors de la purification des extraits bruts afin d'avoir, pour chaque structure, un mélange purifié d'astérosaponines. Or, la CCM est une méthode d'analyse où la capacité de détection et de séparation est très faible en particulier dans les cas de mélanges complexes. Donc, afin de vérifier l'efficacité du regroupement à délimiter la zone des saponines, une étude par CLHPPR fut réalisée sur le mélange purifié de saponines extrait de la partie aborale. Ainsi, chaque pic du mélange obtenu par CLHPPR fut comparé par CCM au mélange purifié

de saponines. Les résultats obtenus sont présentés aux figures 10 et 11, où il est possible de voir la correspondance entre les deux types d'analyse. On remarque que ce qui apparaît sur couche mince comme un mélange formé de 6 ou 7 produits, selon la qualité de la séparation, avec des R variant de 0.24 à 0.44, s'avère, par CLHPPR, être un mélange d'au moins 15 produits dont les temps de rétention (TR) varient entre 2 et 14.05 min.

3.2.3 La quantification du contenu en saponines de chaque structure

Le but de ce travail était d'estimer les quantités de saponines pouvant être extraites des différentes structures anatomiques chez Leptasterias. Les résultats obtenus (tableau 2) ont révélé après une analyse de la variance ($F_{exp} = 59.22$ pour $F_{\alpha=0.01} = 28.71$) et un test de Scheffé que seul l'estomac contiendrait une quantité plus élevée de saponines.

3.2.4 L'analyse des sucres des mélanges de saponines

L'étude des sucres réalisée par l'analyse des dérivés méthyles glycosides triméthylsilylés par chromatographie gazeuse à ionisation de flamme (figures 12 à 16) révéla, après comparaison avec les temps de rétention de méthyles D-glycosides authentiques, que les cinq mélanges

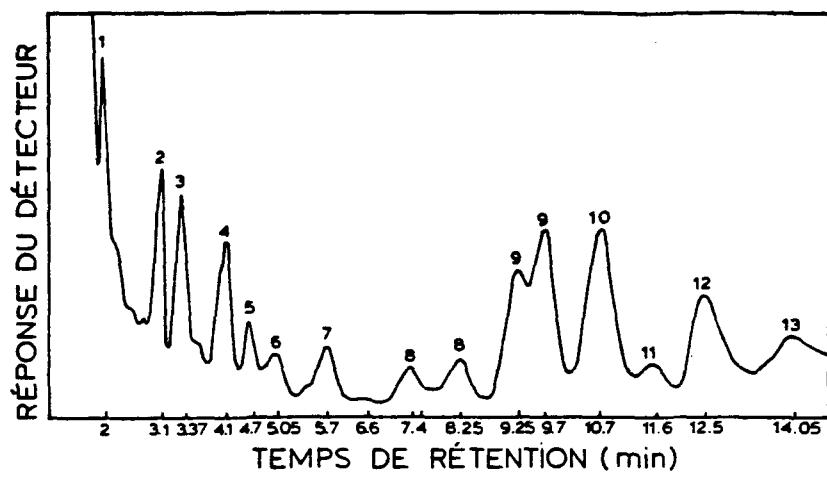


Figure 10. Chromatogramme par CLHPPR de l'extrait de la partie aborale

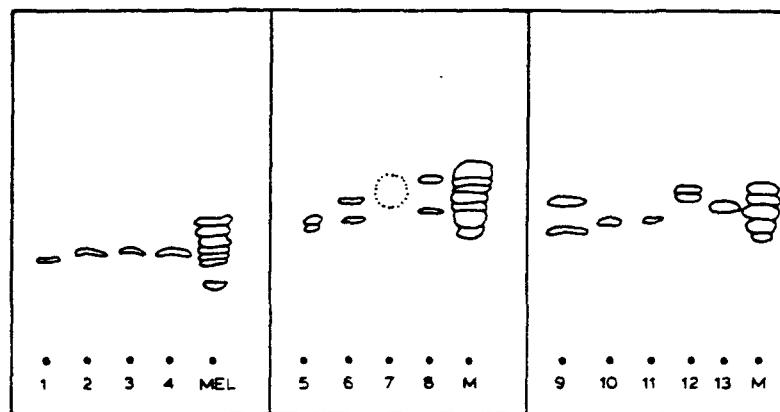


Figure 11. Chromatogramme par CCM des produits composant l'extrait de la partie aborale séparée par CLHPPR

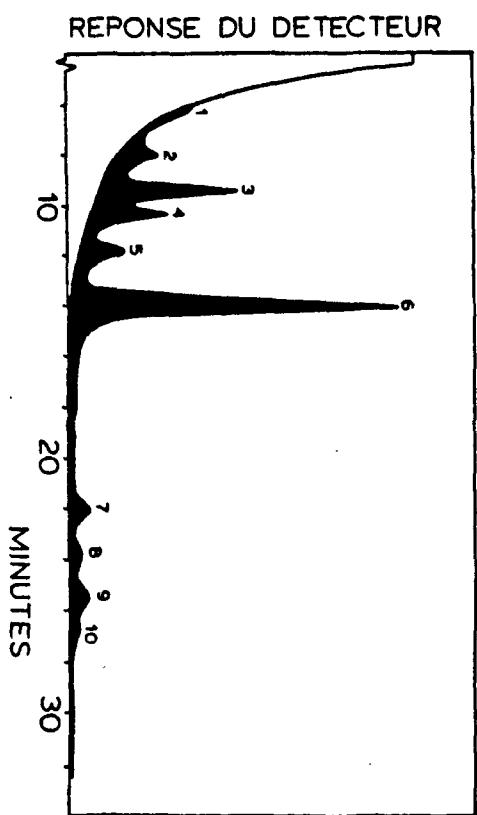


Figure 12. Chromatogramme par CG des dérivés TMS des sucres de la partie aborale.
 (5): Me-Xyloside, (6): Me-quinovoside,
 (2), (3), (4): Me-fucoside,
 (7), (8), (9), (10): Me-galactoside

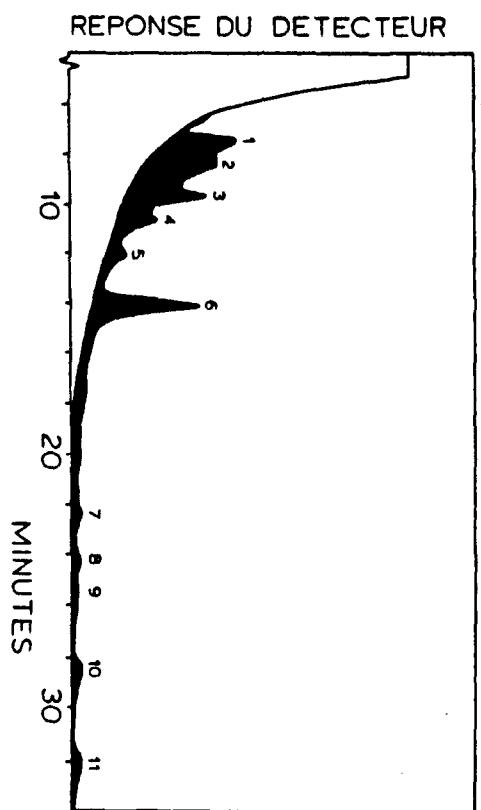


Figure 13. Chromatogramme par CG des dérivés TMS des sucres de la partie orale.
 (5): Me-Xyloside, (6): Me-quinovoside,
 (2), (3), (4): Me-fucoside,
 (7), (8), (9), (10): Me-galactoside

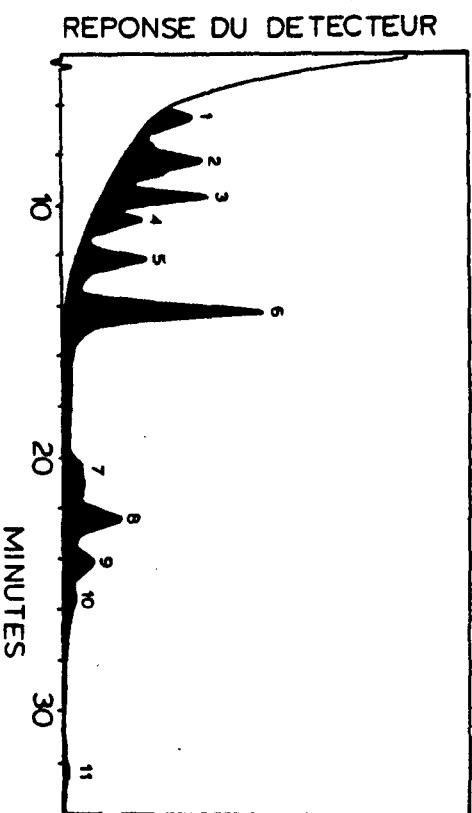


Figure 14. Chromatogramme par CG des dérivés TMS des sucres de l'estomac.
 (5): Me-xyloside, (6): Me-quinovoside,
 (2), (3), (4): Me-fucoside,
 (7), (8), (9), (10): Me-galactoside

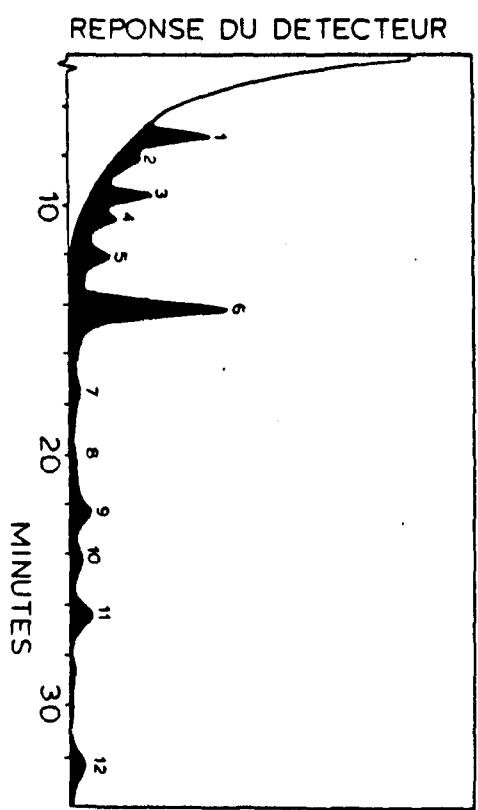


Figure 15. Chromatogramme par CG des dérivés TMS des sucres de l'extrait des gonades.
 (5): Me-xyloside, (6): Me-quinovoside,
 (2), (3), (4): Me-fucoside,
 (8), (9), (10), (11): Me-galactoside

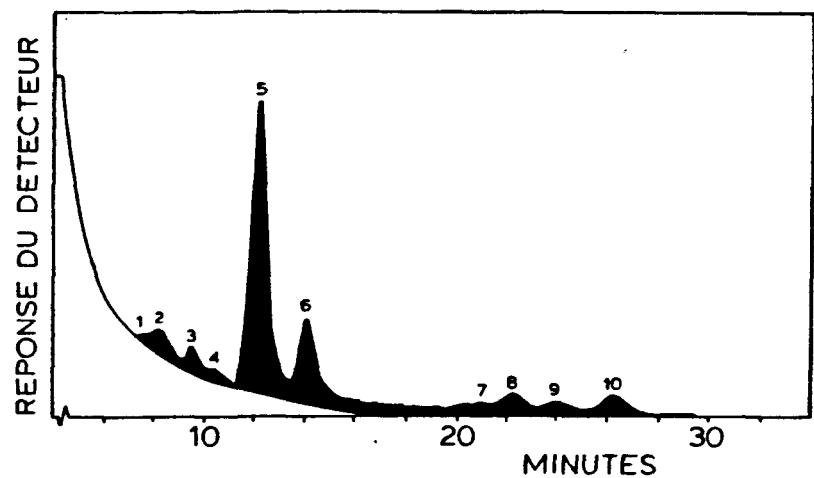


Figure 16. Chromatogramme par CG des dérivés TMS des sucres de l'extrait du caecum pylorique.
(5): Me-xyloside, (6): Me-quinovoside,
(2), (3), (4): Me-fucoside,
(8), (9), (10), (11): Me-galactoside

contenaient les sucres suivants: fucose (TR= 8.4, 9.8, 10.8), xylose (TR= 12.3), quinovose (TR= 14.4) et le galactose (TR= 20.6, 22.5, 24.2 et 26.5). La confirmation de l'identité des sucres fut également réalisée par un chromatographe à gaz couplé à un spectromètre de masse (CGSM). Les sucres suivants furent donc identifiés: fucose: TR=20.8, 21.4; ms m/Z 379 (M -Me), 363 (M -OMe); xylose: TR=22.2; ms m/Z 365 (M -OMe); quinovose: TR=23.0, 23.3, 23.7; ms m/Z 363 (M -OMe); galactose: TR=25.4, 26.0, 26.7, 26.9; ms m/Z 377 [m -(Met TMSOH)], 361 [M - (OMe +TMSOH)].

