

LES ANTIPALUDIQUES DE LA MER

Ireo Ody Tazo Avy Amin'ny Ranomasina

J.L. RAZANAMPARANY, V.O. ANDRIANASOLO, P. LABOUE, R. JAMBOU,
Y. RANARIVELO et D. CORTADELLAS.

RESUME:

Pour la première fois à notre connaissance, une activité antipaludique a été décelée chez deux Invertébrés marins.

Ces deux Invertébrés, récoltés dans la région de Nosy Be, sont originaux et encore indéterminés. Il ont été confiés aux spécialistes de leurs groupes zoologiques, qui n'ont pas encore rendu leur réponse. En attendant, ils sont nommés SAMP 06 et SAMP 12 : SAMP du nom du programme scientifique qui leur a valu d'émerger (SUBSTANCES ACTIVES MARINES DE MADAGASCAR) ; 06 et 12 parce qu'ils sont le 6ème et le 12ème des 22 organismes marins chez lesquels a été recherchée une activité antipaludique.

Ces 22 Invertébrés, récoltés en plongée sous-marine, ont eux-mêmes été sélectionnés d'après les critères biologiques et bibliographiques.

L'activité antipaludique que nous avons mise en évidence chez SAMP 06 et SAMP 12 est due, dans les deux cas, à un principe actif de nature protéinique, qui a pu être purifié mais n'est pas encore analysé. C'est également la première fois, toujours à notre connaissance, qu'une activité antipaludique est rapportée de substances protéiniques.

Cette activité antipaludique a été mise en évidence "in vivo" sur des souris de laboratoire infestées par *Plasmodium berghei*, parasite murin, et "in vitro" sur des cultures de *Plasmodium falciparum*, parasite humain. Son observation doit être améliorée et confortée au fur et à mesure que nous progressons dans la connaissance de la structure de la substance active responsable dans chacun des cas.

FAMINTINANA :

Araky ny fahalalanay dia voalohany izao no nahitana fa misy hery miasa mandresy ny tazo ao amin'ny bibikely tsy misy taolana (invertébrés) ao an-dranomasina ao.

Ireo bibikely roa ireo, izay nalaina tao amin'ny faritry Nosy Be, dia miavaka sy mbola tsy voafaritra. Natolotra ny manampahaizana momban'ny biby izy ireo mba ho sokajiana araka ny toerana misy azy nefa dia mbola tsy nahazoana valiny izany hatramin'izao. Eo ampiandrasana izany dia nomena anarana hoe SAMP 06 sy SAMP 12 izy ireo : ny SAMP dia anaran'ny fandaharan'asa nahitana ny fisian'izy ireo (Substances Actives Marines de Madagascar); ny 06 sy 12 kosa dia satria izy ireo no biby tsy misy taolana faha-6 sy faha-12 amin'ireo biby an-dranomasina 22 nanaovan'ny fandaharan'asa (SAMP) fikarohana momban'ny tazo.

Ireo biby tsy misy taolana 22 ireo koa dia nofidiana araka ny sokajy "biologiques" sy "bibliographiques" misy azy avy.

Ny asa manohitra ny tazo izay nasongadina ao amin'ny SAMP 06 sy SAMP 12 dia vokatra ny toetra misy "protéine" ao aminy ka azo nodiovina nefa kosa mbola tsy voahadiady. Sambany koa, araky ny fahalalanay, no nahitana fa misy hery miasa amin'ny tazo avy amin'ny zavatra misy "protéine".

Io asa manohitra ny tazo natao fikarohana io dia nasongadina tamin-javamananaina (in vivo) avy amin'ny alalan'ny totozy misy otrik'akeritana (parasite murin) "*Plasmodium berghéi*", ary ara-pikarohana (in vitro) tamin'ny voly otrik'aretina (parasite humain) "*Plasmodium falciparum*". Mbola mila fanatsarana sy fanoharana maro, arakaraky ny fahalalana azo momba io hery miasa manohitra ny tazo io ny fandinihina tokony atao.

L'objectif du programme SAMM (Substances Actives Marines de Madagascar) est de chercher des substances antipaludiques à partir d'organismes marins.

Pour réaliser ce programme, un accord a été signé pour trois ans le 31 mai 1991 entre le CNRO (Centre National de Recherches Océanographiques - Nosy Be) et l'ORSTOM.

En fonction de cet accord, l'inventaire de la biodiversité marine, nécessaire à la connaissance des organismes marins étudiés, a été réalisée à Nosy Be. Cependant, les travaux biochimiques et pharmacologiques ont du être effectués à Antananarivo, dans les laboratoires de l'Institut Pasteur de Madagascar ainsi que dans les laboratoires de Biochimie et de Chimie des Produits Naturels de la Faculté des Sciences.

I/ BIOLOGIE MARINE

Dans sa communication, remarquablement illustrée, P. Laboute a décrit le milieu marin de la région de Nosy Be et montré sa richesse en Invertébrés marins. Pour la plupart, ces organismes, inféodés au milieu corallien, ne sont pas encore décrits.

Chacun des organismes échantillonnés est répertorié sur une fiche, est photographié "in situ" et est éventuellement mis en collection dans un liquide de conservation approprié.

Parmi les 450 espèces récoltées depuis septembre 1992, 22 ont fait l'objet de recherche d'activité antipaludique. Ces 22 organismes marins ont été sélectionnés selon des critères de nouveauté et d'originalité zoologiques.

Les quantités récoltées pour l'étude pharmacochimique varient entre 0,3 et 3 kg. Les échantillons sont numérotés de 1 à 22 puis dénommés selon un code - SAMM 01, SAMM 02, SAMM 03, etc - en attendant que leur détermination exacte soit donnée par les spécialistes des groupes zoologiques auxquels ils appartiennent.

II/ ETUDE PHARMACOCHEMIE

A/ EXTRACTION DES SUBSTANCES ACTIVES

Nous avons d'abord réalisé, à partir de ces 22 organismes marins sélectionnés, l'extraction des substances actives. Nous avons utilisé deux méthodes d'extraction à froid, par les solvants organiques d'une part, et par l'eau d'autre part.

