

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC EN OUTAOUAIS

MÉTABOLITES SECONDAIRES DE LIMACES INDIGÈNES (*PHILOMYCUS SPP.*) ET DE
LIMACES INTRODUITES ENVAHISSANTES (*ARION SUBFUSCUS S.L.*) : EXPLORATION
DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DE LEURS EXTRAITS ET DE LEURS PROPRIÉTÉS
ANTI-APPÉTANTES ET PHÉROMONALES

MÉMOIRE

PRÉSENTÉE

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

EXTENSIONNÉE DE L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

PAR

SHAHRIAR DANESHVAR

2024

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette étude. Tout d'abord, je souhaite exprimer ma profonde gratitude envers mes directeurs de mémoire Dr. Angélique Dupuch à l'Université du Québec en Outaouais (UQO) et Dr. Serge Lavoie à l'Université du Québec à Chicoutimi (UQAC), pour leurs conseils éclairés, leur soutien constant et leur patience tout au long de ce projet. Leurs conseils précieux ont grandement enrichi mon travail et m'ont aidé à surmonter les défis rencontrés.

Je remercie également toute l'équipe pédagogique et les intervenants professionnels responsables de ma formation à l'institut des sciences de la forêt tempérée (ISFORT), pour avoir assuré la partie théorique et pratique de celle-ci.

Je désire aussi remercier les professeurs de l'Université du Québec à Chicoutimi et l'équipe de laboratoire LASEVE qui m'ont fourni les outils nécessaires durant mon stage.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance aux personnes suivantes, pour leur aide dans la réalisation de ce mémoire :

Dr. François Lorenzetti (UQO/ISFORT) et Dr. Vakhtang Mshvildadze (UQAC) membre de comité d'évaluation.

Anna Mazaleyrat pour partager ses connaissances et ses expériences sur mon sujet de recherche.

Marie-Ève Charlebois pour ses aides durant la récolte des échantillons.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers ma famille pour leur soutien inconditionnel et leurs encouragements tout au long de cette période d'étude. Leur soutien moral a été une source de motivation précieuse pour moi.

Je suis reconnaissant pour cette expérience enrichissante et les leçons apprises tout au long de ce parcours académique. Merci à tous ceux qui ont été impliqués dans ce projet et qui ont rendu cette réalisation possible.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES FIGURES	v
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	viii
RÉSUMÉ.....	ix
CHAPITRE I.....	11
1. INTRODUCTION.....	11
1.1. Problématique.....	11
1.2. État des connaissances	14
1.2.1. Introduction des espèces exotiques	14
1.2.2. Des limaces introduites et indigènes au Canada	14
1.2.3. Alimentation.....	16
1.2.4. Auto défense.....	16
1.3. Objectif et hypothèse de recherche	18
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	20
2.1. Matériel biologique et échantillonnage	20
2.2. Préparation des échantillons et extraction.....	20
2.3. Activités biologiques.....	21
2.3.1. Activité anti-appétante de l'extrait de limaces – expériences de terrain.....	21
2.3.2. Activité phéromonale de l'extrait de limaces – expériences de laboratoire.....	24
2.4. Analyses des compositions chimiques	26
2.4.1. Séparation liquide-liquide	27
2.4.2. Chromatographie et spectrométrie de masse.....	27
2.4.3. Réseautage moléculaire et identification des molécules	28
2.5. Analyses statistiques	29

2.5.1.	Activité anti-appétante	29
2.5.2.	Activité phéromonale	30
3.	RÉSULTATS	31
3.1.	Activités biologiques.....	31
3.1.1.	Activité anti-appétante	31
3.1.2.	Activité phéromonale	35
3.2.	Analyses chimiques.....	37
4.	DISCUSSION	44
4.1.	Activité anti-appétante et phéromonale.....	44
4.2.	Composition chimique	46
4.3.	Activité anti-appétante/phéromonale et succès d'invasion d' <i>Arion</i>	48
4.4.	Limites du projet	49
5.	CONCLUSION	51
6.	RÉFÉRENCES.....	52

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure du miriamine.	18
Figure 2 : Carte et coordonnées GPS des sites d'expérimentation pour le test d'activité anti-appétante.....	22
Figure 3 : Photos représentant le dispositif expérimental pour l'étude de l'activité anti-appétante (photo A) et l'exemple d'une photo montrant un petit mammifère en train de s'alimenter sur de la pâte de vers de terre (photo B).....	23
Figure 4 : Photo représentant le bac expérimental avec les trois zones utilisées pour les expériences dédiées à l'étude de l'activité phéromonale	25
Figure 5 : Nombre de limaces par minute (multiplié par 100 pour faciliter la lecture des valeurs) sur les supports en plastique en fonction du type d'extrait et du genre de limace dont l'extrait est issu (<i>Arion</i> vs <i>Philomycus</i>).	32
Figure 6 : Nombre d'arachnides par minute (multiplié par 100 pour faciliter la lecture des valeurs) sur les supports en plastique en fonction du type d'extrait (complet ou de surface) et du genre de limace dont l'extrait est issu (<i>Arion</i> vs <i>Philomycus</i>).	33
Figure 7 : Nombre de petits mammifères par minute (multiplié par 100 pour faciliter la lecture des valeurs) sur les supports en plastique en fonction du type d'extrait et du genre de limace dont l'extrait est issu (<i>Arion</i> vs <i>Philomycus</i>).	33
Figure 8 : Nombre de petits coléoptères par minute (multiplié par 100 pour faciliter la lecture des valeurs) sur les supports en plastique en fonction du type d'extrait et du genre de limace dont l'extrait est issu (<i>Arion</i> vs <i>Philomycus</i>).	34
Figure 9 : Nombre de sauterelles par minute (multiplié par 100 pour faciliter la lecture des valeurs) sur les supports en plastique en fonction du type d'extrait et du genre de limace dont l'extrait est issu (<i>Arion</i> vs <i>Philomycus</i>).	34
Figure 10 : Pourcentage moyen de temps passé à se déplacer (c.-à-d. le temps passé dans chaque zone divisée par la durée totale de l'expérience multiplié par 100) dans chaque zone du bac d'expérimentation en fonction du type d'extrait et du genre de limace.....	36
Figure 11 : Pourcentage d'expériences pour lesquelles une limace est entrée en contact avec l'extrait ou le contrôle en fonction du type d'extrait et du genre de limace.	36
Figure 12 : Structure de l'acétate de géranylgeranyle.....	38

Figure 13 : Comparaison des spectres de masse de l'acétate de géranylgéranyle. En haut : spectre de masse obtenu par l'analyse LCMS, en bas : spectre de masse de la banque de données GNPS (CCMSLIB00004709646).	38
Figure 14 : Patron de fragmentation de l'adduit $[M + K]^+$ de l'acétate de géranylgéranyle.....	39
Figure 15 : Chromatogrammes LCMS pour l'ion m/z 487 des fractions MeOH/H ₂ O des surfaces d' <i>Arion</i> et de <i>Philomyces</i>	40
Figure 16 : Structure de Canangalia H et formation de l'adduit chargé positivement.....	40
Figure 17 : Comparaison des spectres de masse du canangalia H. En haut : spectre de masse obtenu par l'analyse LCMS, en bas : spectre de masse de la banque de données GNPS (CCMSLIB00012060267).....	41
Figure 18 : Chromatogrammes LCMS pour l'ion m/z 487 des fractions MeOH/H ₂ O des surfaces d' <i>Arion</i> et de <i>Philomyces</i>	41
Figure 19 : Structure de l'astragaline.	42
Figure 20 : Comparaison des spectres de masse de l'astragaline. En haut : spectre de masse obtenu par l'analyse LCMS, en bas : spectre de masse de la banque de données GNPS (CCMSLIB00003138551).....	42
Figure 21 : Patron de fragmentation de l'adduit $[M + H]^+$ de l'astragaline.	43
Figure 22 : Chromatogrammes LCMS pour l'ion m/z 449 des fractions MeOH/H ₂ O des surfaces d' <i>Arion</i> et de <i>Philomyces</i>	43
Figure 23 : Miriamine vs Acétate de géranylgéranyle	47
Figure 24 : Structure moléculaire du canangalia H et de la juvabione	47

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Quantités d'extraits pour la préparation de la nourriture du test anti-appétant.	22
Tableau 2. Paramètres optimisés de spectromètre de masse.	28
Tableau 3 : Le nombre de visiteurs observés pour chaque genre (type d'extrait).	31
Tableau 4 : Résultats des régressions mixtes pour chacune des catégories de prédateurs (activité anti-appétante). L'estimé et l'erreur standard (entre parenthèses) sont présentés pour chaque variable et interaction incluse dans le modèle. * $p < 0.05$. *** $p < 0.001$	32
Tableau 5 : Résultats des régressions mixtes pour le temps passé en déplacement dans une zone du bac expérimental qui contenait ou pas de l'extrait et pour la présence/absence de contact d'une limace avec le verre de montre de l'extrait ou du contrôle. L'estimé et écart-type (entre parenthèses) sont présentés pour chaque variable et interaction incluse dans le modèle. * $p < 0.05$. *** $p < 0.001$	35
Tableau 6: Le nombre des molécules détectées dans l'extrait uniquement chez <i>Arion</i> , <i>Philomycus</i> ou chez les deux genres.	37
Tableau 7 : Classement des molécules détectées dans les extraits de limaces.	37

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

AcO = OAc: Groupe acétyle ($\text{CH}_3\text{CO-}$)

AICc: Critère d'information d'Akaike corrigé

CHCl_3 : Chloroforme

CH_2Cl_2 : Dichlorométhane

DB: Banque de données (Database)

Exp: Expérience

GNPS: Global Natural Products Social Molecular Networking

ISFORT: Institut des sciences de la forêt tempérée

LC-MS/MS: Liquid chromatography with tandem mass spectrometry

MeOH: Méthanol

UICN: Union internationale pour la conservation de la nature

RÉSUMÉ

Les limaces constituent une proie facile pour leurs prédateurs en raison de leurs corps souples et de déplacements lents. Contrairement aux escargots qui se replient rapidement dans leur coquille lors d'une attaque, les limaces doivent compter sur d'autres mécanismes de défense. Comme avec les plantes sessiles, ou d'autres animaux présentant des caractéristiques similaires (éponges de mers, limaces de mers, algues, tuniciers), il est possible que les limaces se protègent contre les prédateurs par la production de métabolites secondaires anti-appétants. Les limaces utilisent aussi la stratégie du plus grand nombre pour survivre comme espèce grâce à l'hermaphroditisme qui leur permet de multiplier les occasions d'accouplement. Afin de favoriser ces rencontres, les animaux ont souvent recours à des phéromones, qui sont aussi des métabolites secondaires. Dans ce projet, les activités anti-appétantes et phéromonales des métabolites secondaires de deux espèces de limaces qui se trouvent dans les forêts du Sud-est canadien, *Philomycus spp.* et *Arion subfuscus s.l.*, ont été évaluées. L'une de ces espèces, *Philomycus spp.*, est indigène tandis que l'autre, *Arion subfuscus s.l.*, est introduite et envahissante. Cette dernière possède un fort succès d'envahissement, mais les mécanismes sous-jacents à ce succès ne sont pas connus. Ce projet vise donc à vérifier si les métabolites secondaires sécrétés par *Arion subfuscus s.l.* et *Philomycus spp.* possèdent des activités anti-appétantes ou phéromonales. Nous avons également essayé de vérifier si les activités anti-appétantes ou phéromonales des métabolites secondaires pourraient être associées au succès d'envahissement d'*Arion subfuscus s.l.* Pour ce faire, les métabolites secondaires ont été extraits avec des solvants, puis leurs effets anti-appétants et phéromonaux ont été testés sur le terrain et en laboratoire. En parallèle, les métabolites secondaires ont été analysées avec un chromatographe et un spectromètre de masse afin d'accumuler des connaissances quant à leur composition. Les résultats de cette étude supportent en partie l'hypothèse que les limaces produisent des métabolites secondaires ayant des effets anti-appétant et phéromonal, mais que ces effets ne sont pas similaires entre les deux types de limace. En parallèle, les analyses chimiques ont révélé la présence dans le corps, mais également à la surface des limaces, de métabolites secondaires qu'on rencontre généralement chez les végétaux, ce qui suggère une stratégie opportuniste pour le déploiement des défenses chimiques. De plus, ce projet suggère que l'activité phéromonale de ces métabolites secondaires pourrait favoriser le succès d'envahissement d'*Arion subfuscus s.l.*, un mécanisme encore peu étudié pour expliquer les invasions biologiques des espèces animales.

Mots clés : Limace, *Philomycus*, *Arion*, métabolite secondaire, anti-appétant, phéromone, processus d'envahissement.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1. Problématique

Les espèces qui parviennent à coloniser des habitats en dehors de leur aire de répartition naturelle sont qualifiées d'espèces exotiques (Sundseth *et al.*, 2014). Généralement, ces espèces n'entraînent aucun risque majeur, tandis que certaines peuvent même avoir des impacts bénéfiques. Cependant, il arrive aussi que des espèces exotiques constituent une menace pour la biodiversité, la santé humaine et l'économie de nombreux pays (Sundseth *et al.*, 2014). Elles sont alors désignées sous le nom d'espèces exotiques envahissantes (ECCC, 2017b). D'après l'Union internationale pour la conservation de la nature (IUCN, 2018), les espèces exotiques envahissantes représentent la deuxième menace la plus grave pour la biodiversité après la destruction des habitats. Dans leur nouvel environnement, les espèces exotiques envahissantes se transforment en prédateurs, compétiteurs, parasites, agents d'hybridation et vecteurs de maladies pour les espèces indigènes, ainsi que pour les plantes et animaux domestiques (ECCC, 2017c; Pyšek *et al.*, 2020). Aucune région du Canada n'est à l'abri du risque d'invasion par des espèces exotiques, et les conséquences de celles-ci sont déjà observables dans de nombreux écosystèmes (ECCC, 2017a). Après qu'une espèce exotique envahissante se soit établie dans un écosystème favorable ou dans une population qui lui sert de vecteur, il est presque impossible de la déloger et il est très dispendieux de la contrôler. Les conséquences de ces espèces exotiques envahissantes sur les écosystèmes, les habitats et les espèces indigènes sont sévères et fréquemment irréversibles. Leur impact économique est estimé à des milliards de dollars chaque année (ECCC, 2017c; Runghen *et al.*, 2023). Afin de prévenir les invasions, il faut comprendre les facteurs et les mécanismes qui font qu'une espèce introduite devient envahissante.

En Amérique du Nord, un tiers des gastéropodes terrestres exotiques sont des limaces (Jeffrey, 2014). Parmi elles, le genre *Arion* Ferussac, 1819 est le plus diversifié avec au moins dix espèces qui ont été introduites sur ce continent (Barr *et al.*, 2009; Grimm *et al.*, 2009). Plusieurs espèces de ce genre sont organisées en complexes d'espèces qui ne sont identifiables que par dissection ou analyse moléculaire (Quinteiro *et al.*, 2005; Rowson *et al.*, 2014). Par exemple, *Arion subfuscus*

s.l. est reconnu comme un complexe formé de deux espèces cryptiques : *Arion subfuscus* et *Arion fuscus*. Elles se distinguent au niveau morphologique par la position de leurs organes génitaux (Grimm *et al.*, 2009). Chichester, L. F. et Getz (1969) considéraient que ce complexe d'espèces avait le plus grand potentiel de dispersion de toutes les limaces exotiques du nord de l'Amérique du Nord, en raison à la fois de sa capacité à occuper de multiples habitats et de sa propension à habiter des habitats forestiers naturels. Divers impacts potentiels causés par la présence d'*Arion sp.* ont été signalés, tels qu'une réduction de la dispersion des graines (Meadley Dunphy *et al.*, 2016), une augmentation de l'herbivorie sur les plantes indigènes ou les semis d'arbres (Côté *et al.*, 2005; Rathcke, 1985; Sana, 2003) et le broutage d'espèces de lichens menacées (Cameron, 2009). Bien qu'il y a 50 ans, ce complexe d'espèces était peu présent au Québec (Chichester, L. F. et Getz, 1969), il est aujourd'hui retrouvé un peu partout dans la province (L'Heureux et Angers, 2018), ce qui suggère que ce complexe a un excellent potentiel d'invasion. Cependant, à l'heure actuelle, on connaît peu les facteurs qui facilitent le succès d'invasion d'*Arion subfuscus s.l.* (Mazaleyrat *et al.*, 2023; Mazaleyrat, Lorenzetti, Aubin, *et al.*, 2022; Mazaleyrat, Lorenzetti et Dupuch, 2022).

L'établissement et la propagation d'organismes envahissants introduits en dehors de leur aire de répartition naturelle dépendent de facteurs abiotiques et biotiques tels que la pression de propagules (c.-à-d. une mesure du nombre d'individus introduits dans une zone), les caractéristiques abiotiques de l'écosystème envahi, les caractéristiques des envahisseurs, ainsi que les interactions biotiques entre les organismes envahissants et la communauté indigène (Richardson et Pyšek, 2006). L'absence de prédateurs adaptés à l'organisme introduit dans la communauté indigène, c.-à-d., hypothèse de la relâche des ennemis (Keane et Crawley, 2002; Mitchell et Power, 2003; Torchin *et al.*, 2003), ou la présence d'un mécanisme efficace permettant à l'espèce introduite de résister aux prédateurs présents dans la communauté indigène sont des facteurs qui peuvent faciliter le succès d'invasion d'une espèce introduite. Les limaces de mer, des gastéropodes de l'ordre des nudibranches, sont dépourvues de coquille, au même titre que leurs cousins terrestres. Ces organismes utilisent des mécanismes de défense alternatifs contre les prédateurs (Faulkner et Ghiselin, 1983). Ces mécanismes sont basés sur une production de métabolites secondaires, c.-à-d. des produits chimiques anti-appétants ou toxiques (Dean et Prinsep, 2017; Schulte et Scheuer, 1982; Thompson *et al.*, 1982). Le *Roboastra tigris* est un nudibranche carnivore qui se nourrit des petits nudibranches comme *Tambja abdere* et *Tambja elora*. Lorsqu'ils sont attaqués par *Roboastra*, *T. abdere* sécrète un mucus de mauvais goût contenant un total de 3 mg de tambjamines qui fait

parfois interrompre l'attaque du *Roboastra* tandis que *T. elora* s'enfuit parce qu'il n'a pas assez de tambjamine pour éloigner son prédateur (Carté et Faulkner, 1986). Contrairement aux limaces de mers, très peu de métabolites secondaires ont été décrits chez les limaces terrestres.

Les limaces terrestres excrètent du mucus pour faciliter leur déplacement (Denny, 1980), ainsi que pour protéger leur corps contre les blessures mécaniques, le dessèchement (Martin et Deyrup-Olsen, 1982) et les substances nocives (Triebkorn et Ebert, 1989). Contrairement aux escargots, les limaces n'ont pas de coquille pour se défendre contre les prédateurs ce qui ne leur laisse que l'autodéfense et la fuite comme option (Grimm *et al.*, 2009). Le mucus collant fabriqué par les limaces fait d'elles des proies difficiles (Rollo et Wellington, 1979). En effet, les pièces buccales de leurs prédateurs, des carabes par exemple, se colmatent au contact du mucus (Grimm *et al.*, 2009). La limace terrestre *Arion subfuscus s.l* (Draparnaud 1805) produit une colle puissante composée de protéines et d'hydrates de carbone (Wilks *et al.*, 2015). La colle d'*Arion subfuscus s.l* est beaucoup plus rigide que le mucus typique (Smith, 2010). Quand des prédateurs ou certains parasites attaquent une limace, cette dernière sécrète une grande quantité de mucus (Rollo et Wellington, 1979). Les stimulations mécaniques augmentent non seulement la sécrétion de mucus, mais il peut modifier également sa composition. L'écoulement de mucus cesse après quelques minutes de stimulation (Martin et Deyrup-Olsen, 1982, 1986).

