

MEMOIRES DE DEA
SCIENCES DE LA VIE
PHARMACOLOGIE

1992

Criblage biologique par méthode de binding
appliqué aux organismes marins
Etude chimique préliminaire
de quatre organismes sélectionnés

Aude VASSAS

Université de Nantes
Chimie Fine

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES

en

CHIMIE FINE

CRIBLAGE BIOLOGIQUE PAR METHODE DE BINDING
APPLIQUE AUX ORGANISMES MARINS.
ETUDE CHIMIQUE PRELIMINAIRE DE QUATRE ORGANISMES
SELECTIONNES

Aude VASSAS

Année 1992-1993



[Handwritten notes and signatures in the bottom section of the page, including numbers like 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200.]

© ORSTOM, Nouméa, 1992

Vassas, A.

Criblage biologique par méthode de binding appliqué aux organismes marins. Etude chimique préliminaire de quatre organismes sélectionnés
Nouméa : ORSTOM. Août 1992. 63 p.
Mém. DEA : Sci. Vie : Pharmacol.

Ø35SUBSANØ2

PHARMACOCHEMIE ; INVERTEBRE AQUATIQUE ; CRIBLAGE BIOLOGIQUE ; ACTIVITE BIOLOGIQUE ; BINDING / NOUVELLE CALEDONIE

Imprimé par le Centre ORSTOM
de Nouméa
Août 1992

 ORSTOM Nouméa
REPROGRAPHIE

à mes parents, en Métropole

SOMMAIRE

INTRODUCTION	p.9
I. EXPERIENCE DE LIAISON	p.11
1 . Principe	P.13
2 . Choix des récepteurs	P.14
3 . Application de la technique de binding	
AUX ORGANISMES MARINS	p.16
3.1 Obtention des extraits A, B, C	p.16
3.2 Traitement des extraits	p.16
3.2.1. <i>Qualité de l'échantillon</i>	p.16
3.2.2. <i>Intégrité des ligands radioactifs et froids</i>	p.17
3.2.3. <i>Utilisation de solvants appropriés</i>	p.17
3.3 liaison aux récepteur	p.19
4 . Résultats	p.19
5 . Discussion	p.21
6 . Choix des organismes à étudier	p.22
II. ETUDE CHIMIQUE DES 4 ORGANISMES SELECTIONNES	p.25
1 . <u><i>Xestospongia</i></u> <i>sp.</i>	p.27
1.1 Activité biologique des différentes récoltes sur les récepteurs de la somatostatine	p.27
1.2 Travaux antérieurs effectués sur le genre <i>Xestospongia</i>	p.27
1.3 Extraction des alcaloïdes	p.29
1.4 Résultat du test de binding	p.30
1.5 Conclusion	p.30
2 . <u><i>Tedania</i></u> <i>sp.</i>	p.31
2.1 Activité des différentes récoltes sur les récepteurs du VIP	p.31
2.2 Travaux antérieur effectués sur le genre <i>Tedania</i>	p.31
2.3 Fractionnement de l'extrait C	p.32
2.4 Résultats du test de binding	p.33
2.5 Conclusion	p.33

3 . <u><i>Pectinia lactuca</i></u>	p.34
3.1 Activité biologique des différentes récoltes sur les récepteurs du CGRP	p.34
3.2 Travaux antérieurs effectués sur le genre <i>Pectinia</i>	p.34
3.3 Fractionnement de l'extrait C	p.34
3.4 Résultats du test de binding	p.35
3.5 Etude des fractions positives	p.35
3.6 Fractionnement de "f"	p.37
3.7 Résultats du test de binding des fractions issues de "f"	p.38
3.8 Etude des fractions issues de "f"	p.39
3.9 Conclusion	p.39
4. <u><i>Tripneustes gratilla</i></u> (Linné, 1758)	p.40
4.1 Activité biologique de différentes récoltes sur les récepteurs du CGRP	p.40
4.2 Travaux antérieurs effectués sur le genre <i>Tripneustes</i>	p.40
4.3 Fractionnement de l'extrait C	p.40
4.4 Résultats du test de binding	p.41
4.5 Etude des fractions positives d et e	p.41
4.6 Etude des fractions positives q et r	p.41
4.6.1. <i>Fractionnement</i>	p.41
4.6.2. <i>Résultats du test de binding</i>	p.42
4.7 Etude des fractions issues de q2 et q5	p.44
4.7.1. <i>Etude de la fraction q2</i>	p.44
4.7.2. <i>Etude de la fraction q5</i>	p.44
4.8 Conclusion	p.45
CONCLUSION GENERALE	p.47
ANNEXES	p.49
annexe 1	p.51
annexe 2	p.57
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	p.63

Cette étude a été réalisée au Centre ORSTOM de Nouméa, plus particulièrement au sein du laboratoire de pharmacologie, au cours d'un stage de recherche dans le cadre du D.E.A en Chimie Fine de l'Université de Nantes.

Que Monsieur Jarrige, directeur du centre ORSTOM de Nouméa, reçoive ici l'expression de mes remerciements pour m'avoir accueillie et avoir facilité le déroulement de mon stage.

Je remercie également les responsables scientifiques qui m'ont soutenu tout au long de mon travail. Que Madame Bourdy et Mademoiselle Debitus à Nouméa, Monsieur Verbist à Nantes et Monsieur Lavayre à Vitry sur Seine, soient convaincus de ma profonde gratitude pour leurs encouragements, aide et conseils.

Je tiens à remercier tout particulièrement Madame Geneviève Bourdy, qui a accepté d'encadrer mes travaux et m'a fait profiter de son expérience ainsi que de son amitié. Mon séjour à Nouméa n'en a été que plus agréable. Merci Gène!

Je remercie le Service de Screening du Centre de Recherche de Rhône-Poulenc Rorer à Vitry-sur-Seine dirigé par Monsieur Lavayre pour leurs encouragements depuis la Métropole, leur aide et leur grande disponibilité. Merci à Jean-Jacques pour tous ces échantillons testés dans les plus brefs délais...

Je tiens à remercier tous les membres du Laboratoire de Pharmacologie pour leur amitié et leur soutien. Mes remerciements s'adressent également à tous ceux du Centre ORSTOM (chercheurs, techniciens, VAT, stagiaires et plongeurs) qui, par leur gentillesse, leur humour et leur bienveillance, ont rendu mon séjour agréable.

Introduction

La pharmacologie marine a depuis quelques années, pris une rapide expansion. De nombreux composés inconnus chez les espèces végétales ont été identifiés chez des organismes marins. Ces substances ont permis de progresser dans la compréhension de processus physiologiques humains, notamment la connaissance des structures cellulaires. En santé humaine, des médicaments d'origine marine sont utilisés. Citons, entre autres, la cytosine arabinoside (ARA-C®), isolé de l'éponge *Cryptotethia crypta*, a activité antitumorale.

La richesse du lagon néo-calédonien (un des plus riches au monde) ainsi que son accessibilité ont été des facteurs déterminants dans l'implantation du programme SMIB (Substances Marines d'intérêt Biologique)¹ en Nouvelle-Calédonie. Le domaine des récoltes a été étendu des récifs et du lagon néo-calédonien aux monts sous-marins de la zone économique et à l'archipel des Chesterfield.

Le programme SMIB vise à examiner de façon systématique par criblage biologique ("screening") l'action pharmacologique potentielle des substances retirées d'organismes marins et principalement des invertébrés.

Un pré-criblage est effectué à Nouméa, cherchant à mettre en évidence des activités antibactériennes, cytotoxiques, antiherpétiques, antispasmodiques, enzymatiques, antifongiques, phytotoxiques, acaricides, nématocides et de toxicité générale sur *Artemia salina*.

En Janvier 1991, dans le cadre du stage de fin d'études de Pharmacie industrielle, j'ai participé à ce programme. Lors de ce stage, sous la direction de Mme Bourdy, nous avons adapté la technique de binding aux organismes marins récoltés à Nouméa.

276 organismes marins ont été traités à Nouméa puis testés sur 5 récepteurs dans le laboratoire de biologie-screening de Rhône-Poulenc Rorer de Vitry sur Seine.

A la suite de ce stage de fin d'études, il m'a été proposé d'approfondir cette recherche en faisant l'étude chimique, dans le laboratoire de Nouméa, de quatre organismes marins apparaissant comme particulièrement intéressants.

¹Ce programme du département Santé de l'ORSTOM (UR4G), se déroule en collaboration avec le CNRS et Rhône-Poulenc Rorer.

I. EXPERIENCE DE LIAISON

1. PRINCIPE

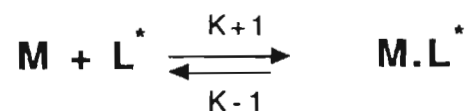
Le binding, ou expérience de liaison, est une technique qui a rapidement progressé dans les années 70 grâce au développement des ligands tritiés et iodés. Elle est maintenant couramment utilisée et supplante la technique des organes isolés.

Cette technique permet de détecter dans un broyat tissulaire un récepteur pour un ligand donné. C'est une **reconnaissance spécifique** d'une molécule de nature glycoprotéique et membranaire avec le ligand. Cette interaction induit un évènement cellulaire par l'intermédiaire d'un système de transduction membranaire plus ou moins complexe (protéines G) et modifie le comportement de la cellule. La technique de binding ne permet pas de savoir si le ligand utilisé est agoniste ou antagoniste.

L'application de cette technique aux organismes marins vise à mettre en évidence une ou plusieurs molécules non protéiques pouvant jouer le rôle de ligand par rapport à un récepteur connu. La nature non protéique des molécules recherchées est un facteur déterminant car cela permet d'éviter l'action dégradante des enzymes digestifs.

Les différentes étapes de cette technique sont les suivantes:

1) Un ligand radioactif va se lier aux sites spécifiques et non spécifiques d'une molécule A. On obtient par lecture au compteur à scintillation le binding total (BT).