1/ EXTRACTION PAR LES SOLVANTS ORGANIQUES

Le matériel animal décongelé est broyé. L'extraction est ensuite conduite selon la méthode classique, à savoir l'utilisation du méthanol à froid puis la méthode de partage liquide-liquide avec des solvants organiques : dichlorométhane, acétate d'éthyle, et enfin n-butanol.

2/ EXTRACTION AQUEUSE

Nous avons opté pour une simple extraction en milieu aqueux à froid, dans un rapport P/V = 3/4.

Ce mode d'extraction ayant pu être réalisé sur place à Nosy Be, les organismes marins ont été broyés frais (et non congelés) ; le broyat est agité pendant 2 heures à 4°C puis centrifugé. Le surnageant résultant, de coloration très foncée (orange ou brune), constitue l'extrait brut (E.B).

B/ ESSAIS BIOLOGIQUES

1/ ESSAIS DE TOXICITÉ

Des tests de toxicité ont été effectués sur tous les échantillons en administrant, en une seule injection intrapéritonéale, 0,5 ml d'extrait brut à des souris SWISS pesant 20 +/- 2 g.

Les extraits organiques issus de SAMM 01, 04, 05, 06, 09 et 12 ont été repris avec du DMSO 1%, puis testés biologiquement. Ils n'ont présenté aucune toxicité.

Trois extraits aqueux se sont montrés toxiques et ont provoqué la mort des souris entre 4 et 24 heures. Il s'agit de SAMM 01, SAMM 06 et SAMM 12.

Nous rappelons que les extraits organiques de ces trois mêmes échantillons n'avaient présenté aucune toxicité.

2/ ESSAIS ANTIPALUDIQUES

L'activité antipaludique a été testée "in vivo" sur un lot de 20 souris SWISS selon le protocole suivant :

- à J₀, les souris sont inoculées par voie intrapéritonéale avec Plasmodium berghei (parasite murin) ; le taux de parasitémie est de 2 %.
- à J₁, 0,25 ml d'extrait brut dilué au 1/4, ce qui constitue la dose non toxique, sont administrés aux souris "traitées" par voie sous-cutanée.

Les extraits organiques toxiques n'ont révélé aucune activité antipaludique "in vivo".

Des extraits aqueux toxiques SAMM 01, SAMM 06 et SAMM 12 testés "in vivo", seuls SAMM 06 et SAMM 12 sont actifs sur Plasmodium berghei.

L'évolution des parasites a été suivie en effectuant des frottis sanguins (méthode May Grunwald - Giemsa). Les témoins meurent entre 6 et 8 jours avec une parasitémie de 8 %, tandis que les souris traitées résistent jusqu'à 21 jours avec une parasitémie moyenne de 5,3 % (cf. tableau 1).

Les extraits organiques issus de SAMM 01, 06 et 12 n'avaient, nous le rappelons, présenté aucune toxicité.

Par la suite, nous avons délibérément négligé l'étude pharmacochimique des extraits autres que les extraits aqueux de SAMM 06 et de SAMM 12. Nous avons également cessé de récolter de nouveaux organismes marins, préférant approfondir notre étude plutôt que d'effectuer un criblage d'activités superficiel. Notre choix a été déterminé autant par des facteurs matériels (temps et moyens disponibles) que par des critères scientifiques puisque nous avons en effet la chance insigne d'avoir décelé **une activité anti-paludique dans des extraits aqueux d'Invertébrés marins encore inconnus, toutes nouveautés remarquables selon la bibliographie.**

A ce jour, d'ailleurs, la détermination zoologique des Invertébrés marins SAMM 06 et SAMM 12 est toujours à l'étude auprès des spécialistes. Nous savons seulement à quel grand groupe appartient SAMM 12, et que SAMM 06 serait probablement **un symbiote dont un des éléments appartiendrait au même grand groupe que SAMM 12. Ce dernier point est en lui-même d'un**

grand intérêt scientifique ; il semble expliquer en partie les comportements pharmacochimiques parallèles de SAMM 12 et de SAMM 06 et la sorte de "compétition" que nous avons pu noter entre ces deux substances au cours de la purification et des essais "in vitro".

Bien évidemment, compte tenu de la nouveauté et de l'intérêt potentiel de notre recherche, nous considérons pour l'instant comme confidentielles les rares indications que nous avons sur l'identité zoologique des Invertébrés SAMM 06 et SAMM 12.

C/ PURIFICATION

Nous avons voulu avoir une première idée de la nature chimique du principe actif des extraits aqueux de SAMM 06 et de SAMM 12 en les soumettant à un traitement thermique : l'extrait brut est chauffé à 70°C pendant 15 mn. Le précipité qui se forme est éliminé par centrifugation.

Le surnageant de couleur claire (jaune ou brun) n'est pas actif. Le principe actif est donc un produit thermolabile.

D'autre part, comme les extraits alcooliques de ces deux organismes n'ont révélé, on le sait, aucune toxicité, on peut en déduire que leurs principes actifs sont dénaturés par les solvants organiques.

Pour situer approximativement la masse moléculaire de ces principes actifs, nous avons dialysé une partie aliquotée de la solution. Dans les deux cas, elle n'était pas dialysable. Les substances ont donc une masse moléculaire élevée.

Partant de ces données, nous avons émis l'hypothèse de la nature protéique des substances actives antipaludiques extraites de SAMM 06 et de SAMM 12. Leur purification a été dirigée dans cette voie.

1) Dans une première étape, nous avons précipité les protéines au sulfate d'ammonium à 100 % selon la méthode de William. Le précipité obtenu est dissous dans l'eau, dialysé pendant 72 heures à 4°C, puis concentré. Le concentrat, de couleur foncée, est toxique. Il constitue l'extrait sulfate (E.S.).

2) Dans une deuxième étape, nous avons choisi une méthode de fractionnement suivant les charges en utilisant un échangeur d'anions, le DE 52 (Whatman) :

L'extrait sulfate est déposé sur ce support préalablement équilibré avec du tampon tris-HCl 50 mM pH 7,6 ; deux pics, A₁ et A₂, pour SAMM 06, et un pic, B₁, pour SAMM 12, correspondant à des substances non retenues par l'échangeur, apparaissent lors du lavage de la colonne avec le tampon précédent (cf. figure 1).

Les substances adsorbées sont éluées avec une solution NaCl 0,3 M dans le tampon d'éluion. Il en sort, pour l'une et l'autre des deux substances, un seul pic, dont les fractions sont fortement colorées.