Le mucus offre une forme de protection, mais on ignore s'il pourrait y avoir d'autres mécanismes de défense contre les prédateurs. Des métabolites secondaires anti-appétants ont été identifiés chez les limaces de mer. On peut donc faire l'hypothèse que les limaces, et notamment *Arion subfuscus s.l.*, utilisent aussi des métabolites secondaires pour repousser les prédateurs. Ces derniers en revanche s'adaptent et parviennent à contourner les défenses de leurs proies. Lorsqu'une espèce avec des défenses chimiques uniques est introduite dans un écosystème, elle pourrait se trouver avantagée par rapport aux espèces indigènes si les prédateurs locaux sont sensibles aux nouveaux mécanismes de défense chimiques, ce qui, par le fait même, pourrait expliquer son succès d'invasion.

Ce projet vise donc à identifier et à caractériser des métabolites secondaires propres au complexe *Arion subfuscus s.l.* et à déterminer si ces métabolites possèdent une fonction biologique dont une fonction anti-appétante qui permettrait de favoriser son succès d'invasion. Pour cela, les fonctions

biologiques potentielles de ces métabolites ont été comparées à celle des métabolites secondaires identifiés chez un genre de limace indigène au Québec, *Philomycus spp.*

1.2. État des connaissances

1.2.1. Introduction des espèces exotiques

Les espèces exotiques sont des espèces qui sont déplacées en dehors de leur aire de répartition écologique naturelle, généralement à la suite de l'action humaine (Sundseth *et al.*, 2014). Quand une espèce exotique entre dans un système où il existe une autre espèce qui partage le même niveau trophique et qui utilise des ressources similaires, la concurrence tend à être plus importante entre l'espèce exotique et l'espèce indigène qu'entre les individus de l'espèce indigène (Schoener, 1983). Si la concurrence est asymétrique et favorise l'espèce exotique, l'espèce indigène peut connaître un déclin de population et/ou un déplacement de son habitat (Holway, 1999; Krasso *et al.*, 2008; Shucksmith *et al.*, 2009). Par exemple, les populations d'*Arion rufus*, une espèce de limace indigène en Suisse, sont en déclin alors que cette espèce est envahissante aux États-Unis (Ross *et al.*, 2010). La concurrence est très forte entre des gastropodes terrestres, car elles partagent de nombreuses ressources (Paustian et Barbosa, 2012). Le succès d'*A. rufus* hors de son aire de répartition indigène pourrait être lié à la dissémination de nématodes parasites, comme cela a été démontré pour plusieurs espèces du genre *Arion* (Ross *et al.*, 2010).

1.2.2. Des limaces introduites et indigènes au Canada

Les limaces introduites se trouvent à des densités élevées dans les écosystèmes perturbés de l'est de l'Amérique du Nord (Chichester et Getz, 1973; McCracken et Selander, 1980; Robinson, 1999). *Arion subfuscus s.l* est une limace de la famille Arionidae eurasienne qui a été introduite pour la première fois en Amérique du Nord il y a plus de 150 ans (Chichester, L. F. et Getz, 1969). Ces limaces existent en étroite habitation avec les limaces indigènes du genre *Philomycus* (Paustian et Barbosa, 2012), originaires de l'est de l'Amérique du Nord (Hubricht, 1985).

Genre *Philomycus*

Le genre *Philomycus* est bien représenté en Amérique du Nord par *Philomycus carolinianus* (Bosc, 1902), également connu sous le nom de limace à manteau de la Caroline (Carolina mantleslug)

(White-Mclean et Capinera, 2014). *P. carolinianus* est une espèce résistante qui est parvenue à coloniser avec succès une grande partie de l'Amérique du Nord (White-Mclean et Capinera, 2014). Une autre espèce qui se trouve en Amérique du Nord est *Philomycus flexuolaris*. Les deux espèces se trouvent généralement sous les écorces mortes partiellement décomposées des forêts humides (Keller et Snell, 2002). La plupart des espèces de *Philomycus* sont généralistes et se nourrissent d'un large spectre de tissus végétaux dans la nature, tels que les feuilles vertes de plantes vivantes, les lichens, les champignons, la végétation en décomposition et même la charogne (Keller et Snell, 2002). Pendant le jour, les *Philomycus* sont parfois observées le long d'arbres matures, à des hauteurs jusqu'à 14 m, en train de se promener sans but précis (Keller et Snell, 2002). Étant donné que les limaces du genre *Philomycus* sont nocturnes comme la majorité des autres espèces de limaces, les observations diurnes sont plutôt rares bien que plus probables les jours humides et nuageux (White-Mclean et Capinera, 2014). Les membres de ce genre ne sont pas agressifs les uns envers les autres. Elles produisent de grandes quantités de mucus même lorsqu'elles ne sont pas dérangées (White-Mclean et Capinera, 2014).

Genre *Arion*

A. subfuscus s. l. a été signalé pour la première fois en 1842 à Boston, aux États-Unis (Pilsbry, 1939). Elle a colonisé progressivement la majeure partie du nord-est de l'Amérique du Nord. Elle se trouve maintenant dans des habitats naturels et anthropiques (Chichester et Getz, 1973; Chichester, L. F. et Getz, 1969). Parfois, cette espèce est plus abondante que les espèces indigènes (Ferguson, 2004; Mazaleyrat *et al.*, 2023).

Traditionnellement, les espèces d'*Arion* ont été identifiées grâce à leur pigmentation corporelle et la structure de leur système de reproduction (Grimm *et al.*, 2009). Cependant, ces caractéristiques portent à confusion, car la couleur peut être influencée par l'environnement (Jordaens *et al.*, 1999), tandis que la structure du système génital peut être polymorphe (Jordaens *et al.*, 2002). Pour éviter la confusion, des techniques moléculaires sont utilisées pour déterminer la taxonomie des Arionidae (Backeljau, Thierry *et al.*, 1996; Backeljau, T. et Winter, 1987; Backeljau, Thierry *et al.*, 1994; Noble et Jones, 1996)

Arion subfuscus s.l consomme divers aliments comme des plantes mortes et sénescents, des algues, des animaux morts, les fèces d'autres animaux, des champignons (Beyer et Saari, 1978;

Chichester et Getz, 1973; Graham, 1955; Jennings et Barkham, 1975a) et même des champignons vénéneux (Kozłowski, 2009). Cette limace est aussi connue pour endommager certains produits d'agriculture (Glen, 2002; Hammond, 2002; Hommay, 2002).

Arion subfuscus s.l est un genre de limace combatif. Les agressions intraspécifiques sont très violentes, puisque les combattants peuvent perdre leur pigmentation (Rollo et Wellington, 1979).

1.2.3. Alimentation

Les limaces sont parmi les principaux consommateurs de plantes dans les écosystèmes terrestres (Buschmann *et al.*, 2005; Hulme, 1996). Les gastéropodes terrestres utilisent leur organe olfactif pour chercher de la nourriture et choisir un habitat (Chase et Croll, 1981; Gelperin, 1974; Zaitseva, 1999). Leur système olfactif est bien développé et joue un rôle important pour découvrir de la nourriture, détecter des phéromones ou évaluer les risques liés aux prédateurs (Chase et Tolloczko, 1989; Gelperin, 2006; Gervais *et al.*, 1996; Matsuo *et al.*, 2010; Matsuo *et al.*, 2011; Nikitin, 2008). Les capacités olfactives sont tellement importantes pour les gastropodes terrestres qu'ils ont développé la capacité de régénérer un tentacule endommagé (Kiss, 2017). Cependant, on ne sait pas si les limaces ont des capacités gustatives.

1.2.4. Auto défense

L'écologie chimique étudie le rôle des composés chimiques, particulièrement des métabolites secondaires, dans les interactions entre les plantes et les animaux (Pickett *et al.*, 1997). Ces produits naturels sont importants dans les interactions entre les organismes, qu'elles soient intraspécifiques, interspécifiques ou avec l'environnement (Avila, 2006). L'un des objectifs de l'écologie chimique est de déterminer la fonction et les mécanismes des produits naturels dans la structuration des communautés (Zimmer et Butman, 2000).

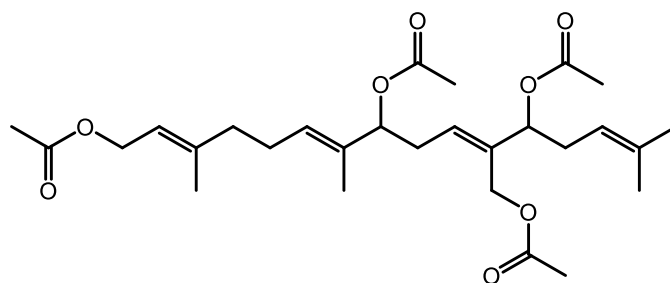
Certains composés chimiques produits par les organismes servent à se protéger contre les prédateurs, les compétiteurs et les organismes pathogènes. Pour comprendre la fonction de ces métabolites secondaires, il faut d'abord les isoler puis déterminer leur structure chimique grâce à différentes techniques de chimie analytique. Quant à leurs rôles au niveau des interactions entre les individus, ils peuvent être identifiés par des observations éthologiques (Derby et Aggio, 2011).

Selon certains chimistes, la survie des organismes dépourvus de moyen de défenses mécaniques et se déplaçant relativement lentement pourrait s'expliquer par des défenses chimiques. Cette idée est confirmée par la découverte de nombreux métabolites secondaires chez les lièvres de mer (Anaspidea) (Kamiya *et al.*, 2006). De ce point de vue, les gastéropodes dépourvus de coquille constituent un excellent choix pour découvrir des produits chimiques défensifs (Avila, 2006). Les métabolites secondaires sont incorporés dans la peau ou d'autres tissus de l'organisme, mais certains d'entre eux sont excrétés lors de l'attaque d'un prédateur. Il existe de nombreux exemples de composés de défense au sein des gastéropodes. Les défenses chimiques des opisthobranches ont été particulièrement bien étudiées à cet égard (Miyamoto, 2006). C'est d'ailleurs à partir de cette classe que la majorité des métabolites secondaires connus chez les gastéropodes ont été identifiés. Ces produits chimiques les rendent toxiques ou extrêmement désagréables pour les prédateurs potentiels (Wahidullah *et al.*, 2006).

Un mucus blanc adhésif est produit par certains pulmonaires sans coquille comme les espèces marines d'*Onchidella* et la limace terrestre *Deroceras reticulatum* (Mair et Port, 2002; Pakarinen, Elisabet, 1994; Pinchuck et Hodgson, 2010). Le mucus produit lors d'une attaque agit comme une barrière protectrice qui réduit la capacité de certains prédateurs à les consommer (Gould *et al.*, 2019). Lorsque l'animal est au repos, le mucus est un gel clair ayant une faible viscosité, mais quand il est stressé, le mucus devient très visqueux et adhésif (Campion, 1961; Pakarinen, E., 1992; Rollo et Wellington, 1979). Cela suggère que l'attaque d'un prédateur modifie la composition chimique du mucus sécrété (O' Hanlon *et al.*, 2019). Par exemple, il a été démontré que des cellules de l'épithélium dorsal d'*Ariolimax columbianus*, d'*Arion subfuscus s.l* et de *Deroceras reticulatum* sécrètent un mucus adhésif défensif à la suite d'une agression (Deyrup-Olsen *et al.*, 1983; Mair et Port, 2002; Martin et Deyrup-Olsen, 1986; Wilks *et al.*, 2015). Les limaces appartenant à la même colonie détectent le mucus de défense qui agit alors comme un signal d'alarme pour les autres individus (Rollo et Wellington, 1977). La phéromone d'alarme est aussi présente chez la limace *Lehmannia ualentianu* (Landauer et Chapnick, 1981). Ainsi, les limaces communiquent des informations cruciales grâce à leurs traînées de mucus (Rollo et Wellington, 1979). Les interactions interspécifiques entre les limaces peuvent également entraîner la libération d'une quantité importante de mucus par l'animal blessé. Ce type de mucus est très répulsif pour les autres limaces (Rollo et Wellington, 1979).

Les limaces doivent non seulement se défendre contre les prédateurs, mais elles doivent protéger leurs œufs contre la prédation pour une reproduction efficace. Pour ce faire, certaines limaces utilisent une défense chimique. L'*Arion sp.* pond ses œufs en grappe dans le sol. Ces œufs sont mous et mucilagineux comme pour les autres genres de limaces. Les œufs d'*Arion sp.* sont enduits d'un diterpène nommé miriamine (Schroeder *et al.*, 1999) (Figure 1). Lors d'une expérience avec la coccinelle *Harmonia axyridis*, la propriété anti-appétante du miriamine a pu être démontrée (Schroeder *et al.*, 1999). La concentration du miriamine dans le corps des *Arion* matures est inférieure à celle des œufs, tandis que chez les limaces immatures, il est indétectable. La production de miriamine est donc liée à la production des œufs (Schroeder *et al.*, 1999).

Figure 1 : Structure du miriamine.



Comme mentionné ci-haut, les limaces peuvent détecter des phéromones, reconnaître les traînées de mucus et les suivre. De plus, la composition chimique de mucus change après une attaque par un prédateur. Dans la majorité de ces exemples, les métabolites secondaires produits par les limaces et leurs activités biologiques restent inconnus. Le miriamine est le seul métabolite secondaire isolé des œufs de limace pour lesquels une activité anti-appétante a été démontrée.

1.3. Objectif et hypothèse de recherche

L'objectif de la présente étude était de déterminer la ou les fonctions biologiques des métabolites secondaires propres au genre *Philomycus spp.* (espèces indigènes) et au complexe *Arion subfuscus s.l.* (espèces introduites envahissantes) et étudier la composition chimique de ces métabolites. Nous avons émis comme hypothèse que les métabolites secondaires extractibles des limaces du genre *Philomycus* et d'*Arion subfuscus s.l.* ont une activité anti-appétante, agissant ainsi comme système de défense contre les prédateurs. Une autre hypothèse serait que les limaces du genre *Philomycus* et d'*Arion subfuscus s.l.* produisent des métabolites secondaires qui attirent d'autres individus de

la même espèce pour diverses raisons, probablement dans le but de se nourrir sur la ressource trouvée par un autre individu ou de trouver un partenaire de reproduction. De plus, *Arion subfuscus s.l.* étant un complexe d'espèces introduites ayant un très bon succès d'invasion dans l'est du Canada (L'Heureux et Angers, 2018), la fonction biologique des métabolites secondaires devrait être tout aussi efficace, voire plus efficace, chez ce complexe d'espèces que pour des espèces indigènes telles que celles du genre *Philomycus*, afin d'assurer un bon succès de reproduction et/ou un faible risque de prédation.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. Matériel biologique et échantillonnage

Des limaces des genres *Philomycus* (indigène) et du complexe d'*Arion subfuscus s.l.* (envahissante) ont été capturées sur deux sites forestiers, l'un aux abords du lac Gagnon (46°05'43" N 75°08'45" O) et l'autre dans la municipalité de l'Ange-Gardien (45°37'51" N 75°22'06" O). Les deux sites sont dominés par les arbres feuillus tels que les érables (*Acer saccharum* Marsh, *Acer pennsylvanicum*), le bouleau jaune (*Betula alleghaniensis* Britton), le hêtre américain (*Fagus grandifolia* Ehrh.), ainsi que la pruche du Canada (*Tsuga canadensis*) (MFFP, 2002); (Nolet *et al.*, 2015). La précipitation moyenne annuelle (1981-2010) est 1091 mm au site de Gagnon et 1007 mm au site d'Ange-Gardien et la température moyenne annuelle (1981-2010) est 4,5°C et 5,1°C au site de Gagnon et au site d'Ange-Gardien respectivement (Environnement Canada, 2020). La récolte manuelle des limaces s'est faite en explorant les arbres vivants debout et ceux tombés au sol et en état de décomposition avancée, c.-à-d. des attributs de l'habitat connus pour favoriser la présence des genres de limaces à l'étude (L'Heureux et Angers, 2018). Pour maximiser le taux de capture, les journées qui succèdent à une période pluvieuse ont été privilégiées. Lorsque capturées, les limaces ont été rassemblées par espèce et par date de sortie dans un pot en plastique, puis emmenées au laboratoire de l'institut des sciences de la forêt tempérée (ISFORT). Chaque genre a été identifiée selon ses caractères morphologiques externes (Grimm *et al.*, 2009). Les spécimens ont été euthanasiés par congélation et conservés à -20 °C (He *et al.*, 2014)

2.2. Préparation des échantillons et extraction

Les limaces d'un genre récolté lors d'une expédition d'une seule journée ont été combinées en un seul lot, et conservées à -20 °C pour éviter la dégradation de leurs métabolites secondaires. Chaque lot a été extrait indépendamment. Pour ce faire, un lot a été décongelé puis séparé en deux portions de masses à peu près égales. Une première moitié a été broyée par une lame de scalpel puis extraite par macération dans le méthanol, pendant 24 h, à la température de la pièce et avec agitation (appelé « extrait complet » par la suite). L'autre moitié a été extraite de la même manière, mais les limaces n'étaient pas broyées, afin d'extraire seulement les métabolites à la surface de l'animal et dans son mucus pendant 20 minutes (appelé « extraits de surface » par la suite). Les suspensions ont ensuite été filtrées sur papier-filtre Whatmann #4, puis le solvant a été évaporé sous pression réduite. La

masse des métabolites a été mesurée afin de calculer le rendement, par rapport à la masse totale de limaces extraites (masse humide). La quantité requise de chaque type d'extrait (surface et complet) a été divisée en deux portions : l'une portion pour tester les activités biologiques, et une autre pour réaliser les analyses chimiques.

2.3. Activités biologiques

Les activités anti-appétante et phéromonale des extraits de limace ont été testées sur le terrain et en laboratoire respectivement. Afin de réaliser les tests d'activités biologiques, tous les lots d'extrait de limaces capturées lors des différentes journées de récoltes ont été combinés par genre (*Philomycus* vs *Arion*) et par type d'extrait (complet vs de surface).

2.3.1. Activité anti-appétante de l'extrait de limaces – expériences de terrain

Préparation de la nourriture - Des vers de terre de culture, destinés à la pêche sportive, ont été utilisés comme substrat de base pour la nourriture. D'abord, les vers de terre ont été lavés avec de l'eau de source (non chlorée). Ensuite, les vers de terre ont été broyés dans un mélangeur de cuisine (Vitamax) jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène. Pour rendre la préparation plus pâteuse, les vers de terre broyés ont été mélangés à de la farine de blé tout usage (Marque « Sans Nom ») dans un rapport vers de terre/farine 2:3. Une partie de la pâte obtenue a été mise de côté pour le contrôle (sans extrait de limace). Les extraits ont été incorporés à la pâte en quantité suffisante pour correspondre à la concentration naturelle d'une limace (Tableau 1). Les préparations ainsi obtenues ont été façonnées en boulette d'environ 0.5 g, puis 3 de ces boulettes ont été offertes en tant que nourriture à la microfaune vivant sur le sol forestier (par exemple invertébrés et petits mammifères) en les plaçant sur le sol forestier dans un couvercle de plastique rouge de 12 cm de diamètre. Les boulettes ont été préparées la veille de l'expérience et congelées afin qu'elles ne se dégradent pas entre le moment de leur préparation et lorsqu'elles ont été disposées sur le terrain.

Tableau 1. Quantités d'extraits pour la préparation de la nourriture du test anti-appétant.

Espèce	Type d'extrait	Masse d'extrait obtenue (mg/g limace)	Masse d'extrait pour 25 g de nourriture (mg)	
			Calculée	Mesurée
<i>Arion subfuscus s.l.</i>	Surface	10,3	258	259
<i>Arion subfuscus s.l.</i>	Complet	28,3	707	698
<i>Philomycus sp.</i>	Surface	7,7	193	195
<i>Philomycus sp.</i>	Complet	25,9	648	653

Expérience en milieu forestier - Pour réaliser le test anti-appétant, quinze sites forestiers distants d'au moins 150 mètres ont été sélectionnés aléatoirement dans la forêt adjacente au lac Gagnon (Figure 2). À chaque site, deux supports en plastique rouge (diamètre =12 cm), l'un contenant trois boulettes (1.5 g au total) de pâte de vers de terre sans extrait (contrôle) et l'autre contenant 3 boulettes de pâte de vers de terre avec des extraits (test), ont été posés côte à côte sur le sol, proche de troncs en état de décomposition afin de favoriser la présence de prédateurs (p.ex., invertébrés et petits mammifères) (Figure 3).