L'analyse quantitative des sucres (tableau 3) montre que le quinovose est le sucre le plus abondant dans toutes les structures sauf dans le cas du caecum pylorique où le xylose forme 80.46 % des sucres. Les quantités totales de sucres pour chaque structure par ordre d'importance sont les suivantes: caecum pylorique (3393 nmoles), partie aborale (2744 nmoles), estomac (2218 nmoles), gonades (1584 nmoles) et la partie orale (1586 nmoles).

3.2.5 L'activité antivirale des saponines

Pour vérifier une activité antivirale possible des saponines de Leptasterias, les extraits provenant des parties aborale et orale, de l'estomac et du caecum pylorique furent testés. Les résultats obtenus (tableau 4) représentent la quantité de virus influenza nécessaire pour provoquer la dégénérescence de 50 % du feuillet cellulaire, soit le

DICT . Ces résultats sont exprimés en valeur logarithmique d'un nom-
bre de virus par 0.025 ml. En comparant le titre viral pour chaque
mélange de saponines au titre viral du témoin, on note que les extraits,
aux concentrations utilisées, n'ont aucun effet sur la croissance du
virus influenza.

TABLEAU 2

Quantité de saponines par structure anatomique pour quatre groupes d'individus.

Tissus et organes	Contenu en saponine (mg/g de poids humide)				
	Groupe I	Groupe II	Groupe III	Groupe IV	Valeurs moyennes
					$\bar{X}(S)$
Partie aborale	0.9	1.1	1.0	1.6	1.15 (0.27)
Partie orale	1.0	1.8	1.5	1.1	1.35 (0.32)
Estomac	4.8	4.6	3.9	4.8	4.53 (0.37)
Caecum pylorique	1.3	1.6	0.8	1.3	1.25 (0.29)
Gonades	1.6	0.7	0.5	1.1	0.98 (0.42)

TABLEAU 3

Distribution des sucres dans les différentes structures anatomiques chez
Leptasterias.

	Partie aborale (n mole)	Partie orale (n mole)	Caecum pylorique (n mole)	estomac (n mole)	gonades (n mole)
SUCRES					
Galactose	231	64	229	334	211
Xylose	323	176	2730	702	273
Fucose	435	501	68	260	189
Quinovose	1755	845	366	922	916
TOTAL	2744	1586	3393	2218	1589

TABLEAU 4

Données sur l'effet des saponines de Leptasterias sur la réPLICATION du virus influenza

Structure et organe	Concentration de saponines μg/ml	Titre viral (log)
Partie aborale	10	2.5
Partie orale	12	2.5
Estomac	11	2.5
Caecum pylorique	15	3.0
Témoin	-	3.0

3.3 DISCUSSION

3.3.1 Caractérisation des extraits et correspondance entre CCM et CLHPPR

Si l'on considère un des buts de l'ensemble du projet, soit la localisation et l'obtention de produits intervenant dans la relation prédateur-proie unissant le buccin et Leptasterias, on comprend immédiatement l'importance que revêt la caractérisation des mélanges de saponines. Yasumoto et Hashimoto (1965) démontrent que la substance toxique extraite de A. amurensis était en fait composée de six saponines séparables par chromatographie sur couche mince. Un composé principal nommé astérosaponine A fut caractérisé. Par la suite, la structure de l'astérosaponine B fut élucidée par Yasumoto et Hashimoto (1967). Récemment, Okano et Ikegami (1981) isolèrent des ovaires de la même espèce d'étoile de mer cinq nouvelles astérosaponines dont les propriétés physico-chimiques diffèrent de celles des astérosaponines A et B isolées précédemment. Il apparaît donc qu'une structure anatomique peut contenir différentes saponines. De plus, Voogt et Van Rheenen (1982) démontrent que chez A. rubens différentes structures et organes (le caecum pylorique, l'estomac, la zone ambulacrale et les ovaires) contiennent différents mélanges de saponines, et ce en se basant sur des différences d'activité hémolytique et de rapport molaire sucre/sulfate entre les différents tissus.

L'analyse des différents extraits par CCM révéla que les mélanges de saponines purifiées par CLBP étaient composés de produits dont les R variaient de 0.22 à 0.41 (0.02). Le nombre de produits par mélange tel qu'obtenu par CCM variait de 2 à 6 selon la structure et également selon la qualité de la séparation. Etant donné le faible pouvoir de séparation des couches minces, une étude par CLHPPR fut réalisée.

Les résultats démontrèrent après plusieurs répétitions la grande précision de cette méthode pour la caractérisation des mélanges. En effet, l'injection répétée d'un même mélange dans les mêmes conditions expérimentales donna toujours le même type de chromatogramme. De plus, une analyse de l'extrait de la partie aborale durant plusieurs mois démontre que le produit séché et conservé à la température de la pièce ne subissait pas de modification.

Si on effectue une analyse quantitative basée sur l'amplitude des pics, on remarque pour la partie aborale et la partie orale (figures 5 et 6) que la principale différence réside dans les quantités relatives des composés les plus polaires (pics 4, 5 et 6). En effet, dans la partie orale, ceux-ci représentent les produits majeurs. Dans les deux structures, on retrouve un autre groupe de produits majeurs (pics 13, 14 et 15) qui dans les deux cas ont des quantités relatives légèrement différentes, quoique leurs concentrations totales soient comparables. Au niveau de l'estomac (figure 7), on ne retrouve qu'un groupe de produits majeurs dont les deux principaux pics sont en concentrations équivalentes aux pics 4 et 5 de la partie orale. Comme dans l'estomac, les gonades

(figure 8) ne présentent qu'un groupe de produits majeurs (pics 3 et 4), également de polarité élevée. La comparaison du caecum pylorique (figure 9) avec les autres structures est plus difficile dû au fait que le volume injecté ($4 \mu l$) était inférieur à celui des autres mélanges ($10 \mu l$). Cependant, on remarque que ce mélange est en majeur partie composé d'un produit ($TR=14.8$ min) de polarité se situant entre les pics 12 et 13 de la partie aborale. On remarque également que pour chaque mélange, une augmentation de la concentration des produits de polarité élevée ($TR= 3$ à 9 min) est accompagnée d'une réduction de concentration des produits de faible polarité ($TR=14$ à 26 min).

Même s'il n'est pas formellement prouvé que deux produits ayant le même temps de rétention dans deux structures différentes soient une même saponine, il devient tout de même intéressant d'établir une correspondance entre les chromatogrammes en se basant sur les temps de rétention (tableau 1). Ainsi, si on considère la partie aborale comme mélange de référence et qu'on essaie d'établir une correspondance entre chacun des pics de ce mélange et ceux des autres extraits, on arrive à une forte ressemblance entre ces différents mélanges. De plus, si on conserve, pour chaque structure les quinze premiers produits ($TR= 3.3$ à 17.8 min) ce qui correspond à la zone où l'on retrouve les produits majeurs et où la séparation est la plus efficace, cette correspondance est encore plus marquée. Pour l'estomac (figure 7), les pics 12, 13, 14 et 15 semblent absents du mélange quoiqu'il soit possible que cette différence ne soit attribuable qu'à la quantité de matériel injecté. Pour la partie orale, la similitude est parfaite. Dans le cas du caecum pylorique, le pic 0 est

absent et, en plus des produits rencontrés dans la partie aborale, d'autres dont les temps de rétention sont identifiés par un astérisque, ne semblent pas avoir leurs équivalents dans la partie aborale. La différence la plus importante du caecum pylorique se situe au niveau du pic de temps de rétention 14.8 min. De plus, ce dernier forme le produit majeur du mélange, et il est à remarquer que seul le caecum pylorique contient un produit qui atteint une telle proportion comparativement aux autres éléments du mélange. Dans les gonades, le produit numéro 4, comme dans les parties externes et l'estomac est une composante majeure du mélange. On note également que le produit numéro 3 représente pour la première fois un élément important.

La correspondance réalisée entre la chromatographie sur couche mince (CCM) et la chromatographie liquide haute pression phase renversée (CLHPPR) du mélange extrait de la partie aborale nous démontre que tous les pics obtenus par CLHPPR sont des produits faisant partie du mélange délimité par CCM (figures 10 et 11).

3.3.2 Estimation du contenu en saponines de chaque structure

Dans d'autres études d'astérosaponines, différentes méthodes d'extraction ont été utilisées. Selon Pike et al. (1974) et Burns et al. (1977), la méthode d'extraction utilisée dans ce travail, consistant en l'utilisation d'un mélange méthanol-eau (70/30: V/V) pour l'extraction suivie d'une adsorption sur résine Amberlite XAD-2 et par la suite d'une désorption pour obtenir le mélange brut de saponines, est la plus efficace. En effet, cette méthode permet d'obtenir des extraits de forte concentration en saponines et sans sels. Ainsi, Pike et al. (1974) étudièrent le rendement en terme de quantité de saponines brutes extraites par trois différentes méthodes couramment utilisées, soit: 1-1'extraction par le n-butanol, 2-1'extraction à l'eau douce et 3-1'extraction au méthanol/eau avec adsorption sur résine XAD-2. Or, il s'avéra que l'extraction au MeOH /H₂O pouvait extraire plus de trois fois la quantité extraite avec de l'eau. La méthode au butanol extrait 50 % moins de saponines que la méthode au MeOH/H₂O. De plus, la résine phase renversée Amberlite XAD-2 adsorbe 93.7 % des saponines dès le premier passage de la solution aqueuse sur celle-ci. Donc, il semble que la méthode MeOH/H₂O-XAD-2 soit celle permettant la meilleure estimation du contenu d'une étoile de mer en saponines. Une autre méthode de quantification des saponines est l'utilisation de l'activité hémolytique de celles-ci. Cependant, d'après certaines études (Voogt et Huiskamp, 1979), il apparaît que les erythrocytes de différents donneurs présentent de grandes différences dans leur résistance à l'hémolyse et que ces différences existent également pour des cellules provenant d'un même donneur.

mais à un degré moindre. De ce fait, les valeurs obtenues par la méthode d'hémolyse ne sont que relatives. De plus, il est mentionné que la présence de protéines ou d'autres lipides peut fortement influencer les résultats en augmentant la turbidité de la solution.

Il devient donc difficile d'évaluer d'une façon précise la quantité de saponine pouvant être extraite d'une étoile de mer. En effet, plusieurs paramètres peuvent influencer ces résultats. Le type de méthode d'extraction est un des principaux facteurs influençant le taux d'extraction. Parmi les autres facteurs, on retrouve les méthodes et le degré de purification, les méthodes de quantification, l'état du matériel avant extraction, la période de l'année lors du prélèvement des organismes ainsi que la structure étudiée. Le tableau 5 nous présente les résultats obtenus par différents auteurs pour plusieurs espèces d'étoiles de mer. Ce tableau nous montre bien l'influence des différents facteurs cités précédemment. En effet, différents auteurs, pour une même étoile de mer, obtiennent différentes concentrations de saponines.

Chez Leptasterias, les valeurs obtenues, telles qu'exprimées en mg/g de poids humide au tableau 2, dues aux contraintes mentionnées ne représentent que des quantités approximatives. Cependant, étant donné que la même procédure d'extraction et de purification a été rigoureusement appliquée, alors il est possible de faire une comparaison entre chaque structure, et ce pour un point fixe de l'année. Ainsi, on remarque que chez Leptasterias, la concentration en saponines dans les gonades, le caecum pylorique, la partie orale et la partie aborale varie de 0.98 à

TABLEAU 5

Analyses du contenu en saponines de différentes espèces d'étoiles de mer

ETOILE DE MER	STRUCTURE	SAPONINE (mg/g)	REFERENCES
		poids humide	
<u>Asterias amurensis</u>	ovaire	0.96	Ikegami, S., Kamiya, Y., 1972
" "	"	6.9	Okano, K., Ikegami, S., 1981
" "	"	0.55	Ikegami, S. et al., 1972
" "	organisme entier	1.44	Yasumoto et al., 1964
<u>Asterias rubens</u>	oocyte	134 et 147	Voogt P.A., Van Rheenen, J. 1979
" "	testicules	2 à 5	Voogt P.A., Huiskamp R., 1979
" "	ovaire	6 à 27.5	" "
<u>Asterias vulgaris</u>	organisme entier	1.5	Gilgan M.W. et al., 1976
" "	" "	0.17	Owellen, R.J. et al., 1973
<u>Ophidiaster hemprichi</u>	" "	8	Elyakov, G.B. et al., 1976
<u>Linckia laevigata</u>	" "	4	" "
<u>Luidia</u> sp.	" "	2	" "
<u>Archaster angulatus</u>	" "	3	" "
<u>Asteropsis corinifera</u>	" "	15	" "
<u>Lysastrosoma anthosticta</u>	" "	5	" "
<u>Lethasterias fusca</u>	" "	0.3	" "
<u>Apilasterias japonica</u>	" "	1	" "
<u>Coscinasterias calamaria</u>	" "	8	" "
<u>Evasterias retifera</u>	" "	2	" "
<u>Astropecten aurantiacus</u>	" "	0.12	De Simone F. et al., 1979a
<u>Marthasterias glacialis</u>	" "	0.2	" "

* mg/g poids sec.