Toutefois, seuls les pics A₁ et B₁ sont actifs.

Par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu non dénaturant, à pH 4,2, ces deux pics sont encore hétérogènes.

3) Dans une troisième étape, les fractions correspondant à A₁ et B₁ sont rassemblées séparément, dialysées contre du tampon phosphate 10 mM pH 8, puis concentrées.

Le concentrat est déposé sur CM 52 (échangeur de cations) : dans les deux cas, un seul pic apparaît lors du lavage, le pic C pour SAMM 06 et le pic D pour SAMM 12 (cf. figure 2).

En effectuant une éluion avec une solution NaCl 0,3 M dans le tampon précédent, les valeurs de densité optique (D.O.) correspondant aux substances adsorbées ne sont pas significatives. Les pics C et D sont cependant actifs.

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide de C et de D ne révèle, dans les deux cas, qu'une seule bande.

A partir de ces résultats sur DE et CM, nous pouvons estimer que le pHi de ces substances est situé entre 7,6 et 8.

4) Dans une quatrième étape, nous avons voulu vérifier l'homogénéité de ces deux produits en effectuant un fractionnement suivant la masse.

Les pics C et D sont déposés successivement sur Séphadex G-50.

Les profils d'éluion par NaCl 9 ‰ montrent deux pics : E₁ et E₂ pour SAMM 06 ; F₁ et F₂ pour SAMM 12 (cf. figure 3).

Seuls E₂ et F₂ sont toxiques.

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide à pH 4,2 montre une seule bande.

Après avoir déterminé le V₀ de la colonne G-50 en utilisant le bleu dextran 2000, nous avons constaté que la sortie de ces deux fractions est située dans le domaine de fractionnement du gel.

Compte tenu de ce résultat et de la propriété non dialysable de ces deux produits, nous pouvons conclure que leur poids moléculaire se situerait entre 12 000 et 30 000. Nous effectuerons ultérieurement une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS et en utilisant des marqueurs protéiques pour préciser le poids moléculaire de chaque substance.

La figure 4 montre les étapes successives de la purification des substances protéiques actives de SAMM 06 et de SAMM 12.

D/ DOSAGE DES PROTÉINES

Nous avons dosé le taux de protéines contenues dans les fractions actives selon la méthode de Lowry.

Au départ, SAMM 06 contient deux fois plus de protéines que SAMM 12.

Au fur et à mesure de la purification, les fractions issues de SAMM 12 contiennent à peu près quatre fois plus de protéines que celles issues de SAMM 06. En effectuant le rapport entre la quantité initiale de protéines et celle obtenue dans le produit final, on montre que le principe actif de SAMM 06 est purifié 131 fois, et celui de SAMM 12 seulement 14 fois (tableau n°2).

Les tests de toxicité ont montré que la fraction pure issue de SAMM 06 est plus toxique que celle issue de SAMM 12 : la DL 50/24 heures est en effet de 3 mg/kg pour SAMM 06 (fraction E₂) et de 15 mg/kg pour SAMM 12 (fraction F₂).

Bien que nous ayons obtenu les produits purs, nos tests antipaludiques "in vivo" et "in vitro" ont encore été réalisés sur les fractions de la deuxième étape, c'est-à-dire avec les fractions issues de la DE 52.

E/ ESSAIS "IN VIVO"

Les résultats obtenus sont synthétisés dans le tableau n°1.

F/ ESSAIS "IN VITRO"

Nous avons effectué les essais "in vitro" pour mettre en évidence la sensibilité de Plasmodium falciparum, parasite humain, aux substances SAMM 06 et SAMM 12.

Le test permet de réduire les variations, dues à l'immunité, de la réponse médicamenteuse "in vivo".

La culture de Plasmodium falciparum à partir de sang prélevé chez un malade en accès palustre est réalisée dans un milieu RPSH constitué par du RPMI et 10 % de sérum humain.

Chacun des 96 puits de la microplaque à fond plat utilisée contient 700 µl de mélange RPSH - culot à 4 % d'hématocrite.

Les concentrations croissantes des fractions actives de SAMM 06 et SAMM 12 issues de la DE 52 sont introduites en triplicate dans les puits.

Trois puits servent de témoins.

La plaque sera ensuite mise en incubation à 37°C, 5 % de CO₂ et O₂.

On laisse les parasites exposés aux substances à tester pendant 24 heures, puis 25 µl d'hypoxanthine tritiée sont introduits dans chaque puits.

La plaque est incubée pendant 42 heures, puis la culture est arrêtée par congélation à - 80°C.

Après décongélation, les échantillons sont collectés par filtration sur des petits disques de papier filtre. Ces papiers filtres sont introduits dans des flacons où ont été versés préalablement 2 ml de liquide scintillant.

L'hypoxanthine tritiée s'incorpore dans le DNA des parasites dont la maturation n'est pas inhibée avant de passer au comptage.

Une inhibition de la maturation des schizontes de la souche en culture est estimée par la diminution de l'incorporation, dans leur DNA, de l'hypoxanthine tritiée présente dans le milieu. Les concentrations inhibitrices sont calculées à partir des concentrations croissantes des substances à tester (cf. figure 5).

On observe par ce procédé qu'une inhibition de la maturation des schizontes de la souche en culture est produite par les

substances SAMM 06 et SAMM 12 qui se fixent sur les hématies parasitées.

CONCLUSION

Il nous reste encore à réaliser la détermination de la CI 90.

Le test "in vitro" sera refait avec le produit pur.

Nos résultats actuels montrent que SAMM 06 inhibe "in vitro" la maturation du Plasmodium falciparum à 57,11 % ; SAMM 12 inhibe "in vitro" le Plasmodium falciparum à 49,27 % (cf. tableau 3).

Au stade actuel de nos travaux, nous pouvons estimer que ces produits, que nous appelons par extension du même nom de code que leurs organismes marins d'origine, SAMM 06 et SAMM 12, ont une activité antipaludique.

Or nous avons vu que le rapport rendement en substance protéique/activité "in vitro" s'inverse au cours de l'expérience, et que l'organisme le plus purifié contenant le moins de protéines, SAMM 06, s'avère plus actif "in vitro" que SAMM 12.