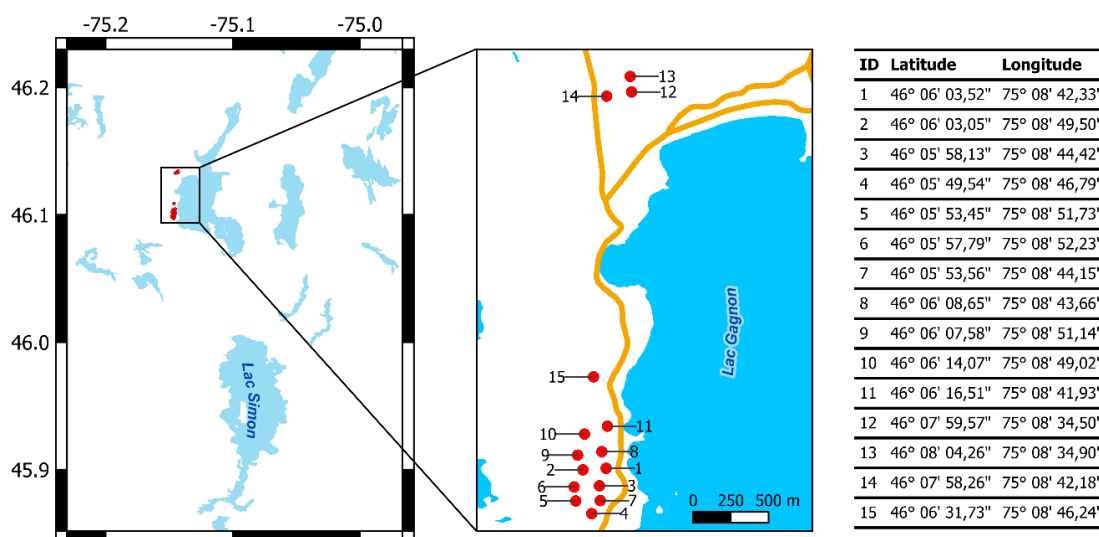
Figure 2 : Carte et coordonnées GPS des sites d'expérimentation pour le test d'activité anti-appétante.

Figure 3 : Photos représentant le dispositif expérimental pour l'étude de l'activité anti-appétante (photo A) et l'exemple d'une photo montrant un petit mammifère en train de s'alimenter sur de la pâte de vers de terre (photo B).

A :



B :



Les deux types d'extraits (complet et de surface) de *Philomycus* et d'*Arion* (c.-à-d. un total de 4 traitements différents : extrait complet *Arion* vs contrôle; extrait de surface *Arion* vs contrôle;

extrait complet *Philomyces* vs contrôle; extrait de surface *Philomyces* vs contrôle) ont été testés à chaque site, durant 4 jours consécutifs (une paire de supports en plastique contenant un contrôle et un type d'extrait par jour). L'ordre dans lequel les extraits ont été testés a été choisi de manière aléatoire. Ainsi, le nombre de répétitions pour chaque extrait était de 15 (pour un total de 60 expériences; 15 sites \times 4 paires de supports en plastique). Une caméra à infrarouge (Modèle Reconyx, PC900) a été disposée à l'aide de deux bâtons en bois à 1,4 m au-dessus des couvercles afin d'être en mesure de les photographier sur une même image (Figure 3). La fréquence des photographies était d'une photo par minute. En plus, en cas de mouvements d'un animal à sang chaud (oiseaux, écureuils, rats laveurs, petits mammifères) dans le champ de vision de la caméra, cette dernière se déclenchait automatiquement et prenait des séries de 3 photos additionnelles à chaque mouvement détecté par la caméra. Chaque expérience a commencé le matin de chaque jour d'expérience et a duré environ 24 h, c.-à-d. jusqu'au lendemain matin.

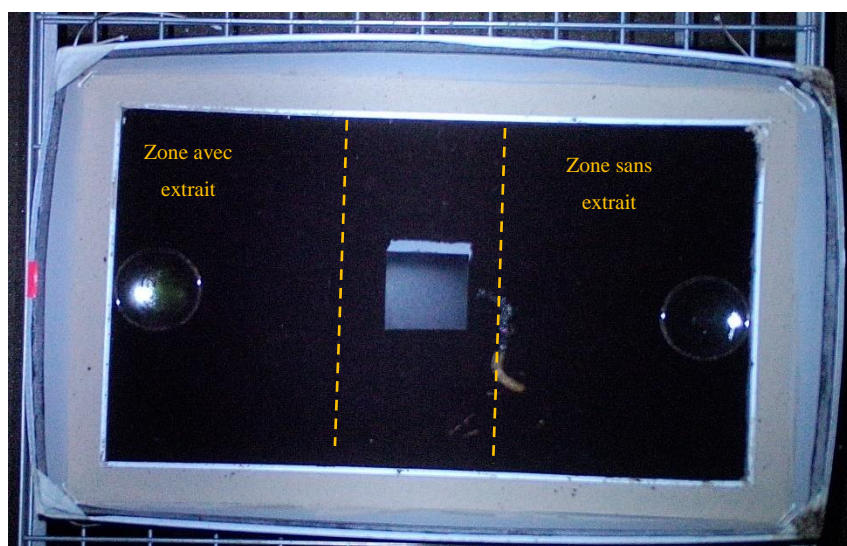
Le nombre de prédateurs dans chaque support en plastique a été estimé sur chaque photo (environ 62800 photos examinées) en considérant seulement les individus ayant au moins la moitié du corps (incluant la tête) localisé dans le support en plastique. Le nombre total d'individus par couvercle a ensuite été calculé en faisant la somme de tous les individus décomptés à travers les photos, pour les groupes de prédateurs suivants : arachnides, chenilles, petits coléoptères (inférieur à 3 mm), grands coléoptères (supérieur à 3 mm), écureuils, escargots, limaces, petits mammifères, rats laveurs, salamandres, sauterelles et oiseaux. Ce décompte a été réalisé tant qu'il y avait de la pâte de vers de terre dans les deux supports en plastique, afin de s'assurer que les prédateurs avaient le choix de s'alimenter sur l'un ou l'autre des supports en plastique. Le décompte des prédateurs a pris fin lorsqu'un des deux supports en plastique ne contenait plus de pâte de vers de terre.

2.3.2. Activité phéromonale de l'extrait de limaces – expériences de laboratoire

La détermination de l'activité phéromonale a été réalisée dans un laboratoire de l'ISFORT. À cet effet, les limaces de chaque genre ont été récoltées le jour même de l'expérience et au site déjà mentionné (lac Gagnon). L'échantillonnage a eu lieu le matin de chaque jour où ont débuté les expériences. Les limaces ont été capturées et transportées individuellement jusqu'au laboratoire dans des boîtes en plastique percées dans lequel un petit morceau de feuille de laitue avait été disposé pour minimiser le stress des limaces (Mazaleyrat, Lorenzetti et Dupuch, 2022). Les limaces ont été gardées dans les boîtes jusqu'au début de l'expérience vers 18h00.

Les expériences se sont déroulées dans huit bacs en plastique d'une dimension intérieure de 50 cm × 33 cm × 15 cm. Au fond de chaque bac, de la terre noire humide a été disposée sur une épaisseur de 3 cm. Entre la terre noire et la paroi du bac, il y avait un cadre à largeur de 2 cm qui a été rempli de cendres pour éloigner la limace de la paroi et éviter que celle-ci ne s'échappe du bac. Un deuxième système « anti-fuite » a été mis en place en disposant un ruban collant à double face couvert de sel (c.-à-d., une substance très irritante pour la peau des limaces) fixé sur la surface interne des parois verticales de chaque bac. Un morceau de plastique noir (6 × 6 cm) a été placé au centre du bac, sur la terre noire, afin de servir d'abri pour la limace (Mazaleyrat, Lorenzetti et Dupuch, 2022) (Figure 4).

Figure 4 : Photo représentant le bac expérimental avec les trois zones utilisées pour les expériences dédiées à l'étude de l'activité phéromonale



Les bacs ont été placés sur des étagères métalliques. Une caméra (Wingscape) a été disposée au-dessus de chaque bac à une distance de 120 cm. De cette manière, toute la surface du bac était visible sur une même image (Figure 4).

Une solution d'extraits mélangée à du méthanol correspondant à la concentration naturellement rencontrée chez une limace a été déposée directement sur un verre de montre de 6 cm de diamètre (test) tandis qu'un autre verre de montre a reçu seulement du méthanol (contrôle). Le solvant sur chaque verre de montre a été séché à l'air libre avant les expériences. Les deux verres de montre (contrôle vs test) ont été disposés sur le sol aux deux extrémités du bac (distance d'environ 40 cm;

Figure 4). L'orientation des bacs sur les étagères (nord-sud vs est-ouest) ainsi que la position relative des verres de montre (test vs contrôle) ont été déterminées aléatoirement.

Les expériences ont commencé vers 18-18h30 en plaçant au centre du bac une limace de la même espèce que l'extrait, en dessous de l'abri. Les expériences ont duré toute la nuit (période où les limaces sont les plus actives) et pris fin le lendemain matin vers 11h30. La photopériode naturelle a été respectée, c'est-à-dire que la période de noirceur dans le laboratoire était de 21h00 jusqu'à 5h00 le lendemain matin. La caméra a été programmée pour prendre une image toutes les minutes.

De manière similaire à l'activité anti-appétante, quatre paires d'extraits ont été testées avec 16 répétitions pour chaque extrait (pour un total de 64 expériences). L'espace de chaque bac a été divisé en trois zones de taille équivalente : la zone où se trouve le verre de montre du contrôle, la zone contenant le verre de montre avec l'extrait, puis la zone centrale du bac (Figure 4). Pour chaque essai, deux métriques ont été calculées afin d'estimer l'effet phéromonal de l'extrait. La première métrique est le temps en minutes (c.-à-d. le nombre de photos) que chaque individu a passé dans la zone contenant de l'extrait ou de celle n'en contenant pas. Pour cela, seules les expériences où les limaces ont été actives pendant plus de 60 minutes sur la durée totale de l'expérience ont été retenues (60 expériences sur les 64). La seconde métrique est le temps qu'une limace a passé en contact avec l'extrait ou avec le contrôle, c.-à-d., lorsqu'une limace se trouve sur l'un des verres de montre correspondant. Le nombre de fois qu'une limace était en contact avec l'extrait ou le contrôle étant peu élevé et non observé pour environ la moitié des verres de montre, la présence ou l'absence de contact pour chaque verre de montre a été estimée plutôt que le temps de contact avec l'extrait ou le contrôle. Après chaque expérience, la terre a été enlevée, et le bac nettoyé avec de l'eau de Javel puis rincé avec de l'eau de source afin d'éliminer toute trace du passage des limaces de l'expérience précédente.

2.4. Analyses des compositions chimiques

Avant de réaliser les analyses chromatographiques (LC-MS/MS), les aliquotes d'extrait de chaque lot ont été fractionnées par séparation liquide-liquide.

2.4.1. Séparation liquide-liquide

Pour ce faire, entre 20 et 25 mg de l'extrait de chaque lot de limaces ont été dissous dans 1 mL d'une solution MeOH/H₂O (9:1). De l'hexane (1 mL) a ensuite été ajouté à cette solution. Ce mélange a été vigoureusement agité puis centrifugé pour séparer les deux phases. La phase supérieure, riche en hexane et en composés non-polaires, a été récupérée puis la phase hydroalcoolique a été extraite deux autres fois avec de l'hexane. Le ratio MeOH: H₂O 9:1 a été modifié à 3:2 en ajoutant de l'eau, puis 1 mL de CHCl₃ a été ajouté à cette solution. Ce mélange a été vigoureusement agité, puis les deux phases ont été séparées par centrifugation. La phase chloroforme a été mise de côté, puis la phase hydroalcoolique a été extraite deux autres fois avec du chloroforme. À la fin, les trois phases, soit hexane, CHCl₃, et MeOH/H₂O, ont été évaporées sous vide.

2.4.2. Chromatographie et spectrométrie de masse

Les fractions ont été analysées à l'aide d'un chromatographe liquide (Vanquish, ThermoFisher) couplé à un spectromètre de masse en tandem (Q Exactive, ThermoFisher). En plus du MS, l'appareil était muni de deux autres détecteurs : un spectrophotomètre UV ainsi qu'un système à aérosol chargé (CAD). Ce dernier génère des signaux qui sont proportionnels à la concentration massique du métabolite. Grâce à un diviseur, environ 10% de l'éluant est dirigé vers le MS, tandis que le reste passe par le détecteur UV puis par le CAD. Les séparations ont été réalisées sur une colonne HPLC en phase inverse C18 (100 mm × 4,6 mm, 3 µm, Hypersil GOLD Thermo Scientific) en utilisant une combinaison d'eau et d'acétonitrile acidifiés avec de l'acide formique à une concentration finale de 0,1 % (v/v). Un mode d'élution par gradient a été effectué avec un débit de 1 mL/min et une programmation débutant à 15 %B pendant 2 min, suivi d'une augmentation jusqu'à 95 %B pendant 30 min, et se terminant par un plateau à 95 %B pendant 16 min. Tous les solvants ont été acidifiés avec l'acide formique (0,1 %).

Le spectromètre de masse est un système muni d'un quadrupôle et d'une trappe orbitale capable de très haute résolution (jusqu'à 140 000). La source d'ionisation est du type électronébuliseur. Tous les paramètres de l'analyse (solvants et débit d'élution, débit et température des gaz, ainsi que le potentiel électrique pour l'électronébuliseur, les modes d'acquisition des données de masse,

etc.) ont été optimisés en utilisant un échantillon total, obtenu en combinant une petite portion de chaque lot d'extrait complet de chaque espèce de limaces (Tableau 2).

Tableau 2. Paramètres optimisés de spectromètre de masse.

Source électronébuliseur		Paramètres de balayage	
Débit de gaz	35	Type de balayage	MS complet
Débit de gaz auxiliaire	10	Gamme de balayage	150 – 2000 m/z
Débit de gaz de balayage	0	Fragmentation	Non
Tension de nébulisation	3 kV	Résolution (FWHM à m/z 200)	70 000
Température de capillaire	275 °C	Polarité	Positif
Niveau de S-lens RF	50 %	Microbalayage	1
		Blocage de masses	Éteindre
		Cible de contrôle automatique de gain	3×10^6
		Temps d'injection maximale	200 msec

Lorsque tous les paramètres de la méthode ont été optimisés, tous les échantillons, les fractions de chaque type d'extrait, ont été injectés séparément 2 fois chacun : deux modes d'analyse des ions (balayage complet et fragmentation sélective) ont été déployés pour chaque échantillon. Dans le mode « balayage complet », tous les ions en provenance de la source seront analysés directement par la trappe orbitale pour mesurer leur ratio m/z. Ce mode d'acquisition permet de déduire la masse moléculaire et la formule moléculaire des différents métabolites de l'échantillon. Lors du mode « fragmentation sélective », des ions d'une masse choisie ont été envoyés dans une chambre de fragmentation pour briser les molécules en fragment de plus petite masse. Le choix des masses retenues a été fait en temps réel par l'appareil qui est programmé pour retenir les ions les plus abondants du moment. Les spectres de masse obtenus permettent d'établir des caractéristiques structurales des molécules analysées et d'en déduire leur degré de similitude. Comme les deux modes d'ionisation (positif, ou négatif) ont eu des résultats semblables, nous avons ignoré des analyses de mode ionisation négatif.

2.4.3. Réseautage moléculaire et identification des molécules

Tous les extraits ont été analysés par LC-MS/MS, en utilisant une colonne en phase inverse (C18) pour la chromatographie, et un mode d'acquisition dépendant des données (ou « Data Dependent

Acquisition ») pour la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Les données brutes ont ensuite été téléversées sur le site « Global Natural Products Social Molecular Networking », ou GNPS (Wang *et al.*, 2016). Ces données sont en format .raw. Comme GNPS supporte le format .mzXML et .mzML, les données ont été converties (Wang *et al.*, 2016) en format mzML par l'application MSConvert de ProteoWizard (Chambers *et al.*, 2012) Ensuite, ces données converties ont été téléchargées sur le site de GNPS par l'application WinSCP. Dans la page de *Molecular Networking Parameter Presets*, les données ont été divisées en trois groupes. Le groupe 1 contient le blanc et le témoin, le groupe 2 inclut les extraits d'*Arion* et le troisième groupe, les extraits de *Philomycus*. La page de *Network Visualizations* section *View Spectral Families (In Browser Network Visualizer)*, a permis de visualiser et d'interpréter les résultats (GNPS, 2023).

2.5. Analyses statistiques

2.5.1. Activité anti-appétante

Afin de tester l'activité anti-appétante de l'extrait, le nombre total de prédateurs a été comparé entre le support en plastique contenant de l'extrait et celui n'en contenant pas (variable binaire *Présence d'extrait* codée « 0 » en absence d'extrait et « 1 » en présence d'extrait) à l'aide d'une régression mixte basée sur une distribution négative binomiale afin de prendre en compte la surdispersion des données de comptage. L'interaction entre les variables *Présence d'extrait* et *Genre* (variable binaire codée « *Arion* » ou « *Philomycus* ») a également été incluse dans le modèle afin de vérifier si l'activité anti-appétante était similaire entre les deux genres. L'interaction entre les variables *Présence d'extrait* et *Type d'extrait* (variable binaire codée « Complet » ou « Surface ») a également été testée afin de vérifier si l'extrait issu du corps complet de la limace avait la même activité anti-appétante que l'extrait issu de la surface du corps. L'interaction triple a également été testée (*Présence d'extrait* x *Type d'extrait* x *Genre*). Celle-ci n'ayant pas d'effet significatif dans aucun des modèles réalisés, elle a été retirée des modèles par respect du principe de parcimonie. Chaque catégorie de prédateurs a été analysée séparément, ce qui a conduit à réaliser 5 modèles mixtes différents. En effet, seules les catégories limaces, petits mammifères, petits coléoptères, sauterelles et arachnides contenaient assez de données pour être analysées. La paire de couvercles ainsi que le numéro de la station ont été considérés en tant qu'effets aléatoires dans les modèles afin de prendre en compte la non-indépendance des données provenant des deux couvercles adjacents (effet aléatoire « paire ») et issus d'une même station (effet aléatoire

« station »). De plus, la durée totale en minutes de chaque expérience réalisée à chaque station a été incluse en tant que variable offset dans le modèle afin de contrôler pour des différences de durée d'expériences entre stations et jours d'échantillonnage. Les analyses ont été réalisées avec le logiciel R (version 4.2.3) et la fonction glmmTMB (Brooks *et al.*, 2017).

2.5.2. Activité phéromonale

Afin de tester l'activité phéromonale de l'extrait, le temps passé dans chaque zone et la présence/absence de contact avec l'extrait ou le contrôle ont été comparés entre le verre de montre contenant de l'extrait (zone avec l'extrait) et celui n'en contenant pas (variable binaire *Présence d'extrait* codée « 0 » en absence d'extrait et « 1 » en présence d'extrait) à l'aide d'une régression mixte basée sur une distribution négative binomiale afin de prendre en compte la surdispersion des données de comptage (temps passé dans chaque zone), et une distribution binomiale (présence/absence de contact) respectivement. L'interaction entre les variables *Présence d'extrait* et *Genre* (variable binaire codée « *Arion* » ou « *Philomycus* ») a également été incluse dans le modèle afin de vérifier si l'activité phéromonale était similaire entre les deux espèces. De plus, l'interaction entre les variables *Présence d'extrait* et *Type d'extrait* (variable binaire codée « Complet » ou « Surface ») a été testée afin de vérifier si l'extrait issu du corps complet de la limace avait la même activité phéromonale que l'extrait issu de la surface du corps. L'interaction triple a également été testée (*Présence d'extrait* × *Type d'extrait* × *Genre*). Le numéro de l'expérience (codée 1 à 64) a été considéré en tant qu'effet aléatoire dans les modèles afin de prendre en compte la non-indépendance des données provenant des paires de verres de montre contenues dans chaque expérience. De plus, la durée totale en minutes de chaque expérience réalisée a été incluse en tant que variable offset dans le modèle afin de contrôler pour des différences de durée d'expériences entre bacs et jours d'échantillonnage. Les analyses ont été réalisées avec le logiciel R (version 4.2.3) et la fonction glmmTMB (Brooks *et al.*, 2017).

