



HAL
open science

Valorisation des coproduits de l'holothurie *Cucumaria frondosa* par l'étude d'extraits bioactifs et approche écotoxicologique des métabolites secondaires relargués en situation de stress

Ludovic Tripoteau

► **To cite this version:**

Ludovic Tripoteau. Valorisation des coproduits de l'holothurie *Cucumaria frondosa* par l'étude d'extraits bioactifs et approche écotoxicologique des métabolites secondaires relargués en situation de stress. Biotechnologies. Université de Bretagne Sud, 2015. Français. NNT : 2015LORIS368 . tel-01297042

HAL Id: tel-01297042

<https://theses.hal.science/tel-01297042>

Submitted on 2 Apr 2016

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

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



THESE / UNIVERSITE DE BRETAGNE-SUD
sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne

pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BRETAGNE-SUD
Mention : Biologie - Santé
Ecole doctorale SICMA

présentée par

Tripoteau – Ludovic

Préparée à l'UBS, Vannes (Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, EA 3884) et à l'Institut de Recherche sur les Zones Côtières (Shippagan, NB, Canada)

Valorisation des coproduits de
l'holothurie *Cucumaria*
frondosa par l'étude d'extraits
bioactifs et approche
écotoxicologique des
métabolites secondaires
relargués en situation de stress

Thèse soutenue le 12 mai 2015 devant le jury composé de :

Bordenave Stéphanie

Maître de conférences, Université de La Rochelle / rapporteur

Flammang Patrick

Professeur, Université de Mons, Belgique / rapporteur

Maes Philippe

Maître de conférences, Université de Bretagne Sud / examinateur

Radenac Gilles

Maître de conférences, Université de La Rochelle / examinateur

Gagnon Jacques

Directeur de recherche IRZC, Canada / Co-directeur de thèse

Bourgougnon Nathalie

Professeur, Université de Bretagne Sud / Directrice de thèse

Résumé

Ludovic Tripoteau

Valorisation des coproduits de l'holothurie *Cucumaria frondosa* par l'étude d'extraits bioactifs et approche écotoxicologique des métabolites secondaires relargués en situation de stress.

Thèse de doctorat, Biologie – Santé, Université de Bretagne-Sud, 2015

La transformation des produits marins génère d'importantes quantités de rejets. La majorité est transformée pour des applications de masse avec une faible valeur ajoutée. Au Nouveau Brunswick, 85 000 tonnes de produits marins sont transformés annuellement et la moitié est peu ou pas valorisée, c'est le cas de l'holothurie *Cucumaria frondosa*. Face aux différentes pressions de leur environnement, et notamment la prédation, ces invertébrés marins ont évolué en développant des métabolites d'une large chimiodiversité, ce qui en fait d'excellents candidats pour le développement de substances naturelles bioactives. L'objectif de cette étude a tout d'abord été de chercher à valoriser les coproduits majeurs de *Cucumaria frondosa* en constituant une large librairie d'extraits et en évaluant, par fractionnement bioguidé, les activités antiherpétiques *in vitro* des fractions obtenues par différents procédés d'extraction (extractions par solvants et hydrolyses enzymatiques). Nous avons pu mettre en évidence la présence de fractions anti-VHS-1 (Virus *Herpes Simplex* de type 1). L'hydrolyse enzymatique s'est avérée être une technique efficace pour la génération de substances actives. Le bulbe aquapharyngé peu considéré d'un point de vue industriel représente un réel potentiel pour l'extraction de composés anti-VHS-1, et notamment lorsque celui-ci est hydrolysé par la papaine en conditions contrôlées. L'activité antiherpétique la plus efficace a été reliée à la présence de molécules à haut poids moléculaires. Dans un second temps, nous avons cherché à comprendre et à mettre en évidence les mécanismes de défense de l'holothurie par l'étude de ces métabolites secondaires relargués en situation de stress. Les métabolites ont été évalués sur différents modèles écotoxicologiques et les molécules actives ont été caractérisées par fractionnement bioguidé par l'utilisation de modèle d'évaluation de cytotoxicité, en parallèle à différents procédés analytiques. L'étude a confirmé l'existence et la production de composés toxiques relargués en situation de stress. Ces métabolites secondaires ont montré une forte toxicité sur différents modèles écotoxicologiques chronique et aiguë. Le fractionnement bioguidé par couplage analytique nous a conduit à l'identification de plusieurs composés du type glycoside triterpénique et notamment le Frondoside A retrouvé dans la fraction responsable de la cytotoxicité. L'étude a permis d'optimiser l'extraction de ce composé d'un intérêt biologique prometteur sans pour autant entraîner la mort de l'animal.

Mots clés : holothurie, valorisation de coproduits marins, activité anti-VHS, hydrolyse enzymatique, métabolites secondaires, glycosides triterpéniques, écotoxicologie, purification.

Abstract

Ludovic Tripoteau

Upgrading of byproducts from the holothurian *Cucumaria frondosa* by the study of bioactive extracts and ecotoxicological approach of the secondary metabolites released under stress conditions.

PhD Thesis, Biology – Health, Université de Bretagne-Sud, 2015

The transformation of marine products generates huge quantities of rejects. The majority of these rejects is used for an upgrading of products with low added value. In New Brunswick, 85 000 tons of marine products are transformed annually, the half is little or not upgraded, that is the case of the holothurian *Cucumaria frondosa*. Confronted with environmental pressures, and especially predation, the marine invertebrates have evolved and developed various metabolites of different chemical classes. Thus, these metabolites represent ideal candidates for the development of new natural bioactive substances. The objectives of this study was first based on the upgrading of the major byproducts from *Cucumaria frondosa* by creating a wide library of extracts and evaluating the *in vitro* anti-HSV-1 (*Herpes Simplex Virus*, type 1) activities of the fractions obtained by different type of extractions (solvent extractions and enzymatic hydrolysis). We showed the presence of potent antiherpetic fractions. The enzymatic hydrolysis has been demonstrated to be efficient for the generation of active substances. The aquapharyngeal bulb, considered to be less used industrially, represents a real potential for the extraction of anti-HSV-1 compounds, and especially when hydrolyzed by papain under controlled conditions. The best activity has been retrieved in the high molecular weight fraction. Secondly, we have searched to understand the mechanism of defense of the holothurian by studying the secondary metabolites released under stress conditions. The metabolites were evaluated on different ecotoxicological models and the active molecules were characterized by bioguided fractionation with a cytotoxic model and analytical evaluation. This work has confirmed the existence and the production of toxic compounds released under stress conditions. These secondary metabolites have shown a strong toxicity on acute and chronic ecotoxicological models. The bioguided fractionation assisted by analytical evaluation leads to the identification of several triterpene glycosides, and especially the Frondoside A into the cytotoxic fraction. This study has permitted the optimization of the extraction of this compound with promising biological activities, without leading to the death of the animal.

Keywords: holothurian, upgrading of marine byproducts, anti-HSV activity, enzymatic hydrolysis, secondary metabolites, triterpene glycosides, ecotoxicology, purification.

Liste des travaux et publications

Publications

Tripoteau L., Bedoux G., Gagnon J., Bourgougnon N. (2015). *In vitro* antiviral activities of enzymatic hydrolysates extracted from byproducts of the Atlantic holothurian *Cucumaria frondosa*. *Process Biochemistry*, 50(5): 867-875.

Lalut J., **Tripoteau L.**, Marty C., Bares H., Bourgougnon N., Felpin F.X. (2012). Synthesis of C3-arylated-3-deazauridine derivatives with potent anti-HSV-1 activities. *Bioorg.Med.Chem. Lett*, 22 7461-7464.

Communications orales

Tripoteau L. « Etude des métabolites secondaires issus de l'holothurie *Cucumaria frondosa* dans la recherche de composés bioactifs : application à la leucémie lymphoïde chronique B ». 1^{ère} Rencontre Nationale des Jeunes Chercheurs en Ecologie Chimique. 5-7 Juin 2013, Supagro Montpellier, France.

Tripoteau L. « De la France à l'Acadie : Recherche et valorisation de coproduits marins, une chance, un défi ». Conférencier invité « 15^{ème} cercle scientifique étudiant ». Avril 2011, Université de Moncton, Campus de Shippagan, N.B., Canada.

Posters

Tripoteau L., Gagnon J., Bourgougnon N. « Antiviral activities of peptides extracted from the Atlantic holothurian *Cucumaria frondosa* against *Herpes simplex* virus ». 4th International Symposium On Antimicrobial Peptides, 4-6 Juin 2014, Lorient, France.

Tripoteau L. « Antiherpetic activities of hydrolysates of *Cucumaria frondosa* (*Holothuroidea*) ». 4th Annual New Brunswick Health Research Conference, November 2012, Fredericton, Canada.

Animations scientifiques

Co-fondateur et membre de l'« Association Française des Jeunes Chercheurs en Écologie Chimique » (2013).

Membre du comité d'organisation de la « 1^{ère} Rencontre Nationale des Jeunes Chercheurs en Écologie Chimique » (5-7 juin 2013, Montpellier, France).

Membre du comité d'organisation du « 4th International Symposium On Antimicrobial Peptides » (4-6 juin 2014, Lorient, France).

Remerciements

J'adresse mes remerciements au Dr. Bordenave et au Pr. Flammang qui me font l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse. Je les remercie vivement d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je tiens à remercier l'Institut de Recherche sur les Zones Côtières (IRZC) pour le financement de ce projet (Fonds d'Innovation Atlantique du Canada).

Je tiens à exprimer ma gratitude au Pr. Nathalie Bourgougnon de l'Université de Bretagne Sud pour avoir assuré la direction de cette thèse. Un grand merci pour la confiance qu'elle m'a témoignée, pour sa motivation constante et sa joie de vivre quotidienne. Encore merci de m'avoir soutenu tout au long de cette longue aventure et d'avoir partagé son immense réseau de collaborateurs. Je te remercie également Nathalie pour m'avoir proposé ce poste d'ATER qui m'a permis de découvrir l'enseignement.

Je remercie vivement le Dr. Jacques Gagnon, directeur de recherche du volet Pêche et Produits Marins de l'IRZC et codirecteur de ce doctorat, sans qui je n'écrirais pas ces lignes. Je lui adresse également mes plus sincères remerciements pour sa patience, sa curiosité scientifique, son extrême gentillesse, son accueil des plus chaleureux au sein de son laboratoire tout au long de la thèse et même sous son toit lors de mes premiers jours canadiens alors que j'étais un peu perdu dans ce grand pays. Merci encore pour m'avoir soutenu et de m'avoir montré cet aspect plus industriel de la recherche.

Je tiens également à remercier les directeurs, le Dr. Alain Dufour, directeur du LBCM pour m'avoir permis de réaliser ma thèse dans son laboratoire et bien entendu j'adresse mes sincères remerciements à l'incontournable Gastien Godin, directeur de l'IRZC, pour m'avoir permis de réaliser ma thèse dans son institut, pour sa gentillesse et sa grande générosité et pour avoir accepté de passer un peu de temps autour de dîners de *Homarus americanus* et de boissons pétillantes au houblon lors de 5 à 7 afin de « jaser » avec un « ostie » de français.

Je souhaite très sincèrement remercier l'entreprise « Pêcheries GEM » et l'ensemble de la famille Foulem pour sa gentillesse, sa disponibilité, son accueil et pour m'avoir gracieusement fourni les spécimens de *C. frondosa* tout au long de cette aventure. Je tiens à remercier les docteurs Junzeng Zhang et Guangling Jiao du laboratoire « Aquatic and Crop Resource Development » du département des Sciences de la Vie du Conseil National de Recherche Canadien (CNRC) à Halifax pour leur collaboration dans ce projet par la réalisation des analyses de spectrométrie de masse et pour leur grande expertise. Ma gratitude va également à Claire Donnay-Moreno du laboratoire BIORAFhe de l'IFREMER de Nantes pour les analyses sur les acides aminés et pour sa grande gentillesse. Je tiens également à remercier Elise Mayrand de l'université de Moncton, campus de Shippagan pour ses conseils écotoxicologiques. Sans bien sur oublier Yahia Djaoued, Balaji Subramanian, et Priya Srinivasan du Laboratoire de recherche en matériaux et Micro-spectroscopies Raman et FTIR de l'université de Moncton pour leurs précieux conseils. J'adresse également mes sincères remerciements à André Dumas, Claude S. Pelletier, Rémy Haché, Michel Desjardins et le regretté Steven Mallet du pavillon aquacole de l'IRZC pour les spécimens de poissons et d'huîtres, les conseils réglementaires et scientifiques et surtout leur amitié. Un grand merci à toute l'équipe de l'IRZC qui m'a si chaleureusement accueilli en terre canadienne et particulièrement Danica Albert pour son soutien, sa grande culture scientifique et son amitié, merci pour tout Danica. Merci également à Gaëlle Simon et Nelly Kervarec du service de RMN-RPE de Brest pour leur collaboration lors de ce travail. Et bien entendu, je tiens à remercier Philippe Douzenel pour son aide précieuse lors des 2587 injections en HPLC et particulièrement pour l'identification des multiples « pannes » de cet appareil.

Je tiens également à remercier le Dr Nathalie Roué-Fourmantin du CHRU de Brest, le Dr. Jacques Bodennec de l'université Claude Bernard de Lyon et le Pr. Richard Brown du laboratoire de Physiologie et de Neurosciences de l'université Dalhousie à Halifax pour leurs collaborations dans ce projet et leurs accueils dans leurs unités respectives.

Je tiens tout particulièrement à remercier le Dr. Gilles Bedoux pour sa présence, sa gentillesse, sa patience (et le mot est faible), ses encouragements pendant mes périodes de doutes lorsque je voulais me reconvertir berger dans le Larzac et ses précieux conseils scientifiques, un grand merci Gilles.

J'ai eu une chance infinie d'avoir pu rencontrer le Dr Jean-Pascal Bergé (aka JP) sans qui rien de tout cela ne serait arrivé. Après avoir effectué 2 stages consécutifs à l'Ifremer de Nantes, Jean-Pascal m'a relayé une information concernant une proposition d'emploi en tant qu'assistant de recherche à l'IRZC de Shippagan au Nouveau-Brunswick à laquelle j'ai immédiatement postulé. Un grand merci à toi Jean-Pascal pour cela mais également pour ta gentillesse, ton amitié et ton indéfectible soutien.

Merci aux anciens de Nantes, entre l'Ifremer, ONIRIS, l'Ecole des Mines et autres. Merci de m'avoir montré « la voie », vous mes amis : Raül (aka le monstre de Floirac), Clément (rédacteur en chef de mémoire de M2), Adrien, Emilie, Angelito, Leonardo, Flavia, Aude, Sarah, Manu, et tous ceux que j'oublie. Merci à vous pour ces moments mémorables.

Un grand merci aux habitants du LBCM et de l'UBS, que ce soit sur le site de Vannes, ou bien celui de Lorient que j'ai malheureusement rencontré que plus tardivement. Merci à vous tous pour votre collaboration, votre amitié, votre soutien et surtout votre patience, notamment lors de réunions où l'on ne parlait pas d'algues (ou est-ce l'inverse ?). Merci la fine équipe : Kévin (ED SPLM) pour ta sagesse et ton calme légendaire, Roumain pour le cuivre et accessoirement ton temps passé sur l'HPLC, Anne-So B pour la machine à laver, Marie pour tes gâteaux et ton accent, Anne-So F pour tes conseils écotoxicologiques, Amélie pour ta tomme, Mouna, Melha, Nolwenn et toute l'équipe lorientaise.

La réalisation de ce doctorat m'a également permis de rencontrer le monde de l'Ecologie Chimique. En effet, en 2012, lors d'une pénible semaine d'Ecole Thématique du CNRS à Fréjus en plein été, j'ai eu la chance de rencontrer 3 personnes avec lesquelles il a été décidé d'organiser une rencontre nationale de jeunes chercheurs dans le domaine de l'écologie chimique. Après un an, 3254 SMS, 1758 mails, 122 visioconférences à travers le monde, 92 dossiers de financements, quelques moments de panique, des rafraichissements de ci de là et d'innombrables fous rires, le projet s'est concrétisé du 5 au 7 Juin 2013 à Montpellier. Merci Roxy, Maxime et Emilie de m'avoir entraîné dans ce beau projet et pour les moments passés et futurs en votre compagnie. Merci.

Que deviendrait le chercheur sans stagiaire ? Dans ce sens, merci Clémentine pour ton temps et pour avoir traversé l'Atlantique à ma place lorsque mon temps faisait défaut. De même, merci Nicole pour ces travaux si loin de chez toi. Et enfin, je tiens à remercier Pascale pour son aide et notamment pour avoir pris la suite des dosages de Clémentine.

Je tiens également à saluer les Costarmoricains : Yo, Denito, Virgule, Toto, Bastien Blosnes, Richie Mavel, Roro, Perrine, Clément le rennais/golfeur semi-pro/doctorant sciences molles, et tous ceux que j'oublie pour m'avoir soutenu et de ne pas m'avoir constamment harcelé avec : « Alors, quand est-ce que tu soutiens ? ».

Je ne saurais oublier ma 2^{ème} famille, soit toute l'équipe de la Danjateam et les personnes qui gravitent autour, pour leur présence, leur gentillesse et leur enthousiasme permanent. Merci à vous.

Et enfin, je tiens à remercier l'ensemble de ma famille pour m'avoir soutenu et avoir cru en moi jusqu'au bout. Merci mamie pour ton soutien et surtout pour les week-ends décompression dans ta maison de St Brévin. Merci à toi Laëtia pour m'avoir souvent changé les idées lors de weekends improvisés. Un énorme merci à mes parents, vous qui m'avez toujours encouragé à réaliser ce qui me tenait à cœur et pour votre aide. Merci à vous Chacha et Jon pour tout ce que vous avez fait pour moi et surtout pour avoir fait de moi le plus heureux des tontons avec l'arrivée récente du petit Léon.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Liste des travaux et publications.....	v
Remerciements	ix
Table des matières	xvii
Liste des figures	xxiii
Liste des tableaux	xxvii
Liste des abréviations.....	xxix
Introduction générale.....	2
Etude bibliographique	5
1 Présentation de <i>Cucumaria frondosa</i>	5
1.1 Généralités	5
1.2 Biologie et reproduction	9
1.3 Ecologie	12
1.4 Composition chimique	12
1.4.1 Composition générale.....	13
1.4.2 Caroténoïdes.....	13
1.4.3 Glycosphingolipides.....	14
1.4.4 Oligosaccharides et polysaccharides sulfatés.....	16
1.4.5 Stérols et triterpènes	18
1.4.6 Glycosides triterpéniques	19
1.4.7 Dérivés azotés originaux de <i>Cucumaria frondosa</i>	23
1.4.8 Lectines	24
1.4.9 Peptides	24
1.5 La ressource et la pêche d'holothuries.....	25

1.5.1	Situation de la pêche au niveau mondial	25
1.5.2	Situation de la pêche au Nouveau-Brunswick.....	26
1.6	Marchés et produits.....	28
1.6.1	Alimentation humaine	28
1.6.2	Médecine traditionnelle et produits nutraceutiques	31
2	Activités antimicrobiennes des métabolites et extraits d'holothuries	32
2.1	Généralités	32
2.1.1	Activité antifongique.....	34
2.1.2	Activité antibactérienne.....	35
2.1.3	Activité antivirale.....	35
3	Procédés d'extraction.....	41
3.1	Généralités	41
3.2	Extraction par solvants.....	41
3.3	Hydrolyse enzymatique	42
3.4	Enzymes : définition et classification	43
3.5	Principe de l'hydrolyse enzymatique.....	44
3.6	Paramètres d'hydrolyse.....	45
Chapitre I : Recherche de molécules à activités antiherpétiques issues de coproduits de <i>Cucumaria frondosa</i>.....		49
4	Introduction	49
5	Matériels & Méthodes.....	53
5.1	Préparation des spécimens de <i>Cucumaria frondosa</i>	53
5.1.1	Collecte des spécimens et maintien en vie en bassin	53
5.1.2	Dissection des spécimens	54
5.2	Préparation des extraits	54
5.2.1	Extraction séquentielle solide-liquide par solvants organiques et aqueux.....	54
5.2.2	Hydrolyse enzymatique.....	56

5.2.2.1	Choix des enzymes	56
5.2.2.2	Conditions d'hydrolyse.....	59
5.3	Activités biologiques	62
5.3.1	Cellules Vero.....	62
5.3.1.1	Milieu de culture	62
5.3.1.2	Entretien des cellules Vero	63
5.3.1.3	Conservation des cellules Vero.....	64
5.3.1.4	Décongélation et mise en culture des cellules	64
5.3.2	Le Virus <i>Herpes Simplex</i> , VHS-1	64
5.3.2.1	Préparation du stock viral	65
5.3.2.2	Détermination du titre infectieux de la suspension virale stock	65
5.3.2.3	Titration selon la méthode de Reed et Muench (1938).....	66
5.3.2.4	Titration par mesure de la viabilité cellulaire : coloration au rouge neutre	68
5.4	Evaluation des activités biologiques.....	69
5.4.1	Activité cytotoxique	69
5.4.1.1	Evaluation de l'activité par viabilité cellulaire (Rouge neutre).....	69
5.4.1.2	Evaluation de la cytotoxicité par détermination de la Concentration Cytotoxique à 50%	69
5.4.2	Activité antivirale.....	70
5.4.2.1	Evaluation de l'activité par viabilité cellulaire (Rouge neutre).....	70
5.4.2.2	Evaluation de l'activité anti-VHS-1 des extraits sur les cellules Vero par détermination de la concentration effective à 50% (CE ₅₀).....	71
5.4.2.3	Acyclovir : substance antiherpétique de référence	71
5.5	Méthodes de caractérisation biochimique.....	72
5.6	Méthodes de fractionnement par poids moléculaire	73
6	Résultats & discussion	75
6.1	Librairie d'extraits	75
6.2	Evaluation de l'activité antivirale de la librairie d'extraits.....	77

6.2.1	Evaluation de la cytotoxicité	77
6.2.2	Evaluation de l'activité antivirale	78
6.3	Compositions biochimiques des extraits efficaces	81
6.4	Cinétique d'activités antivirales des extraits efficaces	85
6.5	Fractionnement bioguidé par poids moléculaire de l'extrait hydrolysé par la papaine	87
Chapitre II : Etude des métabolites secondaires de <i>Cucumaria frondosa</i>.....		91
7	Introduction	91
8	Matériels & Méthodes.....	93
8.1	Matériel biologique	93
8.1.1	L'holothurie <i>Cucumaria frondosa</i>	93
8.1.1.1	Collecte des spécimens et maintien en vie en bassin.....	93
8.1.1.2	Production de métabolites secondaires	93
8.1.1.3	Extraction et fractionnement par chromatographie échangeuse d'ions de l'EMSR	94
8.1.2	Ombre chevalier <i>Salvelinus alpinus</i>	96
8.1.3	Truite arc-en-ciel <i>Oncorhynchus mykiss</i>	96
8.1.4	Huître américaine <i>Crassostrea virginica</i>	96
8.2	Evaluations écotoxicologiques.....	97
8.2.1	Analyses histopathologiques et nécropsies	97
8.2.2	Etude de létalité aigüe sur la truite arc-en-ciel (CL ₅₀ -96h)	97
8.2.2.1	Conditions d'acclimatation	98
8.2.2.2	Conditions d'essais	99
8.2.2.3	Concentrations testées.....	100
8.2.3	Evaluation de l'effet de l'EMSR de <i>C. frondosa</i> sur un modèle de toxicité aigüe: L'huître américaine <i>Crassostrea virginica</i>	100
8.2.3.1	Conditions de cultures.....	103
8.2.3.2	Concentrations d'EMSR de <i>C. frondosa</i> testées.....	104

8.2.3.3	Mesures des paramètres	105
8.2.3.4	Prélèvements et dissections.....	105
8.2.3.5	Dosage de l'ammoniac.....	106
8.2.4	Dosages des biomarqueurs	106
8.2.4.1	Dosage des protéines par la méthode de Bradford.....	106
8.2.4.2	Dosage de la Glutathion-S-transférase.....	108
8.2.4.3	Dosage du MalonDiAldéhyde.....	110
8.2.4.4	Dosage de la catalase	112
8.2.4.5	Dosage de l'acétylcholine estérase	114
8.2.4.6	Etudes statistiques.....	116
8.3	Evaluation cytotoxique	117
8.4	Méthodes de purification et d'analyse chimiques.....	118
8.4.1	Analyse et fractionnement par chromatographie liquide haute performance ..	118
8.4.2	Spectrométrie de masse.....	119
9	Résultats et discussion.....	121
9.1	Production d'EMSR de <i>Cucumaria frondosa</i> en situation de stress.....	121
9.2	Détermination de l'effet de l'EMSR sur l'Omble chevalier au niveau physiologique.....	123
9.3	Détermination de la CL ₅₀ -96h de l'EMSR sur la truite arc-en-ciel	126
9.4	Détermination de l'effet de l'EMSR sur <i>C. virginica</i>	130
9.4.1	Préambule.....	130
9.4.2	Mesures des paramètres environnementaux.....	131
9.4.3	Mesure de l'ammoniac	132
9.4.4	Caractéristiques des échantillons de <i>Crassostrea virginica</i>	132
9.4.5	Éthologie et mortalités cumulées	135
9.4.6	Dosages des biomarqueurs	137
9.4.6.1	Effet de l'EMSR sur la quantité de GST dans la glande digestive	137

9.4.6.2	Effet de l'EMSR sur la quantité de MDA dans la glande digestive	139
9.4.6.3	Effet de l'EMSR sur la quantité de CAT dans la glande digestive.....	141
9.4.6.4	Effet de l'EMSR sur la quantité d'AchE dans la glande digestive	143
9.5	Fractionnement bioguidé des métabolites secondaires toxiques de <i>C. frondosa</i> .	145
9.5.1	Analyse des EMSR par LC-PAD	145
9.5.2	Fractionnement bioguidé par LC-PAD	149
9.5.3	Evaluation de la cytotoxicité des fractions isolées par HPLC semi-préparative....	150
9.6	Caractérisation de l'EMSR par spectrométrie de masse (LC Q-TOF HRMS)....	152
9.6.1	Spectrométrie de masse en mode positif de l'EMSR.....	152
9.6.2	Spectrométrie de masse en mode négatif de l'EMSR	155
Conclusion générale & perspectives		165
Références bibliographiques		169
ANNEXES.....		198
Annexe 1 : Licence pour le transfert de poissons vivants dans des installations d'élevage		200
Annexe 2 : Protocole de préparation de la colonne HP20-Supelco (Sigma)		210
Annexe 3 : Termes convenant à la description de l'aspect du comportement des poissons		214
Annexe 4 : Représentation structurale des Frondosides isolés de <i>Cucumaria frondosa</i>		216

Liste des figures

Figure 1 : Schéma général d'une holothurie, exemple de <i>Cucumaria frondosa</i>	7
Figure 2 : Localisation géographique confirmée de l'espèce <i>Cucumaria frondosa</i>	8
Figure 3 : Photographies des principales étapes du développement embryonnaire de <i>C. frondosa</i>	11
Figure 4 : structure des cucumariaxanthines	14
Figure 5 : Exemple de structure de sphingolipide d'holothurie ayant une activité neurogénique	15
Figure 6 : Exemple de structure de cérébrosides isolés de <i>C. frondosa</i>	15
Figure 7 : Structure du frondécaside isolé de <i>C. frondosa</i>	17
Figure 8 : <i>Fucane sulfaté de L. grisea</i>	17
Figure 9 : Représentation de la structure d'une unité de FucCS	17
Figure 10 : Exemple de stérol retrouvé chez <i>Cucumaria sp.</i>	18
Figure 11 : Exemple d'aglycone de <i>C. frondosa</i>	20
Figure 12 : Exemples d'holothurines (saponines) de type I de <i>C. frondosa</i> (1: Frondoside D; 2: Frondoside A; 3: Frondoside B; 4: Frondoside A ₁).....	20
Figure 13 : Exemple de dérivés azotés atypiques de <i>C. frondosa</i>	23
Figure 14 : Exemple de dérivés azotés atypiques de <i>C. frondosa</i>	23
Figure 15 : Représentation 3D de la structure de SPL-I isolée de <i>C. japonica</i>	24
Figure 16 : Emplacement des zones de pêche de l'Holothurie dans le SONB	28
Figure 17 : Spécimens vivants transportés vers la zone d'éviscération (A) ; peaux fraîchement cuites placées sur des grilles pour le séchage (B) ; muscles frais ou viande (C) ; viande conditionnée sous vide (D) ; peaux sèches et bulbes aquapharyngés secs (E) ; peaux sèches en cours de conditionnement (F)	30
Figure 18 : Exemple de glycosides triterpéniques ayant une activité antifongique	34
Figure 19 : Exemple de glycosides triterpéniques ayant une activité antivirale isolés de <i>Staurocucumis liouvillei</i> (Liouvillosides A et B)	36
Figure 20 : Exemple de chondroïtine sulfate fucosylée isolée de <i>Thelenota ananas</i> ayant une activité antivirale (R = H ou SO ₃ ⁻)	36
Figure 21 : Schéma réactionnel de l'hydrolyse enzymatique avec libération de protons H ⁺ (pH > 6,5).....	45

Figure 22 : Bassin d'acclimatation et de maintien en vie des spécimens collectés de <i>C. frondosa</i>	53
Figure 23 : Organigramme de l'extraction séquentielle par solvants organiques des coproduits de <i>C. frondosa</i> (OI : Organes Internes ; BA : Bulbes Aquapharyngés, TA : Température Ambiante)	55
Figure 24 : Plateforme d'hydrolyse enzymatique au sein du laboratoire Pêche et Produits Marins de l'IRZC	60
Figure 25 : Organigramme de l'extraction assistée par hydrolyse enzymatique de coproduits de <i>C. frondosa</i> (OI : Organes Internes ; BA : Bulbes Aquapharyngés).....	61
Figure 26 : Organisation de la microplaque pour la titration du virus. TC : témoin cellule ; dilution : dilution de la suspension virale stock.....	66
Figure 27 : Organisation de la microplaque pour les évaluations d'activité antivirale et de cytotoxicité.....	70
Figure 28 : Spécimens de <i>C. frondosa</i> placés en situation de stress dans des aquariums remplis d'eau douce filtrée	94
Figure 29 : Organigramme synthétique de l'évaluation toxicologique de l'EMSR de <i>Cucumaria frondosa</i> sur le modèle <i>Crassostrea virginica</i>	102
Figure 30 : Schéma des installations des conditions d'expérimentation d'évaluation de l'EMSR en toxicologie aigüe sur le modèle <i>C. virginica</i> (P : Pompe péristaltique) ...	103
Figure 31 : schéma du principe réactionnel du dosage de la GST	109
Figure 32 : schéma du principe réactionnel du dosage du MDA.....	111
Figure 33 : schéma du principe réactionnel du dosage de la Catalase	113
Figure 34 : schéma du principe réactionnel du dosage de l'AchE.....	115
Figure 35 : Photographies d'observations microscopiques (objectif x 20) de branchies d'Ombles chevalier exposés à l'EMSR (photographie du haut) et du groupe contrôle (photographie du bas)	124
Figure 36 : Photographies d'observations microscopiques (objectif x 63) de branchies d'Ombles chevalier exposés à l'EMSR (photographie du haut) et du groupe contrôle (photographie du bas)	125
Figure 37 : Représentation graphique du suivi de la mortalité des truites arc-en-ciel exposées à différentes concentrations d'EMSR.....	129
Figure 38 : Détermination de la CL _{50-96h} de l'EMSR de <i>C. frondosa</i> sur la truite arc-en-ciel	129
Figure 39 : Dosage du taux de NH ₃ dans un bassin fermé en fonction du temps	132

Figure 40	Evaluation de l'indice hépto-somatique dans les conditions de l'expérience	134
Figure 41	Suivi des mortalités des spécimens de <i>C. virginica</i> exposées aux différentes concentrations d'EMSR de <i>C. frondosa</i>	136
Figure 42	Évaluation de l'effet de l'EMSR de <i>C. frondosa</i> sur la quantité de GST présente dans la glande digestive de <i>C. virginica</i> en fonction du temps et de la concentration en EMSR. Les résultats sont exprimés en $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ (U/mg de protéines).	138
Figure 43	Évaluation de l'effet de l'EMSR de <i>C. frondosa</i> sur la quantité de MDA présent dans la glande digestive de <i>C. virginica</i> en fonction du temps et de la concentration en EMSR. Les résultats sont exprimés en $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines.....	139
Figure 44	Évaluation de l'effet de l'EMSR de <i>C. frondosa</i> sur la quantité de catalase présente dans la glande digestive de <i>C. virginica</i> en fonction du temps et de la concentration en EMSR. Les résultats sont exprimés en $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ (U/mg de protéines).	141
Figure 45	Évaluation de l'effet de l'EMSR de <i>C. frondosa</i> sur la quantité d'AchE présente dans la glande digestive de <i>C. virginica</i> en fonction du temps et de la concentration en EMSR. Les résultats sont exprimés en $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ (U/mg de protéines).	143
Figure 46	Chromatogramme de l'EMSR de 2013	146
Figure 47	Chromatogrammes des lots 5 et 6 de l'EMSR de 2014, de l'EMSR de 2013 et du Frondoside A obtenus par LC Q-TOF HRMS en mode positif.....	153
Figure 48	Spectres de masse des pics à 11,18 ; 11,28 ; 11,33 et 11,22 min correspondant respectivement aux pics majoritaires de la fraction 5 des lots 5 et 6 de l'EMSR de 2014, de l'EMSR de 2013 et du Frondoside A obtenus par LC Q-TOF HRMS en mode positif.	154
Figure 49	Chromatogrammes des lots 5 et 6 de l'EMSR de 2014, de l'EMSR de 2013 et du Frondoside A obtenus par LC Q-TOF HRMS en mode négatif.....	156
Figure 50	Spectres de masse des pics à 11,21 ; 11,30 ; 11,31 et 11,74 min correspondant respectivement aux pics majoritaires de la fraction 5 des lots 5 et 6 de l'EMSR de 2014, de l'EMSR de 2013 et du Frondoside A obtenus par LC Q-TOF HRMS en mode négatif.	157
Figure 51	Représentation structurale de Frondoside A.....	217
Figure 52	Représentation structurale de Frondoside A ₁	217
Figure 53	Représentation structurale de Frondoside A ₂₋₁	218
Figure 54	Représentation structurale de Frondoside A ₂₋₂	218
Figure 55	Représentation structurale de Frondoside A ₂₋₃	219

Figure 56: Représentation structurale de Frondoside A ₂ -4	219
Figure 57: Représentation structurale de Frondoside A ₂ -6	220
Figure 58: Représentation structurale de Frondoside A ₂ -7	220
Figure 59: Représentation structurale de Frondoside A ₂ -8	221
Figure 60: Représentation structurale de Frondoside A ₇ -1	221
Figure 61: Représentation structurale de Frondoside A ₇ -2	222
Figure 62: Représentation structurale de Frondoside A ₇ -3	222
Figure 63: Représentation structurale de Frondoside A ₇ -4	223
Figure 64: Représentation structurale de Frondoside B	223
Figure 65: Représentation structurale de Isofrondoside C	224
Figure 66: Représentation structurale de Frondoside D	224
Figure 67: Représentation structurale de Frondoside E ₁	225
Figure 68: Représentation structurale de Frondoside F	225
Figure 69: Représentation structurale de Frondoside A ₆	226

Liste des tableaux

Tableau I : Classification taxonomique de la classe <i>Holothuroidea</i>	6
Tableau II : Classification taxonomique de <i>Cucumaria frondosa</i>	7
Tableau III : Période de frai de <i>Cucumaria frondosa</i> selon sa distribution géographique	10
Tableau IV: Synthèse des glycosides triterpéniques identifiés chez l'holothurie <i>C. frondosa</i>	21
Tableau V : Quantité estimée des captures d'holothuries dans le monde	25
Tableau VI : Récapitulatif des composés ou extraits actifs antimicrobiens isolés d'holothuries actuellement décrits	37
Tableau VII : Classification des protéases	44
Tableau VIII : paramètres d'hydrolyse utilisés pour la création de la librairie d'extraits	59
Tableau IX : Exemple de calcul du facteur (d) utilisé pour la détermination du titre infectieux de VHS-1 selon la méthode de Reed et Muench (1938).....	67
Tableau X : Librairie d'extraits de coproduits de <i>C. frondosa</i> : extraits par solvants, hydrolyses enzymatiques contrôlées et non traités	76
Tableau XI : Evaluation de l'activité anti-VHS-1 à une MOI de 0,001 DI ₅₀ /cellules sur cellules Vero des extraits de la librairie d'extraits de coproduits de <i>C. frondosa</i> , par la méthode viabilité cellulaire au rouge neutre après 72 h d'incubation	79
Tableau XII : Composition biochimique des hydrolysats lyophilisés de bulbe aquapharyngé et de l'extrait de bulbe aquapharyngé lyophilisé sans traitement ; n.d.: non déterminé.....	82
Tableau XIII : Evaluation de l'activité anti-VHS-1 à une MOI de 0,01 DI ₅₀ /cellules d'extraits de bulbe aquapharyngé hydrolysé par : Alcalase (1), Neutral Protéase (2), Papaïne (3) et Protamex (4) par la méthode d'évaluation au rouge neutre après 48, 72 et 96h d'incubation. L'acyclovir est utilisé comme drogue de référence (ACV).....	85
Tableau XIV : Evaluation de l'activité anti-VHS-1 à une MOI de 0,01 DI ₅₀ /cellules après 72h d'incubation d'extraits fractionnés de bulbe aquapharyngé hydrolysé par la papaïne par la méthode d'évaluation au rouge neutre. ACV est utilisé comme drogue de référence.	88
Tableau XV : Protocole d'éluion de la résine échangeuse d'ions HP-20 par gradient d'éthanol de l'eau filtrée et récupérée de l'aquarium contenant les spécimens de <i>C. frondosa</i> placés en situation de stress	95
Tableau XVI: Protocole d'évaporation des échantillons obtenus après éluion de la résine échangeuse d'ions à l'aide d'un évaporateur rotatif	95

Tableau XVII : Liste de contrôle des conditions et méthodes recommandées pour la détention et l'acclimatation de la truite arc-en-ciel	98
Tableau XVIII : Liste de contrôle des conditions et méthodes d'essais recommandées.	99
Tableau XIX : Concentration en standard de MDA recommandées pour l'établissement de la gamme étalon	111
Tableau XX : Programme d'élution utilisée lors des séparations chromatographiques	118
Tableau XXI : Programme d'élution des EMSR en LC Q-TOF HRMS	119
Tableau XXII : Bilan des évaluations réalisées sur les différents lots d'EMSR.....	122
Tableau XXIII : Résultats des nécropsies réalisées sur les spécimens d'Ombles chevalier exposés ou non à l'EMSR (10 mg/L)	123
Tableau XXIV : Evaluation de la dose létale d'EMSR sur les truites arc-en-ciel après 96 h d'exposition	127
Tableau XXV: Tableau récapitulatif de l'évaluation de la CL ₅₀ -96h de l'EMSR sur les truites arc-en-ciel	128
Tableau XXVI : Temps de rétention des fractions identifiées en séparation analytique (min)	147
Tableau XXVII : Spectres d'absorption des pics majoritaires représentatifs des 5 fractions sélectionnées (tr : temps de rétention).	148
Tableau XXVIII : Temps de rétention des fractions identifiées en séparation semi-préparative (min).....	149
Tableau XXIX : Evaluation cytotoxique des EMSR bruts de 2011, 2012, 2013 et 2014.....	150
Tableau XXX : Evaluation cytotoxique des fractions d'EMSR de 2012 et 2013 obtenues par séparation chromatographique en phase liquide.	151
Tableau XXXI : glycosides triterpéniques identifiés dans l'EMSR de <i>Cucumaria frondosa</i> en LC Q-TOF HRMS en mode négatif	159

Liste des abréviations

ACV : Acyclovir

CAT : Catalase

CC₅₀ : Concentration Cytotoxique à 50%

CE₅₀ : Concentration Effective à 50%

CL₅₀ : Concentration létale à 50%

DI : Dose Infectieuse

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DO : Densité Optique

n°EC : Enzyme Commission number

EMSR : Extrait de Métabolites Secondaires Relargués

GST : Glutathion-S-transférase

HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance

IRZC : Institut de Recherche sur les Zones Côtières

LBCM : Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines

MDA : Malondialdéhyde

MEM : Minimum Essential Media

MOI : Multiplicity Of Infection

MS : Mass Spectrometry

N.B. : Nouveau Brunswick

OD : oxygène dissous

PBS : Phosphate Buffered Saline

PFA : Phosphonoformic Acid

SVF : Sérum de Veau Foetal

ZPH : Zone de pêche du Homard

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

La raréfaction des ressources et l'institution de règles de protection des stocks halieutiques conduisent à « valoriser mieux tout en pêchant moins ». Ainsi, la notion de « déchets » devrait tendre à disparaître au profit de celle de « coproduits ». Au niveau mondial, la production de produits marins a été estimée à 150 millions de tonnes par an (capture et aquaculture confondus; FAO 2012), et 86% de cette production est destinée à l'alimentation humaine. Selon les espèces, la transformation des produits marins à destination humaine génère de 20 à 60% de perte par rapport au poids frais (Ferraro *et al.*, 2010). La majeure partie est utilisée pour une valorisation de masse (huile et farine) et ne génère que très peu de valeur. Les autres applications susceptibles d'apporter une meilleure valeur ajoutée (alimentation humaine, nutraceutique, cosmétique et pharmaceutique) ne représentent à l'heure actuelle que quelques pourcents de part de marché, mais offrent des perspectives de développement intéressantes compte tenu d'une demande croissante dans ces domaines.

Ce travail, soutenu par les Fonds d'Innovation Atlantique du Canada, a été réalisé en codirection entre le Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines (LBCM) de l'Université de Bretagne Sud et l'Institut de Recherche sur les Zones Côtières (IRZC) de l'Université de Moncton ; campus de Shippagan. Cette étude s'inscrit dans le cadre d'un projet sur la valorisation des coproduits marins au Nouveau Brunswick (Canada). En effet, au Nouveau Brunswick, 85 000 tonnes de produits marins sont transformés annuellement et la moitié de cette biomasse est peu ou pas valorisée. Parmi les espèces marines transformées, l'holothurie *Cucumaria frondosa* pêchée dans la baie de Fundy n'échappe pas à la règle. Près de la moitié de cette matière première est peu ou pas exploitée. Or, ces animaux possèdent une importante richesse en substances chimiques, y compris dans les coproduits.

En effet, les invertébrés marins possèdent une vaste diversité chimique due tout d'abord à l'importante biodiversité des espèces marines. Plus de 300 000 espèces de végétaux et d'animaux peuplent les océans (Donia et Hamann, 2003). Parmi ces espèces, une grande partie est représentée par des organismes lents ou peu mobiles, fixés à leur substrat. De plus; face aux pressions écologiques, ces organismes dépourvus de défenses physiques ont développé des systèmes de défenses basées sur la production de métabolites de classe chimique et aux fonctions biologiques variées. De nombreux travaux réalisés sur ces invertébrés font de ces métabolites actifs, d'excellents candidats pour le développement de substances naturelles à intérêt biologiques variés (pharmaceutique, nutraceutique, cosmétique).

L'étude présentée ici se divise en 2 parties :

Tout d'abord, nous avons étudié des voies de valorisation des coproduits majeurs du concombre de mer *Cucumaria frondosa*. Une librairie d'extraits a été constituée par extractions classiques par solvants ainsi que par voie enzymatique. En effet, la valorisation des coproduits de la pêche, par utilisation de l'hydrolyse enzymatique contrôlée, constitue une approche alternative d'un intérêt stratégique majeur pour réhabiliter ces biomasses et notamment la fraction protéique. Ainsi, à l'issue de cette hydrolyse, cette fraction peut se caractériser par de nouvelles propriétés fonctionnelles, nutritionnelles, biologiques et/ou aromatiques. Après avoir réalisé une synthèse bibliographique sur les propriétés biologiques associées aux molécules présentes chez les holothuries, une évaluation de l'activité antivirale de la librairie d'extraits a été réalisée sur un modèle d'étude posant un problème de santé publique majeur.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux mécanismes de défense de l'holothurie. Nous avons étudié la production de ces métabolites secondaires toxiques relargués en situation de stress dans le milieu naturel. Ces situations de stress ont été reproduites au laboratoire dans le but de collecter ces composés afin de les évaluer sur différents modèles écotoxicologiques. Ces molécules actives ont ensuite été identifiées par fractionnement bioguidé par l'utilisation de modèles cellulaires, témoignant de la toxicité, en parallèle à différents procédés analytiques.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Etude bibliographique

1 Présentation de *Cucumaria frondosa*

1.1 Généralités

Le terme Echinoderme provient du grec « *Echinodermata* » et signifie littéralement « peau épineuse » (Echino = épineux ; Derme = peau ; Lambert, 1997). Ces échinodermes regroupent les étoiles de mer (*Asteroidea*), les oursins (*Echinoidea*), les concombres de mer (*Holothuroidea*), les crinoïdes (*Crinoidea*) et les ophiures (*Ophiuroidea*) (Baker *et al.*, 1986). Dans le règne animal, les Echinodermes qui dénombrent environ 7000 espèces se distinguent par 3 caractéristiques principales : un système aquifère (système composé de canaux permettant la motricité, l'alimentation, la respiration et l'excrétion des déchets), une symétrie pentaradiée, et un squelette interne calcaire (Lambert, 1997).

Les holothuries, ou concombres de mer, représentent plus de 1100 espèces à travers le monde (Beirne *et al.*, 2001) et forment un groupe très ancien. En effet, les concombres de mer actuels sont le résultat de 400 millions d'années d'évolution (Lambert, 1997). Ils sont caractérisés par un corps mou contenant des muscles circulaires et longitudinaux, et un squelette fait de spicules de calcite. Cette classe est subdivisée en 3 sous-classes : *Apodacea*, *Aspidochirotacea*, *Dendrochirotacea* (Tableau I).

C. frondosa appartient à l'ordre des *Dendrochirotida* (Tableau II), identifiable par la présence d'une région antérieure à paroi fine (introvert : Figure 1) pouvant se rétracter, avec les tentacules arborescents, à l'intérieur du corps (l'ensemble introvert et tentacules est aussi nommé bulbe aquapharyngé), des podia bien développés, les gonades de chaque côté du mésentère dorsal et la présence d'arbres respiratoires (Martin, 2011).

Tableau I : Classification taxonomique de la classe *Holothuroidea* (Kerr et Kim, 2001)

Sous-classe	Ordre	Famille		
<i>Dendrochiroacea</i>	<i>Dendrochirotida</i>	<i>Ypsilothuriidae</i>		
		<i>Vaneyellidae</i>		
		<i>Rhopalodinidae</i>		
		<i>Psolidae</i>		
		<i>Paracucumidae</i>		
		<i>Placothuriidae</i>		
		<i>Heterothyonidae</i>		
		<i>Sclerodactylidae</i>		
		<i>Cucumariidae</i>		
		<i>Phyllophoridae</i>		
		<i>Apodacea</i>	<i>Molpadiida</i>	<i>Molpadiidae</i>
				<i>Caudinidae</i>
				<i>Gephyrothuriidae</i>
<i>Eupyrgidae</i>				
<i>Apodida</i>	<i>Synaptidae</i>			
	<i>Chirodotidae</i>			
<i>Aspidochiroacea</i>	<i>Aspidochirotida</i>	<i>Holothuriidae</i>		
		<i>Stichopodidae</i>		
		<i>Mesothuriidae</i>		
		<i>Synallactidae</i>		
		<i>Elasipodia</i>	<i>Deimatidae</i>	
			<i>Laetmogonidae</i>	
			<i>Elpidiidae</i>	
			<i>Psychropotidae</i>	
			<i>Pelagothuriidae</i>	

Tableau II : Classification taxonomique de *Cucumaria frondosa*

Règne	Animal
Embranchement	<i>Echinodermata</i>
Classe	<i>Holoturoidea</i>
Sous-classe	<i>Dendrochirotea</i>
Ordre	<i>Dendrochirotida</i>
Famille	<i>Cucumariidae</i>
Genre	<i>Cucumaria</i>
Espèce	<i>Cucumaria frondosa</i>

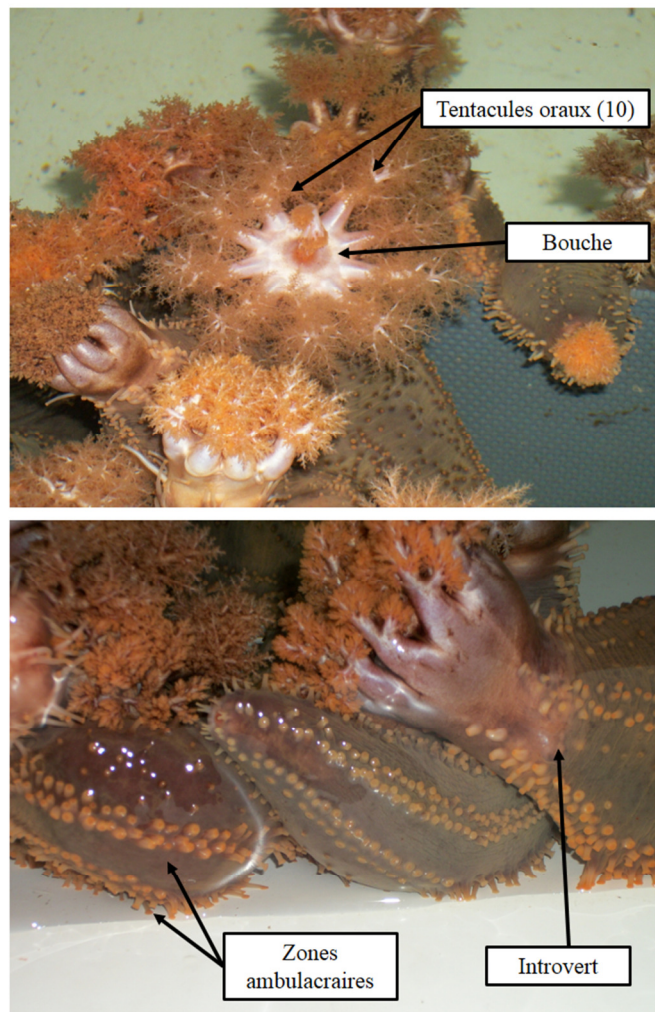


Figure 1 : Schéma général d'une holothurie, exemple de *Cucumaria frondosa*
 (Photographie L. Tripoteau, 2013)

L'holothurie *Cucumaria frondosa* est parmi les espèces de concombre de mer l'une des plus intensivement étudiée (Coady, 1973; Hamel et Mercier, 1996a, b et c; So *et al.*, 2010). L'espèce *C. frondosa* se retrouve dans l'Atlantique Nord, de l'Arctique au Cap Cod et de l'Arctique aux latitudes nord du Royaume Uni, de l'Islande, de la mer des Barents le long des côtes de Russie, en Scandinavie, dans la mer du Nord et le long des côtes du Groenland (Toral-Granda, 2008 ; Figure 2). *C. frondosa* est typiquement localisée entre 20 et 100 m, avec quelques variations selon les sites (Hamel et Mercier, 1996b). Par exemple, dans certaines régions, comme la baie Passamaquoddy au Nouveau Brunswick (N.B. Canada), *C. frondosa* est retrouvée souvent concentrée au niveau inférieur de la zone intertidale (estran). Elle est également connue pour être présente à 300 m de profondeur. De petits spécimens ont été récemment localisés à des profondeurs de 800 m le long du talus continental à Terre Neuve (FAO, 2008).

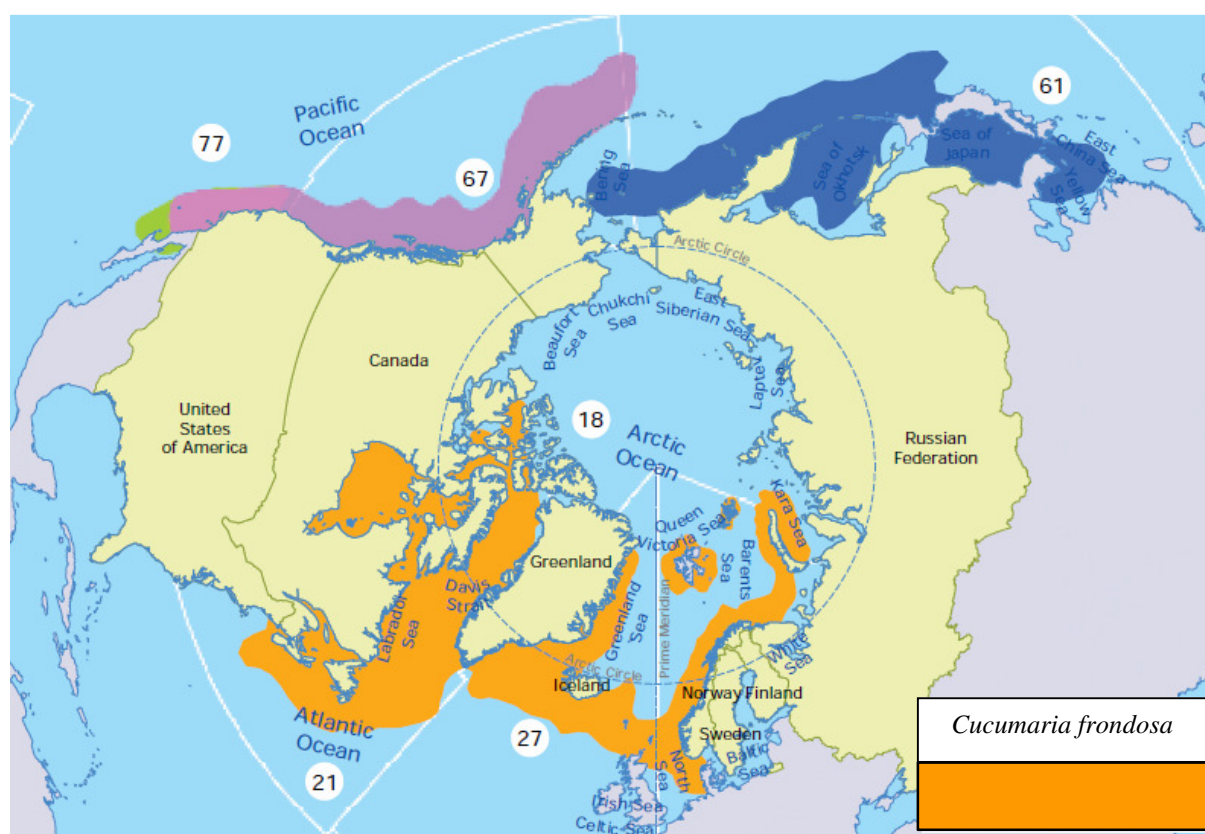


Figure 2 : Localisation géographique confirmée de l'espèce *Cucumaria frondosa*
(données FAO, 2008)

1.2 Biologie et reproduction

Ce concombre de mer de forme ovale est long de 25-30 cm et peut atteindre 50 cm de long une fois relaxé. Son poids moyen a été estimé aux alentours de 250 g pour les spécimens présents au Québec (Canada). Il a été remarqué une variation de poids allant de 540 à 605 g selon la profondeur le long de la côte du Québec. Il est établi un poids d'environ 360 g en Nouvelle Écosse (Canada). Le rapport de poids entre les sexes est de 1:1.

Le cycle reproductif de *C. frondosa* est caractérisé par une période de frai annuelle qui est généralement étroitement synchronisée avec la libération des gamètes (Hamel et Mercier, 1996b, 1996c). La saison de frai varie selon les populations et les régions. Le Tableau III résume les différentes périodes de frai connues selon leurs localisations géographiques en Amérique du Nord et en Europe.

La gamétogénèse chez *C. frondosa* est initiée lors de l'accroissement de la luminosité autour de janvier alors que la période de frai semble être provoquée par de nombreux facteurs incluant la marée et la concentration en phytoplancton et autres éléments nutritifs présents dans la colonne d'eau. Les mâles fraient les premiers et les femelles prennent le relai en relâchant leurs ovocytes dans la colonne d'eau chargée en spermatozoïdes. L'ovocyte rougeâtre de *C. frondosa* mesure de 0,5 à 0,8 mm de diamètre. Les œufs sont très riches en vitelline de réserve, et se développent pendant le cycle larvaire lécithotrophique (Figure 3) en restant dans le plancton durant 35-50 jours (Hamel et Mercier, 1995, 1996b et c, 1998b).

Tableau III : Période de frai de *Cucumaria frondosa* selon sa distribution géographique (FAO, 2008)

Localisation	Période de frai
Estuaire du St Laurent (Québec, Canada)	Mi- Juin (plus importante)
Baie de Fundy (NB, Canada)	Avril – Juin
Nouvelle – Écosse (Canada)	Fin Mars
Péninsule d’Avalon (Terre Neuve, Canada)	Février – Début Mai
St Pierre Bank	Début printemps – Juin
Péninsule d’Avalon (Terre Neuve, Canada)	Fin Mars – Fin Avril
Maine (USA)	Mi-Avril
Nouvelle Angleterre(USA)	Avril à Juin
Mer du Nord(Europe)	Février à Mars
Norvège (Nord)	Avril à Mai
Mer des Barents	Février – Avril

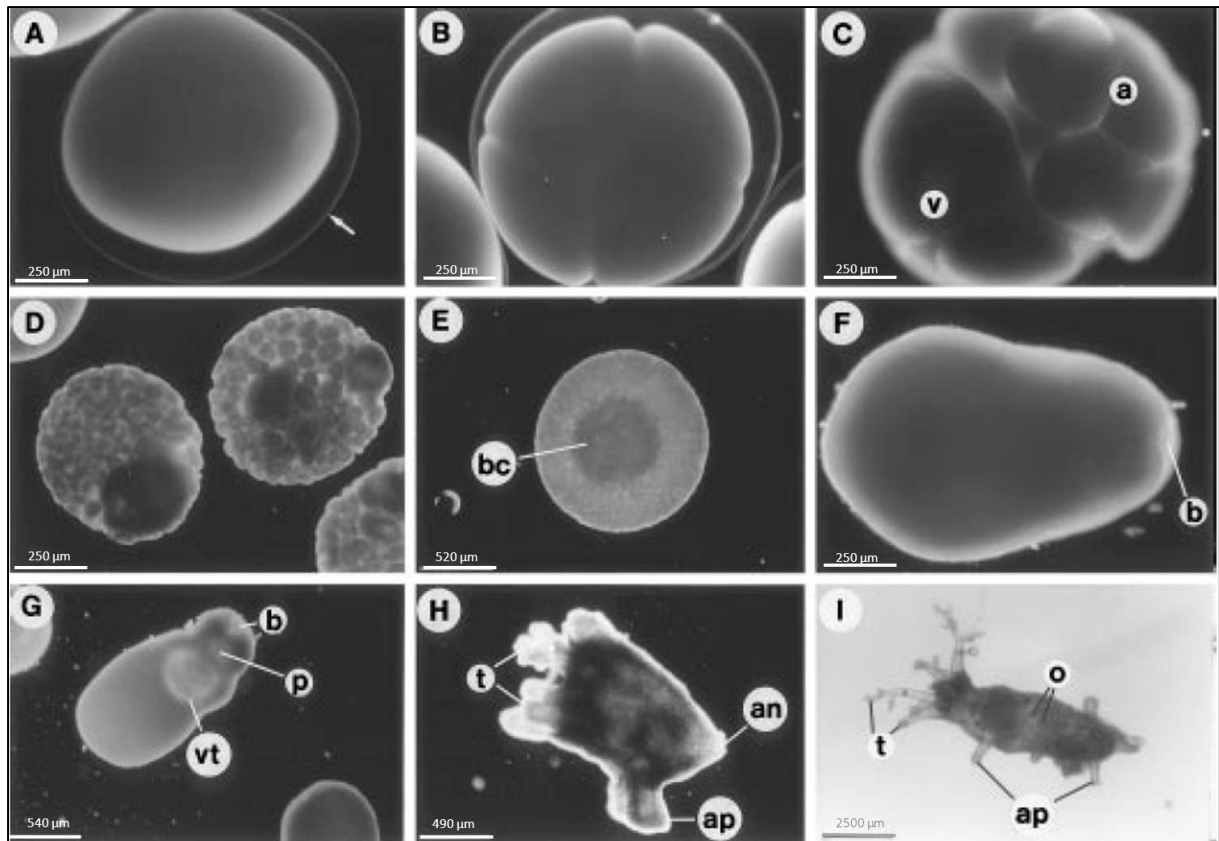


Figure 3 : Photographies des principales étapes du développement embryonnaire de *C. frondosa* (Hamel et Mercier, 1996b).

(A) Œuf fertilisé montrant la formation de la zone pellucide, (B) stade à 4 cellules, (C) embryon atteignant le stade à 32 cellules et division asymétrique des blastomères végétatif et animal, (D) persistance du clivage des blastomères après 30h de développement, (E) apparition du blastocœle (bc) visible à travers la fine couche de l'épithélium au stade blastula après compaction des blastomères, (F) gastrulation tardive après élongation montrant alors le blastopore (b), (G) vitellaria montrant le vestibule (vt), le pore podial (p) et le blastomère résiduel (b), (H) stade pentactula avec paire de podia ambulacraire (ap) montrant le pore anal (an) et les 5 tentacules (t) commençant à se ramifier, (I) jeune concombre de mer de 10 mm de long après 13 mois de croissance montrant les podia ambulacraires (ap), spicules (o), et tentacules (t).

1.3 Ecologie

C. frondosa colonise généralement les fonds rocheux ou pierreux. Il a été également observé occasionnellement sur des fonds sablonneux dans certaines régions. La couleur typique est marron clair ou marron foncé. Cependant, un petit pourcentage d'individus possède une pâle teinte orangée ou crème, avec ou sans pigmentation. D'autres individus peuvent être bruns avec de pâles taches parsemées le long du corps (Hamel et Mercier, 1998a et b; Grant, 2006).

C. frondosa utilise 10 tentacules ramifiés et distribués autour de la bouche (Figure 1) afin de capturer les particules en suspension dans la colonne d'eau, incluant le phytoplancton et de petits spécimens du zooplancton. Ces espèces sont principalement sessiles, bien qu'elles puissent déclencher une puissante réaction de fuite en se détachant du substrat et en contractant vigoureusement le corps en cas d'attaque par l'un de ses prédateurs tel que l'étoile de mer *Solaster endeca*. Cette dernière est largement retrouvée dans les zones de grandes concentrations de *C. frondosa*. Les autres prédateurs connus de *C. frondosa* sont le poisson loup du nord *Anarhichas lupus* et le morse *Odobenus rosmarus*. Il a également été récemment découvert que les larves et les juvéniles inférieurs à 1cm étaient la proie de certaines espèces comme l'oursin vert *Stonglyocentrotus droebachiensis* (Hamel et Mercier, 1996b).

1.4 Composition chimique

Les holothuries sont retrouvées dans toutes les mers du monde, des zones littorales aux abysses, et sont caractérisées par un déplacement lent. Du fait de leur longue évolution et leur grande diversité, les holothuries ont développé des molécules appartenant à des classes chimiques très variées. Cette partie a pour objet de présenter les différentes classes de composés décrits chez *Cucumaria frondosa* mais également chez les autres espèces d'holothuries afin de mettre en évidence la richesse chimique de ces espèces.

1.4.1 Composition générale

Les holothuries sont considérées comme d'excellents produits alimentaires d'un point de vue nutritionnel. En effet, elles possèdent une forte teneur en protéines (5-12 % du poids frais) avec une prédominance en acide glutamique, glycine, acide aspartique, leucine et lysine. Ces taux varient selon l'organe considéré. A titre d'exemple, le tégument du concombre de mer est riche en collagène insoluble possédant une forte teneur en acides aminés essentiels (Zhong *et al.*, 2007).

Cucumaria frondosa possède un faible taux de lipides (environ 3% du poids frais) majoritairement composé d'acide eicosapentaénoïque (EPA, C20:5n-3) et des acides gras saturés, monoinsaturés et polyinsaturés suivants : C15:0, C16:1, C17:1, C18:0, C18:1, C20:1, C20:3, C20:5, C22:1, et C22:6 (Zhong *et al.*, 2007). Ces teneurs varient selon l'organe considéré et selon la période de l'année, notamment pendant la période de reproduction (David et MacDonald, 2002)

La composition en minéraux est majoritairement représenté par la présence de Sodium (Na), Potassium (K), Magnésium (Mg) et de Calcium (Ca) (Trotter *et al.*, 1997).