Nous devons donc dès lors considérer que les substances pures de nature protéinique SAMM 06 et SAMM 12 sont, malgré leur apparent parallélisme, de structures différentes et que cette différence de structure crée la différence d'activité.

Il est essentiel, de notre point de vue, de réaliser, dès que possible et en parallèle avec la confirmation et l'étude approfondie de l'activité antipaludique, l'analyse et la séquence des acides aminés qui composent les substances protéiniques SAMM 06 et SAMM 12.

Nous ne pouvons que regretter que l'ORSTOM ait dû, faute "des compétences requises", se retirer du programme SAMM. Nous espérons que "la qualité (des) travaux" déjà réalisés, qui "n'est nullement remise en cause" et que l'équipe SAMM survivante entend bien faire progresser, retiendra l'attention de la communauté scientifique.

Tableau n°1

EVOLUTION DES FORMES PARASITAIRES
AU COURS DU TRAITEMENT AVEC LES FRACTIONS ACTIVES
DE SAMM 06 ET SAMM 12

TÉMOINS	<--- SOURIS --->	TRAITÉES
J ₁ (Parasitémie 2% (Trophozoïtes jeunes et âgés (Microgamétocytes jeunes (Schizontes jeunes immatures	J ₁	idem
J ₇ (Hématies parasitées éclatée (Microgamétocytes mâles mûrs (Trophozoïtes âgés (Schizontes jeunes immatures (Parasitémie 8 %	J ₇	(Pas d'hématies éclatées (Prédominance de schizontes (Trophozoïtes + polyparasitis (Parasitémie 4,4 %
MORT DES SOURIS TÉMOINS	J ₉	(Trophozoïtes + polyparasitis (Microgamétocytes mûrs (Schizontes immatures
	J ₁₁	(Prédominance de schizontes (Microgamétocytes mâles jeunes et mûrs (Trophozoïtes + polyparasitis
	J ₁₂	(Schizontes mûrs (Schizontes en division (Trophozoïtes jeunes
	J ₁₇	(Schizontes jeunes et mûrs (Trophozoïtes jeunes et âgés (Macrogamétocytes
	J ₂₁	(Prédominance de schizontes (jeunes et immatures (Parasitémie 5,3 %
		MORT DES SOURIS TRAITÉES

Tableau n°2

RENDEMENT PROTÉIQUE

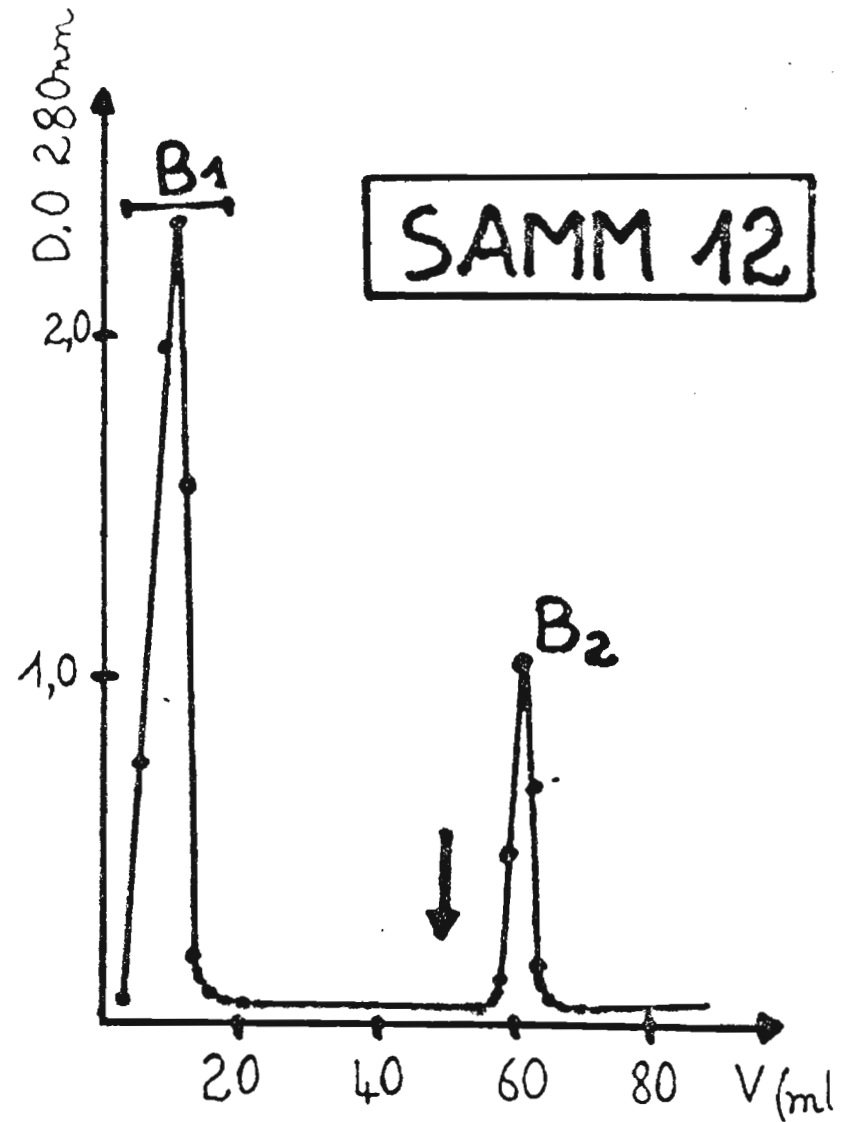
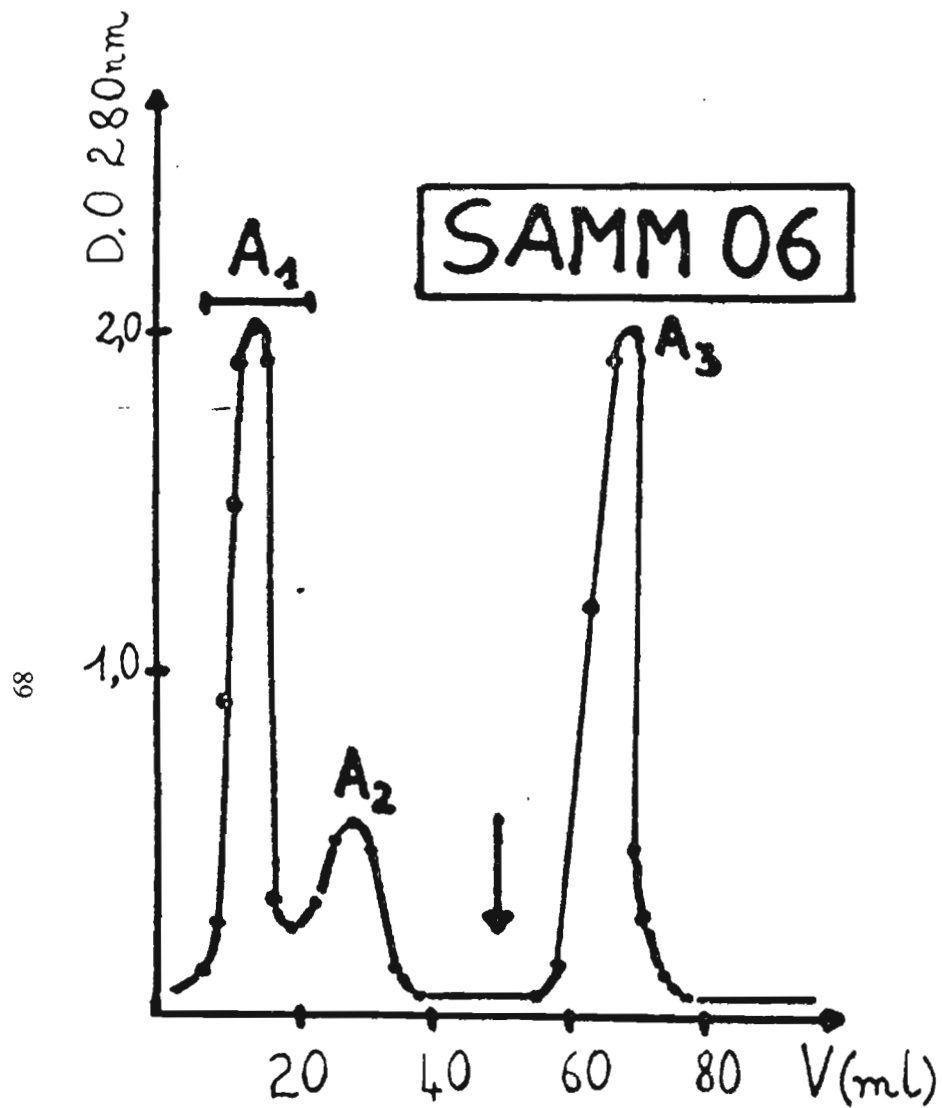
ÉTAPES	VOLUME (ML)	PROTÉINES (MG/ML)	PROTÉINES TOTALES (MG)	%	TAUX DE PURIFICATION
E.S	65,2	SAMM 06 16,25	1053,5	100	X 1
		SAMM 12 7,93	511	100	X 1
DE-52	64	SAMM 06 0,18	11,52	1,1	X 98
		SAMM 12 0,68	43,52	8,5	X 12
CM-52	64	SAMM 06 0,13	8,32	0,80	X 126
		SAMM 12 0,59	37,76	7,36	X 13,5
G-50	64	SAMM 06 0,125	8,0	0,76	X 131
		SAMM 12 0,58	37,12	7,26	X 14