RÉSULTATS

3.1. Activités biologiques

3.1.1. Activité anti-appétante

Parmi les cinq catégories de prédateurs, seules les limaces, les arachnides et les petits mammifères ont démontré une réponse à la présence d'extrait dans la pâte de vers de terre (Tableau 3).

Tableau 3 : Le nombre de visiteurs observés pour chaque genre (type d'extrait).

Visiteur	Type d'extrait	<i>Arion</i>		<i>Philomycus</i>	
		Absence d'extrait	Présence d'extrait	Absence d'extrait	Présence d'extrait
Limaces	Surface	1907	1271	2546	3558
	Complet	3229	2762	2810	2975
Arachnides	Surface	2409	2680	2489	1781
	Complet	2186	1892	3805	2564
Petits mammifères	Surface	14	4	27	23
	Complet	16	4	29	9
Petits coléoptères	Surface	1285	1145	1082	716
	Complet	1793	995	450	116
Sauterelles	Surface	1506	1730	1817	1605
	Complet	1073	993	1339	1805

En ce qui concerne les limaces qui ont visité les dispositifs expérimentaux (lesquelles étaient *Arion* dans ~99,9 % des cas), elles étaient plus abondantes sur les supports en plastique contenant de l'extrait que sur ceux n'en contenant pas, principalement dans le cas de l'extrait provenant de *Philomycus* (Figure 5; Tableau 4, effet significatif de l'interaction « *Genre* × *Présence extrait* »). L'inverse était observé pour les arachnides (ordre des opilions dans plus de 95 % des cas), qui étaient plus abondantes sur le support en plastique ne contenant pas d'extrait, principalement dans le cas de l'extrait provenant de *Philomycus* (Figure 6; Tableau 4, effet significatif de l'interaction « *Genre* × *Présence extrait* »). Quant aux petits mammifères (41 % campagnol à dos roux, 59 % souris, <1 % musaraigne), ils étaient plus abondants sur le support en plastique ne contenant pas d'extrait, et ce, quelle que soit le genre de limace dont provenait l'extrait (Figure 7; Tableau 4, effet significatif de *Présence extrait*). Cet effet était cependant moindre pour l'extrait provenant de la surface de la limace (Figure 7; Tableau 4, effet significatif de l'interaction « *Type extrait* × *Présence*

extrait »). Aucun effet de l'extrait n'a été trouvé pour les petits coléoptères et les sauterelles (Figures 8 et 9; Tableau 4).

Tableau 4 : Résultats des régressions mixtes pour chacune des catégories de prédateurs (activité anti-appétante). L'estimé et l'erreur standard (entre parenthèses) sont présentés pour chaque variable et interaction incluse dans le modèle. * $p < 0.05$. *** $p < 0.001$.

Variables	LIMACES	ARACHNIDES	SAUTERELLES	PETITS COLÉOPTÈRES	PETITS MAMMIFÈRES
Genre ^a	0,93(0,27) ***	0,08(0,25)	0,21(0,30)	-1,05(0,46)	1,62(0,48)
Type extrait ^b	-0,38(0,26)	-0,05(0,25)	0,28(0,29)	0,61(0,42)	0,54(0,44)
Présence extrait ^c	-0,56(0,29)	0,03(0,19)	0,12(0,36)	-0,36(0,43)	-1,81(0,48) ***
Présence d'extrait × Type extrait	-0,10(0,36)	0,05(0,22)	-0,17(0,41)	0,27(0,57)	0,84(0,40) *
Genre × Présence d'extrait	0,77(0,37) *	-0,48(0,22) *	0,08(0,41)	-0,62(0,59)	0,78(0,46)

(a) Genre de référence dans l'analyse : *Arion*; (b) Type d'extrait de référence dans l'analyse: extrait complet; (c) Traitement de référence dans l'analyse: extrait absent.

Figure 5 : Nombre de limaces par minute (multiplié par 100 pour faciliter la lecture des valeurs) sur les supports en plastique en fonction du type d'extrait et du genre de limace dont l'extrait est issu (*Arion* vs *Philomycus*).

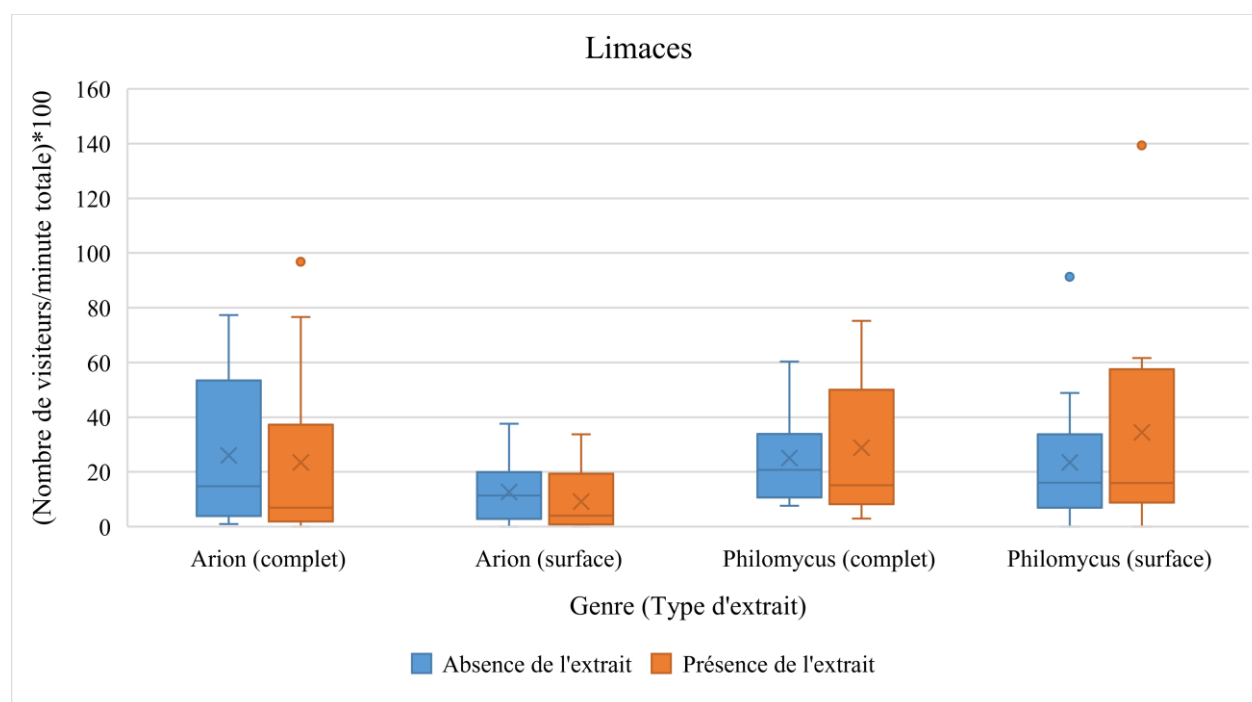


Figure 6 : Nombre d'araignées par minute (multiplié par 100 pour faciliter la lecture des valeurs) sur les supports en plastique en fonction du type d'extrait (complet ou de surface) et du genre de limace dont l'extrait est issu (*Arion* vs *Philomycus*).

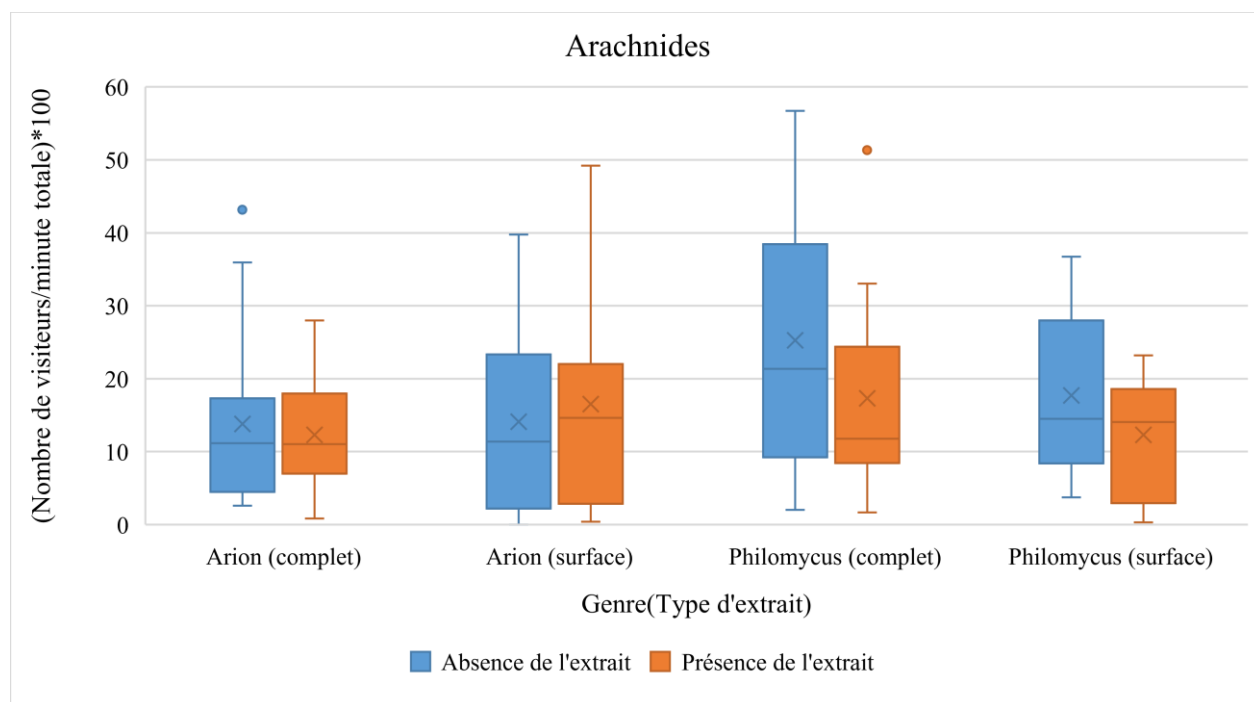


Figure 7 : Nombre de petits mammifères par minute (multiplié par 100 pour faciliter la lecture des valeurs) sur les supports en plastique en fonction du type d'extrait et du genre de limace dont l'extrait est issu (*Arion* vs *Philomycus*).

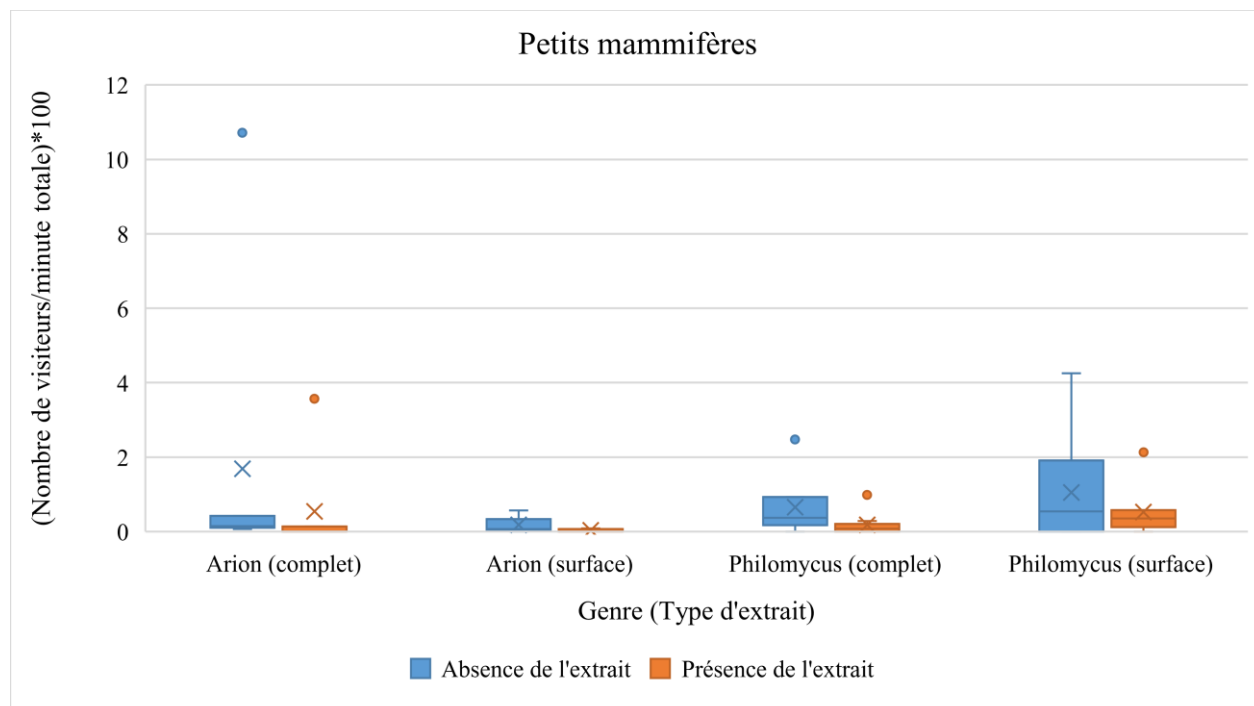


Figure 8 : Nombre de petits coléoptères par minute (multiplié par 100 pour faciliter la lecture des valeurs) sur les supports en plastique en fonction du type d'extrait et du genre de limace dont l'extrait est issu (*Arion* vs *Philomycus*).

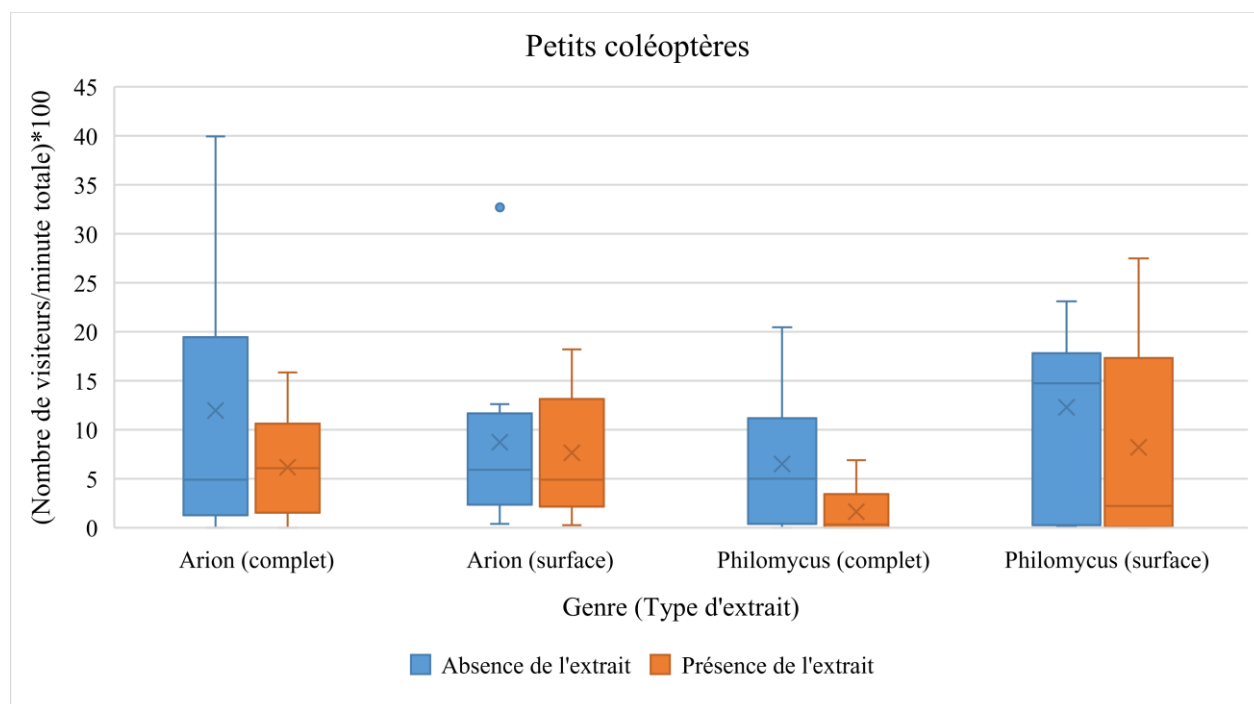
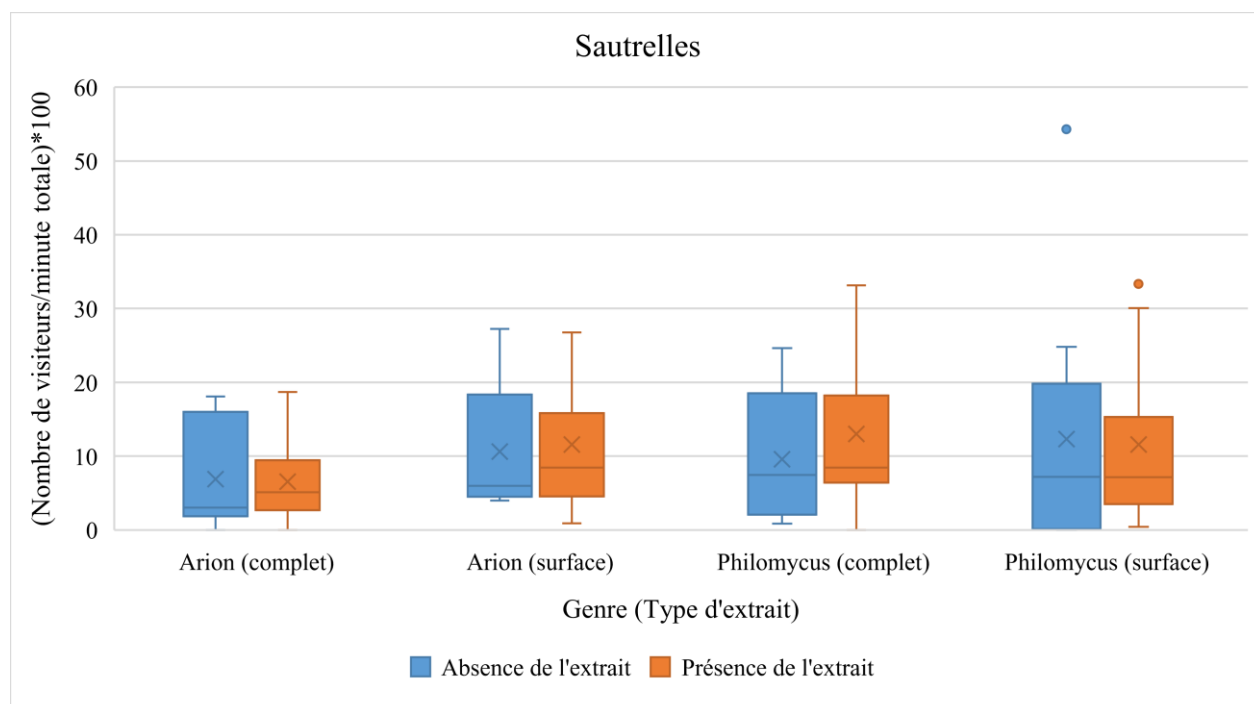


Figure 9 : Nombre de sauterelles par minute (multiplié par 100 pour faciliter la lecture des valeurs) sur les supports en plastique en fonction du type d'extrait et du genre de limace dont l'extrait est issu (*Arion* vs *Philomycus*).



3.1.2. Activité phéromonale

Aucune différence n'a été trouvée pour le temps passé à se déplacer dans la zone du bac expérimental contenant ou pas de l'extrait, que ce soit pour *Arion* ou *Philomycus* (Figure 10, Tableau 5). La probabilité de rentrer en contact avec l'extrait était cependant plus élevée pour *Arion* que *Philomycus* (Figure 11, Tableau 5, interaction *genre* × *zone* significative).

Tableau 5 : Résultats des régressions mixtes pour le temps passé en déplacement dans une zone du bac expérimental qui contenait ou pas de l'extrait et pour la présence/absence de contact d'une limace avec le verre de montre de l'extrait ou du contrôle. L'estimé et écart-type (entre parenthèses) sont présentés pour chaque variable et interaction incluse dans le modèle. * $p < 0.05$. *** $p < 0.001$.