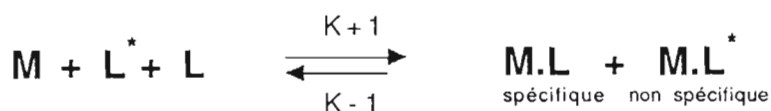
M: préparation contenant les récepteurs

L*: ligand radioactif

K: constante de dissociation

La liaison du ligand sur les membranes peut être **non spécifique**, c'est-à-dire que le ligand se fixe sur des sites qui sont autres que le site récepteur. Ces sites ne sont **pas saturables**, ils sont en **nombre infini** par rapport au nombre de sites spécifiques récepteurs et ils ont **une faible affinité**.

2) En ajoutant une **concentration importante** de ligand non marqué, on va déplacer uniquement le ligand radioactif lié aux sites spécifiques. On obtient donc à la lecture du compteur, le binding non spécifique (BNS), inférieur au binding total.



3) Après séparation par un moyen approprié du ligand lié aux membranes et du ligand libre à l'équilibre, la radioactivité du binding total (BT) et du binding non spécifique (BNS) est mesurée. Par différence on obtient le binding spécifique (BS). Par calcul on définit le % d'inhibition (ou % de déplacement) et le % de fixation. A partir de ces résultats on peut mettre en évidence une interaction d'une molécule X non protéique avec les récepteurs d'une molécule A .

Calculs: BT - BNS = BS

$$\% \text{ de fixation} = \frac{\text{moyenne du composé X} - \text{BNS}}{\text{BS}} = Y$$

$$\% \text{ d'inhibition} = 1 - Y$$

2. CHOIX DES RÉCEPTEURS

Parmi les 23 récepteurs testés par Rhône-Poulenc Rorer à Vitry sur Seine, nous en avons retenu 5, qui sont considérés comme des "leaders" par ce laboratoire, en raison de leur intérêt médical. Ce sont les récepteurs du vasoactive intestinal peptide (VIP), de la somatostatine, du neuropeptide Y, du calcitonine gene related peptide (CGRP) et de la neurotensine .

Le VIP, présent dans les cellules du cortex est un neurotransmetteur du système nerveux central; il intervient au niveau du passage du Ca⁺⁺ dans les cellules et sur les métabolites de la lipoxygénase. Les récepteurs au VIP, par leur action sur la synthèse de l'AMPC, amplifient le message de différents neurotransmetteurs comme la

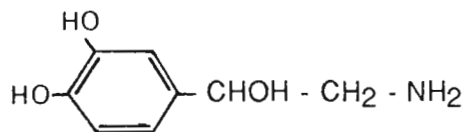
noradrénaline, l'histamine et le GABA (Fig. 1). Enfin il joue un rôle très important dans la régulation locale du métabolisme du cortex cérébral en stimulant la glycogénolyse et en modifiant le flux sanguin cortical (1).

La somatostatine est une hormone polypeptidique sécrétée par différents tissus notamment l'hypothalamus et le pancréas. Elle intervient dans la régulation du glucose sanguin et agit sur l'hormone de croissance. Cette hormone joue donc un rôle fondamental sur la croissance et le diabète (2).

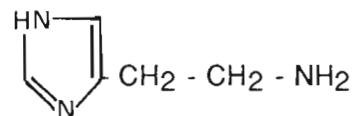
Le neuropeptide Y est un agent participant à la formation des graisses. En se liant sur son récepteur, il inhibe la lipolyse et favorise l'embonpoint (3). Il agirait aussi de façon centrale sur la tension artérielle provoquant une hypotension et une bradycardie suite à une interaction avec les adrénorécepteurs alpha 2. Son action a aussi été démontrée sur l'hormone de croissance et l'hormone lutéinisante (4).

Le CGRP dont la pharmacologie est encore mal définie est un polypeptide provoquant au niveau du cortex une action antipsychotique et analgésique (5).

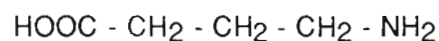
La neurotensine est un peptide isolé de l'hypothalamus et du cortex cérébral en général. C'est aussi un neuromédiateur du SNC où il agit comme analgésique. Son rôle est déterminant dans la relaxation des muscles lisses de l'iléon de cobaye (2).



Noradrénaline



Histamine



GABA

Figure 1: Neurotransmetteurs modifiés par l'action du VIP

3. APPLICATION DE LA TECHNIQUE DE BINDING AUX ORGANISMES MARINS

3.1. Obtention des extraits A, B, C

Les organismes récoltés sont immédiatement congelés à bord des navires. Un échantillon zoologique est envoyé aux spécialistes taxonomistes (Museum d'Histoire Naturelle, Paris) et un échantillon est conservé dans la zoothèque de Nouméa.

De retour à Nouméa, ils sont broyés et lyophilisés. La poudre sèche est divisée en 2 lots pour subir 2 types d'extractions (Fig. 2):

- extrait A: la poudre lyophilisée est extraite 3 fois par de l'eau distillée à 4°C, à l'obscurité (3X1l pour 300g équivalent-frais); l'extrait est centrifugé à 4°C et lyophilisé après être débarrassé du culot.

- extraits B et C: la poudre lyophilisée est extraite une fois avec de l'éthanol à 80%, puis 2 fois par de l'éthanol à 96% à température ambiante, sous agitation mécanique (volume de solvant de 2l pour 600g équivalent-frais); les extraits sont réunis et l'alcool est évaporé sous vide.

Le résidu obtenu est repris par de l'eau distillée (1l pour 600g équivalent-frais), et extrait jusqu'à épuisement par plusieurs fractions de chlorure de méthylène. Les phases organiques sont réunies et séchées sur sulfate de sodium anhydre; l'évaporation du solvant fournit l'extrait C. La phase aqueuse est "dégazée" sous vide et lyophilisée; le lyophilisat est repris par de l'éthanol absolu, filtré. L'élimination de l'alcool sous pression réduite jusqu'à poids constant permet d'obtenir l'extrait B.

3.2. Traitement des extraits

Ce test de binding est soumis à l'action de nombreux artefacts, c'est pourquoi la qualité de l'échantillon, l'intégrité des ligands radioactifs et froids et l'utilisation de solvants appropriés sont primordiaux.

3.2.1. Qualité de l'échantillon

De par la nature chimique de l'extrait, de nombreux constituants intrinsèques à l'échantillon peuvent être à l'origine de résultats faussement positifs ou perturber l'expérience de binding (6):

Les enzymes: protéases, lipases, glycosidases, oxydases... dénaturent les molécules protéiques présentes lors de la réalisation du test, tels les récepteurs et le ligand.

Les sels: en excès, ils interfèrent sur la liaison du récepteur avec son ligand.

Les lipides: ils peuvent avoir un rôle détergent sur la membrane supportant les récepteurs. Cette réaction peut entraîner une réponse anormalement élevée. L'effet est dit stimulateur, le résultat enregistré est négatif. La réponse peut aussi être anormalement faible et dans ce cas une réponse faussement positive sera mise en évidence.

Les molécules ramifiées: certaines molécules ramifiées peuvent piéger le ligand radioactif durant le test. La réponse radioactive sera très élevée (résultat négatif, effet stimulateur).

3.2.2. Intégrité des ligands radioactifs et froids

Les peptides utilisés comme ligands radioactifs et froids à des concentrations très faibles doivent rester stables lors de la manipulation. Les phénomènes de dégradation, d'oxydation, d'absorption, d'insaturations non spécifiques avec l'échantillon perturberont l'expérience de binding. Les paramètres inhérents au test (température, pH du milieu d'incubation) jouent, à ce niveau, un rôle primordial.

3.2.3. Utilisation de solvants appropriés

Les polyéthers, détergents et autres substances organiques peuvent dégrader ou interagir sur les récepteurs. Seuls le méthanol (10% vol. maximum) et l'eau peuvent être utilisés.

C'est pourquoi les échantillons doivent subir un traitement permettant d'éliminer le maximum de ces artéfacts tout en gardant la diversité structurale contenue dans les organismes marins.

Une technique simple de déprotéinisation² et de dessalage a été pratiquée sur les extraits A et B, (dessalage seulement sur les extraits C) des 276 organismes traités (7), (8), (9) (Fig. 2). Nous travaillons sur 20mg d'extrait.