1.5 mg/g tandis que dans l'estomac la quantité de saponines est de 4.53 mg/g.

Si on se réfère à la biologie de Leptasterias, il est possible d'apporter certaines explications aux valeurs obtenues. Ainsi, selon Mackie et al. (1977) la présence élevée de saponines dans l'estomac serait due à l'implication de celles-ci dans la solubilisation du cholestérol accélérant ainsi son absorption. Ce phénomène a d'ailleurs été décrit par Lester et al. (1975) lors de l'étude d'une substance appelée taurine sécrétée par l'intestin des crustacés. Or, au mois de juin (période de récolte), Leptasterias est en période de nutrition. En effet, cette étoile de mer étant une espèce couveuse, les femelles cessent de s'alimenter à partir de la période de ponte qui a lieu tôt à l'automne et recommencent après la fin de la période de couvaison au printemps. Cependant, aucune étude n'a été réalisée chez Leptasterias au niveau d'une variation possible des concentrations de saponines dans l'estomac au cours de l'année. Yasumoto et al. (1966b) démontrent que chez A. amurensis la concentration de saponines dans l'estomac était à son maximum durant la période de reproduction. Cependant, cette étoile de mer n'est pas une espèce couveuse et donc s'alimente toute l'année.

Les faibles valeurs de saponines obtenues pour les gonades et le caecum pylorique comparativement à l'estomac pourraient également s'expliquer par le cycle de reproduction où la période de ponte et de couvaison alterne avec celle de nutrition. Ainsi, la diminution des indices gonosomatique et hépatosomatique observée chez Leptasterias

(Larrivée et Boivin, 1983, comm. pers.) pourrait expliquer les faibles quantités de saponines contenues dans ces structures si toutefois il existe des variations annuelles comme chez d'autres espèces d'étoile de mer. Outre l'indice gonosomatique faible, la ponte pourrait expliquer, chez la femelle, les résultats obtenus. En effet, chez A. rubens (Voogt et Van Rheenen, 1979) les saponines sont contenues dans les oocytes ce qui explique la baisse de saponines dans les ovaires après la ponte chez cette espèce d'étoile de mer.

3.3.3 L'analyse des sucres

Depuis l'étude de Rio et al. (1963) portant sur l'analyse d'une saponine extraite de l'étoile de mer Pycnopodia helianthoïde de nombreuses études ont été réalisées sur l'analyse de la partie oligosaccharidique de différentes saponines extraites de plusieurs espèces d'étoile de mer. Burnell (1978) réalisa la compilation des résultats sur les analyses de sucres d'astérosaponines effectuées entre 1963 et 1981. Depuis 1981, deux nouvelles espèces d'étoile de mer ont été étudiées, Protoreaster nodosus et Patiria pectinifera ainsi qu'une nouvelle saponine extraite de Echinaster sepositus. Les principales caractéristiques de la partie hydrate de carbone de ces astérosaponines ont déjà été énumérées dans l'introduction de cette même section.

Dans les mélanges de saponines extraits de Leptasterias, on retrouve la combinaison suivante de sucres; xylose; quinovose; galactose et fucose. Ces sucres sont souvent rencontrés chez d'autres espèces d'étoile de mer (ApSimon et Burnell, 1983). Les données obtenues montrent que les quantités totales de chaque sucre ainsi que leurs proportions relatives varient selon l'origine de l'extrait. Ce phénomène a d'ailleurs été observé chez A. rubens par Voogt et Van Rheevel (1982). De plus, toujours selon ApSimon et Burnell (1983), la partie hydrate de carbone varie entre les espèces d'étoile de mer, et également pour un même individu selon la saponine étudiée.

Si on compare la composition en sucres de chaque mélange sur une base quantitative (tableau 3), différents traits peuvent être mis en évidence. Ainsi, au niveau des structures externes, on retrouve la même distribution des sucres. Au niveau des structures internes (gonades et estomac) la distribution est la même mais différente de celle des parties externes. Dans le cas du caecum pylorique, la principale différence se situe au niveau du xylose qui représente plus de 80 % de la quantité totale des sucres, et de plus, le caecum est la seule structure où le xylose forme l'élément majeur.

Il est difficile d'établir une correspondance entre l'analyse des sucres et la composition des différents mélanges en saponines puisque en CLHPPR la séparation des produits s'effectue principalement grâce aux différences de polarité de la partie aglycone des molécules. Cependant, dans le cas du caecum pylorique, si le composé marqué d'un astérisque

(figure 9, TR= 14.8 min) est une saponine, alors ce produit majeur pourrait peut-être expliquer la concentration élevée de xylose dans cette structure.

3.3.4 L'activité antivirale

Chez Leptasterias, aucun mélange de saponines n'a présenté d'activité antivirale (tableau 4). Or, Shimizu en 1973, en étudiant l'activité antivirale d'extraits de trois espèces d'étoiles de mer; Asterias forbesi, Acanthaster planci et Asterina pectinifera, démontre que parmi les sept saponines étudiées, cinq démontrent une forte activité antivirale, les deux autres étant nettement plus faibles. Toutefois, comparativement aux concentrations utilisées par Shimizu (1973), (0.3 à 0.5 mg/ml), celles utilisées dans ce travail étaient beaucoup plus faibles. De plus, pour les mélanges utilisés, la pureté de ceux-ci en saponines n'a pu être évaluée que par comparaison des R en CCM avec ceux obtenus par différents auteurs pour d'autres étoiles de mer. Donc, nous croyons qu'il serait non justifié de conclure à un manque d'activité antivirale dans le cas des saponines de Leptasterias.

PARTIE IV

L'ANALYSE DU COMPORTEMENT DE Buccinum undatum EN PRÉSENCE DE
Leptasterias polaris ET DES DIFFÉRENTS EXTRAITS.

4.1 INTRODUCTION

De nombreuses évidences démontrent que la réaction d'évitement de plusieurs invertébrés marins face aux étoiles de mer est un phénomène largement répandu à travers les mers du monde, et ce particulièrement chez les mollusques (tableau 9). De plus, la majorité des réactions de fuite chez les organismes marins face à ces prédateurs sont produites par des substances chimiques sécrétées par eux, et ce, que ce soit lors d'un contact entre la proie et le prédateur ou lors de détection à distance (Grant et Mackie, 1974). Le comportement habituel manifesté par des organismes sensibles au contact d'une étoile de mer démontre que cette manifestation est bien une réponse spécifique causée par les étoiles de mer et non pas un mouvement provoqué par un simple contact physique entre ceux-ci et un élément vivant ou non (Feder, 1967). Plusieurs des réponses sont efficaces pour réduire la prédation exercée par les étoiles de mer et ainsi ont une très grande importance écologique (Feder, 1963). Donc, la nécessité de la chémodétection pour la proie est évidente puisqu'elle permet à chaque espèce d'éviter ses prédateurs, et ainsi elle limite la prédation.

Les proies et les prédateurs étant des partenaires coévolutifs ont développé des stratégies offensives et défensives (Edmunds, 1974). Ainsi, la proie aurait développé deux lignes de défense; une ligne primaire opérant continuellement, comme la présence d'une coquille; et une ligne secondaire, un comportement défensif, utilisée seulement lors de la détection d'un prédateur. Ainsi, un grand nombre de mollusques

ont développé des comportements défensifs en réponse aux étoiles de mer prédatrices (Anselli, 1968). Ces comportements initiés chimiquement ont été divisés en deux catégories, soit une réaction d'évitement violent suite à un contact physique ou une réaction de fuite suite à une détection à distance de produits chimiques provenant de l'étoile de mer (Phillips, 1975, 1977).

Des études chimiques et biologiques sur l'effet des étoiles de mer prédatrices sur des invertébrés marins indiquent que ces étoiles contiennent des quantités de produits extractibles concentrés particulièrement dans les surfaces externes, et qui, en contact avec la proie, causent une réaction d'évitement violent. Mackie et al. (1968), identifièrent la fraction active chez *A. rubens* et *M. glacialis* comme étant une saponine et plus précisément comme un stéroïde glycosidique (Mackie, 1970) représenté à titre d'exemple par les structures des figures 3 et 4.

Des études sur l'interaction chimique entre proie et prédateur ont montré que les saponines étaient distribuées dans différents tissus de l'étoile de mer et que l'activité de ces produits différait selon leur origine. Ainsi, pour la plupart des auteurs, l'activité la plus importante proviendrait d'extraits des parties externes de l'étoile de mer et plus particulièrement des podia (Feder et Arvidsons, 1967; Thomas et Gruffydd, 1971; Mayo et Mackie, 1976; Phillips, 1978). L'estomac est également efficace, et le caecum pylorique est faiblement actif voire même dans plusieurs cas inactif (Barbier, 1981).

4.2 RÉSULTATS

4.2.1 Le comportement défensif du buccin face aux étoiles de mer

Lorsqu'on place un buccin en contact avec Leptasterias, celui-ci manifeste un comportement typique des gastéropodes face à un prédateur. Cette réponse se présente comme un soulèvement prononcé du pied accompagné de mouvements circulaires horizontaux de la coquille. Cette réaction est, par la suite, suivie de la chute du buccin. Le pied ainsi libéré de son attache avec le substrat est étiré et replié longitudinalement. Celui-ci est ensuite animé de violentes contorsions ce qui a pour effet selon les circonstances de libérer le buccin ou de l'éloigner rapidement du prédateur.

De plus, le contact entre le buccin et Leptasterias n'étant pas nécessaire pour provoquer une réaction indique que des substances émises par l'étoile sont détectées et reconnues comme phénomène d'alarme par le buccin. Or, il semble que la nature alarmante de ces produits soit dépendante du type d'association existant entre les deux organismes, ce qui impliquerait une spécificité moléculaire. La taille du buccin semble également influencer le type de réponse ce qui introduit un facteur de taille relative entre proie et prédateur. Une synthèse des résultats obtenus lors des différents bioessais avec les étoiles de mer est présentée au tableau 6.

Tableau 6

Comportement des buccins en présence d'étoiles de mer

Traitements	Nombre d'ind. ayant réagit (sur 30)	Comportement % réaction Normal Défense	délais de réaction	durée de réaction (min)	délais de retour à la norma- le (min)	
			\bar{X} (S)	\bar{X} (S)	\bar{X} (S)	
A- Buccin mature de 7.0 à 10.2 cm de longueur.						
1-Simple déplacement du buccin (témoin)	25	83	3	--	--	1.99 (0.34)
2-Contact entre le buccin et <u>Leptasterias</u>	29	0	97	0.21 (0.05)	0.45 (0.08)	1.10 (0.24)
3-Buccin en présence de <u>Leptasterias</u>	22	93	7	1.25 (0.5)	--	--
4-Buccin en milieu parfumé	29	20	77	0.3 (0.15)	0.77 (0.24)	1.19 (0.71)
5-Buccin en contact avec <u>Henricia</u>	22	70	7	1.71 (3.61)	0.51 (0.9)	2.46 (0.45)
B- Buccin immature de 2.6 à 6.5 cm de longueur.						
1-Simple déplacement du buccin (témoin)	20	67	3	--	--	1.63 (0.48)
2-Buccin en présence de <u>Leptasterias</u>	22	87	13	1.15 (0.48)	2.32 (2.62)	--
3-Buccin en milieu parfumé	30	63	37	0.26 (0.1)	0.51 (0.13)	0.95 (0.24)

4.2.1.1 Réaction défensive du buccin face à Leptasterias

Etant donné la réponse défensive manifestée par le buccin à l'égard de Leptasterias, le comportement de celui-ci, placé en contact direct avec l'étoile de mer, fut analysé et comparé à celui de buccins placés seuls dans un bassin. Les résultats montrent, que sur un total de 30 individus, 29 buccins (97 %) ont manifesté une réaction défensive (contorsion) comparativement à 3 % pour les témoins. De plus, les temps moyens de remise sur pied, dans les deux cas, sont significativement différents. En effet, en présence de l'étoile de mer ce temps est de 1.1 (0.24) min, comparativement à 1.99 (0.34) min pour les témoins. Donc, il existe réellement un comportement défensif manifesté par le buccin, qui se traduit principalement par une réaction violente d'évitement caractéristique des gastéropodes en présence d'un prédateur.