Variables	TEMPS DANS LA ZONE	PRÉSENCE DE CONTACT
Genre ^a	0,001(0,34)	-1,55(0,93) *
Type extrait ^b	-0,18(0,33)	0,42(0,84)
Zone a/s extrait ^c	0,15(0,41)	-3,26(1,25) *
Zone x Type extrait	-0,14(0,47)	0,42(1,09)
Genre x Zone a/s extrait	-0,12(0,47)	3,03(1,29) *

(a) Genre de référence dans l'analyse : *Arion*; (b) Type d'extrait de référence dans l'analyse: extrait complet; (c) Traitement de référence dans l'analyse: zone sans extrait.

Figure 10 : Pourcentage moyen de temps passé à se déplacer (c.-à-d. le temps passé dans chaque zone divisé par la durée totale de l'expérience multiplié par 100) dans chaque zone du bac d'expérimentation en fonction du type d'extrait et du genre de limace.

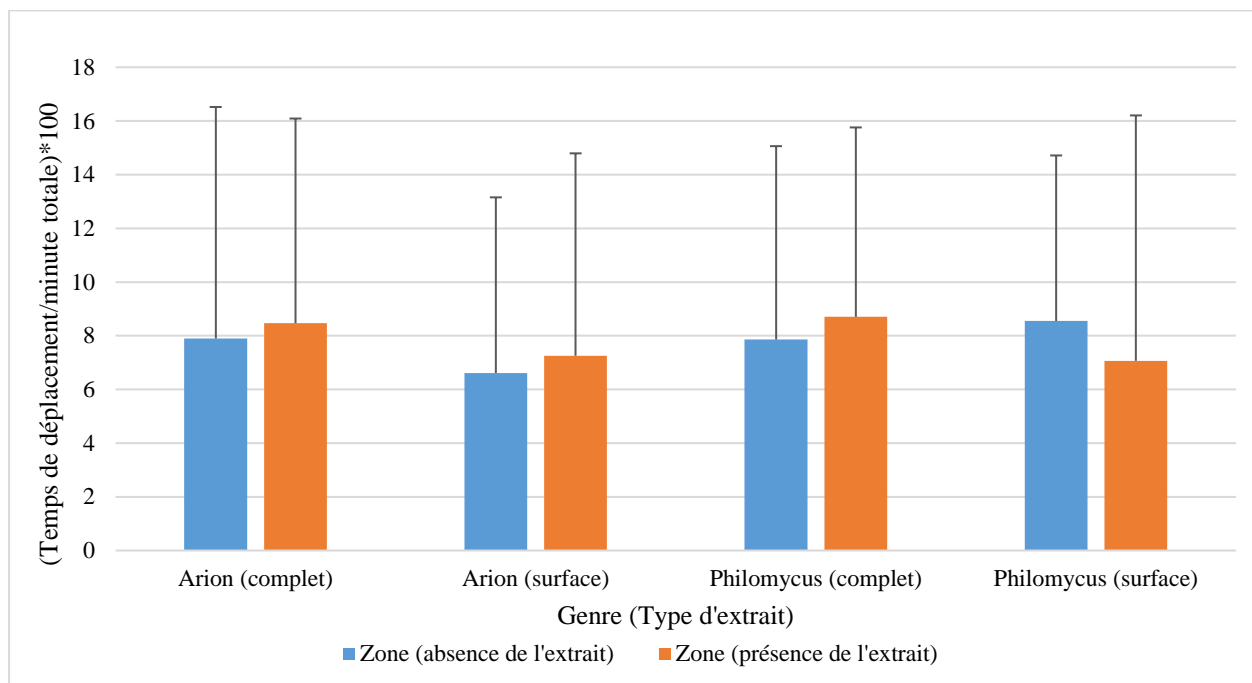
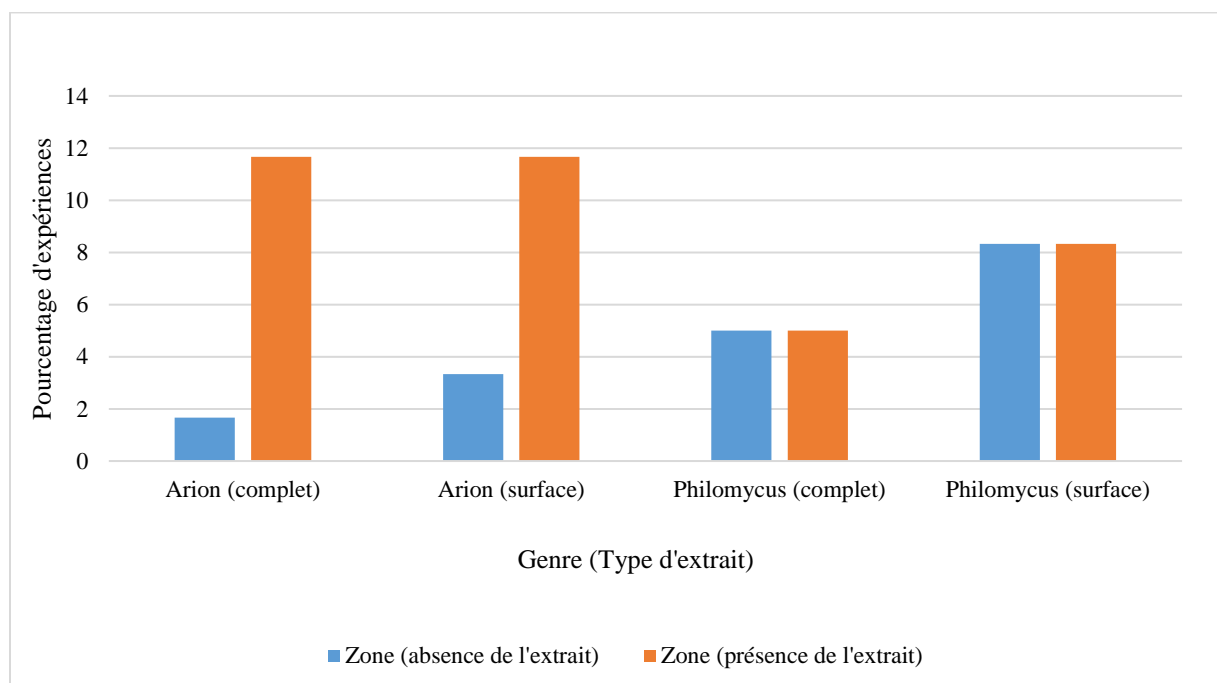


Figure 11 : Pourcentage d'expériences pour lesquelles une limace est entrée en contact avec l'extrait ou le contrôle en fonction du type d'extrait et du genre de limace.



3.2. Analyses chimiques

Selon les résultats de cette analyse, GNPS suggère des identifications pour 160 molécules, certaines étant propres à *Arion* (20 molécules) ou à *Philomycus* (9 molécules), d'autres étant communes aux deux espèces (131 molécules) (Tableau 6). Il est intéressant de noter que les molécules proposées sont accompagnées de métadonnées comme la masse moléculaire, l'origine des données spectrales, ainsi qu'une classification de la molécule. Ainsi, le nombre de molécules dans chacune des grandes catégories est présenté au tableau 7.

Tableau 6: Le nombre des molécules détectées dans l'extrait uniquement chez *Arion*, *Philomycus* ou chez les deux genres.

Genre	<i>Arion</i>	<i>Philomycus</i>	<i>Arion et Philomycus</i>
Nombre des molécules	20	9	131

Tableau 7 : Classement des molécules détectées dans les extraits de limaces

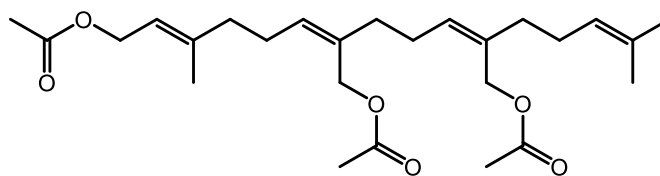
Groupe	Nombre de molécules
Terpenoïdes	25
Phénylpropanoïdes et shikimates	7
Polycétides	6
Alcaloïdes	4
Lipides	12
Phospholipides	64
Acides gras	22
Saccharides	9
Acides aminés et peptides	7
Autres	4

Comme mentionné précédemment, les identifications réalisées par GNPS sont des propositions qui n'ont pas été confirmées avec un standard. Néanmoins, trois de ces tentatives d'identifications sont présentées à la suite.

La première molécule présentée est l'acétate de géranylgeranyle ([[(2E,6Z,10Z)-7,11-bis(acetyloxymethyl)-3,15-dimethylhexadeca-2,6,10,14-tetraenyl] acetate), dont la structure est présentée à la figure 12. Pour confirmer cette identification, le spectre de masse obtenu à la suite

de l'analyse LC-MS/MS a été comparé avec le spectre de masse de la banque de données GNPS (Figure 13). Même si l'ion précurseur ($[M + K]^+ = 487.25$) n'est pas présent sur le spectre de masse, on peut considérer cette identification comme relativement fiable. En effet, on peut expliquer plusieurs des fragments observés sur le spectre de masse par une séquence d'élimination des groupes acétates (Figure 14). Les chromatogrammes pour l'ion précurseur de l'acétate de géranylgeranyle, sont présentés à la figure 15. On remarque que cette molécule serait présente uniquement chez *Arion*.

Figure 12 : Structure de l'acétate de géranylgeranyle.



Formule moléculaire: $C_{26}H_{40}O_6$
Masse exacte: 448.2825

Figure 13 : Comparaison des spectres de masse de l'acétate de géranylgeranyle. En haut : spectre de masse obtenu par l'analyse LCMS, en bas : spectre de masse de la banque de données GNPS (CCMSLIB00004709646).

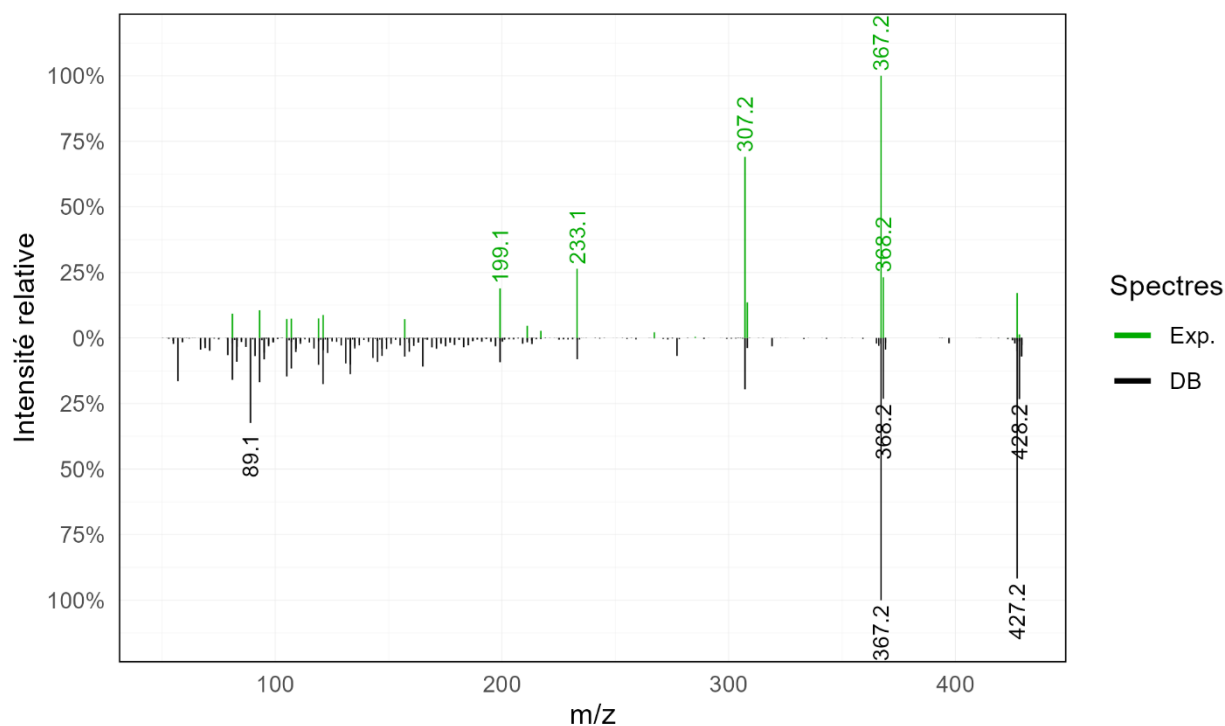


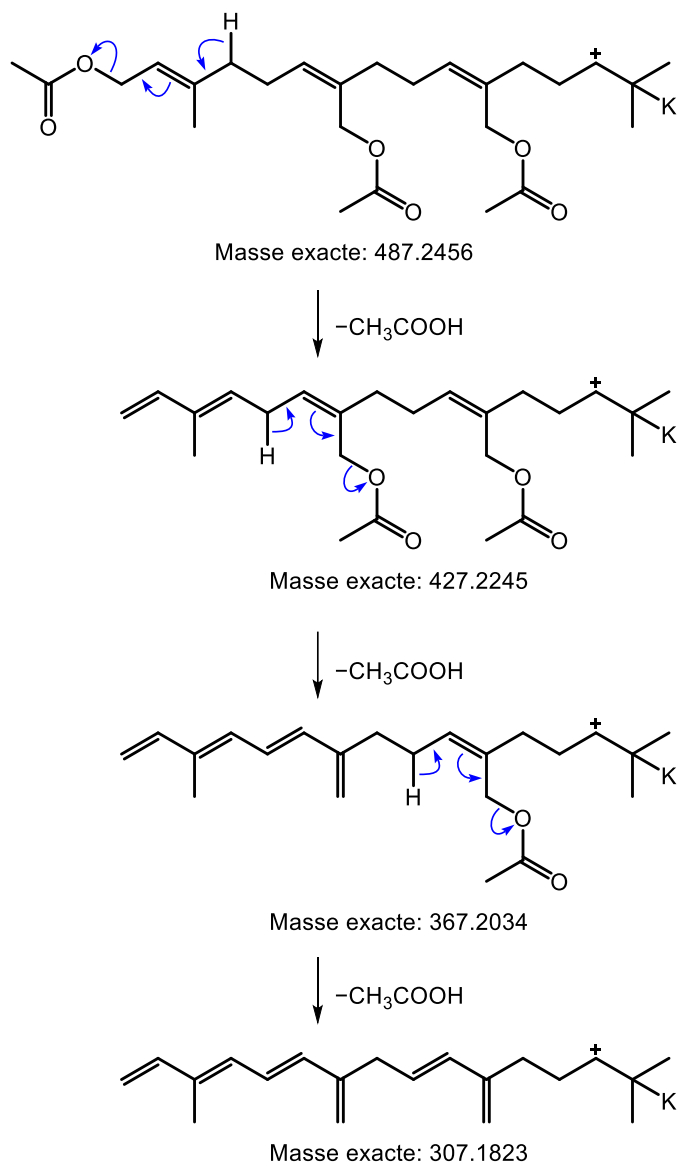
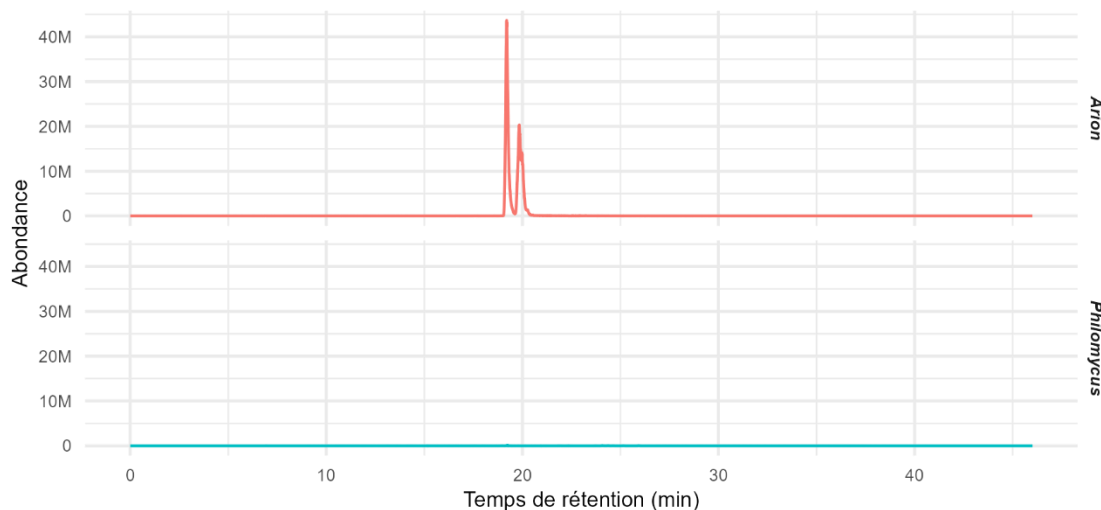
Figure 14 : Patron de fragmentation de l'adduit $[M + K]^+$ de l'acétate de géranylgeranyle.

Figure 15 : Chromatogrammes LCMS pour l'ion m/z 487 des fractions MeOH/H₂O des surfaces d'*Arion* et de *Philomyces*.



La deuxième molécule présentée est le canangalia H, un sesquiterpène dont la structure est présentée à la figure 16. L'identification de ce diol est basée sur le produit de la double déshydratation pour former un diène conjugué. La comparaison des spectres de masse est présentée à la figure 17. Le canangalia H a été détecté chez *Arion* seulement, tel qu'on peut le constater sur les chromatogrammes présentés à la figure 18. Dans ce cas, trois pics sont présents, mais le canangalia H est celui qui sort à 22.4 min. Les deux autres pics détectés pourraient être des isomères du canangalia H.

Figure 16 : Structure de Canangalia H et formation de l'adduit chargé positivement.

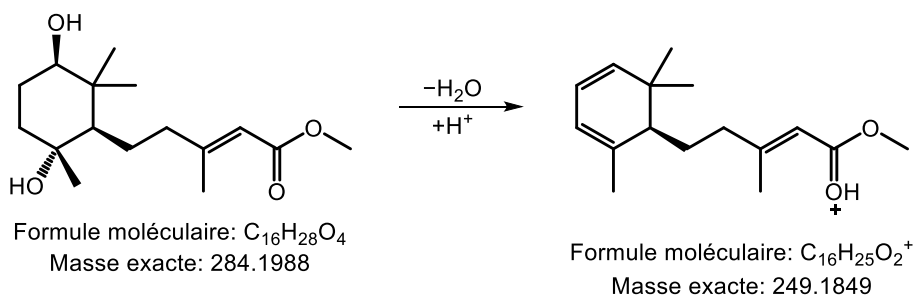


Figure 17 : Comparaison des spectres de masse du canangalia H. En haut : spectre de masse obtenu par l'analyse LCMS, en bas : spectre de masse de la banque de données GNPS (CCMSLIB00012060267).