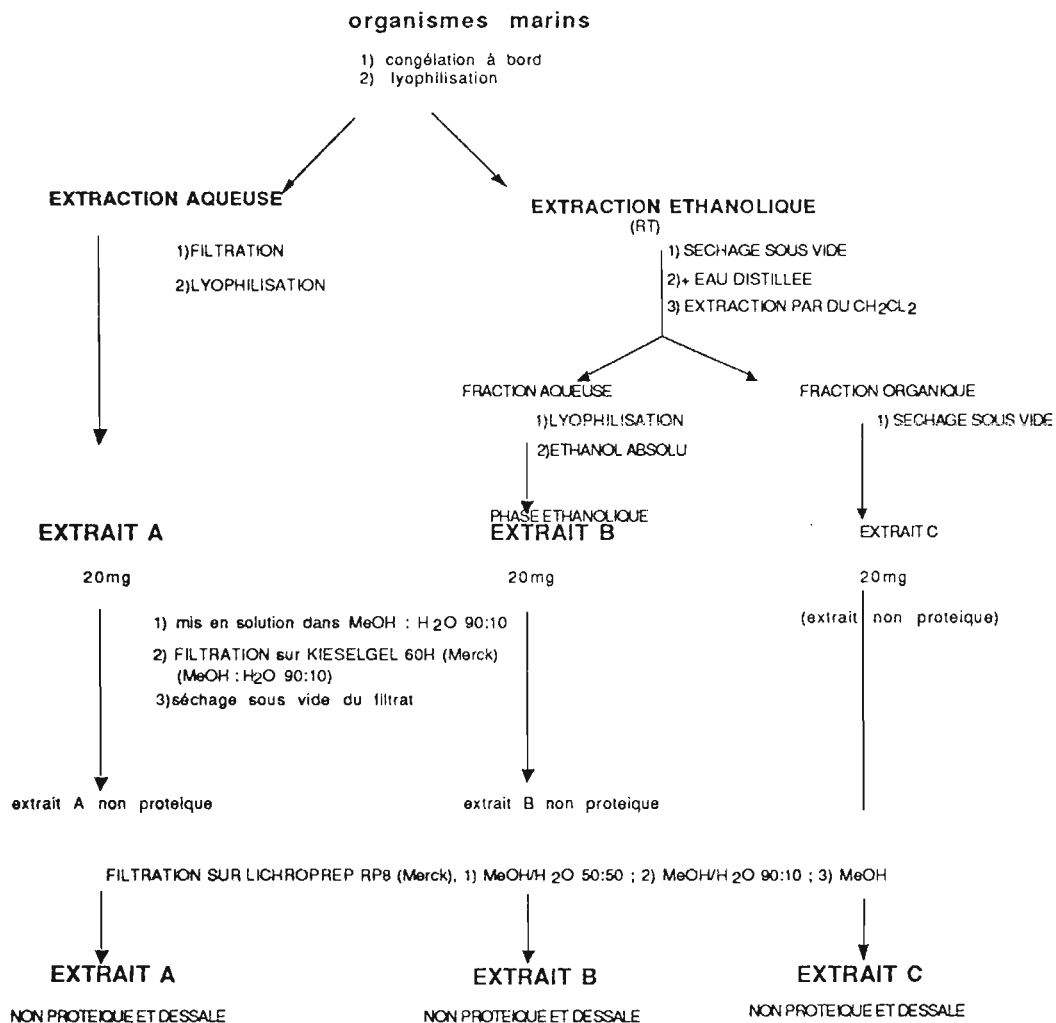


Figure 2: traitement des extraits

² La présence des protéases peut être mise en évidence par un test utilisant un film photographique (16). Par la suite nous avons appliqué ce test à quelques échantillons très fortement inhibiteurs et non spécifiques d'un récepteur (extraits 719, 730, 782). Aucune activité protéolytique n'a été mise en évidence.

3.3. Liaison aux récepteurs

La préparation des membranes et la liaison au récepteur "binding" se font selon des techniques standard, décrites dans la littérature (10), (11), (12), (13), (14), (15).

4. RESULTATS

La liste complète des organismes marins testés est donnée dans l'annexe 1.

Les résultats positifs sont regroupés dans le Tableau I. Dans ce tableau, un numéro de référence a été attribué à chaque organisme (colonne échantillon).

Dans la deuxième colonne, seul le nom de genre de l'organisme testé a été précisé. Dans le cas d'organismes dont la détermination est encore incomplète ou douteuse, l'ordre ou la famille sont mentionnés. Lorsque l'organisme n'a pas encore été étudié par les spécialistes en taxonomie, la mention "indéterminé" a été notée.

Les résultats sont exprimés en % d'inhibition de liaison du récepteur, pour une concentration en matière sèche donnée (entre 0,3 et 0,5 mg/ml).

Chaque organisme a été testé 2 fois; le pourcentage indiqué représente la moyenne.

Tableau I : Résultats positifs exprimés en % d'inhibition

échantillon	RECEPTEUR extrait	VIP			Somatostatine			Neuropeptide Y			CGRP			Neurotensine		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
	Phylum des spongiaires															
829	<i>Agelas sp.</i>		44			99										
830	<i>Agelas sp.</i>						73									
927	<i>Agelas sp.</i>								53							
925	<i>Axinella sp. ou Stylotella sp.</i>								40							
898	<i>Axinellida</i>					93	69		50							
841	<i>Corallistes sp.</i>												76			
724	<i>Corallistes sp.</i>						50			54						
955	<i>Corallistidae</i>												65			
966	éponge indéterminée		121			104			72			96			67	
968	éponge indéterminée		112			100			58							
850	éponge indéterminée			54												
849	éponge indéterminée									44						
982	éponge indéterminée									55						
965	éponge indéterminée		43													
922	éponge indéterminée													65		
846	<i>Haploscleridae</i>						57									
981	<i>Fasciospongia sp.</i>															67
923	<i>Hyrtilis sp.</i>														62	
719	<i>Phloeodictyon sp.</i>		52	57		100	50		92			129			81	
730	<i>Phloeodictyon sp.</i>		127			103			93			138			95	
782	<i>Phloeodictyon sp.</i>	62	124		59	102		50	84			135			94	
959	<i>Phloeodictyon sp.</i>	90	140	132	84	103	103	55	106	56	85	134	118		100	98
919	<i>Psammocinnia sp.</i>	58														
861	<i>Tedanla sp.</i>			43												
929	<i>Verongidae</i>			52												
884	<i>Xestospongia sp.</i>					52	41									
	phylum des chordés															
790	<i>Amphicarpa sp.</i>			47												
985	<i>Didemnum sp.</i>												42			
791	<i>Lissoclinum sp.</i>									43						
890	<i>Polyandrocarpa sp.</i>												51			
786	<i>Polycarpa sp.</i>			42												
787	<i>Pseudodistoma sp.</i>			85			75									54
	Phylum des échinodermes															
971	<i>Gymnocrinus sp.</i>												76			
750	<i>Heterobrissus sp.</i>												40			
748	<i>Triploneustes sp.</i>												52			
	Phylum des coelentérés															
179	<i>Pectinia sp.</i>												64			
180	<i>Pocillopora sp.</i>												76			

5. DISCUSSION

276 organismes ont été testés, se répartissant dans différents phyla. 173 organismes appartenant au phylum des spongiaires, 36 appartenant aux chordés, 20 au phylum des échinodermes, 38 organismes appartenant au phylum des coelentérés, 4 au phylum des mollusques, 3 au phylum des bryozoaires et 2 au phylum des protozoaires.

Une réponse à un récepteur donné est considérée comme positive lorsque le % d'inhibition est supérieur à 40% (valeur du bruit de fond estimée à 30% environ).

Nous avons obtenu ainsi 13% de réponses positives. Le maximum de réponses positives a été enregistré pour les récepteurs du VIP et de la somatostatine (24%), puis le récepteur au CGRP (20%), au neuropeptide Y (20%) et enfin à la neurotensine (12%).

Le pourcentage d'organismes ayant répondu positivement peut sembler élevé, mais il faut remarquer que 7% d'organismes réagissent au moins sur deux récepteurs.

Pour la suite de notre étude nous avons donc été amenés à opérer une sélection selon le critère de spécificité:

un organisme - un récepteur - une réponse positive

Ces organismes sont notés en caractères gras dans le Tableau I.

Ce critère de spécificité permet d'éliminer certains faux-positifs: prenons l'exemple des organismes du genre *Phloeodictyon* référenciés sous les numéros 719, 730, 782, et 959, représentant des espèces différentes. Ces quatre organismes réagissent fortement sur les 5 récepteurs étudiés avec des pourcentages d'inhibition élevés. Il paraît improbable qu'une même molécule se lie avec des récepteurs totalement différents. L'hypothèse émise dans ce cas est qu'il y a interaction entre l'extrait et le ligand radioactif avant sa liaison sur le récepteur; nous obtenons ainsi un faux positif.

Les organismes démontrant une liaison spécifique se répartissent de la façon suivante:

Concernant le récepteur au vasoactive intestinal peptide, 7 organismes sont spécifiques (5 éponges, 2 ascidies).

Concernant le récepteur au calcitonine gene related peptide 9 organismes sont spécifiques (2 hexacoralliaires, 2 échinidés, 2 éponges, 2 ascidies, 1 crinoïde).

Concernant le récepteur à la somatostatine: 3 éponges sont spécifiques.

Concernant le récepteur au neuropeptide Y: 5 organismes sont spécifiques (4 éponges, 1 ascidie).

Enfin, pour le récepteur à la neurotensine: 3 éponges sont spécifiques.

6. CHOIX DES ORGANISMES A ETUDIER

Parmi les organismes réagissant positivement et de façon spécifique à un récepteur, 4 ont été sélectionnés pour une étude chimique ultérieure selon les critères suivants:

- Détermination de l'organisme marin:

Nous avons souhaité travailler sur des organismes dont le genre au moins a pu être déterminé par les taxonomistes. Les organismes 846, 849, 850, 982 (éponges indéterminées) ainsi que 929 et 955 n'ont donc pas été retenus.

- Nature chimique de l'extrait:

Etant donné les moyens de purification et d'isolement disponibles à Nouméa, nous avons choisi de nous intéresser aux organismes dont les extraits C réagissent positivement. Ce sont les plus nombreux.

- Etat d'avancement des travaux de purification et d'isolement réalisés par les partenaires chimistes du programme SMIB:

Plusieurs des organismes ont déjà fait l'objet d'études chimiques (purification, isolement, structure) ou sont en cours d'étude. Nous n'avons pas retenu ces organismes: 750, 791, 830, 841, 890, 923, 929, 971.

- enfin la *quantité d'organisme (sous forme de poudre lyophilisée) présente en stock et les possibilités de rerécolte ultérieure* ont été des facteurs limitants.

Nous avons ainsi retenu:

Xestospongia sp. (phylum des spongiaires)

n° de référence 884

extrait B et C actif sur le récepteur à la somatostatine:

extrait B: 52%, extrait C: 41%.

Tedania sp. (phylum des spongiaires)

n° de référence 861

extrait C actif sur VIP à 43%

Pectinia lactuca (phylum des coelentérés)

n° de référence 902

extrait C actif sur CGRP à 64%

Tripneustes gratilla (phylum des échinodermes)

n° de référence 748

extrait C actif sur CGRP à 52%

Les trois premiers organismes choisis répondent aux critères définis ci-dessus. Bien que pour *Xestospongia*, les extraits B et C soient actifs et qu'une abondante bibliographie ait été relevée concernant ce genre, nous avons néanmoins retenu cet organisme.