4.2.1.2 Démonstration de la nature chimique de l'initiation de la réaction défensive

Le but principal était de démontrer le caractère chimique de la stimulation. Pour ce faire, les comportements du buccin en contact avec Leptasterias et dans un milieu parfumé par l'étoile de mer furent comparés. Les résultats montrent que dans les deux cas la fréquence de manifestation du comportement de défense est élevée; soit 97 % lors du contact direct et 77 % en milieu parfumé. De plus, même si la durée moyenne de la réponse de défense avec l'étoile de mer ($\bar{X} = 0.45$ (0.08)

min) est significativement plus courte ($P<0.01$) que celle en milieu parfumé ($\bar{X} = 0.77$ (0.24) min) et que les délais moyens de réaction ne sont pas significativement différents (0.30 (0.15) min et 0.21 (0.05) min, ($P>0.05$), le temps moyen de remise sur pied dans les deux cas ($\bar{X} = 1.10$ (0.24) min et $\bar{X} = 1.19$ (0.71) min, $P>0.05$) sont semblables. Ces résultats démontrent deux caractéristiques de la réaction de défense; 1- elle est initiée par un produit soluble dans le milieu et diffusant du prédateur; 2- elle représente une réaction initiale probablement pour libérer la proie puisqu'elle ne dure pas malgré la présence des produits dans le milieu.

4.2.1.3 La spécificité moléculaire des saponines

Pour vérifier l'hypothèse que des produits particuliers à l'espèce prédatrice soient responsables de la reconnaissance du prédateur par la proie, le comportement du buccin mis en contact avec Leptasterias fut comparé à celui du buccin en contact avec Henricia, une étoile de mer non prédatrice de mollusque et produisant également des saponines. La vitesse moyenne de remise sur pied en présence de Henricia ($\bar{X} = 2.46$ (0.45) min) se révéla plus lente que celle des buccins en contact avec Leptasterias ($\bar{X} = 1.10$ (0.24) min; $P<0.001$, $ddl=49$) tandis qu'elle ne différait pas de celle des témoins ($\bar{X} = 1.99$ (0.34) min; $P>0.05$, $ddl=46$). De plus, la fréquence de la réponse de défense en présence de Henricia (7%) était aussi faible que pour les témoins (3%) comparativement à 97% lors d'un contact direct avec Leptasterias. Ces résultats

démontrent que le buccin est capable d'exercer une discrimination entre une étoile de mer prédatrice et une autre non-prédatrice et que cette distinction est basée sur la reconnaissance de produits chimiques particuliers au prédateur.

4.2.1.4 L'influence de la taille du buccin sur son comportement défensif

Chez les gastéropodes, tout comme dans plusieurs autres relations prédateur-proie, il a été démontré qu'en plus des facteurs chimiques, un facteur de taille relative joue un rôle très important dans la réponse défensive de la proie. En effet, plus la taille d'une proie sera grande pour un même prédateur, plus ses chances de survie seront élevées. Il devenait donc intéressant d'étudier le comportement du petit buccin (< 7 cm) dans différentes situations et de le comparer avec celui de buccins de taille supérieure à 7 cm.

La comparaison du temps moyen de remise sur pied dans le cas de petits buccins placés seuls dans un contenant ($\bar{X} = 1.63$ (0.48) min) avec celui de petits buccins placés dans un milieu parfumé ($\bar{X} = 0.95$ (0.24) min) ($P < 0.01$, $ddl = 48$) nous montre que tout comme les individus de grande taille, les jeunes sont sensibles à des produits émis par un prédateur. Ceci est démontré par une augmentation de la vitesse de remise sur pied en milieu parfumé. De plus, les jeunes sont plus rapides que ne le sont les gros individus âgés ($\bar{X} = 1.19$ (0.71) min; ($P < 0.05$, $ddl = 57$) et ce,

même si la rapidité de détection du prédateur ne diffère pas significativement selon la taille du buccin ($\bar{X} = 1.25$ (0.5) min, $\bar{X} = 1.15$ (0.48) min; $P>0.05$, $ddl=40$). De plus, les pourcentages d'individus en milieu parfumé se remettant sur pied d'une façon normale et ceux manifestant la réaction de défense pour les jeunes (63% et 37%) sont différents de ceux rencontrés chez les autres individus (20% et 77%).

4.2.2 Le comportement du buccin en présence des saponines

Comme les bioessais avec Leptasterias ont démontré que le buccin manifestait un comportement de défense et que des produits émis par l'étoile de mer semblaient en être la cause, alors des bioessais avec les différents extraits réalisés sur Leptasterias furent entrepris. Ce travail visait donc à étudier l'effet de ces extraits sur le comportement du buccin.

Kittredge (1974) énonçait que les bioessais, pour être valables, se devaient d'être simples (i.e. le moins de variables possible) et d'être reproductibles. De plus, les comportements retenus comme indice d'une activité doivent être facilement observables et ne pas porter à interprétation. Ainsi, le siphon aurait pu être choisi comme site d'application des produits. Cependant, cet organe servant à la détection des produits chimiques est continuellement en mouvement. Donc, il devenait difficile d'interpréter sans ambiguïté les modifications d'activité de cet organe. Par ailleurs, la partie antérieure du pied est une

structure très importante pour l'orientation du buccin (Nielsen, 1975). En effet, lorsqu'un buccin est près d'une proie, il soulève cette partie du pied pour toucher la proie et ainsi la goutter. De plus, des essais de sensibilité aux saponines de différentes zones du pied démontrent que la partie antérieure était la plus sensible. Donc, cette partie fut choisie comme site d'application et le comportement naturel de soulèvement du pied fut retenu comme indicateur d'une réaction à la présence des saponines. Les indicateurs les plus importants étaient la durée du soulèvement du pied ainsi que l'amplitude du mouvement.

Les valeurs moyennes de durée de soulèvement du pied sont compilées au tableau 7. Elles représentent le délai en minute s'écoulant entre l'application d'une solution de saponines et l'arrêt de la réaction de soulèvement du pied représentant un retour à la normale. Ainsi, on obtient pour chaque type d'extrait et à différentes concentrations une durée moyenne de réaction illustrée graphiquement à la figure 17 où les différentes concentrations sont présentées sur une échelle logarithmique (LN). Il est à noter que le nombre accompagnant chaque écart-type indique le nombre d'individus sur dix ayant réagit aux produits. Ces valeurs ont également été compilées au tableau 7.

L'analyse de la variance nous indique que la durée moyenne de la réaction augmente avec une augmentation de la concentration des saponines ($P>0.05$) et que le type d'extrait ne semble pas affecté la durée de la réaction observée chez le buccin ($P<0.01$). Un test de χ^2 réalisé sur le nombre de buccins réagissant aux extraits montre que la

Tableau 7

Durée moyenne de la réaction de soulèvement du pied chez le buccin en fonction du traitement appliqué

Logarithme (ln) de la concentration	Origine de l'extrait			
	aborale $\bar{X}(S)min$	orale $\bar{X}(S)min$	estomac $\bar{X}(S)min$	caecum pylorique $\bar{X}(S)min$
-0.69	0.54(0.22) N=7	0.67(0.31) N=8	0.32(0.59) N=3	0
0	0.55(0.26) N=6	0.50(0.02) N=4	0.55(0.38) N=4	1.18(0.60) N=3
0.92	0.93(0.46) N=8	0.77(0.36) N=9	0.69(0.47) N=8	1.94(3.96) N=3
1.61	0.80(0.25) N=9	0.40(0.35) N=6	1.11(0.67) N=7	0.92(1.15) N=8
2.3	1.49(1.22) N=8	1.07(0.59) N=6	0.87(0.63) N=6	0.59(0.19) N=10
3.22	1.47(0.68) N=10	0.67(0.31) N=8	1.02(0.44) N=8	0.82(0.50) N=10
3.9	1.33(0.55) N=8	1.37(0.54) N=9	0.96(0.35) N=9	0.99(0.33) N=10
4.6	1.94(0.52) N=6	1.72(0.63) N=9	2.91(1.09) N=7	1.37(0.61) N=9
5.29	2.62(0.74) N=10	2.14(1.04) N=8	2.04(0.85) N=8	1.70(0.82) N=8
5.99	3.08(0.93) N=9	4.17(2.83) N=5	3.32(0.89) N=6	2.13(0.30) N=9

N = nombre de buccins sur 10 individus testés ayant démontré une réaction.

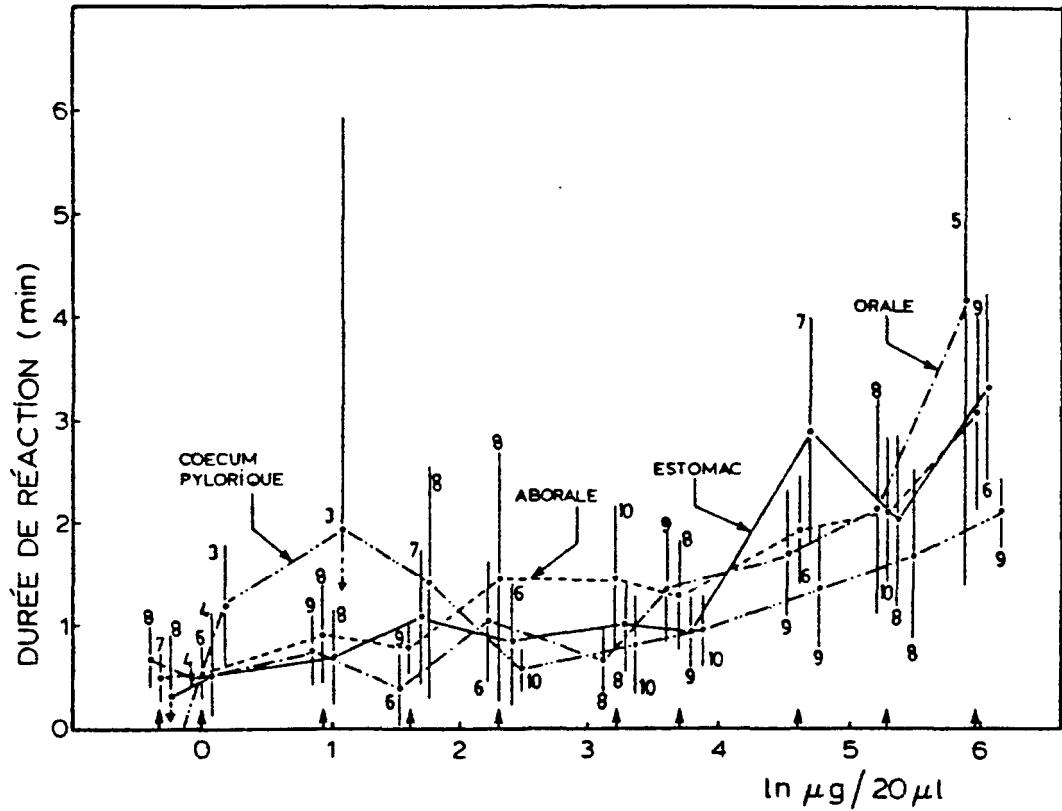


Figure 17. Durée de la réaction de soulèvement du pied du bucin en fonction du logarithme de la concentration de l'extrait. Les flèches indiquent les valeurs réelles des concentrations.

concentration de saponines pour un extrait n'influence pas le nombre d'individus réagissant ($\chi^2_p = 17.55; \chi^2_{\alpha=0.01} = 46.963$, dd1= 27).

Selon Phillips (1976), l'intensité de la réaction de défense manifestée par un mollusque face à un prédateur serait fonction de la concentration des produits émis par ce dernier. Une autre façon d'étudier cette variation de l'intensité de la réaction fut de coter l'amplitude du soulèvement du pied. Par la suite, la fréquence d'apparition de chaque type de réponse fut notée en fonction des différentes concentrations pour chaque extract. Les résultats obtenus sont présentés au tableau 8.

Des tests du Khi carré réalisés sur chaque série de données obtenues pour les quatre types d'extraits (tableau 7) ont démontré une augmentation de la durée de la réponse avec une augmentation de la concentration de l'extrait et ce pour chaque structure (partie aborale; $\chi^2_p=129.03$, dd1= 72 pour $P < 0.001$, partie orale; $\chi^2_p=160.33$, dd1= 81 pour $P < 0.001$, estomac; $\chi^2_p=102.22$, dd1= 63 pour $P < 0.01$ et caecum pylorique; $\chi^2_p=116.1$, dd1= 49 pour $P < 0.001$). De plus, des tests du χ^2 réalisés sur la relation qui pourrait exister entre le type de réponse et le type d'extrait et ce pour une même concentration ont démontré qu'ils étaient indépendants pour toutes les concentrations, sauf à 5 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$, où la provenance de l'extrait semblait influencer le type de réponse.