1.4.2 Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments tetraterpéniques généralement polyinsaturés et hautement conjugués. Matsuno et Tsushima (1995) ont réalisé une étude détaillée de la composition en caroténoïdes chez 7 espèces d'holothuries appartenant aux ordres des *Aspirochirotida* et des *Dendrochirotida*. Cette étude a permis de reporter la présence de β -carotène, de β -échineone, de canthaxanthine, de phoenicoxanthine et d'astaxanthine au sein des deux ordres. Cette étude a cependant démontré des différences significatives entre les 2 ordres et mis en évidence 3 nouveaux caroténoïdes retrouvés au sein de l'ordre des *Dendrochirotida* (cucumariaxanthines A-C : Figure 4). Comme pour les échinides (oursins), les teneurs en caroténoïdes varient beaucoup selon l'organe considéré (viscères, gonades, tégument) (Kornprobst, 2005).

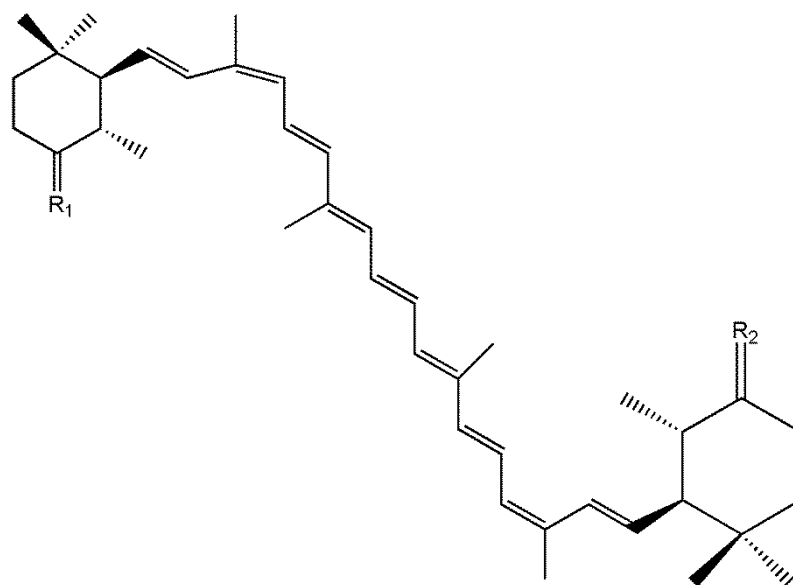


Figure 4 : structure des cucumariaxanthines

A (R1 = O ; R2 = O), B (R1 = O ; R2 = β -OH, α -H) et C (R1 = β -OH, α -H ; R2 = β -OH, α -H)

(Tsushima *et al.*, 1996)

1.4.3 Glycosphingolipides

Les glycosphingolipides sont des glycolipides possédant un alcool aminé sphingosine. Ils regroupent les cérébrosides, les gangliosides et les globosides. Les glycosphingolipides des organismes marins ont fait l'objet de nombreuses études, notamment depuis la découverte de telles molécules chez les éponges présentant des activités antitumorales (Kikuchi *et al.*, 2001). De nombreux cérébrosides et gangliosides ont été décrits chez plusieurs espèces d'holothuries : *Cucumaria echinata*, *Cucumaria japonica*, *Holothuria leucospilota*, *Holothuria pervicax*, *Pentacta australis* et *Stichopus japonicus* (Higuchi *et al.*, 1994a et b ; Muralidhar *et al.*, 2003 ; Figure 5). De nouveaux cérébrosides ont été récemment isolés de *Cucumaria frondosa*, leurs structures ont été élucidées (Xu *et al.*, 2013 ; Figure 6).

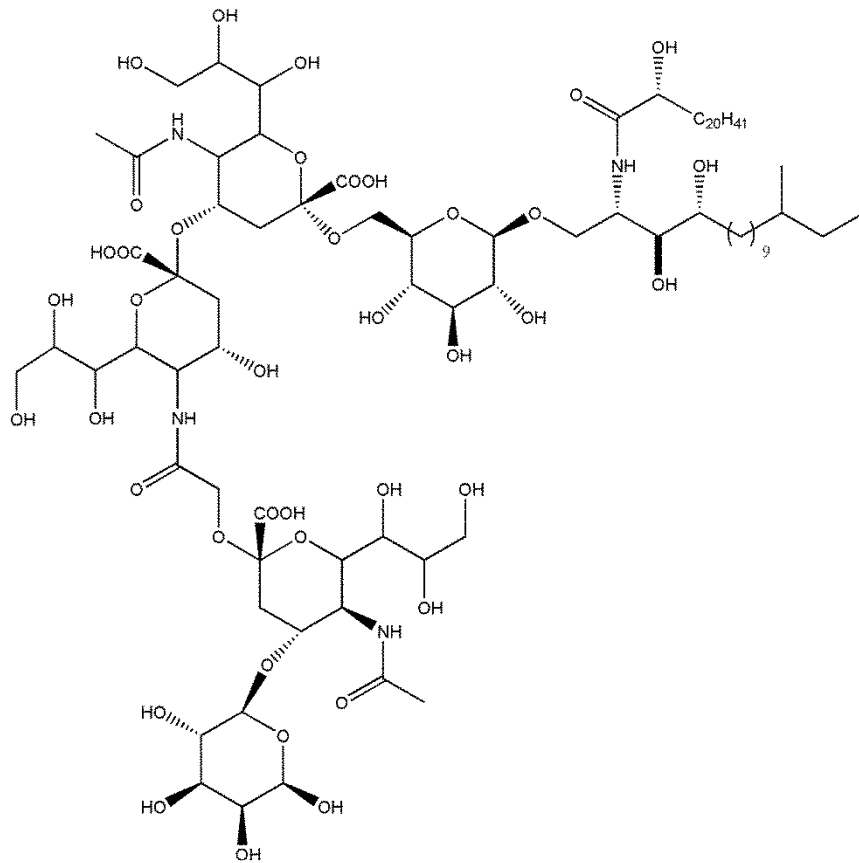


Figure 5 : Exemple de structure de sphingolipide d'holothurie ayant une activité neurogénique (HPG7 isolé de *Holothuria pervicax* ; Muralidhar *et al.*, 2003)

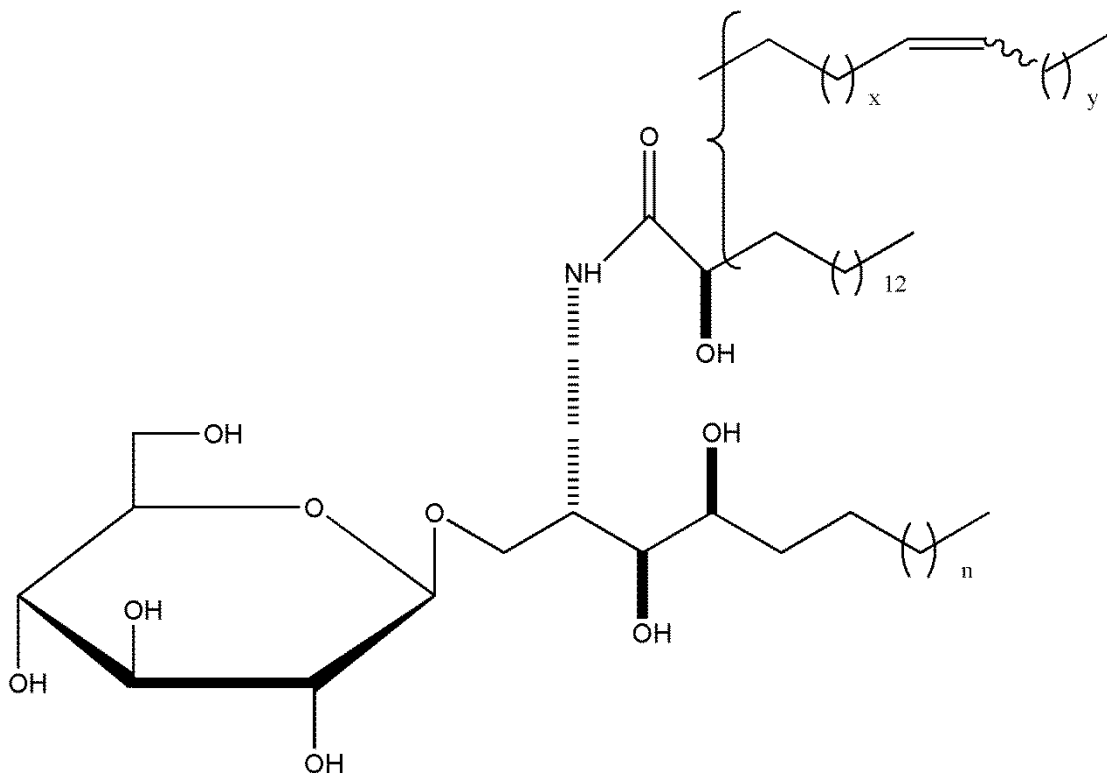


Figure 6 : Exemple de structure de cérébrosides isolés de *C. frondosa*. ($x+y = 17,18$; $n = 9,10$)(CFC-3 ; Xu *et al.*, 2013)

1.4.4 Oligosaccharides et polysaccharides sulfatés

Les oligosaccharides sont des oligomères formés de plusieurs unités osidiques. Par convention les oligosaccharides sont constitués d'un nombre d'oses compris entre 2 et 10 unités. Les polysaccharides contiennent un nombre d'oses supérieur à 10 unités. En 1992, Findlay *et al.* ont permis d'identifier le Frondécaside à partir du Frondoside B isolé de l'espèce *C. frondosa*. Le Frondoside B est un hétéroside (condensation d'un sucre à une partie non glucidique ou aglycone) dont la partie glucidique comporte 5 sucres et 2 groupes sulfates. Le Frondécaside possède la même structure que la partie glucidique du Frondoside B avec un groupement sulfate supplémentaire (Figure 7).

En 1993, les travaux de Silchenko *et al* (2007) ont conduit à l'identification des cucumariosides A₇₋₁, A₇₋₂, A₇₋₃ et A₇₋₄ et l'isofrondoside C chez *C. japonica*.

Des 1,3-fucanes (polymères de fucose) sulfatés en position 3 ou 4 (Figure 8) ont été isolés du tégument de l'holothurie *Ludwigothurea grisea* (Vieira *et al.*, 1991 ; Mourão et Pereira, 1999).

Les glycosaminoglycanes sont des polysaccharides sulfatés constitués par la répétition d'un diholoside de base (hexosamine et un autre ose). Des glycosaminoglycanes spécifiques ont été retrouvés exclusivement chez les holothuries, nommés chondroïtines sulfates fucosylés (FucCS). Ces FucCS (Figure 9) ont la particularité de posséder des groupements sulfates fucosylés, avec un degré de sulfatation variant selon les espèces (Pomin, 2014).

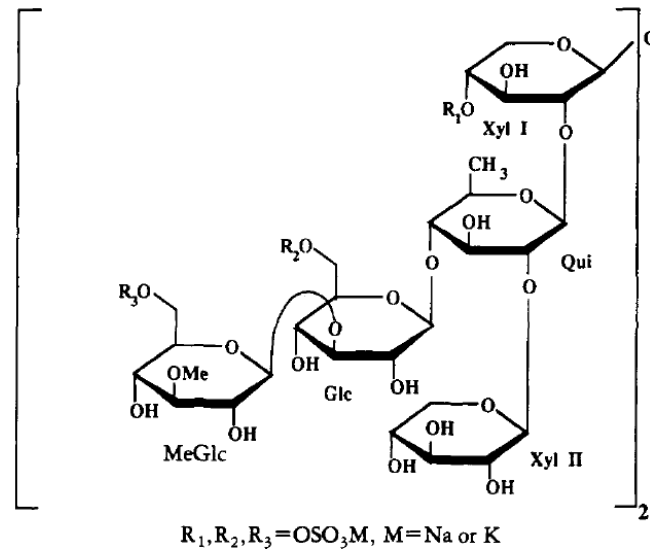


Figure 7 : Structure du frondécaside isolé de *C. frondosa* (Findlay et Yayli, 1992)

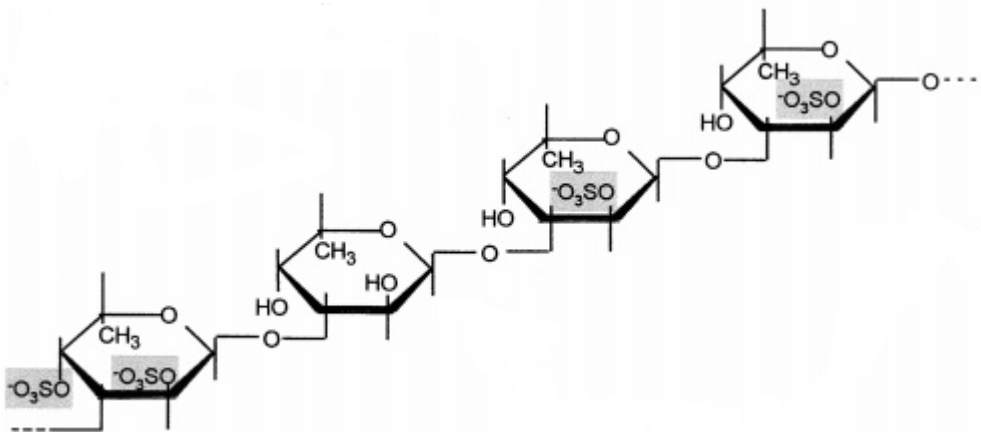


Figure 8 : Fucane sulfaté de *L. grisea* (Mourão et Pereira, 1999)

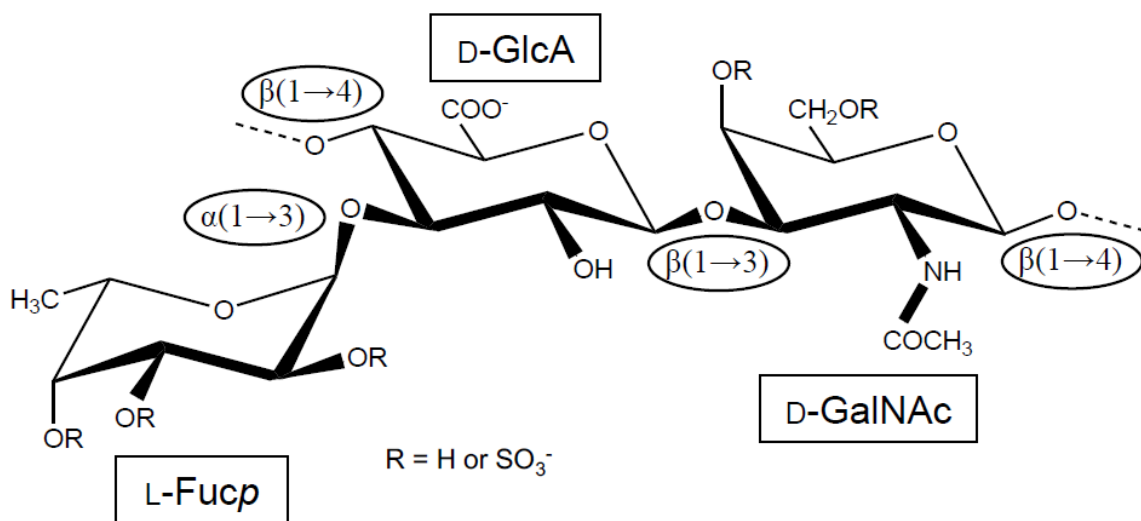


Figure 9 : Représentation de la structure d'une unité de FucCS (Pomin, 2014)

1.4.5 Stérols et triterpènes

Les stérols et les triterpènes sont des composés organiques dérivés des terpénoïdes. Les stérols sont des lipides caractérisés par un noyau polycyclique (stérane) dont un carbone porte un groupement hydroxyle. Les triterpènes sont des terpènes constitués de six unités isoprène et sont majoritairement polycycliques. Les fractions stéroliques des holothuries sont complexes et montrent la présence de stérols Δ^0 (Stanols), Δ^5 , Δ^7 et Δ^9 (11) ainsi que des 4α -méthylstérols et des triterpènes de la série du lanostane (triterpène dérivé du lanostérol) (Figure 10). Des études montrent que comme pour *Eupentacta fraudatrix*, les compositions en stérols de nombreuses espèces d'holothuries sont très complexes, le nombre de structures identifiées variant de 70 à 80 (Stonik *et al.*, 1999 ; Ponomarenko *et al.*, 2001).

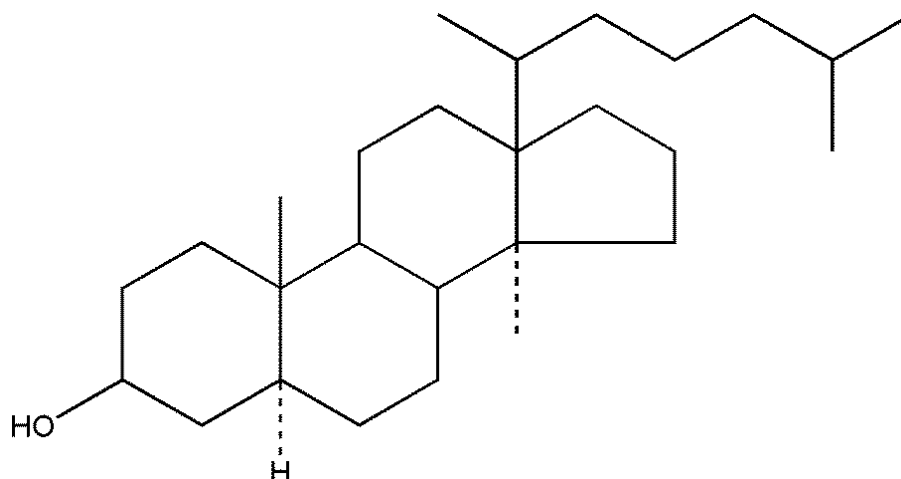


Figure 10 : Exemple de stérol retrouvé chez *Cucumaria sp.*
(14 α -Methyl-5 α -cholest-9(11)-en-3 β -ol, Ponomarenko *et al.*, 2001)

1.4.6 Glycosides triterpéniques

Il existe de nombreux points communs entre les métabolites des étoiles de mer (astérides) et ceux des holothuries, cependant la différence fondamentale entre ces 2 classes d'Echinodermes se retrouve au niveau des saponines. Les saponines (du latin *sapo*) dérivent leur nom de leur capacité à former des mousses stables en solution aqueuse à la manière des savons. Les saponines sont des hétérosides, elles résultent de la combinaison d'un sucre avec une partie non glucidique (aglycone) qui peut être un stéroïde, un alcaloïde ou un triterpène. Chez les astérides, les aglycones sont souvent des stérols. Pour les holothuries, les aglycones sont des triterpènes de la série du lanostane et lorsque la saponine est sulfatée, les groupes sulfates ne se trouvent que sur la partie osidique. Les aglycones triterpéniques (Figure 11 : exemple d'aglycone) ne présentent que peu de variations structurales avec cependant la présence de fonctions cétones (présence d'une fonction ester dans un cycle) pour certains et possèdent le squelette carboné de l'holostane.

La partie glycosidique est toujours reliée à l'hydroxyle en 3 β , le nombre d'osides varie de 2 à 6 incluant le xylose, le quinovose, le glucose et le 3-O-méthylglucose et parfois le 3-O-méthylxylose, le 3-O-méthylquinovose, l'acide 3-O-méthylglucuronique et le 6-O-acétylglucose mais est en général égal à 4 ou à 5. Le nombre de groupe sulfate varie de 0 à 3 (Kalinin *et al.*, 1996 ; Yayli et Findlay, 1999 ; Kornprobst, 2005).

Plusieurs glycosides triterpéniques ont été isolés de *Cucumaria frondosa* et nommés Frondosides en accord avec le nom de l'espèce (Figure 12). Cette classe chimique de molécules est très étudiée chez les holothuries, un travail de synthèse des glycosides triterpéniques de *Cucumaria frondosa* déjà publiés dans la littérature a été réalisé et présenté dans le Tableau IV. Ce tableau a permis de mettre en évidence la présence d'une grande diversité de saponines au sein de cette espèce.

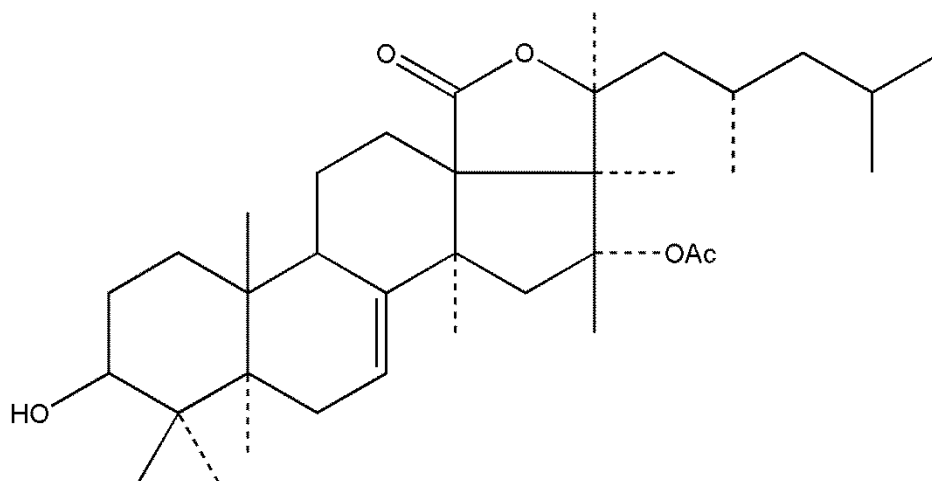
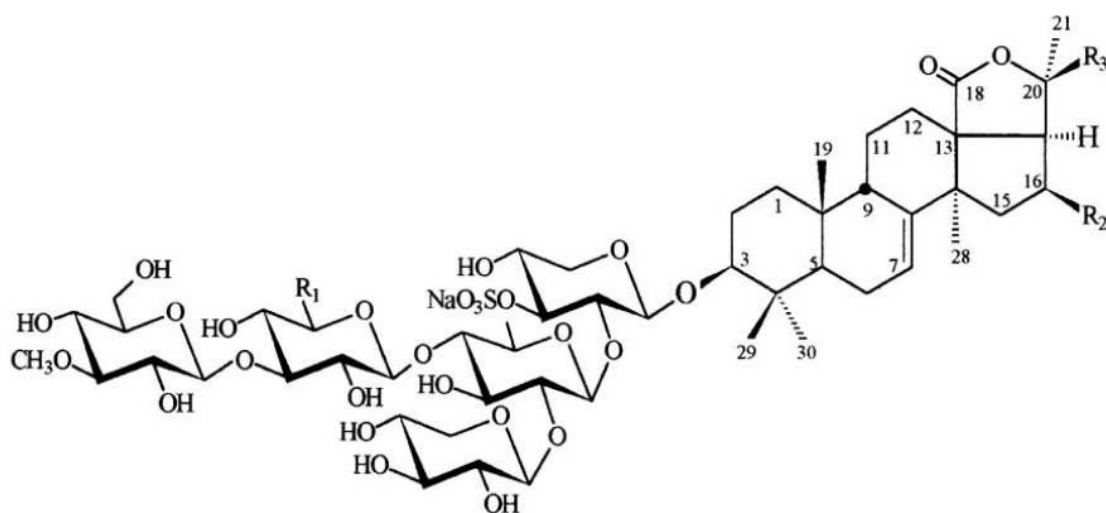


Figure 11 : Exemple d'aglycone de *C. frondosa* (Findlay *et al.*, 1984)



Frondoside D	1	$R_1=H, R_2=OAc, R_3=$	
Frondoside A	2	$R_1=H, R_2=OAc, R_3=$	
Frondoside B	3	$R_1=CH_2OSO_3Na, R_2=H, R_3=$	
Frondoside A1	4	$R_1=H, R_2=OAc, R_3=$	

Figure 12 : Exemples d'holothurines (saponines) de type I de *C. frondosa* (1: Frondoside D; 2: Frondoside A; 3: Frondoside B; 4: Frondoside A₁) (Avilov *et al.*, 1993 ; Findlay *et al.*, 1992 ; Yayli et Findlay, 1999)

Tableau IV: Synthèse des glycosides triterpéniques identifiés chez l'holothurie *C. frondosa*

Nom molécule	Formule empirique	[M-H] ⁻ m/z	Références
Frondoside A	C ₆₀ H ₉₆ O ₂₉ S	1311,5679	Girard <i>et al.</i> , 1990
Frondoside A ₁	C ₅₅ H ₈₈ O ₂₅ S	1179,5257	Avilov <i>et al.</i> , 1993
Frondoside A ₂ -1	C ₅₉ H ₉₂ O ₂₉ S	1295,5366	Silchenko <i>et al.</i> , 2005a
Frondoside A ₂ -2	C ₅₉ H ₉₂ O ₂₉ S	1295,5366	Silchenko <i>et al.</i> , 2005a
Frondoside A ₂ -3	C ₅₉ H ₉₄ O ₂₉ S	1297,5523	Silchenko <i>et al.</i> , 2005a
Frondoside A ₂ -4	C ₅₉ H ₉₄ O ₂₈ S	1281,5574	Silchenko <i>et al.</i> , 2005b
Frondoside A ₂ -6	C ₅₉ H ₉₂ O ₂₉ S	1295,5366	Silchenko <i>et al.</i> , 2005a
Frondoside A ₂ -7	C ₆₁ H ₁₀₀ O ₂₉ S	1327,5992	Silchenko <i>et al.</i> , 2005b
Frondoside A ₂ -8	C ₆₁ H ₁₀₀ O ₂₉ S	1327,5992	Silchenko <i>et al.</i> , 2005b
Frondoside A ₇ -1	C ₅₉ H ₉₂ O ₃₅ S ₃	1455,4503	Silchenko <i>et al.</i> , 2007

Nom molécule	Formule empirique	[M-H] ⁻ m/z	Références
Frondoside A ₇ -2	C ₅₉ H ₉₄ O ₃₄ S ₃	1441,4710	Silchenko <i>et al.</i> , 2007
Frondoside A ₇ -3	C ₅₉ H ₉₈ O ₃₄ S ₃	1445,5023	Silchenko <i>et al.</i> , 2007
Frondoside A ₇ -4	C ₅₉ H ₉₈ O ₃₄ S ₃	1445,5023	Silchenko <i>et al.</i> , 2007
Frondoside B	C ₅₉ H ₉₄ O ₃₁ S ₂	1361,5142	Findlay <i>et al.</i> , 1992
Isofrondoside C	C ₆₁ H ₁₀₀ O ₃₅ S ₃	1487,5129	Silchenko <i>et al.</i> , 2007
Frondoside C désulfaté	C ₆₁ H ₁₀₀ O ₂₆	1247,6424	Avilov <i>et al.</i> , 1998
Frondoside D	C ₆₀ H ₉₆ O ₃₀ S	1327,5628	Yayli <i>et al.</i> , 1999
Frondoside E ₁ /E ₂ (idem Cucumarioside A ₂ -2 de <i>C. japonica</i>)	C ₅₉ H ₉₂ O ₂₉ S	1295,5366	Yayli <i>et al.</i> 2001
Frondoside F	ND	1584,0000	Yayli <i>et al.</i> 2001
Frondoside A ₆	C ₆₀ H ₉₆ O ₂₉ S	1312,5757	Wang <i>et al.</i> , 2014
24-dehydro Frondoside A ₆	C ₆₀ H ₉₄ O ₂₉ S	1310,5601	Wang <i>et al.</i> , 2014

1.4.7 Dérivés azotés originaux de *Cucumaria frondosa*

Une étude de Yayli et Findlay (1994) a permis d'isoler des bases puriques (molécules azotées hétérocycliques) et des dinucléotides (association d'une base azotée à un pentose et à des groupements phosphates) inhabituels au sein de l'espèce *Cucumaria frondosa* (Figures 13 et 14). Cependant, l'origine et la fonction éventuelle pour l'animal de ces dérivés azotés restent indéterminées (Kornprobst, 2010).

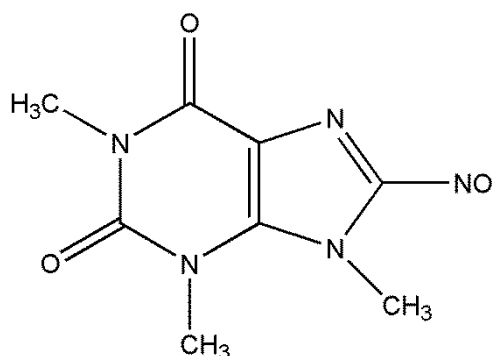


Figure 13 : Exemple de dérivés azotés atypiques de *C. frondosa*
(1,3,9-triméthyl-8-nitrosoisoxanthine; Yayli et Findlay, 1994)

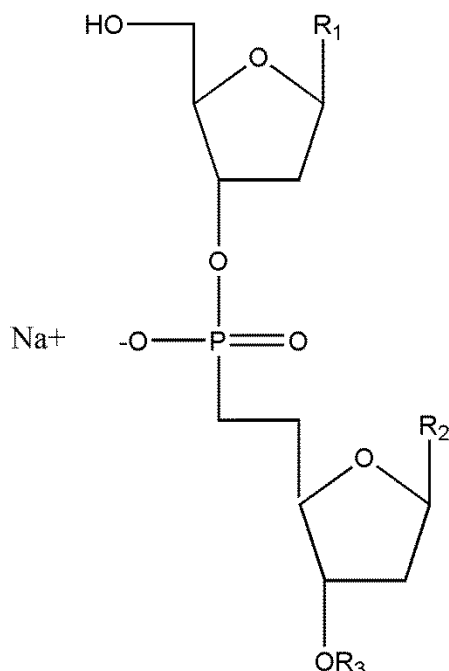


Figure 14 : Exemple de dérivés azotés atypiques de *C. frondosa*
(R_1 = thymine, R_2 = adénine, R_3 = PO_3Na_2 ; Yayli et Findlay, 1994)

1.4.8 Lectines

Les lectines sont des protéines qui se lient spécifiquement et de façon réversible à des glucides. Bulgakov *et al.* (2007) ont décrit une lectine de 44 kDa possédant 2 sous unités identiques à partir du liquide cœlomique de *C. japonica*. Deux lectines de 400 kDa (SPL-I ; Figure 15) et de 68 kDa (SPL-II) ont été isolé du liquide cœlomique de l'holothurie *Apostichopus japonicus* (Matsui *et al.*, 1994).

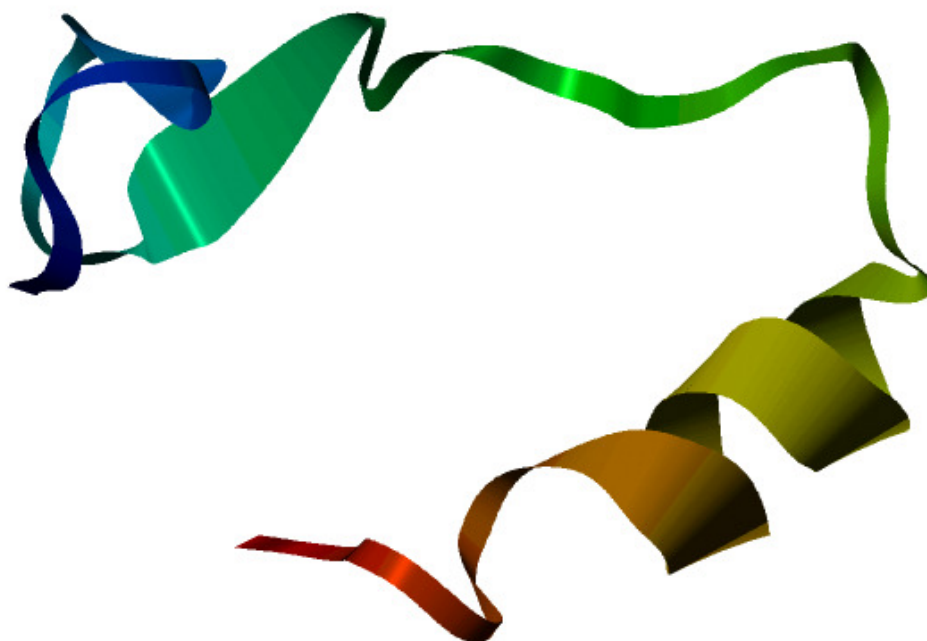


Figure 15 : Représentation 3D de la structure de SPL-I isolée de *C. japonica* (sbkb.org)

1.4.9 Peptides

La présence de peptides a été notamment décrite chez les holothuries afin de mettre en évidence leur caractère antimicrobien. Ces peptides ont été regroupés sous le terme de peptides antimicrobiens (PAM : Peptides Anti Microbiens). Ces PAM sont des molécules de nature protéique à faible poids moléculaire (Schilaci *et al.*, 2013). Haug *et al* (2002) ont décrit un peptide isolé du surnageant d'un homogénat d'œufs de *C. frondosa*. Un peptide de 20 acides aminés a été isolé de *C. echinata* correspondant à la séquence C-terminale dérivé d'une lectine impliquée dans l'hémolyse (Hatekayama *et al.*, 2004).

1.5 La ressource et la pêche d'holothuries

1.5.1 Situation de la pêche au niveau mondial

Au niveau mondial, les pêches d'holothuries sont principalement ciblées sur une soixantaine d'espèces sur plus de 1100 connues à travers 70 pays (FAO, 2012) et commercialisées depuis plusieurs centaines d'années. L'utilisation de ces holothuries dans l'alimentation humaine a débuté en Chine depuis 1000 ans. Face à la demande grandissante des marchés asiatiques, les holothuries ont commencé à être surexploitées à partir du 18^{ème} et du 19^{ème} siècle. En dépit de la forte proportion de ces animaux parmi les espèces benthiques, peu de documentation existe. Récemment, l'intérêt pour l'obtention de ces données a fortement augmenté pour différentes raisons :

- Une demande grandissante pour ces produits
- L'épuisement de certaines espèces
- L'extension des zones de pêches
- Le développement de la mariculture
- Un intérêt grandissant sur les ressources biologiques et leur gestion.

Les 5 zones de pêche majoritaires d'holothuries au niveau mondial sont : Papouasie Nouvelle Guinée (Océanie), Philippines (Asie); Seychelles (Afrique et Océan Indien), les Iles Galápagos (Amérique Latine et Caraïbes) et la pêche de *Cucumaria frondosa* centré sur le Canada (Zones tempérés de l'hémisphère Nord). Au travers de ces 5 zones, le nombre d'espèces exploitées varient beaucoup, avec le plus grand nombre retrouvé en Asie (52 espèces) et dans le Pacifique (36 espèces), dû majoritairement à la grande diversité d'espèces de ces zones. Ces pêches dans les zones tropicales indopacifiques sont donc majoritairement multi-spécifiques et généralement mono-spécifiques dans les zones tempérées (FAO, 2004). L'estimation de la quantité d'holothuries pêchées par région est présentée dans le Tableau V.

Tableau V : Quantité estimée des captures d'holothuries dans le monde (FAO, 2008)

Zone géographique	Quantité récoltée (en t / an)
Asie et région Pacifique	20 000 à 40 000
Zones tempérées	9 000
Afrique et Océan Indien	2000 – 2500
Amérique Latine et Caraïbes	< 1000

Les données sur les pêches d'holothuries dans les zones indopacifiques sont rares et celles des zones tempérées de l'hémisphère nord sont principalement disponibles pour 4 pays (Canada, USA, Russie et Islande) où la pêche commerciale est centrée sur 4 espèces (*Cucumaria frondosa*, *C. japonica*, *Parastichopus californicus* et *P. parvimensis*). Les 2 espèces de *Parastichopus* sont surtout récoltées par plongée en bouteille avec des quantités similaires aux régions tropicales indopacifiques. La pêche des espèces de *Cucumaria* est beaucoup plus industrialisée avec l'utilisation de chalutiers spécialisés et à la présence d'usines de transformation installées sur le littoral. En comparaison, la pêche des espèces de *Parastichopus* date du début des années 70, alors que la majorité des pêches des espèces *Cucumaria* sont récentes et encore au stade de pêches exploratoires, essentiellement au Canada et aux Etats Unis. Les débarquements de la zone atlantique sont concentrés sur *Cucumaria frondosa* et beaucoup plus importants que la zone pacifique concentrées sur *Parastichopus californicus*. En effet, entre 2003 et 2005, la quantité de *Parastichopus californicus* débarquée était de 600-700 t par an pour la côte pacifique des USA (Californie, Oregon, Washington, Alaska) et de manière identique pour celle du Canada (Colombie Britannique), tandis que la moyenne était de 5000 t par an pour la côte Est des USA (Maine) concernant les débarquements de *C. frondosa* et d'environ 2000 t par an pour la partie Atlantique canadienne comprenant Terre-Neuve et Labrador et les Maritimes (Nouveau-Brunswick, Nouvelle-Ecosse et l'Ile du Prince-Edouard) (FAO, 2010).

1.5.2 Situation de la pêche au Nouveau-Brunswick

Entre 1999 et 2006 au Nouveau-Brunswick, deux titulaires de permis de pêche ont été autorisés à pratiquer une pêche expérimentale de l'Holothurie de stade I dans la Zone de Pêche du Homard (ZPH 36) dans le Sud-Ouest du Nouveau-Brunswick (SONB) dans le but d'évaluer leur matériel et le potentiel commercial de l'espèce. Chaque année, la pêche expérimentale est pratiquée de janvier à mars. Depuis 1999, chaque titulaire de permis doit présenter un document de vérification à quai et un journal scientifique du Ministère des Pêches et des Océans (MPO) dans lequel est consigné l'emplacement des traits, les prises, les profondeurs et la hauteur des vagues.

En 2006, 5 zones ont été créées autour du secteur où était principalement déployé l'effort de pêche (Figure 16). Une de ces zones, celle du port de St. Andrews, a été interdite à la pêche en vue d'en faire un secteur de recherche possible. Un Total Autorisé de Captures (TAC) a été assigné à chacune des quatre autres zones pour une pêche expérimentale pendant la saison de 2006 (1010 t) dans Les Passages et 120 t dans chacune des trois autres zones: rivière Magaguadavic, sud de l'île Deer et fond de la baie Passamaquoddy, en fonction des débarquements annuels moyens des cinq années précédentes.

Avant la saison de pêche de 2007, le MPO a autorisé le passage du stade expérimental I au stade exploratoire II pour la pêche de l'Holothurie dans le SONB afin de connaître la durabilité de cette pêche et ses effets sur les écosystèmes. Les conditions de surveillance et de collecte de données scientifiques établies pour le stade I ont été maintenues en 2007-2008, de même que les TAC et les zones de pêche.

Depuis 1999, plus de 80 % des prises proviennent d'une seule zone de pêche appelée « Les Passages », où a été déployé 90 % de l'effort de pêche. Les débarquements ont augmenté jusqu'à atteindre un maximum d'environ 1 600 t en 2005. Depuis, ils se sont maintenus à environ 1 100 t, ce qui pourrait être attribuable aux zones de pêche définies et à l'établissement du TAC global de 1 370 t avant la saison de pêche de 2006. L'effort a culminé en 2005 pour se stabiliser à des taux inférieurs entre 2006 et 2008. Dans le fond de la baie Passamaquoddy, au sud de l'île Deer et dans la rivière Magaguadavic, l'effort a été très faible (8,87 et 19 h respectivement) en raison de la couverture de glace et des mauvaises conditions météorologiques (Rowe *et al.*, 2009).



Figure 16 : Emplacement des zones de pêche de l’Holothurie dans le SONB (Rowe *et al.*, 2009)

1.6 Marchés et produits

1.6.1 Alimentation humaine

Le produit issu du concombre de mer le plus commercialisé est la peau séchée sous le nom « bêche de mer, trévang ou hai-san » destiné à l’alimentation humaine et considéré comme un mets de grande qualité. Ces produits sont majoritairement destinés au marché asiatique. Une large majorité d’espèces sont récoltées pour le marché du trévang (ex : *Actinopyga mauritania*, *Holothuria scabra*, *Thelenota ananas*) et d’autres espèces sont également consommées cuites, marinées et crues (ex : *Apostichopus japonicus*, *Parastichopus californicus*, *Cucumaria frondosa*) (FAO, 2012).

Les produits principaux provenant de *C. frondosa* dans l'état du Maine (USA) sont : (i) les muscles subissant un conditionnement sous vide puis congelés et (ii) la peau cuite puis séchée (Figure 17). La peau cuite à la vapeur pendant 60 min avec une concentration en chlorure de sodium (NaCl) de 3% est ensuite séchée à température ambiante dans un premier temps puis à 60°C dans un second temps. (Hamel et Mercier, 2008a).

Au Nouveau Brunswick, les animaux sont pesés puis soumis à une chaleur de 40°C afin de relaxer les corps. Ils sont ensuite coupés dans le sens de la longueur et maintenus par un clip sur une planche à découper. Un racloir muni d'une lame en acier inoxydable est placé sur le haut du concombre de mer et descend de haut en bas afin de séparer les muscles de la peau. Les muscles sont alors emballés sous vide et congelés. Les peaux sont cuites durant 1 à 2 heures, puis séchées dans un séchoir à 60°C. À l'Est du Canada et plus particulièrement à Terre Neuve, plusieurs nouveaux produits issus de *C. frondosa* ont été testés incluant : (i) la peau cuite, salée et séchée avec la viande attachée ; (ii) les muscles et la peau (congelés frais) ; (iii) le bulbe aquapharyngé (autrement nommé fleur), les viscères, les gonades et le tronc respiratoire (congelés frais et conditionnés séparément) ; et, (iv) la peau et les muscles congelés frais et séparés. L'industrie teste ces produits depuis quelques années afin de s'adapter au marché asiatique (Hamel et Mercier, 2008a).

Les organes internes, le liquide cœlomique et le bulbe aquapharyngé restent considérés comme des sous-produits ou coproduits et représentent une masse de matière première peu ou pas valorisés générant des quantités importantes de rejets pour les industries de transformation. Au nouveau Brunswick, ces coproduits représentent environ 50% de la masse totale de la matière première. Comme, il a été vu précédemment, les concombres de mer possèdent une composition nutritionnelle intéressante due à une forte teneur en protéines et une grande chimiodiversité. Ces coproduits doivent donc être considérés comme un gisement de biomasse important et nécessitent d'être valorisés.



Figure 17 : Spécimens vivants transportés vers la zone d'éviscération (A) ; peaux fraîchement cuites placées sur des grilles pour le séchage (B) ; muscles frais ou viande (C) ; viande conditionnée sous vide (D) ; peaux sèches et bulbes aquapharyngés secs (E) ; peaux sèches en cours de conditionnement (F) (Photographie : FAO, 2008).

1.6.2 Médecine traditionnelle et produits nutraceutiques

Les concombres de mer sont utilisés depuis des centaines d'années en Chine comme aliments mais aussi en médecine traditionnelle (Fredalina *et al.*, 1999). Dans certains pays, des produits cosmétiques sous forme de crème, shampoing ou dentifrice (FAO, 2008), et des produits nutraceutiques sont commercialisés comme l'huile de concombre de mer (Baine et Choo, 1999).

Ces propriétés médicinales ont été confirmées par les travaux sur l'huile rouge en Malaisie (ou « Gamat » qui signifie en Malais tout produit issu du concombre de mer ayant des propriétés médicinales). Cette huile issue des viscères et des membranes de *C. frondosa* a été utilisée comme adjuvant, dans des études sur l'arthrite chez le rat, afin de tester ses propriétés anti-inflammatoires (Colin, 2002). Il est connu que *C. frondosa* contient des composés pouvant inhiber certaines prostaglandines impliquées dans la douleur et l'arthrite. Ces animaux sont également riches en chondroïtine, mucopolysaccharides, mais aussi en plusieurs vitamines et minéraux, nutriments nécessaires au bon fonctionnement de l'os et du cartilage chez l'homme.

En Amérique du Nord, les coproduits de *C. frondosa* sont fabriqués comme complément alimentaire sous forme de chondroïtine (Nutrisea®), vendus comme traitement contre l'arthrite chez l'homme (ArthriSea® et SeaCuMAX®) et chez les animaux (SeaJerky®) (Janakiram *et al.*, 2010). Ce coproduit est également commercialisé comme compost dans le Maine. Il a été noté un accroissement de la demande de ces produits en Russie afin de produire à la fois dans l'alimentaire et dans le cosmétique (FAO, 2008). Les données concernant ces produits restent, cependant, très rares.

2 Activités antimicrobiennes des métabolites et extraits d'holothuries

2.1 Généralités

Les organismes marins représentent une source extraordinaire de métabolites possédant de multiples activités biologiques. Ceci est dû à l'immense diversité des espèces peuplant les océans (plus de 300 000 espèces d'animaux et de végétaux décrites), mais aussi par le développement de systèmes de défense pour faire face à la prédation, à la compétition pour leurs substrats et aux pressions écologiques (Donia et Hamann, 2003 ; Kalinin *et al.*, 2008 ; Mayer *et al.*, 2009 ; Yasuhara-Bell et Lu, 2010 ; Bordbar *et al.*, 2011 ; de Jesus *et al.*, 2013 ; Hayes, 2013). Parmi ces molécules, il est important de mentionner la notion de métabolites primaires et secondaires. Les métabolites primaires (acides aminés, vitamines, acides gras, sucres) sont les composés structurels des cellules ou des organes et interviennent dans les grandes fonctions vitales de l'organisme. Les métabolites secondaires sont dérivés des métabolites primaires. Ces substances, dites allélopathiques, ne sont pas essentielles aux mécanismes vitaux mais assurent des fonctions de communication (signaux ou médiateurs) et de protection (Hossaert-McKey *et al.*, 2012). Dans le monde marin, les métabolites secondaires de protection passent par la simple émission de composés répulsifs dans le but de dissuader l'attaque (aposématisme) jusqu'à la production de toxines extrêmement délétères pour le prédateur.

Face à l'émergence de maladies infectieuses et au développement de phénomènes de résistance aux médicaments, les molécules marines issues des organismes marins et plus particulièrement des invertébrés marins représentent un réel enjeu de santé mais aussi un enjeu économique par le développement de nouveaux médicaments. A titre d'exemples, le Ziconotide isolé d'un cône (mollusque gastéropode) est préconisé lors de douleurs intenses, le Yondelis™ et l'Aplidin™ isolés d'une ascidie sont utilisés respectivement dans le traitement des cancers de l'ovaire et comme agent antitumoral (Pettit *et al.*, 2000 ; Haefner, 2003).

A la base de leur système de défense, les holothuries peuvent entre autre émettre des molécules fortement toxiques en permanence et/ou en situation de stress (Caulier *et al.*, 2011 ; Van Dyck *et al.*, 2011). Un système de défense retrouvé chez les genres *Holothuria* et *Mulleria* constitué par les tubes de Cuvier (organes de défense) consiste à projeter sur son assaillant des filaments blanchâtres fortement adhésifs dans le but de l'engluer et par conséquent de le dissuader à attaquer (Kornprobst, 2005).

Nigrelli (1952) et Yamanouchi (1955) ont décrit le caractère toxique de substances issues des téguments d'holothuries en se basant sur d'anciens rapports. A Guam et dans d'autres régions Indopacifiques, les indigènes se servaient du jus de certaines espèces d'holothuries qu'ils versaient dans certains lagons coralliens afin de faciliter la pêche des poissons. Les poissons étaient ensuite bouillis plusieurs fois afin de perdre cette toxicité (Nigrelli, 1952). Le caractère toxique de ces substances isolées d'*Holothuria vagabunda*, nommées alors holothurines, a été évalué sur plusieurs modèles animaux (crustacés et mollusques, annélides, poissons, amphibiens, lapins et souris). Parallèlement, il a été démontré que l'holothurie placé dans un aquarium avec des poissons marins (*Enedrias nebulosus*, *Girella punctata*, *Pomacentrus coelestis*, *Plotosus anguillaris* et *Thallosoma cupido*) ou d'eau douce (*Carasius auratus* et *Oryzias latipes*) n'entraînait pas de modification du comportement des poissons. Cependant, lorsque le tégument de l'holothurie était « gratté » par la lame d'un couteau, un fluide brun/violet diffusait dans l'eau entraînant alors une modification rapide du comportement des poissons conduisant à la mort (Yamanouchi ; 1955). Van Dyck *et al.* (2011) ont vérifié cette ichthyotoxicité à partir de l'holothurie *Holothuria forskali* en la plaçant avec les poissons d'eau de mer *Coris julis* et *Symphodus ocellatus*. Les auteurs ont isolé ces molécules relarguées en situation de stress, et ont décrit 26 glycosides triterpéniques à partir des tubes de Cuvier et 12 à partir du tégument après avoir fait subir à l'animal un stress mécanique (coups réguliers sans blesser l'animal).

La partie suivante a pour objet de faire une synthèse des extraits et des composés actifs antimicrobiens isolés des holothuries actuellement décrits. Ce travail de synthèse est présenté dans le Tableau VI.

2.1.1 Activité antifongique

L'activité antimicrobienne la plus étudiée est l'activité antifongique (Tableau VI). Les extraits ayant démontrés des activités antifongiques sont des extraits éthanoliques, méthanoliques et aqueux de téguments, de fluide cœlomique et des tubes de Cuvier (Ridzwan *et al.*, 1995 ; Jawahar *et al.*, 2002 ; Ismail *et al.*, 2008 ; Mokhlesi *et al.*, 2012). Ces extraits n'ayant pas été purifiés, la nature des molécules responsables de l'activité ne peut être reliée de manière certaine, cependant de récentes études ont démontré que les tubes de Cuvier et le tégument de certaines holothuries étaient riches en saponines et plus spécifiquement des glycosides triterpéniques (Rodriguez *et al.*, 1991 ; Van Dyck *et al.*, 2010a et b ; Van Dyck *et al.*, 2011). Cette hypothèse est renforcée par le fait que les molécules purifiées étant responsable de l'activité antifongique sont des glycosides triterpéniques, extraits par des solvants alcooliques. Plusieurs critères semblent être corrélés à l'activité antifongique, il apparaît que la présence de la fonction lactone dans la partie aglycone, la longueur et la composition de la chaîne glucidique et la présence et la position de groupements sulfates sont des éléments majeurs modulant l'activité (Kalinin *et al.*, 2008). A titre d'exemple, le Bivittoside C (Figure 18) possède une activité antifongique à la différence du dérivé Bivittoside A (Figure 18) dépourvu de fonction lactone qui ne présente pas ce genre d'activité.

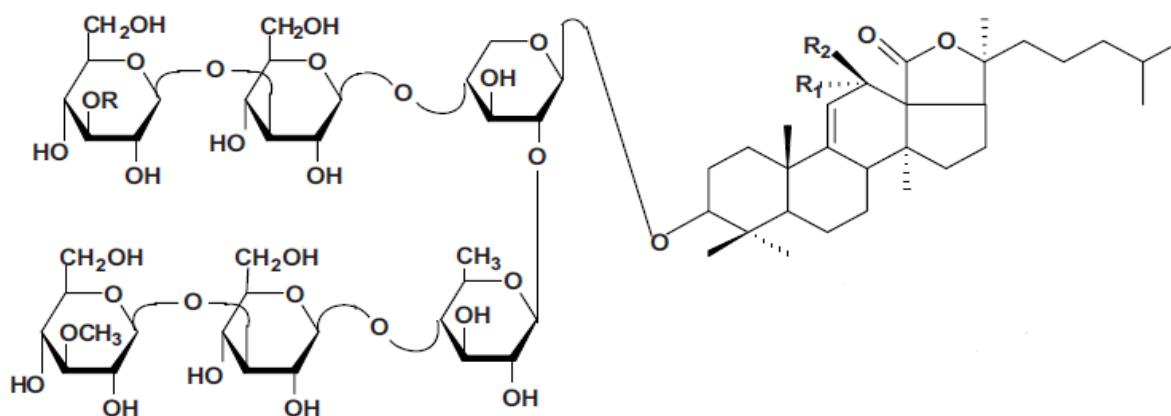


Figure 18 : Exemple de glycosides triterpéniques ayant une activité antifongique

(Bivittoside A : R = CH₃, R₁ = R₂ = H ; Bivittoside C : R = CH₃, R₁ = OH, R₂ = H) (Kalinin *et al.*, 2008)

2.1.2 Activité antibactérienne

Les extraits démontrant une activité antibactérienne sont des extraits éthanoliques, aqueux et insaponifiable de tégument et de spécimen entier. Ces extraits n'ayant également pas été purifiés, la classe chimique des molécules actives n'a pu être reliée directement à l'activité. Cependant, comme pour l'activité antifongique, il est supposé que l'activité antibactérienne de ces extraits est liée à la présence de glycosides triterpéniques, et notamment à la fraction insaponifiable (fraction résiduelle soluble dans les solvants organiques après saponification) active de *Holothuria atra* (Jawahar *et al.*, 2012).

Parmi les composés isolés d'holothuries possédant des activités antibactériennes, 3 concernent des peptides isolés et purifiés par filtration centrifuge ou chromatographie liquide en phase inverse (RP-HPLC) à partir des espèces *Actinopyga lecanora* (Ghanbari *et al.*, 2012), *Cucumaria frondosa* (Beauregard *et al.*, 2001) et *Holothuria tubulosa* (Schillaci *et al.*, 2013), dont un hydrolysats enzymatique (Ghanbari *et al.*, 2002). Ces peptides sont des molécules de faibles poids moléculaires connus pour posséder un spectre large d'activités antifongique, antivirale et antibactérienne. Ils sont chargés positivement et possèdent un caractère amphiphile (molécule possédant à la fois un caractère hydrophile et hydrophobe) permettant à ces molécules d'être solubles en environnement aqueux mais également de pouvoir pénétrer les membranes riches en lipides et ainsi détruire la cellule cible par différents mécanismes (Schilaci *et al.*, 2013).

2.1.3 Activité antivirale

Les métabolites extraits des holothuries à activités antivirales appartiennent majoritairement à la famille des glycosides triterpéniques et ont été extraits à partir de l'animal entier, le tégument et les tubes de Cuvier par des solvants alcooliques. Les cucumarioside A₂-2 et cucumarioside A₄-2 isolés de *Cucumaria japonica* ont montré une inhibition de l'effet cytopathique du virus de la stomatite vésiculaire (VSV), du poliovirus et d'autres virus (Grishin *et al.*, 1991). Les holothurinosides A, C et D isolés de *Holothuria forskalii* ont montré une inhibition de l'effet cytopathique sur le VSV (Rodriguez *et al.*, 1991).

Enfin, les liouvillosides A et B (Figure 19) et les thyonosides A et B isolés de *Staurocucumis liouvillei* (Maier *et al.*, 2001) et de *Thyone aurea* (Bonnard et Rinehart, 2004) ont montré respectivement un effet antiviral sur le Virus *Herpes Simplex* de type 1 (VHS-1). Un extrait brut isolé d'*Holothuria sp.* a montré une activité anti-VHS-1, et notamment un effet inhibiteur sur l'adsorption virale aux cellules ainsi qu'un effet au niveau de la réplication intracellulaire (Farshadpour *et al.*, 2014). Le mécanisme antiviral des glycosides triterpéniques extraits des holothuries semblerait être relié à un phénomène de protection au niveau membranaire lors du contact entre la cellule et le virus (Kalinin *et al.*, 2008). La cucumariaxanthine C est un caroténoïde isolé de *Cucumaria japonica* (Tsushima *et al.*, 1996) ayant démontré une forte activité inhibitrice sur le virus Epstein-Barr. La chondroïtine sulfate fucosylée isolée de *Thelenota ananas* (Figure 20) a montré un effet inhibiteur sur la réplication de plusieurs souches de Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) (Huang *et al.*, 2013 ; Lian *et al.*, 2013).

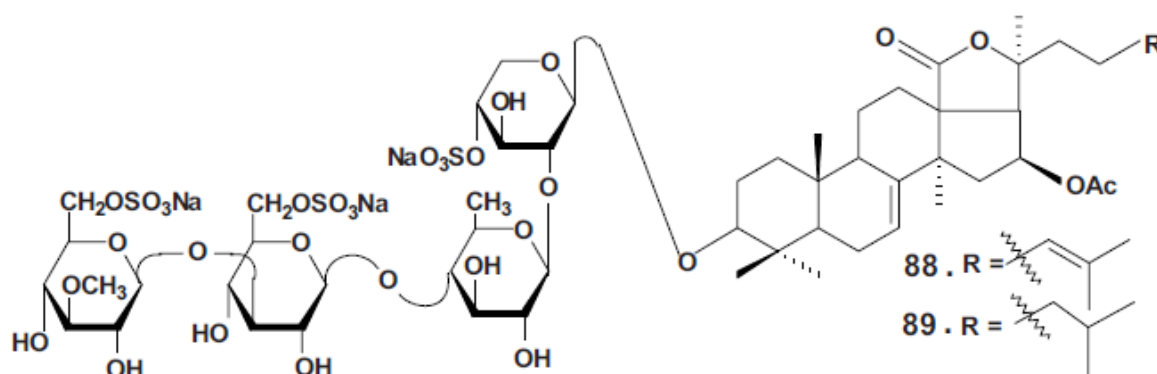


Figure 19 : Exemple de glycosides triterpéniques ayant une activité antivirale isolés de *Staurocucumis liouvillei* (Liouvillosides A et B) (Kalinin *et al.*, 2008)

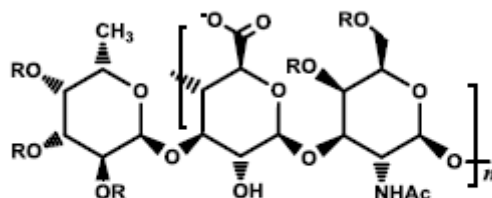


Figure 20 : Exemple de chondroïtine sulfate fucosylée isolée de *Thelenota ananas* ayant une activité antivirale (R = H ou SO₃⁻ ; Lian *et al.*, 2013)

Tableau VI : Récapitulatif des composés ou extraits actifs antimicrobiens isolés d'holothuries actuellement décrits

Nom binomial	Activité	Activité spécifique	Composé ou extrait actif	Référence
<i>Actinopyga agassizii</i> (Selenka, 1867)	Antifongique	<i>A. niger</i> ; <i>A. oryzae</i> ; <i>P. chrysogenum</i> ; <i>P. citricum</i> ; <i>M. spinescens</i> ; <i>R. rubra</i> ; <i>T. mentagrophytes</i> ; <i>T. rubrum</i> ; <i>C. albicans</i> ; <i>C. utilis</i>	Dérivé sulfaté de 24-dehydroechinoside A	Kalinin <i>et al.</i> (2008)
<i>Actinopyga echinites</i> (Jaeger, 1833)	Antibactérien	<i>S. aureus</i>	Fraction éthanolique soluble	Jawahar <i>et al.</i> (2002)
	Antifongique	<i>A. niger</i> ; <i>A. oryzae</i> ; <i>P. chrysogenum</i> ; <i>P. citricum</i> ; <i>R. rubra</i> ; <i>T. mentagrophytes</i> ; <i>T. rubrum</i> ; <i>C. albicans</i> ; <i>C. utilis</i>	Echinoside A; 12-oxoderivative desulfaté de echinoside A; echinoside B	Kalinin <i>et al.</i> (2008)
<i>Actinopyga lecanora</i> (Jaeger, 1833)	Antibactérien	<i>B. subtilis</i> ; <i>S. aureus</i> ; <i>E. coli</i> ; <i>P. aeruginosa</i> ; <i>P. sp.</i>	Peptide antimicrobien (hydrolysate)	Ghanbari <i>et al.</i> (2012)
	Antifongique	<i>T. mentagrophytes</i> ; <i>S. schenckii</i>	Holothurin B	
<i>Actinopyga mauritiana</i> (Quoy & Gaimard, 1834)	Antifongique	<i>S. carlsbergensis</i> ; <i>C. albicans</i>	Holothurin A	Kuznetsova <i>et al.</i> (1982)
<i>Actinopyga miliaris</i> (Quoy & Gaimard, 1833)	Antibactérien	<i>A. hydrophila</i> <i>E. sp.</i> ; <i>E. coli</i> ; <i>K. pneumoniae</i> ; <i>V. harveyi</i> ; <i>P. aeruginosa</i>	Fraction éthanolique soluble	Jawahar <i>et al.</i> (2002)
	Antifongique	<i>A. sp.</i>	Fraction éthanolique soluble	Jawahar <i>et al.</i> (2002)
<i>Actinopyga obesa</i> (Selenka, 1867)	Antifongique	<i>S. carlsbergensis</i>	Holothurin A	Kuznetsova <i>et al.</i> (1982)
<i>Apostichopus japonicus</i> (Selenka, 1867)	Antifongique	<i>C. albicans</i> SC5314; <i>C. neoformans</i> BLS108; <i>M. gypseum</i> 31388	26-nor-25-oxo-holotoxin A; holotoxin F; holotoxin G	Wang <i>et al.</i> (2012)
	Antifongique (inhibiteur de croissance)	<i>C. albicans</i> SC5314; <i>C. neoformans</i> BLS108; <i>C. tropicalis</i> ; <i>C. utilis</i> ; <i>T. utilis</i> ; <i>P. niger</i> ; <i>P. chrysogenum</i> ; <i>P. citricum</i> ; <i>C. herbatum</i> ; <i>S. carlsbergensis</i> ; <i>A. niger</i> ; <i>A. oryzae</i> ; <i>H. pedrosoi</i> ; <i>T. mentagrophytes</i> ; <i>T. rubrum</i> ; <i>T. rubrum</i> 0501124; <i>M. gypseum</i> 31388; <i>M. spinescens</i> ; <i>A. fumigatus</i> 0504656	Holotoxin D; holotoxin E; holotoxin A1; holotoxin B; holotoxin B1; cladolose B	Kalinin <i>et al.</i> (2008)

Nom binomial	Activité	Activité spécifique	Composé ou extrait actif	Référence
<i>Bohadschia argus</i> (Jaeger, 1833)	Antifongique	<i>S. carlsbergensis</i>	Bivittoside type	Kuznetsova <i>et al.</i> (1982)
	Antibactérien	<i>S. faecalis</i> ; <i>S. viridens</i> ; <i>S. pneumoniae</i> ; <i>S. aureus</i> ; <i>E. coli</i> ; <i>S. sonnei</i> ; <i>P. mirabilis</i>	Extrait eau	Ridzwan <i>et al.</i> (1995)
<i>Bohadschia bivittata</i> (Mitsukuri, 1912)	Antifongique	<i>A. niger</i> ; <i>A. oryzae</i> ; <i>P. chrysogenum</i> ; <i>P. citricum</i> ; <i>C. herbatum</i> ; <i>R. rubra</i> ; <i>T. mentagrophytes</i> ; <i>T. rubrum</i> ; <i>C. albicans</i> ; <i>C. utilis</i>	Bivittoside A; bivittoside B; bivittoside D; 12-oxoderivative de bivittoside A	Kalinin <i>et al.</i> (2008)
<i>Bohadshia graeffei</i> (Semper, 1868)	Antifongique	<i>S. carlsbergensis</i>	Holothurin A	Kuznetsova <i>et al.</i> (1982)
<i>Bohadshia marmorata</i> (Jaeger, 1833)	Antifongique	<i>S. carlsbergensis</i>	Marmoratoside A; 17 α -hydroxy impatienside A; impatienside A; bivittoside D; bivittoside type	Yuan <i>et al.</i> (2009a) Kuznetsova <i>et al.</i> (1982)
<i>Bohadshia vitiensis</i> (Semper, 1868)	Antifongique	<i>S. carlsbergensis</i> ; <i>C. albicans</i>	Bivittoside type	Kuznetsova <i>et al.</i> (1982)
<i>Cucumaria echinata</i> (Von Marenzeller)	Antifongique	<i>T. fetus</i> ; <i>C. albicans</i> ; <i>T. mentagrophytes</i> ; <i>A. niger</i> ; <i>P. chrysogenum</i>	Cucumechinoside F; dérivés de cucumechinoside	Miyamoto <i>et al.</i> (1990)
<i>Cucumaria frondosa</i> (Gunnerus, 1767)	Antibactérien	<i>C. glutamicum</i> ; <i>S. aureus</i> ; <i>V. anguillarum</i>	Extraits de téguments	Haug <i>et al.</i> (2002)
		<i>K. pneumoniae</i> ; <i>E. coli</i> ; <i>P. aeruginosa</i> ; <i>A. faecalis</i> ; <i>P. mirabilis</i> ; <i>E. aerogenes</i> ; <i>S. aureus</i> ; <i>E. faecalis</i> ; <i>M. luteus</i>	Peptides antimicrobiens	Beauregard <i>et al.</i> (2001)
<i>Cucumaria japonica</i>	Antivirale	Virus Epstein-Barr; Aleutian disease virus; Poliovirus	Cucumariaxanthin C; Cucumarioside A2-2; Cucumarioside A4-2	Tsushima <i>et al.</i> (1996) Grishin <i>et al.</i> (1991)
	Antifongique	<i>C. albicans</i> ; <i>C. tropicalis</i>	Cucumariosides I et II	Batnikov <i>et al.</i> (1980)
<i>Eupentacta fraudatrix</i>	Antifongique		Cucumariosides B1 et B2	

Nom binomial	Activité	Activité spécifique	Composé ou extrait actif	Référence
<i>Hemoiedema spectabilis</i> (Ludwig 1882)	Antifongique	<i>C. cucumerinum</i>	Hemoiedemosides A et B	Chludil <i>et al.</i> (2002)
<i>Holothuria atra</i> (Jaeger, 1833)	Antibactérien	<i>A. hydrophila</i> ; <i>E. sp.</i> ; <i>K. pneumoniae</i> ; <i>S. aureus</i> ; <i>V. harveyi</i> ; <i>P. aeruginosa</i>	Fraction éthanolique soluble	Jawahar <i>et al.</i> (2002)
		<i>A. hydrophila</i> ; <i>E. sp.</i> ; <i>E. coli</i> ; <i>K. pneumoniae</i> ; <i>S. aureus</i> ; <i>V. harveyi</i> ; <i>P. aeruginosa</i> ; <i>S. typhi</i>	Fraction insaponifiable	
		<i>S. faecalis</i> ; <i>S. viridens</i> ; <i>S. pneumoniae</i> ; <i>S. aureus</i> ; <i>E. coli</i> ; <i>S. sonnei</i> ; <i>P. mirabilis</i>	Extrait eau	Ridzwan <i>et al.</i> (1995)
	Antifongique	<i>A. sp.</i> ; <i>S. carlsbergensis</i>	Fraction éthanolique soluble; Holothurin A	Ridzwan <i>et al.</i> (1995) Kuznetsova <i>et al.</i> (1982)
<i>Holothuria</i> (<i>Microthele</i>) <i>axiloga</i>	Antifongique	6 souches	Impatienside B	Yuan <i>et al.</i> (2009b)
<i>Holothuria coluber</i> (Semper, 1868)	Antifongique	<i>S. carlsbergensis</i>	Holothurin A	Kuznetsova <i>et al.</i> (1982)
<i>Holothuria discrepans</i> (Semper, 1868)	Antifongique	<i>S. carlsbergensis</i>	Mélange de Holothurin A et B	Kuznetsova <i>et al.</i> (1982)
<i>Holothuria edulis</i> (Lesson, 1830)	Antifongique	<i>C. albicans</i> ; <i>S. carlsbergensis</i>	Saponines; Mélange de Holothurin A et B	Hing <i>et al.</i> (2007) Kuznetsova <i>et al.</i> (1982)
<i>Holothuria forskalii</i> (Delle Chiaje, 1823)	Antivirale	Virus de la Stomatite vésiculaire	Holothurinosides A, C et D et dérivés désulfatés	Rodriguez <i>et al.</i> (1991)
<i>Holothuria leucospilota</i> (Brandt, 1835)	Antifongique	<i>A. niger</i> ; <i>A. oryzae</i> ; <i>P. chryzogenum</i> ; <i>P. citricum</i> ; <i>M. spinescens</i> ; <i>C. herbatum</i> ; <i>R. rubra</i> ; <i>T. mentagrophytes</i> ; <i>T. rubrum</i> ; <i>C. albicans</i> ; <i>C. utilis</i>	Dérivé désulfaté de Holothurin A	Kalinin <i>et al.</i> (2008)
		<i>C. albicans</i> ; <i>A. niger</i>	Extrait méthanolique des organes de cuvier; extrait méthanol-eau de fluide cœlomique	Mokhlesi <i>et al.</i> (2012)
<i>Holothuria pervicax</i> (Selenka, 1867)	Antifongique	<i>A. niger</i> ; <i>A. oryzae</i> ; <i>P. chryzogenum</i> ; <i>P. citricum</i> ; <i>M. spinescens</i> ; <i>C. herbatum</i> ; <i>R. rubra</i> ; <i>T. mentagrophytes</i> ; <i>T. rubrum</i> ; <i>C. albicans</i> ; <i>C. utilis</i>	Pervicoside A désulfaté; pervicoside B désulfaté; pervicoside C désulfaté	Kalinin <i>et al.</i> (2008)

Nom binomial	Activité	Activité spécifique	Composé ou extrait actif	Référence
<i>Holothuria polii</i> (Delle Chiaje, 1823)	Antifongique	<i>A. fumigatus</i> (IP 2279.94); <i>A. fumigatus</i> (IP 1082.74)	Extrait aqueux de fluide cœlomique; extrait méthanolique de tégument	Ismail <i>et al.</i> (2008)
<i>Holothuria scabra</i> (Jaeger, 1833)	Antibactérien	<i>A. hydrophila</i> ; <i>E. sp.</i> ; <i>K. pneumoniae</i> ; <i>V. harveyi</i> ; <i>P. aeruginosa</i> ; <i>S. typhi</i>	Fraction éthanolique soluble	Jawahar <i>et al.</i> (2002)
<i>Holothuria sp.</i>	Antifongique	<i>A. sp.</i>	Fraction éthanolique soluble	
<i>Holothuria sp.</i>	Antivirale	HSV-1	Extrait brut	Farshadpour <i>et al.</i> (2014)
<i>Holothuria tubulosa</i> (Gmelin, 1790)	Antibactérien	<i>S. aureus</i> (ATCC 29213); <i>S. aureus</i> (ATCC 25923); <i>E. faecalis</i> (ATCC 29212); <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 15442)	Peptide 5k Da isolé de cœlomocyte du cytosol (5-HCC)	Schillaci <i>et al.</i> (2013)
<i>Parastichopus parvimensis</i>	Antibactérien	<i>B. subtilis</i> ; <i>E. coli</i>	Extrait brut	Villasin and Pomory (2000)
<i>Psolus patagonicus</i> (Ekman, 1925)	Antifongique	<i>C. cucumerinum</i> ; <i>C. fulvum</i> ; <i>F. oxysporum</i> ; <i>M. sp.</i>	Patagonicoside A; ds-patagonicoside A (glycoside désulfaté)	Murray <i>et al.</i> (2001) Muniain <i>et al.</i> (2008)
<i>Staurocucumis liouvillei</i> (Vaney 1914)	Antivirale	HSV-1	Liouvillosides A et B	Maier <i>et al.</i> (2001)
<i>Stichopus chloronotus</i> (Brandt, 1835)	Antifongique	<i>T. utilis</i> ; <i>P. niger</i> ; <i>S. carlsbergensis</i> ; <i>H. pedrosoi</i> ; <i>A. niger</i> ; <i>A. oryzae</i> ; <i>P. chryzogenum</i> ; <i>P. citricum</i> ; <i>R. rubra</i> ; <i>T. mentagrophytes</i> ; <i>T. rubrum</i> ; <i>C. albicans</i> ; <i>C. utilis</i>	Saponine; Stichoposide A; Stichoposide C; Stichoposide D; Stichoposide E; dérivé désulfaté de 24-stichlorosideC2	Hing, <i>et al.</i> (2007) Mal'tsev <i>et al.</i> (1985)
<i>Stichopus variegatus</i> (Semper, 1868)	Antifongique	<i>S. carlsbergensis</i> ; <i>C. albicans</i>	Mélange de stichoposide C et D	Kuznetsova <i>et al.</i> (1982)
<i>Thelenota ananas</i> (Jaeger, 1833)	Antifongique	<i>C. albicans</i> ; <i>T. utilis</i> ; <i>P. niger</i> ; <i>S. carlsbergensis</i> ; <i>A. niger</i> ; <i>H. pedrosoi</i> ; <i>T. mentagrophytes</i>	Mélange de thelothurin A et B Thelenotoside A Thelenotoside B	Kuznetsova <i>et al.</i> (1982) Mal'tsev <i>et al.</i> (1985)
	Antivirale	HIV	Chondroïtine Sulfate Fucosylé (glycosaminoglycane)	Huang <i>et al.</i> (2013) Lian <i>et al.</i> (2013)
<i>Thyone aurea</i> (Quoy & Gaimard, 1834)	Antivirale	HSV-1	Thyonosides A et B	Bonnard et Rinehart (2004)

3 Procédés d'extraction

3.1 Généralités

Les substances naturelles connaissent un intérêt croissant dans de nombreux domaines de par leurs caractéristiques chimiques et biologiques originales. La valorisation de ces molécules d'origine naturelle représente donc un potentiel économique énorme. Pour être valorisés, les composés bioactifs doivent d'abord être séparés de leur matrice biologique d'origine. L'obtention de ces molécules nécessite de nombreuses étapes souvent longues et coûteuses, et posent de nombreux problèmes de toxicité et environnementaux. L'enjeu actuel consiste donc en l'innovation technologique et le développement de nouvelles méthodologies d'extraction tout en ayant une démarche respectueuse de l'environnement. Dans ce contexte, l'objectif de cette partie est de présenter les caractéristiques de l'hydrolyse enzymatique comme technique alternative comparé aux techniques classiques d'extractions par solvants.