III. ETUDE CHIMIQUE DES 4 ORGANISMES SÉLECTIONNÉS

1. XESTOSPONGIA SP

Numéro de référence: 884

Phylum des Spongiaires

Ordre: Nepheliospongida

Famille: Nepheliospongiidae

1.1. Activité biologique des différentes récoltes sur les récepteurs de la somatostatine

	extrait A	extrait B	extrait C
1989: baie de Prony, Nouvelle-Calédonie (- 10 m)	21%	52%	41%
1991: baie de Prony, Nouvelle-Calédonie (- 10 m)	12%	34%	32%

1.2. Travaux antérieurs effectués sur le genre *Xestospongia*

De nombreuses espèces de *Xestospongia* ont fait l'objet de publications pharmaco-chimiques (*X. caycedoi*, *X. exigua*, *X. muta*, *X. sapra*, *X. testudinaria*, *X. vanilla*).

Diverses activités biologiques ont été rapportées, imputées à différents types de molécules. Celles-ci sont été résumées ci-dessous:

Espèce	Réf. bibliographique	Type de molécule	Principe actif isolé	Activité biologique
<i>X. vanilla</i>	(17)	terpénoïde	Xestovanin A	antifongique contre <i>Pythium ultimum</i>
<i>X. sp.</i>	(18)	terpénoïde	Xestin A	cytotoxique
<i>X. sp.</i>	(18)	terpénoïde	Xestin B	cytotoxique
<i>X. sp.</i>	(18)	terpénoïde	Buténolide	cytotoxique
<i>X. exigua</i>	(19)	quinone	Halenaquinone	antibiotique
<i>X. exigua</i> <i>X. sapra</i>	(19), (20)	quinone	Xestoquinone	cardiotonique par inhibition de la Na/K ATPase du SNC

<i>X. sapra</i>	(21), (19)	quinone	Halenaquinol	effet inotrope + par inhibition de la phosphodiesterase
<i>X. caycedoi</i>	(22)	quinone	Renierol	cytotoxique et actif sur <i>S. aureus</i>
<i>X. sp.</i>	(23)	quinone	dérivés renierol	actif sur <i>B. subtilis</i> et sur <i>S. aureus</i>
<i>X. sp.</i>	(24)	acide gras	melyne A, B, C	C est actif sur <i>Giardia</i>
<i>X. testudinaria</i>	(25)	acide gras bromé	acide bisacétylénique bromé	actif sur <i>B. subtilis</i>
<i>X. sp.</i>	(26)	acide gras bromé	6 identifiés	actif sur <i>B. subtilis</i>
<i>X. muta</i>	(27)	acide gras bromé	3 acides gras dibromés	cytotoxicité activité sur le système nerveux central (potentialisation du pentobarbital)
<i>X. sp.</i>	(28)	alcaloïdes	Araguspongines	vasodilatateur
<i>X. sp.</i>	(28)	alcaloïde	Petrosine A	vasodilatateur
<i>X. sp.</i>	(28)	alcaloïde	Aragupetrosine A	vasodilatateur
<i>X. exigua</i>	(29)	alcaloïde	Xestospongine ABCD	vasodilatateur
<i>X. sp.</i>	(30)	alcaloïde	Manzamine EF	cytotoxique

Les quinones et les alcaloïdes isolés des différents genres de *Xestospongia* sont à l'origine d'activités biologiques intéressantes dans le cadre de notre étude: activités cardiotoniques et vasodilatatrices, pouvant être mises en relation avec le système nerveux central.

Pour certaines de ces molécules, leur mode d'action a été démontré. Dans le cas de la Xestoquinone, l'effet cardiaque observé a été lié à l'inhibition de la Na/K ATPase du système nerveux central (20).

Dans le cadre des tests effectués lors du programme SMIB³, des activités cytotoxiques et de toxicité générale (extraits B et C) ont été mises en évidence.

³ Le détail des résultats obtenus lors des différents tests réalisés sur cet organisme dans le cadre du programme SMIB sont donnés en annexe 2.

1.3 Extraction des alcaloïdes

Une réaction visant à mettre en évidence les quinones libres (10mg d'extrait dans 0,5ml de méthanol mis en contact avec 0,5ml de soude à 0,1%) et les anthraquinones (réaction de Borntträger) a été effectuée sur les extraits B et C. Aucune de ces molécules n'a été visualisée par ces tests.

Par CCM sur gel de silice, en utilisant comme révélateur du dragendorff, nous avons confirmé la présence d'alcaloïdes dans les extraits B et C de *Xestospongia* sp.

D'autre part, la partition de l'activité inhibitrice entre les extraits B et C indique que le(s) principe(s) actif(s) sont extraits par des solvants organiques et alcooliques, conditions réalisées par des molécules de type alcaloïdiques.

Nous avons donc réalisé une extraction classique des alcaloïdes sur les extraits B et C (Fig. 3 et 4).

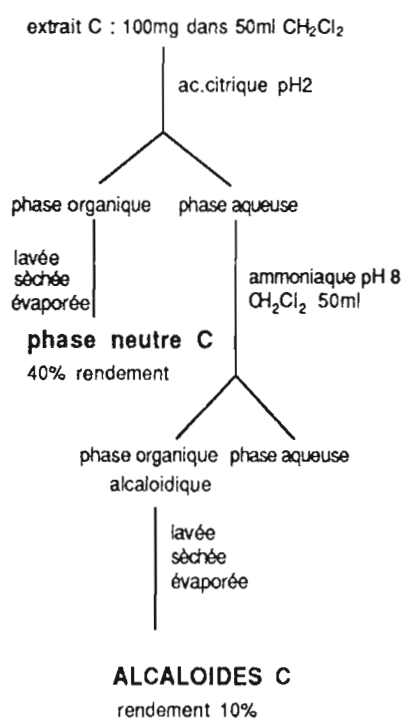


Figure 3: extraction des alcaloïdes C

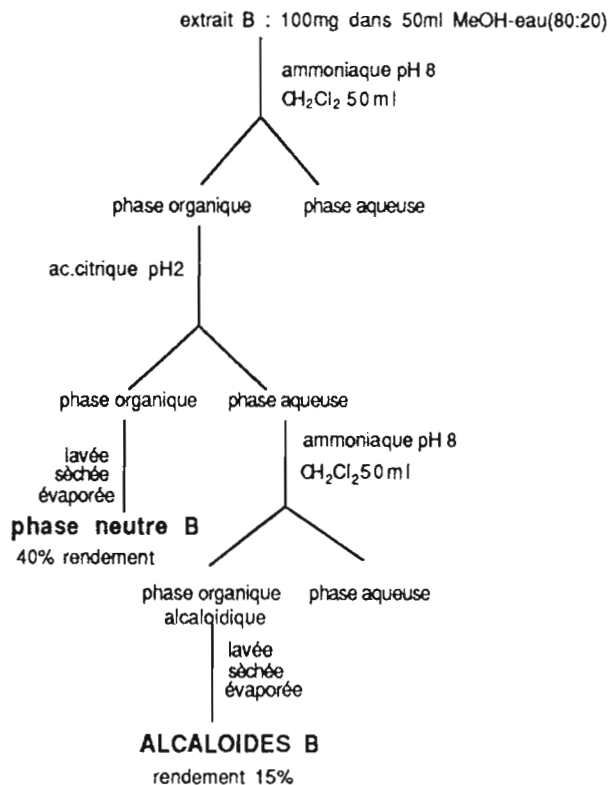


Figure 4: extraction des alcaloïdes B

1.4. Résultat du test de binding

Les fractions alcaloïdiques B et C répondent positivement au test de binding sur le récepteur de la somatostatine. Les phases neutres n'ont pas d'effet inhibiteur.

1.5. Conclusion

Les alcaloïdes présents dans *Xestospongia* sont à l'origine de l'activité de cet organisme sur le récepteur de la somatostatine.

Il serait bien sûr nécessaire d'isoler et de tester les différents alcaloïdes présents dans le totum.

Cependant, ce même échantillon (884) a été travaillé (31). 5 alcaloïdes ont été isolés, dont 4 de la famille des xestospongines, possédant des propriétés vasodilatatrices (29), (28).

Il serait pertinent de les tester sur les récepteurs à la somatostatine afin de mettre en évidence ceux qui sont responsables de l'activité.

L'étude de cet organisme a permis de mettre en évidence un ligand de nature alcaloïdique se liant spécifiquement avec le récepteur de la somatostatine.

Cette activité originale des alcaloïdes de *Xestospongia* n'avait pas encore été mentionnée dans la littérature.

2. TEDANIA SP.

Numéro de référence: 861

Phylum des Spongiaires

Ordre: Poecilosclerida

Famille: Myxillidae

2. 1. Activité biologique des différentes récoltes sur les récepteurs du VIP

	extrait A	extrait B	Extrait C
1988: lagon nord de Nouvelle-Calédonie (-30 m)	18%	6%	43%
1990: lagon nord de Nouvelle-Calédonie (-27 m)	non testé	non testé	- 49%

L'effet inhibiteur de l'extrait C sur VIP n'a pas été confirmé sur la deuxième récolte⁴.

2. 2. Travaux antérieurs effectués sur le genre *Tedania*

Deux espèces seulement de *Tedania* ont fait l'objet de publications pharmacochimiques *T. ignis* et *T. digitata*.

⁴ Le problème majeur rencontré lors des tests sur les organismes marins est la reproductibilité des résultats sur de nouvelles récoltes du même organisme, même lorsqu'elles sont effectuées au même endroit.

Espèce	Réf. bibliographiques	Type de molécule	Principe actif isolé	Activité biologique
<i>T. ignis</i>	(32)	macrolide	Tedanolide	cytotoxique
<i>T. ignis</i>	(33)	Indole	4 composés	phytotoxiques
		carbazole	1 acetyl β carboline	cytotoxique, antimicrobien
			1 methylcarbazole	insecticide antimicrobien cytotoxique
<i>T. digitata</i>	(34)(35)	nucléotide	1methylisoguanosine	myorelaxant, hypothermie hypotension, bradycardie
<i>T. digitata</i>	(36)	nucléotide	1 methylguanosine	inhibition contraction iléon cobaye
<i>T. ignis</i>	(37)(38)	nucléotide	composés alpha et β	neurotoxine
<i>T. ignis</i>	(39)	nucléotide	composés alpha et β	neurotoxine planctonique (<i>Ceratium</i>), non présente chez toutes les espèces de <i>Tedania ignis</i> .