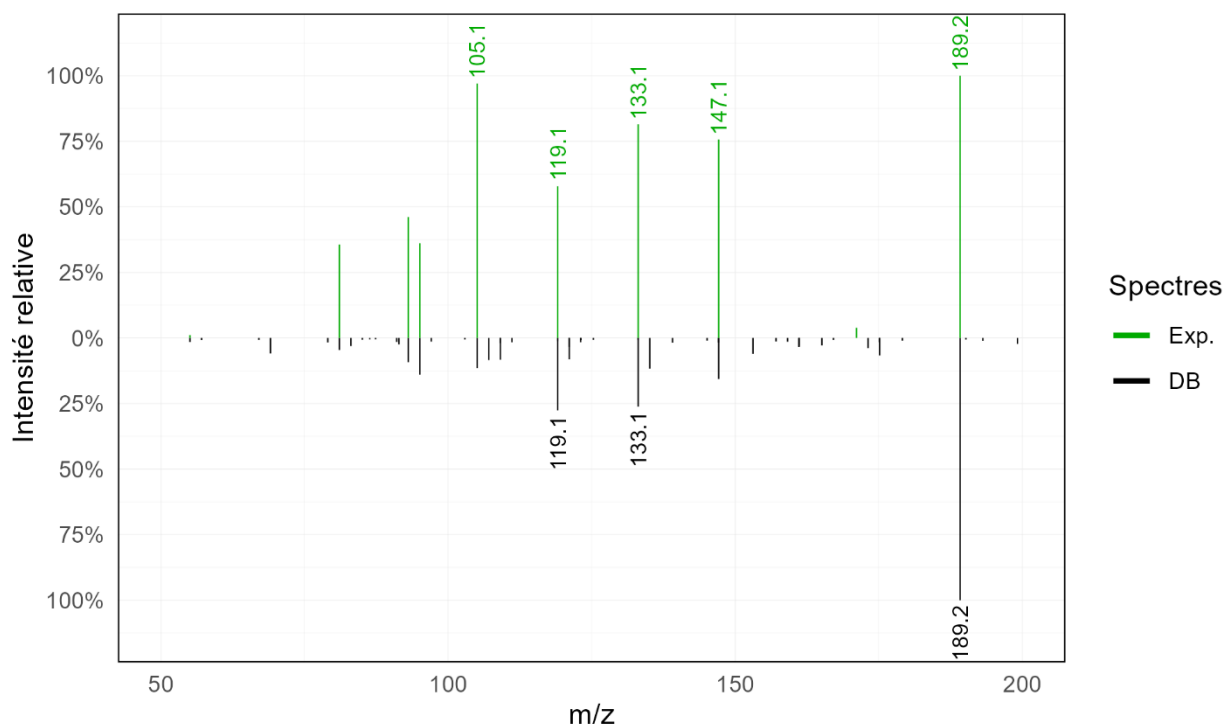
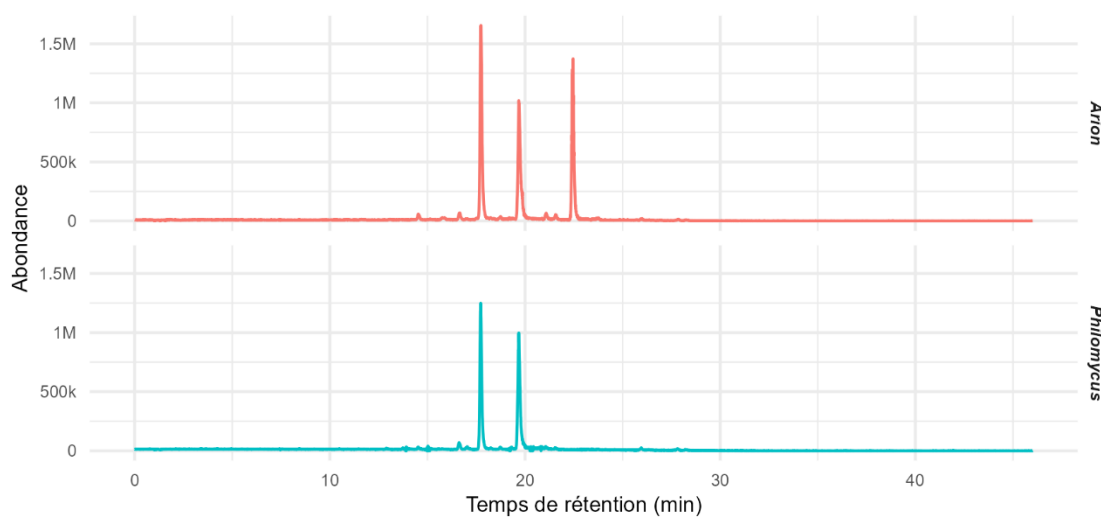


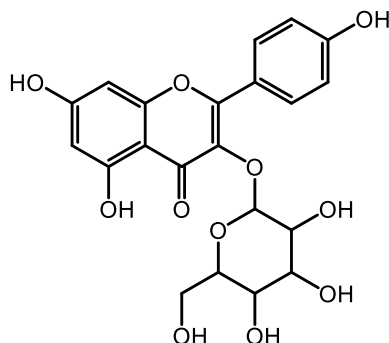
Figure 18 : Chromatogrammes LCMS pour l'ion m/z 487 des fractions MeOH/H₂O des surfaces d'Arion et de *Philomyces*.



La troisième molécule est l'astragaline, un glycoside du kaempférol (Figure 19). L'identification de ce flavonoïde est basée sur un spectre de masse relativement simple avec un pic de base à m/z

287 (Figure 20). Cet ion découle de la séparation de la section sucre et de la génine, tel qu'illustré à la figure 21. Lorsque les chromatogrammes sont inspectés, on trouve un pic à 6.5 min, seulement pour l'extrait d'*Arion* (Figure 22).

Figure 19 : Structure de l'astragaline.



Formule moléculaire: $C_{21}H_{20}O_{11}$
Masse exacte: 448.1006

Figure 20 : Comparaison des spectres de masse de l'astragaline. En haut : spectre de masse obtenu par l'analyse LCMS, en bas : spectre de masse de la banque de données GNPS (CCMSLIB00003138551).

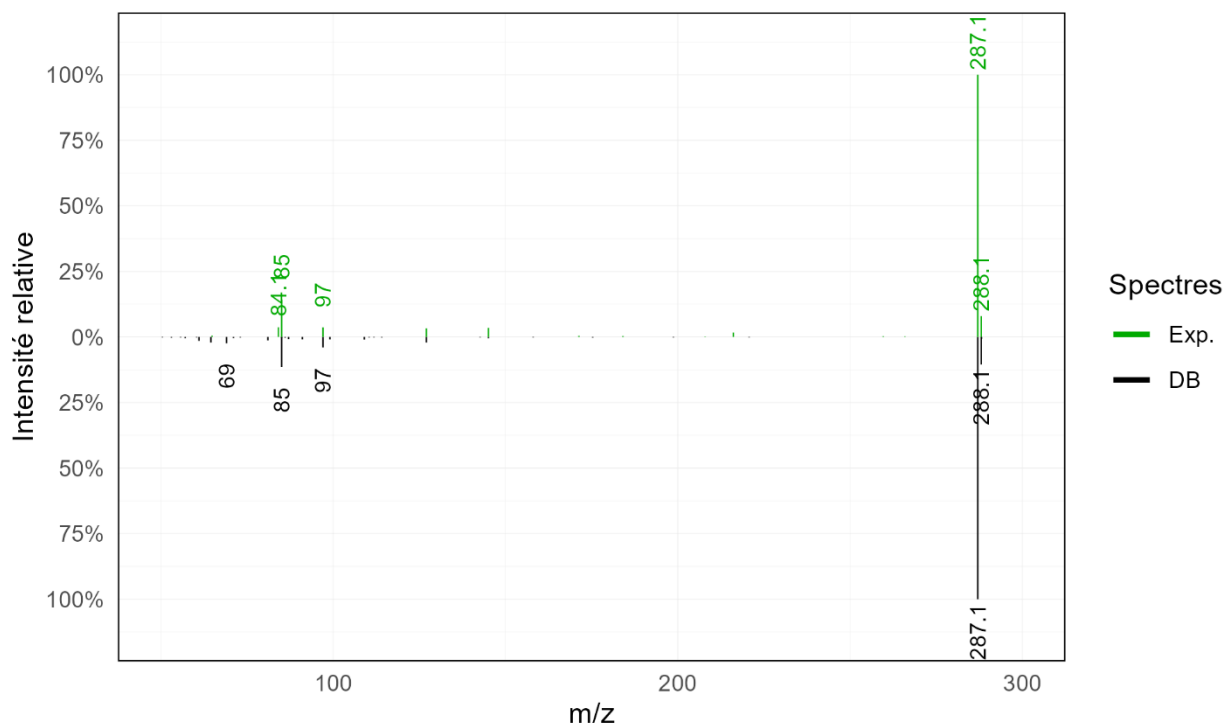


Figure 21 : Patron de fragmentation de l'adduit $[M + H]^+$ de l'astragaline.

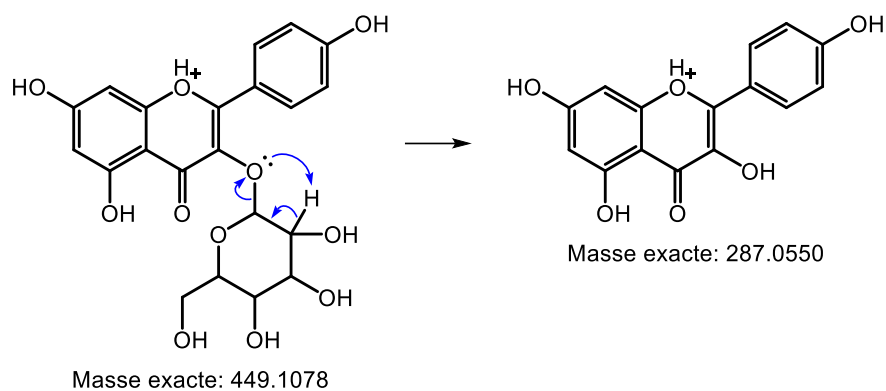
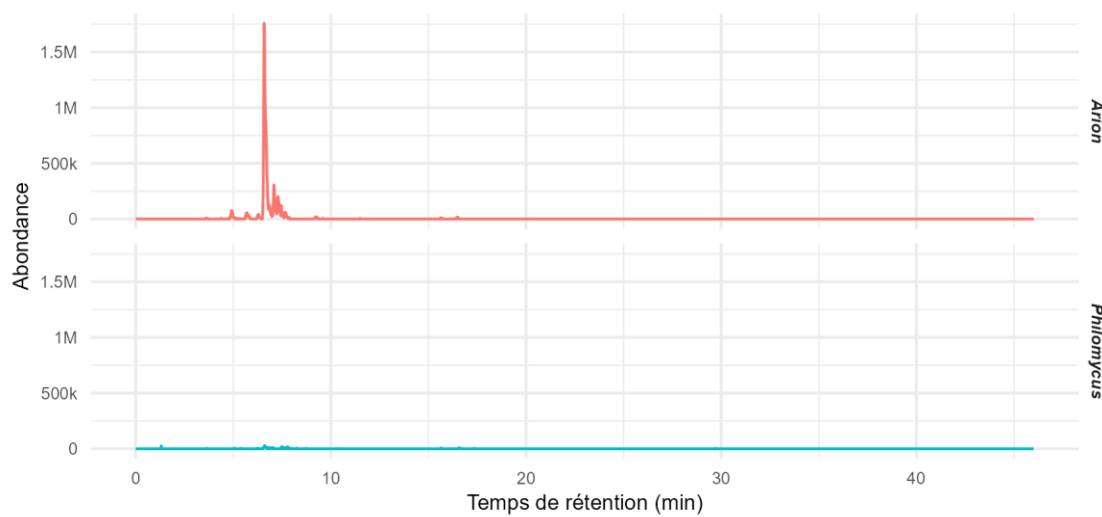


Figure 22 : Chromatogrammes LCMS pour l'ion m/z 449 des fractions MeOH/H₂O des surfaces d'*Arion* et de *Philomyces*.



DISCUSSION

4.1. Activité anti-appétante et phéromonale

Les résultats de cette étude supportent en partie l'hypothèse que les limaces produisent des métabolites secondaires ayant un effet anti-appétant. En effet, les boulettes contenant de l'extrait de limace issu des genres *Arion* et *Philomycus* ont attiré moins de petits mammifères que les boulettes fabriquées avec les mêmes ingrédients mais ne contenant pas d'extrait de limace, ce qui suggère un effet répulsif (anti-appétant) envers les petits mammifères pour ces deux genres de limaces.

Les arachnides ont également été moins attirés par les boulettes contenant de l'extrait de *Philomycus*, ce qui suggère que l'effet anti-appétant n'est pas similaire entre les deux genres de limaces. En effet, l'extrait de *Philomycus* présente une action anti-appétante plus marquée que celle d'*Arion* vis-à-vis des arachnides, les arachnides n'ayant démontré peu ou pas d'évitement des boulettes contenant de l'extrait d'*Arion*. L'avantage apparent de *Philomycus* pourrait s'expliquer par un mécanisme de défense mieux adapté que celui d'*Arion*. En effet, les limaces du genre *Philomycus* ont possiblement développé des métabolites secondaires pour repousser les prédateurs les plus probables dans leur aire de répartition. En revanche, la défense d'*Arion subfuscus s.l.*, une espèce introduite, semble non adaptée pour contrer les arachnides présents dans les sites à l'étude. Cela suggère que la diminution de la pression de prédation, ou « enemy release hypothesis » en anglais (Keane et Crawley, 2002), ne serait pas un mécanisme explicatif du succès d'invasion d'*Arion*, tout du moins en ce qui concerne les arachnides.

Une différence significative de l'effet anti-appétant des extraits obtenus à partir de différents tissus a également été observée (corps entier ou peau/mucus). En effet, les petits mammifères ont été moins attirés par les boulettes contenant de l'extrait d'*Arion* et de *Philomycus*, mais cet effet était plus fort pour l'extrait provenant du corps complet des limaces. Cela peut s'expliquer par le fait que la présence de métabolites secondaires est probablement plus abondante et diversifiée dans l'extrait complet de limace par rapport à son extrait de surface. Une raison à cela est que les limaces ont été complètement broyées, incluant le contenu de leur estomac. Ainsi, une partie des métabolites contenus dans l'extrait complet provient de la nourriture ingérée par la limace. Cette situation pourrait être une stratégie de protection pour la limace, qui se nourrit de plantes ou de

champignons contenant des métabolites secondaires anti-appétants, formant ainsi une défense chimique potentielle contre les prédateurs. En effet, un certain nombre de petites molécules anti-appétantes ou même toxiques pour les poissons ont été isolées à partir de lièvres de mer, des proies potentielles pour les poissons (Kamiya *et al.*, 2006). Il est intéressant de noter que certains de ces composés ont aussi été isolés dans les algues qui composent la diète des lièvres de mer, suggérant une origine alimentaire (Avila, 2006). L'effet plus marqué de l'extrait complet (relativement à l'extrait de surface) n'a cependant été observé que chez les petits mammifères. Une explication possible est que parmi les prédateurs qui se sont alimentés sur les boulettes, les petits mammifères sont les seuls à être capables de consommer facilement une limace entière, incluant le contenu de son système digestif, du fait de leur plus grande taille relativement aux limaces. En revanche, les invertébrés à l'étude étant généralement de plus petite taille que celle des limaces, ils ont probablement une capacité limitée à consommer une limace en entier. Les limaces pourraient avoir ainsi développé une adaptation impliquant des métabolites secondaires contenus dans le système digestif visant à limiter la prédation par les plus grands prédateurs seulement tels que les petits mammifères.

L'effet anti-appétant ne semble pas généralisé à toutes les catégories de consommateurs potentiels puisque les petits coléoptères et les sauterelles n'ont démontré aucune réponse à la présence de l'extrait, quel que soit le type de limace. De plus, les métabolites secondaires produits peuvent se révéler être attirants (ou appétant) contrairement à ce qui était attendu. En effet, l'extrait de *Philomycus* contenu dans les boulettes a attiré *Arion* dans nos expériences sur le terrain, mais *Arion* n'a pas été attirée par son propre extrait. Pourtant, *Arion* est fréquemment observé en train de s'alimenter sur des cadavres de vers de terre, de limaces autres que son espèce ou sur des fèces de carnivores (observation personnelle; A. Dupuch et S. Daneshvar). Cela démontre que *Arion* peut se nourrir de vers de terre, mais que l'ajout d'extrait de limace rend cette nourriture plus appétante à leur sens.

Les résultats de cette étude supportent également l'hypothèse que *Arion* produit des métabolites secondaires ayant une activité phéromonale. En effet, et contrairement aux expériences sur le terrain, *Arion* a démontré une attirance pour son propre extrait lors des expériences en laboratoire. Une explication possible serait que lorsqu'*Arion* est seule ou à faible densité, comme c'était le cas dans les expériences en laboratoire, la rencontre de congénères est un élément important pour la

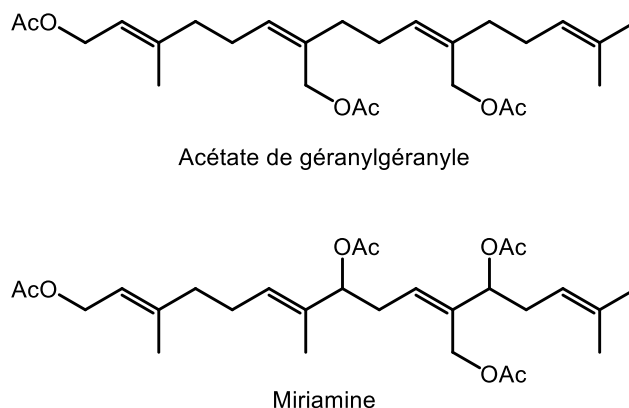
survie de la population comparativement à lorsqu'elles sont en plus grande densité, comme dans les sites forestiers à l'étude. En effet, à faible densité, la production de métabolites secondaires ayant une activité phéromonale pourrait permettre à *Arion* de trouver plus facilement des congénères pour la reproduction. Une telle activité phéromonale n'a pas été observée chez *Philomycus*.

4.2. Composition chimique

Comme le montrent les tableaux 6 et 7, différents groupes de molécules ont été identifiés dans les extraits de *Philomycus* et d'*Arion*. Dans les données recueillies, nous observons des dizaines de molécules regroupées dans différentes classes. Cependant, il est crucial de prendre en compte l'incertitude des données, car l'identification des molécules n'a pas été validée à l'aide d'étalons de référence. De plus, il est important de noter que l'algorithme GNPS peut fournir des identifications qui ne résistent pas à l'analyse critique. Malheureusement, il n'a pas été possible de faire ces analyses pour l'ensemble des identifications.

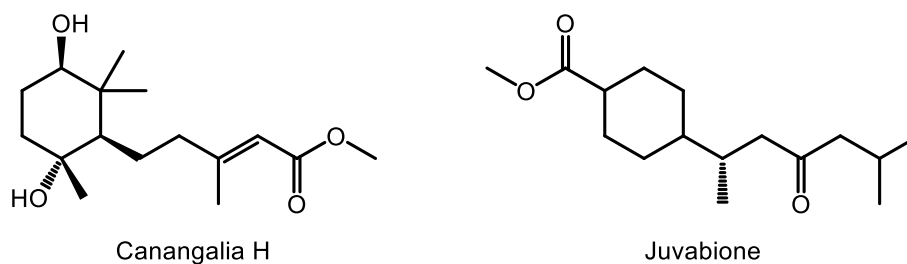
Étant donné que le corps des limaces a été complètement broyé dans la moitié des cas, les métabolites secondaires issues de leur bol alimentaire aurait pu se retrouver dans les extraits testés. Même si ces molécules n'étaient pas intégrées dans le corps des limaces, elles pourraient jouer un rôle clé dans la défense de l'organisme ou sur leur propagation.

Les œufs d'*Arion sp.* sont enduits d'un diterpène nommé miriamine (Schroeder *et al.*, 1999). Cette molécule présente un effet anti-appétant contre ses prédateurs, tels que la coccinelle. Parmi les molécules suggérées par GNPS, on retrouve l'acétate de géranylgeranyle, spécifiquement présent dans l'extrait d'*Arion*. La structure de l'acétate de géranylgeranyle présente des similitudes avec celle de la miriamine.

Figure 23 : Miriamine vs Acétate de géranylgeranyle

Il est possible que la miriamine soit biosynthétisée à partir de métabolites de base tels que l'acétate de géranylgeranyle, puis qu'elle soit intégrée dans les œufs pour les protéger contre les prédateurs.

Le canangalia H (Figure 24) est une autre molécule détectée exclusivement dans l'extrait d'*Arion*. Cette molécule a été isolée de plantes telles que *Miliusa velutina* (Nguyen Thien *et al.*, 2022) et *Cananga latifolia* (Phatchana *et al.*, 2016). La structure du canangalia H ressemble à la juvabione, un sesquiterpène végétal avec des effets hormonaux importants chez plusieurs insectes. Les hormones juvéniles jouent un rôle crucial dans le développement et la reproduction des insectes (Noriega et Nouzova, 2020). Il est intéressant de rappeler que seules les *Arion* étaient attirées par leur extrait lors des expériences en laboratoire visant à vérifier l'activité phéromonale (Figure 11). Bien que le canangalia H ait été détecté à la fois dans l'extrait complet et dans celui de surface (le mucus), il n'est pas possible de confirmer son rôle dans l'activité phéromonale de l'extrait. Néanmoins, il s'agit d'une piste intéressante à explorer étant donné que la reproduction est de première importance dans le succès d'invasion d'une espèce exotique (Watz et Nyqvist, 2022).