3.2 Extraction par solvants

Une extraction consiste à extraire une ou des espèces chimiques d'un milieu solide ou liquide. Il existe plusieurs techniques d'extraction, chacune étant adapté aux propriétés physiques ou chimiques de l'espèce à extraire : pressage, décoction, infusion, macération, enflourage, entraînement à la vapeur, extraction par solvant. L'extraction couramment utilisée afin d'extraire des fractions de classes chimiques distinctes à partir d'une matière première solide est l'extraction solide-liquide par macération et utilisation de solvants. Cette technique permet d'extraire une substance présente dans un solide pour la faire passer dans un solvant liquide qui peut être de nature aqueuse ou organique. Selon la polarité du solvant, des composés de classes chimiques différents seront solubilisés et entraînés par le solvant. Après solubilisation des composés dans le solvant, une étape d'élimination du solvant permet de récupérer les composés d'intérêt. Cette dernière étape est effectuée selon les propriétés physico-chimiques du solvant (centrifugation, séchage, lyophilisation). L'utilisation de plusieurs solvants couvrant une large gamme de polarité permet d'extraire de l'échantillon solide un maximum de composés et de réaliser des extraits de classes chimiques variées.

L'extraction solide-liquide par utilisation de solvants aqueux et organiques est largement utilisée et représente une première approche de criblage pour la recherche de composés bioactifs, et en l'occurrence lorsque la classe chimique des molécules actives est connue. Cependant, cette technique à plusieurs inconvénients :

- Toxicité des solvants
- Interaction des solvants avec certains composés chimiques
- Coût et temps de l'extraction, souvent élevé
- Difficulté de recyclage des solvants et donc inconvénients environnementaux

3.3 Hydrolyse enzymatique

Comme il a été vu précédemment, l'extraction de composés d'intérêt se fait généralement par l'utilisation de solvants qui posent cependant plusieurs inconvénients. Depuis quelques dizaines d'années, l'extraction assistée par hydrolyse enzymatique se développe car elle permet de s'affranchir de ces inconvénients tout en augmentant la qualité et le rendement de l'extraction. En effet, le seul solvant utilisé par cette technique est l'eau. L'application d'une extraction assistée par enzyme protéolytique a été étudiée comme procédé alternatif pour la valorisation des coproduits d'origine marine. Cette technique permet de faire face à la quantité importante de déchets générés annuellement par les industries de la pêche et de transformation de produits de la mer, souvent très riche en protéines (Zhong *et al.*, 2013). Ces hydrolysats, ne nécessitant pas d'étapes d'élimination de solvant pour leurs utilisations, ont de plus, largement contribué à la découverte de nouveaux composés bioactifs possédant des activités telles que : antioxydante, anticancéreuse, calcium binding peptides, suppression de l'appétit, anticoagulante, immunostimulante, hypocholestérolémique, hormono-régulatrice, antimicrobienne et antivirale (Batista, 2013). A titre d'exemple, Lee et Maruyama (1998) et Zeng *et al.* (2008), ont montré l'activité inhibitrice de peptides isolés d'un hydrolysat d'huître vis-à-vis du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH).

3.4 Enzymes : définition et classification

Une enzyme est une protéine capable de catalyser une réaction chimique. Elle n'intervient pas dans le processus réactionnel, et elle est retrouvée intacte à la fin de la réaction. Une enzyme est spécifique d'une réaction, elle catalyse toujours la même transformation de fonctions chimiques. Dans ce sens, les enzymes sont classées en fonction de leurs spécificités selon la nomenclature de l'union internationale de biochimie et de biologie moléculaire (International Union of Biochemistry and Molecular Biology – IUBMB). Un numéro EC (Enzyme Commission number) comportant 4 nombres est attribué à chaque enzyme en fonction de ses caractéristiques, permettant alors son identification :

- Le premier nombre indique le type de réaction catalysée
- Le second indique le substrat général de la réaction
- Le troisième indique le substrat spécifique
- Le dernier indique le numéro de série de l'enzyme

Les principales classes d'enzymes sont les oxydoréductases (EC 1), les transférases (EC 2), les hydrolases (EC 3), les lyases (EC 4), les isomérase (EC 5) et les ligases (EC 6). Dans le cas de notre étude, les enzymes utilisées sont des hydrolases (EC 3) et plus spécifiquement des protéases (EC 3.4) qui vont cliver les liaisons peptidiques. Le Tableau VII résume les différentes spécificités de protéases (Garcia-Carreno et Navarrete del Toro, 1997 ; Dumay, 2006).

Tableau VII : Classification des protéases

Numéro	Substrat spécifique
3.4.11	aminopeptidases
3.4.13	dipeptidase
3.4.14	dipeptidyl- et tripeptidyl-peptidases
3.4.15	peptidyl-dipeptidases
3.4.16	sérine carboxypeptidases
3.4.17	métallo carboxypeptidases
3.4.18	cystéine carboxypeptidases
3.4.19	oméga peptidases
3.4.21	sérine endopeptidases
3.4.22	cystéine endopeptidases
3.4.23	aspartique endopeptidases
3.4.24	métallo endopeptidases
3.4.25	thréonine endopeptidases
3.4.99	endopeptidases au mécanisme inconnu

3.5 Principe de l'hydrolyse enzymatique

Lors d'une hydrolyse enzymatique, les protéases vont cliver les liaisons peptidiques entre deux acides aminés adjacents dans la séquence primaire d'une protéine, générant ainsi deux peptides. L'hydrolyse des liaisons peptidiques va générer la libération de protons H^+ (Figure 21). Cette libération de protons H^+ va entraîner une acidification du milieu. Ce principe est valable pour les hydrolyses se déroulant à pH supérieur à 6,5, pour que le degré de dissociation des ions $R-NH_3^+$ soit suffisant (Dumay, 2006). Lorsque le pH est inférieur à 6,5, la réaction s'inverse et ce seront des ions OH^- qui seront libérés.

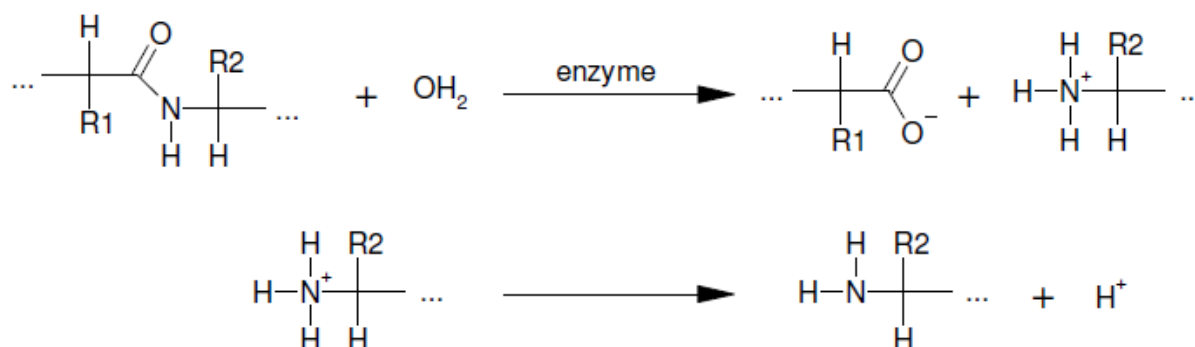


Figure 21 : Schéma réactionnel de l'hydrolyse enzymatique avec libération de protons H^+ (pH > 6,5)

3.6 Paramètres d'hydrolyse

Différents facteurs peuvent influencer l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique des protéines comme la température, le pH, la concentration en substrat et en enzyme, la force ionique, la présence ou l'absence de substances inhibitrices ou activatrices et la quantité d'eau ajoutée.

La température accélère les vitesses de réaction en fournissant l'énergie nécessaire au franchissement de la barrière d'énergie d'activation, cependant une température trop importante peut conduire à une modification de la structure tridimensionnelle de l'enzyme pouvant conduire à une modification ou une dénaturation de celle-ci. Il en résulte donc l'existence d'une valeur optimale de température pour chaque enzyme dans une gamme de température plus ou moins large dépendant de sa stabilité thermique (Dumay, 2006).

La variation du pH peut avoir également des conséquences sur l'enzyme en modifiant l'état d'ionisation des acides aminés présents sur le site actif ou sur ceux responsables du maintien de la conformation tridimensionnelle de la protéine. Le substrat peut également subir une modification de son degré d'ionisation pouvant favoriser ou empêcher la formation du complexe enzyme/substrat. Il existe alors un pH optimal dépendant de la réaction enzymatique d'un substrat donné dans un milieu de composition donnée (Teng *et al.*, 2011).

La vitesse de réaction en fonction de la concentration en enzyme pour une concentration de substrat donnée n'est pas linéaire, en effet au-delà d'une certaine concentration en enzyme, la totalité du substrat se retrouve complexé et donc l'ajout d'enzyme ne permettra alors pas d'augmenter la vitesse de la réaction (Dumay, 2006).

Des effecteurs peuvent modifier la vitesse de réaction de l'hydrolyse en jouant le rôle d'inhibiteurs ou d'activateurs. Les inhibiteurs peuvent être de deux types, ils vont être compétitifs, en possédant une analogie de structure avec le site actif de l'enzyme ou bien non compétitif, en se fixant sur un autre site de l'enzyme qui modifiera alors sa structure tridimensionnelle et son activité (Dumay, 2006).

La quantité d'eau ajoutée par rapport à la quantité de substrat peut modifier la vitesse de réaction d'hydrolyse. L'ajout d'eau va permettre une meilleure solubilisation de la matière sèche dans la phase soluble, qui dans un second temps rendra les nouveaux peptides formés plus accessible à la protéolyse (Sylla *et al.*, 2008).

CHAPITRE I - INTRODUCTION

Chapitre I : Recherche de molécules à activités antiherpétiques issues de coproduits de *Cucumaria frondosa*

4 Introduction

Le concombre de mer *Cucumaria frondosa* pêché dans la baie de Fundy (NB) est transformé dans cette même province en produits à destination de l'alimentation humaine pour le marché asiatique. Comme il a été vu précédemment, cette transformation génère une quantité importante de coproduits. Ainsi, le bulbe aquapharyngé et les organes internes représentant près de la moitié de la masse totale de matière première ne sont peu ou pas valorisés. Cette biomasse pourrait être considérée comme un gisement de nouvelles molécules à activités biologiques à haute valeur ajoutée.

L'étude bibliographique (Tableau VI) sur les holothuries a montré la présence de composés ayant des propriétés antifongiques et antibactériennes. Cependant, peu d'études concernent l'extraction et la caractérisation de molécules à activité antivirale au sein de cette classe et plus particulièrement vis-à-vis du virus *Herpes Simplex-1*.

Le Virus *Herpes Simplex* est un virus enveloppé à ADN double brin. Le type 1 (VHS-1) de ce virus est hébergé par 60-95% de la population et le type 2 (VHS-2) par 6-50% de la population. Le type 1 est majoritairement responsable d'affections orofaciales et d'encéphalites, tandis que le type 2 est responsable d'affections génitales et peut être transmis de la mère au nouveau-né. Le VHS-1 est la première cause d'encéphalites sporadiques et néonatales, il est associé à un taux de mortalité de 70% en l'absence de traitement (Zhong *et al.*, 2012). Ces 2 types de virus ont la capacité de rentrer en phase de latence au sein des neurones sensitifs, en attendant leur réactivation.

La recherche de composés anti-VHS est important chez les sujets immunodéprimés, en effet, la séroprévalence à VHS est significativement plus importante chez les populations infectées par le VIH (Zhong *et al.*, 2013).

Parallèlement à la progression de la séroprévalence au VIH, les affections herpétiques cutanées et des muqueuses deviennent de plus en plus importantes et surviennent chez 92% des individus infectés par le VIH. Les médicaments actuellement disponibles pour le traitement du VHS sont l'acyclovir, la famciclovir et le valacyclovir. L'acyclovir et le valacyclovir sont disponibles comme traitement topique. Au niveau clinique, les traitements du virus permettent de soulager les symptômes et de réduire l'excrétion virale, cependant ces traitements ne permettent pas d'éviter la réinfection endogène (récurrence) du virus. De plus, des phénomènes de résistance dans le traitement à l'acyclovir ont été observés chez des sujets immunodéprimés (Whitley et Roizman, 2001). Par conséquent, il existe un réel besoin de développement de nouveaux agents thérapeutiques afin de faire face à cette problématique. De plus, la majorité des traitements actuels vont être dans le domaine public à partir de cette année. La recherche de nouveaux antiviraux est donc un réel enjeu de santé publique.

L'objectif de cette étude est d'extraire et de purifier de nouvelles molécules à activités antiherpétiques en suivant une stratégie de bioguidage. Cette étude est réalisée à partir de fractions obtenues par hydrolyse enzymatique et par extraction par solvants des coproduits de l'holothurie *Cucumaria frondosa*.

CHAPITRE I

MATERIELS & METHODES

5 Matériels & Méthodes

5.1 Préparation des spécimens de *Cucumaria frondosa*

5.1.1 Collecte des spécimens et maintien en vie en bassin

Les concombres de mer *Cucumaria frondosa* ont été collectés dans la ZPH 36 (Zone de Pêche du Homard n°36) dans la baie Passamaquoddy, Baie de Fundy, N.B., Canada entre janvier et mars de 2011 à 2014. La pêche a été réalisée à l'aide d'un engin modifié initialement destiné au ramassage du pétoncle et de l'oursin. Les concombres de mer ont été ensuite transportés par camion frigorifique et placés en acclimatation dès leur arrivée au laboratoire du pavillon d'aquaculture de l'Institut de Recherche sur les Zones Côtières (IRZC), Shippagan, N.B. Les organismes ont été conservés dans plusieurs bassins de 500 L aérés en circuit ouvert d'eau de mer filtrée et pompée de la baie de Shippagan à $0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, de salinité 30 ‰ en attendant les premières expériences (Figure 22).



Figure 22 : Bassin d'acclimatation et de maintien en vie des spécimens collectés de *C. frondosa* (photographie : L. Tripoteau, 2013)

5.1.2 Dissection des spécimens

Des spécimens ont été prélevés de manière aléatoire au sein des bassins d'acclimatation afin d'être disséqués. Ils sont découpés dans le sens de la longueur et maintenus par des épingles sur une planche à dissection à l'aide de scalpels, ciseaux et forceps. Les organes internes et les bulbes aquapharyngés ont été collectés indépendamment. Ces organes ont été conservés à -20°C après avoir été broyés (LBC15, Waring Laboratory Science, USA) et lyophilisés jusqu'à un taux d'humidité résiduelle d'environ 5%.

5.2 Préparation des extraits

5.2.1 Extraction séquentielle solide-liquide par solvants organiques et aqueux

L'hexane (OmniSolv® Hexanes), l'acétone (OmniSolv® Acétone) et le méthanol (OmniSolv® Méthanol) utilisés sont de pureté HPLC et ont été fournis par Fisher Scientific (Canada). Les différentes étapes d'extraction ont été représentées dans la Figure 23.

Extraction à l'hexane : A partir de 20 g d'échantillon lyophilisé, 300 mL d'hexane (15mL/g) ont été ajoutés dans un erlenmeyer de 500mL et agités pendant 30 min à température ambiante (agitateur magnétique) suivi d'un traitement aux ultrasons de 15 min. L'échantillon est ensuite filtré sous vide (filtre Whatman grade #4). Après filtration, le solvant est éliminé par évaporation rotative puis sous jet d'azote (40-50°C).

Les extractions à l'acétone et au méthanol ont été réalisées de façon identique à l'extraction à l'hexane et répétées pour chacune d'entre elle à partir du résidu de la première extraction. Les extraits du même solvant ont ensuite été rassemblés, placés à -20°C et lyophilisés.

Extraction à l'eau : A partir du résidu sec provenant de l'extraction au méthanol, 200 mL d'eau distillée ont été ajoutés (10 mL/g) dans un Erlenmeyer de 500 mL, mélangés et chauffés à 80-90°C pendant 2 h. Après refroidissement jusqu'à température ambiante, la solution a été filtrée sous vide (Filtre Whatman grade #4). Le filtrat a ensuite été précipité par l'ajout d'éthanol (3V) et placé dans un bain de glace pendant 2 h. Après précipitation, la phase solide est récupérée par centrifugation (2500 rpm/20 min).

Les particules solides ont ensuite été séchées par lyophilisation. Les extraits collectés ont été placés à -20°C. Le résidu final n'a pas été utilisé en raison de sa faible solubilité.

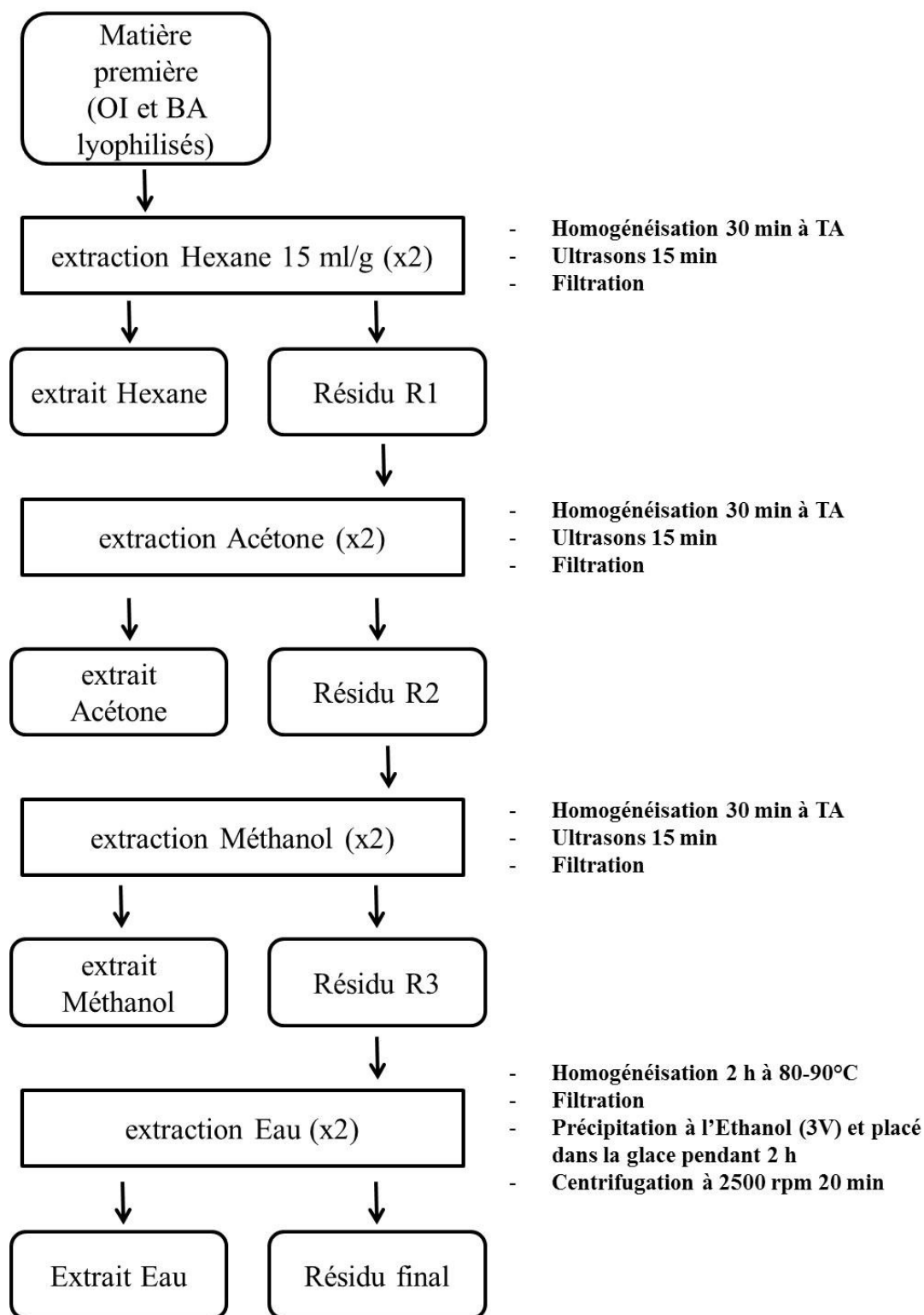


Figure 23 : Organigramme de l'extraction séquentielle par solvants organiques des coproduits de *C. frondosa* (OI : Organes Internes ; BA : Bulbes Aquapharyngés, TA : Température Ambiante)

5.2.2 Hydrolyse enzymatique

5.2.2.1 Choix des enzymes

Les enzymes utilisées lors de cette étude ont été fournies gracieusement par les sociétés Novozymes AS (Danemark) et BioCat (USA). Les enzymes utilisées et leurs caractéristiques sont les suivantes :

Alcalase

Alcalase 2,4L FG est produite par fermentation à partir d'une souche sélectionnée de la bactérie *Bacillus licheniformis*. Son principal constituant enzymatique est la Subtilisine A (Subtilisine Carlsberg), une endopeptidase qui possède les résidus sérine comme site catalytique. Cette enzyme possède les autorisations FAO pour être utilisée à des fins alimentaires. Les numéros enzymatiques de l'alcalase sont EC 3.4.21.62, 3.4.21.19 et 3.4.22.31. Les conditions optimales pour Alcalase sont une température comprise entre 55 et 70°C et un pH compris entre 6,5 et 8,5. L'activité déclarée de l'Alcalase est de 2,4 AU/g. Alcalase peut être inactivée par chauffage à 85°C pendant 10 min lorsque le pH est de 8 (Dumay, 2006).

Bromélaïne

La Bromélaïne est une enzyme protéolytique dérivée de la tige d'*Ananas cosmosus* (ananas). Cette glycoprotéine possède une importante activité thiol-protéinase (cystéine protéase non spécifique) et permet la libération d'esters de glycine mais pas d'esters de lysine. Son numéro enzymatique est EC 3.4.22.32. Les conditions optimales de travail de la Bromélaïne sont une température avoisinant 50°C et un pH pouvant varier de 6 à 8. L'activité spécifique de cette enzyme est exprimée en unité Gelatin-Digesting par g (GDU/g). L'activité de la bromélaïne est standardisée à 2000 GDU/g (Bio-Cat product information).

Flavourzyme

Flavourzyme 500MG est un complexe peptidique qui hydrolyse les protéines dans des conditions neutres ou acides. Elle est de la classe des hydrolases. Flavourzyme est produite par fermentation d'*Aspergillus oryzae* et possède des activités endoprotéase et exopeptidase. Son numéro enzymatique est EC 3.4.11.1. Les conditions optimales de travail de Flavourzyme sont une température avoisinant 50°C et un pH pouvant varier de 4 à 10. Flavourzyme est composée d'au moins 4 endopeptidases et 5 exopeptidases. Flavourzyme est souvent utilisée dans le but de diminuer l'amertume des peptides. L'activité spécifique de cette enzyme est donnée cette fois-ci en unités Leucine Amino Peptidase par g (LAPU/g). Flavourzyme 500 MG possède une activité de 500 LAPU/g (Dumay, 2006). Flavourzyme est inactivée par chauffage à 75°C pendant 10 min.

Fungal protease

La Fungal protéase est une enzyme dérivée d'*Aspergillus oryzae*. Cette enzyme possède des activités à la fois endopeptidase et exopeptidase. Son numéro enzymatique est EC 3.4.23.18. Les conditions optimales de travail de Fungal protéase sont une gamme de températures comprises entre 25°C et 60°C, avec un optimum à 50°C et un pH pouvant varier de 3 à 11 avec un optimum à 7. L'activité spécifique de cette enzyme est donnée cette fois-ci en unités Hémoglobine par g (HU/g). Fungal protéase possède une activité de 400 000 HU/g (Bio-Cat product information).

Neutral protease

Neutral Protéase est une enzyme dérivée de *Bacillus subtilis*. Cette enzyme a une activité principalement endoprotéase. Son numéro EC est 3.4.24.28. Les cofacteurs de cette enzyme sont Ca^{2+} et Zn^{2+} . Les conditions optimales de travail de Neutral Protéase sont une gamme de températures comprises entre 40°C et 60°C et un pH pouvant varier de 6 à 8. L'activité spécifique de cette enzyme est donnée en unités protéolytiques par g (PC/g). Neutral Protéase possède une activité de 2 000 000 PC/g (Bio-Cat product information).

Papaïne

La Papaïne est une enzyme végétale issue de la papaye et classée parmi les hydrolases de la classe des cystéines endopeptidases. Son numéro EC est 3.4.22.2. Les conditions optimales de travail de cette enzyme sont une température allant de 40 à 80°C et un pH compris entre 5 et 8. La Papaïne est de plus grande efficacité lorsqu'un catalyseur est ajouté, la cystéine, à raison de 0,025% lorsque la Papaïne est ajoutée à raison de 2% du poids frais de la matrice à hydrolyser. L'activité spécifique de la Papaïne donnée par le fournisseur est 6500 NFPU/g (Nuclear Floating Power Unit). Cependant, la Papaïne étant utilisée seule et pour une étude spécifique, cette enzyme n'a pas été caractérisée comme les trois autres (Dumay, 2006).

Peptidase AM

Peptidase AM est une enzyme protéolytique produite par fermentation d'*Aspergillus melleus*. Cette enzyme a une activité principalement d'exoprotéase. Son numéro EC est 3.4.11.1. Le cofacteur de cette enzyme est Zn^{2+} . Les conditions optimales de travail de Peptidase AM sont une gamme de températures comprises entre 30°C et 60°C avec un optimum à 50°C et un pH pouvant varier de 5,5 à 8,5 avec un optimum à 7. Peptidase AM possède une activité de 500 LAPU/g (Bio-Cat product information).

Peptidase AO

Peptidase AO est une enzyme protéolytique produite par fermentation d'*Aspergillus oryzae*. Cette enzyme a une activité principalement d'exoprotéase. Son numéro EC est 3.4.11.1. Le cofacteur de cette enzyme est Zn^{2+} . Les conditions optimales de travail de Peptidase AO sont une gamme de températures comprises entre 30°C et 60°C avec un optimum à 50°C et un pH pouvant varier de 5,5 à 8,5 avec un optimum à 7. Peptidase AO possède une activité de 500 LAPU/g (Bio-Cat product information).

Protamex

Protamex est une enzyme industrielle produite par génie génétique par Novozymes AS. Il s'agit d'un complexe peptidique de la classe des hydrolases développé par plusieurs espèces de *Bacillus* pour l'hydrolyse des protéines destinées à l'industrie alimentaire. Contrairement à d'autres endoprotéases, Protamex a été élaborée de façon à ne pas générer de peptides amers, même lorsque les degrés d'hydrolyses sont faibles. Protamex correspond à un mélange des enzymes Alcalase et Neutrase. Du fait du mélange enzymatique présent dans ce complexe, Protamex possède les numéros enzymatiques suivants : EC 3.4.21.62 et EC 3.4.24.28. Protamex est standardisée d'après le fournisseur en unité Anson par g (AU/g). L'activité déclarée de Protamex est de 1,5 AU/g. Les conditions optimales sont un pH compris entre 5,5 et 7,5 et une température comprise entre 35 et 60°C. Protamex peut être inactivée par chauffage à 85°C pendant 10 min lorsque le pH est de 8. (Dumay, 2006).

5.2.2.2 Conditions d'hydrolyse

Les différents paramètres d'hydrolyse ont été testés, et ceux retenus ont été utilisés dans l'étude présentée ici et sont décrits dans le Tableau VIII.

Tableau VIII : paramètres d'hydrolyse utilisés pour la création de la librairie d'extraits

Paramètres	Valeurs
Temps	6h
Température	50°C
pH	8
Rapport enzyme/substrat	0,1% (p/p)
Rapport eau/substrat	50% (p/p)
Agitation	300 rpm

Le pH est fixé à 8 et conservé à cette valeur pendant la réaction d'hydrolyse par ajout d'hydroxyde de sodium (NaOH, 1M). A la fin de chaque hydrolyse, les enzymes ont été inactivées par chauffage à 90°C pendant 15 min. Les hydrolyses ont été réalisées en plaçant les échantillons dans des réacteurs enzymatiques de 7,5 L munis de parois chauffantes et de différentes sondes de contrôle des paramètres (pH, température). L'enzyme a été ajoutée lorsque la température et le pH de consigne sont atteints. L'ensemble du système BioFlo 110, New Brunswick Scientific (Figure 24) était géré sous assistance informatique (NBS Biocommand Plus software, version 3.3 Plus, NewBrunswick Scientific Co. Inc., USA). Les différentes étapes d'extraction assistée par hydrolyse enzymatique ont été représentées dans la Figure 25.

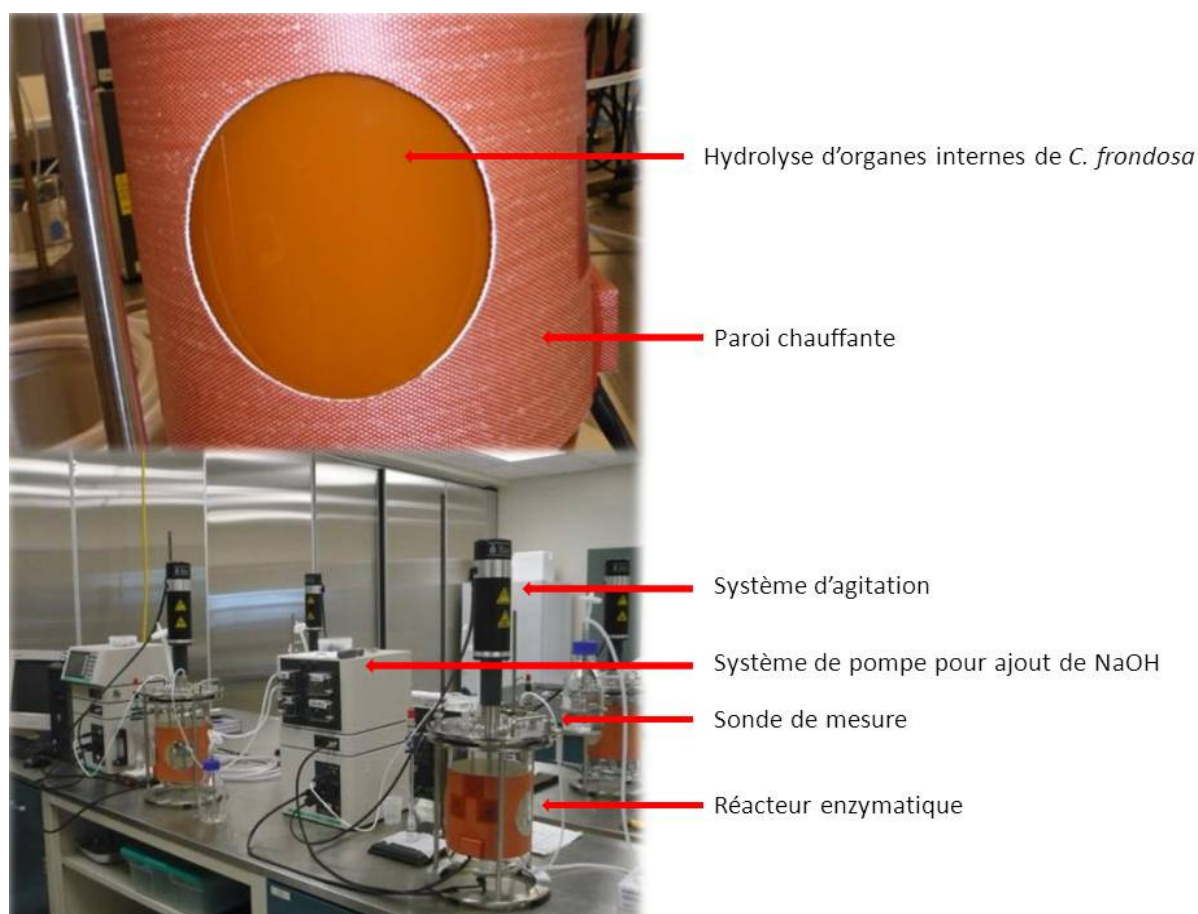


Figure 24 : Plateforme d'hydrolyse enzymatique au sein du laboratoire Pêche et Produits Marins de l'IRZC (photographie L. Tripoteau, 2012)

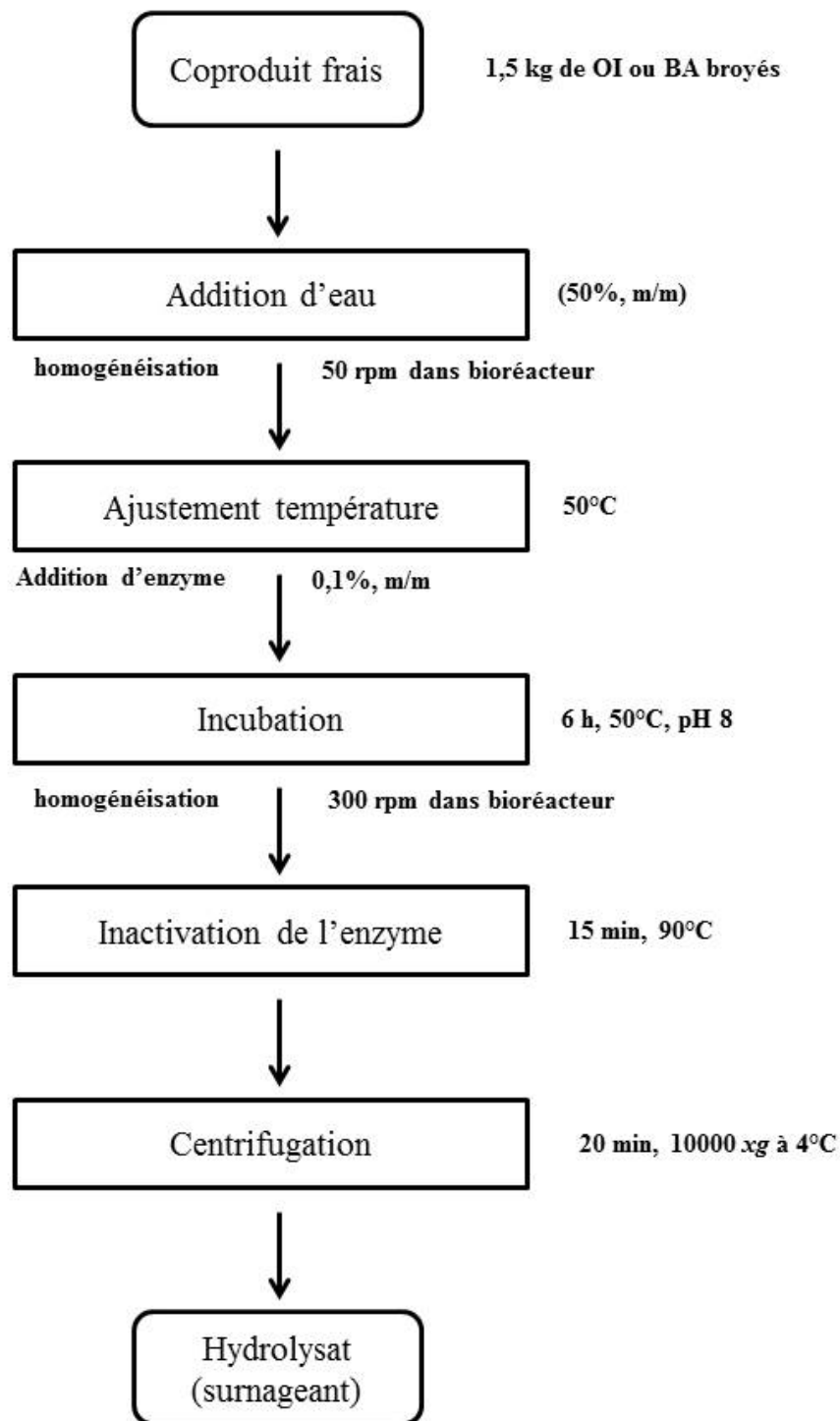


Figure 25 : Organigramme de l'extraction assistée par hydrolyse enzymatique de coproduits de *C. frondosa* (OI : Organes Internes ; BA : Bulbes Aquapharyngés)

5.3 Activités biologiques

5.3.1 Cellules Vero (ATCC : CCL 81)

Cette lignée cellulaire correspond à des cellules fibroblastiques de rein de singe vert (*Cercopithecus aethiops*), en culture continue. C'est une lignée adhérente, garantie stérile, établie en 1962 par Yasumara et Kawakita (Yasumara & Kawakita, 1963). Son taux de croissance est de 1 pour 20 en 7 jours, lorsque les cellules sontensemencées à raison de 3.10^5 cellules/mL. Les cellules Vero possèdent un nombre de chromosomes et/ou une morphologie anormale (aneuploïde). Elles présentent des propriétés spécifiques les différenciant des cellules normales, en particulier un haut potentiel multiplicatif. Cette lignée cellulaire est très sensible à de nombreux virus, dont le virus *Herpes simplex* de type 1, elle est donc adaptée pour l'évaluation d'activité anti-VHS-1.

5.3.1.1 Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé pour la croissance et l'entretien des cellules est le milieu Minimal Essential Medium (MEM) de Eagle, modifié avec des sels de Earle et des acides aminés non essentiels (Eurobio). Ce milieu est tamponné par du bicarbonate de sodium (NaHCO_3) 7,5% (Sigma) et ajusté à un pH de $6,9 \pm 0,1$ sous CO_2 . Stérilisé par filtration sur membrane de $0,22 \mu\text{m}$, le milieu est alors réparti stérilement en flacons de 500 mL, conservé à 37°C pendant 24 h puis à température ambiante pendant 48 h et enfin stocké à 4°C si aucune contamination n'a été décelée. Au moment de l'utilisation, le milieu est enrichi par l'addition de 8% de Sérum de Veau Fœtal (SVF, Eurobio) (MEM 8% SVF), inactivé 40 min au bain-marie à 56°C et filtré sur membrane $0,22 \mu\text{m}$. A ce milieu est ensuite ajouté 1% de glutamine (200 mM ; Eurobio), nécessaire pour l'obtention d'une culture satisfaisante de cellules de mammifères. Le milieu est également complété à 1% par les antibiotiques et les antifongiques suivants : de la pénicilline (10 000 d'unités/mL ; Sigma), de la streptomycine (10 mg/mL ; Sigma) et de la colimycine (10 000 d'unités /mL ; Sigma), afin de réduire les contaminations par les bactéries et les champignons. Les solutions d'antibiotiques ont été préalablement préparées dans 200 mL de solution phosphatée et réparties en aliquots de 5 mL.

La solution phosphatée est préparée pour 5 L, à partir de chlorure de sodium (40 g ; Sigma), de chlorure de potassium (1 g ; Sigma), de phosphate disodique (14,5 g ; Sigma), de phosphate monopotassique (1 g ; Sigma) et d'eau distillée (5 L). Cette solution phosphatée est stérilisée 20 min à 120°C et conservée à 4°C avant utilisation.

5.3.1.2 *Entretien des cellules Vero*

Les cellules Vero sont cultivées dans 30 mL de milieu nutritif MEM 8% SVF complété, puis incubées à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂, en monocouche cellulaire, dans des flacons de 75 cm² (VWR). Le pH du milieu est maintenu à 7,4 (indicateur de pH : rouge de phénol) grâce au système tampon CO₂/HCO₃⁻ du milieu et renforcé par l'atmosphère enrichie à 5% de CO₂ (système tampon avec HCO₃⁻). Le CO₂ n'intervient pas seulement au niveau du pH mais également sur la prolifération cellulaire au niveau de la biosynthèse des acides puriques et pyrimidiques. Enfin, l'atmosphère nécessite d'être saturée en vapeur d'eau afin de prévenir l'évaporation et donc l'augmentation de l'osmolarité du milieu. Les cellules d'un flacon doivent être multipliées lorsque le tapis cellulaire est confluent, soit 2 fois par semaine. Le milieu de culture est éliminé et le tapis cellulaire est lavé avec la solution phosphatée (afin de favoriser l'action de la trypsine ensuite ajoutée). Deux mL de trypsine (Eurobio, Trypsine / EDTA : 0,5 g/L / 0,2 g/L) sont alors ajoutés et laissés en contact avec le tapis cellulaire pendant une minute à température ambiante. Puis, après avoir enlevé l'excès de la solution de trypsine, le flacon est placé 5 à 10 min à 37°C jusqu'à complète dissociation du tapis cellulaire. Les cellules agglomérées sont séparées par aspirations et rejets de 6 mL de milieu MEM 8% SVF. Les cellules décollées sont ensuiteensemencées à raison de 2 mL de suspension cellulaire par nouveaux flacons de 75 cm² (1 flacon en 3 flacons) dans 30 mL de milieu MEM 8% SVF. Chaque flacon, après l'entretien des cellules, doit contenir en moyenne 350 000 cellules/mL.

5.3.1.3 Conservation des cellules Vero

Une culture de cellules Vero en croissance exponentielle (~ 25 à 30 h), à moins de 10 repiquages est dissociée par ajout de trypsine et reprise par 4 mL de SVF pur. Les cellules en suspension homogène sont alors distribuées dans des cryotubes à raison de 1 mL par cryotube. Cette opération s'effectue à froid dans de la glace. En parallèle, une solution de diméthylsulfoxyde (DMSO, Sigma) 20% (agent cryoprotecteur), est préparée dans du milieu MEM 8% SVF. Un mL de cette solution de DMSO 20% est rajouté goutte à goutte sur les cellules précédemment déposées dans les cryotubes.

Une fois les cryotubes remplis de cellules dans le DMSO (6.10^6 cellules dans 2 mL au final), ils sont placés 1 h à -30°C avant d'être conservés à -80°C pendant 24 h puis dans de l'azote liquide (-196°C) jusqu'à utilisation.

5.3.1.4 Décongélation et mise en culture des cellules

La décongélation des cellules doit s'effectuer rapidement dans un bain-marie à 37°C . La décongélation doit être effectuée de façon partielle uniquement, car une décongélation totale à température ambiante provoquerait un contact trop long du DMSO, toxique envers les membranes cellulaires. Les 2 mL de cellules Vero décongelées sont ajoutés à 30 mL de milieu MEM 8% avant d'être centrifugés à 500g pendant 10 min à 4°C (Jouan MR22i). Une fois le surnageant éliminé, le culot cellulaire obtenu est repris par 6 mL de milieu MEM 8% SVF dans un flacon de 25 cm^2 et placé dans l'étuve à 37°C , sous 5% de CO_2 . Le milieu est renouvelé au bout d'une journée de culture. Quand les cellules ont atteint leur stade de confluence (3 à 4 jours), leur trypsination est nécessaire afin de les transférer dans un flacon de 75 cm^2 ajouté à 30 mL de milieu MEM 8% SVF.

5.3.2 Le Virus *Herpes Simplex*, VHS-1

La souche sauvage 17 utilisée de VHS-1, ACVs (Acyclovir) et PFAs (Phosphonoformic Acid), a été fournie par le Professeur Agut (Laboratoire de Dynamique, épidémiologie et traitement des infections virales de la Pitié Salpêtrière, Paris).

5.3.2.1 Préparation du stock viral

Une fois le milieu d'une suspension de cellules Vero à confluence (10^5 cellules/mL dans un flacon de 75 cm^2) éliminé, le tapis cellulaire est repris dans 5 mL de milieu MEM 8% SVF préalablement inoculé par 500 μL de la suspension virale stock. Le flacon est ensuite placé 2 h à 37°C sous 5% de CO_2 . Ce temps d'incubation est nécessaire pour que le virus puisse s'adsorber sur la membrane cellulaire avant de pénétrer dans la cellule et de s'y multiplier. Le milieu est ensuite éliminé et remplacé par 30 mL de milieu MEM 8% SVF, afin d'enlever le surplus de suspension virale. Après 3 à 4 cycles de multiplication virale (3 jours), le flacon subit alors 2 cycles successifs de congélation et décongélation pour compléter l'éclatement des cellules et ainsi libérer les virions intracellulaires. Une fois le surnageant prélevé, la suspension virale subit une clarification par centrifugation (10 000g, 10 min à 4°C ; Jouan MR22i). La suspension virale de stock ainsi obtenue est alors répartie en aliquots de 1 mL dans des cryotubes, puis congelée à -80°C .

5.3.2.2 Détermination du titre infectieux de la suspension virale stock

Deux méthodes sont employées en parallèle pour déterminer le titre infectieux d'un virus :

- (Reed & Muench, 1938)
- Viabilité cellulaire par coloration au rouge neutre

Le principe du titrage viral est de dénombrer les particules virales capables d'infecter des cellules permissives par unité de volume. Le titrage viral est réalisé sur des plaques de microtitration de 96 puits. Une suspension de 100 μL de cellules Vero à 350 000 cellules/mL est déposée dans chaque puits, ajouté de 50 μL de milieu MEM 8% SVF. Deux colonnes de témoins cellulaires sont préparées à partir de 100 μL de suspension cellulaire et 100 μL de milieu MEM 8% SVF. Une série de dilutions au 10^{ème} est réalisée à partir de la suspension de stock viral et 50 μL sont distribués par puits à raison de 10 réplicats par dilution. Après inoculation du virus, les microplaques sont incubées 72 h à 37°C sous 5% de CO_2 , permettant 3 à 4 cycles de multiplication du virus *Herpes* (Figure 26).

L'effet cytopathique du virus herpétique s'exprime par un gonflement et un arrondissement des noyaux des cellules qui prennent un aspect globuleux ainsi qu'une organisation des cellules en chapelet. La dose infectieuse 50% (DI₅₀) est la dilution produisant un effet cytopathique total dans 50% des essais.

dilution											TC	TC
10-1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
10-2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
10-3	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
10-4	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
10-5	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
10-6	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
10-7	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
10-8	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

Une ligne par dilution :

100 µL de suspension cellulaire
50 µL de milieu MEM 8% SVF
50 µL de suspension virale stock

Deux colonnes témoins cellules :

100 µL de suspension cellulaire
100 µL de milieu MEM 8% SVF

Figure 26 : Organisation de la microplaque pour la titration du virus. TC : témoin cellule ; dilution : dilution de la suspension virale stock.

5.3.2.3 Titration selon la méthode de Reed et Muench (1938)

Cette méthode des dilutions limites, permet de réaliser le calcul de la dose infectieuse à 50%. Comme le nombre d'essais est en pratique limité, Reed et Muench préconisent d'augmenter artificiellement le nombre d'essais par dilution en utilisant le procédé des totaux cumulatifs (Tableau IX): Si un effet positif est obtenu à une dilution, la réponse sera également positive pour les dilutions inférieures. Inversement, si un effet est négatif à une dilution, il sera semblable aux dilutions supérieures. Les pourcentages de mortalité sont calculés pour chaque dilution. Si le point 50% ne correspond pas exactement à l'une des dilutions, sa distance proportionnelle (**d**) à la dilution immédiatement inférieure est calculée selon la formule : $(A-50) / (A-B)$; A étant le pourcentage de mortalité à la dilution immédiatement supérieure et B le pourcentage de mortalité à la dilution immédiatement inférieure.

Le logarithme du titre infectieux est le logarithme de la dilution qui donne un pourcentage d'effet positif immédiatement supérieur à 50% avec la distance proportionnelle multipliée par le logarithme du facteur de dilution. A partir de la valeur du titre infectieux de la suspension virale, il est possible de déterminer la multiplicité d'infection MOI (Multiplicity Of Infection). Elle correspond à la dose infectieuse divisée par le nombre de cellules par mL et intervient dans l'évaluation de l'activité antivirale :

$$\text{MOI} = \text{DI}_{50}/\text{mL} / (\text{nombre de cellules Vero}/\text{mL})$$

Le titre infectieux utilisé lors de ces travaux est de $2.10^{7,57}$ DI₅₀/mL

Tableau IX : Exemple de calcul du facteur (d) utilisé pour la détermination du titre infectieux de VHS-1 selon la méthode de Reed et Muench (1938)

Dilutions	Nombre de puits contenant des cellules		Somme des puits contenant des cellules		Taux de mortalité	%	Position de d pour % > 50%
	mortes	vivantes	mortes	vivantes			
10 ⁻¹	10	0	61	0	61/61	100	
10 ⁻²	10	0	51	0	51/51	100	
10 ⁻³	10	0	41	0	41/41	100	
10 ⁻⁴	10	0	31	0	31/31	100	
10 ⁻⁵	10	0	21	0	21/21	100	
10 ⁻⁶	9	1	11	1	11/12	92	d
10 ⁻⁷	2	8	2	9	2/11	18	
10 ⁻⁸	0	10	0	19	0/19	0	

$$\begin{aligned} \text{Calcul : } d &= (A-50) / (A-B) \\ &= (92-50) / (92-18) \\ &= 0,57 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Log DI}_{50} &= \text{Log } 10^{(\text{dilution de } d)} + d \\ &= \text{Log } 10^6 + 0,57 \\ &= 6 + 0,57 \\ &= 6,57 \end{aligned}$$

Pour 50 µL le titre est de $10^{6,57}$
Pour 1 mL le titre viral est de $2 \times 10^{7,57}$

5.3.2.4 Titration par mesure de la viabilité cellulaire : coloration au rouge neutre

Le principe de ce dosage repose sur la coloration des cellules par un colorant vital, le rouge neutre, qui est ensuite extrait par un tampon. Le colorant va diffuser de façon homogène dans le solvant. Les cellules vivantes sont colorées et la lecture de la Densité Optique à 540 nm (DO_{540} nm), correspondant à la longueur d'onde d'absorption maximale du rouge neutre, est faite au spectrophotomètre UV-visible (SpectraCount™, microplate photometer, Packard). Le nombre de cellules vivantes étant proportionnel à la DO_{540} nm, celle-ci est utilisée pour exprimer les résultats (McLaren *et al.*, 1983; Langlois *et al.*, 1986).

Coloration : La solution, conservée au froid et à l'abri de la lumière, est préparée à partir de 0,15 g de rouge neutre (Fluka Chemika) dans 100 mL de sérum physiologique (pH 5,5). Après 72 h d'incubation cellulaire, 50 μ L de rouge neutre sont introduits dans chaque puits. Les plaques sont ensuite incubées 45 min à 37°C.

Lavage : Après incubation, les plaques sont vidées et 100 μ L de PBS (Phosphate Buffered Saline) sont ajoutés dans chaque puits afin de laver le rouge neutre sur les parois des puits.

Extraction : le colorant vital est élué par extraction au tampon citrate-éthanol. Ce tampon est préparé à partir d'un volume d'éthanol absolu et d'un volume de tampon Sorensen (V/V ; solution A : 21 g d'acide citrique, 200 mL NaOH 1N qsp 1 L d'eau / solution B : HCl 0,1 N).

Lecture des résultats : Après homogénéisation des cellules dans chaque puits, les plaques sont lues au spectrophotomètre UV-visible (SpectraCount™, microplate photometer, Packard) à la longueur d'onde de 540 nm. Les moyennes des densités optiques obtenues sont déterminées pour chaque série d'évaluation.

5.4 Evaluation des activités biologiques

5.4.1 Activité cytotoxique

5.4.1.1 Evaluation de l'activité par viabilité cellulaire (Rouge neutre)

Une suspension cellulaire de 350 000 cellules/mL de cellules Vero est distribuée dans les 96 puits d'une plaque de microtitration à fond plat, à raison de 100 µL par puits. Pour chaque puits, sont ensuite ajoutés aux cellules, 50 µL d'extraits à tester à différentes concentrations (4 puits de réplicats par concentration). Une colonne témoin est réalisée. Une colonne témoin cellule est composée de 10 puits contenant chacun 100 µL de suspension cellulaire et de 100 µL de milieu MEM 8% SVF. Chaque microplaque est incubée pendant 72 h à 37°C sous atmosphère 5% CO₂. Après 72 h une observation au microscope inversé (Gx100, Olympus CK2) des tapis cellulaires est réalisée avant d'arrêter le test, selon la méthode de coloration au rouge neutre.

5.4.1.2 Evaluation de la cytotoxicité par détermination de la Concentration Cytotoxique à 50%

La Concentration Cytotoxique à 50% (CC₅₀) du produit à tester correspond à la concentration de ce produit capable d'inhiber 50% de la croissance cellulaire. L'évaluation de l'activité cytotoxique est effectuée en triplicatas. Dans les puits correspondants à l'évaluation de la cytotoxicité sont ajoutés 50 µL de milieu MEM 8% SVF aux 100 µL de cellules Vero et 50 µL d'extrait. La CC₅₀ est évaluée par la méthode du rouge neutre (McLaren *et al.*, 1983) dans chaque puits de la plaque de microtitration (Nunc). Après coloration, une lecture au spectrophotomètre UV visible à 540 nm est effectuée de la même manière que pour la « titration virale par mesure de la viabilité cellulaire : coloration au rouge neutre ». Les résultats sont exprimés en pourcentage de destruction cellulaire et calculés selon la formule suivante :

Calcul des résultats

$$\% \text{ destruction} = \frac{(\text{DO}_{\text{témoin cellules}} - \text{DO}_{\text{cellules+drogue}})}{\text{DO}_{\text{témoin cellules}}} \times 100$$

5.4.2 Activité antivirale

5.4.2.1 Evaluation de l'activité par viabilité cellulaire (Rouge neutre)

Une suspension cellulaire de 350 000 cellules/mL de cellules Vero est distribuée dans les 96 puits d'une plaque de microtitration à fond plat, à raison de 100 µL par puits. Pour chaque puits, sont ensuite ajoutés aux cellules, 50 µL d'extraits à tester à différentes concentrations (4 puits de répliquats par concentration). La drogue de référence (Acyclovir) est associée à chaque essai (50 µL par puits à différentes concentrations à la place des extraits (5 ; 1 ; 0,5 ; 0,1 et 0,05 µg/mL, 4 puits par concentration). Deux colonnes témoins sont réalisées. Une colonne témoin cellule est composée de 10 puits contenant chacun 100 µL de suspension cellulaire et de 100 µL de milieu MEM 8% SVF. Une colonne témoin virus à la MOI de 0,01 DI50/cellules est composée de 100 µL de suspension cellulaire, 50 µL de suspension virale et 50 µL de milieu MEM 8% SVF. Chaque microplaque est incubée pendant 72 h à 37°C sous atmosphère 5% CO₂. Après 72 h (2-3 cycles de multiplication virale), une observation au microscope inversé (Gx100, Olympus CK2) des tapis cellulaires est réalisée avant d'arrêter le test, selon la méthode de coloration au rouge neutre. La microplaque est schématiquement divisée en 2 afin d'évaluer d'une part la cytotoxicité par la mesure de la concentration cytotoxique à 50% (CC₅₀) et d'autre part l'activité antivirale par la mesure de la concentration effective à 50% (CE₅₀) (Figure 27).

Composé testé à différentes concentrations										TV	TC	
CC ₅₀	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
CE ₅₀	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

TC : témoin cellule ; TV : témoin virus ; CC₅₀ : concentration cytotoxique, engendrant 50% de destruction cellulaire ; CE₅₀ : concentration effective, permettant d'obtenir 50% de protection cellulaire vis-à-vis du virus. Chaque composé est testé à 10 concentrations à raison de 4 puits pour déterminer la CC₅₀ et 4 puits pour la CE₅₀

Figure 27 : Organisation de la microplaque pour les évaluations d'activité antivirale et de cytotoxicité

L'évaluation de la cytotoxicité par détermination de la Concentration Cytotoxique à 50% (CC₅₀) est réalisée de la même manière que « Activité cytotoxique ».

5.4.2.2 *Evaluation de l'activité anti-VHS-1 des extraits sur les cellules Vero par détermination de la concentration effective à 50% (CE₅₀)*

La concentration effective antivirale 50% (CE₅₀) est exprimée comme la concentration de l'extrait qui diminue de 50% l'effet cytopathique du virus (50% de protection cellulaire). Afin de mettre en évidence l'activité anti-VHS-1 des différents extraits, une suspension virale est préparée avec une multiplicité d'infections (MOI) de 0,01 DI₅₀/cellule et un titre viral de 2x10^{7,57} DI 50/mL pour 350 000 cellules/mL. Dans les puits correspondants à l'évaluation de l'activité antivirale sont ajoutés 50 µL de suspension virale à la MOI de 0,01 DI₅₀/cellule aux 100 µL de cellules Vero et 50µL d'extrait. Les mesures d'activité antiherpétique sont arrêtés et lus selon la méthode de coloration au rouge neutre (Rawls, 1992; Fleury, 1993). Les résultats sont exprimés en pourcentage de protection cellulaire et calculés selon la formule suivante :

Calcul des résultats

$$\% \text{ protection} = \frac{(\text{DO}_{\text{cellules+virus+drogue}} - \text{DO}_{\text{témoin virus}})}{\text{DO}_{\text{cellules+drogue}} - \text{DO}_{\text{témoin virus}}} \times 100$$

5.4.2.3 *Acyclovir : substance antiherpétique de référence*

L'Acyclovir (Zovirax®) est utilisé comme antiviral de référence dans notre étude. Ce produit est un inhibiteur de l'ADN polymérase qui agit uniquement dans les cellules dans lesquelles les herpèsvirus sont en cours de répllication. Il s'agit d'un dérivé nucléosidique d'acycloguanidine possédant une base guanine (9-(2 hydroxyéthoxyméthyl)guanine) et où le sucre est remplacé par une chaîne hydrocarbonée acyclique. Cette molécule est active contre le virus sous forme tri-phosphorylée. La phosphorylation est effectuée par la thymidine kinase, produite en grande quantité par le virus au cours de la phase de répllication.