Des molécules de nature nucléotidiques ont été mises en évidence chez 2 espèces différentes de *Tedania* (*T. ignis* et *T. digitata*); ces composés présentent des activités biologiques intéressantes.

Les tests effectués au laboratoire de pharmacologie de Nouméa ont mis en évidence l'activité cytotoxique et la toxicité générale de l'extrait C. Ces activités n'ont pas été confirmées pour la récolte 1990.

2. 3. Fractionnement de l'extrait C

Un fractionnement sur colonne de l'extrait C⁵ (récolte 1988) a été réalisé.

2g d'extrait C ont été chromatographiés sur une colonne contenant 25g de silice 60 (Merck Art 7734).

L'extrait est élué progressivement par un gradient de solvant de polarité croissante:

⁵ Tous les fractionnements ont été réalisés à partir des extraits C "bruts" (non dessalés).

200ml du mélange hexane-chlorure de méthylène (50:50)
200ml de chlorure de méthylène-méthanol (98:2)
200ml de chlorure de méthylène-méthanol (96:4)
200ml de chlorure de méthylène-méthanol (92:8)
200ml de chlorure de méthylène-méthanol (85:15)
500ml de chlorure de méthylène-méthanol (80:20)

Les fractions récupérées sont de 30 ml.

Les fractions donnant un image chromatographique identique sur CCM (gel de silice, chlorure de méthylène-méthanol (92:8), révélateur vaniline sulfurique) sont réunies: on obtient ainsi 17 fractions.

2. 4. Résultats du test de binding

Aucune des fractions ainsi obtenues n'a démontré d'activité sur les récepteurs du VIP. De plus l'extrait C (récolte 1988), testé à nouveau, n'a démontré aucune activité sur ces mêmes récepteurs.

2. 5. Conclusion

L'activité de l'extrait C n'ayant pas été confirmé, nous avons abandonné l'étude de cet organisme.

La première réponse positive enregistrée pour l'extrait C (43%) serait due à la présence d'un artefact créé lors de la manipulation donnant une réaction faussement positive.

3. PECTINIA LACTUCA

Numéro de référence: 902

Phylum des Coelentérés

Ordre: Madréporaires

Famille: Pectiniidae

3. 1. Activité biologique des différentes récoltes sur les récepteurs du CGRP

	extrait A	extrait B	extrait C
1987: récif de Tomboo. Nouvelle-Calédonie (-10m)	37%	non testé	64% <i>(test de Juillet 91)</i>
1991: 2ème cap nord passe de Dumbéa (à 20km environ de la 1ère récolte) (-10m)	non testé	non testé	-10%

L'effet inhibiteur de l'extrait C sur CGRP n'a pas été confirmé sur la deuxième récolte.

3. 2. Travaux antérieurs effectués sur le genre *Pectinia*

Nous n'avons relevé que peu d'études pharmaco-chimiques concernant le genre *Pectinia*. Un auteur rapporte les activités ichtyotoxiques et antimicrobiennes d'une molécule polyacétylénique isolée de *Pectinia lactuca* (40).

Par ailleurs, aucune activité n'a été relevée lors des tests effectués au laboratoire de pharmacologie (annexe 2).

3. 3. Fractionnement de l'extrait C

L'extrait C (récolte 1987) a été chromatographié par CCM sur gel de silice en utilisant différents révélateurs: dragendorff acétique et vanilline sulfurique.

Le dragendorff acétique ne met pas en évidence de taches, tandis que la vanilline sulfurique permet de visualiser de nombreuses taches avec une bonne résolution pour le solvant de migration suivant: CH₂Cl₂-MeOH (92:8)

Un fractionnement sur colonne est effectué sur l'extrait C (récolte 1987).

2g d'extrait sont chromatographiés (conditions expérimentales cf. *Tedania* sp.)

Les fractions donnant une image chromatographique identique sur CCM (gel de silice, chlorure de méthylène-méthanol (92:8), révélateur vanilline sulfurique) sont réunies: on obtient ainsi 15 fractions.

3. 4. Résultats du test de binding

6 fractions sont actives sur les récepteurs du CGRP (Tableau II). Cependant, l'activité de l'extrait C (récolte 1987, test de Juin 92) sur le récepteur au CRPG n'a pas été reconfirmée.

3. 5. Etude des fractions positives

6 des 15 fractions issues de la chromatographie sur colonne donnent un résultat positif au test de binding, alors que l'extrait ayant servi à ce fractionnement ne démontre plus d'activité sur ces mêmes récepteurs. Nous avons cherché à expliquer ce phénomène.

L'étude chromatographique des 15 fractions (CCM sur gel de silice, solvant chlorure de méthylène-méthanol (92:8), révélées par une solution d'acide phosphomolybdique⁶ Merck, Art.531). montre que les fractions actives présentent toutes les taches de Rf 0,80 et 0,55 dont l'intensité est en rapport avec le poids de la fraction (Tableau II, et Fig.5).

⁶ Ce réactif met en évidence les composés réducteurs, les lipides, les stérols et les stéroïdes.

F	a	b	c	d	e	f	g	h	i
S	hexane- CH ₂ Cl ₂ (50:50)	hexane- CH ₂ Cl ₂ (50:50)	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (98:2)	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (98:2)	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (98:2)	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (98:2)	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (98:2)	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (98:2)	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (96:4)
P	192mg	3mg	10mg	19mg	21mg	32mg	1mg	1mg	14mg
R	-135%	-63%	80%	100%	95%	100%	45%	-7%	85%
Rf 0,80	-	-	++	+++	+++	+++	+	traces	++
Rf 0,55	-	-	+	+	++	++	++	-	++

F: identification de la fraction.

S: solvant d'élution

P: poids de la fraction en mg.

R: résultat au test de binding sur les récepteurs au CGRP exprimé en % d'inhibition.

Rf 0,8 et Rf 0,55: variabilité d'intensité des taches de Rf 0,8 et 0,55 après migration sur gel de silice, solvant chlorure de méthylène-méthanol (92:8), révélateur acide phosphomolybdique; + intensité faible, ++ intensité moyenne, +++ intensité maximum.

Tableau II: fractionnement de *Pectinia lactuca*

La présence de ces 2 taches de Rf 0,8 et 0,55, révélées par l'acide phosphomolybdique dans les fractions positives, permet de supposer qu'elles sont responsables de l'activité observée sur les récepteurs du CGRP, et de nature lipidique (stérols, lipides, stéroïdes). L'effet positif observé pourrait alors être imputé à une réaction faussement positive, lié à la présence de lipides détergents.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons effectué une chromatographie sur colonne de la fraction f.

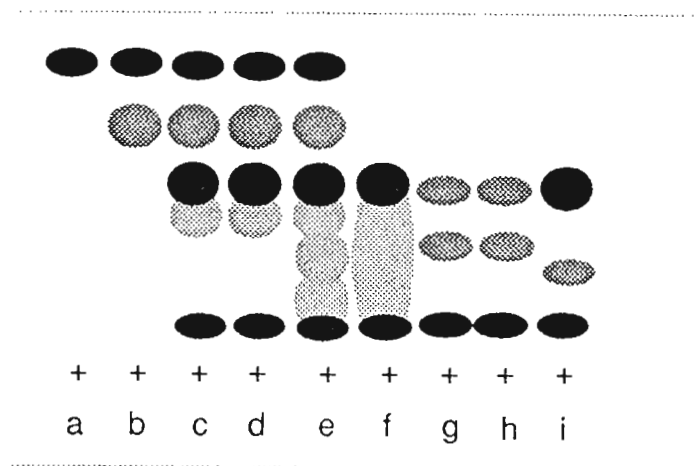


Figure 5: CCM des 9 premières fractions de *Pectinia lactuca*

3. 6. Fractionnement de "f"

32 mg de la fraction f sont chromatographiés sur une colonne contenant 5g de silice 60 (Merck Art 7734).

La fraction f est éluée progressivement par un gradient de solvant de polarité croissante:

100 ml d'hexane pur

50ml hexane- CH_2Cl_2 (50:50)

50ml CH_2Cl_2 -MeOH (98:2)

50ml CH_2Cl_2 -MeOH (96:4)

50ml CH_2Cl_2 -MeOH (92:8)

50ml CH_2Cl_2 -MeOH (85:15)

Les fractions récupérées sont de 25 ml.

Les fractions donnant une image chromatographique identique sur CCM (gel de silice, chlorure de méthylène-méthanol (92:8), révélateur acide phosphomolybdique) sont réunies: on obtient ainsi 7 fractions (Fig. 6).

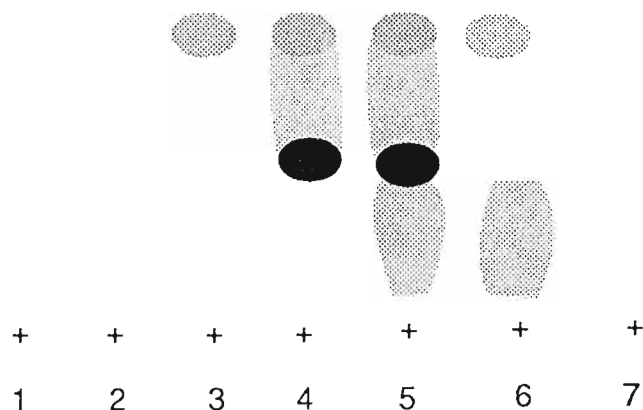


Figure 6: CCM des fractions issues de f révélées par l'acide phosphomolybdique

3.7 Résultats du test de binding des fractions issues de "f"

2 des 7 fractions issues de "f" sont positives sur les récepteurs au CGRP (Tableau III).