Tableau 8

Comportement du buccin en présence des extraits provenant de Leptasterias (nombre de buccin démontrant tel type de réponse à différentes concentrations et selon la provenance de l'extrait)

PARTIE ABORALE

Type de réaction	Intensité (voir p.22)	Concentration ($\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$)									
		0.5	1	2.5	5	10	25	50	100	200	400
1-Soulèvement de la partie antérieure du pied	-très fort						1	1	1	1	6
	-fort			2	2	2	3	4	6	3	2
	-moyen	1	2	1	2	3	2	2	2	2	
2-Plissement de la marge du pied											
2.1-Réaction propagée	-forte				1			1			
	-moyenne			1	6	3	5	1	1	3	
	-faible										
2.2-Réaction locale	-forte										
	-moyenne	1	3	3			1	1			
	-faible	5	3	2	1	1			1	1	
3-Aucune réaction		3	2	1	1						

PARTIE ORALE

Type de réaction	Intensité (voir p. 22)	Concentration ($\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$)									
		0.5	1	2.5	5	10	25	50	100	200	400
1-Soulèvement de la partie antérieure du pied	-très fort							1		2	3
	-fort			2			2	3	7	6	7
	-moyen	1	2	1	6	2	1	1	1	1	
2-Plissement de la marge du pied					1						
2.1-Réaction propagée	-forte				3	1	2	3	2	2	
	-moyenne										
	-faible										
2.2-Réaction locale	-forte		1		1				1		
	-moyenne	2	3	3	6		2				
	-faible	6	2						1		
3-Aucune réaction		2	3				1			1	

Tableau 8 (suite)

Comportement du buccin en présence des extraits provenant de Leptasterias (nombre de buccin démontrant tel type de réponse à différentes concentrations et selon la provenance de l'extrait)

ESTOMAC

Type de réaction	Intensité (voir p. 22)	Concentration ($\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$)									
		0.5	1	2.5	5	10	25	50	100	200	400
1-Soulèvement de la partie antérieure du pied	-très fort								1	2	3
	-fort						2	3	5	4	6
	-moyen	1		3	1	2	3	2	3	1	1
2-Plissement de la marge du pied											
2.1-Réaction propagée	-forte								1		
	-moyenne					1	1	1		1	1
	-faible										
2.2-Réaction locale	-forte										
	-moyenne	2	1	2	3	1	2	1			
	-faible	1	3	3	2	2	2	2			2
3-Aucune réaction		6	6	2	3	3			1		

CAECUM PYLORIQUE

Type de réaction	Intensité (voir p. 22)	Concentration ($\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$)									
		0.5	1	2.5	5	10	25	50	100	200	400
1-Soulèvement de la partie antérieure du pied	-très fort								1		
	-fort							1	2	2	6
	-moyen						1	1	2	1	2
2-Plissement de la marge du pied											
2.1-Réaction propagée	-forte					1					
	-moyenne						2	1			
	-faible								1		
2.2-Réaction locale	-forte										
	-moyenne					1	2	3	6	3	
	-faible		2	4	6	3	3	1		2	
3-Aucune réaction		10	7	5	2	1	1				

Pour les bioessais avec les extraits provenant des parties orale et aborale, on observe une fréquence de réponse de fuite de 51 % et 54 % respectivement. Un test de student révéla que les résultats ne différaient pas significativement ($t = 0.3067; t_{exp} = 2.262, dd1= 9$). Pour l'estomac et le caecum pylorique, les valeurs obtenues étaient de 37 % et 27 %. Ces dernières ne sont pas significativement différentes ($t = 1.62; t_{exp} = 2.262, dd1= 9$) mais diffèrent de celles des structures précédentes (aborales vs caecum pylorique; $t = 5.2177; t_{exp} = 3.25, dd1= 9$). De plus, un test du χ^2 démontre qu'il n'y avait pas de relation entre la fréquence de réponse de fuite et la concentration de l'extrait.

4.3 DISCUSSION

4.3.1. La réaction de défense du buccin

La fréquence élevée de la réponse de défense manifestée par le buccin (97 %), ainsi qu'une vitesse accrue de remise sur pied ($\bar{X} = 1.1$ (0.24) min) lors d'un contact direct avec Leptasterias comparativement aux buccins témoins (3 %, $\bar{X} = 1.99$ (0.34) min) nous indiquent qu'il existe une relation prédateur-proie très forte entre ces deux organismes. De plus, le buccin et Leptasterias sont des espèces sympatriques (Jalbert P. non publié) des communautés infralittorales où abondent les bivalves et autres mollusques dont les deux espèces se nourrissent. Or, ce phénomène d'habitudes alimentaires convergentes, décrit par Rosenthal (1971), pourrait expliquer, au niveau évolutif, le besoin pour le buccin mature de développer cette réponse violente face à un prédateur. En effet, ce comportement permettrait à la proie de cohabiter avec son prédateur tout en réduisant les réponses de fuites inutiles dues à la simple présence du prédateur, ce qui entraînerait une dépense d'énergie ainsi qu'une diminution de son efficacité d'utilisation du milieu.

4.3.2 La nature chimique du stimulus

Les bioessais avec un milieu, où Leptasterias a séjourné pendant quelques heures, démontrent que le facteur déclenchant la réponse de

défense est de nature chimique. En effet, dans ce milieu, on observe une augmentation de la rapidité de remise sur pied ($\bar{X} = 1.19$ (0.71) min), tout comme dans le cas d'un contact direct, ainsi qu'une fréquence élevée du comportement de contorsion (77 %) typique aux gastéropodes face à un prédateur, comparativement aux buccins témoins où seulement 3 % des individus présentent la réponse de défense.

Donc, il apparaît que le buccin est apte à détecter des substances diffusant de l'étoile de mer et à y répondre par un comportement de fuite ou par une réponse de défense; la fuite étant généralement associée à une détection à distance, tandis que la réponse de défense se produit lors d'un contact direct avec le prédateur. Ces résultats sont d'ailleurs en accord avec les résultats obtenus chez d'autres espèces d'astéridés (tableau 9). Ces substances affecteraient la proie et permettraient ainsi une détection du prédateur et de ce fait une diminution de la fréquence de contact avec celui-ci.

4.3.3 La spécificité moléculaire

La mise en contact de buccins avec Henricia a démontré que la présence de cette dernière n'influence pas le comportement du buccin. Cette étude permettait de mettre en évidence deux aspects importants du comportement de défense des proies: la spécificité moléculaire et la nature chimique du stimulus. Ainsi, le buccin ne réagit pas aux saponines émises par une étoile de mer non prédatrice de mollusques puisque

Henricia se nourrit d'éponge d'où la spécificité moléculaire. Par la même occasion, ces essais nous permettaient de renforcer l'hypothèse d'un médiateur chimique impliqué dans cette relation prédateur-proie plutôt qu'une simple reconnaissance tactile du prédateur par la proie. Les résultats obtenus sont en accord avec l'hypothèse émise par différents auteurs sur la spécificité des produits émis par les étoiles de mer (Thomas et Gruffydd, 1971; Phillips, 1976; Watanabe, 1983). Ceci entraînerait une absence de réponse aux espèces non prédatrices de mollusques. De plus, Phillips (1975, 1978) énonçait que le fait de ne réagir qu'à l'espèce prédatrice permettait une économie d'énergie et également une utilisation maximale des ressources du milieu.

4.3.4 Modification du comportement de défense du buccin reliée à sa taille

Les bioessais réalisés avec les petits buccins ont démontré qu'il y avait une modification du comportement du buccin reliée à sa taille. Ainsi, les petits individus (<7 cm) semblent favoriser la réaction de fuite en démontrant une vitesse de remise sur pied plus rapide associée à une fréquence de réponse de défense plus faible que chez les buccins plus grands que 7 cm.

Dans le milieu naturel, nous avons pu observer à quelques reprises des buccins de grande taille se nourrissant de la proie d'une étoile de mer. Ainsi, il semble que ceux-ci soient favorisés lors de

contact avec un prédateur comparativement aux petits individus. En effet, le buccin mature pourra développer une plus grande force pour se libérer que ne pourrait le faire le buccin immature (Mauzey et al., 1968; Menge, 1972; Rosenthal et Chess, 1972). Ce comportement devrait permettre aux buccins de grande taille de tolérer plus facilement la proximité d'un prédateur et de ne réagir que lors d'un réel danger.

Une divergence de l'habitat et probablement du régime alimentaire entre les petits buccins et Leptasterias (Jaibert, P., non publié) pourrait également expliquer la différence de comportement observée. Cette divergence impliquant un degré d'association moindre entre ces buccins et Leptasterias entraînerait une moins grande sensibilité et une forme de défense différente chez ceux-ci (Phillips et Castori, 1982; Doering et Phillips, 1983). De plus, certains auteurs ont émis l'hypothèse que l'étoile de mer utiliserait, pour localiser sa proie, des produits qui augmenteraient l'activité de celle-ci. La proie ainsi stimulée dégagerait à son tour des substances pouvant être détectées par le prédateur (Ansoll, 1968; Doering, 1976). Donc, il est possible que la réponse moins violente chez le petit buccin soit une adaptation pour éviter de signaler sa présence aux prédateurs.

4.3.5 Le comportement du buccin face aux extraits de saponines

Les courbes de la figure 17 représentant la durée de la réaction de soulèvement du pied en fonction de la concentration des saponines

corroborent l'hypothèse d'un accroissement de l'activité des saponines en fonction d'une augmentation de la concentration de celles-ci. Ces résultats ont d'ailleurs été observés chez d'autres mollusques (Mackie et al., 1968; Phillips, 1976, 1978).

De plus, on remarque que suite à l'application de l'extrait plusieurs buccins ont manifesté une réaction de fuite (un changement de direction accompagné d'une augmentation de la vitesse de déplacement). On remarque également que les structures externes sont plus actives à provoquer une réaction de fuite chez le buccin et que, peu importe la concentration des extraits, la fréquence de fuite est sensiblement la même et largement privilégiée comparativement à la réponse de défense.

Les réponses manifestées par le gastéropode et provoquées chimiquement peuvent être divisées en deux catégories en se basant sur la nature du stimulus, soit une réponse de fuite représentée par un changement de direction ou une réponse de défense se manifestant par des mouvements convulsifs involontaires. Avec les extraits provenant de Leptasterias il y a modification de l'intensité de la réponse avec l'augmentation de la concentration de l'extrait. De plus, pour une même concentration, on observe également pour les 10 buccins testés des variations de l'intensité de la réponse qui sont attribuables à la sensibilité différente de chaque individu (tableau 8). A forte concentration (200 à 400 µg/20 µl), la réaction de contorsion n'a été provoquée que dans 10 et 15 % des cas pour l'estomac et la partie aborale et dans aucun cas pour le caecum pylorique et la partie orale, cette

dernière étant considérée par différents auteurs comme la structure contenant le plus de substances actives. Cependant, la réaction de fuite est généralisée et ce même à de faibles concentrations. Comme dans nos résultats, les observations de Mackie et al. (1968) sur l'action de substances extraites de A. rubens et de M. glacialis sur le comportement du buccin ont démontré que ces extraits pouvaient provoquer à faible concentration une réaction immédiate de fuite. Cependant, leurs résultats démontrent également que les buccins manifestent une réaction de contorsion généralisée avec de fortes concentrations d'extraits (400 - 500 µg/20 µl).

Les variations de concentrations utilisées lors des bioessais sont probablement représentatives d'une variation de la distance entre le buccin et Leptasterias. Ceci pourrait expliquer la variabilité (intensité et type) de la réponse des buccins face aux extraits contrairement à un seul type de réponse lors d'un contact direct entre le buccin et Leptasterias. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Phillips (1977) lors de son étude sur le comportement de Olivella biplicata face à Pisaster brevispinus. Celui-ci démontre un changement de comportement chez Olivella en fonction de la distance du prédateur et un seul type de réponse lors de contact. L'interprétation faite par Phillips est que très peu de variabilité ne doit être tolérée dans le comportement d'évitement après un contact puisque cette réponse immédiate est essentielle à la survie de la proie.

Toujours pour expliquer la variabilité rencontrée au sein d'une population, Phillips (1975) fait intervenir des considérations évolutives. Ainsi, il semble que les forces de sélection en jeu dans la relation prédateur-proie inhibent et renforcent le comportement d'évitemen violent. L'hétérogénéité dans la réponse des individus à l'intérieur d'une population pourrait être l'expression de la variabilité de ces forces de sélection agissant en directions opposées. Ainsi, la pression de prédation exercée par l'étoile de mer agissant pour renforcer le comportement de fuite peut varier avec la période de l'année puisque certaines étoiles de mer présentent une activité de nutrition saisonnière (Paine, 1969), avec la densité d'étoile de mer dans le milieu et avec la disponibilité des sources de nourriture préférée par l'étoile de mer (Landenberger, 1968). Dans la direction opposée, la pression de sélection s'exerçant sur la proie pour limiter la réponse de fuite peut varier selon le site, l'abondance de la nourriture pour la proie, selon l'environnement physique et la saison. Ainsi, des forces activeraient la réponse de fuite chez la proie, lui permettant d'éviter le prédateur et ainsi diminuer la prédation. Par contre, des forces contraires permettraient à la proie d'utiliser la même nourriture et le même espace que son prédateur potentiel. La présence de différents degrés de réponse dans un même population permettrait une utilisation optimale des ressources durant différentes saisons et pour différents milieux. Cette variabilité serait attribuable à la fois à la sensibilité de chaque individu et à une variation de la capacité du prédateur à provoquer la réponse de défense, ce qui expliquerait les différentes réponses des buccins.