Ainsi modifiée, la molécule peut participer à l'inhibition compétitive de l'enzyme de réplication, l'ADN polymérase de VHS-1. L'acycloguanosine (ACG) est la première substance anti-VHS-1 spécifique dépourvue d'effet toxique sur la cellule (Elion, 1993; Fleury, 1993).

5.5 Méthodes de caractérisation biochimique

L'analyse de la composition biochimique en protéines, cendres, humidité et lipides des extraits efficaces a été menée au sein des Laboratoires et services d'analyses de l'IRZC. La composition en sucres neutres a été réalisée au sein du LBCM. La composition en acides aminés a été réalisée au sein du laboratoire BIORAFhe (Bioressources et Bio-raffinerie par hydrolyse enzymatique) du centre Ifremer de Nantes. La détermination de la composition en **protéines, humidité et cendres** ont été réalisés selon les méthodes officielles A.O.A.C (Association of Official Analysts Chemists) 981.10, 952.08 et 938.08 respectivement. La détermination de la composition en **lipides** a été réalisée selon la méthode de Folch (Folch *et al.*, 1957). La détermination de la composition en **sucres neutres** a été réalisée selon la méthode décrite par Dubois *et al.* (1956). Les sucres neutres sont dosés au phénol sulfurique. Cette méthode est basée sur la réduction des sucres neutres en dérivés chromophores de 5-hydroxymethylfurfural par le phénol donnant une coloration jaune. Une gamme étalon de glucose anhydre a été réalisée, de 0 à 100 µg/mL. 50 µL de phénol à 75% dans de l'eau (v:v) sont ajoutés à 1,0 mL de standard ou d'échantillon puis homogénéisés par agitation. Un volume de 2,5 mL d'acide sulfurique pur est ensuite ajouté brutalement dans le mélange, provoquant une réaction exothermique. Les échantillons sont ensuite refroidis dans de l'eau glacée pendant 5 minutes puis incubés 10 minutes à température ambiante et 10 minutes au bain marie à 30°C. Trois réplicats sont réalisés. La mesure de DO est faite à 490 nm contre un blanc échantillon.

La composition en **acides aminés totales et acides aminés libres** a été déterminée après hydrolyse acide (HCl, 6M) des lyophilisats pendant 18h à 118°C. Les échantillons sont ensuite séchés sous flux d'azote puis dilués par ajout de 2,5 mL d'eau. L'analyse des acides aminés a été réalisée selon la procédure EZ faast™ qui consiste en une extraction en phase solide, suivie d'une dérivatisation et d'une extraction liquide/liquide.

L'extraction en phase solide est réalisée via une résine permettant le greffage des acides aminés et la non-rétention des autres composés. Les acides aminés greffés sont extraits de la résine et rapidement transformés dans une solution aqueuse à l'aide d'un réactif à température ambiante. Les acides aminés dérivatisés vont migrer de manière concomitante vers la phase organique pour une purification supplémentaire de ces derniers. Un aliquot de la phase organique est ensuite analysé en chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS). Le spectromètre de masse utilisé est un Agilent 5973 series network mass selective detector (Agilent, CA, USA). La colonne utilisée est une Zebron ZB-AAA GC spécifique des hydrolysats protéiques (Température max : 320/340°C). La quantification des acides aminés est réalisée selon leurs facteurs de réponse relatifs à l'étalon interne Norvaline ajouté à une concentration de 200 µmol/L (Soufi-Kechaou *et al.*, 2012).

5.6 Méthodes de fractionnement par poids moléculaire

L'échantillon a été solubilisé à 1mg/mL dans de l'eau ultrapure. Ce fractionnement est accompli par des concentrateurs centrifuges (Vivaspin 2, Sartorius) à différents seuils de coupure. Les centrifugations ont été réalisées sur des volumes de 2 mL pendant 10 min à 12 000g pour les membranes de 2, 5, 10, 30 et 50 KDa (PES : PolyEtherSulfone) et à 9000g pour la membrane de 100 KDa (PES). Sept fractions ont été obtenues (<2 kDa, 2-5 kDa, 5-10 kDa, 10-30 kDa, 30-50 kDa, 50-100 kDa, >100 kDa) et ont été séchées par lyophilisation.

CHAPITRE I

RESULTATS & DISCUSSION

6 Résultats & discussion

6.1 Librairie d'extraits

La phase de dissection a permis de mettre en évidence que la proportion des coproduits issus de *C. frondosa* représentait environ la moitié du poids frais de l'animal entier. Les parties majoritaires étant les organes internes ($15 \pm 3\%$ du poids frais) et le bulbe aquapharyngé ($13 \pm 2\%$ du poids frais), ils représentent une part non négligeable de l'animal. L'ensemble des extraits obtenus par extraction, par solvants ou par hydrolyses enzymatiques, a permis de constituer une librairie de 28 échantillons de coproduits majeurs de *C. frondosa* préparés à partir d'organes internes et bulbes aquapharyngés. Les coproduits non traités (témoin) ont également été considérés et inclus dans cette librairie d'extraits présentée dans le Tableau X.

Les différents paramètres d'hydrolyse (ratio enzyme/substrat, pH et température) sélectionnés au cours de cette étude sont les valeurs moyennes des conditions optimales déclarées par les fournisseurs d'enzymes. Concernant le temps d'hydrolyse, des études ont montré que, le Degré d'Hydrolyse (DH) de l'Alcalase, la Bromélaïne, Flavourzyme et Protamex atteignait une valeur plateau après 6h. Par conséquent, ce temps a été sélectionné pour l'ensemble des hydrolyses. (Dumay, 2006 ; Ghanbari *et al.*, 2012 ; Soufi-Kechaou *et al.*, 2012,)

Tableau X : Librairie d'extraits de coproduits de *C. frondosa* : extraits par solvants, hydrolyses enzymatiques contrôlées et non traités.

Organe	Traitement	Type d'extraction
Bulbe Aquapharyngé (BA)	Extrait brut	Aucune
	Hydrolyse enzymatique	Alcalase
		Bromélaïne
		Flavourzyme
		Fungal protease
		Neutral protease
		Papaïne
		Peptidase AM
		Peptidase AO
		Protamex
	Extraction par solvant	Acétone
		Hexane
		Méthanol
		Eau
Organes Internes (OI)	Extrait brut	Aucune
	Hydrolyse enzymatique	Alcalase
		Bromélaïne
		Flavourzyme
		Fungal protease
		Neutral protease
		Papaïne
		Peptidase AM
		Peptidase AO
		Protamex
	Extraction par solvant	Acétone
		Hexane
		Méthanol
		Eau

6.2 Evaluation de l'activité antivirale de la librairie d'extraits

6.2.1 Evaluation de la cytotoxicité

L'évaluation de la cytotoxicité de la librairie d'extraits a été réalisée par la méthode au rouge neutre par viabilité cellulaire pendant 72 h. Elle permet de détecter la fonctionnalité des lysosomes. Cette méthode est couramment utilisée dans la recherche de composés antiherpétiques d'origine marine (Bergé *et al.*, 1999 ; Maier *et al.*, 2001 ; Olicard *et al.*, 2005). Aussi, la gamme de concentration de l'extrait n'induisant pas de toxicité à la cellule hôte est estimée. La concentration cytotoxique à 50% (CC₅₀) est déterminée pour chacun des extraits. Les résultats sont présentés dans le Tableau XI.

Bulbes aquapharyngés

La plupart des extraits de Bulbes Aquapharyngés (BA) ne sont pas cytotoxiques sur le modèle de cellules Vero. Les valeurs de CC₅₀ varient de 74,5 à plus de 500,0 µg/mL selon les extraits. Seulement 2 extraits obtenus après extraction solide-liquide ont montré une cytotoxicité (extrait hexane avec une CC₅₀ = 81,5 µg/mL et l'extrait au méthanol avec une CC₅₀ = 74,5 µg/mL). Aucun des hydrolysats évalués dans nos conditions n'a entraîné de modifications morphologiques des cellules ou de la densité cellulaire.

Organes internes

La CC₅₀ des Organes Internes (OI) varient entre 23,3 et plus de 500,0 µg/mL. La moitié d'entre eux sont cytotoxiques dans les concentrations testées. L'évaluation de la cytotoxicité des extraits obtenus par solvants a montré que les extraits très polaires étaient toxiques (extrait au méthanol avec une CC₅₀ = 56,7 µg/mL et l'extrait à l'eau avec une CC₅₀ = 96,3 µg/mL). La majorité des hydrolysats étaient également cytotoxiques (Hydrolysats Bromélaïne avec une CC₅₀ = 40,4 µg/mL ; Hydrolysats Fungal Protéase avec une CC₅₀ = 29,0 µg/mL ; Hydrolysats Neutral Protéase avec une CC₅₀ = 23,3 µg/mL ; Hydrolysats Papaïne avec une CC₅₀ = 69,6 µg/mL ; Hydrolysats Peptidase AO avec une CC₅₀ = 74,9 µg/mL).

La cytotoxicité des extraits isolés de Bulbes Aquapharyngés et plus spécialement des Organes Internes peut être expliquée par la présence de glycosides triterpéniques (Findlay et Yayli, 1992 ; Bahrami *et al.*, 2014).

En effet, ces molécules, essentiellement extraites par solvants alcooliques, ont été décrites chez plusieurs espèces d'holothuries comme cytotoxiques.

Par exemple, le Frondoside A isolé par solvant alcoolique à partir du tégument de *C. frondosa*, a montré une toxicité vis-à-vis des lignées cellulaires tumorales humaines THP-1 et HELA avec des CI_{50} (Concentration Inhibitrice à 50%) de 4,5 et 2,1 $\mu\text{g/mL}$ respectivement.

6.2.2 Evaluation de l'activité antivirale

L'évaluation de l'activité antiherpétique a été menée par viabilité cellulaire sur la librairie d'extraits à une multiplicité d'infection (MOI) de 0,001 DI_{50} /cellules pendant 72 h. Les résultats sont présentés dans le Tableau XI. La drogue de référence acyclovir (ACV), confère une protection à une Concentration Efficace à 50% (CE_{50}) de 0,2 $\mu\text{g/mL}$ vis-à-vis de VHS-1 avec un faible pourcentage de destruction cellulaire.

Bulbes aquapharyngés

Après 72 h de traitement, 7 extraits sur 9 obtenus par hydrolyse enzymatique du BA ont montré une activité antiherpétique avec des valeurs de CE_{50} comprises entre 7,2 et 170,9 $\mu\text{g/mL}$. Seul l'extrait à l'eau du Bulbe Aquapharyngé de *C. frondosa* a montré une activité antiherpétique avec une CE_{50} de 140,0 $\mu\text{g/mL}$. L'extrait de BA sans traitement (témoin) a également montré une efficacité antivirale ($CE_{50} = 75,0 \mu\text{g/mL}$).

Organes internes

Parmi les extraits d'Organes Internes, seul le contrôle (matière première sans traitement) a montré une activité vis-à-vis de VHS-1 (72,5 $\mu\text{g/mL}$).

Sur 28 extraits, 10 ont montré des activités antivirales. Les extraits de BA ont montré des activités plus efficaces que les extraits d'OI. Ce criblage a permis de mettre en évidence le caractère polaire des extraits actifs. En effet, seuls les hydrolysats et l'extrait aqueux de BA possèdent une activité antiherpétique sans montrer de toxicité sur les cellules.

Tableau XI : Evaluation de l'activité anti-VHS-1 à une MOI de 0,001 DI_{50} /cellules sur cellules Vero des extraits de la librairie d'extraits de coproduits de *C. frondosa*, par la méthode viabilité cellulaire au rouge neutre après 72 h d'incubation. L'Acyclovir (ACV) est utilisé comme drogue de référence. Valeurs de CC_{50} et de CE_{50} sont données avec l'écart type (n=4)

Organe	Traitement	Réactif	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
Bulbe Aquapharyngé (BA)	Extrait brut	Aucun	>500	75,0 \pm 2,1	
	Hydrolyse enzymatique	Alcalase	>500	15,2 \pm 2,5	
		Bromélaïne	>500	>250	
		Flavourzyme	>500	160,5 \pm 8,7	
		Fungal protease	>500	>250	
		Neutral protease	>500	12,5 \pm 3,1	
		Papaïne	>500	7,2 \pm 1,9	
		Peptidase AM	>500	45,3 \pm 5,1	
		Peptidase AO	>500	170,9 \pm 7,5	
		Protamex	>500	8,3 \pm 2,7	
		Extraction par solvant	Acétone	>500	>250
	Hexane		81,5 \pm 3,8	7,9 \pm 3,4	
	Méthanol		74,5 \pm 4,5	70,9 \pm 7,4	
	Eau chaude		>250	140,0 \pm 13,8	
	Organes Internes (OI)	Extrait brut	Aucun	>250	72,5 \pm 9,8
		Hydrolyse enzymatique	Alcalase	>500	>250
Bromélaïne			40,4 \pm 3,0	60,0 \pm 3,2	
Flavourzyme			>500	>250	
Fungal protease			29,0 \pm 3,0	10,4 \pm 1,5	
Neutral protease			23,3 \pm 3,1	14,0 \pm 4,0	
Papaïne			69,6 \pm 2,8	11,0 \pm 9,1	
Peptidase AM			>500	>250	
Peptidase AO			74,9 \pm 4,8	7,8 \pm 9,5	
Protamex			>500	>250	
Extraction par solvant		Acétone	>500	>250	
		Hexane	>500	>250	
		Méthanol	56,7 \pm 5,8	7,9 \pm 1,8	
	Eau chaude	96,3 \pm 7,3	33,2 \pm 4,8		
ACV	Aucun	Aucun	>500	0,2 \pm 0,1	

Dans une récente revue, Zhong *et al.* (2013) ont montré que sur 188 extraits de végétaux, d'animaux et de microorganismes, 162 (soit 86,2%) possédant une activité inhibitrice vis-à-vis de VHS-1 provenaient d'extraits à polarité élevée tels que les solvants aqueux, le méthanol, l'éthanol et l'acide acétique. Il apparaît donc que de nombreuses molécules anti-VHS-1 sont solubles dans les solvants polaires. En conséquence, il semble logique de concentrer nos recherches de composés antiherpétiques dans les extraits aqueux.

Les extraits efficaces retenus ont été obtenus par l'utilisation de 4 différentes protéases (Alcalase, Neutral Protéase, Papaine et Protamex) et possédant un mécanisme d'action commun. En effet, ces enzymes possèdent des activités endopeptidases permettant principalement la production de polypeptides ou de protéines, à la différence des exopeptidases qui génèrent préférentiellement des acides aminés libres. L'utilisation de la protéolyse enzymatique contrôlée permet, par exemple en condition douce, la libération de peptides bioactifs, alors que ceux-ci étaient inactifs au sein de la séquence aminée de la protéine parente (Batista, 2013). Dans notre étude, la phase aqueuse obtenue par hydrolyse enzymatique de BA de *Cucumaria frondosa* constitue un extrait prometteur dans la recherche de composés actifs contre le Virus *Herpes Simplex* de type 1.

Très peu d'études font état de l'activité antivirale d'extraits issus d'holothuries. Tsushima *et al.* (1996), ont montré que la Cucumariaxanthine C extraite de *Cucumaria japonica* possédait un effet inhibiteur sur l'activation du virus Epstein-Barr *in vitro*. Sur la même espèce, Grishin *et al.* (1991) ont mis en évidence que les glycosides triterpéniques, et plus spécifiquement le Cucumarioside A₂-2, pouvaient inhiber l'effet cytopathique induit par le Virus de la Stomatite Vésiculaire (VSV), le Poliovirus et d'autres virus sur lignées cellulaires. Selon Rodriguez *et al.* (1991), les holothurinosides de *Holothuria forskalii* à une concentration de 20 µg/mL pouvaient également inhiber l'effet cytopathique induit par VSV. Récemment, il a été démontré qu'un glycosaminoglycane extrait de *Thelenota ananas* représentait un réel potentiel à développer comme inhibiteur de l'entrée du VIH (Huang *et al.*, 2013 et Lian *et al.*, 2013). Les Liouvillosides A et B isolés du spécimen entier de *Staurococcus liouvillei* par extraction alcoolique (Maier *et al.*, 2001), les thyonosides A et B isolés du spécimen entier de *Thyone aurea* par extraction par solvants (Bonnard et Rinhard, 2004) et un extrait aqueux du tégument d'*Holothuria sp.* (Farshadpour *et al.*, 2014), présentent des activités antivirales vis-à-vis de VHS-1.

En effet, les glycosides triterpéniques de *Staurococcus liouvillei* ont montré un effet virucide à des concentrations inférieures à 10 µg/mL sur une souche KOS (souche Smith K.O. ; Smith, 1964) à 4×10^7 Unités Formant Plaque (UFP) pendant un essai d'une heure. La souche KOS est connue pour être moins virulente que la souche sauvage 17 utilisée dans notre étude (Macdonald *et al.*, 2012). L'extrait aqueux de *Holothuria sp.* a montré une activité antivirale intracellulaire avec une valeur de CI_{50} de 189,9 µg/mL.

En comparaison avec l'extraction par solvants organiques, l'hydrolyse enzymatique a donc permis l'obtention d'extraits antiherpétiques efficaces à partir de bulbe aquapharyngé de *Cucumaria frondosa*. De plus, cette méthode d'extraction offre l'avantage d'être une technique douce, sans étape d'élimination de solvants. Elle peut permettre également la valorisation de l'intégralité de la matière première en apportant de la valeur ajoutée aux rejets initialement non valorisés. Enfin, dans un contexte global de surexploitation des ressources biologiques marines, cette valorisation totale de la biomasse permet d'adopter une démarche éco-responsable (Kristinsson et Rasco, 2000 ; Guérard *et al.*, 2007 ; Thorkelsson *et al.*, 2012).

6.3 Compositions biochimiques des extraits efficaces

Les extraits efficaces sont sélectionnés, pour la suite de l'étude en fonction de leur efficacité, soit 4 hydrolysats de BA : Hydrolysats Papaïne ($CE_{50} = 7,2$ µg/mL), hydrolysats Protamex ($CE_{50} = 8,3$ µg/mL), hydrolysats Neutral Protéase ($CE_{50} = 12,5$ µg/mL) et l'hydrolysats Alcalase ($CE_{50} = 15,2$ µg/mL). L'analyse de la composition biochimique de ces 4 extraits a été réalisée. L'analyse de la composition de l'extrait de bulbe aquapharyngé sans traitement a également été effectuée. Les résultats en terme de composition biochimique sont présentés dans le Tableau XII.

Tableau XII : Composition biochimique des hydrolysats lyophilisés de bulbe aquapharyngé et de l'extrait de bulbe aquapharyngé lyophilisé sans traitement ; n.d.: non déterminé

Analyse	Extrait brut	Hydrolysats Alcalase	Hydrolysats Neutral Protease	Hydrolysats Papaïne	Hydrolysats Protamex
Protéines (%)	58,8	54,5	54,7	55,4	54,9
Humidité (%)	6,5	5,8	5,9	4,7	4,3
Cendres (%)	23,2	26,2	25,1	26,0	27,6
Lipides (%)	2,8	6,3	6,5	7,0	6,4
Sucres neutres (%)	n.d.	1,8	3,1	1,9	1,7

L'analyse de la composition n'a pas montré de différences significatives entre les extraits, à l'exception du contrôle (matière première sans traitement). En effet, une augmentation du taux de protéines et une faible diminution du taux de lipides ont été observés par rapport aux hydrolysats. La composition des extraits révèle un taux de protéines élevé avec une moyenne de 54,9% (par rapport au poids sec). Cette valeur est en accord avec l'étude de Mamelona *et al.* (2010) portant sur l'analyse d'hydrolysats de coproduits de *C. frondosa*. En effet, ces auteurs ont mis en évidence un taux de protéines moyen de 55%. De précédents travaux sur l'hydrolyse enzymatique de matrices marines mentionnent que la protéolyse n'entraîne pas de changements significatifs du taux de protéines mais a tendance à libérer des peptides de faible taille (Ravallec-Plé *et al.*, 2001).

L'évaluation de la composition en acides aminés totaux n'a pas montré de différences significatives entre les différents extraits. La composition moyenne des acides aminés totaux est présentée en 3 groupes en fonction de leur abondance : Inférieur à 4% : histidine (1,5%), méthionine (1,5%), phénylalanine (3,5%), lysine (2,3%), hydroxyproline (3,5%), et tyrosine (2,0%). De 4 à 8%: alanine (7,8%), thréonine (6,2%), valine (5,1%), isoleucine (4,7%), leucine (6,1%), et serine (7,5%). Supérieur à 8%: acide aspartique (10,7%), acide glutamique (12,4%), glycine (16,5%) et proline (8,6%).

Ces valeurs sont en accord avec les résultats obtenus lors d'une précédente étude de Zhong *et al.* (2007) sur la comparaison de la composition biochimique de différentes parties de *C. frondosa*, frais ou lyophilisés. Les acides aminés majeurs décrits sont ceux retrouvés dans notre étude. Cependant, le profil des acides aminés totaux du contrôle est sensiblement différent. En effet, le contrôle est riche en leucine (8,2%), phénylalanine (5,0%), glycine (25,8%) et alanine (10,4%), mais appauvri en acide aspartique (5,1%), acide glutamique (5,7%) et en sérine (5,5%). Dans nos conditions, la protéolyse enzymatique semble libérer des acides aminés à résidu carboxyle et au contraire fortement diminuer l'acide aminé neutre glycine.

Les taux de lipides des hydrolysats sont significativement similaires avec une moyenne de 6,6% (par rapport à la matière sèche). Ce taux est au moins deux fois plus élevé que l'extrait non traité. Cette différence peut être expliquée par la capacité du processus d'hydrolyse enzymatique à favoriser la libération de lipides dans la phase soluble. Dumay *et al.* (2009) ont mis en évidence une forte teneur en lipides dans la phase soluble lors de la protéolyse de coproduits de sardines.

Les taux de cendres mesurés dans les extraits ont montré des taux similaires avec une moyenne de 25,6%. Les données sur la composition en cendres de bulbes aquapharyngés d'holothuries sont plutôt rares, cependant le taux de cendres obtenus pour *C. frondosa* est plus élevé que les valeurs obtenues dans les viscères pour cette même espèce (7-11% : Mamelona *et al.*, 2010) et plus faible que les valeurs obtenues pour les téguments d'autres espèces d'holothuries retrouvées aux mêmes profondeurs avec une moyenne de 52% (Sibuet et Lawrence, 1981). Ces variations de taux de cendres peuvent être expliquées par la structure de leur anatomie interne, qui est plus ou moins riche en calcite selon l'organe considéré (Lambert, 1997).

Les teneurs en sucres neutres moyens sont de 1,8% pour les hydrolysats Alcalase, Papaine et Protamex. Ces teneurs sont similaires aux résultats retrouvés pour des espèces d'holothuries de même profondeur dans une étude comparant la composition biochimique d'holothuries d'eau peu profonde et d'holothuries d'origine abyssale (Sibuet et Lawrence, 1981). Les holothuries des abysses possèdent en effet un taux de matière organique beaucoup plus faible en raison d'un métabolisme ralenti à ces profondeurs.

Le taux retrouvé pour l'hydrolysat Neutral Protéase est cependant un peu plus élevé avec un taux de sucres neutres de 3,1%.

Des études sur les produits naturels ayant démontrés des activités antiherpétiques suggèrent que le mécanisme d'action principal était ciblé sur l'absorption et l'adsorption virale. Les autres mécanismes d'action reportés pour ces agents antiviraux d'origine naturelle seraient également l'inhibition de la réplication de l'ADN polymérase virale, l'inhibition de l'encapsidation, du relargage des particules virales, des récepteurs membranaires et leurs présentations aux effecteurs immunitaires (Zhong et al., 2013).

Les 4 hydrolysats sélectionnés possèdent un haut taux de protéines. Les peptides et nucléosides marins ont montré des activités antiherpétiques par inhibition de la synthèse protéique virale (Sagar *et al.*, 2010). Le nucléoside spongouridine est utilisé pour la synthèse de l'arabinoside adénine (Ara-A) rapidement transformé sous sa forme triphosphorylée, entraînant une inhibition de l'ADN polymérase virale et de la synthèse d'ADN des cellules infectées (Vo *et al.*, 2011). D'autres composés de classes chimiques différentes ont également été décrits. La Chondroïtine Sulfate Fucosylée (FuCS : Fucosylated Chondroitin Sulfate) retrouvée dans de nombreuses espèces d'holothuries a révélé d'intéressantes activités. Parmi ces activités, la FuCS extraite de *Thelenota ananas* possède une activité antivirale vis-à-vis du VIH. Ce FuCS est capable de bloquer l'entrée et la réplication virale sur des lignées cellulaires (cellules C8166 : expriment des marqueurs de lymphocytes T) et des isolats cliniques (Pomin, 2014).

Les polysaccharides sulfatés sont reconnus comme étant actifs sur VHS. Ces composés ont la capacité d'inhiber l'adsorption virale et/ou d'empêcher l'encapsidation dans la cellule hôte (de Jesus *et al.*, 2013). Les carraghénanes extraits des algues marines ont été identifiés comme puissants inhibiteurs de VHS-1 et VHS-2. Plusieurs études suggèrent que l'action antivirale de ces macromolécules est basée sur l'adsorption virale (Abad Martinez *et al.*, 2008). Les alcaloïdes ont démontré des activités antiherpétiques sur l'adsorption virale et l'inhibition de la synthèse protéique (Souza *et al.*, 2007). Des activités intéressantes vis-à-vis de VHS-1 et VHS-2 ont été rapportés sur des glycolipides. Le mécanisme d'action serait dû à la fixation de la glycoprotéine virale au glycolipide entraînant une dénaturation irréversible empêchant ainsi l'infection virale (El Baroty *et al.*, 2011).

Plusieurs molécules marines de classe chimique variée avec une large gamme de mécanismes d'action ont été rapportées comme agents antiviraux efficaces vis-à-vis de VHS-1. Cependant, l'analyse de la composition biochimique et les valeurs d'activités modulées selon la nature de l'enzyme utilisée suggèrent que les composés antiviraux présents dans les extraits efficaces pourraient être de nature protéique.

6.4 Cinétique d'activités antivirales des extraits efficaces

Les extraits efficaces ont été testés à 10 concentrations différentes allant de 0,25 à 250,00 µg/mL à une MOI de 0,01 DI₅₀/cellule. Après une période d'incubation de 48, 72 et 96h, l'évaluation de la viabilité cellulaire n'a montré aucune cytotoxicité des extraits dans la gamme de concentrations testées.

Les 4 hydrolysats ont démontré une efficacité certaine vis-à-vis de VHS-1. Les résultats sont présentés dans le Tableau XIII en comparaison à l'ACV.

Tableau XIII : Evaluation de l'activité anti-VHS-1 à une MOI de 0,01 DI₅₀/cellules d'extraits de bulbe aquapharyngé hydrolysé par : Alcalase (1), Neutral Protéase (2), Papaïne (3) et Protamex (4) par la méthode d'évaluation au rouge neutre après 48, 72 et 96h d'incubation. L'acyclovir est utilisé comme drogue de référence (ACV).

	48h		72h		96h	
	CC ₅₀ (µg/mL)	CE ₅₀ (µg/mL)	CC ₅₀ (µg/mL)	CE ₅₀ (µg/mL)	CC ₅₀ (µg/mL)	CE ₅₀ (µg/mL)
1	>500,0	20,4 ±3,2	>500,0	43,9 ±5,2	>500,0	150,4 ±8,2
2	>500,0	26,9 ±4,4	>500,0	36,9 ±0,5	>500,0	>500,0
3	>500,0	15,9 ±2,2	>500,0	25,2 ±4,8	>500,0	44,3 ±3,2
4	>500,0	52,2 ±5,8	>500,0	102,9 ±8,7	>500,0	144,9 ±7,3
ACV	>500,0	0,3 ±0,1	>500,0	0,3 ±0,1	>500,0	1,1 ±0,3

Après 48h d'incubation, les 4 extraits présentent une importante activité antivirale : hydrolysats Papaine ($EC_{50} = 15,9 \mu\text{g/mL}$) > hydrolysats Alcalase ($CE_{50} = 20,4 \mu\text{g/mL}$) > hydrolysats Neutral protéase ($CE_{50} = 26,9 \mu\text{g/mL}$) > hydrolysats Protamex ($CE_{50} = 52,2 \mu\text{g/mL}$). Après 72h d'incubation, les hydrolysats perdent de l'efficacité en contrôlant moins bien les nouvelles générations de virus mais demeurent actifs vis-à-vis de VHS-1: hydrolysats Papaine ($CE_{50} = 25,2 \mu\text{g/mL}$) > hydrolysats Neutral protease ($CE_{50} = 36,9 \mu\text{g/mL}$) > hydrolysats Alcalase ($CE_{50} = 43,9 \mu\text{g/mL}$) > hydrolysats Protamex ($CE_{50} = 102,9 \mu\text{g/mL}$).

Après 96h d'incubation, l'effet est accentué, les extraits sont moins efficaces. Trois hydrolysats sur 4 démontraient encore une activité vis-à-vis de VHS-1: hydrolysats Papaine ($CE_{50} = 44,3 \mu\text{g/mL}$) > hydrolysats Protamex ($CE_{50} = 144,9 \mu\text{g/mL}$) > hydrolysats Alcalase ($CE_{50} = 150,4 \mu\text{g/mL}$).

Il est intéressant de souligner que l'activité des extraits varie au cours du temps. En effet, les extraits contrôlent moins bien les nouvelles générations de particules virales. L'hydrolysats obtenu à partir de la Neutral Protéase reste actif jusqu'à 72h mais perd son efficacité après 72 h d'incubation. Les extraits semblent agir efficacement lors des premiers cycles de répliquions virales, mais après 96h d'incubation font difficilement face aux virions nouvellement formés avec une baisse de leurs activités (Mat R *et al.*, 2009).

Les résultats montrent que l'hydrolysats obtenu avec Protamex est le deuxième extrait le plus actif à une MOI de 0,001 $DI_{50}/\text{cellules}$ ($CE_{50} = 8,3 \mu\text{g/mL}$) après 72h d'incubation. Cependant à une MOI plus élevée de 0,01 $DI_{50}/\text{cellules}$, cet extrait devient moins efficace avec une $CE_{50} = 102,9 \mu\text{g/mL}$ pour la même gamme de concentrations testée et le même temps d'incubation. Cette observation peut être expliquée par une concentration plus forte en virus. L'hydrolysats a plus de difficulté à contrôler les générations virales (Harmemberg *et al.*, 1985).

L'hydrolysats obtenu avec la Papaine demeure l'extrait le plus actif au regard de la MOI et du temps d'incubation. Selon les spécificités de chaque enzyme, une tendance se dégage. Les coproduits hydrolysés par l'Alcalase et principalement par la Papaine possèdent les activités les plus importantes. La Papaine, et l'Alcalase à un moindre niveau, clivent les liaisons peptidiques préférentiellement au niveau des acides aminés possédant une longue chaîne hydrophobe, contrairement à Protamex et Neutral Protéase (EXPASY).

Ghanbari *et al* (2012) ont mis en évidence l'activité antibactérienne d'hydrolysats enzymatiques de spécimens entiers préalablement éviscérés de l'holothurie *Actinopyga lecanora*. L'activité antibactérienne n'était pas seulement reliée à la taille, le poids moléculaire et le degré d'hydrolyse, mais également à l'hydrophobicité des peptides générés par l'action de la Papaïne et de l'Alcalase. Des activités d'hydrolysats de Papaïne ont été décrites dans la littérature, et notamment des activités antioxydantes et d'inhibition de l'ACE (Angiotensin-Converting Enzyme).

En conclusion, le procédé d'hydrolyse enzymatique par l'utilisation de différentes protéases conduit à l'obtention d'extraits possédant des activités antivirales. La nature de l'enzyme protéolytique semble être un paramètre majeur dans la modification de l'activité antivirale. En effet, la spécificité de l'enzyme agit sur la fonctionnalité des peptides car elle influence leurs tailles et leurs hydrophobicités dans l'hydrolysats (Kristinsson et Rasco, 2000), pouvant alors avoir un effet direct sur l'activité de ceux-ci.

6.5 Fractionnement bioguidé par poids moléculaire de l'extrait hydrolysé par la papaïne

Après fractionnement par poids moléculaires à l'aide de 6 membranes différentes (2 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 30 kDa, 50 kDa and 100 kDa), les extraits ont été de nouveau évalués à 10 concentrations différentes allant de 0,25 à 250,00 µg/mL. Après 72h d'incubation, l'évaluation de la viabilité cellulaire n'a montré aucun effet cytotoxique dans la gamme de concentrations testée. Les résultats sont présentés dans le Tableau XIV.

Tableau XIV : Evaluation de l'activité anti-VHS-1 à une MOI de 0,01 DI_{50} /cellules après 72h d'incubation d'extraits fractionnés de bulbe aquapharyngé hydrolysé par la papaïne par la méthode d'évaluation au rouge neutre. ACV est utilisé comme drogue de référence.

	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
< 2 kDa	>500,0	>500,0
2-5 kDa	>500,0	>500,0
5-10 kDa	>500,0	>500,0
10-30 kDa	>500,0	>500,0
30-50 kDa	>500,0	55,1 \pm 7,2
50-100 kDa	>500,0	38,1 \pm 5,2
> 100 kDa	>500,0	18,2 \pm 3,6
ACV	>500,0	0,3 \pm 0,1

Sur 7 fractions testées, 3 présentent une efficacité vis-à-vis de VHS-1 avec une CE_{50} de 55,1 ; 38,1 et 18,2 $\mu\text{g/mL}$ pour les fractions 30-50 KDa, 50-100 KDa et supérieur à 100 KDa respectivement. Les autres extraits testés ne montrent pas d'activité antivirale dans la gamme de concentrations testées. Les activités sont retrouvées dans les dernières fractions, et augmentent proportionnellement au poids moléculaire (de 30 à supérieur à 100 KDa). Nous pouvons donc supposer que les composés à l'origine de l'activité antivirale appartiennent aux fractions de poids moléculaires élevés.

Des composés de haut poids moléculaire ont été décrits comme agents antiherpétiques (Bouhlal *et al.*, 2011). En effet, des polysaccharides sulfatés de poids moléculaires de 308 et 360 kDa ont été démontrés comme étant actifs sur VHS-1 en interférant sur les premiers cycles de réplication virale. Récemment, des polysaccharides sulfatés isolés de du tégument de *C. frondosa* ont été décrits comme actifs biologiquement. Ces composés ont la capacité d'agir de manière positive sur la maturation de cellules dendritiques *in vitro* (Kale *et al.*, 2013).

Généralement les polypeptides, et plus spécifiquement les protéines, accèdent difficilement à leur site cible ou perdent leurs intégrités structurales avant de l'atteindre, et ceci en raison de la faible perméabilité des membranes, la taille de ces molécules et leurs instabilités physique et chimique *in vivo*. En effet, des peptides de 2 à 6 acides aminés atteindront plus facilement leur site d'action à la différence d'une protéine entière. Cependant, des protéines issues d'organismes marins ont déjà été mises en évidence pour leurs activités biologiques sur des modèles animaux. L'activité antiherpétique de lectines d'origine végétale a été démontrée. Ces molécules sont capables de reconnaître et de se fixer sur des glycoprotéines ou des glycolipides de la membrane cellulaire et provoquer une agglomération empêchant l'adsorption virale (Oldham *et al.*, 2002). La présence de lectines chez plusieurs espèces d'holothuries, la grande variabilité de poids moléculaires et leurs activités antiherpétiques suggèrent que l'activité retrouvée dans notre étude pourrait être attribuée à la présence de lectines. Bulgakov *et al* (2000) ont décrits une lectine de 44 kDa constituée de 2 sous unités identiques isolés du liquide cœlomique de *C. japonica*. Deux lectines de 400 (SPL-1) et 68 kDa (SPL-2) ont également été isolé de l'holothurie *Stichopus japonicus* (Matsui *et al.*, 1994). De plus, la présence d'oligomères avec des sous unités de poids moléculaires différents pourrait expliquer les activités antivirales des 2 fractions inférieures à 100 kDa. La glycosylation est une étape essentielle dans la réplication virale à plusieurs niveaux, tant au niveau de la reconnaissance des récepteurs membranaires cellulaires que l'encapsidation ou la synthèse de protéines. Dans cette optique, les lectines peuvent se fixer de manière covalente à l'enveloppe virale en agissant comme bloqueur d'entrée et ainsi empêcher l'infection de la cellule hôte.

En conclusion, nous avons pu mettre en évidence la présence de composés antiherpétiques à partir d'extraits de coproduits de l'holothurie *Cucumaria frondosa*. L'hydrolyse enzymatique s'est avérée être une technique efficace pour la génération de substances actives. Le bulbe aquapharyngé peu considéré d'un point de vue industriel représente un réel potentiel pour l'extraction de composés anti-VHS-1, et notamment lorsque celui-ci est hydrolysé par la Papaine en conditions contrôlées. En effet, les valeurs de CE₅₀ observée pour les différentes fractions de cet extrait oscillent entre 18,2 et 55,1 µg/mL à une MOI 0,01 DI₅₀/cellules après 72h d'incubation. L'activité antiherpétique la plus efficace est reliée à la présence de molécules à haut poids moléculaire et la littérature suggère que la nature de ces molécules pourrait être associée à des lectines. Cette partie a donné lieu à une publication scientifique dans un journal à comité de lecture de rang A.

CHAPITRE II - INTRODUCTION

Chapitre II : Etude des métabolites secondaires de *Cucumaria frondosa*

7 Introduction

Les holothuries se sont adaptées à de nombreux environnements en termes de reproduction, de pressions écologiques et de prédation menant alors à l'évolution de métabolites secondaires spécifiques possédant de nombreuses activités biologiques. Elles ont développé une large gamme de mécanismes anti-prédation (Bingham et Braithwaite, 1986; Lawrence, 1987) : une peau très épaisse et toxique, un corps capable de gonfler et de se durcir, l'auto-éviscération ou autotomie, une capacité de nage, des activités nocturnes ou encore des comportements d'enfouissement (Francour, 1997). Les saponines produites par les holothuries semblent constituer le mécanisme le plus efficace pour faire face aux prédateurs (Van Dyck *et al.*, 2011). Les saponines sont délétères pour la plupart des organismes et fonctionnent probablement comme une barrière chimique dissuadant les prédateurs (Caulier *et al.*, 2011).

Les objectifs de cette partie ont été de produire et d'extraire les métabolites secondaires relargués par l'holothurie *Cucumaria frondosa* après l'avoir placée en situation de stress, d'évaluer ces métabolites sur des modèles toxicologiques chronique et aiguë, de réaliser un fractionnement bioguidé des métabolites secondaires afin d'isoler les molécules toxiques en utilisant la chromatographie en phase liquide couplée à des essais de toxicité sur une lignée cellulaire modèle et enfin d'identifier les molécules responsables de cette toxicité par spectrométrie de masse.

CHAPITRE II

MATERIELS & METHODES

8 Matériels & Méthodes

8.1 Matériel biologique

8.1.1 L'holothurie *Cucumaria frondosa*

8.1.1.1 Collecte des spécimens et maintien en vie en bassin

Les spécimens de concombres de mer *Cucumaria frondosa* utilisés dans l'étude présentée dans le chapitre II ont été collectés et traités de la même manière que dans les travaux réalisés dans le chapitre I (voir partie 5.1.1).

8.1.1.2 Production de métabolites secondaires

Des aquariums remplis de 20 L d'eau douce filtrée sont utilisés. Cinq à six individus de *Cucumaria frondosa* sont plongés par aquarium pendant une durée de 6 h (données personnelles) afin de provoquer une situation de stress par choc osmotique entraînant la libération de métabolites secondaires, permettant alors l'obtention d'un Extrait de Métabolites Secondaires Relargués (EMSR) qui servira par la suite de matériel de travail du chapitre II. L'apparition d'une mousse blanche caractéristique de la présence de saponines, à la surface des aquariums sert d'indicateur à la production de ces métabolites, en partant du postulat que ces molécules sont à l'origine de la cytotoxicité (Figure 28). Après 6 h, l'eau des aquariums est récupérée et filtrée sur un filtre de porosité de 8 µm (Whatman®40) avant d'être chargée sur une colonne chromatographie échangeuse d'ions (voir partie 8.1.1.3).



Figure 28 : Spécimens de *C. frondosa* placés en situation de stress dans des aquariums remplis d'eau douce filtrée (photographie L. Tripoteau)

8.1.1.3 Extraction et fractionnement par chromatographie échangeuse d'ions de l'EMSR

La chromatographie échangeuse d'ions est réalisée sur une résine DIAION™ HP20 (Supelco, USA) adsorbant synthétique. Les pores sont de grandes tailles et permettent d'adsorber des grosses molécules (250-850 μm). Après conditionnement et préparation de la résine (protocole : Annexe 2), l'eau filtrée contenant l'EMSR est chargée dans la colonne à un débit maximum de 6 volumes de colonne par heure. A un débit supérieur, une partie des composés n'est pas retenue sur la résine (apparition de mousse et de bulle à la sortie de la colonne de chromatographie). A la fin du chargement de la colonne, 3 lavages sont effectués avant de procéder à l'élution. L'élution est réalisée avec un gradient de solvant organique, l'éthanol, selon le protocole du Tableau XV.

Tableau XV : Protocole d'élution de la résine échangeuse d'ions HP-20 par gradient d'éthanol de l'eau filtrée et récupérée de l'aquarium contenant les spécimens de *C. frondosa* placés en situation de stress

Concentration en éthanol (% v/v)	Volume(s) de colonne
40	2
60	3
80	3
100	3

Les différents éluats sont rassemblés et homogénéisés avant d'être distillés à l'aide d'un évaporateur rotatif (Heidolph® Hei-VAP Precision) afin d'éliminer l'éthanol et de concentrer la solution. Pour cela, 600 mL de solution sont placés dans le ballon de l'évaporateur rotatif dans un bain marie à 40°C. La rotation est fixée à 280 rpm, à une pression de 140 mbar. La pression est ensuite diminuée de 10 mbar toutes les min jusqu'à atteindre certaines valeurs palier. Le temps par palier est indiqué dans le Tableau XVI.

Tableau XVI : Protocole d'évaporation des échantillons obtenus après élution de la résine échangeuse d'ions à l'aide d'un évaporateur rotatif

Pression (mbar)	Temps (min)	Solvant évaporé
140	2-3	Ethanol
100	10	Ethanol
70-80	10	Ethanol
50	15	Ethanol – Eau
23	40	Eau

Cette étape permet de réduire le volume initial de 20 fois et ainsi concentrer l'extrait obtenu. L'extrait concentré obtenu est de couleur jaune. Le concentré obtenu est ensuite séché par lyophilisation. Le produit sec se présente sous la forme d'une poudre cristalline très pulvérulente, de couleur allant du beige au jaune clair. Sous sa forme sèche le produit, s'il est inhalé ou ingéré peut provoquer des irritations, des démangeaisons.

Un équipement de protection est nécessaire à sa manipulation (gants, masque complet et blouse). Les échantillons sont stockés à -20°C avant d'être utilisés.

8.1.2 Omble chevalier *Salvelinus alpinus*

Les Ombles chevaliers (15 spécimens d'alevins de 2 à 2,5 g) ont été gracieusement fournis en 2011 par le laboratoire d'aquaculture du pavillon Aquacole de l'IRZC situé à l'Aquarium et Centre Marin du Nouveau Brunswick, Institut de Recherche sur les Zones Côtières.

8.1.3 Truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss*

Les truites arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* (Troutlodge Inc.) ont servi pour les essais de toxicité aiguë. Elles proviennent d'un transfert en 2012 (PERMIS No. NBI&T – 12-045 ; Annexe 1) de 300 alevins toutes femelles et stériles de 1,5 g depuis l'entreprise piscicole Boréal Aquaculture Inc. au Pavillon Aquacole de l'IRZC situé à l'Aquarium et Centre Marin du Nouveau Brunswick.

8.1.4 Huître américaine *Crassostrea virginica*

Deux cents cinquante huîtres américaines *Crassostrea virginica* d'un même lot génétique, âgées d'environ 3 ans ont été achetées à l'ostréiculteur d'Étang Ruisseau Bar à Shippagan en février 2014. Prélevées dans le milieu extérieur, alors que la baie de Shippagan était toujours gelée, les huîtres ont été placées en hivernage en circuit ouvert avec une eau circulante à 0°C ± 1 °C sans ajout de nourriture, en attendant les premiers essais en laboratoire. Les huîtres avaient une taille moyenne de 76,7 ± 5,8 mm.

8.2 Evaluations écotoxicologiques

8.2.1 Analyses histopathologiques et nécropsies

Une première évaluation de toxicité aiguë a été réalisée sur quelques spécimens d'Ombles chevalier (Écloserie IRZC) afin de valider l'effet toxique de l'EMSR. Ces poissons ont été acclimatés de la même manière que les Truites arc-en-ciel, à la différence d'avoir été placés dans de l'eau salée prélevée directement de la baie de Shippagan. Six spécimens ont été exposés à une concentration de 10 mg/L d'EMSR et 6 autres spécimens ont été placés dans un aquarium témoin ne contenant pas d'EMSR. A la fin de l'expérience, les morts (et sacrifiés) ont été fixés dans la formaline 10% (Sigma Aldrich, Canada) et envoyés pour analyses en histologie au laboratoire de physiopathologie de l'Université de l'Île du Prince Édouard (Charlottetown, Canada). Les échantillons contenant des os et du cartilage (crâne, œil, corps, branchies) ont alors subi une décalcification par immersion dans une solution de CAL-EX II ® (Fisher 112 Chemical, Canada) pendant 24h. Des sections de tissus ont ensuite été découpées et façonnées en blocs de cire. Des coupes de 5 µm ont été réalisées, montées sur lames de verre et colorées par la méthode d'Hématoxylin and Eosin (H&E, Luna, 1968). Les lames ont été examinés par un microscope Leica DM2500 et un microscope numérique PixeLink PL-B625 pour l'acquisition de photos (PixeLINK® µScope Standard v3.6 software). Les modifications histologiques et physiologiques des tissus et des organes ont été rapportées.

8.2.2 Étude de létalité aiguë sur la truite arc-en-ciel (CL₅₀-96h)

La truite arc en ciel est devenue dans le monde entier le poisson d'eau froide étalon pour les études sur la pollution et la recherche en toxicologie aquatique. L'essai de létalité aiguë sur la truite arc-en-ciel permet l'évaluation des effets bioaquatiques de substances toxiques selon des conditions normalisées. Cet essai a été réalisé selon le protocole établi dans le Rapport SPE 1/RM/9 de Juillet 1990 (avec les modifications de mai 1996 et de mai 2007) d'environnement Canada. Dans cet essai à concentrations multiples, le pourcentage de poissons morts obtenu après 96h d'exposition à l'extrait étudié permet la détermination de la Concentration Létale à 50% (CL₅₀-96h).

8.2.2.1 Conditions d'acclimatation

Les conditions d'acclimations sont résumées dans le Tableau XVII

Tableau XVII : Liste de contrôle des conditions et méthodes recommandées pour la détention et l'acclimatation de la truite arc-en-ciel

Source de poissons	Poissons obtenus d'une écloserie et exempts de maladies.
Eau	Approvisionnement non contaminé d'eau de ville déchlorée. Volume et débit pour la détention : 1,0 L / 10g de poissons et 1,4 L/ g de poissons par jour respectivement.
Température	Température de détention variant de 4 à 18°C. Température d'acclimatation obtenue à raison d'au plus 3°C/jour et maintenue à 15±2°C pendant au moins deux semaines.
Oxygénation / aération	Oxygène dissous (OD) de 80 à 100% de saturation
pH	Entre 6,0 et 8,5
Qualité de l'eau	Température, oxygène dissous, pH et le débit doivent être vérifiés chaque jour.
Eclairage	Eclairage fluorescent à spectre continu, entre 100 à 500 Lux à la surface ; Lumière pendant 16 ±1 h, obscurité pendant 8 ±1h avec variation progressive.
Alimentation	Au moins une fois par jour avec des aliments commerciaux standards en boulettes ; Débit quotidien d'alimentation : de 1 à 5% du poids frais.
Nettoyage	Siphonage des débris tous les jours ou selon les besoins.
Maladie	Les mortalités doivent être surveillées chaque jour, les poissons moribonds étant enlevés ; le taux de mortalité du groupe de poissons devant être soumis à l'essai doit être inférieur à 2% pendant les sept jours précédant l'essai

8.2.2.2 Conditions d'essais

La liste de contrôle des conditions de méthodes et d'essais recommandés est résumée dans le Tableau XVIII.

Tableau XVIII : Liste de contrôle des conditions et méthodes d'essais recommandées.

Type d'essai	Statique, durée de 96 h
Eau de contrôle / de dilution	Eau municipale déchlorée ; OD de 90 à 100% de saturation au moment de l'essai.
Poisson	Alevin au stade de l'alimentation active ; poids moyen de 1,5 g ; au moins 10 poissons par solution d'essai ; densité de chargement maximale de 0,5 g/L.
Profondeur de la solution	15 cm au minimum
Température	15±1°C
Oxygène / aération	Au moment de la préparation, pré-aérer chaque solution d'essai pendant 30 min à raison de 6,5± 1mL/min. Aérer les solutions à ce débit pendant l'essai.
pH	Aucune correction si le pH de la solution est compris entre 5,5 et 8,5.
Eclairage	Eclairage fluorescent à spectre continu, entre 100 à 500 Lux à la surface ; Lumière pendant 16 ±1 h, obscurité pendant 8 ±1 h avec variation progressive.
Alimentation	Ne pas nourrir les poissons 16h avant l'essai et pendant l'essai.
Observations	Mort, aspect et comportement des poissons ; au moins à 24, 48, 72 et 96 h (termes convenant à la description de l'aspect et du comportement : Annexe 3)
Mesures	Température, pH, OD chaque jour ; conductivité au début de l'essai.
Résultats	Concentration Létale à 50% (CL ₅₀) après 96 h
Produit toxique de référence	Phénol
Validité de l'essai	L'essai n'est pas valide si plus de 10% de poissons de la solution contrôle meurent ou ont un comportement atypique ou stressé.

8.2.2.3 Concentrations testées

Une première série d'expériences a été réalisée avec une large gamme de concentrations en EMSR (Extrait de Métabolites Secondaires Relargués) afin de déterminer les concentrations pertinentes à utiliser dans un second temps pour obtenir une valeur de CL₅₀-96h la plus précise possible. Les concentrations testées pour cette série sont les suivantes : 0 (contrôle négatif), 1,0 ; 1,4 ; 1,9 ; 2,7 ; 3,7 ; 5,2 ; 7,2 ; 10 mg/L.

Avec les résultats de la première série d'expériences, une seconde série a été réalisée sur une gamme de concentrations plus étroite : 0 (contrôle négatif), 1,2 ; 1,4 ; 1,6 ; 1,8 ; 2,0 ; 2,2 mg/L et phénol à 10 mg/L (contrôle positif).

8.2.3 Evaluation de l'effet de l'EMSR de *C. frondosa* sur un modèle de toxicité aiguë : L'huître américaine *Crassostrea virginica*

L'huître *Crassostrea virginica* est un animal benthique et suspensivore qui filtre les particules de phytoplancton du milieu extérieur pour se nourrir et de ce fait, absorbe la majorité des contaminants présents dans leur environnement. C'est un modèle d'étude largement utilisé en écotoxicologie car du fait de leur caractère sessile, il est possible de savoir si les organismes ont été en contact avec certains contaminants du milieu extérieur (Ringwood *et al*, 1999 ; Chu *et al*, 2002). Le dosage de biomarqueurs de contamination sur la glande digestive (hépatopancréas) de l'espèce *Crassostrea virginica*, exposée à différentes concentrations d'EMSR pendant 28 jours a permis d'évaluer les effets toxicologiques de cet extrait sur ce modèle.

Trois semaines avant le début de l'expérimentation écotoxicologique, les huîtres ont été sorties de l'hivernage pour être acclimatées dans des bassins de 200 L au Centre Marin de Shippagan. La température de l'eau a été augmentée progressivement de 3°C tous les 3 jours, chaque matin la température a été ajustée, le bac vidé et nettoyé au savon (données internes IRZC) et rincé, la concentration en phytoplancton (*Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri* et *Chaetoceros gracilis*) a été fixée à 50 000 cellules/mL. Cent huîtres issues du même producteur mais n'appartenant pas au même lot génétique ont été achetées un peu plus tard en supplément pour remplacer les huîtres prélevées au cours de l'expérimentation.

En effet, comme le mode d'action et d'accumulation de l'extrait toxique testé n'est pas encore clairement connu, il était nécessaire de garder un nombre d'individus constant afin que la quantité d'extrait disponible par individu soit la même pendant toute l'expérimentation. Le nombre constant d'individus dans les bacs permettant aussi de garder des conditions le plus stable possible tout au long de l'expérimentation. L'acclimatation a été réalisée dans les mêmes conditions pour les huîtres de remplacement. Afin de faire la distinction entre les deux lots, les huîtres de remplacement ont été marquées au burin électrique avec un X sur la valve gauche pour être reconnaissables une fois dans les bacs. Un organigramme synthétique de l'expérience de toxicologie chronique sur *Crassostrea virginica* est présenté dans la Figure 29.

L'expérimentation s'est déroulée au Centre Marin de Shippagan (NB, Canada) du 1^{er} au 29 Avril 2014. Pour cela, 250 huîtres de l'espèce *Crassostrea virginica* ont été utilisées et placées dans 8 bassins de 40 L en circuit fermé (25 huîtres par bassin). Les huîtres ont été nourries pendant la totalité de l'expérience. Quatre conditions ont été mises en place. :

- Témoin: sans EMSR. Le réplicat 1 a été nommé A0 et le réplicat 2, B0
- Concentration d'EMSR [C1]= 0,63 mg/L Le réplicat 1 a été nommé A1 et le réplicat 2, B1
- Concentration d'EMSR [C2]= 1,26 mg/L Le réplicat 1 a été nommé A2 et le réplicat 2, B2
- Concentration d'EMSR [C3]= 1,9 mg/L Le réplicat 1 a été nommé A3 et le réplicat 2, B3

Chaque condition a été réalisée en duplicata et l'ordre des bacs (A0, A1, A2, A3, B0, B1, B2, B3) dans la salle a été tiré au sort lors de l'installation afin de limiter le biais pouvant être causé par la position des bacs dans la salle (Figure 30).

Crassostrea virginica



- Huître américaine
- Animal benthique
- Modèle écotoxicologique

Evaluation de l'effet
de l'EMSR



- 10 bassins de 40L (fermés)
- 25 spécimens / bassin
- 3 concentrations d'EMSR testées + 1 contrôle (0; 0,63; 1,26 et 1,9 mg/L)
- Etude sur 28 jours (prélèvements à T0, T7, T14, T21 et T28)
- Contrôle quotidien des paramètres (pH, T°C, salinité, oxygénation, concentration de phytoplancton, ammoniac)

Prélèvement de la
glande digestive



Dosage biomarqueurs :

- Acétylcholinestérase
- Catalase
- Glutathion-S-Transférase
- Malondialdéhyde

Figure 29 : Organigramme synthétique de l'évaluation toxicologique de l'EMSR de *Cucumaria frondosa* sur le modèle *Crassostrea virginica*

Un système d'aération a été mis en place dans les bacs et les seaux de microalgues afin de garder les cellules phytoplanctoniques en suspension dans l'eau, permettant aussi à l'EMSR de s'homogénéiser dans les bacs. La concentration en algues dans les bacs a été fixée à 50 000 cellules de phytoplancton/mL afin d'assurer des conditions de disponibilité en nourriture non-limitante (données internes IRZC). Le nombre de cellules algales a été mesuré à l'aide d'un compteur Coulter® afin de pouvoir ajuster la quantité de cellules nécessaire pour chaque condition et vérifier que les huîtres filtraient correctement. Le nettoyage des bacs à l'eau et au savon a été réalisé 2 fois par semaine. Après chaque nettoyage et rinçage à l'eau de mer, le volume du bac a été complété à 40 L, température de l'eau (18°C), la concentration en microalgues et en EMSR ont été ajustées.

8.2.3.2 Concentrations d'EMSR de *C. frondosa* testées

De premières expériences ont été réalisées en 2013 sur *C. virginica* afin de déterminer la concentration à ne pas dépasser pour pouvoir réaliser des essais de toxicité chronique sans entraîner de mortalité. Ces essais ont été réalisés pendant 7 jours à des concentrations croissantes, la concentration la plus importante étant 1,9 mg/L. Cette dernière n'ayant pas entraîné de mortalité à 7 jours, il a alors été décidé d'utiliser cette concentration comme valeur maximale pour l'expérimentation de toxicité aigüe de 2014.

Trois concentrations d'EMSR ont été testées : 0,63 mg/L, 1,26 mg/L et 1,9 mg/L. Ne possédant pas de moyen rapide pour doser ces molécules dans l'eau, il n'était donc pas possible de mesurer la concentration réelle d'EMSR dans les bacs au cours de l'expérience. Le protocole suivant a donc été appliqué : au cours de la production d'EMSR, les différents lots ont été regroupés afin d'être d'homogénéisés et distribués dans les bacs. Des solutions mères d'EMSR par condition ont été préparées tous les deux jours afin de s'assurer de la distribution d'un produit « frais ». Les concentrations en EMSR ont été ajustées dans les bacs de 40 L deux fois par semaine (après chaque nettoyage).

8.2.3.3 *Mesures des paramètres*

Chaque jour les paramètres suivant ont été mesurés pour chacun des réplicats:

- pH
- salinité
- oxygénation
- température
- concentration de phytoplancton.

Les taux de mortalité ont été mesurés tout au long de l'expérimentation et les huîtres mortes ont toutes été remplacées au fur et à mesure par des huîtres de remplacement.

8.2.3.4 *Prélèvements et dissections*

Au temps T0, T7, T14, T21 et T28 jours, 5 huîtres ont été prélevées par condition. A partir du T7 ; chaque huître prélevée a été remplacée par une huître marquée au burin par un X afin de garder la biomasse d'individus constante pendant toute la durée de la manipulation et limiter le biais pouvant être causé par une plus grande filtration de concentration de toxine pour les huîtres au fur et à mesure de l'expérimentation. Chaque huître a été mesurée et sexée. Les hépatopancréas ont été prélevés et pesés. Chaque organe a été congelé directement à l'aide d'une bouteille de Freeze'it™ de Fisherbrand® (qui permet de congeler instantanément à -51°C les échantillons) avant d'être conservé à -80°C.

8.2.3.5 *Dosage de l'ammoniac*

Les bassins étant en circuit fermé, les déchets (urine, respiration, excès de nourriture, poissons morts) sont libérés dans le système et ces produits azotés sont rapidement dégradés et transformés en ammoniac toxique. Le dosage de l'ammoniac rend alors compte de la qualité de l'eau des bassins (Epifanio et Srna, 1975 ; Petit, 1986).

Avant le début de l'expérimentation, une première installation a été réalisée afin de vérifier le fonctionnement du système et mesurer les variations du taux d'ammoniac dans les bacs de 40 L en présence de 20 huîtres sur une période de 4 jours. Le plan d'expérimentation prévoyait deux nettoyages des bassins par semaine. Vingt huîtres ont été placées dans un bac de 40L à 18°C, dans les mêmes conditions prévues pour l'expérimentation. Les mesures d'ammonium libre $\text{NH}_4\text{-N}$ ont été réalisées à T=24 H, T=48 H, T=72 H et T=96 H avec l'utilisation d'un kit (Nitrogen, Ammonia Test Kit, Model NI-SA HASH®). La lecture des résultats a été réalisée par spectrophotométrie à $\lambda=655\text{nm}$. Les résultats d'absorbance permettent de calculer les taux d'ammoniac NH_3 dans les bassins et ont été confrontés aux valeurs toxiques recensées dans la littérature (Epifanio et Srna, 1975 ; Petit, 1986).

8.2.4 **Dosages des biomarqueurs**

8.2.4.1 *Dosage des protéines par la méthode de Bradford (Bio-Rad kit)*

La méthode de dosage de Bradford est une méthode de dosage des protéines basée sur la fixation d'un colorant où la différence de coloration est directement liée à la réponse, soit la concentration en protéines. L'absorbance maximum pour une solution acide de Bleu Brillant de Coomassie G-250 varie de 465 à 595 nm lorsqu'il y a fixation aux protéines. Le colorant se lie principalement aux résidus des acides aminés basiques et aromatiques, et notamment l'arginine. Le coefficient d'extinction d'une solution du complexe colorant-albumine reste constant en augmentant 10 fois la gamme de concentration. Du fait, la loi de Beer-Lambert peut être appliquée pour une quantification précise des protéines en sélectionnant le rapport approprié volume de colorant/concentration en échantillon.

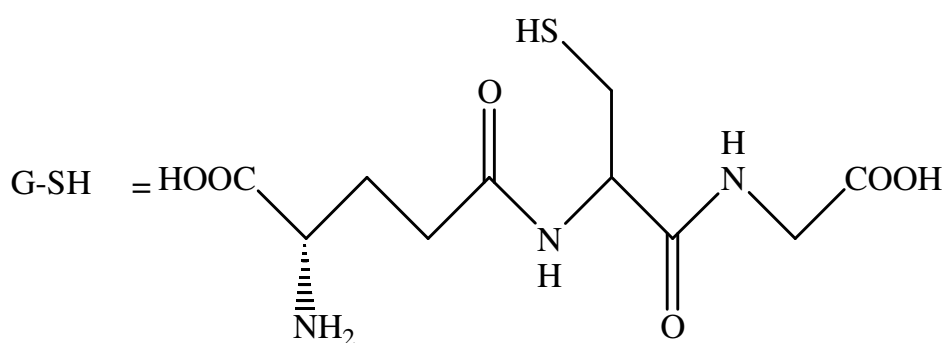
Méthode :

- Le colorant est préparé en diluant un volume de réactif de coloration avec 4 volumes d'eau distillée pour être ensuite filtré afin de retirer les particules à l'aide d'un filtre Whatman (n°1). Cette solution peut être conservée 2 semaines à température ambiante.
- 3 à 5 dilutions de standard de protéines (BSA : Bovine Serum Albumine) sont préparées dans la gamme de concentration du produit testé.
- 2 mL d'eau distillée sont ajoutés aux dilutions de standard. L'albumine bovine peut être conservée à +4°C pendant 2 mois, et des aliquots de 5 mL peuvent être conservés à -20°C pour une plus longue période.
- Une solution de Triton (1%) est préparée en mélangeant 100 µL de Triton avec 9,9 mL d'eau. Cette solution peut être conservée à température ambiante.
- Une solution d'urée 10 mM est préparée en solubilisant 300g d'urée dans 300 mL d'eau en chauffant doucement, et ensuite complétée à 500 mL.
- Préparation de l'échantillon : L'échantillon de glande digestive est homogénéisé manuellement (7 mL Dounce Tissue homogeniser, Ace Glass). 250 µL d'homogénat est mélangé à 30 µL de Triton 1%, 1,15 mL d'urée 10mM et 40 µL d'acide acétique glacial. La solution est incubée 2 min à température ambiante puis centrifugée à 2000g pendant 1,5 min.
- Dans un tube réactionnel, 50 µL du mélange protéique (surnageant de la solution centrifugée) est ajoutée à 2,5 mL de solution de colorant Bio-Rad et incubée pendant 5 min à température ambiante.
- Le tube est homogénéisé au vortex avant de mesurer l'absorbance à 595 nm (Un blanc est préparé avec de l'eau à la place de l'homogénat).
- Calcul : le calcul de la pente est réalisé à partir de la courbe standard.

Concentration (mg/mL) = pente x A_{595} x facteur de dilution homogénat x facteur de dilution de l'échantillon dans les réactifs.