Tableau n° 3

ESSAIS "IN VITRO"

INHIBITION DU PLASMODIUM FALCIPARUM PAR SAMM 06 ET SAMM 12

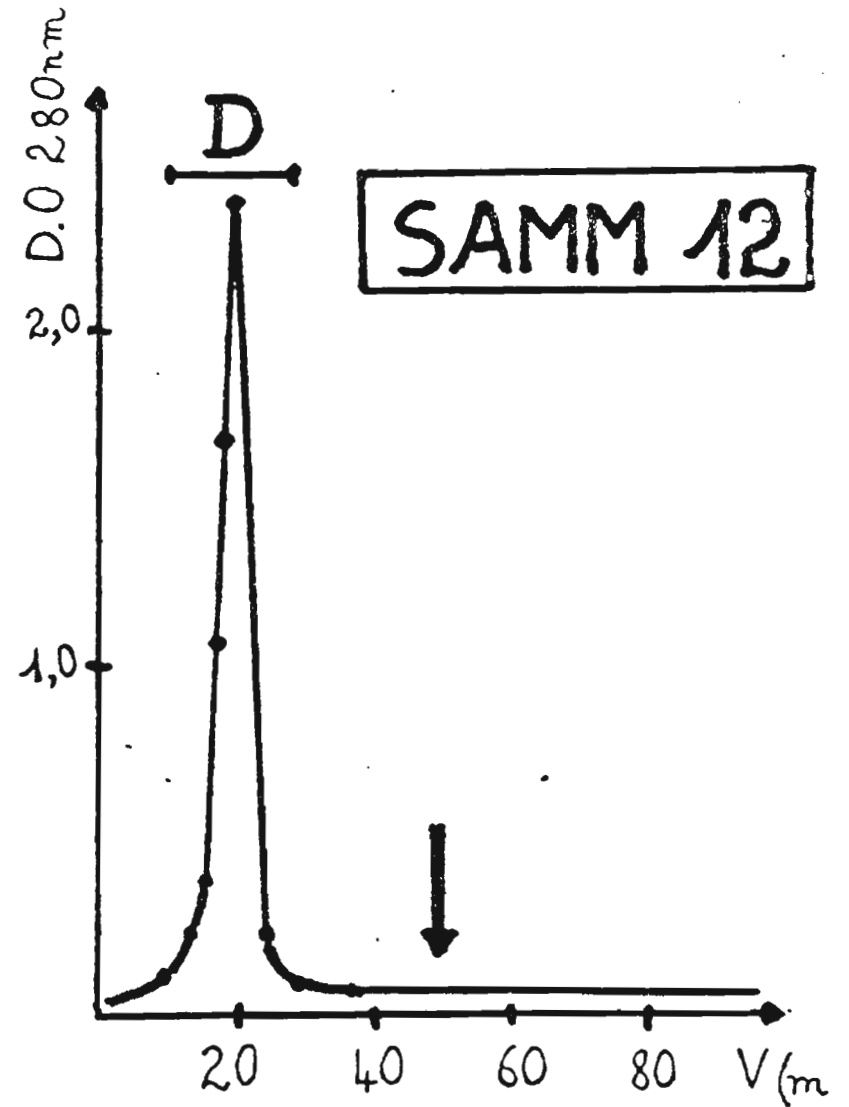
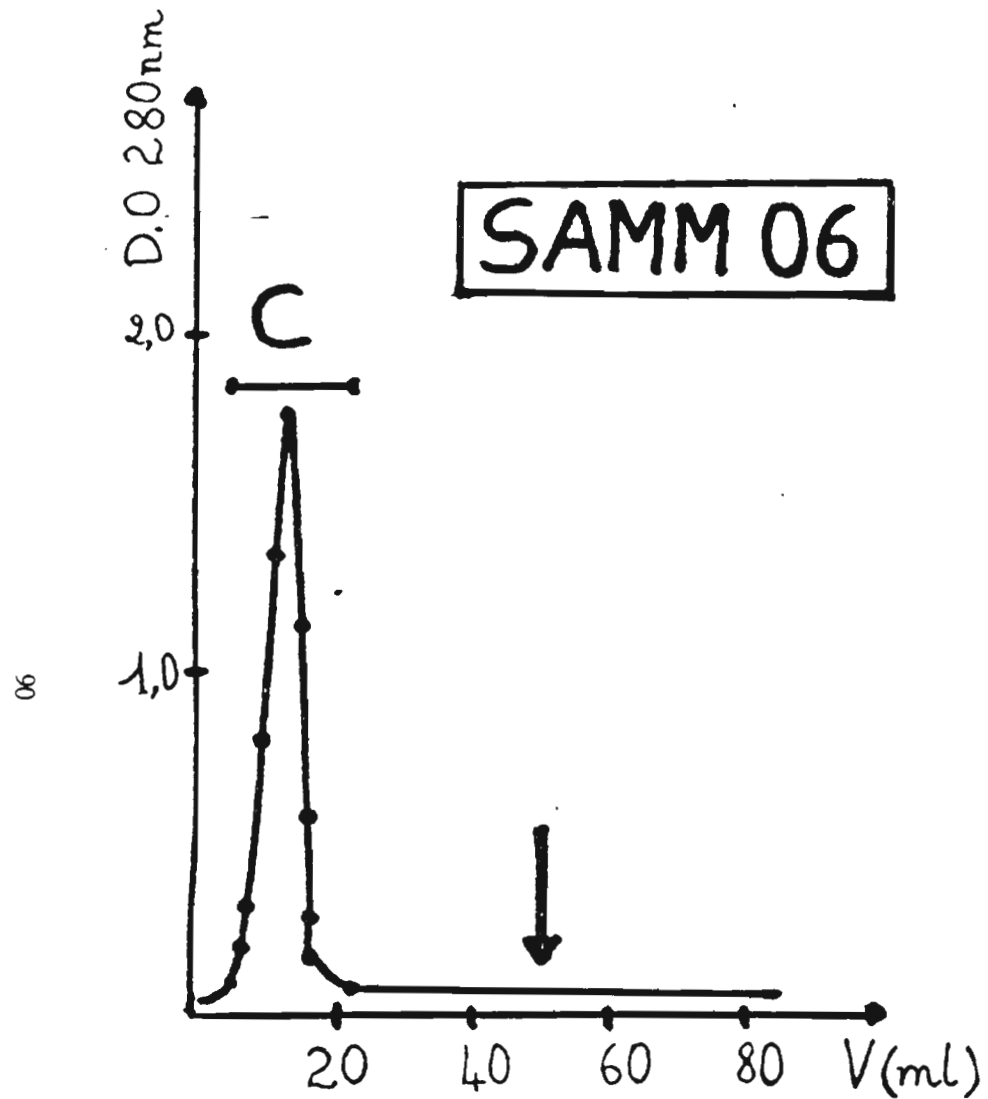
PRODUIT	DOSE (µG/ML)	% PARASITES VIVANTS	% D'INHIBITION
SAMM 06	0 (témoin)	100	0
	$1,25 \cdot 10^{-3}$	74,54	25,46
	$6,25 \cdot 10^{-3}$	69,32	30,68
	$62,50 \cdot 10^{-3}$	56,18	43,82
	$625,00 \cdot 10^{-3}$	42,89	57,11
SAMM 12	0 (témoin)	100	0
	$2,4 \cdot 10^{-3}$	76,35	23,65
	$4,8 \cdot 10^{-3}$	67,90	32,10
	$11,5 \cdot 10^{-3}$	65,35	34,65
	$23,0 \cdot 10^{-3}$	50,73	49,27



CHROMATOGRAPHIE SUR DE 52 A PH 7.6
DES EXTRAITS SULFATES.