F	f1	f2	f3	f4	f5	f6	f7
S	hexane	hexane- CH ₂ Cl ₂ (50:50)	hexane- CH ₂ Cl ₂ (50:50)	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (98:2)	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (98:2)	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (96:4)	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (92:8)
P	1mg	1mg	1mg	16mg	9mg	1mg	1mg
R	2%	-16%	14%	100%	40%	-30%	-19%
Rf. 0,80	-	-	+	+	+	+	-
Rf. 0,55	-	-	-	+	+	-	-

F: identification de la fraction.

S: solvant d'élution

P: poids de la fraction en mg.

R: résultat au test de binding sur les récepteurs au CGRP exprimé en % d'inhibition.

Rf 0,8 et Rf 0,55: présence(+) ou absence (-) des taches de Rf 0,8 et 0,55, après migration sur gel de silice, solvant chlorure de méthylène-méthanol (92:8), révélateur acide phosphomolybdique.

Tableau III: fractionnement de "f".

3. 8 Etude des fractions issues de "f".

Les fractions f4 et f5 actives sur le CGRP présentent toutes les deux des taches de nature lipidique (stérols, lipides ou stéroïdes) révélées par l'acide phosphomolybdique. La tache de Rf 0,55 est commune à ces 2 fractions et est absente dans les fractions inactives.

Le % d'inhibition relevé lors du test de binding est en rapport avec le poids de l'échantillon et avec l'intensité des taches révélées.

3. 9. Conclusion

L'activité observée sur les récepteurs au CGRP des fractions f4 et f5, apparaît être due à la présence de molécules lipidiques et/ou stéroïdiques.

Ces molécules lipidiques et /ou stéroïdiques sont aussi présentes dans les fractions c, d, e, f, g, i.

Le résultat positif démontré par ces 6 fractions semble du à l'action de lipides et/ou stéroïdes intrinsèques, jouant le rôle de lipides à effet détergent entraînant la formation d'un faux positif.

4. TRIPNEUSTES GRATILLA (Linné, 1758)

Numéro de référence: 748

Phylum des Echinodermes

Ordre: Echinides

Famille: Toxopneustidae

4. 1. Activité biologique des différentes récoltes sur les récepteurs du OGRP

	extrait A	extrait B	extrait C
1986: platier du phare Amédée (-10m)	9%	non testé	52%
1991: platier du phare Amédée (-10m)	non testé	non testé	20%

4. 2. Travaux antérieurs effectués sur le genre *Tripneustes*

Peu de travaux ont été effectués sur le genre *Tripneustes*. Les auteurs décrivent des activités toxiques liées à des molécules de nature protéique (41), (42). Aucune autre molécule non protéique n'a été isolée.

Parmi les tests effectués au laboratoire de pharmacologie seule une activité toxique sur *Artemia* a été relevée.

4. 3. Fractionnement de l'extrait C

L'extrait C (récolte 1986) est chromatographié par CCM sur gel de silice en utilisant 2 révélateurs: dragendorff acétique et vanilline sulfurique. Ces deux révélateurs permettent de mettre en évidence des taches avec une bonne résolution pour le solvant de migration suivant: CH₂Cl₂- MeOH (92:8)

Un fractionnement sur colonne est effectué sur l'extrait C (récolte 1986).

2g d'extrait sont chromatographiés (conditions expérimentales cf *Tedania* sp.).

Les fractions donnant une image chromatographique identique sur CCM (gel de silice, chlorure de méthylène-méthanol (92:8), révélateur vanilline sulfurique) sont réunies: on obtient ainsi 19 fractions.

4. 4. Résultats du test de binding

4 fractions sont actives sur les récepteurs du CGRP (Tableau IV).
L'activité de l'extrait C (récolte 1986) a été reconfirmée.

F	d	e	q	r
S	CH ₂ Cl ₂ - MeOH (98:2)	CH ₂ Cl ₂ - MeOH (98:2)	CH ₂ Cl ₂ - MeOH (85:15)	CH ₂ Cl ₂ - MeOH (85:15)
P	51mg	14mg	53mg	13mg
R	66%	88%	99%	59%

F: identification de la fraction

S: poids de la fraction en mg

R: résultat au test de binding sur les récepteurs du CGRP en % d'inhibition

Tableau IV: fractions positives de *Tripneustes gratilla*

4.5 Etude des fractions positives d et e

Les fractions positives d, e et q, r sont testées par CCM gel de silice, chlorure de méthylène-méthanol (92:8). Différents révélateurs sont utilisés: dragendorff acétique, vanilline sulfurique et acide phosphomolybdique.

Les fractions apolaires d et e présentent de nombreuses taches révélées à la vanilline sulfurique et à l'acide phosphomolybdique (Fig. 8) dont certaines sont intenses (Rf 0,83 et 0,63). La nature de ces taches semble caractéristique des lipides ou stérols à effet détergent déjà mis en évidence chez *Pectinia lactuca*. Voulant éviter de travailler sur des fractions faussement positives, nous n'avons pas continué leur étude.

4. 6. Etude des fractions positives q et r

4. 6. 1. *Fractionnement*

Les fractions polaires q et r présentent des taches révélées au dragendorff acétique, à la vanilline sulfurique et à l'acide phosphomolybdique (Fig. 8).

Nous avons effectué une chromatographie sur colonne de la fraction q.

53mg sont chromatographiés sur une colonne contenant 1,6g de silice 60 H (Merck Art.7736).

La fraction q est éluée par 15 ml d'une solution de chlorure de méthylène -méthanol (92:8) puis 5 ml d'une solution de chlorure de méthylène - méthanol (88:12).

Les fractions récupérées sont de 1 ml.

Les fractions présentant des images chromatographiques identiques par CCM (gel de silice, chlorure de méthylène - méthanol (90:10), migration sur 10cm 3 fois) révélée par l'acide phosphomolybdique et le dragendorff acétique, sont réunies. Nous obtenons ainsi 7 fractions.

4. 6. 2. Résultats du test de binding

2 des 7 fractions issues de q sont positives sur les récepteurs du CGRP (tableau V).

D'autre part, nous avons confirmé l'activité des fractions qr en testant une nouvelle fraction qr obtenue à partir de la même récolte (mêmes conditions que précédemment) sur les récepteurs du CGRP.

F	q1	q2	q3	q4	q5	q6	q7
P	1mg	7mg	1mg	3mg	7mg	10mg	3mg
R	15%	40%	-13%	10%	41%	-17%	-13%

F: identification de la fraction

P: poids de la fraction en mg

R: résultat au test de binding sur les récepteurs du CGRP en % d'inhibition

Tableau V: résultats binding du fractionnement de q

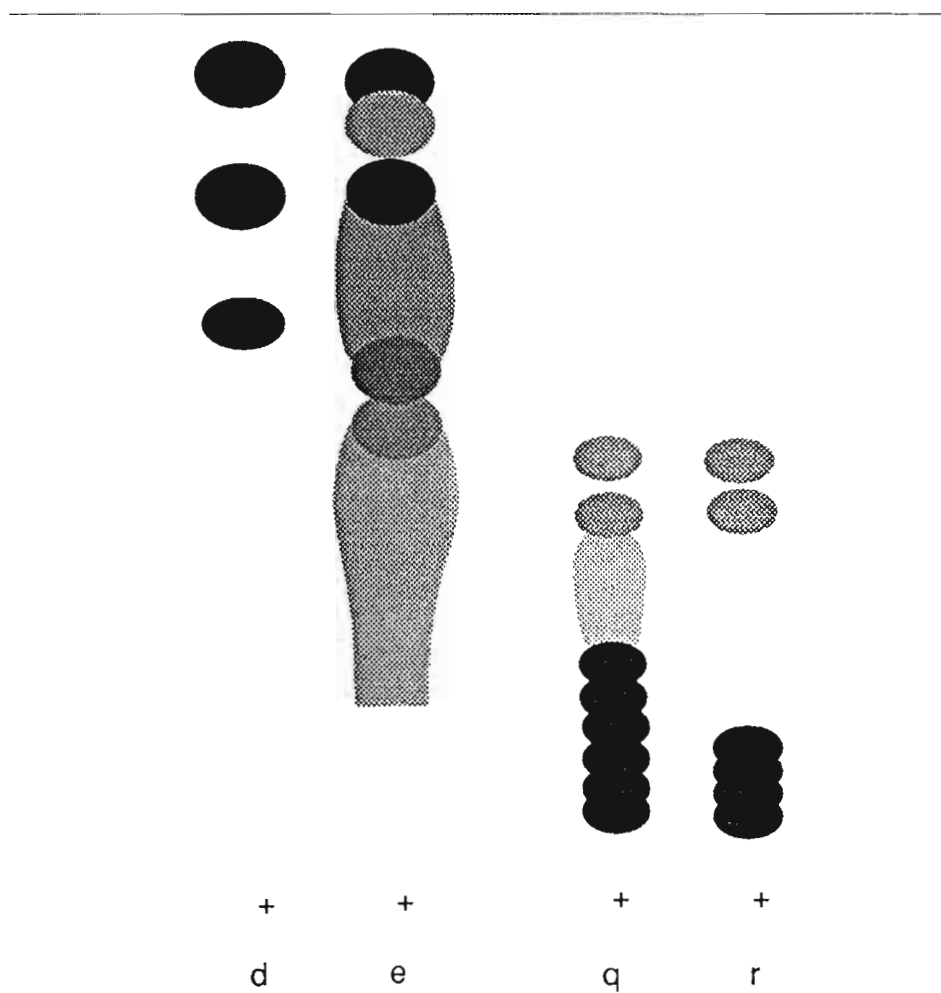


Figure 8: CCM des fractions d, e, q, r révélées par l'acide phosphomolybdique

4. 7. Etude des fractions issues de q2 et q5

Les fractions q2 et q5 présentent après CCM des taches révélées à l'acide phosphomolybdique et au dragendorff acétique.

4. 7. 1. *Etude de la fraction q2*

7mg de la fraction q2 sont chromatographiés sur une microcolonne contenant 200mg de silice 60 H (Merck Art.7736).