Le fait de n'avoir pu provoquer avec les extraits qu'une réaction de fuite comparativement aux fréquences de contorsion obtenues lors de contact direct avec Leptasterias (97 %) ou en milieu parfumé (77 %), où la concentration des produits émis par l'étoile de mer pouvait probablement atteindre celle rencontrée lors d'un contact direct et où il y avait tout de même une perte de contact avec le substrat, tend à appuyer l'hypothèse de deux types de réponse en fonction de la distance du prédateur. Alors, on peut penser que les produits extraits sont impliqués dans la relation prédateur-proie et que la réaction de contorsion est provoquée plus particulièrement par le contact physique avec le prédateur en association avec la détection de produits émis par celui-ci comme l'ont démontré les bioessais avec les étoiles de mer.

Les deux types d'expérience avec extraits et avec étoiles de mer nous amènent à discuter de la contribution du comportement d'évitement à distance et de la réaction de contorsion pour limiter la prédation. Malgré la faible quantité de données sur l'importance relative de chaque élément, on doit noter que si la détection à distance est vraiment efficace, alors le contact et la réponse de contorsion seront rares (Phillips, 1977). De plus, un contact répété du buccin avec Leptasterias inhibe la réponse de contorsion ce qui pourrait être interprété comme une réduction de la sensibilité du buccin à l'étoile de mer. Donc, la réaction de fuite à distance revêt toute son importance en rendant la localisation du buccin plus difficile et en réduisant d'autant la prédation (Doering, 1982).

Les chromatogrammes des différents mélanges de saponines extraits de Leptasterias (figures 5 à 9) nous indiquent que la composition en saponines varie selon la structure étudiée. Les différences se situent à la fois au niveau du type de saponine et au niveau des proportions relatives de chacunes d'elles. Les différentes analyses statistiques réalisées sur les résultats obtenus lors des bioessais avec les extraits montrent que l'activité de ceux-ci ne varie qu'en fonction de la concentration et non de leur provenance. Or, chez les étoiles de mer, les saponines reconnues comme causant une réaction de fuite chez de nombreux gastéropodes et autres organismes marins sont distribuées dans différents tissus et l'activité de ces produits diffère selon la structure et selon l'espèce d'étoile de mer.

Quelques hypothèses de nature chimique pourraient expliquer la similitude de l'activité des différents extraits. Ainsi, une modification structurale au cours de l'isolation a pu diminuer l'activité des molécules contenues dans les structures externes entraînant une altération de la spécificité biologique de ces molécules ou de leur activité membranaire.

Une autre hypothèse impliquerait une dénaturation d'un complexe entre les saponines et d'autres molécules organiques. Comme l'on démontré Voogt et Van Rheenen (1979) chez A. rubens, seulement 3 % des astéro-saponines sont libres, la plupart formant des complexes avec des protéines et des lipoprotéines. Mackie et al. (1968) démontrent également que chez A. rubens et M. glacialis les saponines étaient liées à

des protéines ou à des polypeptides. Cependant, ils démontrèrent que ces complexes chimiques n'étaient pas nécessaires pour que les saponines aient une activité maximale sur le buccin.

Une troisième possibilité serait une modification des quantités relatives des saponines constituants les mélanges. En effet, chez certains insectes (Barbier, 1976), la spécificité d'une réaction est reliée non pas à la détection d'un produit mais à celle d'un mélange de produits dont les proportions relatives sont fixes. Or, lors de l'extraction, toutes les saponines contenues dans les différentes structures anatomiques ont été extraites mais pas nécessairement dans la même proportion à laquelle elles sont normalement émises par l'étoile de mer. Ainsi, lors des bioessais, les buccins réagiraient aux mélanges extraits comme ils le feraient à tout agent tensio-actif.

Une dernière hypothèse serait que la substance réellement impliquée dans la relation étudiée soit de nature autre que celle des saponines. Ward (1965) a démontré que la réaction de fuite provoquée par l'étoile de mer Dermasterias imbricata sur l'anémone Stomphia coccinea serait causée par un amino-polysaccharide. Cependant, plusieurs travaux (tableau 9) montrent que les mollusques sont sensibles aux saponines d'étoiles de mer et manifestent des comportements défensifs.

Le manque de réaction pourrait être également relié à la nature des bioessais. En effet, tels qu'ils furent réalisés, le buccin n'était jamais en contact avec la surface externe de l'étoile. Ceci pourrait

expliquer la similitude des réponses pour les différents extraits et appuyer l'importance du contact avec le prédateur pour le déclenchement d'une réponse violente d'évitement. Ce contact avec le prédateur ou un détachement du substrat comme dans le milieu parfumé pourraient représenter des conditions extrêmes de danger nécessitant une réaction violente et immédiate. En présence de Leptasterias (sans contact) et avec les différents extraits, la réaction du buccin représente surtout un simple évitement à distance (changement de direction).

Chaque hypothèse possède des éléments de réponse intéressants et aucune d'elles ne peut être rejetée d'une façon catégorique. En effet, considérées une à une, différents travaux tendent à les appuyer. Cependant, l'hypothèse émise par Barbier (1976) sur la spécificité des mélanges de produits est la plus intéressante pour une étude du phénomène de chémodétection impliqué dans une relation prédateur-proie. Ainsi, l'étude chimique des produits émis par l'étoile de mer (milieu parfumé) apporterait probablement des indices intéressants sur la nature des composés spécifiques à la relation prédateur-proie existant entre Leptasterias et le buccin.

TABLEAU 9

Réaction défensives des mollusques face aux étoiles de mer

ETOILE DE MER	MOLLUSQUES	TRAITEMENTS	REACTIONS	REFERENCES
<u>Asterias forbesi</u>	<u>Mercenaria mercenaria</u>	-eau parfumée	-diminution d'activité, enfouissement	Doering, P.M. (1982, 1976)
<u>Asterias rubens</u>	<u>Emarginula reticula</u>	-extrait -présence de l'étoile	-fuite -fuite	Feder, H.M. (1967)
" "	<u>Patella vulgata</u>	-contact avec l'étoile -présence de l'étoile -eau parfumée	-battement répétitif des valves -la plupart insensible -fuite	"
" "	<u>Acmaea tessulata</u>	-présence de l'étoile	-forte réponse	"
" "	<u>Gibbula cineraria</u>	-présence de l'étoile -extrait	-fuite -soulèvement de la coquille	"
" "	<u>Patella pellucida</u>	-contact avec épiderme	-fuite immédiate	"
" "	<u>Cantharidus delandi</u>	-présence de l'étoile et de l'extrait	-fuite et oscillation horizontale de la coquille	"
" "	<u>Calliostoma zizyphinum</u>	-présence de l'étoile -contact avec l'étoile	-fuite -contorsions violentes	"
" "	<u>Natica intermedia</u> et <u>N. montagui</u>	-présence de l'étoile	-recouvre la coquille avec le manteau	"
" "	<u>Nassarius reticulatus</u>	-présence de l'étoile -extrait	-oscillement violent de la coquille -fuite et détachement du substrat	"
" "	<u>Nassarius incrassatus</u>	-présence de l'étoile	-réaction violente	"
" "	<u>Buccinum undatum</u>	-présence de l'étoile et extrait	-réaction négative à modérée, délais de réponse long	"
" "	<u>Haliotis tuberculata</u>	-contact avec podia -contact prolongé	-soulèvement de la coquille et fuite -contorsion violente	"
" "	<u>Lima loscombi</u>	-présence de l'étoile et extrait brut	-réaction faible à nulle	"

TABLEAU 9 (suite)

ETOILE DE MER	MOLLUSQUES	TRAITEMENTS	REACTIONS	REFERENCES
<u>Asterias rubens</u>	<u>Cardium ichinatum</u>	-présence de l'étoile et extrait brut	-fermeture des valves sortie du pied fuite, sauts délais de réponse	Feder, H.M. (1967)
" "	<u>Pecten maximus</u>	-contact avec l'étoile	-nage	Thomas, G.E. et al. (1971)
" "	<u>Buccinum undatum</u>	-extrait (saponine)	-soulèvement et torsion du pied	Mackie, et al. (1968)
<u>Asterina gibbosa</u>	<u>Patella vulgaris</u>	-présence de l'étoile	-soulèvement de la coquille et oscillation	Feder, H.M. (1967)
<u>Asterias rubens</u>	<u>Pecten maximus</u>	-extrait brut	-nage	Thomas, G.E. (1971)
" "	<u>Haliotis tuberculata</u>	-présence de l'étoile	-réponse moyenne fuite après 5 min.	Feder, H.M. (1967)
<u>Astropecten irregularis</u>	<u>Pecten maximus</u>	-contact avec l'étoile et extrait brut	-nage	Thomas, G.E. (1971)
<u>Crossaster paposus</u>	<u>Nassarius reticulatus</u>	-présence de l'étoile et extrait	-réponse faible ou nulle	Feder, H.M. (1967)
" "	<u>Buccinum undatum</u>	-contact avec l'étoile	-pas de réponse	Hancock, D.A. (1974)
<u>Henricia leviuscula</u>	<u>Notoucmea ensessa</u> <u>Collisilla instabilis</u>	-contact avec l'étoile	-réaction très faible à nulle	Phillips, D.W. (1982)
<u>Henricia sanguinolenta</u>	<u>Pecten maximus</u>	-contact avec l'étoile -extrait brut	-réaction faible ou nulle -saut	Thomas, G.E. (1971)
<u>Leptasterias aequalis</u>	<u>Acmea scutum</u>	-eau parfumée	-fuite légère	Phillips, D.W. (1976)
<u>Leptasterias hexactis</u>	<u>Collisilla instabilis</u>	-contact avec l'étoile	-soulèvement, oscillation et fuite	Phillips, D.W. (1982)
" "	<u>Acmea scutum</u>	-eau parfumée	-fuite légère	Phillips, D.W. (1976)
<u>Luidia ciliaris</u>	<u>Pecten maximus</u>	-contact avec l'étoile et extrait brut	-saut et fermeture des valves	Thomas, G.E. (1971)
<u>Marthasterias glacialis</u>	<u>Emarginula reticula</u>	-contact avec l'étoile et extrait	-fuite	Feder, H.M. (1967)

TABLEAU 9 (suite)

ETOILE DE MER	MOLLUSQUES	TRAITEMENT	REACTIONS	REFERENCES
<u>Marthasterias</u> <u>glacialis</u>	<u>Patella vulgata</u>	-présence de l'étoile -contact avec podia -contact avec épiderme -extrait brut	-soulèvement de la coquille -oscillation occasionnelle -peu de fuite	Feder, H.M. (1967)
" "	<u>Patella jellucida</u>	-présence de l'étoile et contact avec épiderme	-fuite immédiate	"
" "	<u>Acmaea tessulata</u>	-présence de l'étoile, et extrait brut	-fuite	Feder, H.M. (1967)
" "	<u>Gibbula cineraria</u>	-présence de l'étoile et extrait	-fuite	"
" "	<u>Cantharidus clelandi</u>	-présence de l'étoile -extrait	-fuite et oscillation -fuite et contorsion	"
" "	<u>Calliostoma zizyphinum</u>	-présence de l'étoile -contact avec l'étoile	-fuite -contorsion	"
" "	<u>Natica intermedia</u> et <u>N. montogui</u>	-présence de l'étoile	glisse le manteau par dessus la coquille	"
" "	<u>Nassarius reticulatus</u>	-présence de l'étoile et extrait	-contorsion et fuite	"
" "	<u>Nassarius incrassatus</u>	-présence de l'étoile	-très forte réaction	"
" "	<u>Buccinum undatum</u>	-présence de l'étoile, extrait et matériel partiellement purifié	-réaction très forte	"
" "	<u>Haliotis tuberculata</u>	-contact avec podia -contact prolongé	-soulèvement et fuite -contorsion	"
" "	<u>Lima loscombi</u>	-présence de l'étoile	-ouverture des valves et nage rapide	"
" "	<u>Cardium echinatum</u>	-présence de l'étoile et extrait brut	-fermeture des valves -sortie du pied, fuite et sauts, -réaction immédiate	"
" "	<u>Pecten maximus</u>	-contact avec l'étoile -extrait brut	-nage -saut	Thomas, G.E. (1971)
" "	<u>Buccinum undatum</u>	-glycosides stéroïdaux M ₁ et M ₂	-réaction d'évitement et retrait du pied	Mackie, A.M. (1978)