— FRACTION ACTIVE

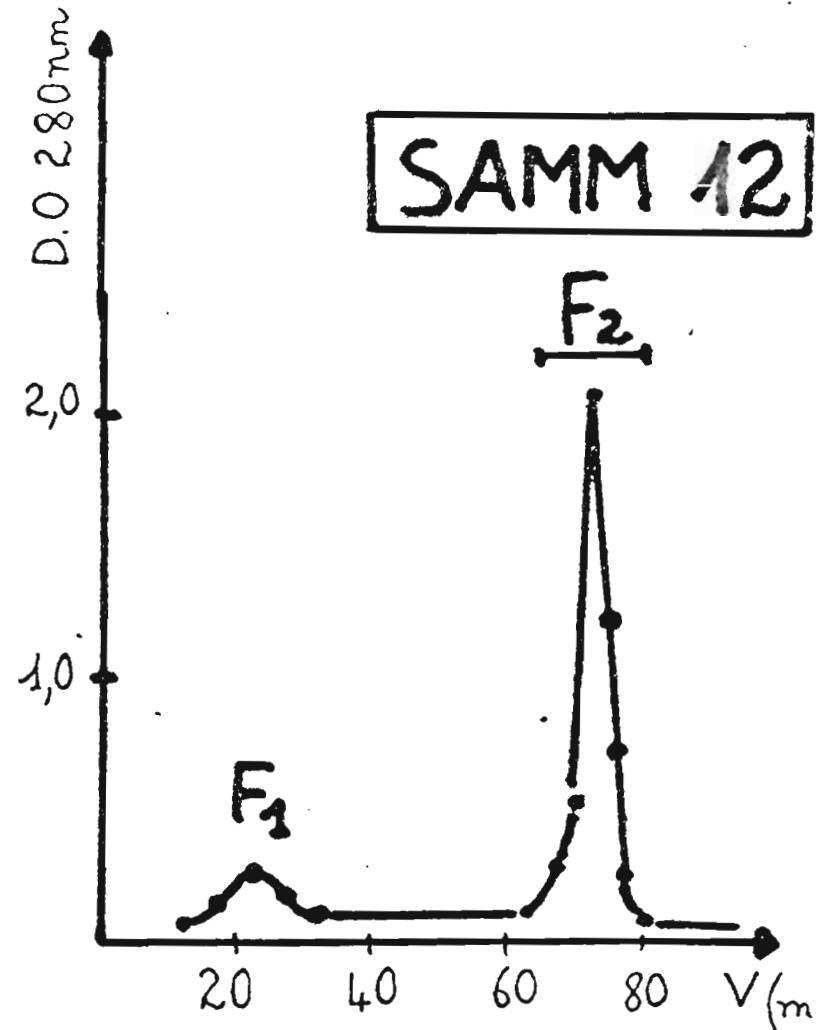
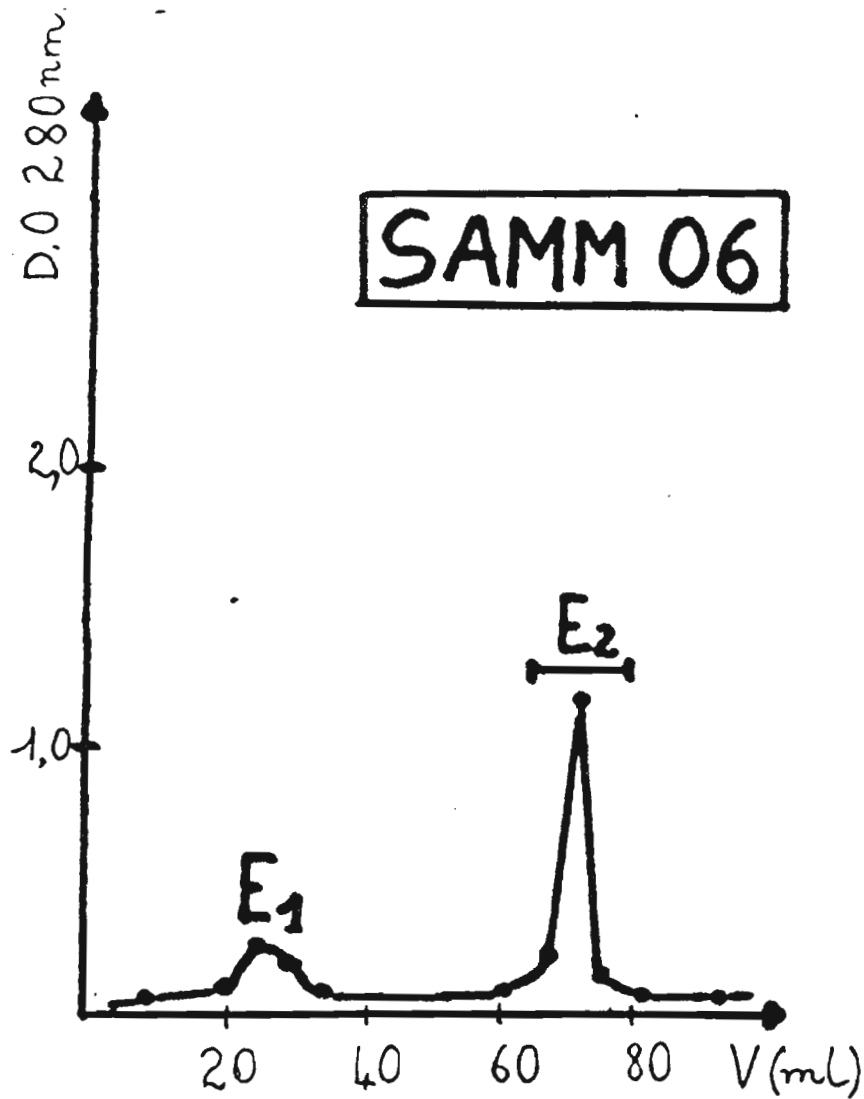
(FIGURE 1)



CHROMATOGRAPHIE SUR CM 52 A PH 8 DES FRACTIONS A₁ ET B₁.

— FRACTION ACTIVE

(FIGURE 2)



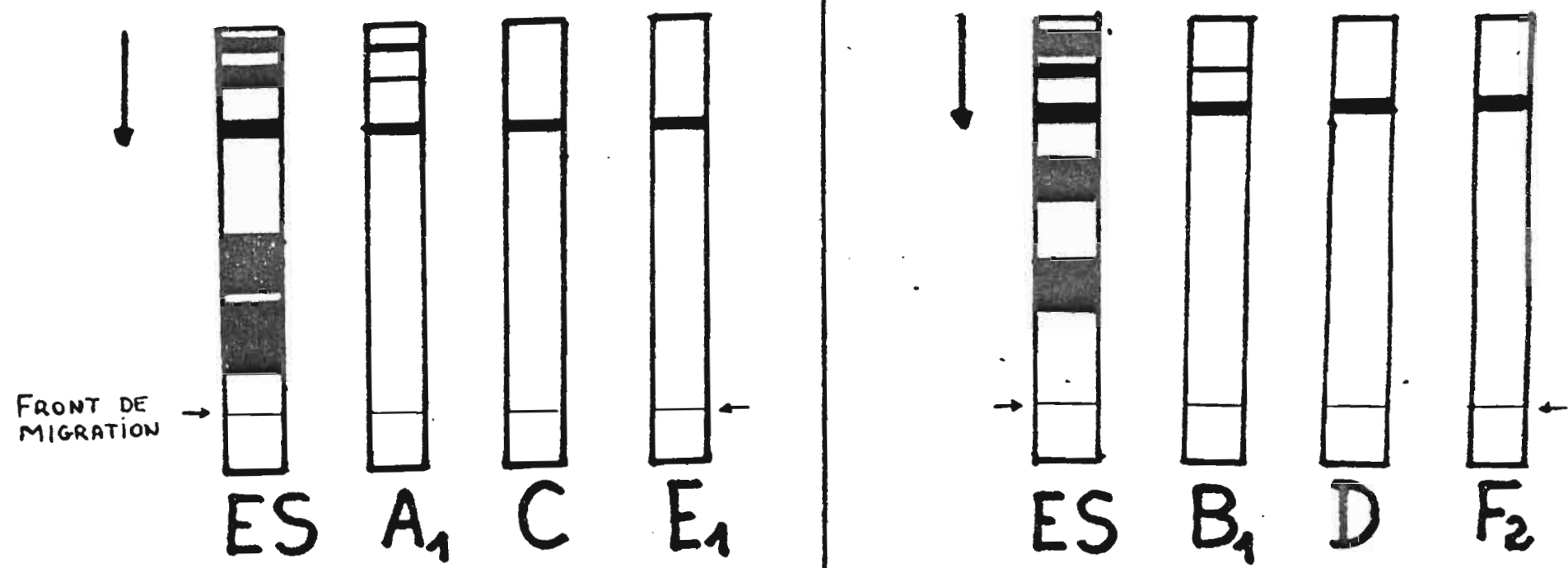
CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE
SEPHADEX G-50 DES FRACTIONS C ET D