La fraction est éluée progressivement par un gradient de solvant de polarité croissante constitué de:

5ml de chlorure de méthylène pur

5ml de chlorure de méthylène-méthanol (98:2)

5ml de chlorure de méthylène-méthanol (96:4)

5ml de chlorure de méthylène-méthanol (92:8)

5ml de chlorure de méthylène-méthanol (85:15)

Les fractions récupérées sont de 0,5ml.

Les fractions présentant les mêmes images chromatographiques par CCM (gel de silice 60, chlorure de méthylène-méthanol (90:10), migration 3 fois, révélateur acide phosphomolybdique) sont réunies. Nous obtenons ainsi 8 fractions.

Toutes ces fractions ont un poids inférieur à 1mg.

Une CCM sur gel de silice 60 (Merck Art. 5721), migration 3 fois dans du chlorure de méthylène-méthanol (90:10) et révélée par de l'acide phosphomolybdique permet de mettre en évidence des taches pour 3 des 8 fractions. La tache révélée au dragendorff acétique dans la fraction q2 n'a été retrouvée dans aucune des fractions obtenues.

Tests de binding sur les fractions issues de q2: aucune des fractions obtenues n'a donné de résultats positifs.

4. 7. 2. *Etude de la fraction q5*

Une chromatographie préparative est effectuée sur 7mg de la fraction q5. La fraction est déposée sur une plaque de silice 60 (Merck Art. 5721). La plaque est mise à migrer dans un mélange de chlorure de méthylène-méthanol (90:10) 4 fois de suite sur 10cm.

6 fractions sont obtenues. La tache révélée au dragendorff acétique dans la fraction q5 n'a été retrouvée dans aucune des fractions.

Test de binding sur les fractions issues de q5: aucune des fractions n'est positive sur les récepteurs du CGRP.

4. 8. Conclusion

L'extrait C de l'oursin *Tripneustes gratilla* présente une activité inhibitrice sur les récepteurs du CGRP. Cet extrait a subi 3 fractionnements successifs (Fig. 9).

Le premier conduisant à l'obtention de quatre fractions répondant positivement, dont deux ont été identifiées comme des faux positifs.

Le deuxième fractionnement, effectué sur la fraction q conduit à l'isolement de deux fractions positives q2 et q5, donnant des taches en CCM avec les révélateurs suivants: acide phosphomolybdique, vanilline sulfurique et dragendorff acétique. Seules ces deux fractions positives présentent une tache après révélation par le Dragendorff acétique.

La troisième purification effectuée sur les deux extraits précédents (chromatographie sur colonne pour q2 et préparative pour q5) a conduit à l'obtention de fractions, dont aucune ne démontre de résultats positifs sur les récepteurs du CGRP.

Malgré le fait que le test de binding soit très sensible (10 nmolaire), nous ne pouvons pas conclure à la présence ou non de molécules actives dans les dernières fractions obtenues. De plus, l'extrait B n'ayant pu être testé, nous ne pouvons pas vérifier son activité sur les récepteurs du CGRP.

Nous pouvons simplement supposer que les molécules actives sont de nature alcaloïdiques ou présentent une fonction azotée. Cette hypothèse reste à confirmer mais malheureusement la récolte de ces organismes marins ainsi que les étapes successives de purification demandent du temps dont nous ne disposons plus à ce stade de notre recherche.

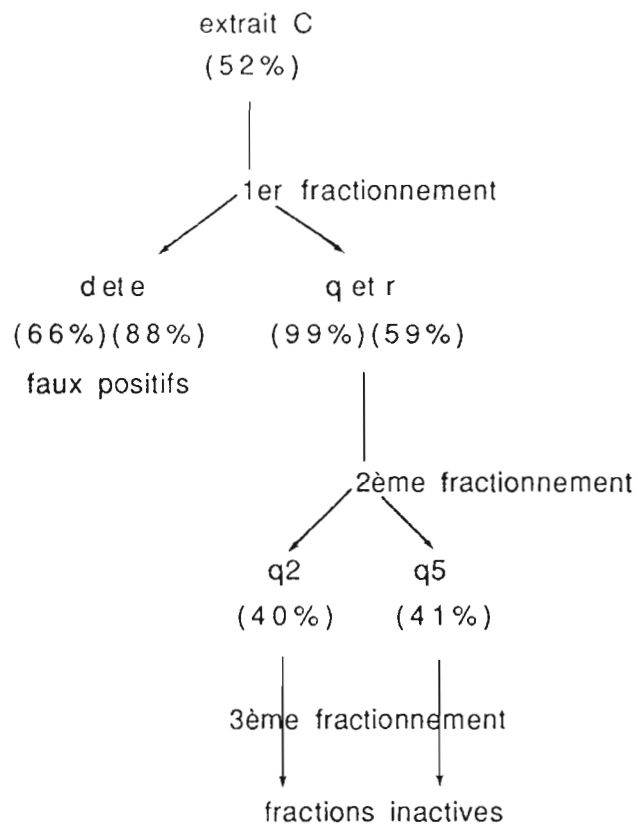


Figure 9: % d'inhibition des fractions actives

CONCLUSION GÉNÉRALE

Après avoir testé 276 organismes marins sur 5 récepteurs membranaires, 4 organismes, *Xestospongia sp.*, *Tedania sp.*, *Pectinia lactuca*, et *Tripneustes gratilla* apparaissant comme particulièrement intéressants ont été retenus pour une étude chimique ultérieure.

Sur ces 4 organismes, l'étude de 2 organismes a été abandonnée, les résultats obtenus n'ayant pu être confirmés ou ayant été identifiés comme des faux positifs.

L'activité de *Xestospongia sp.* et de *Tripneustes gratilla* a été reconfirmée plusieurs fois sur les récepteurs à la somatostatine ou les récepteurs au CGRP.

Un totum alcaloïdique montrant un résultat positif spécifique du récepteur de la somatostatine a été obtenu à partir des extraits C et B de *Xestospongia sp.* dont il serait très intéressant de tester les produits purs déjà isolés par des partenaires chimistes avant de poursuivre cette étude.

Des fractions obtenues à partir de l'extrait C de *Tripneustes gratilla* montrent une activité inhibitrice. Les molécules engagées dans cette réponse pourraient être de nature alcaloïdique ou présenter une fonction azotée. Ce résultat pourrait susciter une étude plus approfondie afin d'isoler le(s) molécule(s) se liant spécifiquement au récepteur du CGRP.



ANNEXES

ANNEXE 1

PHYLUM DES SPONGIAIRES

REF.	DETERMINATION
829	<i>Agelas</i> sp.
830	<i>Agelas</i> sp.
927	<i>Agelas</i> sp.
936	<i>Agelas</i> sp.
736	<i>Aplysida</i> sp.
845	<i>Aurora</i> sp.
937	Autochore
712	<i>Axinella</i> sp.
925	<i>Axinella</i> sp. ou <i>Stylotella</i> sp.
831	<i>Axinella</i> sp.
898	Axinellida
709	<i>Axynissa</i> sp.
778	<i>Azorica</i> sp.
777	<i>Azorica</i> sp.
931	<i>Azorica</i> sp.
887	<i>Calcarea</i> sp.
807	<i>Callyspongia</i> sp.
773	<i>Carteriospongia</i> sp.
783	<i>Carteriospongia</i> sp.
851	<i>Chondrosia</i> sp.
935	<i>Cinachyra</i> sp.
714	<i>Cladocroce</i> sp.
775	<i>Clalinopsilla</i> sp.
856	<i>Clathria</i> sp.
771	<i>Cliona</i> sp.
813	<i>Cliona</i> sp.
841	<i>Corallistes</i> sp.
729	<i>Corallistes</i> sp.
747	<i>Corallistes</i> sp.
816	<i>Corallistes</i> sp.
825	<i>Corallistes</i> sp.
717	<i>Corallistes</i> sp.
822	<i>Corallistes</i> sp.
724	<i>Corallistes</i> sp.
955	Corallistidae
839	<i>Damiriana</i> sp.
811	<i>Dendrilla</i> sp.
735	Dictyoceratida
774	Dictyoceratida
833	Dictyoceratida
804	<i>Dysidea</i> sp.
908	<i>Echinochalina</i> sp.
733	<i>Echinodictyum</i> sp.
966	Eponge indéterminée
968	Eponge indéterminée
850	Eponge indéterminée

849	Eponge indéterminée
982	Eponge indéterminée
965	Eponge indéterminée
922	Eponge indéterminée
964	Eponge indéterminée
846	Eponge indéterminée
818	<i>Erylus</i> sp.
954	<i>Eurete</i> sp.
981	<i>Fasciospongia</i> sp.
808	<i>Fenestrospongia</i> sp.
725	<i>Geodia</i> sp.
718	<i>Geodia</i> sp.
726	<i>Geodia</i> sp.
772	<i>Geodia</i> sp.
819	<i>Geodia</i> sp.
946	Halichondrida
977	Halichondrida
809	<i>Haliclona</i> sp.
814	<i>Haliclona</i> sp.
885	<i>Haliclona</i> sp. ou <i>Callyspongia</i> sp.
837	Halido-petiona
838	Halido-petiona
926	Haploscerida
852	<i>Homophymia</i> sp.
909	<i>Hyattella</i> sp.
924	<i>Hyrrios</i> sp.
923	<i>Hyrrios</i> sp.
731	<i>Ircinia</i> sp.
776	<i>Ircinia</i> sp. ou <i>Psammocinia</i> sp.
823	<i>Jereicopsis</i> sp.
969	<i>Leucetta</i> sp.
766	<i>Liosina</i> sp.
939	Listhistide
932	<i>Merengeria</i> sp.
934	<i>Microscleroderma</i> sp.
817	<i>Myxilla</i> sp. ou <i>Lyssodendrix</i> sp.
976	<i>Negombata</i> sp.
918	<i>Neofibularia</i> sp.
728	<i>Neosiphonia</i> sp.
806	<i>Niphates</i> sp.
734	<i>Niphates</i> sp.
956	<i>Penares</i> sp.
962	<i>Penares</i> sp.
943	<i>Penares</i> sp.+ <i>Xestospongia</i> sp.
910	<i>Petrosia</i> sp.
805	<i>Petrosia</i> sp.
920	<i>Petrosia</i> sp.
952	<i>Phakellia</i> sp.
715	<i>Pheronema</i> sp.
716	<i>Pheronema</i> sp.
824	<i>Pheronema</i> sp.
826	<i>Pheronema</i> sp.