TABLEAU 9 (suite)

ETOILE DE MER	MOLLUSQUES	TRAITEMENTS	REACTION	REFERENCES
<u>Marthasterias glacialis</u>	<u>Pecten maximus</u> et <u>Chlamy opercularis</u>	-M ₁ et M ₂	-nage	Mackie, A.M. (1978)
" "	<u>Patella vulgata</u>	-M ₁ et M ₂	-soulèvement de la coquille	"
" "	<u>Buccinum undatum</u>	-saponine et eau parfumée	-soulèvement de la coquille et torsion du pied	Mackie, A.M. (1968)
<u>Meyenaster gelatinosus</u>	<u>Enoplochiton niger</u> <u>Chiton cumingsii</u> , <u>Chiton granosus</u> , <u>Acanthopleura echinata</u> , <u>Collisella variabilis</u>	-présence de l'étoile "	-fuite -fuite, contorsion et soulèvement du manteau par dessus la coquille	Dayton, P.K. (1977) "
" "	<u>Tegula atra</u>	-présence de l'étoile	-soulèvement de la coquille, oscillation et fuite	"
" "	<u>Concholepas concholepas</u>	-contact avec l'étoile	-colle au substrat	"
<u>Patiria miniata</u>	<u>Notoacmea insessa</u>	-contact avec l'étoile	-réaction faible	Phillips, D.W. (1982)
" "	<u>Acmea limatula</u> et <u>A. scutum</u>	-eau parfumée	-pas de réaction	Phillips, D.W. (1976)
" "	<u>Olivella biplicata</u>	-présence de l'étoile	-réaction très faible	Phillips, D.W. (1977)
<u>Pisaster brevispinus</u>	<u>Acmea limatula</u> et <u>A. scutum</u>	-eau parfumée	-pas de réaction	Phillips, D.W. (1976)
" "	<u>Massarius fossata</u>	-contact avec l'étoile	-sauts répétés	Barbier, M. (1981)
" "	<u>Olivella biplicata</u>	-présence de l'étoile -contact	-enfouissement -fuite	Phillips, D.W. (1977)
<u>Pisaster giganteus</u>	<u>Kelletia kelletii</u>	-contact avec l'étoile	-pas de réponse	Rosenthal, R.J. (1971)
" "	<u>Acmea limatula</u>	-eau parfumée	-fuite	Phillips, D.W. (1976)
<u>Pisaster ochraceus</u>	<u>Notoacmea insessa</u>	-contact avec l'étoile	-soulèvement de la coquille, oscillation et fuite	Phillips, D.W. (1982)
" "	<u>Tegula funebralis</u>	-contact avec les podia	-fuite	Doering, P.H. (1983)

TABLEAU 9 (suite)

ETOILE DE MER	MOLLUSQUES	TRAITEMENTS	REACTIONS	REFERENCES
<u>Pisaster ochraceus</u>	<u>Tegula brunnea</u> <u>T. pulligo</u> et <u>T. montereyi</u>	-contact avec l'étoile	-oscillation et fuite	Watanabe, J.M. (1983)
" "	<u>Acmea limatula</u>	-eau parfumée	-fuite	Phillips, D.W. (1976) Phillips, D.W. (1975)
" "	<u>Acmea limatula</u>	-contact avec podia	-soulèvement la coquille Barbier, M. (1981) et fuite	
" "	<u>Olivella biplicata</u>	-présence de l'étoile	-enfouissement	Phillips, D.W. (1977)
" "	<u>Tegula funebralis</u>	-contact ou non avec l'étoile	-soulèvement de la coquille, oscillation et fuite	Feder, M.H. (1963)
" "	<u>Tegula brunnea</u>	-contact avec l'étoile	-soulèvement de la coquille, fuite	"
" "	<u>Acmea scutum</u> , <u>A. limatula</u> et <u>A. delta</u>	-contact avec l'étoile	-soulèvement de la coquille et fuite	"
" "	<u>Acmea scabra</u> et <u>A. digitalis</u>	-contact avec l'étoile	-aucune réponse	"
" "	<u>Haliotis cracherodii</u> et <u>H. rufescens</u>	-contact avec l'étoile	-soulèvement de la coquille et fuite	"
<u>Porania pulvillus</u>	<u>Pecten maximus</u>	-extrait brut	-saut	Thomas, G.E. (1971)
<u>Pycnopodia helianthoides</u>	<u>Tegula brunnea</u>	-contact avec l'étoile	-oscillation et fuite	Watanabe, J.M. (1983)
" "	<u>Tegula pulligo</u>	-contact avec l'étoile	-colle la coquille sur le substrat	"
" "	<u>Acmea scutum</u>	-eau parfumée	-fuite	Phillips, D.W. (1976)
" "	<u>Olivella biplicata</u>	-présence du prédateur	-enfouissement	Phillips, D.W. (1977)

Partie V

CONCLUSION GÉNÉRALE

Tel que cité dans le titre du projet, celui-ci portait sur l'analyse chimique des astérosaponines extraites de Leptasterias et sur leur implication dans les mécanismes de défense développés par le buccin. L'analyse et la nature des résultats obtenus dans les différentes sections ne nous permettent pas d'établir une conclusion unique et définitive, mais plutôt de présenter différentes conclusions possibles dont la solution finale nécessiterait une continuité au projet.

Ainsi, l'analyse chimique nous a permis d'établir qu'effectivement le contenu des différents extraits était formé de saponines. En effet, les sucres retrouvés dans ces mélanges (xylose, quinovose, fucose et le galactose) sont ceux constituant le plus souvent la partie hydrate de carbone des astérosaponines. De plus, l'analyse qualitative et semi-quantitative réalisée par CLHPPR nous démontre que les cinq structures, après identification des différents produits par leur temps de rétention, présentaient plusieurs produits communs. L'analyse semi-quantitative réalisée par une estimation de la quantité de chaque produit par la surface de son pic démontre que cette distribution relative différente était la caractéristique la plus évidente. En effet, il est possible que dans certaines structures l'absence d'un produit soit reliée à la capacité de détection et de séparation de produits en très faibles concentrations par rapport à d'autres.

Dans le cas de la relation prédateur-proie entre Leptasterias et le buccin, celle-ci devient évidente puisque les bioessais ont démontré clairement que le buccin mature présentait un comportement violent de

défense typique aux gastéropodes face aux étoiles de mer. De plus, il a été démontré que la réaction provenait d'une reconnaissance par le buccin de produits chimiques émis par Leptasterias et que la nature alarmante de ceux-ci était dépendante du degré d'association entre les deux organismes. Il a été également établi que le comportement de la proie face au prédateur était fonction de la taille de celle-ci. Cette différence de comportement entre individus matures et immatures a été expliquée principalement par une intensité moindre d'association entre les immatures et Leptasterias. En effet, ceux-ci n'occupent pas le même milieu que l'étoile de mer comme le font les buccins matures.

Lors des bioessais avec les extraits, il n'a pas été possible de mettre en évidence une activité plus grande pour l'une ou l'autre des structures. De plus, la réponse de défense attendue chez le buccin n'a pu être provoquée que dans trop peu de cas. Cependant, il a été clairement démontré que les buccins étaient sensibles à ces produits et manifestaient dans de nombreux cas une réponse de fuite caractéristique d'une détection à distance et que la réponse violente de défense serait un comportement utilisé principalement lors d'un contact direct. Une autre hypothèse apportée pour tenter d'expliquer le manque possible d'activité des structures externes fait intervenir la composition des mélanges. En effet, rien ne nous permet de dire que les mélanges extraits et plus particulièrement pour les structures externes ont la même composition que celui émis naturellement dans le milieu par l'étoile de mer. Ainsi, la réaction de défense serait provoquée par un mélange précis et spécifique à l'étoile de mer étudiée.

Cette étude, nous l'espérons, aura apporté certains éléments de réponse aux facteurs chimiques impliqués dans la relation prédateur-proie. De plus, même si beaucoup de points demeurent ambigüs et ainsi témoignent de la complexité du phénomène, nous souhaitons que ce travail contribuera à la compréhension des problèmes reliés à l'écologie chimique en stimulant, par les interrogations qu'il soulève, le besoin de les étudier.

BIBLIOGRAPHIE

- Anderson, J.M. 1960. Histological studies on the digestive system of a starfish, Henricia, with notes on Tiedemann's pouches in starfishes. Biol. Bull. Mar. Biol. Woods Hole 119:371-398.
- Ansell, A.D. 1968. Defensive adaptations to predation in the mollusca. p. 487-512. Proceedings of the symposium on mollusca. Marine biological association of India.
- ApSimon, J.W. et J. Burnell. 1983. Echinoderm saponins. Dans: Marine natural products, chemical and biological perspectives. Edité par Scheuer P.J., vol. 5, chap.6, Academic Press, New York.
- Barbier, M. 1976. Introduction à l'écologie chimique. Masson. Paris.
- Barbier, M. 1981. Marine chemical ecology. The roles of chemical communication and chemical pollution. p. 147-186. Dans: Marine natural products Vol. 4, Academic Press Toronto.
- Bauer, V., Zur Kenntnis der, 1912. Lebenweise von Pecten jacobaeus L. Zool. Jb. Abt. 3, Allg. Zool. Physiol. der Tiere. 33: 127-150.
- Burnell, D.J. 1978. Investigations of the steroidal components of the squid, Illex ellecebrosus, and the starfish, Asterias vulgaris. M.Sc. Thesis, Carleton University, Ottawa, Ontario.
- Burns, B.G., M.W. Gilgan, V.H. Logan, J. Burnell et J.W. ApSimon, 1977. Estimation of a steroid released from the crude saponins of the starfish, Asterias vulgaris, by solvolysis. Seasonal and geographic abundance. Analytical biochemistry 81: 196-208.
- Chanley, J.D., J. Perlstein, R.F. Nigrelli et H. Sobotka. 1960 . Further studies on the structure of holothurin. Ann. N.Y. Acad. Sci. 90: 902-905.
- Dayton, P.K., R..J. Rosenthal, L.C. Mahen et T. Antezana.1977. Population structure and foraging biology of the predaceous chilean asteroid Meyenaster gelatinonus and the escape biology of its prey. Marine Biology 39: 361-370.
- De Simone, F., A. Dini, E. Finamore, L. Minale, C. Pizza et R. Riccio. 1979a. Starfish saponins -IV. Sapogenins from the starfish Astropecten aurantiacus and Marthasterias glacialis . Comp. Bioch. and Physi. (part B). Vol. 64, no. 1., p. 25-32.
- De Simone, F., A. Dini, L. Minale, C. Pizza et R. Riccio. 1979b. Starfish saponins-III. A novel steroidal sapogenin, 17β -methyl- $3\beta,6\alpha$ -dihydroxy- 18 -nor- 5α -cholesta- $9(11),13$ dien-23-one from the starfish Astrepecten aurantiacus . Tetrahedron Letters 11, 959-962.

- De Simone, F., A. Dini, L. Minale, C. Pizza et R. Riccio. 1981. J. C. S. Perkin I, 1855-62. Starfish saponins. Part 5 Structure of sepositoside A, a novel steroidal cyclic glycoside from the starfish Echinaster sepositus. J.C.S. Perkin (I), 1855-1862.
- Doering, P.H. 1976. A burrowing response of Mercenaria mercenaria elicited by Asterias forbesi. Veliger 19: No. 2. 167-175.
- Doering, P.H. 1982. Reduction of attractiveness to the sea star Asterias forbesi by the clam Mercenaria mercenaria. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 60: 47-61.
- Doering, P.H. et D.W. Phillips. 1983. Maintenance of the shore-level size gradient in marine snail Tegula funebralis (A. Adams): Importance of behavioral responses to light and sea star predators. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 67: 159-173.
- Edmunds, M. 1974. Defense in animals, a survey of antipredator defenses. Longman Group. Ltd., Essex. Great Britain. 357 p.
- Elyakov, G.B., E.V. Levina, V.S. Levin et I.I. Kapustina, 1976. Glycosides of marine invertebrates-V. A comparative study of glycoside fractions from starfish. Comp. Bioch. Physi. part B. 55(1):57-60.
- Feder, H.M. 1963. Gastropod defensive responses and their effectiveness in reducing predation by starfish. Ecology 44 (3): 505-512.
- Feder, H.M. 1967. Organisms responsive to predatory sea stars. Sarsia 29: 271-394.
- Feder, H.M. et J. Arvidsson. 1967. Studies on a sea-star (Marthasterias glacialis) extract responsible for avoidance reactions in a gastropod (Buccinum undatum). Arkiv fur Zoologi 19(4): 369-379.
- Fisher, P. 1869. Note sur la natation de Pecten maximus. J. Conch. 17: 121-123.
- Garneau, F.X., J.L. Simard, O. Harvey, J.W. Apsimon et M. Girard. 1983. The structure of psoluthrin A, the major triterpene glycoside of the sea cucumber Psolus fabricii. Can. J. Chem. 61: 1465-1471.
- Gilgan, M.W., R.K. Pike et J.W. ApSimon. 1976. Quantification of a saponin steroid from the starfish Asterias vulgaris. Comp. Bioch. Physi. 54 (4):561-563.
- Goldsmith, A. et P.G. Carlson. 1974. Pharmacological evaluation of an asterosaponin from Asterias forbesi. Dans: Food-drugs from the sea. p. 354-365. Marine Technology Society, Washington, D.C.