Figure 24 : Structure moléculaire du canangalia H et de la juvabione

Non seulement la présence du Canangalia H chez *Arion* est incertaine, mais sa fonction et son origine biosynthétique sont encore inconnues. Il est raisonnable de supposer une origine alimentaire puisque le canangalia H a été identifié dans plusieurs plantes. Même si un rapprochement entre ce sesquiterpène et l'hormone juvénile III est mentionné dans ces études, cela est basé uniquement sur la structure moléculaire puisque les activités hormonales n'ont pas été mesurées. Quant à sa fonction, on pourrait en imaginer plusieurs, mais il s'agirait de pure spéculation.

L'astragaline, un type de flavonoïde, démontre des propriétés anti-inflammatoires, antivirales et antibactériennes (Li *et al.*, 2020), ainsi qu'une activité neuroprotectrice (Riaz *et al.*, 2018). Durant notre analyse, cette molécule a été détectée chez *Arion*. Les activités de cette molécule peuvent aider la croissance et le développement corporel d'*Arion*. L'astragalin pourrait également protéger son système nerveux et la protéger contre les pathogènes.

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires produits par les plantes en tant que défenses chimiques contre l'herbivorie des insectes et d'autres organismes (War *et al.*, 2012). Puisque l'astragaline a été détecté dans l'extrait d'*Arion*, cela démontre qu'elle se nourrit au moins en partie de plante. Comme le composé a été détecté dans l'extrait complet et l'extrait de surface, cela démontre que le composé est internalisé par la limace. Il est donc possible de conclure que les limaces ont neutralisé la défense chimique des plantes. Cela élargit le spectre alimentaire d'*Arion*, lui permettant ainsi d'avoir un choix plus varié de nourriture.

4.3. Activité anti-appétante/phéromonale et succès d'invasion d'*Arion*

Le rôle des métabolites secondaires dans le succès d'envahissement des espèces introduites est un mécanisme encore peu étudié pour expliquer les invasions biologiques des espèces animales. Il existe plusieurs dizaines d'hypothèses aujourd'hui pour expliquer le succès d'envahissement des espèces introduites (Enders *et al.*, 2020). Parmi ces hypothèses, il y a celle du « enemy release » (Keane et Crawley, 2002), laquelle stipule que l'absence de prédateurs adaptés à l'espèce introduite aide à son succès d'envahissement. Pour *Arion*, cela se traduirait par la présence de métaboliques secondaires qui permettrait de réduire la pression de prédation par les prédateurs locaux (non adaptés à s'alimenter sur *Arion*). En lien avec cette hypothèse, ce projet suggère qu'*Arion* possède des métaboliques secondaires ayant une activité anti-appétante envers les petits mammifères

seulement, les autres prédateurs à l'étude n'ayant pas démontré d'évitement de l'extrait d'*Arion* durant les expériences de terrain. Cependant, les résultats suggèrent que cet effet anti-appétant sur les petits mammifères est aussi présent chez *Philomycus*. Ainsi, il est peu probable qu'un effet anti-appétant des métaboliques secondaires d'*Arion* puisse être un mécanisme explicatif du succès d'invasion d'*Arion*, tout du moins pour réduire la pression de prédation par les groupes de prédateurs à l'étude. Les amphibiens (grenouille, crapaud, salamandre), les serpents, ainsi que les oiseaux sont des prédateurs importants des limaces, il serait nécessaire de tester l'effet anti-appétant sur ces groupes de prédateurs afin d'évaluer plus précisément le rôle des métabolites secondaires dans le succès d'envahissement des espèces introduites.

La capacité de reproduction joue également un rôle clé dans le succès de l'invasion d'une espèce exotique (Mazaleyrat, Lorenzetti et Dupuch, 2022; Watz et Nyqvist, 2022). Cela est d'autant plus important pour *Arion*, puisque que les individus meurent généralement après la reproduction (Beyer et Saari, 1978; Jennings et Barkham, 1975b). Une forte capacité de reproduction est moins nécessaire pour les espèces de *Philomycus*, qui ont une durée de vie plus longue que celle d'*Arion* et ne meurent pas après la reproduction (Mazaleyrat, Lorenzetti et Dupuch, 2022). En lien avec cette hypothèse, les résultats de ce projet suggèrent qu'*Arion* possède des métabolites secondaires ayant un effet phéromonal, lequel serait présent lorsqu'*Arion* est à faible densité ou seul, comme durant les expériences de laboratoire. Cela pourrait permettre à *Arion* d'augmenter la probabilité de rencontrer des congénères et par le fait même, d'augmenter sa capacité de reproduction lorsqu'elle est en faible densité. Un tel effet phéromonal serait un avantage pour une espèce introduite en phase d'établissement dans un nouvel environnement, car cela permettrait une croissance plus rapide de la population via une meilleure capacité de reproduction. Des expériences supplémentaires seraient nécessaires afin de vérifier un tel effet phéromonal.

4.4. Limites du projet

Le projet présente plusieurs limites. La première est que les expériences n'ont pas permis de tester le rôle anti-appétant sur des groupes de prédateurs importants de limaces, i.e. les reptiles et les amphibiens. De plus, une nourriture dénaturée (vers de terre broyé contenant de l'extrait de limace) a été présentée aux prédateurs ce qui pourrait impacter leur comportement alimentaire. Certains prédateurs auraient possiblement visité plus souvent les stations si de vraies limaces avaient été présentes, tandis que d'autres prédateurs les auraient possiblement évités.

Par ailleurs, l'activité phéromonale a été testé en milieu contrôlé (laboratoire), ce qui peut ne pas être représentatif du comportement naturel des limaces en milieu naturel. Tester cette activité dans l'habitat des limaces serait préférable afin d'éviter des biais comportementaux liés aux conditions de laboratoire. De plus, bien qu'*Arion* ait réagi à l'extrait dans ces expériences, nous ne pouvons pas être certain qu'un désir de reproduction a été déclenché chez les individus. Il se pourrait que les limaces utilisent ces indices sensoriels pour trouver des congénères afin de s'alimenter sur la nourriture qu'ils auraient découvert.

En ce qui concerne les analyses chimiques, différentes molécules ont été détectées et identifiées, mais pour valider ces résultats, il aurait fallu analyser des étalons de ces substances, qui n'étaient malheureusement pas disponible lors de ces travaux. La composition chimique des extraits est donc encore très incertaine. Il est également pratiquement impossible de déterminer la ou les substances qui sont responsables des activités biologiques observées puisque c'est un mélange complexe qui a été testé. Plusieurs substances pourraient être actives, sans compter le fait que des synergies pourraient augmenter les activités biologiques des substances individuelles.

CONCLUSION

Ce projet suggère que les limaces possèdent des métabolites secondaires ayant un effet anti-appétant envers certains prédateurs forestiers ainsi qu'un effet phéromonal, mais que ces effets diffèrent selon le genre de limace. Ce projet n'a pas permis d'identifier les causes et conséquences de ces différences, mais d'un point de vue des invasions biologiques, il serait important de réaliser des expériences supplémentaires afin de vérifier le rôle potentiel des métabolites secondaires dans le succès d'invasion des espèces introduites. En effet, les mécanismes sous-jacents au succès d'envahissement d'*Arion* sont encore peu connus, et les résultats de ce projet suggèrent que les métabolites secondaires pourraient jouer un rôle via un effet phéromonal.

La caractérisation chimique des extraits de limaces a été réalisée par spectrométrie de masse à haute résolution et en tandem (MS/MS), avec une dérégulation effectuée avec les outils du « Global Natural Products Social Molecular Networking », ou GNPS. Dans ce projet, plusieurs molécules, certaines communes aux deux genres, d'autres spécifiques à un seul genre, ont pu être identifiées dans leurs extraits. Cette approche a permis d'obtenir des propositions de substances, mais d'autres travaux sont encore nécessaires pour valider leur identité. Parmi les composés identifiés, plusieurs font partie du métabolisme primaire comme par exemple des lipides. Néanmoins, plusieurs molécules issues du métabolisme secondaire ont pu être identifiées dont certaines sont présentes uniquement chez les plantes. Quant à leur rôle par rapport aux activités biologiques décrites dans ce travail de recherche, d'autres travaux sont nécessaires pour les déterminer.

RÉFÉRENCES

- Avila, C. (2006). Molluscan natural products as biological models: chemical ecology, histology, and laboratory culture. Dans G. Cimino et M. Gavagnin (dir.), *Molluscs: From Chemo-ecological Study to Biotechnological Application* (p. 1-23). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-30880-5_1.
- Backeljau, T., Winnepeninckx, B., Jordaens, K., Wolf, H., Breugelmans, K., Parejo, C. et Rodriguez, T. (1996). Protein electrophoresis in *Arionid* taxonomy. Dans *BCPC Symposium Proceedings* (vol. 66, p. 21-28).
- Backeljau, T. et Winter, A. J. D. (1987). An electrophoretic characterisation of three paratypes of *Arion fagophilus* De Winter, 1986, with notes on the subgeneric division of the genus *Arion* Féruccac, 1819 (Mollusca, Pulmonata). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 25(3), 169-180. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.1987.tb00601.x>
- Backeljau, T., Winter De, A. J., Martin, R., Rodriguez, T. et Bruyn De, L. U. C. (1994). Genital and allozyme similarity between *Arion urbiae* and *A. anguloi* (Mollusca: Pulmonata). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 110(1), 1-18. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.1994.tb01467.x>
- Barr, N. B., Cook, A., Elder, P., Molongoski, J., Prasher, D. et Robinson, D. G. (2009). Application of a DNA barcode using the 16S rRNA gene to diagnose pest *Arion* species in the USA. *Journal of Molluscan Studies*, 75(2), 187-191. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyn047>
- Beyer, W. N. et Saari, D. M. (1978). Activity and ecological distribution of the slug, *Arion subfuscus* (Draparnaud) (Stylommatophora, Arionidae). *The American Midland Naturalist*, 100(2), 359-367. <https://doi.org/10.2307/2424835>
- Brooks, M. E., Kristensen, K., van Benthem, K. J., Magnusson, A., Berg, C. W., Nielsen, A., Skaug, H. J., Machler, M. et Bolker, B. M. (2017). glmmTMB balances speed and flexibility among packages for zero-inflated generalized linear mixed modeling. *The R journal*, 9, 400. <https://doi.org/10.3929/ethz-b-000240890>
- Buschmann, H., Keller, M., Porret, N., Dietz, H. et Edwards, P. J. (2005, 2005/04/01). The effect of slug grazing on vegetation development and plant species diversity in an experimental grassland. *Functional Ecology*, 19(2), 291-298. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2005.00960.x>
- Cameron, R. (2009). Are non-native gastropods a threat to endangered lichens? *Canadian Field Naturalist*, 123, 169-171. <https://doi.org/10.22621/cfn.v123i2.697>
- Campion, M. (1961). The structure and function of the cutaneous glands in *Helix aspersa*. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, s3-102(58), 195-216. <http://doi.org/10.1242/jcs.s3-102.58.195>
- Carté, B. et Faulkner, D. J. (1986). Role of secondary metabolites in feeding associations between a predatory nudibranch, two grazing nudibranchs, and a bryozoan. *Journal of Chemical Ecology*, 12(3), 795-804. <https://doi.org/10.1007/BF01012111>
- Chambers, M. C., Maclean, B., Burke, R., Amodei, D., Ruderman, D. L., Neumann, S., Gatto, L., Fischer, B., Pratt, B., Egertson, J., Hoff, K., Kessner, D., Tasman, N., Shulman, N., Frewen, B., Baker, T. A., Brusniak, M.-Y., Paulse, C., Creasy, D., Flashner, L., Kani, K., Moulding, C., Seymour, S. L., Nuwaysir, L. M., Lefebvre, B., Kuhlmann, F., Roark, J., Rainer, P., Detlev, S., Hemenway, T., Huhmer, A., Langridge, J., Connolly, B., Chadick, T., Holly, K., Eckels, J., Deutsch, E. W., Moritz, R. L., Katz, J. E., Agus, D. B., MacCoss, M., Tabb,

- D. L. et Mallick, P. (2012). A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nature Biotechnology*, 30(10), 918-920. <https://doi.org/10.1038/nbt.2377>
- Chase, R. et Croll, R. P. (1981). Tentacular function in snail olfactory orientation. *Journal of comparative physiology*, 143(3), 357-362. <https://doi.org/10.1007/BF00611173>
- Chase, R. et Tolloczko, B. (1989, 1989/05/01). Interganglionic dendrites constitute an output pathway from the procerebrum of the snail *Achatina fulica*. *Journal of Comparative Neurology*, 283(1), 143-152. <https://doi.org/10.1002/cne.902830112>
- Chichester et Getz. (1973). The Terrestrial Slugs of Northeastern North America. *STERK IANA*, 51.
- Chichester, L. F. et Getz, L. L. (1969). The zoogeography and ecology of Arionid and Limacid slugs introduction into northeastern north America. *Malacologia*, 7, 313-346.
- Côté, M., Ferron, J. et Gagnon, R. (2005). Invertebrate predation of postdispersal seeds and juvenile seedlings of black spruce (*Picea mariana*) in the boreal forest of eastern Canada. *Canadian Journal of Forest Research*, 35(3), 674-681. <https://doi.org/10.1139/x05-001>
- Dean, L. J. et Prinsep, M. R. (2017). The chemistry and chemical ecology of nudibranchs. *Natural Product Reports*, 34(12), 1359-1390. <https://doi.org/10.1039/C7NP00041C>
- Denny, M. (1980). Locomotion: The cost of gastropod crawling. *Science*, 208(4449), 1288. <https://doi.org/10.1126/science.208.4449.1288>
- Derby, C. D. et Aggio, J. F. (2011). The neuroecology of chemical defenses. *Integrative and Comparative Biology*, 51(5), 771-780. <https://doi.org/10.1093/icb/icr063>
- Deyrup-Olsen, I., Luchtel, D. L. et Martin, A. W. (1983). Components of mucus of terrestrial slugs (Gastropoda). *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 245(3), 448-452. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1983.245.3.R448>
- Enders, M., Havemann, F., Ruland, F., Bernard-Verdier, M., Catford, J. A., Gómez-Aparicio, L., Haider, S., Heger, T., Kueffer, C., Kühn, I., Meyerson, L. A., Musseau, C., Novoa, A., Ricciardi, A., Sagouis, A., Schittko, C., Strayer, D. L., Vilà, M., Essl, F., Hulme, P. E., van Kleunen, M., Kumschick, S., Lockwood, J. L., Mabey, A. L., McGeoch, M. A., Palma, E., Pyšek, P., Saul, W.-C., Yannelli, F. A. et Jeschke, J. M. (2020). A conceptual map of invasion biology: Integrating hypotheses into a consensus network. *Global Ecology and Biogeography*, 29(6), 978-991. <https://doi.org/10.1111/geb.13082>
- Environnement Canada. (2020). *Normales et moyennes climatiques de 1981-2010*. Récupéré le 23 octobre 2020 de https://climat.meteo.gc.ca/climate_normals/index_f.html
- Environnement et Changement climatique Canada. (2017a). *Endroits où l'on trouve des espèces exotiques envahissantes*. Gouvernement du Canada. Récupéré le 2024-05-29 de <https://www.canada.ca/fr/environnement-changement-climatique/services/biodiversite/endroits-trouve-especes-exotiques-envahissantes.html>
- Environnement et Changement climatique Canada. (2017b). *Espèces exotiques et espèces exotiques envahissantes*. Gouvernement du Canada. Récupéré le 2024-05-29 de <https://www.canada.ca/fr/environnement-changement-climatique/services/biodiversite/especes-exotiques-envahissantes.html>
- Environnement et Changement climatique Canada. (2017c). *Pourquoi les espèces exotiques envahissantes sont nuisibles*. Gouvernement du Canada. Récupéré le 2024-05-29 de <https://www.canada.ca/fr/environnement-changement-climatique/services/biodiversite/pourquoi-especes-exotiques-envahissantes-sont-nuisibles.html>

- Faulkner, D. et Ghiselin, M. (1983). Chemical defense and evolutionary ecology of dorid nudibranchs and some other opisthobranch gastropods. *Marine Ecology Progress Series*, 13, 295. <https://doi.org/10.3354/meps013295>
- Ferguson, S. (2004). Effects of poisoning nonindigenous slugs in a boreal forest. *Canadian Journal of Forest Research*, 34, 449-455. <https://doi.org/10.1139/x03-208>
- Gelperin, A. (1974). Olfactory basis of homing behavior in the giant garden slug, *Limax maximus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(3), 966-970. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.3.966>
- Gelperin, A. (2006). Olfactory computations and network oscillation. *The Journal of Neuroscience*, 26(6), 1663. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3737-05b.2006>
- Gervais, R., Kleinfeld, D., Delaney, K. R., Gelperin, A., Gervais, R., Kleinfeld, D., Delaney, K. R. et Gelperin, A. (1996, 1996/08/01). Central and reflex neuronal responses elicited by odor in a terrestrial mollusk. *Journal of Neurophysiology*, 76(2), 1327-1339. <https://doi.org/10.1152/jn.1996.76.2.1327>
- Glen, D. M., Moens, R. (2002). Agriolimacidae, Arionidae and Milacidae as pests in western european cereals. Dans G. M. Barker (dir.), *Molluscs as crop pests*. <https://doi.org/10.1079/9780851993201.0271>.
- GNPS. (2023). *Arion_Philomycus*. <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=c3ae5e503b1a4ed69fbb794b7685651c>
- Gould, J., Valdez, J. W. et Upton, R. (2019). Adhesive defence mucus secretions in the red triangle slug (*Triboniophorus graeffei*) can incapacitate adult frogs. *Ethology*, 125(8), 587-591. <https://doi.org/10.1111/eth.12875>
- Graham, A. (1955). Molluscan diets. *Journal of Molluscan Studies*, 31(3-4), 144-158. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.mollus.a064734>
- Grimm, F. W., Forsyth, R. G., Schueler, F. W. et Karstad, A. (2009). *Identifying land snails and slugs in Canada, introduced species and native genera*. Canadian Food Inspection Agency.
- Hammond, R. B., Byers, R. A. (2002). Agriolimacidae and Arionidae as pests in conservation tillage soybean and maize cropping in north America. Dans G. M. Barker (dir.), *Molluscs as crop pests*. <https://doi.org/10.1079/9780851993201.0301>.
- He, R., Ye, J., Zhao, Y. et Su, W. (2014, 2014/04/01/). Partial characterization, antioxidant and antitumor activities of polysaccharides from *Philomycusbilineatus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 65, 573-580. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.01.016>
- Holway, D. A. (1999). Competitive mechanisms underlying the displacement of native ants by the invasive Argentine ant. *Ecology*, 80(1), 238-251. <https://doi.org/10.2307/176993>
- Hommay, G. (2002). Agriolimacidae, Arionidae and Milacidae as pests in west european sunflower and maize. Dans G. M. Barker (dir.), *Molluscs as crop pests*. <https://doi.org/10.1079/9780851993201.0245>.
- Hubricht, L. (1985). *The distributions of the native land mollusks of the eastern United States* (vol. 24 ;). Field Museum of Natural History. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.3329>
- Hulme, P. E. (1996). Herbivores and the performance of grassland plants: A comparison of arthropod, mollusc and rodent herbivory. *Journal of Ecology*, 84(1), 43-51. <https://doi.org/10.2307/2261698>
- IUCN. (2018). *Invasive alien species and sustainable development*. International union for conservation of nature July 2018. https://iucn.org/sites/default/files/2022-07/ias_and_sustainable_development_issues_brief_final.pdf