8.2.4.2 Dosage de la Glutathion-S-transférase (GST – EC 2.5.1.18)

Parmi les biomarqueurs de contamination, ceux reliés à la biotransformation des composés organiques et ceux reliés au système antioxydant et du stress oxydatif sont les plus fréquemment employés. Les réactions de biotransformation peuvent être classés en 2 phases : les réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse des composés organiques constituent la phase I, suivies des réactions de conjugaison de ces métabolites à des composés endogènes constituant alors la phase II. Les enzymes impliquées dans les réactions de biotransformation de phase I incluent les cytochromes P450 (CYP) et les monooxygénases flavine (FMO : Flavin-ontaining MOnooxygenase). Les Glutathion-S-transférase (GST) font parties des enzymes de phase II, elles représentent environ 1% des protéines cellulaires retrouvées chez les procaryotes et les eucaryotes (Salinas et Wong, 1999). Leur principal rôle est de défendre la cellule face à la toxicité induite par des composés chimiques en désactivant les xénobiotiques qui pourraient entraîner une cytotoxicité ou des espèces génotoxiques. Cette désactivation est réalisée par une attaque nucléophile du glutathion réduit (GSH) au niveau des substances électrophiles (ex : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques ou HAP), par addition ou délétion selon le substrat. Le glutathion (GSH) ainsi conjugué est ensuite exporté en dehors de la cellule par transport actif via des pompes ATP dépendantes et excrété en dehors de l'organisme (Blanchette *et al.*, 2007). Les GST participent à la protection cellulaire vis à vis des effets toxiques d'une large gamme de xénobiotiques et de produits du métabolisme oxydatif (Zanette *et al.*, 2011).



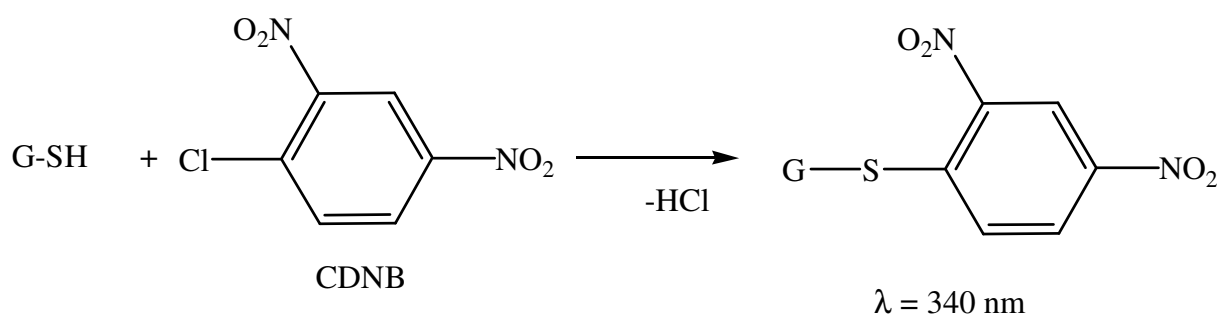


Figure 31 : schéma du principe réactionnel du dosage de la GST

Méthode :

- 1 L de Tampon phosphate salin Dulbecco est préparé avec 0,215g de KCl, 2,04g de KH₂PO₄, 8,00g de NaCl et 2,30g de Na₂HPO₄. Le pH est ajusté à 7,4 en utilisant NaOH ou HCl.
- La solution de l-glutathion (100 mM) est préparée en ajoutant 0,307g de l-glutathion à 5 mL d'eau distillée.
- La solution de 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) est préparée en ajoutant 0,101g de CDNB à 5 mL d'éthanol 95%.
- L'échantillon de glande digestive est homogénéisé manuellement (7 mL Dounce Tissue homogeneiser, Ace Glass). L'homogénat est préparé par une extraction au Tampon phosphate salin Dulbecco de l'hépatopancréas (1 :25) suivi d'une centrifugation à 11000 rpm pendant 20 min à 4°C.

Le schéma du principe réactionnel du dosage de la GST est représenté dans la Figure 31. Les lectures sont réalisées à 340 nm toutes les 15 secondes pendant 5 min. Dans chaque cuve sont ajoutés 980 μL de tampon phosphate salin Dulbecco, 10 μL de l-glutathion et 10 μL de CDNB. Ce mélange est mesuré en cinétique et considéré comme le blanc. 20 μL de l'échantillon protéique sont ensuite ajoutés à la cuve et laissés incubés pendant 1 min à température ambiante. La lecture est ensuite lancée pendant 5 min. Le temps de réaction, l'absorbance initiale et l'absorbance finale sont enregistrés pour chaque dosage. Le $\Delta A_{340}/\text{min}$ est calculé de la manière suivante :

$$\Delta A_{340}/min = \frac{A_{lecture\ finale} - A_{lecture\ initiale}}{temps\ de\ réaction\ (min)}$$

A = absorbance en nm

L'activité spécifique de la GST est déterminée selon la formule suivante :

$$AS = \frac{\left(\frac{\Delta A_{340}}{min}\right) * vol * fd}{\epsilon_{mM} * V_{enz}}$$

AS = Activité Spécifique de la GST en $\mu\text{mol/mL/min}$

Vol = Volume réactionnel (1 mL)

$\epsilon_{mM} = 9,6\ \text{mM}^{-1}$

V_{enz} = Volume d'enzyme en mL

fd = facteur de dilution

Les résultats sont ensuite convertis en $\mu\text{mol/min/mg}$ de protéines (U/mg) en utilisant les valeurs de concentrations en protéines totales obtenues par la méthode de Bradford.

8.2.4.3 Dosage du MalonDiAldéhyde (MDA)

Les dommages oxydatifs affectent majoritairement les lipides, les protéines et l'ADN. La peroxydation lipidique affecte la stabilité de la membrane cellulaire en modifiant sa fluidité et sa perméabilité pouvant entraîner sa rupture. La dégradation des lipides engendre la production d'aldéhydes tels que le malondialdéhyde (MDA) et des hydrocarbures (Béguel, 2012). La peroxydation lipidique est le plus souvent évaluée par le dosage du MDA. En effet, il est un marqueur de détérioration oxydatif de la membrane cellulaire chez les invertébrés et notamment chez les mollusques bivalves, et un des principaux responsable de la perte de fonction cellulaire dans les situations de stress oxydatif (Zanette *et al.*, 2011).

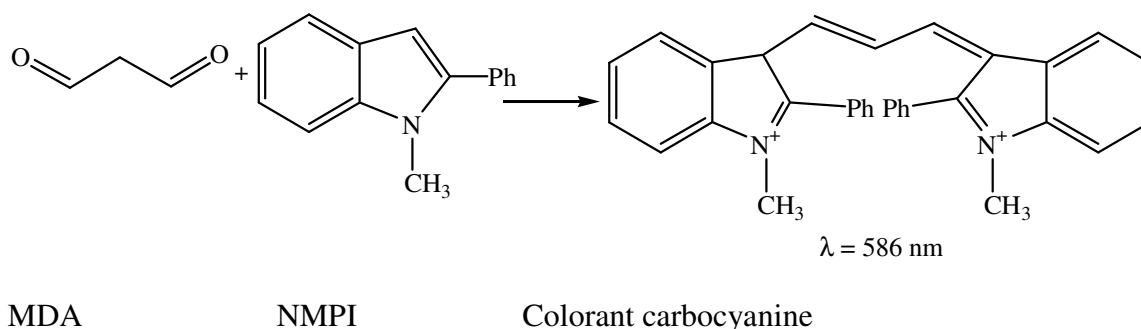


Figure 32 : schéma du principe réactionnel du dosage du MDA.

Le N-méthyl-2-phénylindole réagit avec le MDA pour former un complexe coloré (Colorant carbocyanine) possédant un maximum d'absorption à 586 nm. Le dosage mesure la quantité de MDA dans les échantillons en μM . Le protocole suivi pour ce dosage est celui préconisé par le kit BIOXYTECH MDA-586. Toutes les solutions nécessaires au dosage sont incluses dans le kit. Le schéma du principe réactionnel du dosage du MDA est représenté dans la Figure 32.

- La solution R1 (N-méthyl-2-phénylindole) est diluée avec du méthanol (1:3 ; MeOH:R1). Le standard de MDA est dilué au 1:500 avec de l'eau distillée.
- La courbe standard pour le dosage du MDA selon les concentrations mentionnées dans le Tableau XIX.
- L'échantillon de glande digestive est homogénéisé manuellement (7 mL Dounce Tissue homogeneiser, Ace Glass). L'homogénat est préparé par une extraction au Tampon phosphate salin Dulbecco de l'hépatopancréas (1:25) suivi d'une centrifugation à 11000 rpm pendant 20 min à 4°C.

Tableau XIX : Concentration en standard de MDA recommandées pour l'établissement de la gamme étalon

Volume de standard 20 μM (μL)	0	25	50	100	150	200
Volume d'eau (μL)	200	175	150	100	50	0
Concentration finale (μM)	0	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0

L'essai est réalisé en ajoutant par tube 10 µL de probucol, 200 µL d'homogénat ou de standard et 640 µL de solution R1 diluée. Après agitation, 150 µL de solution R2 est ajoutée et mélangée pour ensuite être incubée 60 min à 45°C. Après incubation, les tubes sont centrifugés pendant 20 min à 11000 rpm. Le surnageant est alors transféré dans une cuve pour mesurer son absorbance à 586 nm.

En utilisant la courbe standard, la régression linéaire permet de déterminer la concentration en MDA par échantillon selon les calculs suivants :

$$A_{586} = a[\text{MDA}] + b$$

$$[\text{MDA}] = \frac{A_{586} - b \cdot fd}{a}$$

[MDA] = Concentration en MDA dans l'échantillon

A_{586} = Absorbance de l'échantillon à 586 nm

a = coefficient directeur de la droite de régression

b = ordonnée à l'origine de la droite de régression

fd = facteur de dilution de l'échantillon.

Les résultats sont ensuite convertis en µM/mg de protéines en utilisant les valeurs obtenues de concentrations en protéines totales par la méthode de Bradford.

8.2.4.4 Dosage de la catalase (EC 1.11.1.6)

La catalase est une enzyme clé du système antioxydant qui est présente dans la plupart des organismes eucaryotes ou procaryotes aérobies, de la bactérie aux mammifères. En décomposant le peroxyde d'hydrogène, la catalase est impliquée dans de nombreux processus biologiques incluant l'inflammation, la mutagenèse et la prévention de l'apoptose. De plus, la catalase est essentielle dans le système immunitaire inné des invertébrés (Zhang *et al.*, 2011).

De hauts niveaux de H₂O₂ intracellulaires entraînent une activation préférentielle de la catalase tandis que de plus faibles niveaux seraient préférentiellement pris en charge par un autre enzyme de défense antioxydante (Glutathion Peroxydase – GPX) permettant alors une complémentarité d'action (Béguel, 2012). La CAT est régulièrement employée comme biomarqueur du stress oxydant (Banni *et al.*, 2010).

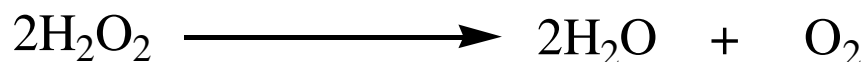


Figure 33 : schéma du principe réactionnel du dosage de la catalase

Méthode :

Le schéma du principe réactionnel du dosage de la catalase est représenté dans la Figure 33. Le dosage de la catalase se fait par mesure à 240 nm de la disparition du peroxyde d'hydrogène. Une unité décompose 1 micromole d'H₂O₂/min à 25°C (pH 7).

Réactifs :

- 0,05 M de phosphate de potassium K₂HPO₄, pH7
- 0,036% de peroxyde d'hydrogène dans du phosphate de potassium, pH7. L'absorbance à 240 nm de cette solution est déterminée, en utilisant le tampon phosphate comme le blanc. L'A₂₄₀ doit être comprise entre 0,520 et 0,550 unités d'absorbance. Au besoin, l'ajout d'H₂O₂ permet d'augmenter l'absorbance et l'ajout de tampon phosphate permet de la diminuer.
- L'échantillon de glande digestive est homogénéisé manuellement (7 mL Dounce Tissue homogeniser, Ace Glass). L'homogénat est préparé en le diluant au 1:25 dans le tampon phosphate.

Procédure :

Les lectures sont réalisées à 240 nm en mode cinétique pendant 3 min. Le tampon phosphate est considéré comme le blanc. Pour un volume réactionnel de 1mL, 0,03 mL d'homogénat sont ajoutés à 0,097 mL de peroxyde d'hydrogène et immédiatement mélangés par inversion. La diminution de l'absorbance est mesurée pendant 3 min. le ΔA₂₄₀/min est calculé à partir du début de la portion linéaire de la courbe.

Calcul :

$$\frac{U}{mL} = \frac{\left(\frac{\Delta A_{240}}{\text{min}}\right) * 1000 * \text{volume dans la cuvette} * fd}{43,6 * V_{enz}}$$

fd = facteur de dilution (25)

Les résultats sont ensuite convertis en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines (U/mg) en utilisant les valeurs de concentrations en protéines totales obtenues par la méthode de Bradford.

8.2.4.5 Dosage de l'acétylcholine estérase (AChE – EC 3.1.1.7)

Parmi les biomarqueurs, le dosage de l'activité de l'AChE est utilisé pour l'évaluation de l'effet de l'exposition de composés neurotoxiques sur les animaux aquatiques. L'AChE joue un rôle important dans le fonctionnement du système neuromusculaire, en prévenant la contraction continue du muscle. En effet, elle est responsable de la dégradation du neurotransmetteur Acétylcholine (ACh) en choline au niveau des synapses cholinergiques et des jonctions neuromusculaires. L'inhibition de l'AChE engendre une accumulation de l'ACh, la membrane post-synaptique restant alors excitée et la transmission nerveuse interrompue. De fait, les composés inhibiteurs de l'AChE peuvent provoquer de graves troubles au sein des organismes aquatiques, et notamment un changement de comportement, une paralysie ou la mort (Matozzo *et al.*, 2005). La mesure de l'activité de l'acétylcholine Estérase (AChE) est régulièrement réalisée afin d'évaluer l'exposition aux composés dérivés des pesticides organophosphorés et organochlorés dans les environnements aquatiques. Ces composés provoquent l'inhibition de cette enzyme (Anguiano *et al.*, 2009). Cette enzyme, présente dans de nombreux tissus, est une cible privilégiée des pesticides. L'inhibition de cette enzyme d'importance est donc utilisée comme biomarqueur d'exposition à de nombreux polluants (Banni *et al.*, 2005).

Principe :

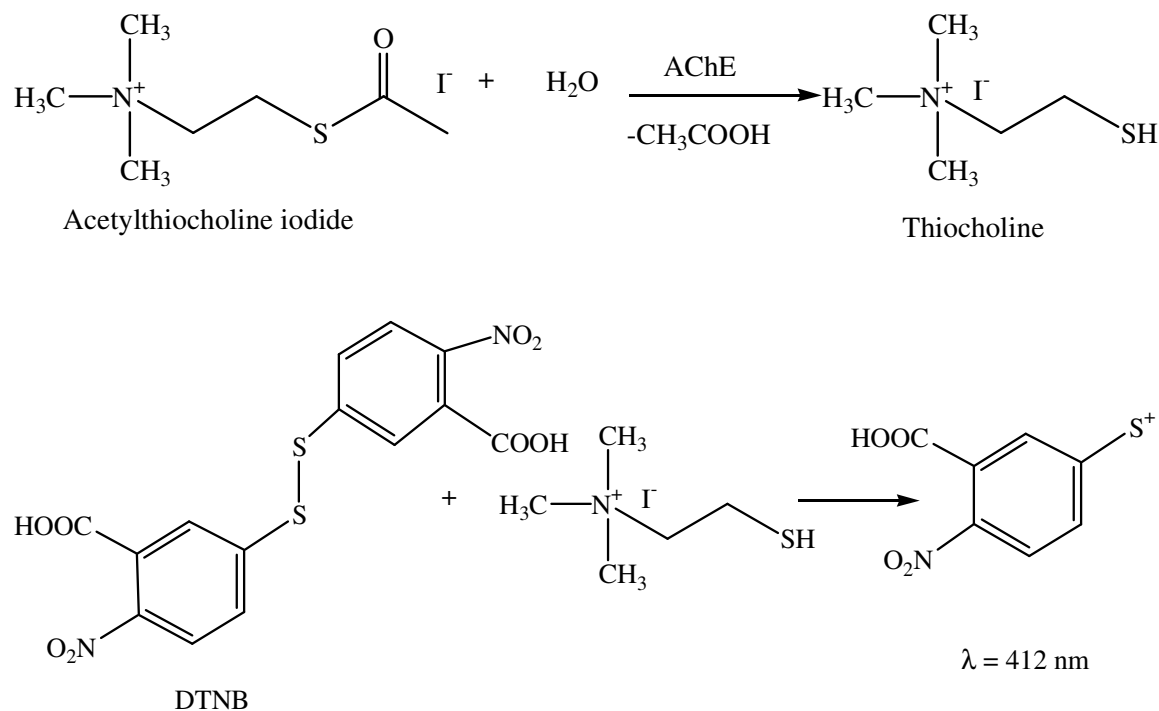


Figure 34 : schéma du principe réactionnel du dosage de l'AChE

Méthode :

Le schéma du principe réactionnel du dosage de l'AChE est représenté dans la Figure 34. L'activité de l'AChE mesurée dans les échantillons est exprimée en $\mu\text{mol/mL/min}$.

- 100 mM de tampon phosphate à pH 8 est préparé en mélangeant à volumes équivalents 13,6 mM de NaH₂PO₄ et 86,3 mM de Na₂HPO₄. Le pH de la solution est ajusté à 8.
- Une solution de DTNB (5,5'-Dithiobis dinitrobenzoic acid) à 10 mM est préparée en mélangeant 0,0198g de DTNB dans 5 mL de tampon phosphate 100 mM à pH 8.
- 100 mM d'iodure d'acétylthiocholine est préparée en mélangeant 0,025g d'iodure d'acétylthiocholine dans 1 mL d'eau distillée.
- L'échantillon de glande digestive est homogénéisé manuellement (7 mL Dounce Tissue homogeniser, Ace Glass). L'homogénat est préparé par une extraction au tampon phosphate (100 mM) de l'hépatopancreas (1 : 25) suivi d'une centrifugation à 11000 rpm pendant 10 min à 4°C.

Pour le blanc, la cuve doit contenir 860 μL de tampon phosphate (100 mM ; pH 8) et 70 μL de DTNB (10 mM). Pour chaque extrait protéique, les cuves doivent contenir 820 μL de tampon phosphate (100 mM ; pH 8), 70 μL de DTNB (10 mM) et 40 μL d'extrait protéique. Le mélange est incubé à température ambiante pendant 15 min. Après incubation, 70 μL d'iodure d'acétylthiocholine est ajouté et agité. La lecture est déclenchée immédiatement après agitation. Les lectures sont réalisées à 412 nm toutes les 15 secondes pendant 8 min. Le temps de réaction, l'absorbance initiale et l'absorbance finale sont enregistrées pour chaque dosage. Le $\Delta A_{412}/\text{min}$ est calculée de la manière suivante :

$$\Delta A_{412}/\text{min} = \frac{A_{\text{lecture finale}} - A_{\text{lecture initiale}}}{\text{temps de réaction (min)}}$$

A = absorbance en nm

L'activité spécifique de l'AchE est déterminée selon l'équation suivante :

$$AS = \frac{\left(\frac{\Delta A_{412}}{\text{min}}\right) * 1000 * \text{vol} * 10^6 * fd}{13600 \text{ LM}^{-1}\text{cm}^{-1} * \text{quantité protéines (mg)}}$$

AS = Activité Spécifique

Vol = Volume réactionnel (1mL)

fd = facteur de dilution

Les résultats sont ensuite convertis en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines (U/mg) en utilisant les valeurs de concentrations en protéines totales obtenues par la méthode de Bradford.

8.2.4.6 Etudes statistiques

Les tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel Statgraphics Centurion XV.I. Les données ont été analysées par analyse de la variance à un facteur (ANOVA) en utilisant le test de Tukey pour identifier les différences entre les groupes. Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives lorsque la valeur de p était inférieure à 0,05.

8.3 Evaluation cytotoxique

Les dilutions d'EMSR (50 µl) sont préparées dans du MEM supplémenté et distribuées dans les puits de microplaque Microtest III 96 puits de culture cellulaire (Nunclon, Intermed). Chaque série comprend neuf différentes concentrations d'EMSR allant de 250 à 1,25 µg / ml avec six répétitions par concentration. Cent µl de suspension cellulaire ($3,5 \times 10^5$ cellules / ml) dans du MEM supplémenté sont distribués dans chaque puits. Cinquante µl de chaque dilution d'EMSR sont ajoutés dans chaque puits correspondant et incubés pendant 72 heures à 37°C et 5 % CO₂ sans changement de milieu, le contrôle cellulaire est effectué simultanément pour chaque plaque.

Après incubation, un examen microscopique est réalisé pour vérifier la croissance cellulaire et l'effet cytotoxique des EMSR. Après examen, 50 µl de rouge neutre (0,15 %, pH 5,5) sont ajoutés dans chaque puits et les plaques sont incubées pendant 45 min à 37°C (MacLaren *et al.*, 1983). Le rouge neutre en excès est ensuite retiré par rinçage avec une solution saline de tampon phosphate (PBS, pH 7,2; Biomérieux) et le rouge neutre, incorporé aux cellules par viabilité cellulaire, est élué avec 100 µl / puits de tampon citrate éthanol. Après avoir agité la plaque pendant 20 min, pour détruire complètement la couche cellulaire, la densité optique (DO) de chaque puits est lue à l'aide d'un spectrophotomètre (Packard Spectra Count™) à 540 nm, la DO étant directement relié au pourcentage de cellules viables et donc inversement proportionnel à la concentration cytotoxique à 50% (CC₅₀). La droite de régression pour la détermination de la CC₅₀ est déterminée pour chaque essai et pour chaque plaque sur la base du contrôle cellulaire (Langlois *et al.*, 1986).

8.4 Méthodes de purification et d'analyse chimiques

8.4.1 Analyse et fractionnement par chromatographie liquide haute performance

Les analyses en chromatographie liquide sont réalisées sur un Chromatographe Liquide Haute Performance (LC : Liquid Chromatography, Dionex) équipé d'une pompe quaternaire P680, d'un passeur automatique ASI, d'un détecteur à barrette de diode (PAD : Photodiode Array Detector, UVD 340, 200-595 nm) et d'un collecteur de fractions (Gilson). Les analyses chromatographiques sont réalisées sur une colonne apolaire C18 (Nucleodur C18ec, 4,6 x 250 mm, 5µm, Macherey-Nagel) à 40°C. La collecte de fractions est réalisée sur une colonne semi-préparative apolaire C18 (Econosil, 10 x 250 mm, 5 µm, Alltech) à la même température. Les échantillons sont préparés à 1 mg/mL dans de l'eau ultrapure et filtrés à sur une cartouche à 0,20 µm avec une membrane PVDF (PolyVinyliDeneFluoride, Whatman). Des volumes de 50 µL sont injectés sur la colonne analytique et de 500 µL sur la colonne semi-préparative. Le gradient d'élution utilisé pour la séparation chromatographique analytique et semi-préparative est présenté dans le Tableau XX. Le débit de phase mobile utilisé pour la séparation analytique est d'1 mL/min et de 3mL/min pour la séparation semi-préparative. Les chromatogrammes ont été traités par le logiciel Chromeleon (version 6.80, Dionex). Après concentration sous vide, les fractions collectées sont lyophilisées. L'analyse chromatographique a été réalisée sur différents lots d'EMSR (2011 et 2013).

Tableau XX : Programme d'élution utilisée lors des séparations chromatographiques

Temps (min)	Acétonitrile (%)	Eau (%)
0	3	97
1,5	3	97
4,5	8	92
8,5	21	79
18	24	76
20	39	61
21	41	59
24	50	50
29	50	50
34	3	97
44	3	97

8.4.2 Spectrométrie de masse

Les analyses en chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse haute résolution à temps de vol (LC Q-TOF HRMS) ont été réalisées sur un appareil Waters Q-TOF Premier (Milford, USA) équipé d'une source d'ionisation par électrobulisaison (Electrospray Ionization LockSpray™). Ces analyses ont été effectuées au sein du laboratoire « Aquatic and Crop Resource Development » du département des Sciences de la Vie du Conseil National de Recherche Canadien d'Halifax, Nouvelle Ecosse.

Des volumes de 3 µL d'échantillons (5 mg/mL) sont injectés et élués sur une colonne Hypersil Gold C18 (2,1 x 100 mm, Thermo Fisher Scientific Inc. USA) selon un gradient d'éluion présenté dans le Tableau XXI.

Les analyses ont été réalisées en mode positif et en mode négatif en réalisant un balayage dans un domaine de rapport masse sur charge (m/z) compris entre 500 et 2500. Les analyses ont été réalisées sur 3 lots différents d'EMSR. Le standard de Frondoside A (Sigma-Aldrich) a été analysé dans les mêmes conditions.

Tableau XXI : Programme d'éluion des EMSR en LC Q-TOF HRMS

Temps (min)	Acétonitrile (+ 0,1% d'acide formique) (%)	Eau (+ 0,1% d'acide formique) (%)
0,4	3,0	97,0
3,2	21,0	79,0
7,8	39,0	61,0
9,4	50,0	50,0
13,4	97,0	3,0
18,0	3,0	97,0

CHAPITRE II

RESULTATS & DISCUSSION

9 Résultats et discussion

9.1 Production d'EMSR de *Cucumaria frondosa* en situation de stress

Entre 2011 et 2014, plusieurs lots d'EMSR (Extrait de Métabolites Secondaires Relargués) ont été produits dans le but d'être évalués sur différents modèles d'études écotoxicologique, cytotoxique et analytique. Le Tableau XXII présente les différents lots d'EMSR produits et leurs utilisations respectives. Il est à noter que l'extraction d'EMSR a été optimisée lors de la production de ces différents lots par modifications de différents paramètres (température, période de stress, nombre de spécimens, gradient d'élution) et l'utilisation d'un système d'évaporation sous vide plus performant permettant d'optimiser l'extraction (Hei-VAP Precision, Heidolph®, USA). La production de 2011 a permis d'obtenir 80 ± 7 mg de produit à partir d'un aquarium de 20 L et celle de 2014 a permis d'en obtenir 600 ± 50 mg. La production la plus importante a été réalisée en 2014, en effet, l'évaluation en écotoxicologie chronique sur 28 jours nécessitait 4,8 g de produit. Cette production a été répartie en 6 lots.

Tableau XXII : Bilan des évaluations réalisées sur les différents lots d'EMSR.

Le rendement est exprimé en quantité d'EMSR approximative obtenue après stress des spécimens pour une extraction par aquarium de 20 L.

Nom extrait	Rendement (mg)	Evaluation sur modèles animaux			Evaluation cytotoxique	Fractionnement	Caractérisation
		<i>Salvelinus alpinus</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Crassostrea virginica</i>			
		Histologie	Ecotoxicologie aigüe	Ecotoxicologie chronique	Viabilité cellulaire	HPLC	LC-QTOF-HRMS
EMSR 2011	80	X			X	X	
EMSR 2012	150		X		X		
EMSR 2013	300			X	X	X	X
EMSR 2014 (Lot 1 à 4)	500			X	X		
EMSR 2014 (Lot 5 à 6)	600			X	X		X

9.2 Détermination de l'effet de l'EMSR sur l'Omble chevalier au niveau physiologique

En préambule, une évaluation de la toxicité de l'EMSR a été réalisée sur 6 spécimens d'Ombles chevalier exposés à une concentration de 10 mg/L. Six autres animaux présents dans un aquarium contrôle ont servi de témoin. Cette première expérience a consisté à valider la toxicité de l'EMSR mais également de déterminer les effets de cet extrait au niveau morphologique et histologique. Après 2 h d'exposition des poissons à l'extrait, la mort des 6 spécimens a été constatée. La totalité des spécimens du groupe témoin était en vie après 2h mais ont été sacrifiés pour réaliser les nécropsies. Six spécimens ont été analysés au laboratoire de physiopathologie de Charlottetown, à l'Université de l'Île du Prince Édouard (Canada). Quatre spécimens du groupe exposé à l'extrait et 2 du groupe témoin ont été soumis à ces analyses. L'ensemble des spécimens ont été placés dans la formaline (10% Neutral Buffered Formalin, Sigma-Aldrich) afin de fixer les tissus. Les résultats des nécropsies sont résumés dans le Tableau XXIII.

Tableau XXIII : Résultats des nécropsies réalisées sur les spécimens d'Ombles chevalier exposés ou non à l'EMSR (10 mg/L)

	Groupe exposé à l'EMSR	Groupe témoin
Histologie	Branchies : Nécrose diffuse des muqueuses respiratoires et orales, caractérisée par une hypertrophie de l'épithélium lamellaire et une marginalisation de la chromatine nucléaire Gras mésentérique : nécrose Foie : infiltration leucocytaire moyenne	Morphologie normale
Morphologie	Nécrose des branchies et stomatite : aigue à subaiguë, diffuse et modérément sévère	Morphologie des tissus normale

Au niveau histologique, les observations du service de physiopathologie ont mis en évidence une atteinte sévère des branchies des poissons, une nécrose des mésentères ainsi qu'une atteinte hépatique. De même, les observations morphologiques confirment l'état de dégradation des tissus des spécimens avec l'apparition d'inflammations de la cavité buccale et de nécroses au niveau branchial repérés par des flèches sur les Figures 35 et 36.

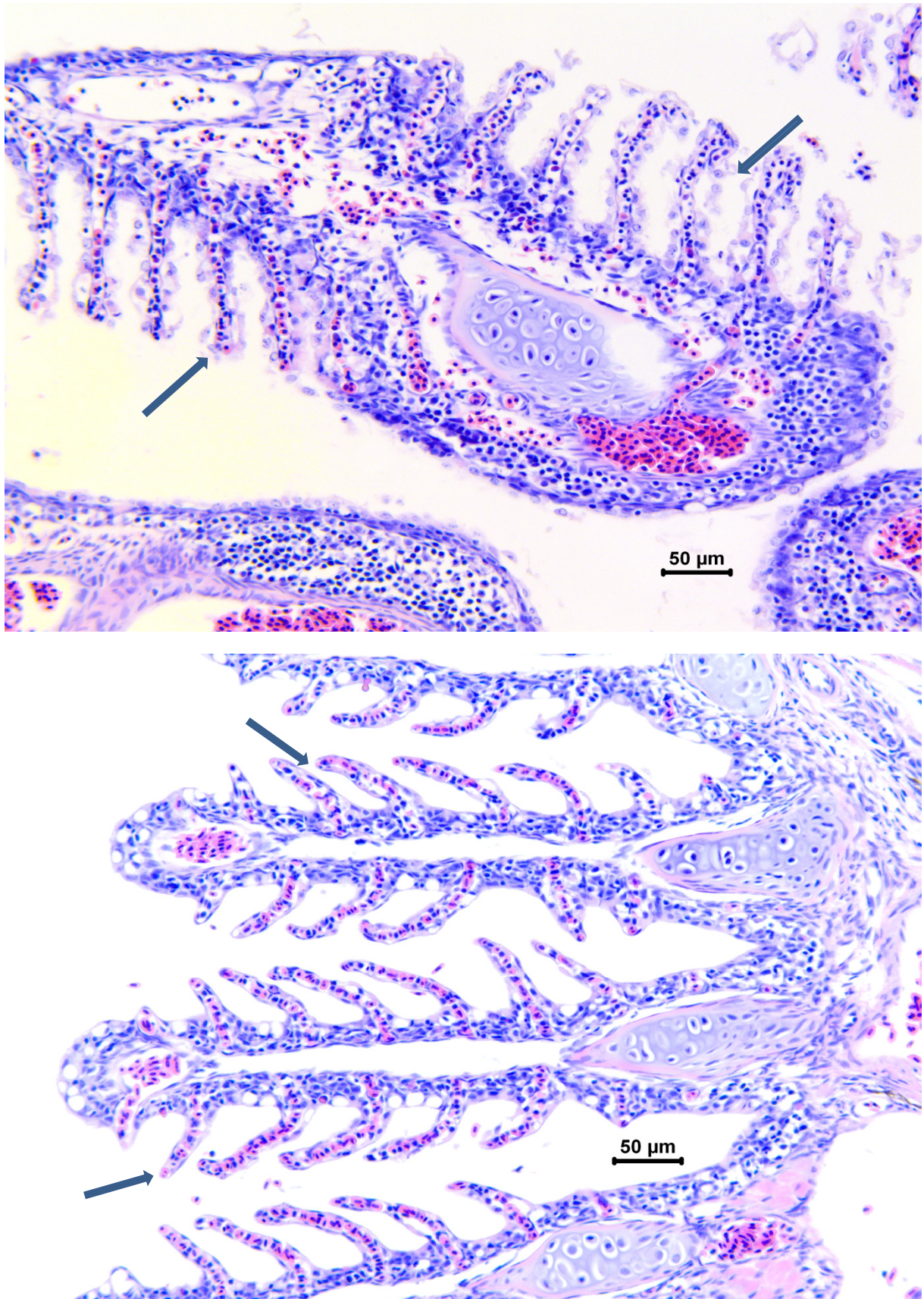


Figure 35 : Photographies d’observations microscopiques (objectif x 20) de branchies d’Ombles chevalier exposés à l’EMSR (photographie du haut) et du groupe contrôle (photographie du bas) (Photographies D. Groman, Atlantic Veterinary Center, Charlottetown, Canada).

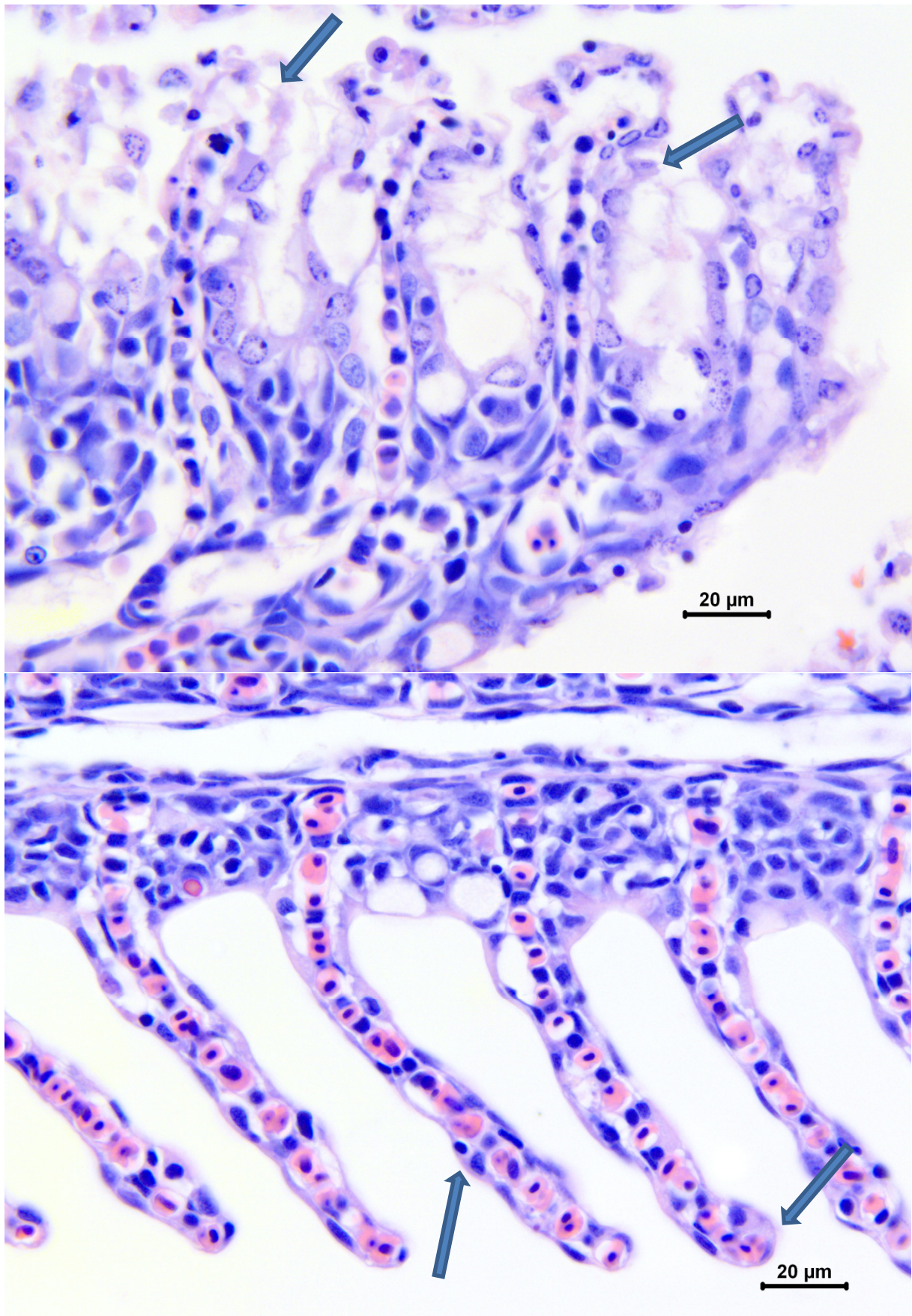


Figure 36 : Photographies d’observations microscopiques (objectif x 63) de branchies d’Ombles chevalier exposés à l’EMSR (photographie du haut) et du groupe contrôle (photographie du bas) (Photographies D. Groman, Atlantic Veterinary Center, Charlottetown, Canada).

Les observations microscopiques (Figures 35 et 36) des branchies des spécimens d'Ombles chevalier exposés à l'EMSR comparées au groupe témoin ont mis en évidence une hypertrophie (augmentation du volume d'un organe ou d'une cellule par altération) de l'épithélium lamellaire branchial ainsi qu'une nécrose (mort cellulaire non programmée) évidente par déstructuration de l'intégrité de l'épithélium.

Ces premiers résultats ont permis de valider l'effet de l'EMSR. En effet, il apparaît clairement que les spécimens exposés à l'EMSR ont subi des atteintes physiologiques importantes ayant entraîné la mort après seulement 2h d'exposition. Nigrelli (1952) et Yamanouchi (1955) ont montré la présence de substances ichtyotoxiques chez plusieurs espèces d'holothuries. Ils ont relié cette toxicité à la présence de saponines entraînant chez les poissons une destruction des branchies. Ces saponines peuvent donc potentiellement être responsables de la forte toxicité observée dans cette partie, mais plus d'informations sont nécessaires afin de l'affirmer.

9.3 Détermination de la CL₅₀-96h de l'EMSR sur la truite arc-en-ciel

Afin de déterminer plus précisément la toxicité et de la normaliser, des essais de toxicité aiguë sur un modèle standard ont été réalisés par la détermination de la CL₅₀-96h de l'EMSR sur la truite arc-en-ciel, selon le protocole établi par l'agence canadienne de l'environnement « Environnement Canada ».

Une première série d'expériences a été réalisée avec une large gamme de concentrations en EMSR afin de déterminer les concentrations pertinentes à utiliser dans un second temps pour obtenir une valeur de CL₅₀-96h la plus précise possible. Les concentrations testées étaient les suivantes : 0 (contrôle négatif), 1,0 ; 1,4 ; 1,9 ; 2,7 ; 3,7 ; 5,2 ; 7,2 ; 10 mg/L. Les résultats de mortalité obtenus pour cette première série sont résumés dans le Tableau XXIV.

Tableau XXIV : Evaluation de la dose létale d'EMSR sur les truites arc-en-ciel après 96 h d'exposition

Concentrations testées en EMSR (mg/L)	Mortalités
0,0	1/10 après 96 h
1,0	0/10 après 96 h
1,4	0/10 après 96 h
1,9	7/10 après 96 h
2,7	10/10 après 8 h
3,7	10/10 après 4 h 45
5,2	10/10 après 3 h 45
7,2	10/10 après 3 h 15
10,0	10/10 après 3 h

Ces résultats montrent la forte toxicité de l'EMSR de *C. frondosa*. En effet, une concentration supérieure ou égale à 2,7 mg/L entraîne la mort de l'ensemble des spécimens. Il est à noter toutefois la présence d'une mortalité dans le groupe contrôle. Ne s'agissant que d'une seule mortalité, celle-ci est considérée comme aléatoire et donc non significative. L'essai serait invalidé si le taux de mortalité du contrôle était supérieur à 10%.

Cette première série d'expérience sur la truite arc-en-ciel a permis de déterminer une gamme de concentrations plus étroite afin d'affiner la valeur de la CL_{50-96h} . Une seconde série a été réalisée sur une gamme de concentrations plus étroite : 0 (contrôle négatif), 1,2 ; 1,4 ; 1,6 ; 1,8 ; 2,0 ; 2,2 mg/L et phénol à 10 mg/L (contrôle positif). Les résultats sont consignés dans le Tableau XXV.

Tableau XXV: Tableau récapitulatif de l'évaluation de la CL₅₀-96h de l'EMSR sur les truites arc-en-ciel

Concentrations testées d'EMSR (mg/L)	Mortalités
0	0/10
1,2	0/10
1,4	0/10
1,6	0/10
1,8	3/10
2,0	8/10
2,2	10/10
10 (témoin phénol)	7/10

Dans cet essai, les mesures de la conductivité, du pH, de la température et de l'oxygénation ont été réalisées quotidiennement. Au cours des 96 h de l'étude, aucune variation significative de ces valeurs n'a été relevée. Pour l'ensemble des aquariums, le pH a oscillé entre 6 et 6,3 ; la conductivité de l'eau entre 167 et 174 μS ; la température entre 14,7 et 15,3°C et l'oxygénation entre 95 et 98% de saturation. La concentration en phénol utilisé comme témoin positif a été estimée en fonction des valeurs existantes pour cette espèce de poisson (Environnement Canada, 1998).

Le calcul de la CL₅₀-96h est réalisé en utilisant les valeurs de concentrations bornées à la concentration inférieure induisant 0% de mortalité et à la concentration supérieure induisant 100% de mortalité, en excluant donc les séries de concentrations reliées à 0 ou 100% de mortalité afin d'affiner la valeur de CL₅₀. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 37 et la détermination de la CL₅₀-96h a été déterminée et représentée dans la Figure 38.

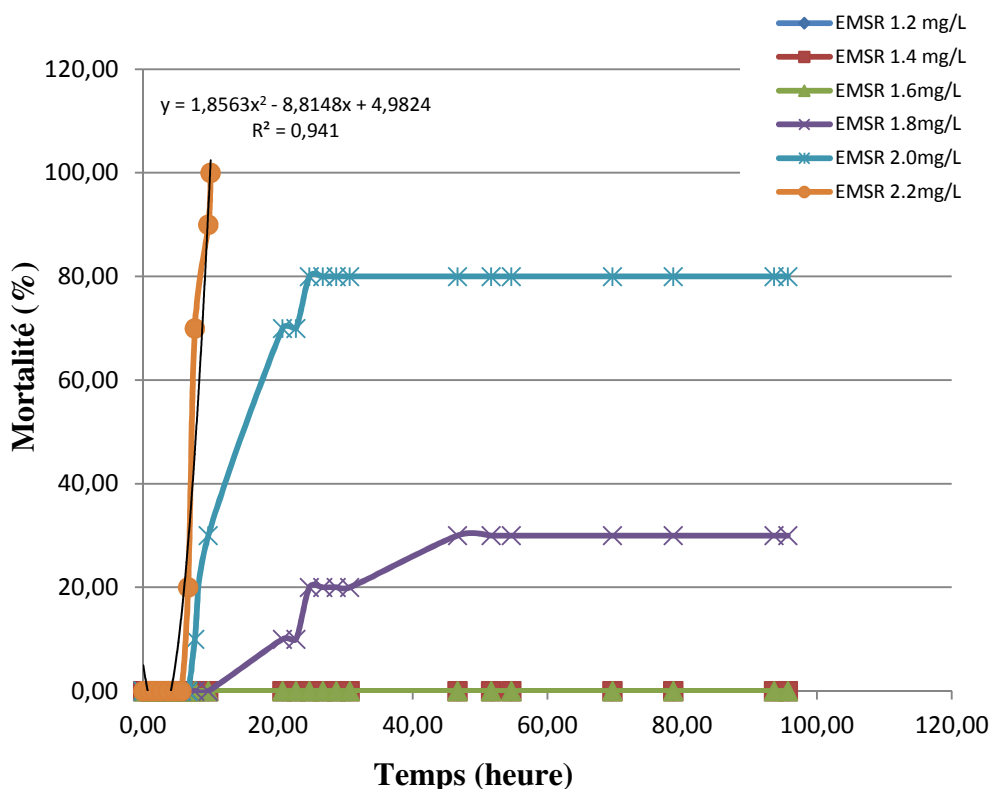


Figure 37 : Représentation graphique du suivi de la mortalité des truites arc-en-ciel exposées à différentes concentrations d'EMSR

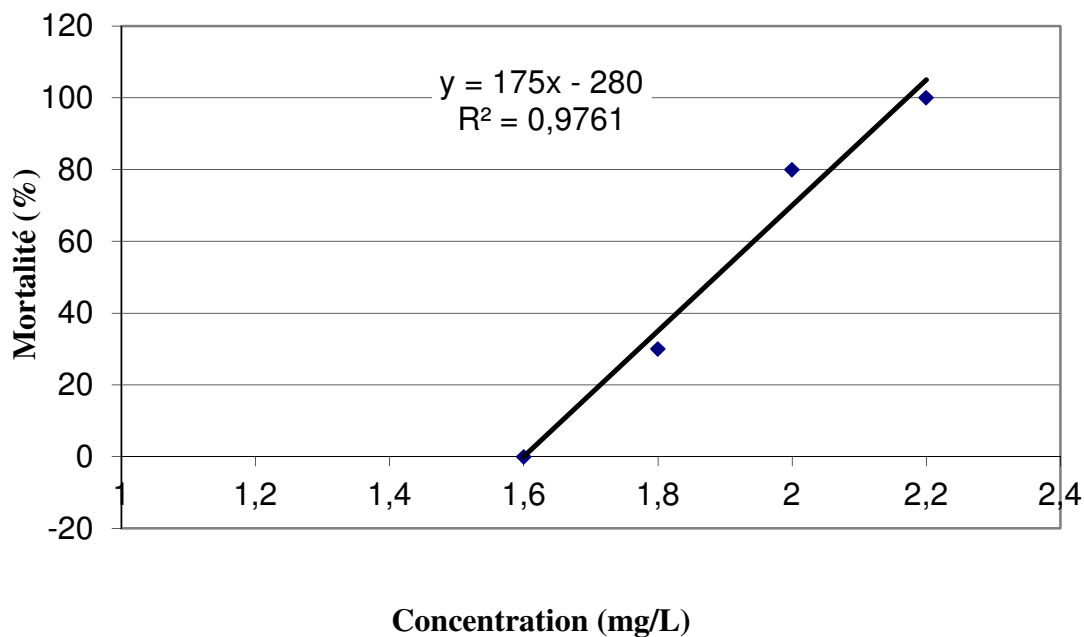


Figure 38 : Détermination de la CL_{50-96h} de l'EMSR de *C. frondosa* sur la truite arc-en-ciel

En utilisant les concentrations présentées dans la Figure 37, soit les valeurs allant de 1,6 à 2,2 mg/L et en réalisant une régression linéaire, l'équation de la droite a permis de calculer la valeur de la concentration associée à 50% de mortalité soit : 1,88 mg/L.

La valeur de la concentration létale à 50% sur 96 h de l'Extrait de Métabolites Secondaires Relargués de *C. frondosa* sur la truite arc-en-ciel dans les conditions de l'essai est donc de 1,88 mg/L. La CL₅₀ à 48h de la substance toxique de référence (phénol) pour la truite arc-en-ciel est estimée entre 5,2 et 16,6 mg/L et entre 0,07 et 0,12 mg/L à 27 jours (Environnement Canada). Peu de données relatives à la CL₅₀ à 96 h de ce type d'extrait sont retrouvées dans la littérature. Le benzène, entraînant des troubles neurologiques chez l'homme et pouvant conduire à la mort, sera utilisé à titre de comparaison. Le benzène présent dans l'environnement aquatique est de source anthropogénique. La CL₅₀ à 96 h du benzène sur la même espèce de poisson est estimé à 5,3 mg/L (TOXNET, US National Library of Medicine).

9.4 Détermination de l'effet de l'EMSR sur *C. virginica*

9.4.1 Préambule

Les marqueurs de stress ou les biomarqueurs sont employés dans les études toxicologiques chez les mollusques bivalves afin d'évaluer leurs réponses biochimiques reflétant la présence de contaminants ou de changements de l'environnement. Pour l'évaluation de ces situations de stress, il existe plusieurs groupes de biomarqueurs. Les biomarqueurs reliés à la défense antioxydante et au stress oxydatif, aux réactions de biotransformations de phase I et II, à la neurotoxicité et à la peroxydation lipidique (Zanette *et al.*, 2006). La majorité des études évaluant ces effets et dosant ces biomarqueurs est impliquée dans la recherche de l'effet d'un contaminant sur une réaction donnée.

En s'inspirant de l'écologie chimique, les objectifs de cette partie étaient de collecter les métabolites secondaires relargués, et de tester cet EMSR directement sur un modèle d'étude écotoxicologique afin de simuler l'effet rencontré dans l'environnement naturel. Après avoir évalué l'effet de cet extrait sur une étude toxicologique aiguë afin de déterminer la dose létale à 50% ayant montré une forte toxicité, il était intéressant d'évaluer cet EMSR au niveau chronique sur un modèle taxonomique différent.

L'étude a consisté à rechercher l'effet de cet extrait au niveau d'un modèle, en utilisant pour cela des biomarqueurs impliqués dans des réactions différentes. Les biomarqueurs sélectionnés pour cette étude sont l'Acétylcholine estérase (AChE) dont la diminution de l'activité est révélatrice d'une neurotoxicité (Matozzo *et al.*, 2005), la Glutathion-S-Transférase (GST) de la famille des enzymes de biotransformation de phase II des xénobiotiques (Zanette *et al.*, 2011), la Catalase (CAT) impliquée dans la défense antioxydante (Zanette *et al.*, 2011) et le Malondialdéhyde (MDA), marqueur de la peroxydation lipidique (Zhang *et al.*, 2011).

Les branchies et la glande digestive sont les sites principaux d'accumulation des métaux et des contaminants chez les mollusques (Skolova *et al.*, 2005 ; Adeyemi *et al.* (2012). La glande digestive est un site d'importance dans la métabolisation des nutriments mais également des xénobiotiques, confirmé par l'étude de Collin *et al.* (2010) sur l'accumulation de pesticides dans l'hépatopancréas chez *Crassostrea gigas*. La glande digestive a donc été sélectionnée comme organe d'étude dans cet essai de toxicologie chronique pour ce bivalve.

9.4.2 Mesures des paramètres environnementaux

Les paramètres ont peu varié pendant les 28 jours de l'expérience. La température de l'eau des bacs est restée stable autour de $18^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ pendant l'expérimentation, une légère augmentation a été rencontrée (19°C) à partir du 25^{ème} jour dans les bacs B0 et A1 (Figure 30), ces deux bacs se trouvant près de la source de chaleur.

Les mesures du pH de l'eau des bassins ne montrent pas de variations selon les conditions. La valeur moyenne du pH est de $7,9 \pm 0,2$.

La teneur en oxygène est restée constante dans toutes les conditions avec une valeur moyenne de $7,9 \pm 0,3$ mg/L d'oxygène.

La salinité de l'eau de mer est le paramètre qui a le plus varié au cours de l'expérimentation. La salinité de l'eau de mer était d'environ 30 ‰ au 1^{er} jour. On note une diminution progressive de la salinité à partir du 17^{ème} jour pour atteindre une valeur de 27 ‰ au 28^{ème} jour.

9.4.3 Mesure de l'ammoniac

Avant de débiter l'évaluation de l'effet de l'EMSR sur les spécimens de *C. virginica*, un suivi de l'ammoniac a été réalisé dans un bac contenant 20 huîtres, dans les mêmes conditions que l'expérimentation afin de vérifier les teneurs en NH_3 toxique. En effet, à forte dose, le NH_3 peut influencer l'état physiologique des huîtres (Figure 39).

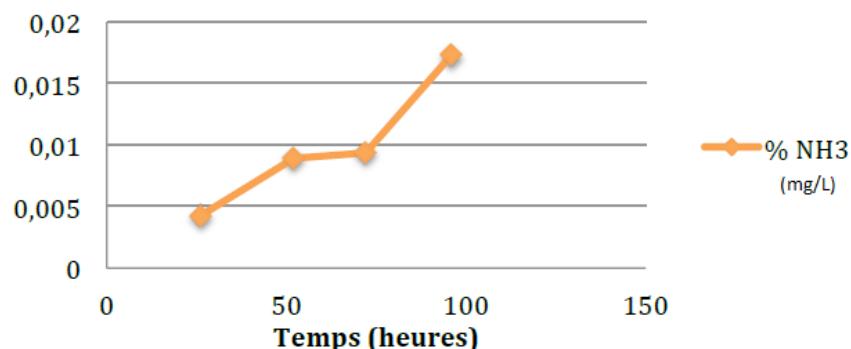


Figure 39 : Dosage du taux de NH_3 dans un bassin fermé en fonction du temps

L'évaluation de la teneur en NH_3 dans un bassin dans les conditions de l'expérience a montré un maximum de 0,017 mg/L après 4 jours. Selon le protocole utilisé dans notre expérience, 10 L de l'eau du bassin sont retirés chaque jour (soit $\frac{1}{4}$ du volume total) soit lors de la distribution de nourriture, une partie de l'ammoniac toxique était donc éliminée chaque jour. Au vu de ces résultats, le plan de nettoyage des bacs a été déterminé à deux nettoyages par semaine, un après 4 jours et un autre après 3 jours. Des suivis ponctuels de la teneur en NH_3 pendant l'expérience ont montré des teneurs ne dépassant jamais la valeur de 0,02 mg/L, or la concentration sublétalement toxique chez *C. virginica* a été évaluée à 7,2 mg/L dans une étude de toxicité chronique de 96 h (Epifanio et Srna, 1975).

9.4.4 Caractéristiques des échantillons de *Crassostrea virginica*

La valeur de masse de chair humide est restée constante au cours de l'expérience. Le poids moyen des échantillons est de $5,8 \pm 1,3$ g. L'ensemble des échantillons a montré une homogénéité de taille avec une moyenne de $76,7 \pm 5,8$ mm. Au jour 14, il ne restait plus que deux huîtres vivantes dans le bac à la concentration en EMSR à 1,9 mg/L.

Le sexe des individus a été déterminé en faisant des écrasés de gonades sur lame mince observés au microscope (grossissement x400) selon la méthode décrite par Harding *et al* (2013). Cent trois individus mâles, 5 individus hermaphrodites et 5 individus femelles ont été dénombrés. Le sexe n'a pu être déterminé pour les individus restants. En effet, le stade de développement des gonades n'était pas assez avancé pour pouvoir se prononcer, ou parce qu'il n'y avait pas d'observation de spermatozoïdes ni d'ovocytes au microscope. Le sexe-ratio est généralement de 1 : 1 (Principe de Fisher). Le lot d'huîtres acheté à l'ostréiculteur d'Étang Ruisseau Bar à Shippagan montre un déséquilibre du sexe-ratio avec une forte majorité d'individus mâles. On note la présence de quelques individus hermaphrodites.

L'indice hépato-somatique (IHS) nous informe sur l'importance qu'occupe l'hépatopancréas dans la masse corporelle. Il est calculé grâce à la formule suivante (Cartier *et al*, 2004) :

$$IHS = \frac{\text{Masse de la glande digestive (g)}}{\text{Masse totale de la chair humide (g)}}$$

Les valeurs obtenues pour l'IHS au cours de l'expérience ont été rapportées dans la Figure 40. L'exposition de *C. virginica* aux différentes concentrations d'EMSR n'a pas entraîné de variations de l'IHS. Ce constat est un point important car cela démontre une importante homogénéité des spécimens et des échantillons.

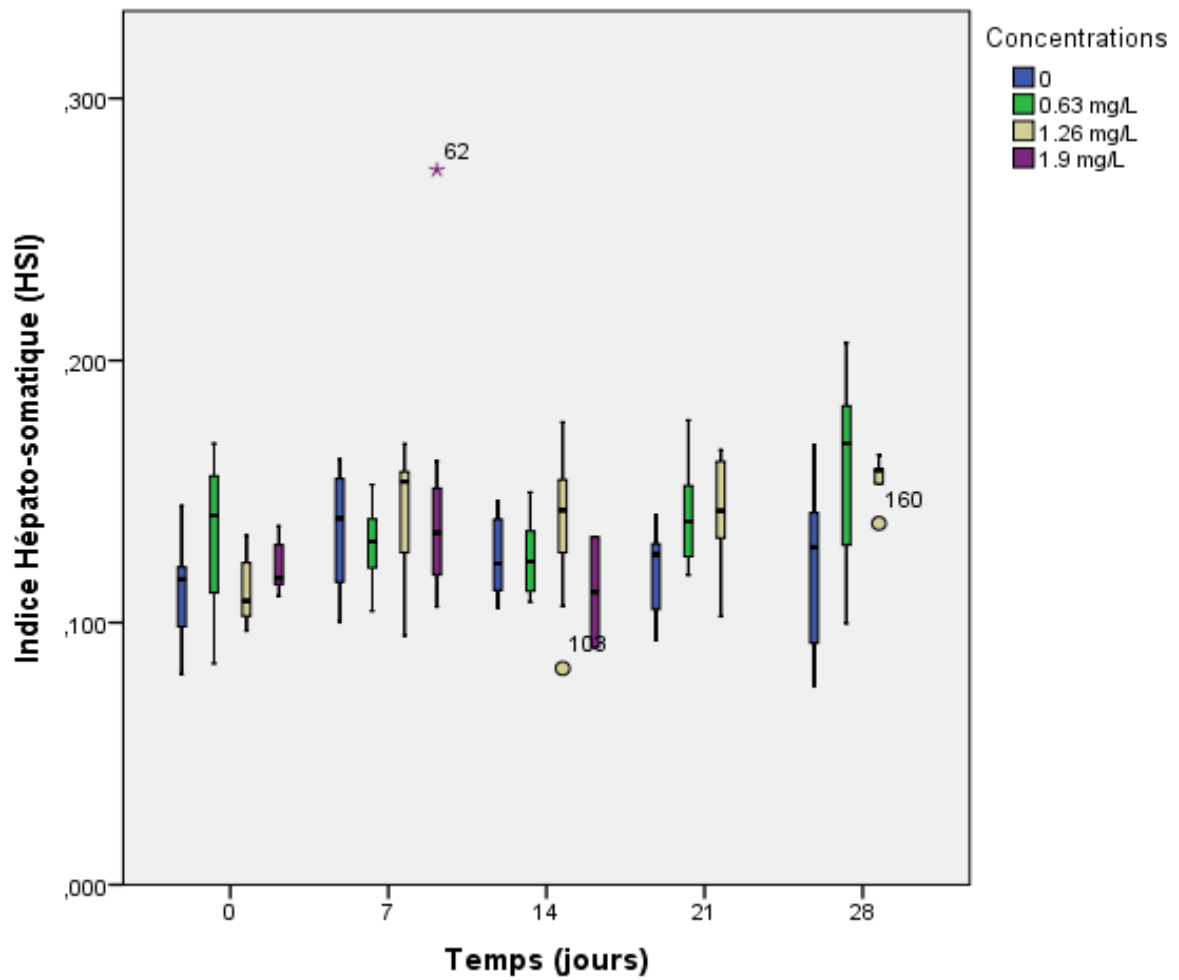


Figure 40 Evaluation de l'indice hépatosomatique dans les conditions de l'expérience

9.4.5 Éthologie et mortalités cumulées

L'expérience a été réalisée en utilisant l'EMSR de *C. frondosa* sur un modèle écotoxicologique afin de mimer une situation naturelle. Dès le premier jour, les huîtres ont réagi à l'ajout de l'EMSR. La concentration de microalgues étant connue dans le bac, il a été possible d'évaluer la quantité d'algue filtrée par bassin.

La première réaction a été un arrêt quasi immédiat de l'activité de filtration. Les huîtres placées dans les bassins des concentrations 1,26 et 1,9 mg/L se sont fermées et n'ont presque pas filtré l'eau lors des 2 premiers jours. Un réel effet dose a été observé, le taux de filtration observée des spécimens était inversement proportionnel à la concentration en EMSR dans laquelle ils se trouvaient (Taux de filtration témoin positif > Taux de filtration de la concentration 0,63 mg/L > Taux de filtration de la concentration 1,26 mg/L > Taux de filtration de la concentration 1,9 mg/L). Les spécimens de *Crassostrea virginica* ont donc eu comme première réaction de se protéger en se fermant et en limitant leurs activités de filtration. Aucune mortalité n'a été observée pour la concentration en EMSR de 0,63 mg/L, ainsi que dans les conditions témoins.

Au cours de l'expérience, des mortalités ont été observées dans les bacs de la concentration 1,26 et 1,9 mg/L (Figure 41).

L'apparition de mortalités massives a été observée dans les bacs de la concentration 1,9 mg/L, à partir du 10^{ème} jour pour le 2^{ème} réplikat (réplikat B) et du 11^{ème} jour pour le 1^{er} réplikat (réplikat A). Au 11^{ème} et 13^{ème} jour, la moitié des huîtres restantes dans le bac à la concentration de 1,9 mg/L était morte. Au 14^{ème} jour, seul 1 individu par réplikat avait survécu. Sur les 25 huîtres placées initialement dans les bacs, 11 individus par réplikat ont été prélevés et disséqués au jour 0 (5 individus), au 7^{ème} jour (5 individus) et au 14^{ème} jour (1 individu). Comme tous les individus étaient morts, l'arrêt des bassins A3 et B3 s'est fait à partir du 14^{ème} jour. Ces mortalités indiquent que la concentration de 1,9 mg/L d'EMSR est létale pour l'espèce *Crassostrea virginica* après 2 semaines d'exposition.

A partir du 19^{ème} jour pour les bassins de la concentration 1,26 mg/L, des mortalités sont apparues dans les deux bassins. Sur les 25 huîtres placées initialement dans les bacs, 23 individus pour le réplicat B et 21 individus pour le réplicat A ont été prélevés et disséqués au jour 0 (5 individus), au jour 7 (5 individus), au jour 14 (5 individus), au jour 21 (5 individus) et au jour 28 (3 individus pour le réplicat B et 1 individu pour le réplicat A). La concentration 1,26 mg/L d'EMSR est donc létale pour l'espèce *Crassostrea virginica* à partir de 3 semaines d'exposition même si certains individus ont résisté pendant 28 jours.

Aucune mortalité n'a été observée à la concentration 0,63 mg/L d'EMSR. L'exposition à cette concentration ne semble donc pas provoquer de mortalités chez *Crassostrea virginica* après 1 mois d'exposition.

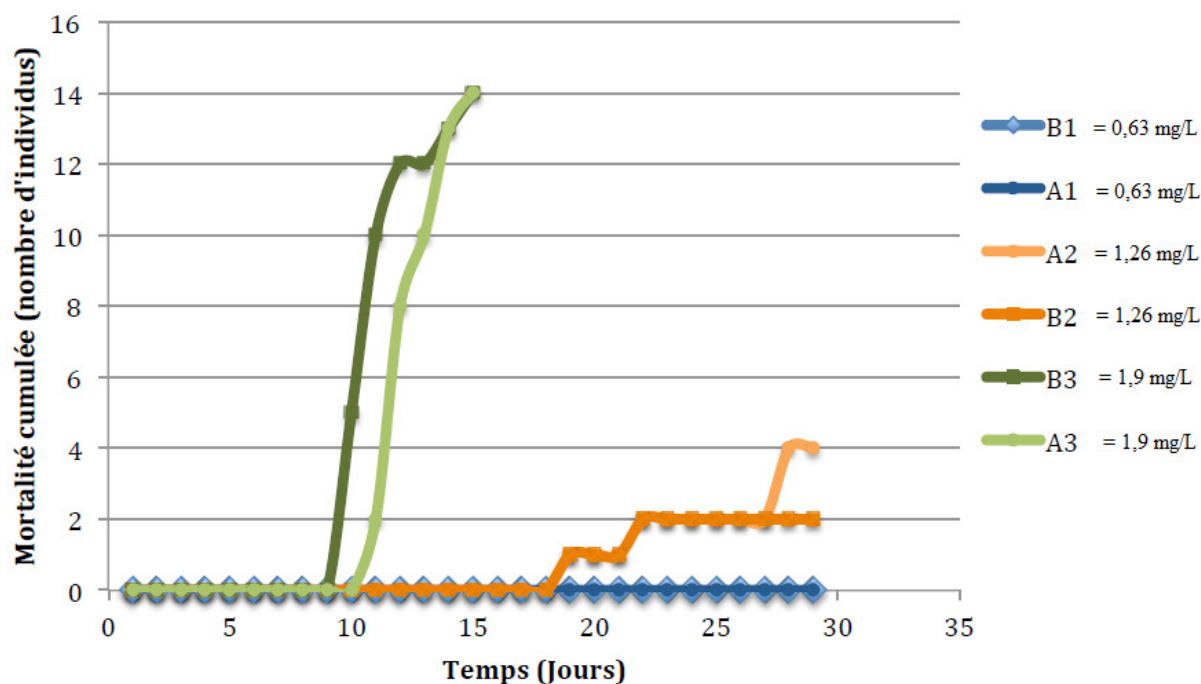


Figure 41 : Suivi des mortalités des spécimens de *C. virginica* exposées aux différentes concentrations d'EMSR de *C. frondosa*.