- Grant, P.T. et A.M. Mackie. 1974. Interspecies and intraspecies chemoreception by marine invertebrates. p. 105- 140. Dans: P.T. Grant and A.M. Mackie, Eds, Chemoreception in marine organisms. Academic Press. N.Y.
- Hancock, D.A. 1974. Some aspects of the biology of the sunstar Crossaster papposus. *Ophelia* 13: 1-30.
- Howden, M.E.H., J.S. Lucas, M. Mc Duff et R. Salathe. 1975. Chemical defenses of Acanthaster planci. p. 67-69. Dans: Crown-of-Thorns starfish seminar proceedings, Brisbane, sept. 6, Australia Govt. Publ. Service, Canberra.
- Hughes, R.N. et S. de B. Dunkin. 1984. Behavioral Components of prey selection by dogwhelks, Nucella lapillus (L.), feeding on mussels, Mytilus edulis (L.) in the laboratory. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 77: 45-68.
- Ikegami, S. et Y. Kamiya. 1972a. Isolation and identification of spawning inhibitors from ovaries of the starfish, Asterias amurensis. *Agri. Biol. Chem.* 36 (6): 1078-1089.
- Ikegami, S., Y. Kamiya et S. Tamura. 1972b. Isolation and characterization of spawning inhibitors in ovary of the starfish, Asterias amurensis. *Agr. Bio. Chem.* 38 (11): 2005-2011.
- Ikegami, S. et S. Tamura. 1973. Spawning control in starfish. *Experientia* 29 (3): 325.
- Kesselmeier, J. et D. Strack. 1981. High performance liquid chromatographic analysis of steroid saponins from Avena sativa. *Zeitchrift fur natur forschuag. Biosciences sect. C.* 36: 11-12.
- Kicha , A.A., A.I. Kalinovsky, E.V. Levina, V.A. Stonik et G.B. Elyakov. 1983. Asterosaponin P, from the starfish Patiria pectinifera. *Tetrahedron Letters* 24 (36): 3893-3896.
- Kitagawa, I., M. Kobayashi, T. Sugawara et I. Ysicka. 1975. Thornasterol A and B, two genine saponenols from the starfish Acanthaster planci. *Tetrahedron Letters* 967-970.
- Kitagawa, I. et M. Kobayashi. 1977. On the structure of the major saponin from the starfish Acanthaster planci. *Tetrahedron Letters* 10: 859-862.
- Kittredge, J.S. 1974. Behavioral bioassays and biologically active compounds. Dans: Food drugs from the sea. p. 467-475. Marine Technology Society, Washington. D.C.

- Komori, T., H. Nanri, Y. Itakura, K. Sakamoto, S. Taguchi, R. Higuchi, T. Kawasaki et T. Higuchi. 1983. Structures of two newly characterised genuine saponins and an oligoglycoside sulfate. Liebigs Ann. Chem. 37-55.
- Landenberger, D.E. 1968. Studies on selective feeding in the Pacific starfish Pisaster in southern California. Ecology 49: 1062-1075.
- Lester, R., M.C. Garey, J.M. Little, L.A. Cooperstein et S.R. Dowd. 1975. Crustacean intestinal detergent promotes sterol solubilization. Science. 189:1098-1100.
- Lucas, J.S., R.J. Hart, M.E. Houden et R. Salathe. 1979. Saponins in eggs and larvae of Acanthaster planci as chemical defences against planktivorous fish. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 40: 155-165.
- Mackie, A.M., R. Lasker et P.T. Grant. 1968. Avoidance reactions of a mollusc Buccinum undatum to saponin-like surface-active substances in extracts of the starfish Asterias rubens and Marthasterias glacialis. Comp. Bioch. Physi. 26: 415-428.
- Mackie, A.M. et A.B. Turner. 1970. Partial characterization of a biologically active steroid glycoside isolated from the starfish Marthasterias glacialis. Biochem. Jour. 117: 543-550.
- Mackie, A.M., H.T. Singh et J.M. Owen. 1977. Studies on the distribution, biosynthesis and function of steroid saponins in echinoderms. Comp. Bioch. Physi. 56B: 9-14.
- Mackie, A.M. 1978. Avoidance reactions of marine invertebrates to either steroid glycosides of starfish or synthetic surface-active agents. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 5: 63-69.
- Mayo, P. et A.M. Mackie. 1976. Studies of avoidance reactions in several species of predatory british seastars. Mar. Biol. 38: 41-49.
- Matsuno, T., A. Sakushima et T. Ishida. 1973. Nippon Suisan Gakkaishi 39: 307.
- Mauzey, P.K., C. Birkeland et P.K. Dayton. 1968. Feeding behavior of asteroids and escape responses of their prey in the Puget sound region. Ecology 49: 603-619.
- Menge, B.A. 1972. Foraging strategy of starfish in relation to actual prey availability and environmental predictability. Ecol. Monogr. 42 (1): 25-50.
- Minale, L., R. Riccio, F. De Simone, A. Dini, C. Pizza et E. Ramundo. 1978. Starfish saponins I. 3β hydroxy-5 α -cholesta-8, 14-dien-23-one, the major genin from the starfish Echinaster sepositus. Tetrahedron Letters. 29: 2609-2612.

- Nielsen, C. 1975. Observations on Buccinum undatum attacking bivalves and on prey responses with a short review on attack methods of other prosobranchs. *Ophelia* 13:87-108.
- Nigrelli, R.F. 1952. The effect of holothurin on fish and mice with Sarcoma-180. *Zoologica*. 37: 89-90.
- Okano, K. et S. Ikegami. 1981. Separation of ovarian asterosaponins in the starfish Asterias amurensis Agri. *Biol. Chem.* 45 (3): 801-803.
- Owollen, R.J., R.G. Owollen, M.A. Gorog et D. Klein. 1973. Cytolytic saponin fraction from Asterias vulgaris. *Toxicon* 11: 319-323.
- Paine, R.T. 1969. The Pisaster - Tegula interaction: prey patches, predator food preference and intertidal community structure. *Ecology* 50: 950-961.
- Phillips, D.W. 1975. Distance chemoreception-triggered avoidance behavior of the limpet Acmaea (Collisella) limatula and Acmaea (Notoacmea) scutum to the predatory starfish Pisaster ochraceus. *Jour. Exp. Zool.* 1914 (2): 199-209.
- Phillips, D.W. 1976. The effect of a species-specific avoidance response to predatory starfish on the intertidal distribution of two gastropod. *Oecologia* 23: 83-94.
- Phillips, D.W. 1977. Avoidance and escape responses of the gastropod mollusc Olivella biplicata to predatory asteroids. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 28: 77-86.
- Phillips, D.W. 1978. Chemical mediation of invertebrate defensive behaviors and the ability to distinguish between foraging and inactive predators. *Marine Biology* 49: 237-243.
- Phillips, D.W. et P. Castori. 1982. Defensive responses to predatory seastars by two specialist limpets Notoacmea insersa and Colisella instabilis associated with marine algae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 59:23-30.
- Pike, R., M.W. Gilgan et J.W. ApSimon. 1974. Quantification of a starfish saponin steroid aglycone of commercial interest. Dans: Food-drugs from the sea. p. 375-386. Marine Technology Society, Washington, D.C.
- Riccio, R., A. Dini, L. Minale, C. Pizza, F. Zollo et T. Savenet. 1982a. Starfish saponins. VII. Structure of luzonicoside, a further steroidal cyclic glycoside from the pacific starfish Echinaster luzonicus. *Experientia*. 38: 68-69.

- Riccio, R., L. Minale, C. Pizza, F. Zollo et J. Pusset. 1982b. Starfish saponins. part. 8. Structure of nodoside, a novel type steroidal glycoside from the starfish Protoreaster nodus. Tetrahedron Letters 23:2899-2902.
- Rio, G.J., G.D. Ruggieri, M.F. Stempien et R.F. Nigrelli. 1963. Saponin-like toxin from the giant sunburst starfish, Pycnopodia helianthoides, from the Pacific northwest. Amer. Zool. 3: 554-555.
- Rio, G.J., M.F. Stempien, R.F. Nigrelli et G.D. Ruggieri. 1965. Echinoderm toxins I. Some biochemical and physiological properties of toxins from several species of asteroida. Toxicon 3: 147-155.
- Rosenthal, R.J. 1971. Trophic interaction between the sea star Pisaster giganteus and the gastropod Kelletia kelletii. Fishery Bulletin 69 (3): 669-679.
- Rosenthal, R.J. et J.R. Chess. 1972. A predator-prey relationship between the leather star, Dermasterias imbricata, and the purple urchin, Strongylocentrotus purpuratus. Fishery Bulletin. 70(1): 205-216.
- Ruggieri, G.D. and R.F. Nigrelli. 1972. Physiologically active substances from echinoderms. p. 183-195. Dans: Bioactive compounds from the sea. (Edité par H.J. Humm and C.E. Lane, Marcel Dikkin, Inc., N.Y.)
- Seiber, J.N., C.J. Nelson et J.M. Benson. 1981. HPLC analysis of cardiac glycosides and related steroids. Chromatographic Science 16: 41-80.
- Shimizu, Y. 1973. Characterization of starfish toxins - identification of an aglycone as a 5-pregnane derivative. p. 291-297. Dans: Food-drugs from the sea (Edité par Worthen L.R.) Marine Technology Society, Washington D.C.
- Sondheimer, E. et J.B. Simone. 1970. Chemical Ecology. Academic Press, New York. 336 p.
- Teshima, S., R. Fleming, J. Gaffney et L.J. Goad. 1977. p.133 Dans: Marine Natural Products Chemistry. D.J. Faulkner and W.H. Fenicals, eds. Plenum, N.Y.
- Thomas, G.E. et Ll. D. Gruffydd. 1971. The types of escape reactions elicited in the scallop Pecten maximus by selected sea-star species. Marine Biology 10: 87-93.
- Vogel, A.I., 1961. A text-book of Practical organic chemistry. Third Edition, Longmans, London.

- Voogt, P.A. et R. Huiskamp. 1979. Sex-dependance and seasonal variation of saponins in the gonads of the starfish Asterias rubens: their relation to reproduction. Comp. Bioch. Physi. 62A: 1049-1055.
- Voogt, P.A. et J.W.A. Van Rheenen. 1979. Studies on the possible regulatory function of asterosaponins in oocyte maturation and early embryogenesis of Asterias rubens. International J. Invert. Repro. 1: 307-316.
- Voogt, P.A. et J.W.A. Van Rheenen. 1982. Carbohydrate content and composition of asterosaponins from different organs of the sea star Asterias rubens. Relation to their haemolytic activity and implications for their biosynthesis. Comp. Bioch. Physi. 72B(4): 683-688.
- Whittaker, R.H. et P.P. Feeny. 1971. Allelochemistry: chemical interactions between species. Science 171:757-770.
- Ward, J.A. 1965. An investigation on the swimming reaction of the anemone Stomphia coccinea I. Partial isolation of a reacting substance from the asteroid Dermasterias imbricata. J. Exp. Zool. 158: 357-364.
- Watanabe, J.M. 1983. Anti-predator defenses of three kelp forest gastropods: contrasting adaptations of closely-related prey species. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 71:257-270.
- Yamanouchi, T. 1942. Teikoku Gakushiin Hōkoku. 73.
- Yasumoto, T. et Y. Hashimoto. 1965. Properties and sugar components of asterosaponin A isolated from starfish. Agr. Biol. Chem. 29 (9): 804-808.
- Yasumoto, T. et Y. Hashimoto. 1967. Properties of asterosaponin B isolated from starfish Asterias amurensis. Agr. Biol. Chem. 31(3): 368-372.
- Yasumoto, T., K. Nakamura et Y. Hashimoto. 1967. A new saponin, Holothurin A isolated from sea-cucumber, Holothuria vagabunda and Holothuria lubrica. Agr. Biol. Chem. 31: 7-10.
- Yasumoto, T., M. Tanaka et Y. Hashimoto. 1966a. Distribution of saponins in echinoderms. Bull. Jap. Soc. Scient. Fish. 32: 673-676.
- Yasumoto, T., M. Tanaka et Y. Hashimoto. 1966b. Nippon Swisas Gakkaishi 32: 673.
- Yasumoto, T., T. Watanabe et Y. Hashimoto. 1964. Physiological activities of starfish saponin. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 30: 357-364.