- Jeffrey, C. N. (2014). Overview of the north American terrestrial gastropod fauna. *American Malacological Bulletin*, 32(2), 225-235. <https://doi.org/10.4003/006.032.0203>
- Jennings, T. J. et Barkham, J. P. (1975a). Food of Slugs in Mixed Deciduous Woodland. *Oikos*, 26(2), 211-221. <https://doi.org/10.2307/3543711>
- Jennings, T. J. et Barkham, J. P. (1975b). Slug populations in mixed deciduous woodland. *Oecologia*, 20(3), 279-286. <https://doi.org/10.1007/BF00347478>
- Jordaens, K., Van Dongen, S., Riel, P., Geenen, S., Verhagen, R. et Backeljau, T. (2002). Multivariate morphometrics of soft body parts in terrestrial slugs: Comparison between two datasets, error assessment and taxonomic implications. *Biological Journal of The Linnean Society* 75, 533-542. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8312.2002.00040.x>
- Jordaens, K., Van Riel, P., Verhagen, R. et Backeljau, T. (1999). Food-induced esterase electromorphs in *Carinarion spp.* and their effects on taxonomic data analysis (Gastropoda, Pulmonata, Arionidae). *Electrophoresis*, 20(3), 473-479. [https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(19990301\)20:3%3C473::AID-ELPS473%3E3.0.CO;2-F](https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1522-2683(19990301)20:3%3C473::AID-ELPS473%3E3.0.CO;2-F)
- Kamiya, H., Sakai, R. et Jimbo, M. (2006). Bioactive molecules from sea hares. Dans G. Cimino et M. Gavagnin (dir.), *Molluscs: From Chemo-ecological Study to Biotechnological Application* (p. 215-239). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-30880-5_10.
- Keane, R. M. et Crawley, M. J. (2002). Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis. *Trends in Ecology & Evolution*, 17(4), 164-170. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(02\)02499-0](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)02499-0)
- Keller, H. W. et Snell, K. L. (2002). Feeding activities of slugs on Myxomycetes and macrofungi. *Mycologia*, 94(5), 757-760. <https://doi.org/10.1080/15572536.2003.11833169>
- Kiss, T. (2017, 2017/07/08). Do terrestrial gastropods use olfactory cues to locate and select food actively? *Invertebrate Neuroscience*, 17(3), 9. <https://doi.org/10.1007/s10158-017-0202-2>
- Kozłowski, J. (2009). On the distribution and food preferences of *Arion subfuscus* (Draparnaud, 1805). *Folia Malacologica*, 16(2), 61-67. <https://doi.org/10.12657/folmal.610.010>
- Krassoi, F. R., Brown, K. R., Bishop, M. J., Kelaher, B. P. et Summerhayes, S. (2008). Condition-Specific competition allows coexistence of competitively superior exotic oysters with native oysters. *Journal of Animal Ecology*, 77(1), 5-15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2007.01316.x>
- L'Heureux, É. et Angers, B. (2018). A discreet invasion: Distribution, origins, and expansion of the european slug complex *Arion subfuscus* S.l. in Quebec. *Canadian Journal of Zoology*, 96(4), 325-331. <https://doi.org/10.1139/cjz-2017-0171>
- Landauer, M. R. et Chapnick, S. D. (1981). Responses of terrestrial slugs to secretions of stressed conspecifics. *Psychological Reports*, 49(2), 617-618. <https://doi.org/10.2466/pr0.1981.49.2.617>
- Li, C., Hu, M., Jiang, S., Liang, Z., Wang, J., Liu, Z., Wang, H.-M. D. et Kang, W. (2020). *Evaluation procoagulant activity and mechanism of astragalin Molecules* (vol. 25, p. 177).
- Mair, J. et Port, G. R. (2002). The influence of mucus production by the slug, *Deroceras reticulatum*, on predation by *Pterostichus madidus* and *Nebria brevicollis* (Coleoptera: Carabidae). *Biocontrol Science and Technology*, 12(3), 325-335. <https://doi.org/10.1080/09583150220128112>
- Martin, A. W. et Deyrup-Olsen, I. (1982). Surface exudation in terrestrial slugs. *Biochem Physiol*, 72 C, 45-51.

- Martin, A. W. et Deyrup-Olsen, I. (1986). Function of the epithelial channel cells of the body wall of a terrestrial slug, *Arioumax columbianus*. *Exp. Boil*, 121, 301-314.
- Matsuo, R., Kobayashi, S., Tanaka, Y. et Ito, E. (2010). Effects of tentacle amputation and regeneration on the morphology and activity of the olfactory center of the terrestrial slug Limax valentianus. *The Journal of experimental biology*, 213(18), 3144. <https://doi.org/10.1242/jeb.046938>
- Matsuo, R., Kobayashi, S., Yamagishi, M. et Ito, E. (2011). Two pairs of tentacles and a pair of procerebra: optimized functions and redundant structures in the sensory and central organs involved in olfactory learning of terrestrial pulmonates. *The Journal of Experimental Biology*, 214(6), 879. <https://doi.org/10.1242/jeb.024562>
- Mazaleyrat, A., Borgne, H., Lorenzetti, F. et Dupuch, A. (2023). Do disturbance-induced habitat changes drive alien species invasion success and native species decline? A case study based on slug species inhabiting managed deciduous forests. *Biological Invasions*, 25, 1-17. <https://doi.org/10.1007/s10530-023-03046-y>
- Mazaleyrat, A., Lorenzetti, F., Aubin, I., Venier, L., Hébert, C., Fortin, D. et Dupuch, A. (2022). Towards a better understanding of the effect of anthropogenic habitat disturbance on the invasion success of non-native species: slugs in eastern Canadian forests. *Biological Invasions*, 24, 1-15. <https://doi.org/10.1007/s10530-021-02723-0>
- Mazaleyrat, A., Lorenzetti, F. et Dupuch, A. (2022). Invasion of alien slugs in disturbed habitats: role of behavioural phenotype, plasticity and interspecific competition. *Animal Behaviour*, 183, 29-40. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2021.10.013>
- McCracken, G. F. et Selander, R. K. (1980). Self-fertilization and monogenic strains in natural populations of terrestrial slugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(1), 684-688. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.1.684>
- Meadley Dunphy, S., Prior, K. et Frederickson, M. (2016). An invasive slug exploits an ant-seed dispersal mutualism. *Oecologia*, 181(1), 149-159. <https://doi.org/10.1007/s00442-015-3530-0>
- Ministère des Forêts, d. l. F. e. d. P. (2002). *Forêt ancienne du Lac-Gagnon*. Récupéré le 2024-05-18 de <https://mffp.gouv.qc.ca/documents/forets/connaissances/ecosystemes-lac-gagnon.pdf>
- Mitchell, C. E. et Power, A. G. (2003). Release of invasive plants from fungal and viral pathogens. *Nature*, 421(6923), 625-627. <https://doi.org/10.1038/nature01317>
- Miyamoto, T. (2006). Selected bioactive compounds from japanese Anaspideans and Nudibranchs. Dans G. Cimino et M. Gavagnin (dir.), *Molluscs: From Chemo-ecological Study to Biotechnological Application* (p. 199-214). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-30880-5_9.
- Nguyen Thien, T. V., Vo, T. K. L., Dang, P. H., Huynh, N. V., Ngo, T. T. D., Nguyen, T. M. N., Hansen, P. E. et Ton That, Q. (2022, 2022/01/17). Two new sesquiterpenes from the stems of *Milium velutinum*. *Natural Product Research*, 36(2), 553-559. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1789984>
- Nikitin, E. S. (2008). Olfactory experience modifies the effect of odour on feeding behaviour in a goal-related manner A Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology. *Journal of comparative physiology*, v. 194(no. 1), pp. 19-26-2008 v.2194 no.2001. <https://doi.org/10.1007/s00359-007-0272-4>
- Noble, L. R. et Jones, C. S. (1996). A molecular and ecological investigation of the large arionid slugs of North-West Europe: The potential for new pests. Dans *The ecology of agricultural pests* (p. 93-131). Springer.

- Nolet, P., Delagrangé, S., Bannon, K., Messier, C. et Kneeshaw, D. (2015, 05/25). Liming has a limited effect on sugar maple-american beech dynamics compared to beech sapling elimination and canopy opening. *Canadian Journal of Forest Research*, 45, 150525143514004. <https://doi.org/10.1139/cjfr-2015-0010>
- Noriega, F. G. et Nouzova, M. (2020). *Approaches and tools to study the roles of juvenile hormones in controlling insect biology* *Insects* (vol. 11, p. 858).
- O' Hanlon, A., Williams, C. D. et Gormally, M. J. (2019). Terrestrial slugs (Mollusca: Gastropoda) share common anti-predator defence mechanisms but their expression differs among species. *Journal of Zoology*, 307(3), 203-214. <https://doi.org/10.1111/jzo.12635>
- Pakarinen, E. (1992). The response of terrestrial slugs *Arion fasciatus* and *Deroceras reticulatum* to the mucus of stressed conspecifics and heterospecifics. *Animal Behaviour*, 43(6), 1051-1052. [https://doi.org/10.1016/s0003-3472\(06\)80019-9](https://doi.org/10.1016/s0003-3472(06)80019-9)
- Pakarinen, E. (1994). The importance of mucus as a defence against carabid beetles by the slug *Arion fasciatus* and *Deroceras reticulatum*. *Journal of Molluscan Studies*, 60(2), 149-155. <https://doi.org/10.1093/mollus/60.2.149>
- Paustian, M. E. et Barbosa, P. (2012). Overlap of food and microhabitat preferences among some native and nonnative slugs in mid-Atlantic forests of eastern north America [Article]. *Journal of Molluscan Studies*, 78(1), 92-99. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyr041>
- Phatchana, R., Thongsri, Y. et Yenjai, C. (2016). Canangalins C-H, juvenile hormone III analogues from the roots of *Cananga latifolia*. *Fitoterapia*, 114, 45-50. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.08.018>
- Pickett, J. A., Wadhams, L. J. et Woodcock, C. M. (1997). Developing sustainable pest control from chemical ecology. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 64(2), 149-156. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(97\)00033-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-8809(97)00033-9)
- Pilsbry, H. A. (1939). *Land mollusca of north America (north of Mexico)*. Printed by the George W. Carpenter Fund for the Encouragement of Original Scientific Research.
- Pinchuck, S. C. et Hodgson, A. N. (2010). The ultrastructure and histology of the perinotal epidermis and defensive glands of two species of *Onchidella* (Gastropoda: Pulmonata). *Tissue and Cell*, 42(2), 105-115. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2010.02.001>
- Pyšek, P., Hulme, P. E., Simberloff, D., Bacher, S., Blackburn, T. M., Carlton, J. T., Dawson, W., Essl, F., Foxcroft, L. C., Genovesi, P., Jeschke, J. M., Kühn, I., Liebhold, A. M., Mandrak, N. E., Meyerson, L. A., Pauchard, A., Pergl, J., Roy, H. E., Seebens, H., van Kleunen, M., Vilà, M., Wingfield, M. J. et Richardson, D. M. (2020). Scientists' warning on invasive alien species. *Biological Reviews*, 95(6), 1511-1534. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/brv.12627>
- Quinteiro, J., Rodríguez-Castro, J., Castillejo, J., Iglesias, J. et Rey-Méndez, M. (2005, 05/12). Phylogeny of slug species of the genus *Arion*: Evidence of monophyly of Iberian endemics and of the existence of relict species in Pyrenean refuges. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 43, 139-148. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2005.00307.x>
- Rathcke, B. (1985). Slugs as generalist herbivores: Tests of three hypotheses on plant choices. *Ecology*, 66(3), 828-836. <https://doi.org/10.2307/1940544>
- Riaz, A., Rasul, A., Hussain, G., Zahoor, M. K., Jabeen, F., Subhani, Z., Younis, T., Ali, M., Sarfraz, I. et Selamoglu, Z. (2018). Astragalins: A bioactive phytochemical with potential therapeutic activities. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2018, 9794625. <https://doi.org/10.1155/2018/9794625>

- Richardson, D. M. et Pyšek, P. (2006). Plant invasions: merging the concepts of species invasiveness and community invasibility. *Progress in Physical Geography: Earth and Environment*, 30(3), 409-431. <https://doi.org/10.1191/0309133306pp490pr>
- Robinson, D. (1999). Alien invasions: The effects of the global economy on non-marine gastropod introductions into the United States. *Malacologia*, 41, 413-438.
- Rollo, C. D. et Wellington, W. G. (1977). Why slugs squabble. *Natural History*, 86 (9). <http://hdl.handle.net/2246/6484>
- Rollo, C. D. et Wellington, W. G. (1979). Intra- and inter-specific agonistic behavior among terrestrial slugs (Pulmonata: Stylommatophora). *Canadian Journal of Zoology*, 57(4), 846-855. <https://doi.org/10.1139/z79-104>
- Ross, J., Ivanova, E., Severns, P. et Wilson, M. (2010). The role of parasite release in invasion of the USA by european slugs. *Biological Invasions*, 12(3), 603-610. <https://doi.org/10.1007/s10530-009-9467-7>
- Rowson, B., Anderson, R., Turner, J. A. et Symondson, W. O. C. (2014). The slugs of Britain and Ireland: undetected and undescribed species increase a well-studied, economically important fauna by more than 20%. *PLOS ONE*, 9(4), e91907. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091907>
- Runghen, R., Llopis-Belenguer, C., McNeill, M. R., Dalla Riva, G. V. et Stouffer, D. B. (2023). Using network analysis to study and manage human-mediated dispersal of exotic species. *Biological Invasions*, 25(11), 3369-3389. <https://doi.org/10.1007/s10530-023-03122-3>
- Sana, G. (2003, 9/1). Herbivory, disease and mortality of sugar maple seedlings. *Northeastern Naturalist*, 10(3), 253-268. [https://doi.org/10.1656/1092-6194\(2003\)010\[0253:HDAMOS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1656/1092-6194(2003)010[0253:HDAMOS]2.0.CO;2)
- Schoener, T. W. (1983). Field experiments on interspecific competition. *The American Naturalist*, 122(2), 240-285. <https://doi.org/10.1086/284133>
- Schroeder, F. C., González, A., Eisner, T. et Meinwald, J. (1999). Miriamin, a defensive diterpene from the eggs of a land slug (*Arion sp.*) [Article]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(24), 13620-13625. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.13620>
- Schulte, G. R. et Scheuer, P. J. (1982). Defense allomones of some marine mollusks. *Tetrahedron*, 38(13), 1857-1863. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(82\)80034-3](https://doi.org/10.1016/0040-4020(82)80034-3)
- Shucksmith, R., Cook, E. J., Hughes, D. J. et Burrows, M. T. (2009). Competition between the non-native amphipod *Caprella mutica* and two native species of caprellids *Pseudoprotella phasma* and *Caprella linearis*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 89(6), 1125-1132. <https://doi.org/10.1017/S0025315409000435>
- Smith, A. M. (2010). *Gastropod secretory glands and adhesive gels*. Vienna: Springer Vienna. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0286-2_4
- Sundseth, K., Wegefelt, S. et Dumortier, M. (2014). Invasive alien species. <https://doi.org/10.2779/69473>
- Thompson, J. E., Walker, R. P., Wratten, S. J. et Faulkner, D. J. (1982). A chemical defense mechanism for the nudibranch *cadlina luteomarginata*. *Tetrahedron*, 38(13), 1865-1873. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(82\)80035-5](https://doi.org/10.1016/0040-4020(82)80035-5)
- Torchin, M. E., Lafferty, K. D., Dobson, A. P., McKenzie, V. J. et Kuris, A. M. (2003). Introduced species and their missing parasites. *Nature*, 421(6923), 628-630. <https://doi.org/10.1038/nature01346>

- Triebskorn, R. et Ebert, D. (1989). The importance of mucus production in slugs' reaction to molluscicides and the impact of molluscicides on the mucus producing system. Dans *Slugs and snails in world agriculture* (vol. 41, p. 373-378).
- Wahidullah, S., Guo, Y. W., Fakhr, I. M. I. et Mollo, E. (2006). Chemical diversity in Opisthobranch molluscs from scarcely investigated Indo-Pacific areas. Dans G. Cimino et M. Gavagnin (dir.), *Molluscs: From Chemo-ecological Study to Biotechnological Application* (p. 175-198). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-30880-5_8.
- Wang, M., Carver, J. J., Phelan, V. V., Sanchez, L. M., Garg, N., Peng, Y., Nguyen, D. D., Watrous, J., Kapon, C. A., Luzzatto-Knaan, T., Porto, C., Bouslimani, A., Melnik, A. V., Meehan, M. J., Liu, W.-T., Crüsemann, M., Boudreau, P. D., Esquenazi, E., Sandoval-Calderón, M., Kersten, R. D., Pace, L. A., Quinn, R. A., Duncan, K. R., Hsu, C.-C., Floros, D. J., Gavilan, R. G., Kleigrew, K., Northen, T., Dutton, R. J., Parrot, D., Carlson, E. E., Aigle, B., Michelsen, C. F., Jelsbak, L., Sohlenkamp, C., Pevzner, P., Edlund, A., McLean, J., Piel, J., Murphy, B. T., Gerwick, L., Liaw, C.-C., Yang, Y.-L., Humpf, H.-U., Maansson, M., Keyzers, R. A., Sims, A. C., Johnson, A. R., Sidebottom, A. M., Sedio, B. E., Klitgaard, A., Larson, C. B., Boya P, C. A., Torres-Mendoza, D., Gonzalez, D. J., Silva, D. B., Marques, L. M., Demarque, D. P., Pociute, E., O'Neill, E. C., Briand, E., Helfrich, E. J. N., Granatosky, E. A., Glukhov, E., Ryffel, F., Houson, H., Mohimani, H., Kharbush, J. J., Zeng, Y., Vorholt, J. A., Kurita, K. L., Charusanti, P., McPhail, K. L., Nielsen, K. F., Vuong, L., Elfeki, M., Traxler, M. F., Engene, N., Koyama, N., Vining, O. B., Baric, R., Silva, R. R., Mascuch, S. J., Tomasi, S., Jenkins, S., Macherla, V., Hoffman, T., Agarwal, V., Williams, P. G., Dai, J., Neupane, R., Gurr, J., Rodríguez, A. M. C., Lamsa, A., Zhang, C., Dorrestein, K., Duggan, B. M., Almaliti, J., Allard, P.-M., Phapale, P., Nothias, L.-F., Alexandrov, T., Litaudon, M., Wolfender, J.-L., Kyle, J. E., Metz, T. O., Peryea, T., Nguyen, D.-T., VanLeer, D., Shinn, P., Jadhav, A., Müller, R., Waters, K. M., Shi, W., Liu, X., Zhang, L., Knight, R., Jensen, P. R., Palsson, B. Ø., Pogliano, K., Lington, R. G., Gutiérrez, M., Lopes, N. P., Gerwick, W. H., Moore, B. S., Dorrestein, P. C. et Bandeira, N. (2016). Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology*, 34(8), 828-837. <https://doi.org/10.1038/nbt.3597>
- War, A. R., Paulraj, M. G., Ahmad, T., Buhroo, A. A., Hussain, B., Ignacimuthu, S. et Sharma, H. C. (2012). Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signaling & Behavior*, 7(10), 1306-1320. <https://doi.org/10.4161/psb.21663>
- Watz, J. et Nyqvist, D. (2022). Interspecific competition among terrestrial slugs. *Journal of Molluscan Studies*, 88(2), eyac007. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyac007>
- White-Mclean, J. et Capinera, J. L. (2014). Some life history traits and diet selection in *Philomycus carolinianus* (Mollusca:Gastropoda:Philomycidae). *The Florida Entomologist*, 97(2), 511-522. <https://doi.org/10.1653/024.097.0223>
- Wilks, A., Rabice, S., Garbacz, H., Harro, C. et Smith, A. (2015). Double network gels and the toughness of terrestrial slug glue. *The Journal of experimental biology*, 218. <https://doi.org/10.1242/jeb.128991>
- Zaitseva, O. V. (1999). Principles of the structural organization of the chemosensory systems of freshwater gastropod mollusks. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 29(5), 581-593. <https://doi.org/10.1007/BF02461151>
- Zimmer, R. K. et Butman, C. A. (2000). Chemical signaling processes in the marine environment. *The Biological Bulletin*, 198(2), 168-187. <https://doi.org/10.2307/1542522>