9.4.6 Dosages des biomarqueurs

Il est reconnu depuis quelques années en toxicologie environnementale que l'analyse chimique des contaminants par leurs dosages dans le milieu naturel ne suffit pas à comprendre les effets délétères de ces derniers dans l'écosystème évalué. Dans cette optique, la mesure des effets biologiques des contaminants est devenue un élément majeur dans l'évaluation de la qualité de l'environnement (Gray, 1992). Des biomarqueurs spécifiques des réactions impliquées lors de stress face à ces contaminants ont été examinés et plus spécifiquement chez les bivalves qui sont d'excellents organismes sentinelles de par leur côté ubiquitaire et leur habitats littoraux (Jing *et al.*, 2006). L'EMSR ayant montré des effets ichtyotoxiques sur 2 espèces de poisson, les effets biologiques de cet extrait ont été évalués en utilisant des biomarqueurs spécifiques.

Face à la mortalité massive des spécimens à la concentration la plus importante (1,9 mg/L) après 7 jours d'exposition, les dosages des biomarqueurs n'ont donc pas pu être réalisés pour les prélèvements au 14^{ème}, 21^{ème} et 28^{ème} jour à cette concentration. Les valeurs obtenues pour les premiers prélèvements ont été ajoutés aux histogrammes à des fins de comparaison. Tous les dosages ont été réalisés en duplicat.

9.4.6.1 Effet de l'EMSR sur la quantité de GST dans la glande digestive

Les résultats du dosage de la Glutathion-S-Transférase (GST) obtenus après exposition de l'huître américaine à différentes concentrations d'EMSR sont présentés dans la Figure 42.

Le dosage de la GST dans la glande digestive de *C. virginica* mis en contact avec l'EMSR de *C. frondosa* à différentes concentrations sur une période de 28 jours n'a pas montré de différences significatives entre les échantillons testés. Les mesures réalisées au jour 0 n'ont pas montré de différences significatives ce qui a donc permis de valider le dosage de cette enzyme. La valeur moyenne du dosage de la GST obtenue pour ces échantillons est de 77 mU/mg de protéines. Cette valeur est en corrélation avec les valeurs obtenues sur *Crassostrea gigas* avec des valeurs oscillant entre 70 et 150 mU/mg au sein des branchies dans une étude sur l'effet de la salinité et l'exposition au diesel (Zanette *et al.*, 2011), et sur *Crassostrea brasiliana* avec des valeurs variant entre 40 et 60 mU/mg au sein de la glande digestive dans une étude d'exposition également au diesel (Lüchmann *et al.*, 2011).

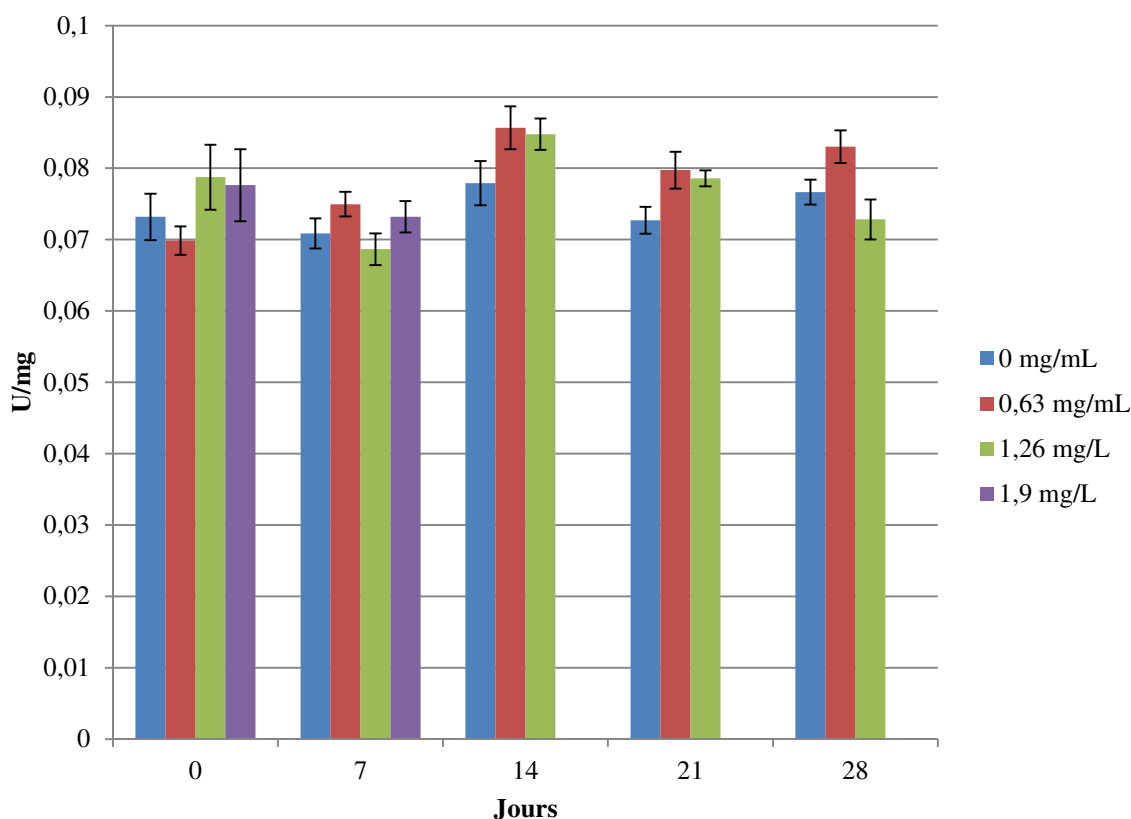


Figure 42 : Évaluation de l'effet de l'EMSR de *C. frondosa* sur la quantité de GST présente dans la glande digestive de *C. virginica* en fonction du temps et de la concentration en EMSR. Les résultats sont exprimés en $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ (U/mg de protéines). * et ** représentent les différences significatives entre le groupe contrôle et le groupe testé ($P < 0.05$ et $P < 0.005$ respectivement) pour chaque temps testé (ANOVA à un facteur suivi d'un test de Tukey).

La GST impliquée dans les processus de biotransformation de phase II possède également une activité peroxydase jouant un rôle antioxydant supplémentaire en prévenant la peroxydation lipidique (Lüchmann *et al.*, 2011). L'activité GST dans la glande digestive des bivalves a été démontrée majoritairement lors d'exposition de contamination aux Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP ; Solé *et al.*, 2007 ; Banni *et al.*, 2010). D'autres composés ont été décrits comme inhibiteurs de la GST, et notamment les dérivés du Chlorophénol agissant comme inhibiteur sur le modèle *Daphnia magna* (Whitacre, 2009). Ce dernier entraîne une augmentation de l'inhibition en fonction du caractère lipophile du composé. L'absence d'augmentation ou de diminution significative chez notre modèle montre que l'EMSR n'induit pas l'augmentation de l'activité GST.

9.4.6.2 Effet de l'EMSR sur la quantité de MDA dans la glande digestive

Les résultats du dosage du Malondialdéhyde (MDA) obtenus après exposition de l'huître américaine à différentes concentrations d'EMSR sont présentés dans la Figure 43.

Les mesures réalisées au jour 0 n'ont pas montré de différences significatives ce qui a donc permis de valider le dosage de ce marqueur. Le dosage du MDA dans la glande digestive de *C. virginica* mis en contact avec l'EMSR de *C. frondosa* à différentes concentrations sur une période de 28 jours n'a pas montré de différences significatives entre les échantillons testés. Cependant, à la concentration de 1,9 mg/L au 7^{ème} jour, il est noté une activité significativement inférieure au contrôle. Cependant, cette valeur est équivalente aux valeurs de base du jour 0. En effet, le taux de MDA au 7^{ème} jour pour les concentrations 0 ; 0,63 et 1,26 mg/L sont plus élevées que leurs valeurs de base du jour 0.

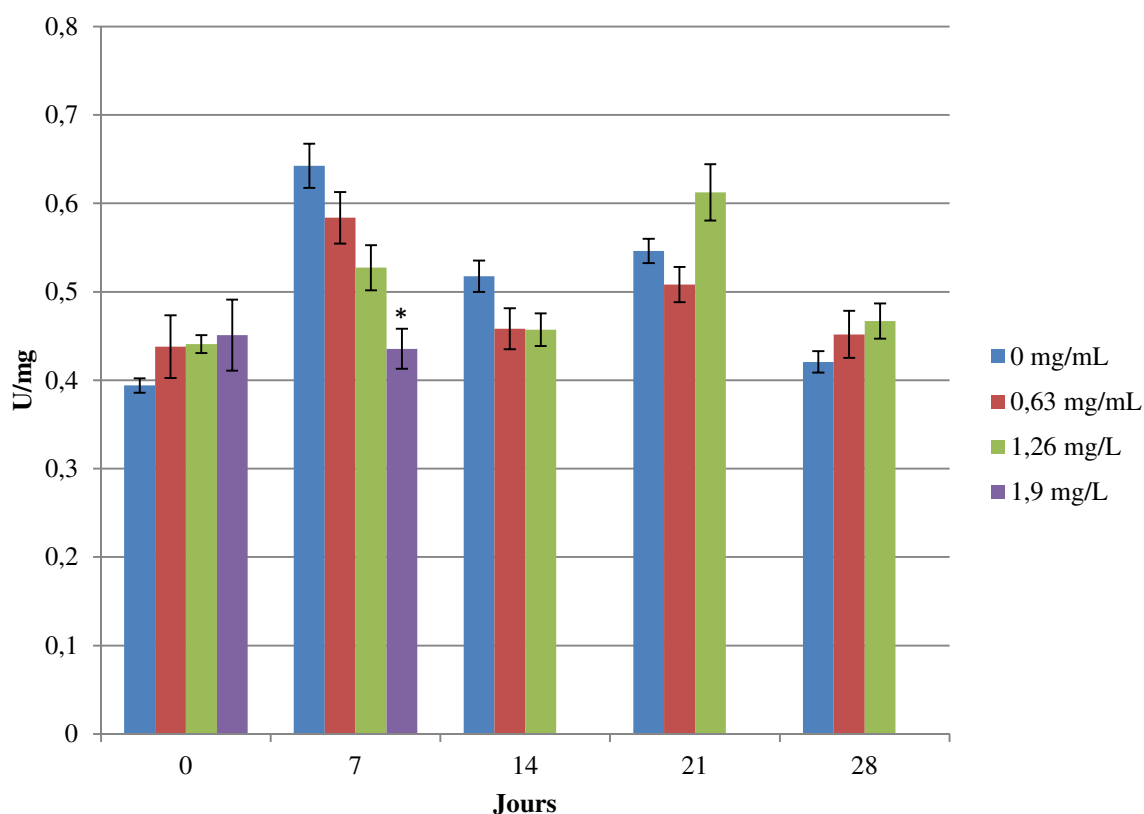


Figure 43 : Évaluation de l'effet de l'EMSR de *C. frondosa* sur la quantité de MDA présent dans la glande digestive de *C. virginica* en fonction du temps et de la concentration en EMSR. Les résultats sont exprimés en $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines. * et ** représentent les différences significatives entre le groupe contrôle et le groupe testé ($P < 0.05$ et $P < 0.005$ respectivement) pour chaque temps testé (ANOVA à un facteur suivi d'un test de Tukey).

Le MDA est induit lorsque l'animal est en présence de contaminants comme les métaux, les HAP, les composés polychlorobiphényles (PCB) et les résidus de pesticides (Srain et Rudolph, 2010). La peroxydation lipidique est liée à un déséquilibre entre les composés pro- et antioxydants (Zanette *et al.*, 2011), elle est majoritairement retrouvée lors de pollution dans l'environnement face aux hydrocarbures en concentration massive.

Cette induction est également liée à la pollution par les métaux. L'étude de Géret *et al.* (2002) a mis en évidence que la réponse était fonction de la nature des organes cibles. Une diminution significative du taux de MDA a été observée dans des branchies d'huîtres (*Crassostrea gigas*) exposées au Cd (Cadmium), Cu (Cuivre) et Hg (Mercure) après 21 jours d'exposition alors que pour la même exposition, les niveaux de MDA dans la glande digestive n'avaient pas montré de différences significatives. Dans notre étude, il peut être supposé que le niveau de MDA pourrait être significativement plus élevé dans les branchies.

L'effet significativement négatif retrouvé à la concentration 1,9 mg/L au 7^{ème} jour doit être pondéré. En effet, les spécimens des bassins exposés à cette concentration ont subi une mortalité massive après le 10^{ème} jour, ce qui signifie que l'état de santé des animaux au 7^{ème} jour devait être fragilisé, ce résultat révèle que ces spécimens ne sont pas des modèles adéquats pour un essai de toxicologie chronique. A l'exception de ce point et de l'augmentation non significative entre les concentrations 0 ; 0,63 et 1,26 mg/mL au 7^{ème} jour, les niveaux de MDA ne semblent pas avoir été affectés par l'exposition à l'EMSR. La légère augmentation au 7^{ème} jour pour les concentrations 0 ; 0,63 et 1,26 mg/mL peuvent être la conséquence d'un stress oxydant non maîtrisé dans cette étude. En effet, les niveaux de MDA reviennent ensuite à des niveaux équivalents au premier temps de prélèvement. Face à la multitude de facteurs mis en jeu dans ce genre d'évaluation, certains phénomènes ne peuvent être totalement maîtrisés. Ceci a été notamment mis en évidence lors d'études sur l'évaluation de la peroxydation lipidique (Brahim Errahmani *et al.*, 2014).

9.4.6.3 Effet de l'EMSR sur la quantité de CAT dans la glande digestive

Les résultats du dosage de la catalase (CAT) obtenus après exposition de l'huître américaine à différentes concentrations d'EMSR sont présentés dans la Figure 44. Les mesures réalisées au jour 0 n'ont pas montré de différences significatives ce qui a donc permis de valider le dosage de cette enzyme. Le dosage de la CAT dans la glande digestive de *C. virginica* mis en contact avec l'EMSR de *C. frondosa* à différentes concentrations sur une période de 28 jours n'a pas montré de différences significatives entre les échantillons testés. Au 7^{ème} jour, nous retrouvons le même type de résultat que celui constaté pour le MDA avec un effet inversement proportionnel du niveau de CAT en fonction de la concentration.

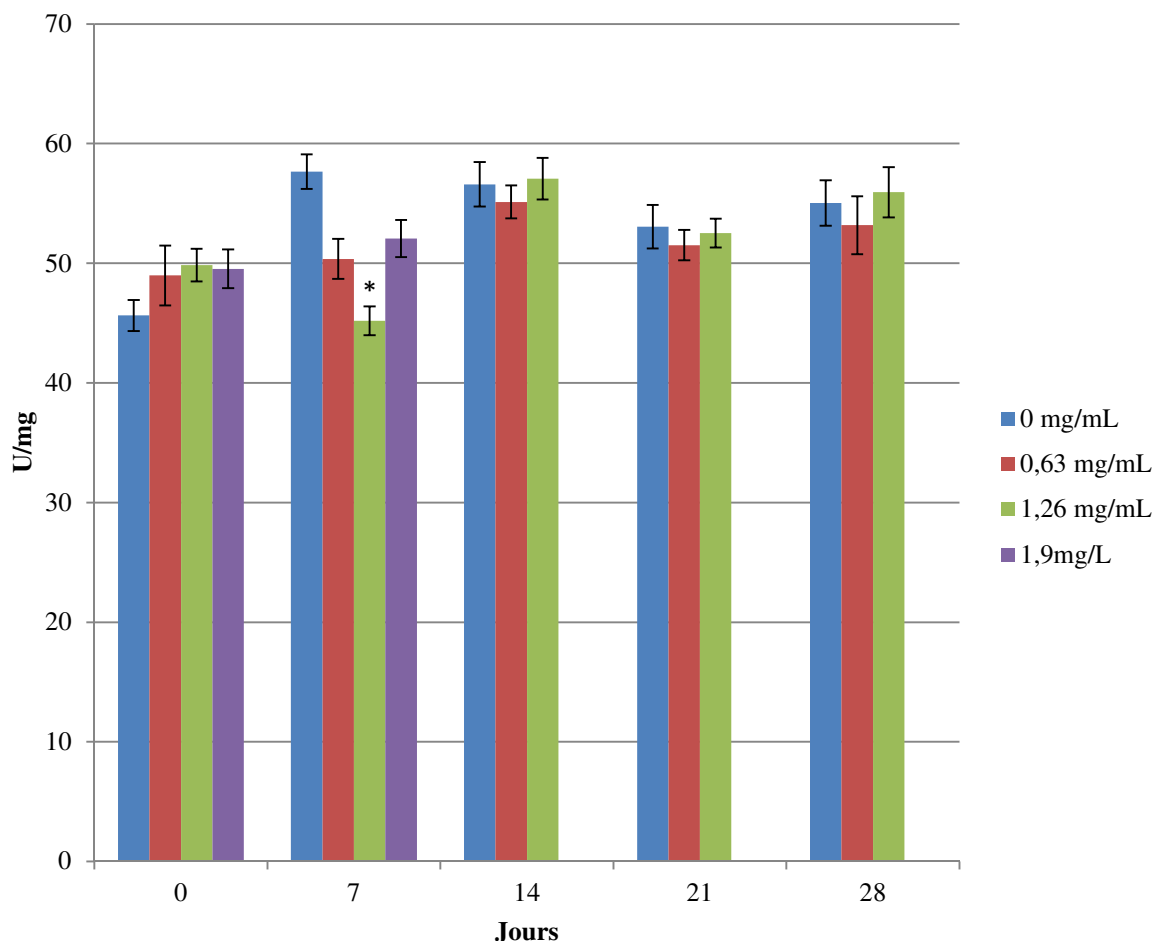


Figure 44 : Évaluation de l'effet de l'EMSR de *C. frondosa* sur la quantité de catalase présente dans la glande digestive de *C. virginica* en fonction du temps et de la concentration en EMSR. Les résultats sont exprimés en $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ (U/mg de protéines). * et ** représentent les différences significatives entre le groupe contrôle et le groupe testé ($P < 0.05$ et $P < 0.005$ respectivement) pour chaque temps testé (ANOVA à un facteur suivi d'un test de Tukey).

Mc Carthy *et al.* (2013) ont montré que les nanoparticules d'Ag (Argent), retrouvées dans l'environnement, issues des industries de nouvelles technologies entraînaient une augmentation du niveau de CAT chez *Crassostrea virginica*. Cependant, un niveau plus faible est retrouvé pour une concentration encadrée par sa concentration directement inférieure et directement supérieure. Ceci qui peut être en partie expliqué par le système de complémentarité mentionné plus haut. Lüchmann *et al.* (2011) ont montré que l'exposition aiguë de *Crassostrea brasiliana* à de fortes concentrations de déchets d'industries pétrochimiques n'entraînait pas de variations du niveau de CAT au sein de la glande digestive.

Il peut donc être supposé que l'EMSR à 1,26 mg/L au 7ème jour n'entraîne pas le même profil de niveau de CAT que pour les autres concentrations, cette explication est corroborée par l'étude de Brahim Errahmani *et al.* (2014). Cette étude démontre que le niveau de catalase dans la glande digestive n'est pas forcément concentration-dépendante. La différence significative observée entre le contrôle et la concentration 1,26 mg/L observée au 7ème jour est peut-être plus probablement lié à une augmentation du niveau de CAT dans le contrôle. En effet, la constatation d'une légère augmentation du contrôle au 7ème jour peut être reliée à l'hypothèse émise pour le MDA. Un stress oxydant non maîtrisé peut être à l'origine de l'augmentation du niveau de CAT pour le contrôle à ce jour. Cependant, la tendance générale montre une homogénéité du niveau de catalase, l'exposition prolongée de *C. virginica* à l'EMSR semble ne pas influencer le niveau de cette enzyme au sein de la glande digestive.

9.4.6.4 Effet de l'EMSR sur la quantité d'AchE dans la glande digestive

Les résultats du dosage de l'Acétylcholine Estérase (AchE) obtenus après exposition de l'huître américaine à différentes concentrations d'EMSR ont été présentés dans la Figure 45.

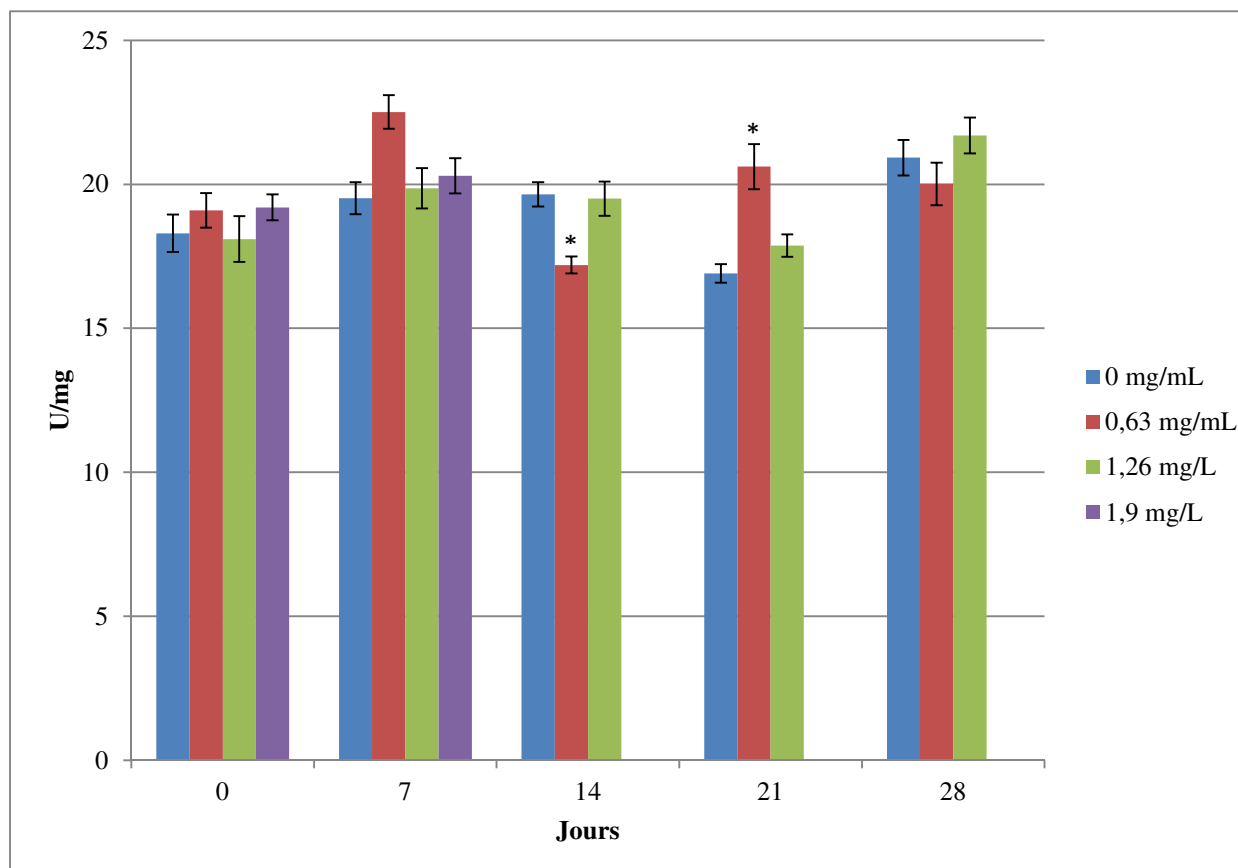


Figure 45 : Évaluation de l'effet de l'EMSR de *C. frondosa* sur la quantité d'AchE présente dans la glande digestive de *C. virginica* en fonction du temps et de la concentration en EMSR. Les résultats sont exprimés en $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ (U/mg de protéines). * et ** représentent les différences significatives entre le groupe contrôle et le groupe testé ($P < 0.05$ et $P < 0.005$ respectivement) pour chaque temps testé (ANOVA à un facteur suivi d'un test de Tukey).

Les mesures réalisées au jour 0 n'ont pas montré de différences significatives ce qui a donc permis de valider le dosage de cette enzyme. Le dosage de l'AchE dans la glande digestive de *C. virginica* mis en contact avec l'EMSR de *C. frondosa* à différentes concentrations sur une période de 28 jours n'a pas montré de différences significatives entre les échantillons testés pour les concentrations 0 et 1,26 mg/L. Cependant, par rapport au témoin, la concentration 0,63 mg/L a montré une diminution significative de l'activité de l'enzyme au 14^{ème} jour et une augmentation significative au 21^{ème} jour.

Anguiano *et al.* (2010) ont réalisé une étude sur l'évaluation de l'effet de l'exposition à différents pesticides et autres polluants sur l'activité de l'AchE sur les branchies de *Crassostrea gigas*. Les pesticides impliqués (organochlorés, carbamates et organophosphorés) ont entraîné une inhibition plus ou moins importante selon la nature du composé après 72 et 96 h. Une comparaison des niveaux d'inhibition selon la concentration de Lindane (organochloré) après 12 jours d'exposition a montré une plus forte inhibition pour une concentration plus faible en pesticide. L'exposition de la moule *Mytilus galloprovincialis* à différentes concentrations en fuel a permis de mettre en évidence une tendance similaire à celle observée dans notre étude au cours du temps (Solé *et al.*, 2007). Sur une exposition de 10 jours, le niveau de l'AchE dans les branchies est passé d'une valeur supérieure au témoin, à une valeur inférieure après 4 jours d'exposition pour revenir après 10 jours à une valeur basale équivalente au témoin.

L'évaluation de l'effet de l'EMSR montre une faible inhibition de l'AchE pour la plus faible concentration (0,63 mg/L) après 14 jours d'exposition. Elle est associée d'un surplus d'activité mesurée au 21^{ème} jour, ceci est probablement lié à un retour à l'état d'équilibre, hypothèse confirmée par des niveaux équivalents retrouvés au 28^{ème} jour.

En conclusion, l'évaluation de l'effet de l'EMSR de *C. frondosa* par l'utilisation de biomarqueurs spécifiques sur le modèle *C. virginica* n'a pas permis de dégager de réels effets significatifs de l'extrait sur les différents biomarqueurs que nous avons choisi de mesurer dans la glande digestive, excepté une faible inhibition de l'Acétylcholinestérase à 14 jours d'exposition pour la concentration à 0,63 mg/L. D'autres biomarqueurs, mesurés dans le même organe ou dans un organe différent (branchies) pourraient peut-être se révéler utiles pour nous aider à mieux comprendre le mécanisme d'action toxique de l'EMSR.

9.5 Fractionnement bioguidé des métabolites secondaires toxiques de *C. frondosa*

Comme il a été vu précédemment (voir partie 2.1), les glycosides triterpéniques des holothuries semblent être le mécanisme de défense le plus efficace pour faire face aux prédateurs (Van Dyck *et al.*, 2011). Préalablement au fractionnement des métabolites secondaires toxiques et à l'identification de ces molécules, un travail de synthèse des travaux sur les différents glycosides triterpéniques de *Cucumaria frondosa* déjà publiés dans la littérature a été réalisé et présenté dans le Tableau IV. Ce tableau de synthèse permet de mettre en évidence la présence d'une grande variété de saponines au sein de l'espèce *Cucumaria frondosa*. Parmi cet ensemble de molécules, seulement quelques-unes ont été associées à des activités biologiques et notamment le Frondoside A. En effet, il représente la majorité des activités biologiques décrites à ce jour dans la littérature, entre autre comme composé antitumoral (Attoub *et al.*, 2013), immunostimulant (Aminin *et al.*, 2008) et cytotoxique (Wang *et al.*, 2014). De plus, la structure chimique du Frondoside A a été décrite. Celui-ci a donc été introduit dans nos analyses à des fins de comparaison et d'identification des composés présents dans les extraits.

9.5.1 Analyse des EMSR par LC-PAD

L'analyse des chromatogrammes des EMSR de 2011 et de 2013 a permis la détection de de plusieurs composés dans les 2 extraits. Le chromatogramme de l'EMSR de 2013 (Figure 46) montre 5 clusters de pics (Fractions dénommées F1 à F5 et repérées par des zones grisées). Chaque cluster est constitué d'1 pic majoritaire et au maximum de 2 pics minoritaires. Ces 5 clusters de pics sont également présents dans l'EMSR de 2011. Ces 5 clusters constituent les 5 fractions sélectionnées pour la séparation semi-préparative. Ils correspondent aux intervalles de temps de rétention présentés dans le Tableau XXVI).

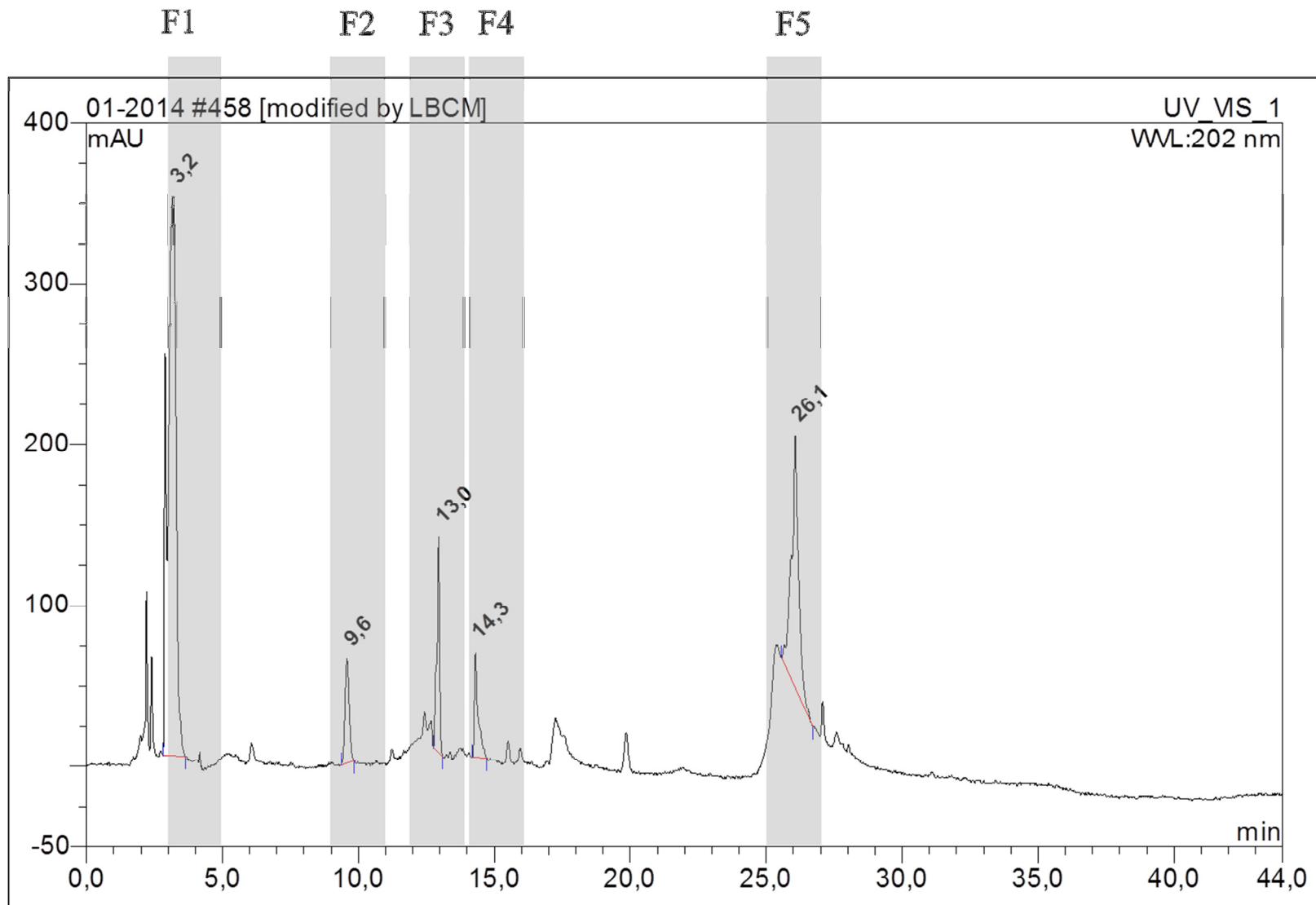


Figure 46 : Chromatogramme de l'EMSR de 2013. Les zones grisées représentent les 5 fractions différentes sélectionnées par chromatographie liquide analytique.

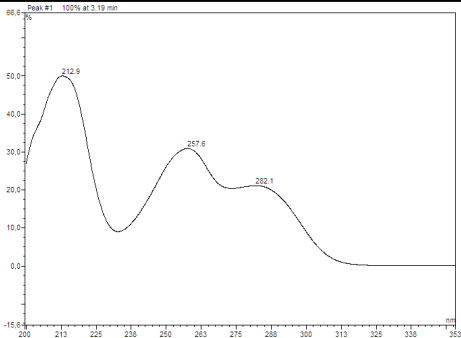
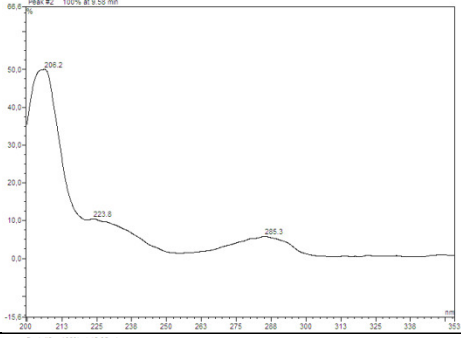
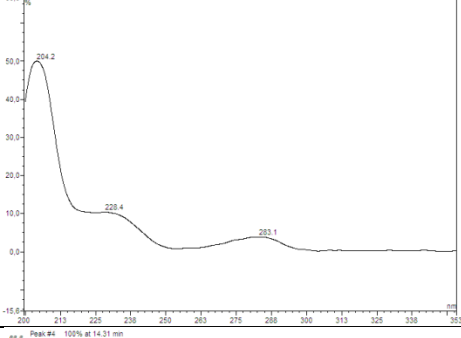
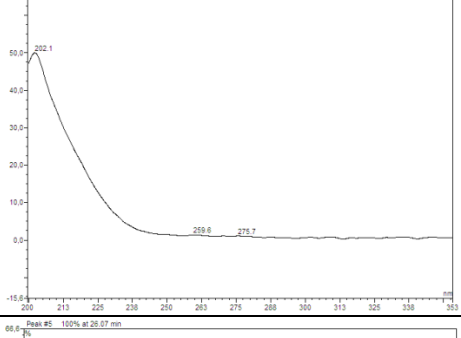
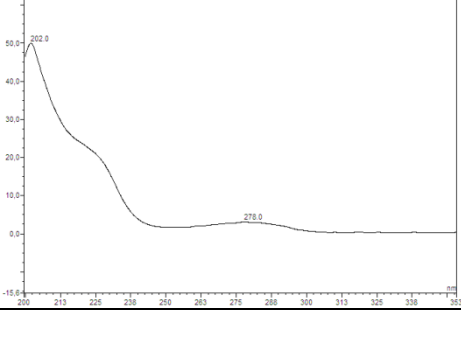
Tableau XXVI : Temps de rétention des fractions identifiées en séparation analytique (min)

Numéro de fraction	Temps de rétention (min)
1	[3-5[
2	[9-11[
3	[12-14[
4	[14-16[
5	[25-27[

Les pics présents au temps de rétention 17,2 et 19,8 min sur l'EMSR de 2013 n'ont pas été retenus car ils n'ont pas été retrouvés dans l'EMSR de 2011. L'absence de ces pics minoritaires dans l'EMSR de 2011 peut être expliquée par l'optimisation du procédé d'extraction appliqué ou par une variabilité de la matière première. Les pics majoritaires des 5 clusters sont caractérisés par leur spectre d'absorption présenté dans le tableau XXVII.

Les 3 premiers pics majoritaires des fractions F1, F2 et F3 (temps de rétention : 3,2 ; 9,6 et 13,0 min) présentent 3 valeurs d'absorbance maximales (λ_{\max}), à la différence des 2 pics majoritaires des fractions F4 et F5 (temps de rétention : 14,3 et 26,1 min) qui ne possèdent qu'un seul λ_{\max} . Les λ_{\max} des composés des fractions F1, F2 et F3 montrent que ceux-ci sont de nature chimique différente. Les composés des fractions F4 et F5 possèdent des profils d'absorbance voisins avec un λ_{\max} de 202,1 et 202,0 nm respectivement. Ces derniers possèdent donc un chromophore commun. Cependant la différence des temps de rétention démontre une composition chimique différente. Selon la littérature, le Frondoside A est caractérisé par un spectre d'absorbance dont le λ_{\max} est inférieur à 210 nm (Girard *et al.*, 1990). D'après ce premier résultat, le composé associé au pic majoritaire des fractions 4 et 5 pourrait correspondre au Frondoside A. Des analyses supplémentaires sont nécessaires afin de valider cette hypothèse.

Tableau XXVII : Spectres d'absorption des pics majoritaires représentatifs des 5 fractions sélectionnées (tr : temps de rétention).

Fraction	Pic majoritaire (tr en min)	Spectre d'absorption	Absorbance (nm)
1	3,2		$\lambda_{\max 1} : 212,9$ $\lambda_{\max 2} : 257,6$ $\lambda_{\max 3} : 282,1$
2	9,6		$\lambda_{\max 1} : 206,2$ $\lambda_{\max 2} : 223,8$ $\lambda_{\max 3} : 285,3$
3	13,0		$\lambda_{\max 1} : 204,2$ $\lambda_{\max 2} : 228,4$ $\lambda_{\max 3} : 283,1$
4	14,3		$\lambda_{\max} : 202,1$
5	26,1		$\lambda_{\max} : 202,0$

9.5.2 Fractionnement bioguidé par LC-PAD

Les fractions identifiées par chromatographie analytique ont été ensuite utilisées sur une colonne semi-préparative dans le but de les isoler et de les concentrer afin d'évaluer leur potentiel cytotoxique et de déterminer la fraction active. Les 5 clusters de pics ont été retrouvés sur les chromatogrammes de la séparation sur colonne semi-préparative pour les 2 extraits. Les temps de rétention correspondant aux fractions sélectionnées ne sont pas exactement les mêmes que ceux obtenus par la séparation analytique. En effet, les séparations chromatographiques ont été modifiées par l'utilisation d'une colonne semi-préparative possédant un diamètre plus important et un volume d'échantillon injectée 10 fois plus élevée. Les temps de rétention ont été ajustés pour la collecte de fractions dans le but de concentrer. Ils sont présentés dans le Tableau XXVIII.

Tableau XXVIII : Temps de rétention des fractions identifiées en séparation semi-préparative (min)

Numéro de fraction	Temps de rétention (min)
1	[2-5[
2	[6-8[
3	[11-13[
4	[13-15[
5	[23-26[

9.5.3 Evaluation de la cytotoxicité des fractions isolées par HPLC semi-préparative

L'évaluation cytotoxique des EMSR bruts de 2011, 2012, 2013 et les 6 lots de 2014 montre une importante toxicité sur les cellules Vero. Les résultats sont présentés dans le Tableau XXIX. Cette évaluation a permis de mettre en évidence que les différents extraits bruts contiennent des composés cytotoxiques à des concentrations proches.

Tableau XXIX : Evaluation cytotoxique des EMSR bruts de 2011, 2012, 2013 et 2014

Extrait testé	CC ₅₀ (µg/mL)
EMSR 2011 - brut	15,4 ±1,4
EMSR 2012 - brut	16,9 ±1,5
EMSR 2013 - brut	18,6 ±3,5
EMSR 2014 / lot 1 - brut	27,2 ±4,2
EMSR 2014 / lot 2 - brut	28,5 ±5,1
EMSR 2014 / lot 3 - brut	25,3 ±2,3
EMSR 2014 / lot 4 - brut	32,3 ±6,1
EMSR 2014 / lot 5 - brut	27,3 ±2,5
EMSR 2014 / lot 6 - brut	22,1 ±3,0

Disponibles en quantité suffisante, les EMSR de 2011 et 2013 ont été fractionnés dans le but de cibler la fraction cytotoxique parmi les cinq collectées. Pour chaque essai, les extraits bruts d'EMSR de 2011 et de 2013 ont été également testés en parallèle comme contrôle. Seule la fraction 5 (Fraction 23-26 min) des 2 lots a montré une activité cytotoxique. Les concentrations cytotoxiques à 50% obtenues sont résumées dans le Tableau XXX. Les valeurs présentées sont les moyennes des valeurs obtenues sur 3 répétitions d'échantillons.

Tableau XXX : Evaluation cytotoxique des fractions d'EMSR de 2012 et 2013 obtenues par séparation chromatographique en phase liquide.

Extrait testé	CC ₅₀ (µg/mL)
EMSR 2011 - brut	18,9 ±1,9
EMSR 2011 - Fraction 1	> 500
EMSR 2011 - Fraction 2	> 500
EMSR 2011 - Fraction 3	> 500
EMSR 2011 - Fraction 4	> 500
EMSR 2011 - Fraction 5	13,4 ±1,8
EMSR 2013 - brut	17,8 ±2,4
EMSR 2013 - Fraction 1	> 500
EMSR 2013 - Fraction 2	> 500
EMSR 2013 - Fraction 3	> 500
EMSR 2013 - Fraction 4	> 500
EMSR 2013 - Fraction 5	15,2 ±2,1

Les concentrations cytotoxiques à 50% de la fraction 5 montrent donc une activité toxique importante sur les cellules Vero, que ce soit pour le lot d'EMSR de 2011 ou bien celui de 2013 avec une valeur de CC₅₀ égale à 13,4 et 15,2 µg/mL respectivement.

9.6 Caractérisation de l'EMSR par spectrométrie de masse (LC Q-TOF HRMS)

9.6.1 Spectrométrie de masse en mode positif de l'EMSR

Profils chromatographiques

La fraction 5, identifiée comme cytotoxique dans la partie précédente, éluée entre 23 et 26 min, a été caractérisée avec le même programme d'élution par LC Q-TOF HRMS. Ce programme d'élution a ensuite été réduit et a conduit à un déplacement du temps de rétention. Le temps de rétention de la fraction 5 (F5) est réduit à 11 min en lien avec la géométrie de la colonne utilisée. Le détecteur utilisé dans cette partie (TIC : Total Ion Current) est différent du détecteur UV utilisé dans la partie précédente fixé à 202 nm. Ici, tous les composés ionisables sont détectés, ceci entraîne un profil de chromatogramme différent. Les chromatogrammes obtenus sont présentés dans la Figure 47. La fraction 5 identifiée par superposition d'un repère (zone grisée) sur les chromatogrammes des lots 5 et 6 de l'EMSR de 2014, de l'EMSR de 2013 et du Frondoside A apparaît comme étant commune à tous les échantillons.

Les chromatogrammes des 3 lots d'EMSR présentent des profils similaires avec la présence de pics ou de clusters de pics retrouvés à : 0,81 ; 3,00-6,00 ; 8,00-12,00 et 14,00-19,00 min. Le chromatogramme du Frondoside A montre des pics communs avec les 3 lots d'EMSR, et notamment à : 0,80; 5,63; 11,28 et 14,00-19,00 min.

Spectres de masse (mode positif)

Les spectres de masse illustrés dans la Figure 48 correspondent au pic majoritaire de la fraction 5 de chaque lot d'EMSR. Le spectre de masse du pic élué entre 11,18 et 11,33 min montre un composé majoritaire commun aux lots 5 et 6 de l'EMSR de 2014, de l'EMSR de 2013 et du Frondoside A. Ces pics sont respectivement caractérisés par une valeur m/z égale à 1313,5936 ; 1313,5907 ; 1313,5874 et 1313,5967.

Les chromatogrammes TIC et les spectres de masse démontrent la présence du Frondoside A ($C_{60}H_{96}O_{29}S$) dans la fraction 5 de tous les échantillons. L'explication la plus plausible pour la présence de l'ion identifié correspondant au pic m/z 1181 suggère un glycoside triterpénique dérivé du Frondoside A ayant perdu un xylose. Cet ion est également retrouvé dans le spectre de masse du standard de Frondoside A.

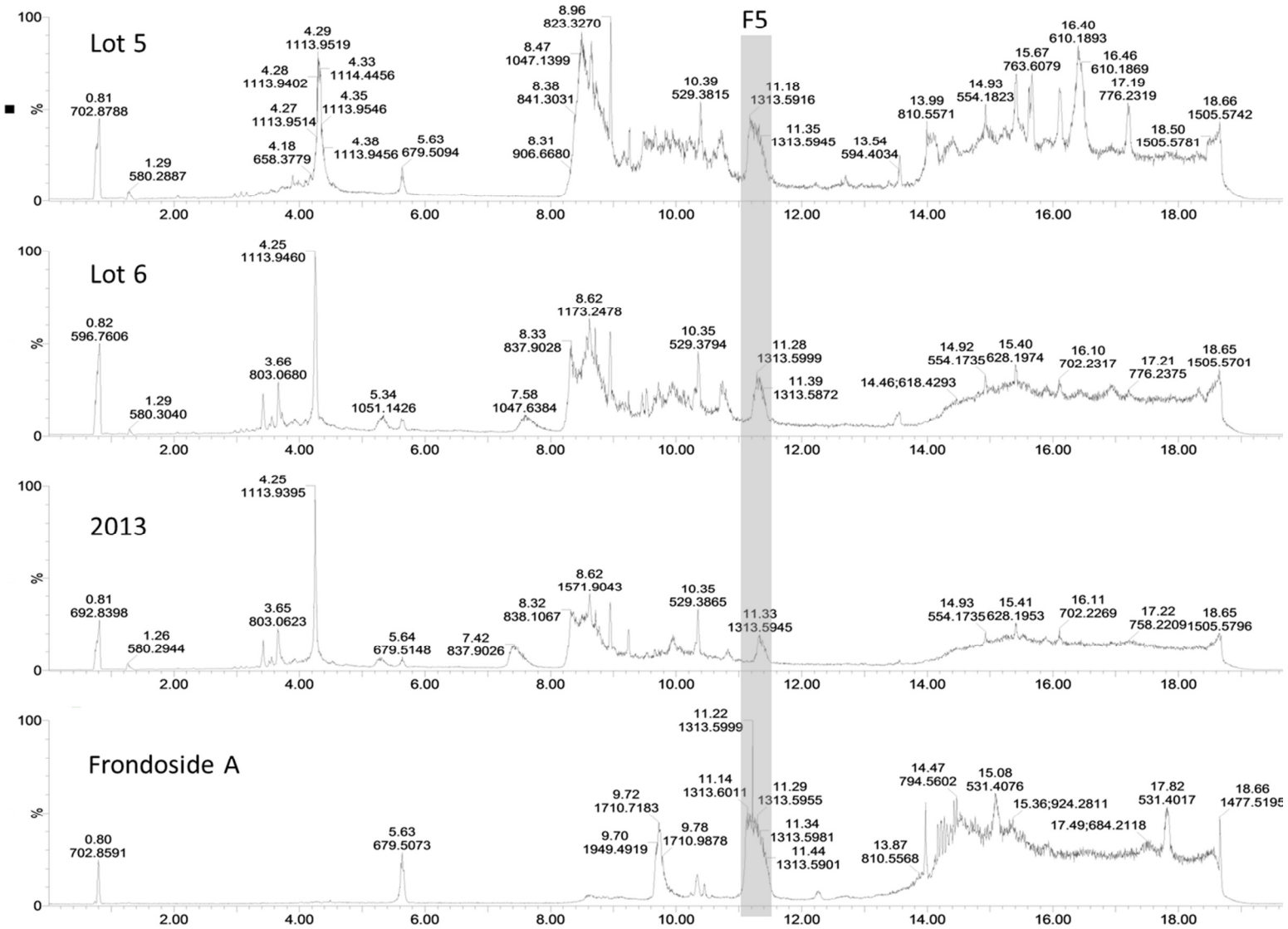


Figure 47 : Chromatogrammes des lots 5 et 6 de l'EMSR de 2014, de l'EMSR de 2013 et du Frondoside A obtenus par LC Q-TOF HRMS en mode positif.

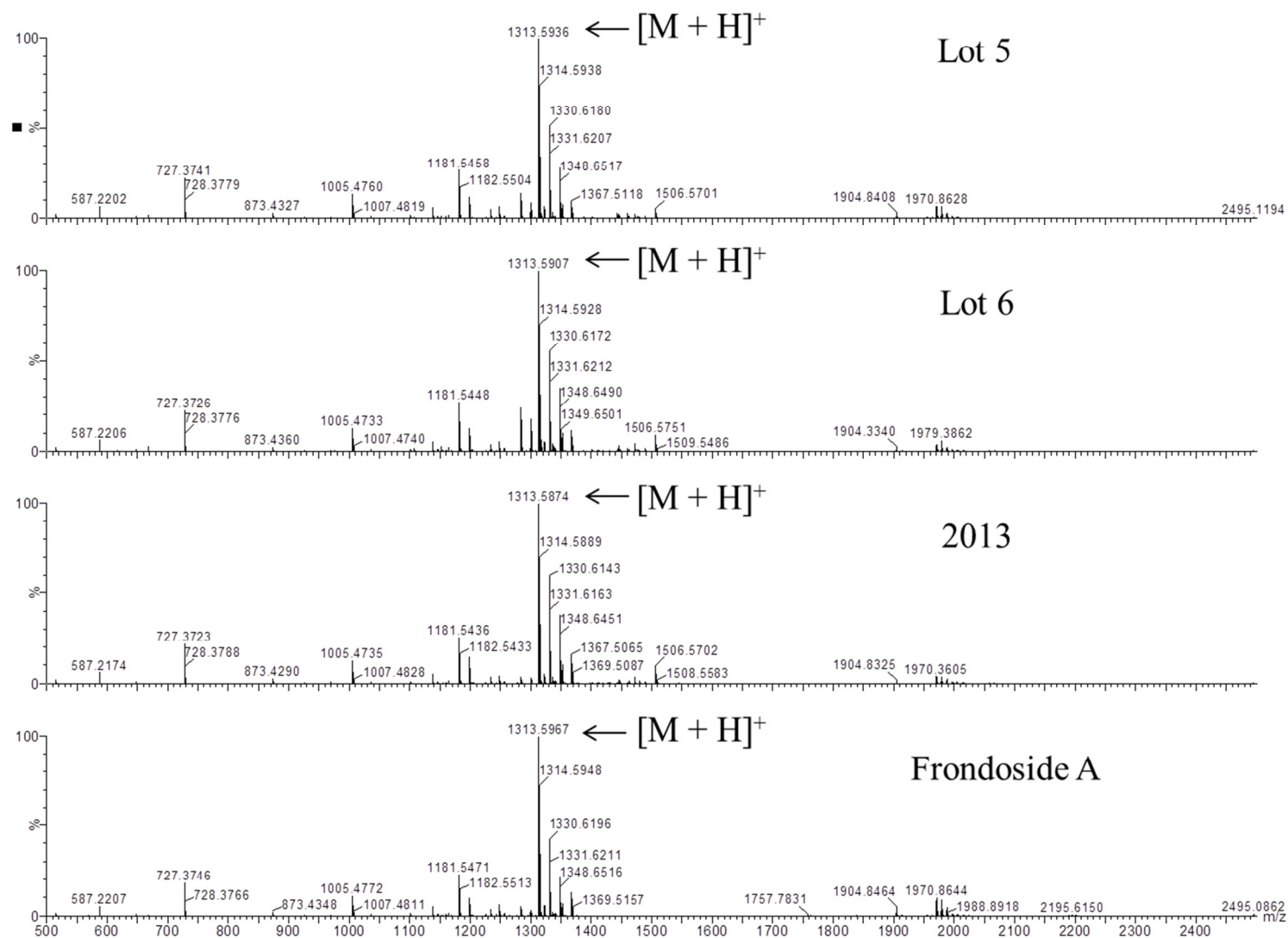


Figure 48 : Spectres de masse des pics à 11,18 ; 11,28 ; 11,33 et 11,22 min correspondant respectivement aux pics majoritaires de la fraction 5 des lots 5 et 6 de l'EMSR de 2014, de l'EMSR de 2013 et du Frondoside A obtenus par LC Q-TOF HRMS en mode positif.

9.6.2 Spectrométrie de masse en mode négatif de l'EMSR

Profils chromatographiques

Les chromatogrammes obtenus pour les lots 5 et 6 de l'EMSR de 2014, de l'EMSR de 2013 et du Frondoside A sont présentés dans la Figure 49. La fraction 5 identifiée par superposition d'un repère (zone grisée) sur les chromatogrammes des lots 5 et 6 de l'EMSR de 2014, de l'EMSR de 2013 et du Frondoside A apparaît comme étant commune à tous les échantillons. Les chromatogrammes en mode négatif des 3 lots d'EMSR présentent également des profils similaires avec la présence de pics ou de clusters de pics retrouvés à : 0,81 ; 8,00-11,00 ; 11,00-12,00 et 18,65 min. Le chromatogramme du Frondoside A montre des pics identiques pour les 3 lots d'EMSR, et notamment avec la présence du pic majoritaire retrouvé entre 11,00 et 12,00 min et le pic retrouvé à 18,66 min.

Spectres de masse (mode négatif)

En raison de l'ionisation de la chaîne glucidique et des groupements sulfates, le mode négatif permet une meilleure résolution du spectre de masse. Les spectres de masse obtenus pour le pic majoritaire de la fraction 5 en mode négatif des lots 5 et 6 de l'EMSR de 2014, de l'EMSR de 2013 et du Frondoside A sont présentés dans la Figure 50. Le spectre de masse du pic élué entre 11,21 et 11,74 min montre un composé majoritaire commun aux lots 5 et 6 de l'EMSR de 2014, de l'EMSR de 2013 et du Frondoside A. Ces pics sont respectivement caractérisés par une valeur m/z égale à 1311,5735 ; 1311,5703 ; 1311,5718 et 1311,5845. Les chromatogrammes TIC et les spectres de masse en mode négatif démontrent la présence du Frondoside A ($C_{60}H_{96}O_{29}S$) dans la fraction 5 de tous les échantillons. Le chromatogramme du standard présente un cluster de pics entre 14,00 et 19,00 min qui n'est pas retrouvé dans les 3 lots d'EMSR.

Les résultats obtenus en mode positif et en mode négatif démontrent la présence du Frondoside A dans la fraction 5 toxique retrouvée entre 11,00 et 12,00 min des lots 5 et 6 de l'EMSR de 2014 et de l'EMSR de 2013.

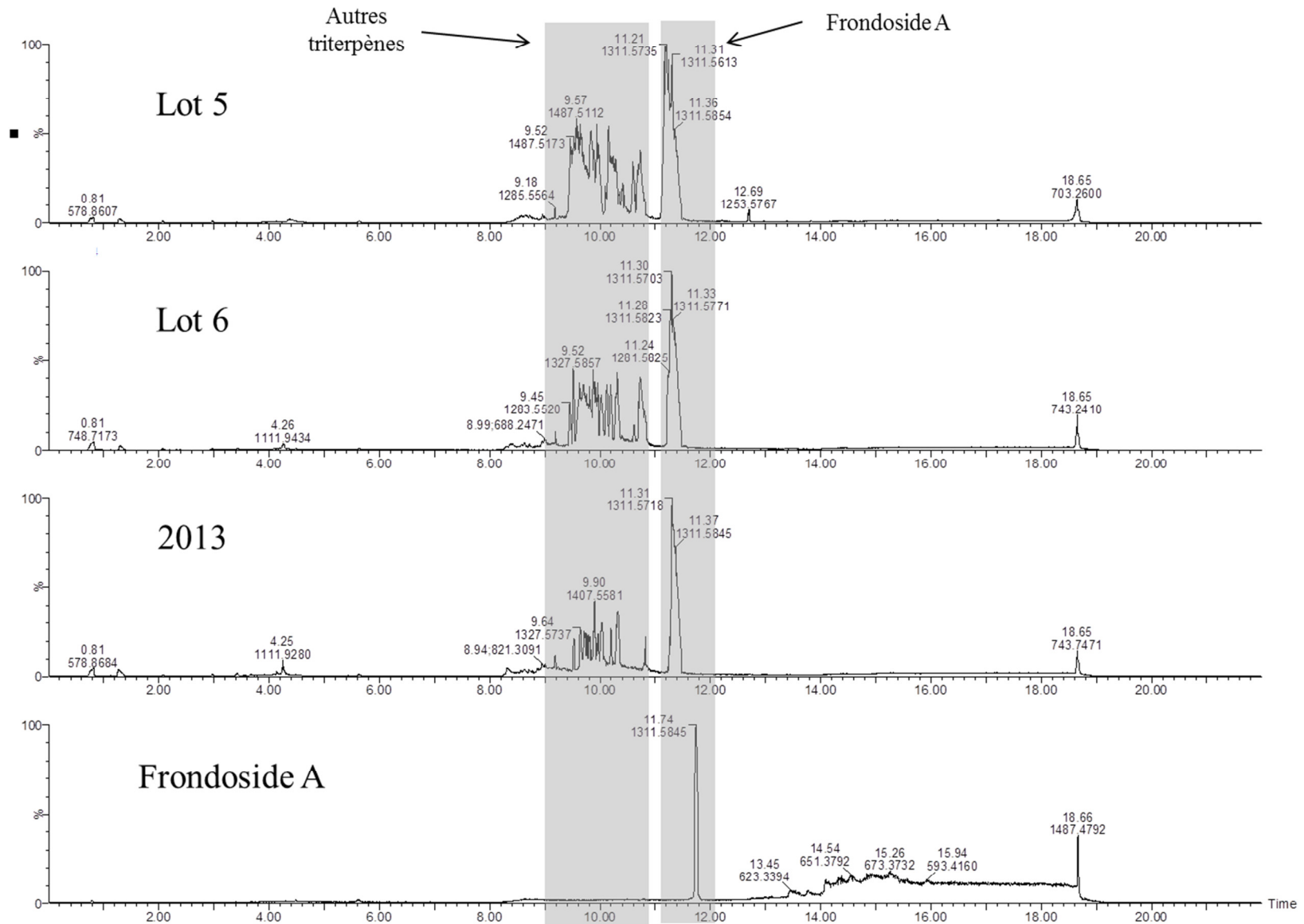


Figure 49 : Chromatogrammes des lots 5 et 6 de l'EMSR de 2014, de l'EMSR de 2013 et du Frondoside A obtenus par LC Q-TOF HRMS en mode négatif

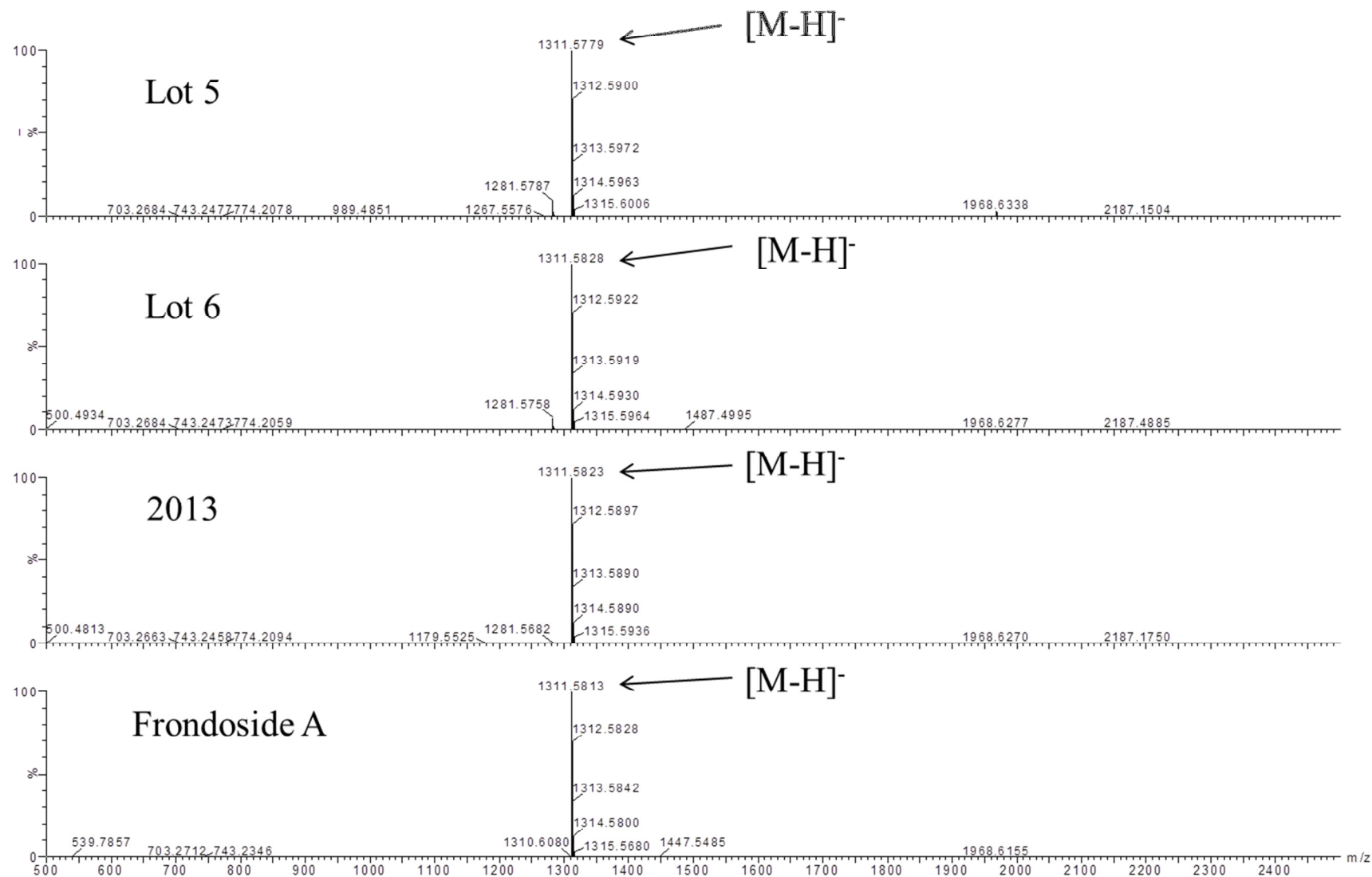


Figure 50 : Spectres de masse des pics à 11,21 ; 11,30 ; 11,31 et 11,74 min correspondant respectivement aux pics majoritaires de la fraction 5 des lots 5 et 6 de l'EMSR de 2014, de l'EMSR de 2013 et du Frondoside A obtenus par LC Q-TOF HRMS en mode négatif.

Les chromatogrammes des lots d'EMSR ont également mis en évidence la présence d'autres composés correspondants au cluster de pics élué entre 8 et 11 min (Figure 49). Les spectres de masses ont permis de démontrer la présence d'autres glycosides triterpéniques identifiés dans le Tableau XXXI. L'analyse des spectres de masse en comparaison aux valeurs de m/z associées à des glycosides triterpéniques connus (Tableau IV) a permis l'identification du Frondoside A ($m/z = 1311,5679$), Frondoside A₂-1 ($m/z = 1295,5372$), Frondoside A₂-2 ($m/z = 1295,5372$), Frondoside A₂-3 ($m/z = 1297,5528$), Frondoside A₂-4 ($m/z = 1281,5579$), Frondoside A₂-6 ($m/z = 1295,5372$), Frondoside A₂-7 ($m/z = 1327,5998$), Frondoside A₂-8 ($m/z = 1327,5998$), Frondoside A₇-1 ($m/z = 1455,4508$), Frondoside A₇-2 ($m/z = 1441,4715$), Frondoside A₇-3 ($m/z = 1445,5028$), Frondoside A₇-4 ($m/z = 1445,5028$), Frondoside B ($m/z = 1361,5147$), isofrondoside C ($m/z = 1487,5134$) et le Frondoside D ($m/z = 1327,5634$) dans les 3 lots d'EMSR. Le Frondoside A₇-1 a été seulement identifié dans le lot 6 de l'EMSR de 2014. La difficulté de séparation de ces glycosides triterpéniques d'holothuries est régulièrement mentionnée dans la littérature du fait du caractère amphiphile et de la variabilité structurale de la partie glycosidique (Silchenko *et al.*, 2005). La structure de ces différents composés est illustrée dans l'Annexe 4.

L'utilisation de la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) pourrait être utilisée afin de procéder à la séparation de ces composés. En effet, à l'aide de cette méthode, Bahrami *et al.* (2014) ont isolé 5 nouvelles saponines à partir de l'holothurie *Holothuria lessoni*. La CPC est une technique de chromatographie liquide-liquide fondée sur la différence de partage des solutés entre les 2 phases liquides non miscibles d'un système biphasique. L'une des deux phases liquides est utilisée comme phase stationnaire et est maintenue dans la colonne grâce à la force centrifuge. La deuxième phase du système est utilisée comme phase mobile qui est alors pompée au travers de la phase stationnaire. La différence de coefficients de partage des solutés permet alors leur séparation. Cette technique est utilisée pour la séparation de composés naturels à partir d'extraits bruts complexes (Lu *et al.*, 2006).