— . FRACTION ACTIVE

(FIGURE 3)

SAMM 06

SAMM 12



92

ELECTROPHORÈSE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE EN MILIEU NON DENATURANT A PH 4,2 DES FRACTIONS ACTIVES.

(FIGURE 4)

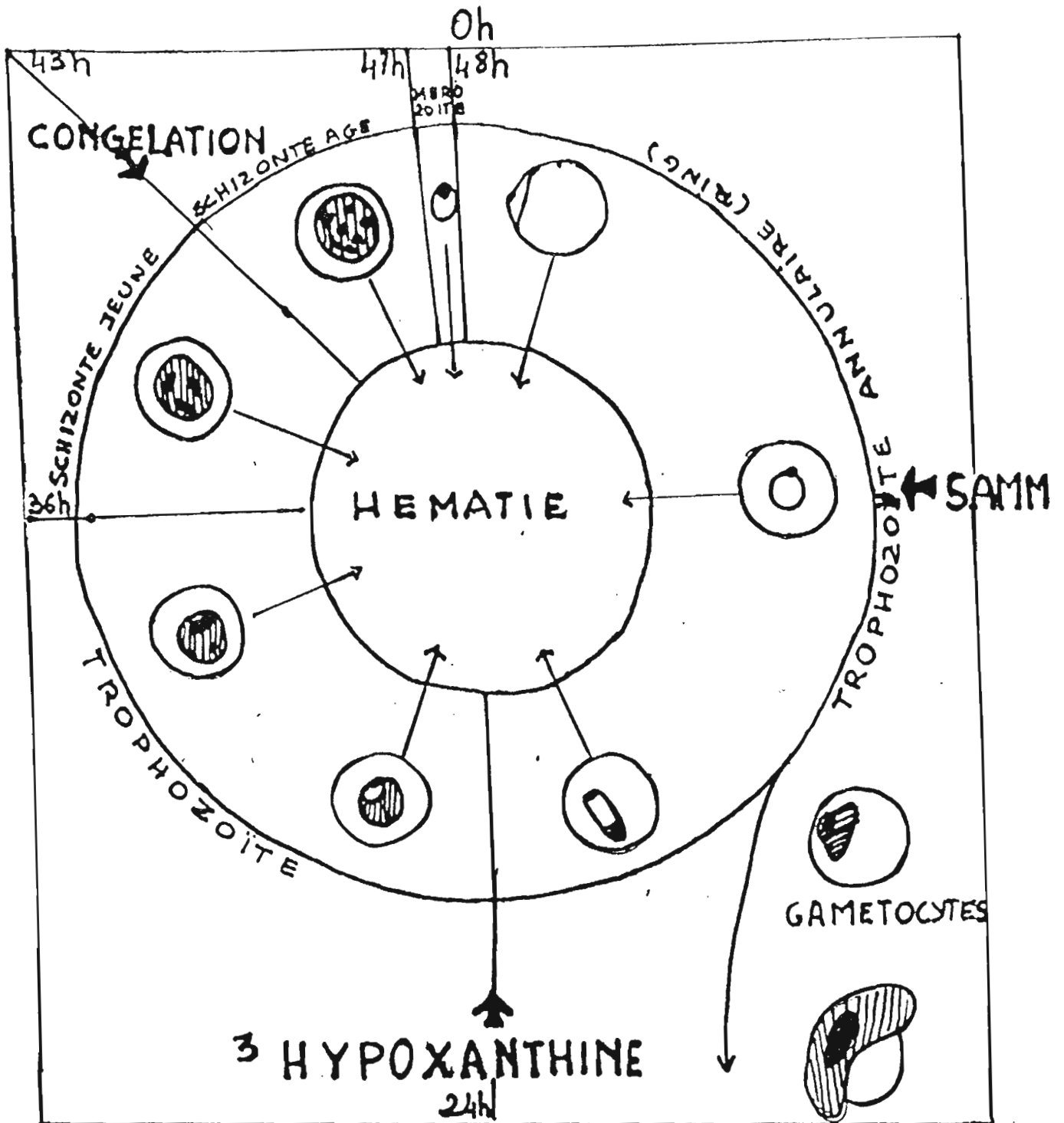


SCHÉMA DU MÉCANISME D'ACTION
 DES SUBSTANCES ÉTUDIÉES SAMM 06 ET 12
 SUR LES HÉMATIES PARASITÉES.

(FIGURE 5)

REPOBLIKAN' I MADAGASIKARA
Tanindrazana-Fahafahana-Fahamarinana

BULLETIN
DE
L'ACADEMIE NATIONALE
MALGACHE
NUMERO SPECIAL

DU 50ème ANNIVERSAIRE
DE
L'ORSTOM

*Institut Français de Recherche Scientifique
pour le Développement en Coopération*
1994

ANTANANARIVO
1995