Tableau XXXI : glycosides triterpéniques identifiés dans l'EMSR de *Cucumaria frondosa* en LC Q-TOF HRMS en mode négatif

Nom molécule	Formule empirique	[M-H] ⁻ m/z	EMSR 2013	EMSR 2014 (Lot 5)	EMSR 2014 (Lot 6)
Frondoside A	C ₆₀ H ₉₆ O ₂₉ S	1311,5679	X	X	X
Frondoside A ₂ -1					
Frondoside A ₂ -2	C ₅₉ H ₉₂ O ₂₉ S	1295,5372	X	X	X
Frondoside A ₂ -6					
Frondoside A ₂ -3	C ₅₉ H ₉₄ O ₂₈ S	1297,5528	X	X	X
Frondoside A ₂ -4	C ₅₉ H ₉₄ O ₂₈ S	1281,5579	X	X	X
Frondoside A ₂ -7					
Frondoside A ₂ -8	C ₆₁ H ₁₀₀ O ₂₉ S	1327,5998	X	X	X
Frondoside A ₇ -1	C ₅₉ H ₉₂ O ₃₅ S ₃	1455,4508			X
Frondoside A ₇ -2	C ₅₉ H ₉₄ O ₃₄ S ₃	1441,4715	X	X	X
Frondoside A ₇ -3					
Frondoside A ₇ -4	C ₅₉ H ₉₈ O ₃₄ S ₃	1445,5028	X	X	X
Frondoside B	C ₅₉ H ₉₄ O ₃₁ S ₃	1361,5147	X	X	X
isoFrondoside C	C ₆₁ H ₁₀₀ O ₃₅ S ₃	1487,5134	X	X	X
Frondoside D	C ₆₀ H ₉₆ O ₃ S	1327,5634	X	X	X

Plus de 100 saponines majoritairement extraites par extraction solide-liquide alcoolique du tégument ou de l'animal entier ont été décrites chez les holothuries (Van Dyck, 2011). Des activités intéressantes ont été rapportées sur des composés extraits de l'holothurie d'atlantique *Cucumaria frondosa*. Aminin *et al.* ont montré en 2008 que le glycoside triterpénique Frondoside A (Girard *et al.*, 1990) est un stimulant de l'immunité cellulaire induisant la phagocytose sans pour autant amplifier de manière significative l'activité humorale immune ou d'autres voies adjuvantes.

De nombreuses études ont mis en évidence les activités biologiques associées au Frondoside A. Une étude récente de Wang *et al.* (2014) a mis en évidence le caractère cytotoxique du Frondoside A sur 4 lignées cellulaires humaines par la méthode d'évaluation colorimétrique au MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). En effet, l'évaluation a montré des valeurs d'IC₅₀ égales à 3,30 ; 3,76 ; 4,14 et 5,42 µg/mL pour les lignées cellulaires Hela (lignée cellulaire modèle du cancer du col utérin), K562 (lignée cellulaire modèle de leucémie), HepG2 (lignée cellulaire modèle de carcinome hépatocellulaire) et HL-7702 (lignée cellulaire modèle d'hépatocytes) respectivement. Ce composé a également démontré des activités anticancéreuses *in vitro* et d'inhibition de croissance de tumeurs *in vivo* (Li *et al.*, 2008). L'activité antitumorale est majoritairement reliée à la capacité de la molécule d'induire l'apoptose des cellules cancéreuses (Jin *et al.*, 2009 ; Roginsky *et al.*, 2010). L'activité anticancéreuse du Frondoside A semble être également dû à ses effets antiangiogénique et antimétastatique (Al Marzouqi *et al.*, 2011 ; Ma *et al.*, 2012 ; Attoub *et al.*, 2013). Park *et al.* (2014) ont suggéré que le groupement acétyl en C₁₆ de la partie aglycone du Frondoside A pourrait avoir un rôle significatif dans la cytotoxicité. Les auteurs ont émis cette hypothèse en réalisant une comparaison du niveau d'activité avec un glycoside triterpénique structuralement proche mais isolé d'une espèce d'holothurie différente, *Cucumaria japonica*.

Des études récentes mettent en évidence que de faibles concentrations en Frondoside A inhibent la croissance et induisent l'apoptose de cellules cancéreuses pancréatiques, leucémiques et mammaires par l'activation de la voie des caspases (Li *et al.*, 2008 ; Jin *et al.*, 2009 ; Al Marzouqi *et al.*, 2011). Le Frondoside A améliorerait également l'inhibition de la croissance de tumeurs pulmonaires induites par l'agent chimiothérapeutique Cisplatine (Ma *et al.*, 2012).

Le Frondanol A5®, extrait alcool isopropylique/eau d'hydrolysate enzymatique d'épithélium de *Cucumaria frondosa*, a montré des effets contre la carcinogénèse du colon chez le rat et d'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses du colon chez l'humain (Janakiram *et al.*, 2010). Cet extrait contient le glycoside triterpénique Frondoside A, le glycoside disulfaté Frondoside B (Findlay *et al.*, 1992), le glycoside trisulfaté Frondoside C (Avilov *et al.*, 1998), de l'acide 12-méthyltetradécanoïque, de l'acide éicosapentaénoïque, du sulfate de chondroïtine fucosylée, et de la canthaxanthine/astaxanthine.

Le Frondoside C désulfaté est isolé de *C. frondosa* par une extraction solide-liquide alcoolique de l'animal entier. Il possède une activité cytotoxique ($IC_{50} = 1 \text{ mg/mL}$) lorsqu'il est testé *in vitro* en présence de plusieurs lignées cellulaires tumorales de souris et humaines (P-388, Schabel, A-549, HT-29, and Mel-28) (Avilov *et al.*, 1998).

Ces triterpènes glycosylés possèdent un large spectre d'activités, de nombreuses études ont donc été conduites dans le but d'identifier de nouvelles molécules ou de découvrir de nouvelles activités (Girard *et al.*, 1990 ; Findlay *et al.*, 1992 ; Silchenko *et al.*, 2005, 2007, 2008 ; Aminin *et al.*, 2008, 2009a, b, 2010 ; Al Marzouqui *et al.*, 2011 ; Al Shemali *et al.*, 2014). Cependant, les mécanismes d'action de ces molécules ne sont pas encore totalement élucidés.

De manière générale, les activités biologiques décrites des glycosides triterpéniques des holothuries sont majoritairement reliées aux propriétés membranolytiques de ces composés. Ils ont la capacité d'augmenter la perméabilité des membranes, d'entraîner des pertes de fonction membranaires, voire induire une rupture de celle-ci. Stonik *et al.* (1999) et Pisllyagin *et al.* (2013) suggèrent que les glycosides triterpéniques attachés aux membranes cellulaires interagissent avec les membranes lipidiques en formant des complexes glycosides-stéroïdes dans les biomembranes, modulant alors la viscosité de la membrane et de ses fonctions associées. De plus, selon la structure de ces composés et la composition de la membrane lipidique, les glycosides triterpéniques ont la capacité de former des canaux ioniques non spécifiques pouvant entraîner une augmentation de la perméabilisation ionique et donc une perte de fonction de la cellule voire sa destruction (Kalinin *et al.*, 2008).

L'activité cytotoxique vis-à-vis de la lignée cellulaire mammalienne Vero retrouvée dans la fraction 5 de l'EMSR est en accord avec les travaux précédents concernant l'activité cytotoxique du Frondoside A. Le mécanisme d'action de cette molécule semble donc être majoritairement relié à son activité membranolytique en interagissant avec la membrane cellulaire en formant des complexes avec les stérols présents.

En conclusion, notre étude a confirmé l'existence et la production de composés toxiques relargués en situation de stress. Ces métabolites secondaires ont montré une forte toxicité sur différents modèles écotoxicologiques chronique et aiguë. L'évaluation de l'EMSR en écotoxicologie chronique sur le modèle *Crassostrea virginica* par l'utilisation de biomarqueurs spécifiques n'a pas montré d'effets réellement significatifs. Le contact de cet extrait à différentes concentrations a entraîné une mortalité importante à la plus forte concentration et une mortalité non négligeable à la concentration directement inférieure. Par conséquent, les mécanismes de défense de l'huître pour faire face à cette agression ne semblent donc pas être reliés aux réactions impliquant la peroxydation lipidique, l'Acétylcholine Estérase, la Glutathion-S-Transférase et la Catalase. Il peut donc être supposé que l'effet de l'EMSR sur ces spécimens est relié à un effet membranolytique des glycosides triterpéniques sur les cellules des organes des bivalves.

Cette hypothèse est corrélée avec la forte toxicité de l'EMSR évaluée sur les espèces *Oncorhynchus mykiss* et *Salvelinus alpinus*. En effet, la concentration létale à 50% de l'EMSR sur *Oncorhynchus mykiss* pendant une exposition chronique de 96h a été évaluée à 1,88 mg/L. Cette toxicité a été confirmée par les observations morphologiques et histologiques réalisées sur *Salvelinus alpinus*. En effet, l'observation *post mortem* après contact avec l'EMSR a mis en évidence des atteintes sévères des branchies des poissons, une nécrose des mésentères ainsi qu'une atteinte hépatique et des inflammations buccales et branchiales. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Nigrelli (1952) et Yamanouchi (1955) sur la présence de substances ichthyotoxiques chez plusieurs espèces d'holothuries.

Le fractionnement bioguidé par couplage analytique nous a conduit à l'identification de plusieurs composés du type glycosides triterpéniques dans cet EMSR et notamment le Frondoside A retrouvée dans la fraction responsable de la cytotoxicité.

CONCLUSION GENERALE
&
PERSPECTIVES

Conclusion générale & perspectives

L'importante biodiversité des invertébrés marins, et plus particulièrement des échinodermes, représente un gisement conséquent pour la découverte de nouvelles substances naturelles bioactives. La transformation de produits marins destinés à la consommation humaine génère d'importantes quantités de rejets qui posent à la fois des problèmes économiques et environnementaux. Il est donc nécessaire de traiter ces rejets de la même manière que les produits car ils recèlent de composés d'intérêt. Notre étude a montré que l'extraction enzymatique de composés bioactifs semble être une approche intéressante pour la production de molécules antiherpétiques issues de coproduits marins. Les hydrolysats protéiques ont été étudiés comme une alternative à la valorisation des coproduits pour faire face à l'importante quantité de déchets générés par les industries de transformation (Harnedy et Fitzgerald, 2013). Ces hydrolysats ont largement contribué à la découverte de nouveaux composés biologiquement actifs : antioxydant, anticancéreux, suppresseur d'appétit, immunostimulant, hypocholestérolémique, hormono-régulateur, antibactérien et antiviral (Dumay, 2006). La spécificité des enzymes utilisées a également été démontrée avec l'obtention de différents niveaux de réponses en terme d'activité mais pas de composition. Le bulbe aquapharyngé issu de l'holothurie *Cucumaria frondosa*, longtemps considéré comme un coproduit sans grande valeur commerciale, représente une partie non négligeable tant au niveau de sa proportion par rapport à l'animal entier mais également pour sa composition biochimique. A notre connaissance, aucune étude n'avait mis en évidence la présence de composés antiherpétiques provenant des coproduits de *C. frondosa*. Les résultats obtenus dans cette étude concernant l'extrait à haut poids moléculaire du bulbe aquapharyngé de *C. frondosa* hydrolysé par la Papaïne représentent donc un réel potentiel de composés anti-VHS-1. La littérature suggère que les lectines pourraient être une explication possible à la nature des composés antiherpétiques à haut poids moléculaires retrouvés dans l'extrait actif. Ces molécules agiraient au niveau de la pénétration virale en se fixant à l'enveloppe du virus. Cet extrait pourrait apporter une importante valeur ajoutée à cette biomasse sous-estimée via une technique respectueuse de l'environnement par l'utilisation d'enzymes à la place de solvants souvent difficiles à éliminer complètement. Ces composés sont actuellement en cours de purification afin de les identifier et de déterminer leurs mécanismes d'action.

L'holothurie *Cucumaria frondosa* retrouvée en Atlantique Nord est une espèce qui a fait l'objet de nombreuses études au niveau de sa biologie, de sa répartition géographique et spatiale, et de sa composition biochimique. Ces travaux ont été réalisés par différents procédés d'extraction et par utilisation des composés extraits sur différents modèles mais rarement d'un point de vue d'écologie chimique, excepté les excellents travaux d'Hamel et Mercier qui ont montré le synchronisme intraspécifique de la gamétogénèse au sein de cette espèce. Les auteurs ont démontré que le mucus était le médiateur de ce phénomène (Hamel et Mercier, 1999).

Plusieurs travaux ont été menés sur d'autres espèces d'holothuries. Elles mettent en évidence l'existence des métabolites secondaires relargués en situation de stress comme moyens de défense. Van Dyck *et al.* (2009, 2010a, 2010b et 2011) et Caulier *et al.* (2011) ont confirmé ces données et démontré la richesse en saponines de ces métabolites secondaires au niveau des tubes de Cuvier et des téguments.

Des spécimens de l'espèce *Cucumaria frondosa* ont donc été placés en situation de stress afin de vérifier cette observation. L'effet des extraits de métabolites secondaires relargués obtenus a ensuite été évalué sur différents modèles écotoxicologiques chronique et aigu afin de simuler en laboratoire le phénomène naturel dans des conditions contrôlées.

L'EMSR a montré une forte toxicité vis-à-vis des 2 espèces de poissons utilisées comme modèle en entraînant des mortalités à de faibles concentrations. L'évaluation en écotoxicologie chronique sur l'espèce *Crassostrea virginica* par le dosage de biomarqueurs spécifiques n'a pas permis de mettre en évidence de différences significatives, excepté une faible inhibition de l'acétylcholine estérase au 14^{ème} jour d'exposition pour la plus faible concentration en extrait. L'absence d'effet des enzymes sélectionnées dans notre étude peut suggérer des mécanismes de défense cellulaire différents. Il serait intéressant d'évaluer cet EMSR par l'utilisation de marqueurs différents (Ratio ADN/ARN, glycoprotéine-P, Superoxyde dismutase) et/ou d'étudier des parties différentes de l'animal (hémolymphe et branchies). Cette absence d'effet peut également signifier une perte de fonctionnalité cellulaire. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait pertinent de réaliser des tests de viabilité cellulaire sur des isolats afin de mettre en évidence la cytotoxicité, et si celle-ci est de type apoptotique ou nécrotique.

Un fractionnement bioguidé utilisant les propriétés cytotoxiques de l'EMSR a été réalisé et a permis d'isoler les composés toxiques au sein d'une fraction. L'analyse par spectrométrie de masse a permis d'identifier plusieurs de ces composés comme glycosides triterpéniques au sein de l'extrait et notamment le Frondoside A dans la fraction toxique.

Les glycosides triterpéniques et plus particulièrement le Frondoside A chez l'espèce *Cucumaria frondosa* ont été associés à de nombreuses activités biologiques, particulièrement par leurs capacités membranolytiques. Ces dernières semblent être les phénomènes les plus probables ayant entraîné une telle toxicité sur les différents modèles évalués dans cette étude. Cette hypothèse est corroborée par le phénomène de nécrose observée sur les branchies des Ombles chevalier exposées à cet EMSR.

En conséquence de quoi, le bilan de ces travaux met en évidence l'intérêt de valoriser les coproduits marins en apportant la possibilité de générer des produits à haute valeur ajoutée d'intérêt en santé humaine en utilisant des procédés d'extraction respectueux de l'environnement. Les résultats de l'évaluation antiherpétique font des fractions bioactives de haut poids moléculaires de bons candidats pour le développement d'agents antiviraux. Ces composés nécessitent cependant d'être plus finement purifiés dans le but d'évaluer leur mécanisme d'action. La technique de SDS-PAGE permettrait également d'estimer plus précisément la taille de ces composés. Il pourrait être envisagé d'évaluer ces extraits sur d'autres modèles viraux.

Selon la littérature, le Frondoside A a démontré des propriétés biologiques intéressantes et notamment des activités anticancéreuses prometteuses. Cependant, la majorité des études extraient ce composé en sacrifiant l'animal afin de réaliser des extractions alcooliques du tégument ou de l'animal entier. Or, nous avons démontré dans notre étude la possibilité de produire ce composé par relargage en situation de stress sans entraîner la mort de l'animal, de plus, nous avons également pu augmenter le rendement d'extraction en optimisant les différents paramètres d'extraction. Il peut donc très bien être imaginé de réaliser une production de ce composé d'un intérêt certain tout en conservant l'animal en vie à des fins de conservation de l'espèce et/ou de transformation alimentaire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

A

Abubakar L., C. Mwangi, J. Uku and S. Ndirangu. "Antimicrobial activity of various extracts of the sea urchin *Tripneustes Gratilla* (Echinoidea)." *African Journal of Pharmacology and Therapeutics* 1, no. 1 (2012): 19-23.

Adeyemi J. A. and L. E. Deaton. "The effect of Cadmium exposure on digestive enzymes in the Eastern oyster *Crassostrea Virginica*." *Journal of Shellfish Research* 31, no. 3 (2012): 631-634.

Al Marzouqi N., R. Iratni, A. Nemmar, K. Arafat, M. A. Al Sultan, J. Yasin, P. Collin, J. Mester, T. E. Adrian and S. Attoub. "Fronodoside A inhibits human breast cancer cell survival, migration, invasion and the growth of breast tumor xenografts." *European Journal of Pharmacology* 668, no. 1-2 (2011): 25-34.

Al Shemaili J., E. Mensah-Brown, K. Parekh, S. A. Thomas, S. Attoub, B. Hellman, F. Nyberg, A. Adem, P. Collin and T. E. Adrian. "Fronodoside A enhances the antiproliferative effects of gemcitabine in pancreatic cancer." *European Journal of Cancer* 50, no. 7 (2014): 1391-1398.

Aminin D. L., I. G. Agafonova, V. I. Kalinin, A. S. Silchenko, S. A. Avilov, V. A. Stonik, P. D. Collin and C. Woodward. "Immunomodulatory properties of Fronodoside A, a major triterpene glycoside from the North Atlantic commercially harvested sea cucumber *Cucumaria Frondosa*." *Journal of Medicinal Food* 11, no. 3 (2008): 443-453.

Aminin D. L., E. L. Chaykina, I. G. Agafonova, S. A. Avilov, V. I. Kalinin and V. A. Stonik. "Antitumor activity of the immunomodulatory lead cumaside." *International Immunopharmacology* 10, no. 6 (2010): 648-654.

- Aminin D. L., C. Koy, P. S. Dmitrenok, B. Muller-Hilke, D. Koczan, B. Arbogast, A. A. Silchenko, V. I. Kalinin, S. A. Avilov, V. A. Stonik, P. D. Collin, H. J. Thiesen, M. L. Deinzer and M. O. Glocker.** "Immunomodulatory effects of holothurian triterpene glycosides on mammalian splenocytes determined by mass spectrometric proteome analysis." *Journal of Proteomics* 72, no. 5 (2009a): 886-906.
- Aminin D. L., A. S. Silchenko, S. A. Avilov, V. G. Stepanov and V. I. Kalinin.** "Cytotoxic action of triterpene glycosides from sea cucumbers from the genus *Cucumaria* on mouse spleen lymphocytes. Inhibition of nonspecific esterase." *Natural Product Communications* 4, no. 6 (2009b): 773-776.
- Aneiros A. and A. Garateix.** "Bioactive peptides from marine sources: pharmacological properties and isolation procedures." *Journal of Chromatography B* 803, no. 1 (2004): 41-53.
- Anguiano G. A., Alejandro Amador, Manuel Moreno-Legorreta, Fabiola Arcos-Ortega and Celia Vazquez-Boucard.** "Effects of exposure to Oxamyl, Carbofuran, Dichlorvos, and Lindane on acetylcholinesterase activity in the gills of the Pacific oyster *Crassostrea Gigas*." *Environmental Toxicology* 25, no. 4 (2010): 327-332.
- Attoub S., K. Arafat, A. Gelaude, M. A. Al Sultan, M. Bracke, P. Collin, T. Takahashi, T. E. Adrian and O. De Wever.** "Frondoside a suppressive effects on lung cancer survival, tumor growth, angiogenesis, invasion, and metastasis." *PLoS ONE* 8, no. 1 (2013): e53087.
- Avilov S. A., O. A. Drozdova, V. I. Kalinin, A. I. Kalinovsky, V. A. Stonik, E. N. Gudimova, R. Riguera and C. Jimenez.** "Frondoside C, a new nonholostane triterpene glycoside from the sea cucumber *Cucumaria Frondosa*: Structure and cytotoxicity of its desulfated derivative." *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie* 76, no. 2 (1998): 137-141.
- Avilov S. A., V. I. Kalinin, O. A. Drozdova, A. I. Kalinovskii, V. A. Stonik and E. N. Gudimova.** "Triterpene glycosides from the holothurian *Cucumaria frondosa*" *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, no. 2 (1993): 260-263.

B

- Bahrami Y., W. Zhang, T. Chataway and C. Franco.** "Structural elucidation of novel saponins in the sea cucumber *Holothuria Lessoni*." *Marine Drugs* 12, no. 8 (2014): 4439-4473.
- Baine M and P.S. Choo.** "Sea cucumber fisheries in Malaysia, towards a conservation strategy." *SPC Beche-de-Mer Information Bulletin* 12, (1999): 6-10.
- Baker A. N., F. W. E. Rowe and H. E. S. Clark.** "A new class of *Echinodermata* from New Zealand." *Nature* 321, no. 6073 (1986): 862-864.
- Bakus G. J.** "Defensive mechanisms and ecology of some tropical holothurians." *Marine Biology* 2, no. 1 (1968): 23-32.
- Banni M., A. Negri, A. Dagnino, J. Jebali, S. Ameer and H. Boussetta.** "Acute Effects of Benzo[a]Pyrene on Digestive gland enzymatic biomarkers and DNA damage on mussel *Mytilus Galloprovincialis*." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, no. 5 (2010): 842-848.
- Batista I.** "Biological activities of fish-protein hydrolysates." In *Marine Proteins and Peptides*, 111-138: John Wiley & Sons, Ltd, 2013.
- Batrakov S. G., E. S. Girshovich and N. S. Drozhzhina.** "Triterpene glycosides with antifungal activity isolated from the sea cucumber *Cucumaria japonica*." *Antibiotiki* 25, no. 6 (1980): 408-11.
- Battison A. L., R. Summerfield and A. Patrzykat.** "Isolation and characterisation of two antimicrobial peptides from haemocytes of the American lobster *Homarus americanus*." *Fish & Shellfish Immunology* 25, no. 1-2 (2008): 181-187.

- Beauregard K., N. Truong, H. Zhang, W. Lin and G. Beck.** "The detection and isolation of a novel antimicrobial peptide from the echinoderm *Cucumaria Frondosa*." In *Phylogenetic Perspectives on the Vertebrate Immune System*, edited by Gregory Beck, Manickam Sugumaran and EdwinL Cooper, 484, 55-62: Springer US, 2001.
- Becker P. T. and P. Flammang.** "Unravelling the sticky threads of sea cucumbers. A comparative study on cuvierian tubule morphology and histochemistry." In *Biological Adhesive Systems*, edited by Janek Byern and Ingo Grunwald, 87-98: Springer Vienna, 2010.
- Béguel J-P.** "Etude de La capacité antioxydante en lien avec la reproduction chez l'huître creuse *Crassostrea Gigas*." Université de Bretagne Occidentale., 2012.
- Beirne L., K Fitzmier and M Miller.** "*Holothuroidea*." *Biological Diversity 2001* (2001).
- Bergé J. P., N. Bourgougnon, S. Alban, F. Pojer, S. Billaudel, J. C. Chermann, J. M. Robert and G. Franz.** "Antiviral and anticoagulant activities of a water-soluble fraction of the marine diatom *Haslea ostrearia*." *Planta Med* 65, no. 07 (1999): 604-609.
- Bergmann W. and R. J. Feeney.** "Contributions to the study of marine products. XXXIII. The Nucleosides of Sponges. I.1." *The Journal of Organic Chemistry* 16, no. 6 (1951): 981-987.
- Bingham B. L. and L. F. Braithwaite.** "Defense adaptations of the dendrochirote holothurian *Psolus chitonoides* Clark." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 98, no. 3 (1986): 311-322.
- Blanchette B., X. Feng and B. Singh.** "Marine Glutathione S-Transferases." *Marine Biotechnology* 9, no. 5 (2007): 513-542.

Bonnard I. and K. L. Rinehart. "Thyonosides A and B, two new saponins isolated from the holothurian *Thyone aurea*." *Tetrahedron* 60, no. 13 (2004): 2987-2992.

Bordbar S., F. Anwar and N. Saari. "High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods-a review." *Marine Drugs* 9, no. 10 (2011): 1761-1805.

Brahim Errahmani M., F. Zouaoui and D. Bendjoudi. "Metabolic effects in the bivalve *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis*: Impact on the environment due to contamination by copper." *Journal of Marine Biology* 2014, (2014): 9.

Bulgakov A. A., E. L. Nazarenko, I. Y. Petrova, M. G. Eliseikina, N. M. Vakhrusheva and V. A. Zubkov. "Isolation and properties of a mannan-binding lectin from the coelomic fluid of the holothurian *Cucumaria japonica*." *Biochemistry (Mosc)* 65, no. 8 (2000): 933-9.

C

Campagna S., J. Lambert and P. Archambault. "Abonbdance et distribution du concombre de mer (*Cucumaria Frondosa*) et prises accidentelles obtenues par dragage entre Matane et Cap-Gaspé (Québec) En 2004." *Rapp. Tech. can. sci. halieut. aquat.* 2620, (2005): 61.

Cartier S., J. Pellerin, M. Fournier, E. Tamigneaux, L. Girault and N. Lemaire. "Use of an index based on the blue mussel (*Mytilus edulis* and *Mytilus trossulus*) digestive gland weight to assess the nutritional quality of mussel farm sites." *Aquaculture* 241, no. 1-4 (2004): 633-654.

Caulier G., Van Dyck S., Gerbaux P., Eeckhaut I. and Flammang P. "Review of saponin diversity in sea cucumbers belonging to the family *Holothuriidae*." *Bêche de mer Information Bulletin* 31, (2011): 48-54.

- Chen J.X.** *Present status and prospects of sea cucumber industry in China*. Vol. 463 FAO Fisheries Technical Paper (FAO). 0429-9345, Edited by Advances in sea cucumber aquaculture and management. Italy, 2004.
- Chludil H. D., C. C. Muniain, A. M. Seldes and M. S. Maier.** "Cytotoxic and antifungal triterpene glycosides from the Patagonian sea cucumber *Hemoiedema Spectabilis*." *Journal of Natural Products* 65, no. 6 (2002): 860-865.
- Chu Fu-Lin E., A. K. Volety, R. C. Hale and Y. Huang.** "Cellular responses and disease expression in oysters (*Crassostrea Virginica*) exposed to suspended field - Contaminated Sediments." *Marine Environmental Research* 53, no. 1 (2002): 17-35.
- Coady L. W.** "Aspects of the reproductive biology of *Cucumaria frondosa* (Gunnerus, 1770) and *Psolus fabricii* (Düben and Koren, 1846) (*Echinodermata: Holothuroidea*) in shallow waters of the Avalon peninsula, Newfoundland." Memorial University of Newfoundland, 1973.
- Collin H., A-L. Meistertzheim, E. David, D. Moraga and I. Boutet.** "Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, Thunberg 1793, to pesticide exposure under experimental conditions." *The Journal of Experimental Biology* 213, no. 23 (2010): 4010-4017.
- Collin P. D.** "Sea cucumber carotenoid lipid fraction products and methods of use." WO99/37314. USA, 2002.
- Constantine Jr G. H., P. Catalfomo and C. Chou.** "Antimicrobial activity of marine invertebrate extracts." *Aquaculture* 5, no. 3 (1975): 299-304.
- Crews P., L. V. Manes and M. Bohler.** "Jasplakinolide, a cyclodepsipeptide from the marine sponge, *Jaspis sp.*" *Tetrahedron Letters* 27, no. 25 (1986): 2797-2800.

D

David V. M. M. and B. A. MacDonald. "Seasonal biochemical composition of tissues from *Cucumaria frondosa* collected in the Bay of Fundy, Canada: Feeding activity and reproduction." *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 82, no. 1 (2002): 141-147.

Davies P. H., J. P. Goettl Jr, J. R. Sinley and N. F. Smith. "Acute and chronic toxicity of lead to Rainbow Trout *Salmo Gairdneri*, in hard and soft water." *Water Research* 10, no. 3 (1976): 199-206.

de Jesus R., M. Filomena, R. M. S. C. de Morais and A. M. M. B. de Morais. "Bioactivity and applications of sulphated polysaccharides from marine microalgae." *Marine Drugs* 11, no. 1 (2013): 233-252.

Donia M. and M. T. Hamann. "Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents." *The Lancet Infectious Diseases* 3, no. 6 (2003): 338-348.

Dubois M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith. "Colorimetric method for determination of sugars and related substances." *Analytical Chemistry* 28, no. 3 (1956): 350-356.

Dumay J. "Extraction de lipides en voie aqueuse par bioréacteur enzymatique combine à l'ultrafiltration : Application à la valorisation de co-produits de poisson (*Sardina pilchardus*)". Université de Nantes, 2006.

Dumay J., M. Allery, C. Donnay-Moreno, G. Barnathan, P. Jaouen, M. E. Carbonneau and J-P. Bergé. "Optimization of hydrolysis of sardine (*Sardina pilchardus*) heads with protamex: Enhancement of lipid and phospholipid extraction." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89, no. 9 (2009): 1599-1606.

E

Elion G. B. "Acyclovir: discovery, mechanism of action, and selectivity." *Journal of Medical Virology* 41, no. S1 (1993): 2-6.

Epifanio C. E. and R. F. Srna. "Toxicity of ammonia, nitrite ion, nitrate ion, and orthophosphate to *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea virginica*." *Marine Biology* 33, no. 3 (1975): 241-246.

F

FAO. The state of world fisheries and aquaculture. In: Department Fisheries and Aquaculture. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2012: 230 p.

Farshadpour F., S. Gharibi, M. Taherzadeh, R. Amirinejad, R. Taherkhani, Habibian A. and Zandi K. "Antiviral activity of *Holothuria sp.* A sea cucumber against Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1)." *Eur Rev Med Pharmacol Sci* Vol. 18 - N. 3, (2014): 333-337.

Ferraro V., I. B. Cruz, R. Ferreira Jorge, F. Xavier Malcata, M. E. Pintado and P. M. L. Castro. "Valorisation of Natural Extracts from Marine Source Focused on Marine by-Products: A Review." *Food Research International* 43, no. 9 (2010): 2221-2233.

Findlay J. A., A. Daljeet, J. Matsoukas and Y. E. Moharir. "Constituents of the sea-cucumber *Cucumaria-frondosa*." *Journal of Natural Products* 47, no. 3 (1984): 560-560.

Findlay J. A., N. Yayli and L. Radics. "Novel sulfated oligosaccharides from the sea-cucumber *Cucumaria-frondosa*." *Journal of Natural Products* 55, no. 1 (1992): 93-101.

Fleury H. J. A., ed. *Virologie Humaine*, Abrégés (Paris. 1971). Paris ; Milan ; Barcelone: Masson, 1993.

Folch J., M. Lees and S. G. Sloane. "A simple method for the isolation and purification of total lipides from Animal." *J Biol Chem.*, 226(1) (1957):497-509.

Francis G., Z. Kerem, H. P. S. Makkar and K. Becker. "The biological action of saponins in animal systems: A review." *British Journal of Nutrition* 88, no. 06 (2002): 587-605.

Francour P. "Predation on holothurians: A literature review." *Invertebrate Biology* 116, no. 1 (1997): 52-60.

Fredalina B. D., B. H. Ridzwan, A. A. Zainal Abidin, M. A. Kaswandi, H. Zaiton, I. Zali, P. Kittakoop and A. M. Mat Jais. "Fatty acid compositions in local sea cucumber." *General Pharmacology: The Vascular System* 33, no. 4 (1999): 337-340.

G

Garcia-Carreón F. L. and M. Angeles Navarrete Del Toro. "Classification of proteases without tears." *Biochemical Education* 25, no. 3 (1997): 161-167.

Géret F., A. Jouan, V. Turpin, M. João Bebianno and R. P. Cosson. "Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalve mollusks: The oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*)." *Aquatic Living Resources* 15, no. 1 (2002): 61-66.

Ghanbari R., A. Ebrahimpour, A. Abdul-Hamid, A. Ismail and N. Saari. "*Actinopyga lecanora* hydrolysates as natural antibacterial agents." *Int J Mol Sci.* 13(12), no. 1422-0067 (Electronic) (2012): 16796-811.

Girard M., J. Belanger, J. W. Apsimon, F. X. Garneau, C. Harvey and J. R. Brisson.

"Frondoside-a - A novel triterpene glycoside from the holothurian *Cucumaria frondosa*." *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie* 68, no. 1 (1990): 11-18.

Gowda N. M., U. Goswami and M. Islam Khan. "Purification and characterization of a T-

antigen specific lectin from the coelomic fluid of a marine invertebrate, sea cucumber (*Holothuria scabra*)." *Fish & Shellfish Immunology* 24, no. 4 (2008): 450-458.

Gray J. S. "Biological and ecological effects of marine pollutants and their detection."

Marine Pollution Bulletin 25, no. 1-4 (1992): 48-50.

Grishin Y. I., E. Morozov and S. A. Avilov. "Preliminary studies of antiviral activities of

triterpene glycosides from holothurians." In *8th conference of young scientist on organic and bioorganic chemistry*, 181. Latvian Academy of Sciences, Institute of Organic Synthesis, Riga, 1991.

Guerard F., M. T. Sumaya-Martinez, D. Laroque, A. Chabeaud and L. Dufossé.

"Optimization of free radical scavenging activity by response surface methodology in the hydrolysis of shrimp processing discards." *Process Biochemistry* 42, no. 11 (2007): 1486-1491.

Gupta K. C. and P. J. Scheuer. "Echinoderm sterols." *Tetrahedron* 24, no. 17 (1968): 5831-

5837.

H

Haefner B. "Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates." *Drug*

Discovery Today 8, no. 12 (2003): 536-544.

- Hamel J. F. and A. Mercier.** "Early development, settlement, growth, and spatial distribution of the sea cucumber *Cucumaria frondosa* (Echinodermata: Holothuroidea)." *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53, no. 2 (1996a): 253-271.
- Hamel J. F. and A. Mercier.** "Evidence of chemical communication during the gametogenesis of holothuroids." *Ecology* 77, no. 5 (1996b): 1600-1616.
- Hamel J. F. and A. Mercier.** "Gonad morphology and gametogenesis of the sea cucumber *Cucumaria frondosa*." *Bêche de mer Information Bulletin* 8, (1996c): 22-33.
- Hamel J. F. and A. Mercier.** "Diet and feeding behaviour of the sea cucumber *Cucumaria frondosa* in the St Lawrence estuary, Eastern Canada." *Canadian Journal of Zoology- Revue Canadienne De Zoologie* 76, no. 6 (1998a): 1194-1198.
- Hamel J. F. and A. Mercier.** "Le langage du silence ou la communication chimique chez les concombres de mer." *Le naturaliste canadien* 122, no. 2 (1998b): 61-64.
- Hamel J. F. and A. Mercier.** "Cuvierian tubules in tropical holothurians: Usefulness and efficiency as a defence mechanism." *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 33, no. 2 (2000): 115-139.
- Hamel J. F. and A. Mercier.** "Population status, fisheries and trade of sea cucumbers in temperate areas of the Northern Hemisphere., Canada in sea cucumbers. A global review of fisheries and trade. FAO." *Fisheries and Aquaculture Technical Paper* 516, no. Rome, FAO (2008a): pp. 257–291.
- Hamel J. F. and A. Mercier.** "Precautionary management of *Cucumaria frondosa* in Newfoundland and Labrador, Canada in sea cucumbers. A global review of fisheries and trade. FAO." *Fisheries and Aquaculture Technical Paper* 516, no. Rome, FAO (2008b): pp. 293–306.
- Hansen C. A. and B. D. Sidell.** *Atlantic hagfish cardiac muscle: Metabolic basis of tolerance to anoxia*. Vol. 244, 1983.

Harding J. M., E. N. Powell, R. Mann and M. J. Southworth. "Variations in Eastern oyster (*Crassostrea Virginica*) sex-ratios from three Virginia estuaries: Protandry, growth and demographics." *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 93, no. Special Issue 02 (2013): 519-531.

Harmenberg J., B. Wahren, V-A. Sundqvist and B. Levén. "Multiplicity dependence and sensitivity of *Herpes Simplex* virus isolates to antiviral compounds." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 15, no. 5 (1985): 567-573.

Hatakeyama T., T. Suenaga, S. Eto, T. Niidome and H. Aoyagi. "Antibacterial activity of peptides derived from the C-Terminal region of a hemolytic lectin, CEL-III, from the marine invertebrate *Cucumaria echinata*." *Journal of Biochemistry* 135, no. 1 (2004): 65-70.

Haug T., A. K. Kjuul, O. B. Styrvold, E. Sandsdalen, O. M. Olsen and K. Stensvag. "Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea)." *Journal of Invertebrate Pathology* 81, no. 2 (2002): 94-102.

Hayes M. "Biological activities of proteins and marine-derived peptides from byproducts and seaweeds." In *Marine Proteins and Peptides*, 139-165: John Wiley & Sons, Ltd, 2013.

Higuchi R., M. Inagaki, K. Togawa, T. Miyamoto and T. Komori. "Constituents of *Holothuroideae*, IV. Isolation and structure of three new cerebrosides, CE-2b, CE-2c and CE-2d, from the sea cucumber *Cucumaria echinata*." *Liebigs Annalen der Chemie* 1994, no. 1 (1994a): 79-81.

Higuchi R., M. Inagaki, K. Togawa, T. Miyamoto and T. Komori. "Constituents of *Holothuroideae*, V. Isolation and structure of cerebrosides from the sea cucumber *Pentacta australis*." *Liebigs Annalen der Chemie* 1994, no. 7 (1994b): 653-658.

Hing HL, K Md. Ambia, R Azraul-Mumtazah, SA Hamidah, AZ Sahalan, N Shamsudin, MW Shamsudin and R Hashim. "Effect of methanol extracts from sea cucumbers *Holothuria edulis* and *Stichopus chloronotus* on *Candida albicans*." *Microscopy and Microanalysis* 13, no. SupplementS02 (2007): 270-271.

Hossaert-McKey M. (dir.), Bagnères-Urbany A.G. (dir.), Baldy V., Banaigs B., Baudino S., Bertrand C., Caissard J.C., Charpentier M., Cortesero A.M., Fernandez C., Ganen G., Giron D., Grison C., Grosjean Y., La Barre S., Leblanc C., Lucas C., Nagnan-Le Meillour P., Nay B., Pérez T., Poupon E., Rebuffat S., Thomas O., Schatz B., Viard F., Bourdy Genevière (collab.), Payri Claude (collab.), Petek Sylvain (collab.). *Ecologie chimique: le langage de la nature.* Paris (FRA) ; Paris : Cherche Midi ; CNRS, 2012, 191 p.

Huang N., M-Y. Wu, C-B. Zheng, L. Z., J-H. Zhao and Y-T. Zheng. "The depolymerized fucosylated chondroitin sulfate from sea cucumber potently inhibits HIV replication via interfering with virus entry." *Carbohydrate Research* 380, no. 0 (2013): 64-69.

I

Ismail H., S. Lemriss, Z. Ben Aoun, L. Mhadhebi, A. Dellai, Y. Kacem, P. Boiron and A. Bouraoui. "Antifungal activity of aqueous and methanolic extracts from the Mediterranean sea cucumber, *Holothuria polii*." *Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology* 18, no. 1 (2008): 23-26.

J

Janakiram N. B., A. Mohammed, Y. T. Zhang, C. I. Choi, C. Woodward, P. Collin, V. E. Steele and C. V. Rao. "Chemopreventive effects of Frondanol A5, a *Cucumaria frondosa* extract, against rat colon carcinogenesis and inhibition of human colon cancer cell growth." *Cancer Prevention Research* 3, no. 1 (2010): 82-91.

Jawahar A.T, J Nagarajan and S.A. Shanmugam. "Antimicrobial substances of potential biomedical importance from holothurian species." *Indian J. Mar. Sci.* 31, (2002): 161–164.

Jin J. O., V. V. Shastina, S. W. Shin, Q. Xu, J. I. Park, V. A. Rasskazov, S. A. Avilov, S. N. Fedorov, V. A. Stonik and J. Y. Kwak. "Differential effects of triterpene glycosides, Frondoside A and Cucumarioside A(2)-2 isolated from sea cucumbers on caspase activation and apoptosis of human leukemia cells." *Febs Letters* 583, no. 4 (2009): 697-702.

Jing G., Y. Li, L. Xie and R. Zhang. "Metal accumulation and enzyme activities in gills and digestive gland of pearl oyster (*Pinctada fucata*) exposed to copper." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 144, no. 2 (2006): 184-190.

K

Kale V., J. Freysdottir, B. S. Paulsen, Ó. H. Friðjónsson, G. Ó. Hreggviðsson and S. Omarsdottir. "Sulphated polysaccharide from the sea cucumber *Cucumaria frondosa* affect maturation of human dendritic cells and their activation of allogeneic CD4(+) T cells *in vitro*." *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 2, no. 2 (2013): 108-117.

Kalinin V. I., D. L. Aminin, S. A. Avilov, A. S. Silchenko and V. A. Stonik. "Triterpene glycosides from sea cucumbers (*Holothurioidea, Echinodermata*). Biological activities and functions." In *Studies in Natural Products Chemistry*, edited by Rahman Atta ur, Volume 35, 135-196: Elsevier, 2008.

Kalinin V. I., N. G. Prokofieva, G. N. Likhatskaya, E. B. Schentsova, I. G. Agafonova, S. A. Avilov and O. A. Drozdova. "Hemolytic activities of triterpene glycosides from the holothurian Order *Dendrochirotida*: Some trends in the evolution of this group of toxins." *Toxicon* 34, no. 4 (1996): 475-483.

- Kerr A. M. and J. Kim.** "Phylogeny of *Holothuroidea* (Echinodermata) inferred from morphology." *Zoological Journal of the Linnean Society* 133, no. 1 (2001): 63-81.
- Kerr R. G. and Z. Chen.** "In vivo and in vitro biosynthesis of saponins in sea cucumbers." *Journal of Natural Products* 58, no. 2 (1995): 172-176.
- Kikuchi A., M. Nieda, C. Schmidt, Y. Koezuka, S. Ishihara, Y. Ishikawa, K. Tadokoro, S. Durrant, A. Boyd, T. Juji and A. Nicol.** "In vitro anti-tumour activity of [Agr]-galactosylceramide-stimulated human invariant V[Agr]²⁴+Nkt cells against melanoma." *Br J Cancer* 85, no. 5 (2001): 741-746.
- Kornprobst J. M.** *Substances naturelles d'origine marine: Chimiodiversité, Pharmacodiversité, Biotechnologies*: Éditions Tec & Doc, 2005.
- Kornprobst J. M.** *Encyclopedia of marine natural products*, 3 Volume Set: Wiley-Blackwell; (2010). 1680 p.
- Kristinsson H. G. and B. A. Rasco.** "Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40, no. 1 (2000): 43-81.
- Kuznetsova T. A., M. M. Anisimov, A. M. Popov, S. I. Baranova, S. S. Afiyatullo, I. I. Kapustina, A. S. Antonov and G. B. Elyakov.** "A comparative study *in vitro* of physiological activity of triterpene glycosides of marine invertebrates of echinoderm type." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 73, no. 1 (1982): 41-43.

L

La M-P., J-J. Shao, J. Jiao and Y-H. Yi. "Three cerebrosides from the sea cucumber *Cucumaria frondosa*." *Chinese Journal of Natural Medicines* 10, no. 2 (2012): 105-109.

Lambert P., ed. *Sea cucumbers of British Columbia, Southeast Alaska and Puget Sound*, Royal British Columbia Museum Handbook: UBC Press, 1997.

Langlois M., J.P. Allard, F. Nugier and M. Aymard. "A rapid and automated colorimetric assay for evaluating the sensitivity of *Herpes*." *J Biol Stand.* 14, (1986): 201-211.

Lawrence J. M. *A functional biology of echinoderms*. London; Sydney: Croom Helm, 1987.

Lee T-G. and S. Maruyama. "Isolation of HIV-1 protease-inhibiting peptides from thermolysin hydrolysate of oyster proteins." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 253, no. 3 (1998): 604-608.

Li X., A. B. Roginsky, X. Z. Ding, C. Woodward, P. Collin, R. A. Newman, R. H. Bell and T. E. Adrian. "Review of the apoptosis pathways in pancreatic cancer and the anti-apoptotic effects of the novel sea cucumber compound, Frondoside A." *Recent Advances in Clinical Oncology* 1138, (2008): 181-198.

Lian W., M. Wu, N. Huang, N. Gao, C. Xiao, Z. Li, Z. Zhang, Y. Zheng, W. Peng and J. Zhao. "Anti-HIV-1 activity and structure–activity-relationship study of a fucosylated glycosaminoglycan from an echinoderm by targeting the conserved CD4 induced epitope." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1830, no. 10 (2013): 4681-4691.

Lu Y., Sun C and Pan Y. "A comparative study of upright counter-current chromatography and high-performance liquid chromatography for preparative isolation and purification of phenolic compounds from *Magnoliae officinalis*." *Journal of separation science*. no. 29 (2006):351-357.

Lüchmann K. H., J. J. Mattos, M. N. Siebert, N. Granucci, T. S. Dorrington, M. C. Bicego, S. Taniguchi, S. T. Sasaki, F. G. Daura-Jorge and A. C. D. Bainy. "Biochemical biomarkers and hydrocarbons concentrations in the Mangrove oyster *Crassostrea brasiliiana* following exposure to diesel fuel water-accommodated fraction." *Aquatic Toxicology* 105, no. 3–4 (2011): 652-660.

Luna LG. *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology* McGraw-Hill. Luna LG, editor. New York (1968).

M

Ma X., N. Kundu, P. D. Collin, O. Goloubeva and A. M. Fulton. "Frondoside A inhibits breast cancer metastasis and antagonizes prostaglandin E receptors EP4 and EP2." *Breast Cancer Research and Treatment* 132, no. 3 (2012): 1001-1008.

Maier M. S. "Biological activities of sulfated glycosides from echinoderms." In *Studies in Natural Products Chemistry*, edited by Rahman Atta ur, Volume 35, 311-354: Elsevier, 2008.

Mal'tsev I. I., S. I. Stekhova, E. B. Shentsova, M. M. Anisimov and V. A. Stonik. "Antimicrobial activity of glycosides from holothurians of the family *Stichopodidae*." *Khim. Pharm.Zhurn.* 19, (1985): 54–56.

Mamelona J., E. Pelletier, K. Girard-Lalancette, J. Legault, S. Karboune and S. Kermasha. "Quantification of phenolic contents and antioxidant capacity of Atlantic sea cucumber, *Cucumaria frondosa*." *Food Chemistry* 104, no. 3 (2007): 1040-1047.

Mamelona J., R. Saint-Louis and E. Pelletier. "Nutritional composition and antioxidant properties of protein hydrolysates prepared from echinoderm byproducts." *International Journal of Food Science and Technology* 45, no. 1 (2010): 147-154.

- Martin J.** *Les invertébrés marins du golfe de Gascogne à la Manche Orientale*: Editions Quae, 2011.
- Mat R. Z., E. Lahaye, D. Defer, P. Douzenel, P. Perrin, N. Bourgougnon, O. Sire and G. Olivier.** "Isolation of a sulphated polysaccharide from a recently discovered sponge species (*Celtodoryx girardae*) and determination of its anti-herpetic activity." 44, 8. Kidlington, U.K.: Elsevier, 2009.
- Matozzo V., A. Tomei and M. Gabriella Marin.** "Acetylcholinesterase as a biomarker of exposure to neurotoxic compounds in the clam *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice." *Marine Pollution Bulletin* 50, no. 12 (2005): 1686-1693.
- Matsui T., Y. Ozeki, M. Suzuki, A. Hino and K. Titani.** "Purification and characterization of two Ca²⁺-dependent lectins from coelomic plasma of sea cucumber, *Stichopus japonicus*." *Journal of Biochemistry* 116, no. 5 (1994): 1127-1133.
- Matsuno T. and M. Tsushima.** "Comparative biochemical studies of carotenoids in sea cucumbers." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 111, no. 4 (1995): 597-605.
- Mayer A. M. S., A. D. Rodriguez, R. G. S. Berlinck and M. T. Hamann.** "Marine pharmacology in 2005-6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action." *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1790, no. 5 (2009): 283-308.
- McCarthy M. P., D. L. Carroll and A. H. Ringwood.** "Tissue specific responses of oysters, *Crassostrea virginica*, to silver nanoparticles." *Aquatic Toxicology* 138-139, no. 0 (2013): 123-128.

- McLaren C., M.N. Ellis and Hunter G.A.** "A colorimetric assay for the measurement of the sensitivity of *Herpes simplex* viruses to antiviral agents." *Antiviral Research* 3, (1983): 223-234.
- Melzig M. F., G. Bader and R. Loose.** "Investigations of the mechanism of membrane activity of selected triterpenoid saponins." *Planta Med* 67, no. 01 (2001): 43-48.
- Miyamoto T., K. Togawa, R. Higuchi, T. Komori and T. Sasaki.** "Constituents of *Holothuroidea*, II. Six newly identified biologically active triterpenoid glycoside sulfates from the sea cucumber *Cucumaria echinata*." *Liebigs Annalen der Chemie* 1990, no. 5 (1990): 453-460.
- Mokhlesi A., S. Saeidnia, A. Reza Gohari, A. Reza Shahverdi, A. Nasrolahi, F. Farahani, R. Khoshnood and N. Es'haghi.** "Biological activities of the sea cucumber *Holothuria leucospilota*." *Asian Journal of Animal & Veterinary Advances* 7, no. 3 (2012): 243.
- Mourão P. A. S. and M. S. Pereira.** "Searching for alternatives to heparin: sulfated fucans from marine invertebrates." *Trends in Cardiovascular Medicine* 9, no. 8 (1999): 225-232.
- Muniain C., R. Centurión, V.P. Careaga and M.S. Maier.** "Chemical ecology and bioactivity of triterpene glycosides from the sea cucumber *Psolus patagonicus* (*Dendrochirotida: Psolidae*)." *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 88, no. 04 (2008): 817-823.
- Muralidhar P., P. Radhika, N. Krishna, D. Venkata Rao and C. Bheemasankara Rao.** "Sphingolipids from marine organisms: A review." *Natural Product Science* 9, no. 3 (2003): 117-142.
- Murray A. P., C. Muniain, A. M. Seldes and M. S. Maier.** "Patagonicoside A: A novel antifungal disulfated triterpene glycoside from the sea cucumber *Psolus patagonicus*." *Tetrahedron* 57, no. 47 (2001): 9563-9568.

N

Nigrelli R. F. "The effects of holothurin on fish, and mice with sarcoma 180." *Zoologica* 37, (1952): 89-90.

O

Oldham M. J., H. C. Krivan and R. C. Potter. "Method of using lectins for prevention and treatment of skin diseases and disorders." Google Patents, 2002.

Olicard C., T. Renault, C. Torhy, A. Benmansour and N. Bourgougnon. "Putative antiviral activity in hemolymph from adult Pacific oysters, *Crassostrea Gigas*." *Antiviral Research* 66, no. 2–3 (2005): 147-152.

Otero-González A. J., B. S. Magalhães, M. Garcia-Villarino, C. López-Abarrategui, D. Amaro Sousa, S. Campos Dias and O. Luiz Franco. "Antimicrobial peptides from marine invertebrates as a new frontier for microbial infection control." *The FASEB Journal* 24, no. 5 (2010): 1320-1334.

P

Park J-I., H-R. Bae, C. Gun Kim, V. A. Stonik and J-Y. Kwak. "Relationships between chemical structures and functions of triterpene glycosides isolated from sea cucumbers." *Frontiers in Chemistry* 2, (2014).

Pettit G. R., J. C. Knight, J. C. Collins, D. L. Herald, R. K. Pettit, M. R. Boyd and V. G. Young. "Antineoplastic agents 430. Isolation and structure of Cribrostatins 3, 4, and 5 from the Republic of Maldives *Cribrachalina* species1." *Journal of Natural Products* 63, no. 6 (2000): 793-798.

Pislyagin E. A., P. S. Dmitrenok, T. Y. Gorpenchenko, S. A. Avilov, A. S. Silchenko and D. L. Aminin. "Determination of Cucumarioside A2-2 in mouse spleen by radiospectroscopy, Maldi-MS and Maldi-IMS." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 49, no. 4 (2013): 461-467.

Podolak I., A. Galanty and D. Sobolewska. "Saponins as cytotoxic agents: A review." *Phytochemistry Reviews* 9, no. 3 (2010): 425-474.

Pomin V. "Holothurian fucosylated chondroitin sulfate." *Marine Drugs* 12, no. 1 (2014): 232-254.

Ponomarenko L. P., A. I. Kalinovsky, O. P. Moiseenko and V. A. Stonik. "Free sterols from the holothurians *Synapta maculata*, *Cladolabes bifurcatus* and *Cucumaria sp.*" *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 128, no. 1 (2001): 53-62.

Purcell S. W., Y. Samyn and C. Conand. *Commercially important sea cucumbers of the world*, 2012. Vol. 6.

R

Ravallec-Plé R., C. Charlot, C. Pires, V. Braga, I. Batista, A. Van Wormhoudt, Y. Le Gal and M. Fouchereau-Péron. "The presence of bioactive peptides in hydrolysates prepared from processing waste of sardine (*Sardina pilchardus*)." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81, no. 11 (2001): 1120-1125.

Rawls W. "Herpes Simplex Viruses: Types 1 and 2." In *Laboratory Diagnosis of Viral Infections*, edited by E. H. Lennette (ed.), 443-461. New York: Marcel Dekker, 1992.

Reed L. J. and H. Muench. "A simple method of estimating fifty percent endpoints." *American Journal of Epidemiology* 27, no. 3 (1938): 493-497.

Ridzwan B. H., M. A. Kaswandi, Y. Azman and M. Fuad. "Screening for antibacterial agents in three species of sea cucumbers from coastal areas of Sabah." *General Pharmacology: The Vascular System* 26, no. 7 (1995): 1539-1543.

Ringwood A. H., D. E. Connors and C. J. Keppler. "Cellular responses of oysters, *Crassostrea virginica*, to metal-contaminated sediments." *Marine Environmental Research* 48, no. 4-5 (1999): 427-437.

Rodriguez J., R. Castro and R. Riguera. "Holothurinosides: New antitumour non sulphated triterpenoid glycosides from the sea cucumber *Holothuria forskalii*." *Tetrahedron* 47, no. 26 (1991): 4753-4762.

Roginsky A. B., X. Z. Ding, C. Woodward, M. B. Ujiki, B. Singh, R. H. Bell, Jr., P. Collin and T. E. Adrian. "Anti-pancreatic cancer effects of a polar extract from the edible sea cucumber, *Cucumaria frondosa*." *Pancreas* (2010).

Rowe S, P Comeau, R Singh, S Coffen-Smout, M Lundy, G Young, J Simon and H Vandermeulen. *Assessment of the exploratory fishery for sea cucumber (Cucumaria frondosa) in Southwest New Brunswick*, 2009. Vol. 05.

S

Salinas A. E. and M. G. Wong. "Glutathione S-transferases- A review." *Curr Med Chem* 6, no. 4 (1999): 279-309.

Schillaci D., M. G. Cusimano, V. Cunsolo, R. Saletti, D. Russo, M. Vazzana, M. Vitale and V. Arizza. "Immune mediators of sea-cucumber *Holothuria tubulosa* (Echinodermata) as source of novel antimicrobial and anti-staphylococcal biofilm agents." *AMB Express* 3(1), no. - 2191-0855 (Electronic) (2013): 35.

- Sergerie Y. and G. Boivin.** "Thymidine kinase mutations conferring acyclovir resistance in *Herpes Simplex* Type 1 recombinant viruses." 50, 4. Washington, DC, USA: American Society for Microbiology, 2006.
- Silchenko A. S., S. A. Avilov, A. S. Antonov, A. I. Kalinovsky, P. S. Dmitrenok, V. I. Kalinin, V. A. Stonik, C. Woodward and P. D. Collin.** "Glycosides from the sea cucumber *Cucumaria frondosa*. III. Structure of Frondosides A(2)-1, A(2)-2, A(2)-3, and A(2)-6, Four new minor monosulfated triterpene glycosides." *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie* 83, no. 1 (2005a): 21-27.
- Silchenko A. S., S. A. Avilov, A. S. Antonov, A. I. Kalinovsky, P. S. Dmitrenok, V. I. Kalinin, C. Woodward and P. D. Collin.** "Glycosides from the sea cucumber *Cucumaria frondosa*. IV. Structure of Frondosides A(2)-4, A(2)-7, and A(2)-8, Three new minor monosulfated triterpene glycosides." *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie* 83, no. 12 (2005b): 2120-2126.
- Silchenko A. S., S. A. Avilov, V. I. Kalinin, A. I. Kalinovsky, P. S. Dmitrenok, S. N. Fedorov, V. G. Stepanov, Z. Dong and V. A. Stonik.** "Constituents of the sea cucumber *Cucumaria okhotensis*. Structures of Okhotosides B-1-B-3 and cytotoxic activities of some glycosides from this species." *Journal of Natural Products* 71, no. 3 (2008): 351-356.
- Silchenko A. S., S. A. Avilov, V. I. Kalinin, V. A. Stonik, A. I. Kalinovsky, P. S. Dmitrenok and V. G. Stepanov.** "Monosulfated triterpene glycosides from *Cucumaria okhotensis* Levin Et Stepanov, a new species of sea cucumbers from sea of Okhotsk." *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 33, no. 1 (2007): 73-82.
- Singh R., B. A. MacDonald, M. L. H. Thomas and P. Lawton.** "Patterns of seasonal and tidal feeding activity in the dendrochirote sea cucumber *Cucumaria frondosa* (Echinodermata : Holothuroidea) in the Bay of Fundy, Canada." *Marine Ecology-Progress Series* 187, (1999): 133-145.

- Smith K. O.** "Relationship between the envelope and the infectivity of *Herpes Simplex* Virus." *Proc Soc Exp Biol Med* 115, (1964): 814-6.
- So J. J., J. F. Hamel and A. Mercier.** "Habitat utilisation, growth and predation of *Cucumaria frondosa*: Implications for an emerging sea cucumber fishery." *Fisheries Management and Ecology* 17, no. 6 (2010): 473-484.
- Sokolova I. M., A. H. Ringwood and C. Johnson.** "Tissue-specific accumulation of cadmium in subcellular compartments of Eastern oysters *Crassostrea virginica* Gmelin (*Bivalvia: Ostreidae*)." *Aquatic Toxicology* 74, no. 3 (2005): 218-228.
- Solé M., A. Buet, L. Ortiz, F. Maynou, J. M. Bayona and J. Albaigés.** Bioaccumulation and biochemical responses in mussels exposed to the water-accommodated fraction of the prestige fuel oil. *Scientia Marina* 7, no. 2 (2007): 373-82.
- Soufi-Kechaou E., P. Jaouen, R. Ben Amar and J-P. Berge.** "Influence of hydrolysis time on protein recovery and amino acid composition of hydrolysates from *Sepia officinalis* viscera." *Science Research Reporter* 2, no. 2 (2012): 115-129.
- Srain B. and R. Anny.** "Acetylcholinesterase activity, antioxidant defenses, and lipid peroxidation in the clam *Semele solida*: Can this species be used as a bioindicator?" *Revista de biologia marina y oceanografia*, (2010).
- Stonik V. A., V. I. Kalinin and S. A. Avilov.** "Toxins from sea cucumbers (Holothuroids): chemical structures, properties, taxonomic distribution, biosynthesis and evolution." *Journal of Natural Toxins* 8, no. 2 (1999): 235-248.
- Sylla K. S. B., B Musabyemariya, J-P. Berge and Mg Seydi.** "Water ratio effect on the proteins hydrolysis tongue sole by-products (*Cynoglossus Senegalensis*)." *Revue Africaine de Santé et de Productions Animales (RASPA)* 6, no. 3-4 (2008): 189-194.

T

Teng D., Y. Fang, X. Song and Y. Gao. "Optimization of enzymatic hydrolysis parameters for antioxidant capacity of peptide from goat placenta." *Food and Bioprocess Processing* 89, no. 3 (2011): 202-208.

Thorkelsson G, S Sigurgisladottir, M Geirsdottir, R Jóhannsson, F. Guerard, A. Chabeaud, P. Bourseau, L. Vandanjon, P. Jaouen, M Chaplain-Derouiniot, M. Fouchereau-Peron, O. Martinez Alvarez, Y. Le Gal, R. Ravallec-Ple, L. Picot, J-P. Berge, C. Delannoy, G. Jakobsen, I. Johansson and I. Batista. "Mild processing techniques and development of functional marine protein and peptide ingredients." In *improving seafood products for the consumer*, edited by Borresen T., 2008.

Toral-Granda V., A. Lovatelli and M. Vasconcellos. *Sea cucumbers. A global review of fisheries and trade*, 2008. Vol. 516.

Trotter J. A., J. P. Salgado and T. J. Koob. "Mineral content and salt-dependent viscosity in the dermis of the sea cucumber *Cucumaria frondosa*." *Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology* 116, no. 4 (1997): 329-335.

Tsushima M., Y. Fujiwara and T. Matsuno. "Novel marine di-Z-carotenoids: Cucumariaxanthins A, B, and C from the sea cucumber *Cucumaria japonica*." *Journal of Natural Products* 59, no. 1 (1996): 30-34.

V

Van Dyck S., G. Caulier, M. Todesco, P. Gerbaux, I. Fournier, M. Wisztorski and P. Flammang. "The triterpene glycosides of *Holothuria forskali*: Usefulness and efficiency as a chemical defense mechanism against predatory fish." *Journal of Experimental Biology* 214, no. 8 (2011): 1347-1356.

Van Dyck S., P. Flammang, C. Meriaux, D. Bonnel, M. Salzet, I. Fournier and M. Wisztorski. "Localization of secondary metabolites in marine invertebrates: contribution of Maldi MSI for the study of saponins in cuvierian tubules of *H. forskali*." *PLoS ONE* 5, no. 11 (2010a): e13923.

Van Dyck S., P. Gerbaux and P. Flammang. "Elucidation of molecular diversity and body distribution of saponins in the sea cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata) by Mass Spectrometry." *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 152, no. 2 (2009): 124-134.

Van Dyck S., P. Gerbaux and P. Flammang. "Qualitative and quantitative saponin contents in five sea cucumbers from the Indian Ocean." *Marine Drugs* 8, no. 1 (2010b): 173-189.

Vieira R P, B Mulloy and P A Mourão. "Structure of a fucose-branched chondroitin sulfate from sea cucumber. Evidence for the presence of 3-O-sulfo-beta-D-glucuronosyl residues." *Journal of Biological Chemistry* 266, no. 21 (1991): 13530-6.

Villasin J. and C. M. Pomory. "Antibacterial activity of extracts from the body wall of *Parastichopus parvimensis* (Echinodermata: Holothuroidea)." *Fish & Shellfish Immunology* 10, no. 5 (2000): 465-467.

W

Wang J., H. Han, X. Chen, Y. Yi and H. Sun. "Cytotoxic and apoptosis-inducing activity of triterpene glycosides from *Holothuria scabra* and *Cucumaria frondosa* against HepG2 cells." *Marine Drugs* 12, no. 8 (2014): 4274-4290.

Wang W., S-X. Wang and H-S. Guan. "The antiviral activities and mechanisms of marine polysaccharides: An overview." *Marine Drugs* 10, no. 12 (2012): 2795-2816.

Wang Z., H. Zhang, W. Yuan, W. Gong, H. Tang, B. Liu, K. Krohn, L. Li, Y. Yi and W. Zhang. "Antifungal orriterpene and triterpene glycosides from the sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka." *Food Chemistry* 132, no. 1 (2012): 295-300.

Whitacre D. *Reviews of environmental contamination and toxicology 204*: Springer, 2009.

Whitley R. J. and B. Roizman. "Herpes Simplex Virus infections." *The Lancet* 357, no. 9267 (2001): 1513-1518.

X

Xu J., S. Guo, L. Du, Y-M. Wang, T. Sugawara, T. Hirata and C-H Xue. "Isolation of cytotoxic glucoerebrosides and long-chain bases from sea cucumber *Cucumaria frondosa* using high speed counter-current chromatography." *Journal of Oleo Science* 62, no. 3 (2013): 133-142.

Y

Yamanouchi T. "On the poisonous substance contained in holothurians." *Publications of Publications of the Seto Marine Biological Laboratory* 4, no. 2-3 (1955): 183-203.

Yasuhara-Bell J and Y. Lu. "Marine compounds and their antiviral activities." *Antiviral Research* 86, no. 3 (2010): 231-240.

Yasumara Y and M Kawakita. "The research for the SV40 by means of tissue culture technique." *Nippon Rinsho* 21, (1963): 1201-1219.

Yayli N. "Minor saponins from the sea cucumber *Cucumaria frondosa*." *Indian Journal of Chemistry Section B-Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry* 40, no. 5 (2001): 399-404.

Yayli N. and J. A. Findlay. "Polar metabolites from the sea-cucumber *Cucumaria-frondosa*." *Journal of Natural Products* 57, no. 1 (1994): 84-89.

Yayli N. and J. A. Findlay. "A triterpenoid saponin from *Cucumaria frondosa*." *Phytochemistry* 50, no. 1 (1999): 135-138.

Yuan W-H., Y. Yi, H-F. Tang, B-S. Liu, Z-L. Wang, G-Q. Sun, W Zhang, L. Li and P. Sun. "Antifungal triterpene glycosides from the sea cucumber *Bohadschia marmorata*." *Planta Med* 75, no. 02 (2009): 168-173.

Z

Zanette J., E. Alves de Almeida, A. Zaccaron da Silva, J. Guzenski, J. Fernando Ferreira, P. Di Mascio, M. Risoleta F. Marques and A. C. Dias Bainy. "Salinity Influences Glutathione S-Transferase Activity and Lipid Peroxidation Responses in the *Crassostrea Gigas* Oyster Exposed to Diesel Oil." *Science of The Total Environment* 409, no. 10 (2011): 1976-1983.

Zanette J., J. M. Monserrat and A. Bianchini. "Biochemical Biomarkers in Gills of Mangrove Oyster *Crassostrea Rhizophorae* from Three Brazilian Estuaries." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 143, no. 2 (2006): 187-195.

Zeng Mi., W. Cui, Y. Zhao, Z. Liu, S. Dong and Y. Guo. "Antiviral Active Peptide from Oyster." *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 26, no. 3 (2008): 307-312.

Zhang Y., Di. Fu, F. Yu, Q. Liu and Z. Yu. "Two Catalase Homologs Are Involved in Host Protection against Bacterial Infection and Oxidative Stress in *Crassostrea Hongkongensis*." *Fish & Shellfish Immunology* 31, no. 6 (2011): 894-903.

Zhong M-G., Y-F. Xiang, X-X. Qiu, Z. Liu, K Kitazato and Y-F. Wang. "Natural Products as a Source of Anti-*Herpes Simplex* Virus Agents." *RSC Advances* 3, no. 2 (2013): 313-328.

Zhong Y., M. A. Khan and F. Shahidi. "Compositional Characteristics and Antioxidant Properties of Fresh and Processed Sea Cucumber (*Cucumaria Frondosa*)." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, no. 4 (2007): 1188-1192.

Sites internet

ExPASy – Enzyme : <http://enzyme.expasy.org>

PSI Nature, Structural Biology Knowledgebase: <http://sbkb.org/>

TOXNET Database : <http://toxnet.nlm.nih.gov>

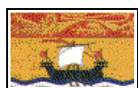
ANNEXES

Annexe 1 : Licence pour le transfert de poissons vivants dans des installations d'élevage



**DEMANDE DE LICENCE D'IMPLANTATION OU DE TRANSFERT
DE LA RÉGION NOUVEAU-BRUNSWICK
MARCHE À SUIVRE POUR PRÉSENTER UNE DEMANDE**

Toute personne qui souhaite transférer des espèces de poissons, de poissons marins, de mollusques, de crustacés ou de plantes aquatiques dans une pisciculture ou pour relâcher dans des habitats de poisson doit avoir une licence et peuvent soumettre une demande par écrit à:



C/o Gerald (Jeff) Cline, Area Chief

Fisheries and Aquaculture Management of N.-B.

Fisheries and Oceans Canada

99 Mount Pleasant Road, P.O. Box 1009

St George, New Brunswick

E5C 3S9

No. Téléphone: (506) 755-5033

No. Télécopieur: (506) 755-5061

Courier-el: ClineG@mar.dfo-mpo.gc.ca

La demande écrite doit être soumise sur le formulaire ci-joint et doit inclure une carte démontrant la destination du site aquicole, Pisciculture ou autre corps d'eau dans la province réceptrice. Les dates d'échéances pour le dépôt des demandes sont la mi-février, la mi-avril, la mi-juin et la mi-octobre.



IMPLANTATION ET DE TRANSFERT

MINISTÈRE DES PÊCHES ET OCÉANS (MPO)

1. INFORMATION SUR LE REQUÉRANT

Nom du requérant:	Nom: Claude Pelletier, biologiste et Chargé de projet Institut de recherche sur les zones côtières/ Situé à l' Aquarium et Centre Marin/
Adresse (adresse postale et adresse rurale au complet):	Pavillon Aquacole de l'IRZC 100 rue de l' Aquarium Shippagan, N.-B. E8S 1H9
Numéro de téléphone:	506-336-3124
Numéro de télécopieur:	506-336-3057
Courrier électronique:	Claudep@umcs.ca
S'il s'agit d'une entreprise, nom d'une personne ressource (indiquer son poste):	Centre de recherche en aquaculture
S'il s'agit d'un aquiculteur, numéro du permis d'aquiculture:	



2. NATURE DE LA DEMANDE

Préciser la nature de cette demande. Décrire la méthode d'élevage employée. Si la demande vise une installation d'élevage, inclure un plan de l'installation existante ou proposée. Joindre un appendice, si nécessaire.

(Utilisez des feuilles séparées si nécessaire)

Cette demande comprend un transfert de 300 alevins de truite arc-en-ciel tout femelle de la pisciculture Boréal Aquaculture Inc. de bas Caraquet vers le Pavillon aquacole de l'Institut de recherche sur les zones côtières Inc (IRZC) de Shippagan situé à l' Aquarium et Centre marin du Nouveau Brunswick. Ce transfert est prévu dans le cadre d'un projet de recherche à l'IRZC.

Boréal Aquaculture Inc. opère depuis 2011 une installation piscicole pour l'élevage de la truite arc-en-ciel, la truite mouchetée et l'omble chevalier à Morais près de Bas-Caraquet. L'entreprise se concentre actuellement sur l'élevage de la truite arc-en-ciel et envisage une production annuelle de 75-85 tonnes pour une biomasse maximale, dans les infrastructures, de l'ordre de 25 tonnes; celles-ci répondant aux normes énoncées dans la Politique sur l'élevage de la truite arc-en-ciel au Nouveau-Brunswick. L'élevage est conduit à l'intérieur d'un bâtiment comprenant une superficie d'élevage d'environ 11 000 pieds carrés dans lequel on retrouve plusieurs bassins opérant en circuit fermé. Les installations sont alimentées par des puits d'eau douce situés sur la propriété.

Les truites seront transférées dans un secteur qui est situé à l'IRZC à l'écart des projets de recherche sur l'omble chevalier. Ces poissons seront maintenus pour des fins d'étude dans le cadre d'un projet sur la caractérisation d'extrait bioactif de coproduit de concombres de mer selon de protocole d'environnement Canada d'essai de létalité aigue sur la truite arc-en-ciel.



3. DEMANDE DE LICENCE POUR RELÂCHER OU TRANSFÉRER LES POISSONS

(Pour le transfert et relâche des poissons vivants d'une ou plusieurs écloseries à des sites de cages marins ou autre écloseries, s'il vous plaît compéter "l'Annexe 1", en attachement.)

Nom commun: Truite arc-en-ciel

Nom scientifique et lignée: *Oncorhynchus mykiss* (Troutlodge Inc.)

Stade de développement: Alevins tout femelle stérile

Nombre à transférer: 300 à 1,5 g

Dates d'envois proposées: 11 au 25 avril 2012

Méthode d'envoi: dans un sac avec de l'eau douce oxygéné



4. ORIGINE DU STOCK

Nom du requérant:	André Mazerolle Boréal Aquaculture Inc.
Adresse (adresse postale et adresse rurale au complet):	177-A, boul J.D. Gauthier Shippagan NB. E8S 1M7
Numéro de téléphone:	Téléphone: 506-336-4131 Cellulaire:506-336-7977
Numéro de télécopieur:	Fax : 506-601-0112
Courrier électronique:	denisas@rogers.com
S'il s'agit d'une entreprise, nom d'une personne ressource (indiquer son poste):	
S'il s'agit d'un aquiculteur, numéro du permis d'aquiculture:	IF-0309



5. DESTINATION DU STOCK (écloserie, alevinière, parc d'affinage, autres - définir)

Nom du requérant:	Claude Pelletier Biologiste et chargé de projet Pavillon aquacole de l'IRZC situé à Aquarium et Centre Marin 100 rue de l'Aquarium Shippagan, N.-B. 506-336-3124
S'il s'agit d'un aquiculteur, numéro du permis d'aquiculture:	
Numéro du site :	



6. PROFIL DE L'ÉTAT DE SANTÉ

Fournir toute information disponible sur l'état de santé du stock à relâcher ou à transférer. Prière d'annexer une copie du certificat faisant état des conditions pathogènes spécifiques ou attestant l'absence de maladies. Joindre un appendice, si nécessaire.

Boréal Aquaculture Inc. est une compagnie piscicole qui se spécialise dans l'élevage de la truite arc-en-ciel pour en faire de la vente en marché. Boréal Aquaculture n'a pas de certificat de santé du poisson, RPSP. Et les poissons qui seront transférés au Pavillon aquacole de l'IRZC seront placés dans un secteur isolé qui n'a également pas de certificat de santé du poisson.

Une inspection sanitaire provinciale sur la santé du poisson est effectuée afin de vérifier s'il y a présence d'agents pathogènes sur le lot qui sera transféré à l'IRZC. Une copie sera envoyée par télécopieur (au 506-755-5061).

7 INFORMATIONS ADDITIONNELLES

Identifier les risques potentiels ou conflits que ce transfert ou implantation pourrait avoir avec d'autres groupes d'utilisateurs (Autochtones, pêcheurs commerciaux, activités récréatives, propriétaires de terrains, etc.) et les mesures qui pourraient être prises. Les demandeurs doivent fournir toutes autres informations pouvant mieux faire comprendre leurs intentions.

Ces transferts ne démontrent pas de risques potentiels. Les truites arc-en-ciel seront maintenues dans un endroit isolé.

Claude Pelletier

le 5 avril 2012

Signature

Date

ANNEXE I
TRANSFÈRE ET RELÂCHE DE POISSONS VIVANTS

ÉCLOSERIE DE SOURCE	# Licence	Stock	TAILLE	DATES
Boréal Aquaculture Inc.		Truite Arc-en-ciel	300 alevins	11 au 25 avril 2012
SITE MARIN RECEVEUR	# SITE	# À TRANSF.	# TRANSF. ACTUEL	DATES
Pavillon Aquacole de l'Institut de Recherche sur les Zones Côtières de Shippagan	IF-0309	300	0	

Annexe 2 : Protocole de préparation de la colonne HP20-Supelco (Sigma)

PROTOCOLE DE PRÉPARATION COLONNE HP20-SUPELCO/SIGMA CAT#1-3607

Important : ne pas utiliser d'acide nitrique ou autres agents oxydants puissants avec ce produit.

L'éluion avec des solvants organiques, tel que le méthanol, l'éthanol et l'isopropanol, peuvent faire gonfler la résine. La colonne ne devrait être remplie qu'à moitié pour permettre ce gonflement.

Hydratation de la résine :

1-Transférer la résine sèche dans un bécher de 500 ml. Ajouter assez de volume de méthanol pour couvrir la résine d'une couche de liquide d'environ 2.5 -5 cm d'épaisseur.

2-Agiter doucement le mélange pendant environ une minute afin de bien humidifier la résine. Incuber sans agitation pour 15 minutes.

3-Décanté le méthanol et le remplacer par de l'eau distillée, agiter doucement. Incuber sans agitation pour une période de 10 minutes.

Préparation de la colonne :

Important : toujours utiliser la résine hydratée, ne pas laisser la résine sécher durant aucune des étapes de la préparation de la colonne ou lors de son utilisation. Il est nécessaire de laisser une mesure de liquide d'environ 2.5 cm au-dessus du volume de résine pour prévenir la déshydratation et aussi réduire le remous des billes de résine lors de l'ajout de liquide à la colonne.

1-Ajouter une mesure d'environ 2.5 cm d'eau à la colonne, préalablement lavée, avant d'y verser la résine hydratée. S'assurer que la vanne soit en position fermée.

2-Verser lentement la résine dans la colonne et prendre soins de vider l'excédent d'eau sans toutefois enlever complètement la mesure d'eau au-dessus des billes. Puisque la résine aura tendance à gonfler, ajouter assez de résine pour ne remplir que la moitié de la colonne.

Décolmatage :

Cette étape permet de retirer les bulles d'air qui se trouvent entre les billes de résine ainsi que de classer les billes par leur grosseur dans la colonne (les plus grosses en dessous et les plus petites en dessus). Cette étape permettra aussi de se débarrasser des billes trop fines. Environ 30 minutes de décolmatage est suffisant pour préparer une nouvelle colonne.

Pour une colonne déjà en utilisation, cette étape est effectuée pour retirer les débris qui pourraient s'être logés entre les billes. Ce décolmatage est effectué *après* l'adsorption, *avant* l'éluion.

1-Attacher un tuyau de silicone sur le bec de sortie de la colonne. Placer la vanne en position ouverte.

2-Introduire un faible débit d'eau dans la colonne, ensuite augmenter doucement le débit jusqu'à ce qu'il y ait une resuspension totale des billes de résine.

3-Maintenir ce débit jusqu'à ce que toutes les bulles d'air soient délogées et laisser les particules fines sortir du haut de la colonne.

4-Arrêter le débit et laisser les billes de résines se déposer.

5-Ajuster le volume d'eau en haut de la surface des billes pour obtenir une mesure de 2.5 cm d'eau au-dessus des billes.

Calcul du volume de billes :

$$\text{volume du cylindre} = \pi \times \frac{1}{2} \times \text{hauteur de la colonne de billes}$$

Cette valeur permettra de calculer les débits optimaux.

Chargement de la colonne :

Ce processus de passage de l'échantillon dans la colonne permet aux molécules d'intérêts de s'adsorber sur la résine. L'adsorption est un phénomène d'équilibre donc, l'adsorbat ne sera jamais totalement adsorbé. C'est ce phénomène qui permettra ensuite l'éluion de l'adsorbat en utilisant un solvant. Pour assurer une adsorption adéquate, le débit de la solution à traiter doit être ajusté.

Le débit le plus efficace se situe entre 2-16 volumes de résine par heure. Plus ce débit est faible, meilleure sera l'efficacité d'adsorption. Un débit supérieur à 8 volumes par heure permet une fuite de l'adsorbat, il est conseillé de ne pas dépasser ce débit.

Le chargement de la colonne est permis jusqu'à ce qu'il y a fuite de l'adsorbat. Si l'on doit récupérer la solution après le chargement de la colonne, il est conseillé de le faire en fractions afin d'éviter la présence de molécules non-adsorbé dans la solution.

La solution qui passe sur la résine devrait être libre de particules en suspension puisque ces dernières risquent d'interférer avec l'efficacité d'adsorption. Pour éviter un blocage de la colonne par des particules insolubles, l'échantillon est filtré sur un papier Whatman de pore de 20-25µm (#4). Il est tout de même possible que la colonne devienne colmatée malgré cette étape de pré-filtration, si tel est le cas il est requis d'effectuer un cycle de décolmatage avant de poursuivre.

Lorsque l'étape de chargement est terminée, les molécules d'intérêt sont récupérées par élution.

Élution de l'adsorbat :

Le choix du solvant devrait être effectué en rapport avec la nature du matériel adsorbé ainsi que du type de résine utilisé (i.e. solvant hydrophobe pour une résine hydrophobe).

Le débit durant l'élution devrait être de 1-2 volume de résine par heure. Normalement, l'adsorbat est récupéré en passant 2 ou 3 volumes de résine.

Cette élution a pour effet de réactiver la surface adsorbante des billes et sert aussi à reconditionner la colonne.

Pour l'élution des molécules de concombres de mer, le protocole d'élution suivant est utilisé.

concentration éthanol (% v/v)	bed volume
40	2
60	3
80	3
100	3

Équilibrage de la colonne :

Après l'élution, l'espace occupé par l'adsorbat est remplacé par l'éluant. C'est pour cette raison que l'on doit rincer la colonne avant de la réutiliser afin de déloger le solvant utilisé pour l'élution. Pour ce faire, 2 volumes de solution d'équilibrage sont passés sur la colonne à un débit semblable à celui utilisé pour l'élution. La solution d'équilibrage est composée d'eau de rinçage ou de solvant. Après cette étape d'équilibrage, la colonne est prête à être réutilisée.

Annexe 3 : Termes convenant à la
description de l'aspect du comportement
des poissons

Terme	Définition
Tégument	Revêtement épithélial du corps, y compris les branchies
Décollé	- décollement ou perte de parties du tégument
Muqueux	- sécrétions excessives de mucus, surtout évidentes sur les branchies
Hémorragique	- saignement (p. ex., dans les branchies, l'ouverture anale ou les yeux)
Pigmentation	Couleur de la peau, attribuable au dépôt ou à la distribution de pigments
Pâle	- couleur plus pâle que la normale pour l'espèce (telle qu'elle apparaît dans les conditions de l'essai, à l'exclusion de la solution d'essai)
Foncée	- couleur plus foncée que la normale pour l'espèce (telle qu'elle apparaît dans les conditions de l'essai, à l'exclusion de la solution d'essai)
Tachetée	- couleur anormalement variée des poissons, pris individuellement
Comportement général	Réactions observables des poissons soumis à l'essai, individuelles ou en groupes, dans leur environnement
Passif	- en état d'inactivité anormalement faible; immobile ou quasi immobile
Surexcitable	- réagissant à des stimuli beaucoup plus intensément que les poissons témoins
Irrité	- présentant une hyperactivité plus ou moins continue
En surface	- restant très longtemps à la surface
En plongée	- plongeant soudainement au fond du réservoir et y restant très longtemps
Spasmodique	- agité de mouvements brusques (spasmes musculaires) sur une partie ou la totalité du corps
Tétanique	- en état de tétanie, caractérisé par des spasmes tétaniques intermittents des muscles volontaires Normal - en apparence non affecté par la solution d'essai (ou non exposé à elle); conforme à l'aspect normal et aux caractéristiques de comportement habituel de l'espèce dans les conditions d'essai définies
Nage	Autopropulsion progressive dans l'eau par un mouvement coordonné de la queue, du corps et des nageoires
Interrompue	- absence de mouvement
Irrégulière	- évolution caractérisée par un manque d'uniformité, de régularité ou de cohérence; mouvement fluctuant et intégral
Giratoire	- le poisson tourne autour d'un point central ou évolue en spirale autour d'un axe
Éclaboussante	- les poisson nage très vite à la surface, avec des mouvements rapides du corps
Inversée	- le poisson est sur le dos (ou à peu près)
Sur le flanc	- le poisson est retourné à $\pm 90^\circ$ sur le côté par rapport à la position normale du corps
Respiration	Échange physique d'eau à la surface des branchies, se manifestant pas le mouvement des opercules
Rapide	- plus rapide que la normale (rythme respiratoire manifestement plus rapide que celui des poissons témoins)
Lente	- plus lente que la normale (rythme respiratoire manifestement moins rapide que celui des poissons témoins)
Toux	- accroissement (par rapport aux poissons témoins) des cas de toux (circulation inverse dans les branchies, se manifeste par l'ouverture marquée des opercules)
En surface	- le poisson nage à la surface, la bouche ouverte, en pompant de l'eau ou de l'air par les branchies
Irrégulière	- ne se produisant pas à intervalles réguliers (rythmiques)

Annexe 4 : Représentation structurale des
Frondosides isolés de *Cucumaria*
frondosa

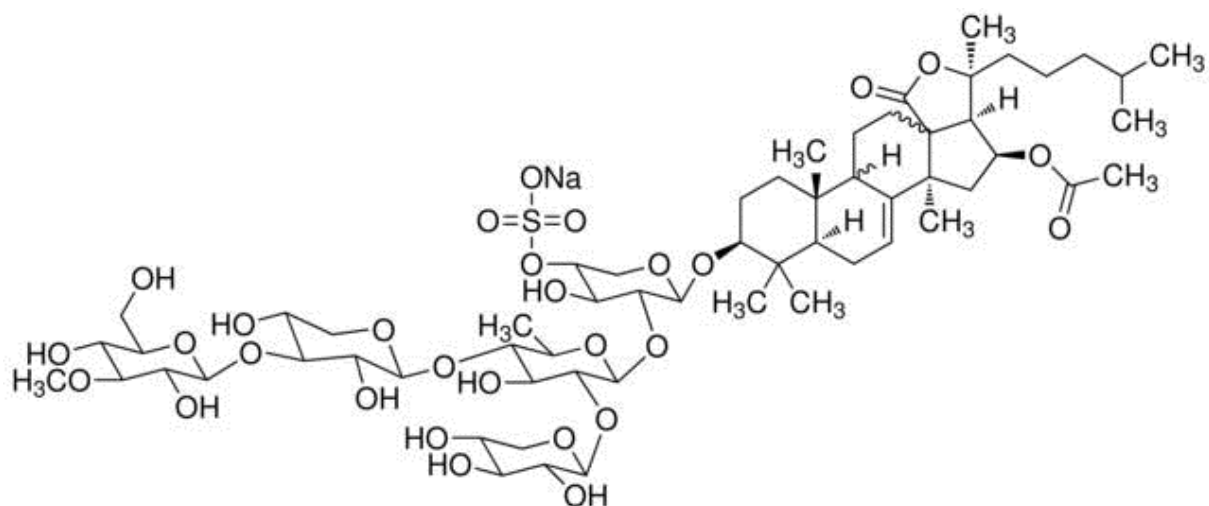


Figure 51 : Représentation structurale de Frondoside A

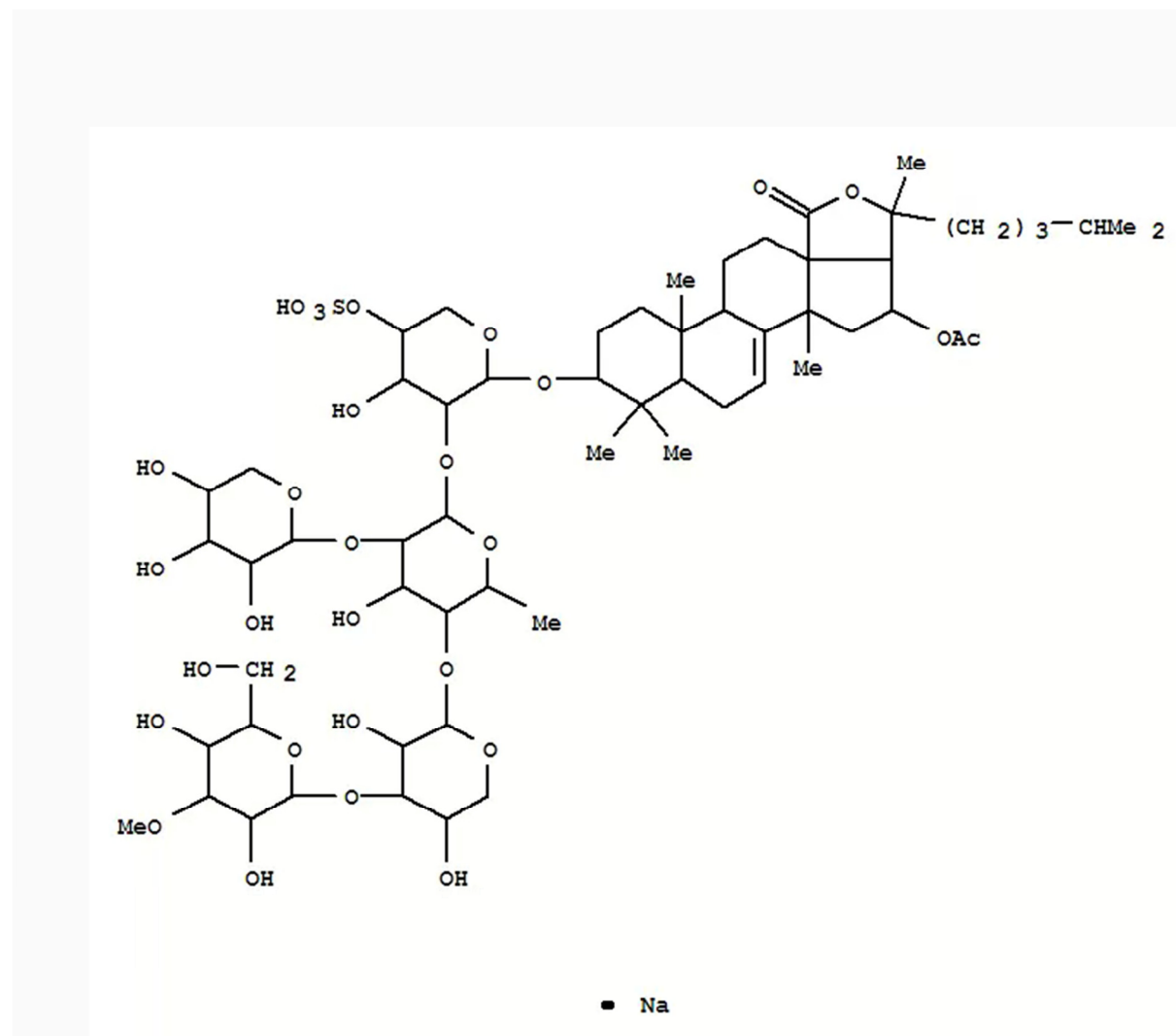


Figure 52: Représentation structurale de Frondoside A₁

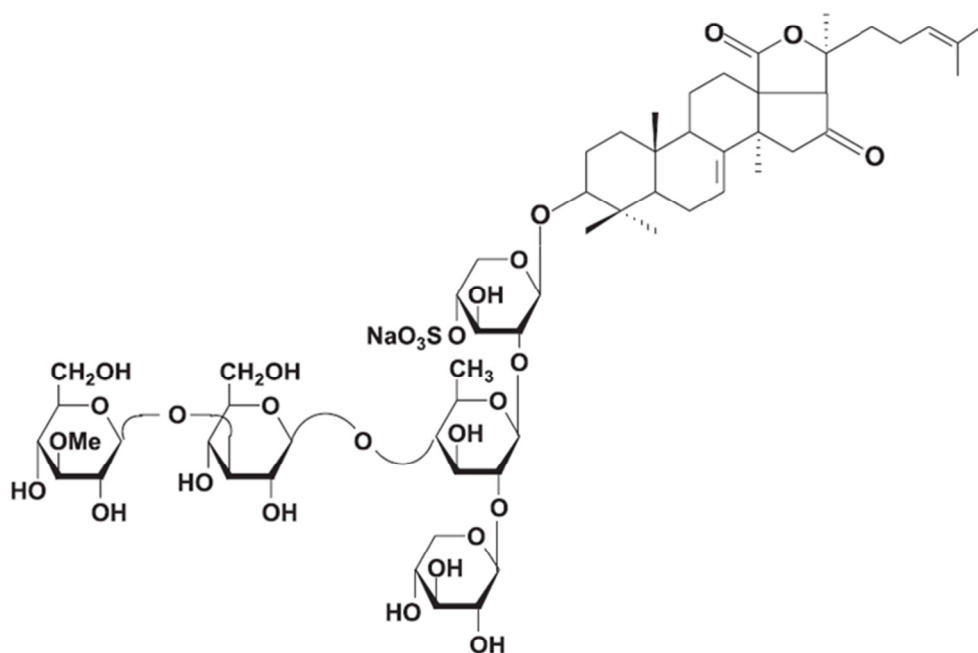


Figure 53 : Représentation structurale de Frondoside A₂-1

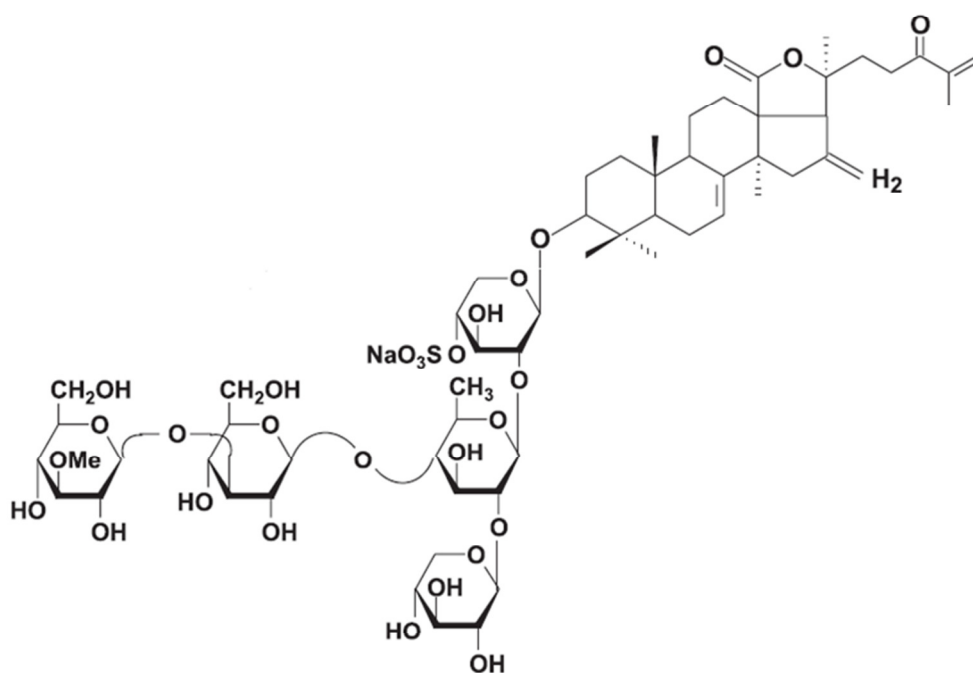


Figure 54: Représentation structurale de Frondoside A₂-2

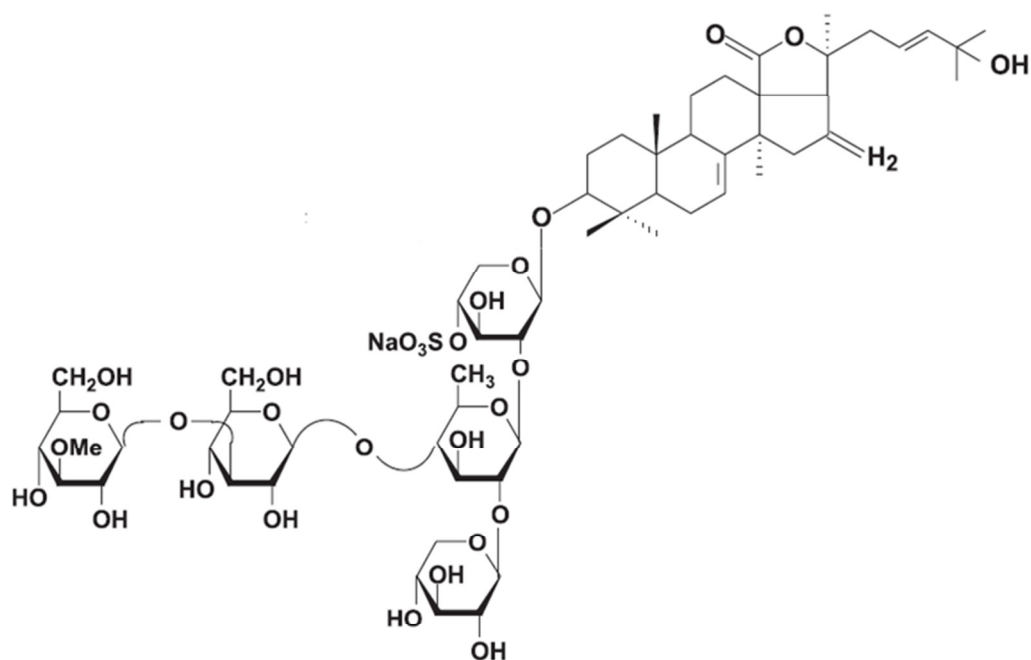


Figure 55: Représentation structurale de Frondoside A₂-3

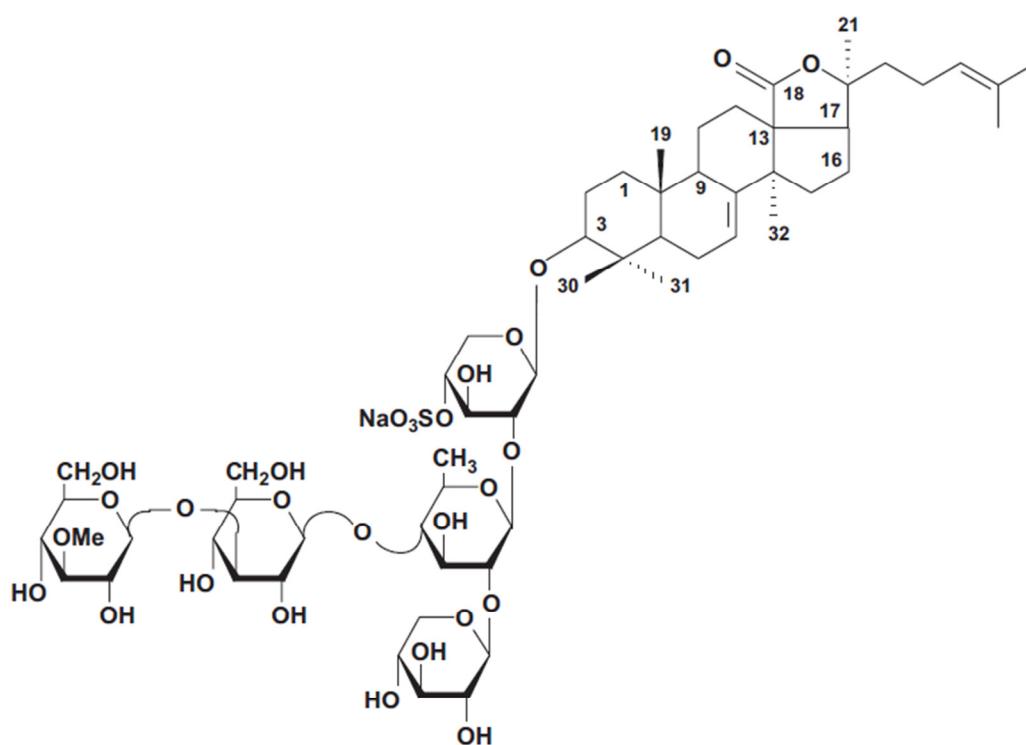


Figure 56: Représentation structurale de Frondoside A₂-4

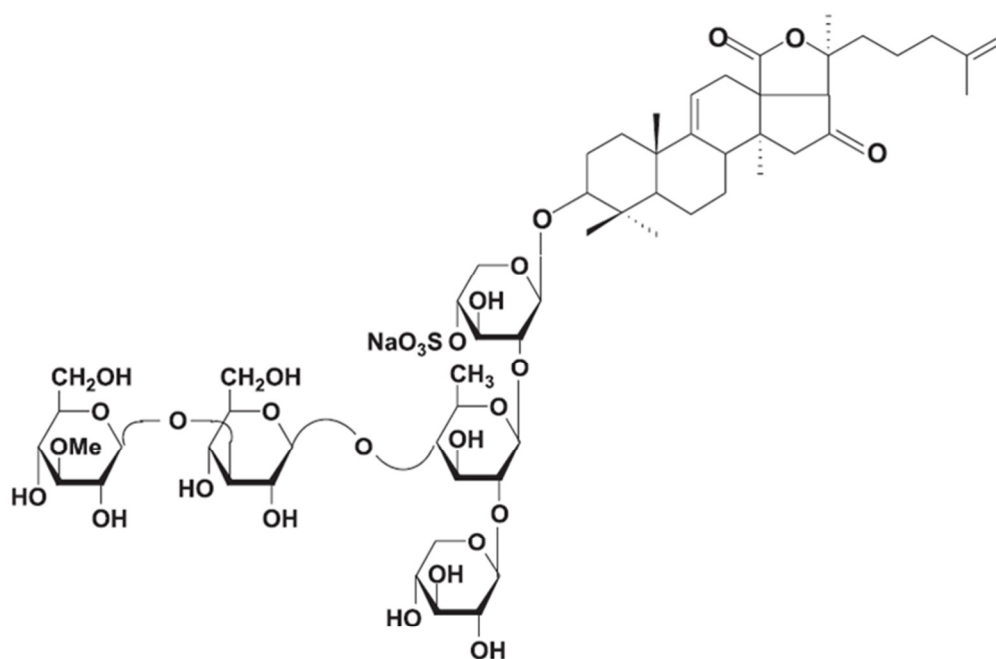


Figure 57: Représentation structurale de Frondoside A₂-6

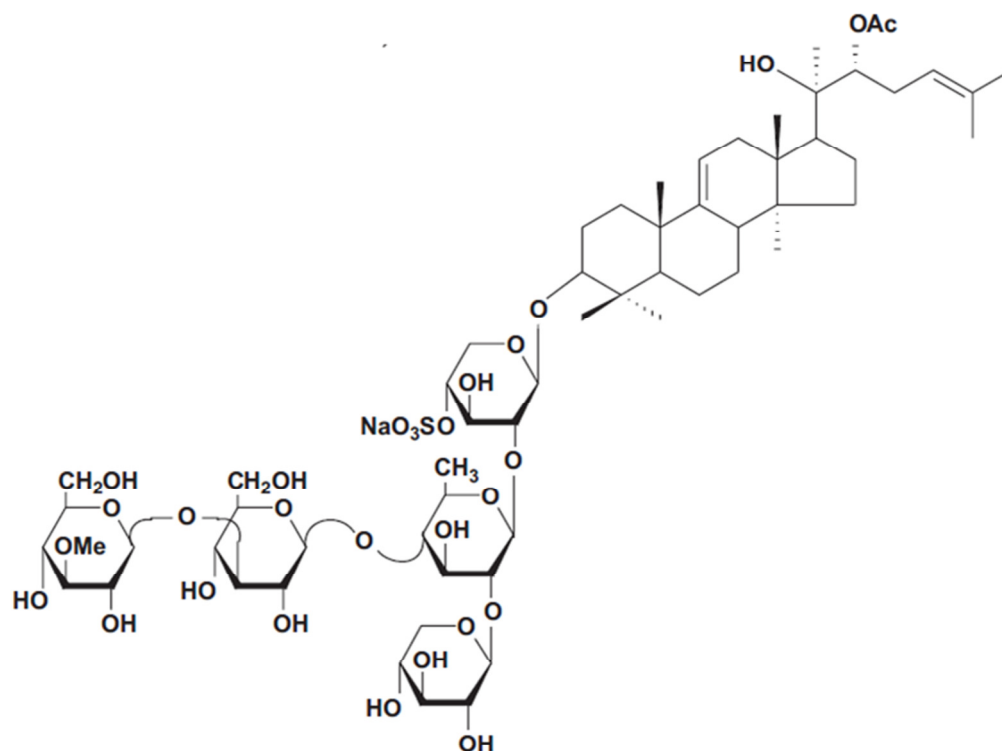


Figure 58: Représentation structurale de Frondoside A₂-7

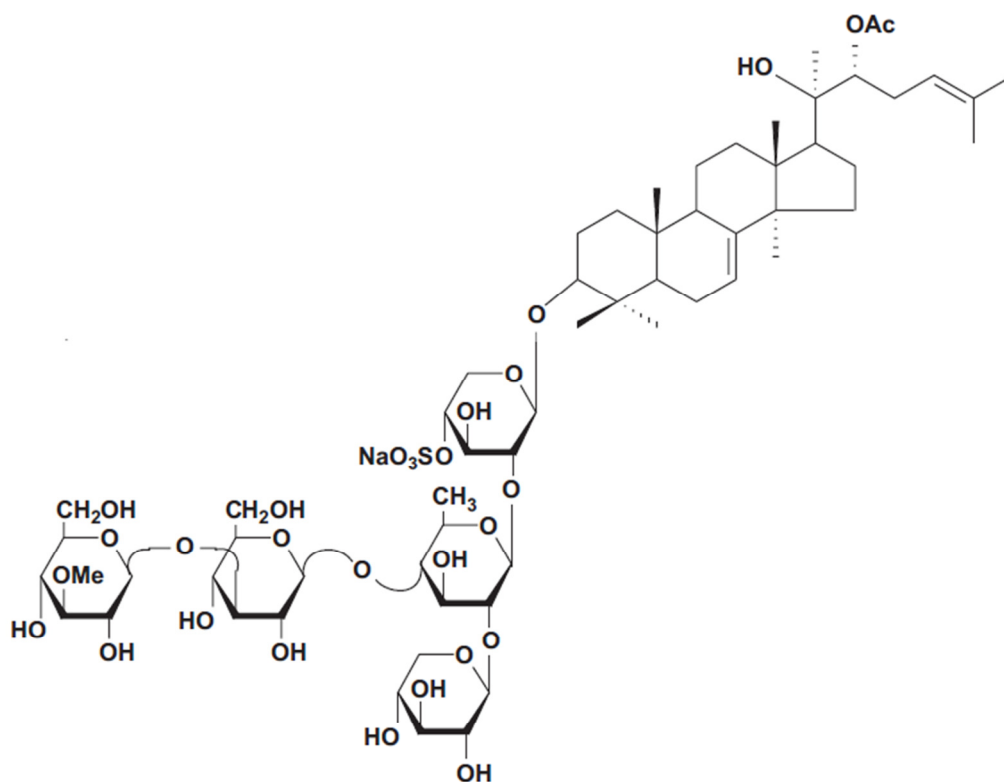


Figure 59: Représentation structurale de Frondoside A₂-8

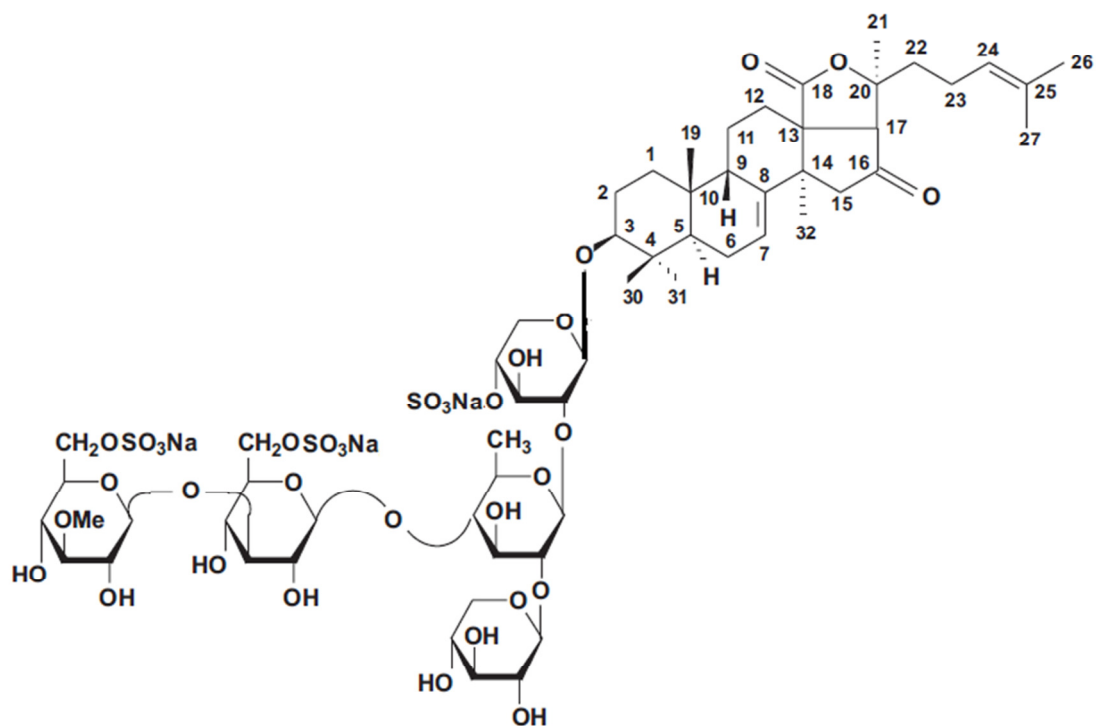


Figure 60: Représentation structurale de Frondoside A₇-1

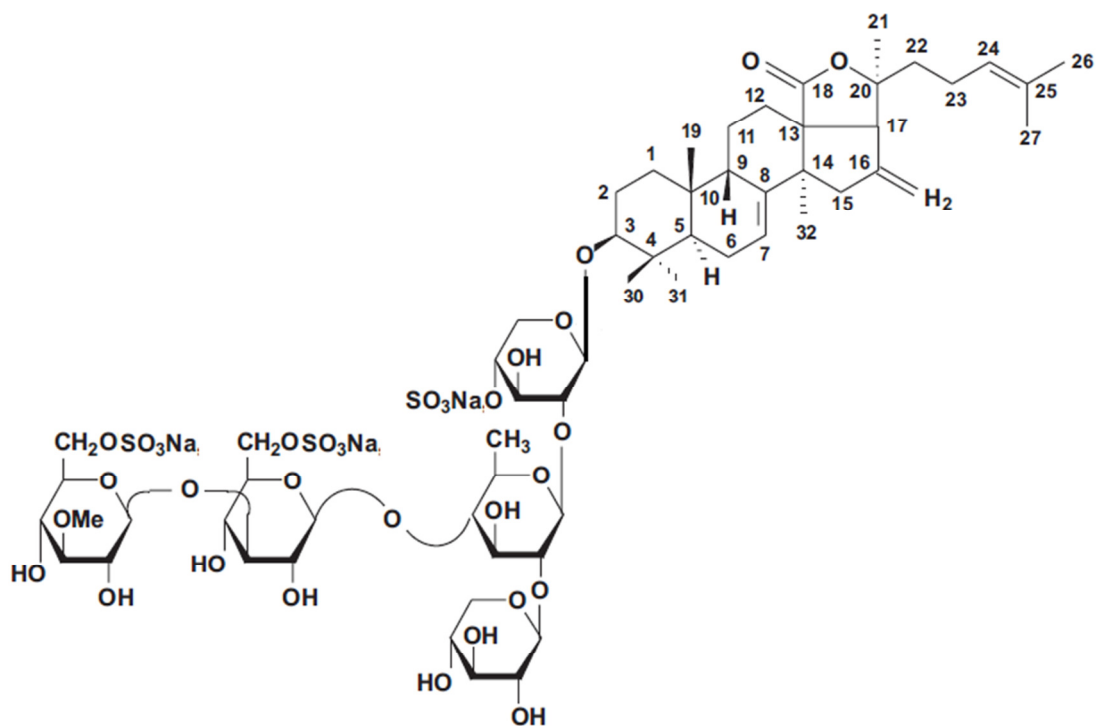


Figure 61: Représentation structurale de Frondoside A7-2

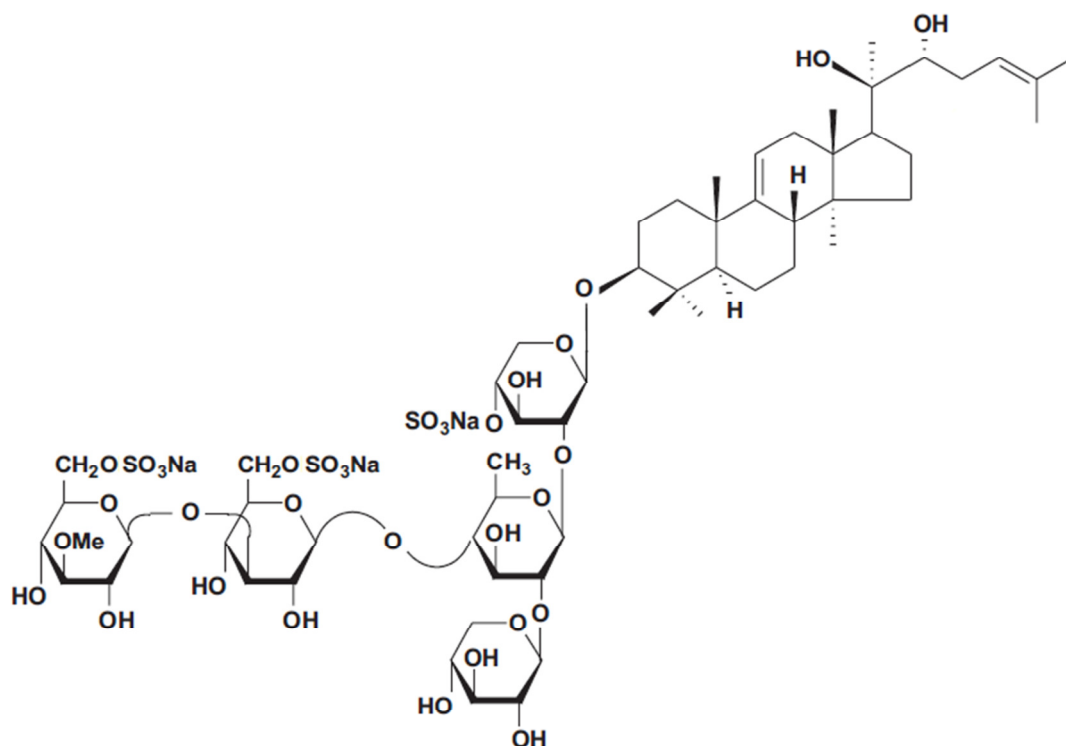


Figure 62: Représentation structurale de Frondoside A7-3

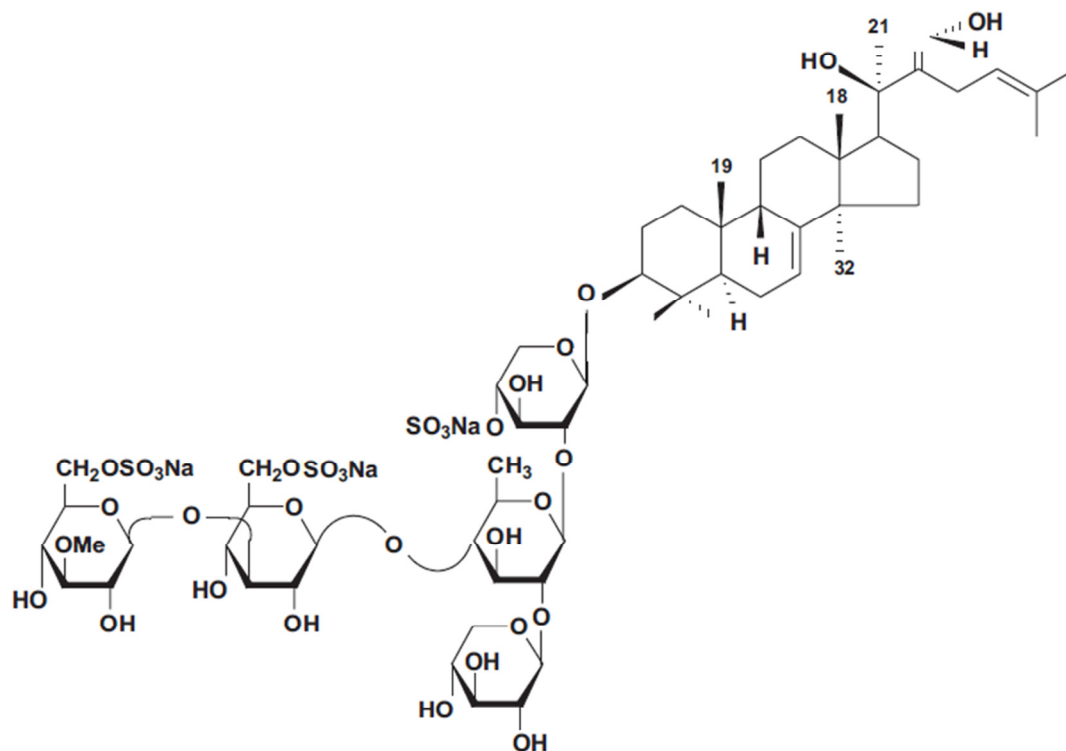


Figure 63: Représentation structurale de Frondoside A₇₋₄

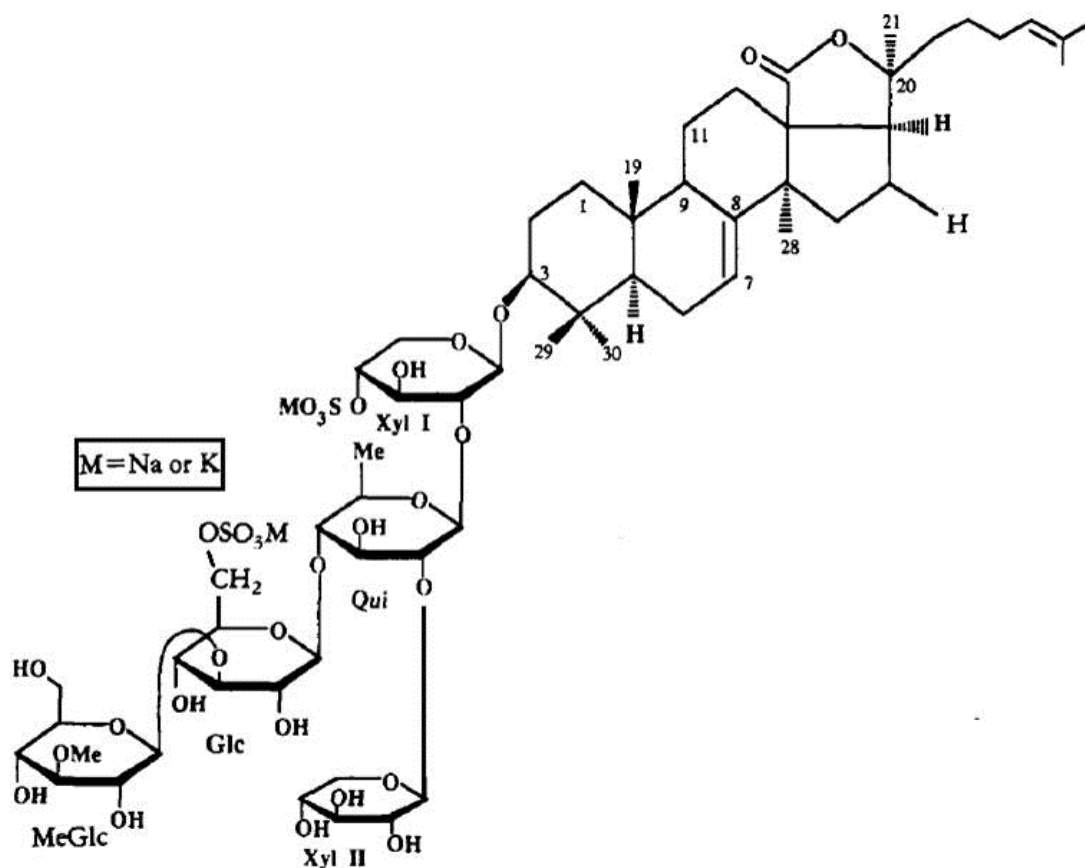


Figure 64: Représentation structurale de Frondoside B

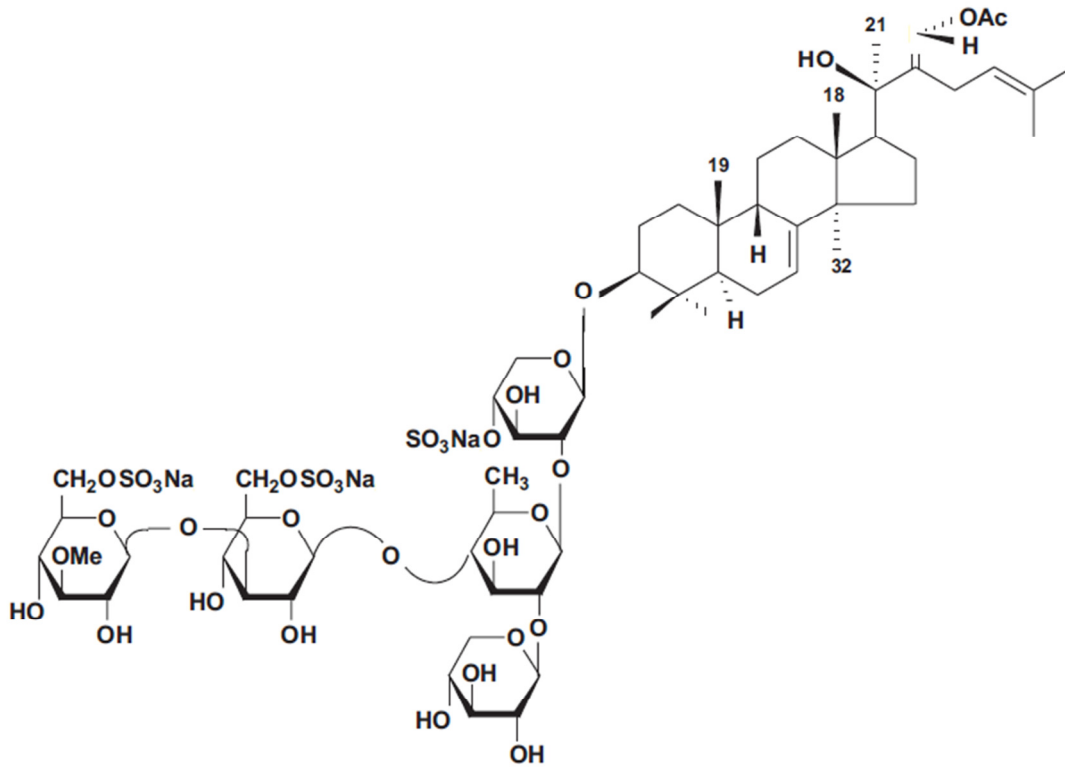


Figure 65: Représentation structurale de Isofrondoside C

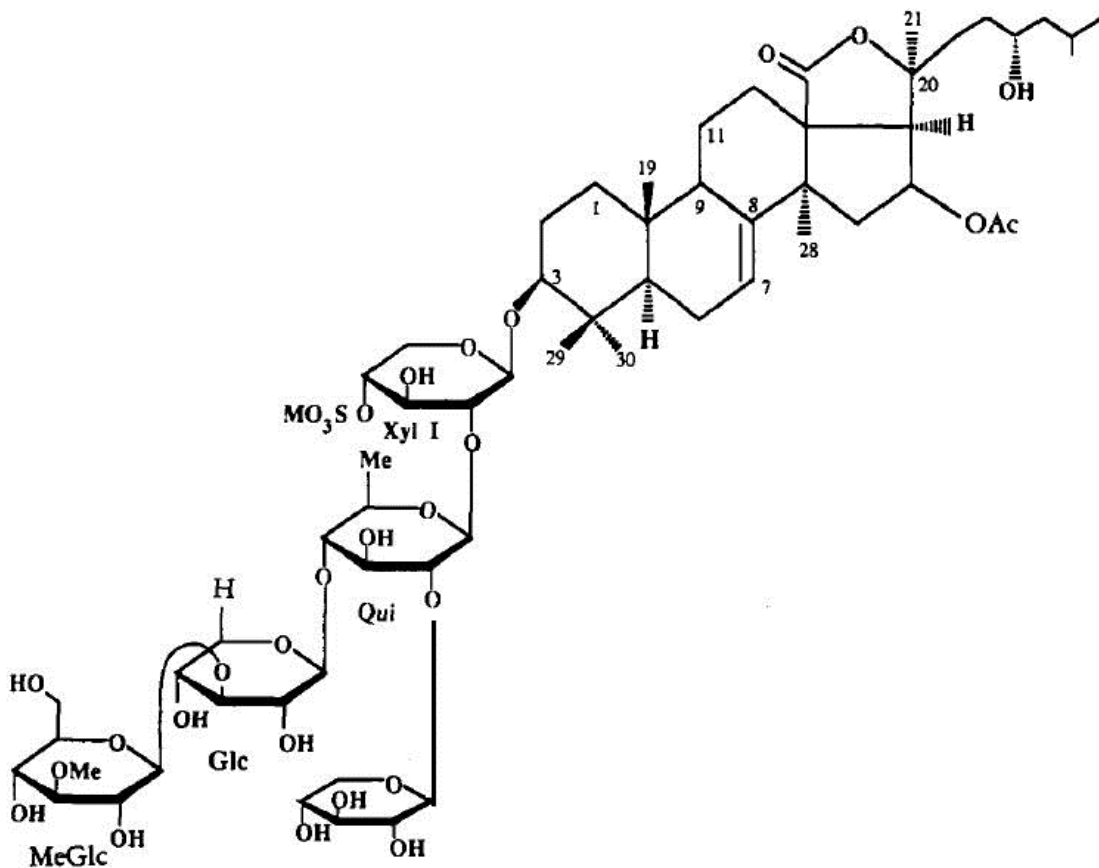


Figure 66: Représentation structurale de Frondoside D

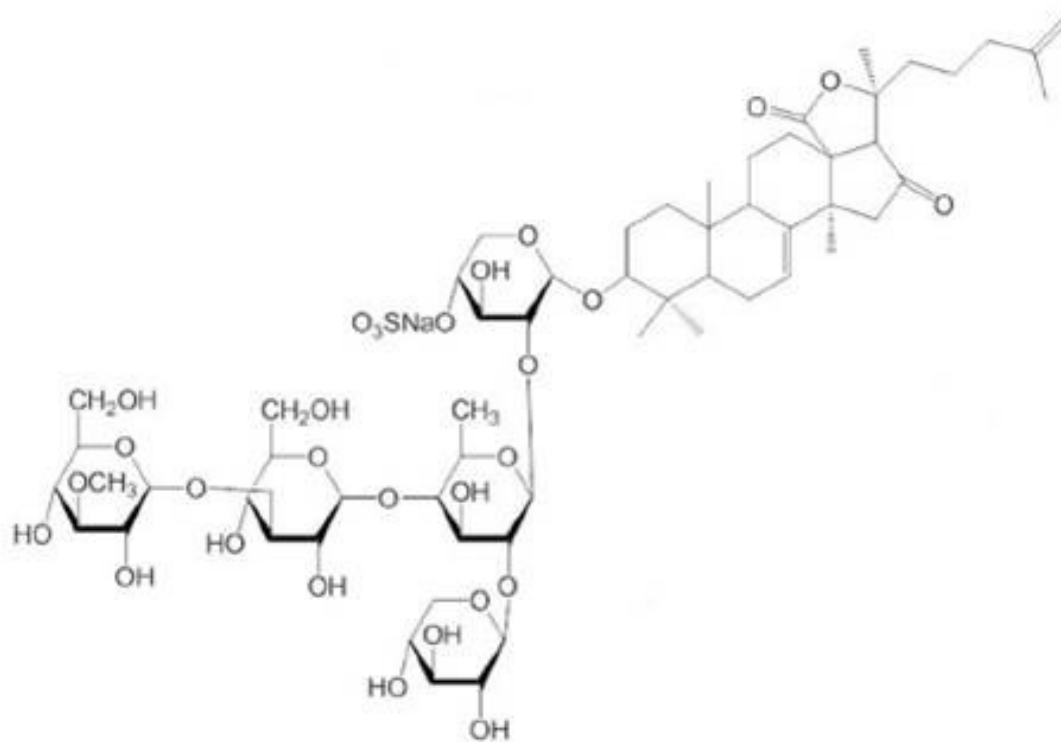


Figure 67: Représentation structurale de Frondoside E₁

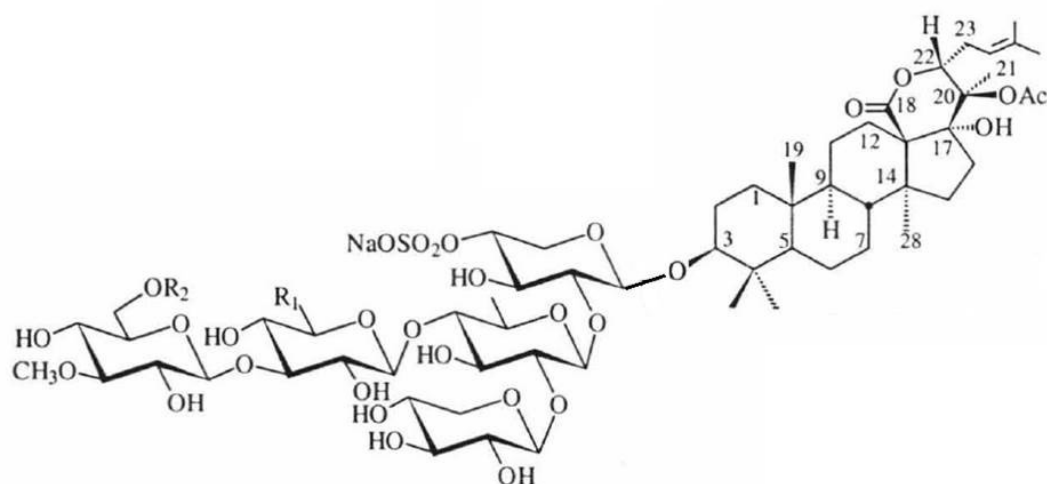


Figure 68: Représentation structurale de Frondoside F