719	<i>Phloeodictyon</i> sp.
730	<i>Phloeodictyon</i> sp.
782	<i>Phloeodictyon</i> sp.
959	<i>Phloeodictyon</i> sp.
815	<i>Phloeodictyon</i> sp.
942	<i>Phloeodictyon</i> sp.
784	<i>Phyllospongia</i> sp.
820	<i>Pleroma</i> sp.
828	<i>Podospongia</i> sp.
919	<i>Psammocinnia</i> sp.
737	<i>Pseudoceratina</i>
978	<i>Pseudoceratina</i>
903	<i>Regadrella</i> sp.
727	<i>Reidispongia</i> sp.
722	<i>Reniera</i> sp.
888	<i>Rhizoniera</i> sp.
711	<i>Spinoseella</i> sp.
834	<i>Spirastrella</i> sp.
921	<i>Spirastrella</i> sp.
859	<i>Spongia</i> sp.
949	<i>Spongia</i> sp.
769	<i>Stelletta</i> sp.
770	<i>Stelletta</i> sp.
780	<i>Stelletta</i> sp.
835	<i>Stelletta</i> sp.
953	<i>Strongylophora</i> sp.
821	<i>Stylotella</i> sp.
980	<i>Stylotella</i> sp.
861	<i>Tedania</i> sp.
836	<i>Tethya</i> sp.
720	<i>Tethya</i> sp.
723	<i>Thenea</i> sp.
961	<i>Topsentia</i> sp.
840	<i>Topsentia</i> sp.
933	<i>Topsentia</i> sp.
944	<i>Topsentia</i> sp.
957	<i>Topsentia</i> sp.
938	<i>Trachyopsis</i> sp.
853	<i>Trachyopsis</i> sp. ou <i>Topsentia</i> sp.
941	<i>Vaceletia</i> sp.
810	<i>Verongia</i> sp.
929	Verongidae
884	<i>Xestospongia</i> sp.
904	<i>Xestospongia</i> sp.

PHYLUM DES CHORDES

REF.	DETERMINATION
790	<i>Amphicarpa</i> sp.
741	<i>Aplidiopsis</i> sp.
796	<i>Aplidium</i> sp.

896	<i>Atriolum</i> sp.
788	<i>Cystodystes</i> sp.
742	<i>Cystodystes</i> sp.
858	<i>Didemnum</i> sp.
985	<i>Didemnum</i> sp.
891	<i>Didemnum</i> sp.
892	<i>Didemnum</i> sp.
744	<i>Didemnum</i> sp.
792	<i>Didemnum</i> sp.
795	<i>Eudistoma</i> sp.
789	<i>Eudistoma</i> sp.
984	<i>Leptoclinides</i> sp.
893	<i>Lissoclinum</i> sp.
791	<i>Lissoclinum</i> sp.
785	<i>Microcosmus</i> sp.
746	<i>Pharyngodictyon</i> sp.
890	<i>Polyandrocarpa</i> sp.
738	<i>Polycarpa</i> sp.
786	<i>Polycarpa</i> sp.
983	<i>Polycarpa</i> sp.
745	<i>Polycarpa</i> sp.
739	<i>Polycitor</i> sp.
906	<i>Polyclinum</i> sp.
743	<i>Polysyncraton</i> sp.
794	<i>Polysyncraton</i> sp.
787	<i>Pseudodistoma</i> sp.
889	<i>Pyura</i> sp.
793	<i>Pyura</i> sp.

PHYLUM DES ECHINODERMES

REF.	DETERMINATION
751	<i>Aerosoma</i> sp.
754	<i>Asthenosoma</i> sp.
994	<i>Celerina</i> sp.
756	<i>Coelopleurus</i> sp.
862	<i>Comanthus</i> sp.
752	<i>Diadema</i> sp.
971	<i>Gymnocrinus</i> sp.
750	<i>Heterobrissus</i> sp.
758	<i>Holothuria</i> sp.
753	<i>Lovenia</i> sp.
900	<i>Metacrinus</i> sp.
749	<i>Pericosmus</i> sp.
757	<i>Stomopneustes</i> sp.
990	<i>Thromidia</i> sp.
748	<i>Tripneustes</i> sp.

PHYLUM DES COELENTERES

REF. DETERMINATION

874	<i>Acropora</i> sp.
875	<i>Acropora</i> sp.
876	<i>Acropora</i> sp.
991	<i>Alveopora</i> sp.
992	<i>Caulastrea</i> sp.
761	<i>Chrysogorgia</i> sp.
973	<i>Cynarina</i> sp.
868	<i>Ellisella</i> sp.
870	<i>Euplexaura</i> sp.
762	<i>fanellia</i> sp.
911	<i>Goniopora</i> sp.
993	<i>Lobophylla</i> sp.
905	<i>Merulina</i> sp.
866	<i>Muricella</i> sp.
705	Nephtidae
759	Nephtidae
989	<i>Palythoa</i> sp.
902	<i>Pectinia</i> sp.
871	<i>Pocillopora</i> sp.
873	<i>Pocillopora</i> sp.
974	<i>Rhizotrochus</i> sp.
864	<i>Rhumphella</i> sp.
877	<i>Ricordea</i> sp.
706	<i>Sarcophyton</i> sp.
869	<i>Siphonogorgia</i> sp.
765	<i>Solenocaulon</i> sp.
865	<i>Villogorgia</i> sp.
867	<i>Villogorgia</i> sp.

PHYLUM DES BRYOZOAIRE

REF. DETERMINATION

913	<i>Celloporaria</i> sp.
915	<i>Celloporaria</i> sp.
914	<i>Iodyctium</i> sp.

PHYLUM DES PROTOZOA

REF. DETERMINATION

912	<i>Symploca</i> sp. + <i>Schyzotrhrix</i> sp.
-----	---

PHYLUM DES MOLLUSQUES

REF.	DETERMINATION
708	<i>Onchidium</i> sp.
881	<i>Amusium</i> sp.
882	<i>Strombus</i> sp.

nous n'avons pas reporté les organismes
indéterminés non positifs.

ANNEXE 2

fiche d'étude de *Xestospongia* sp. SMIB 884

Rendement MS/MF : 20%

extrait	A	B	C
poids (g)	3,9	2,7	6,2
rendement	20%	1,3%	3%

Résultats obtenus lors des tests réalisés dans le cadre du programme SMIB⁷ :

Antibactérienne	extrait A	extrait B	extrait C
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+
<i>Bacillus caerus</i>	+	+	+
<i>Streptocoque hémolytique</i>	+	+	+
Antifongique			
<i>Fusarium oxysporum</i>			+
<i>Phytophthora hevea</i>		+	++
<i>Helminthosorium sativum</i>	++	++	++
<i>Pyricularia oryzae</i>			++
<i>Botrytis cynerea</i>	+	+	++
<i>Candida albicans</i>	+		+++
Cytotoxicité			
Kb		++	++
P388		+	
Tox. générale sur <i>Artemia salina</i>	+	+	+
Test de binding			
Somatostatine		52%	41%

⁷ La légende des résultats obtenus lors des tests réalisés dans le cadre du programme SMIB est détaillé à la fin de cette annexe

fiche d'étude de *Tedania sp.* SMIB 861

Rendement MS/MF : 15%

extrait	A	B	C
poids (g)	3,9	2,7	6,2
rendement	47%	1,2%	2,5%

Résultats obtenus lors des tests réalisés dans le cadre du programme SMIB:

Récolte 1988

Pas d'activité antibactérienne ou antifongique.

Cytotoxicité	extrait A	extrait B	extrait C
Kb P388			++
Tox. générale sur <i>Artemia salina</i>		+	++
Test de binding VIP			43%

Récolte 1990: pas de confirmation des résultats.

Pectinia lactuca SMIB 902

rendement MS/MF : 72%

extrait	A	B	C
poids (g)	9,7	4,1	2
rendement	4%	0,85%	0,4%

Résultats obtenus lors des tests réalisés dans le cadre du programme SMIB:

Récolte 1987

pas d'activité antibactérienne, antifongique, cytotoxique

extrait	A	B	C
Test de binding CGRP			64%

Récolte 1991

l'activité sur les récepteurs du CGRP n'a pas été confirmée (-10%).

TRIPNEUSTES GRATILLA SMIB 748

rendement matière sèche/matière fraîche : 72%

extrait	A	B	C
poids (g)	8,6	7,9	4,1
rendement	14,3%	3,5%	2,05%

Résultats obtenus lors des tests réalisés dans le cadre du programme SMIB :

récolte 1986

pas d'activité antibactérienne, antifongique, cytotoxique

	extrait A	extrait B	extrait C
toxicité sur artemia		+	+
test de binding CGRP			52%

récolte 1991

l'activité sur les récepteurs n'a pas été reconfirmée (20%)

Légende des résultats obtenus lors des tests réalisés dans le
cadre du programme SMIB

Expression des résultats:

ANTIBACTERIENS:

- : pas de zone d'inhibition observée
- + : auréole $\leq 9\text{mm}$ à $1000\text{mg}/\text{disque}$
- ++ : diamètre d'inhibition $> 10\text{mm}$ à $1000\mu\text{g}/\text{disque}$
- +++ : diamètre d'inhibition $> 10\text{mm}$ à $100\mu\text{g}/\text{disque}$
(diamètre du disque= 6mm)

ANTIFONGIQUES:

- : pas d'inhibition
- + : inhibition à $1000\mu\text{g}/\text{disque}$
- ++ : inhibition à $1000\mu\text{g}/\text{disque}$ et à $100\mu\text{g}/\text{disque}$

CYTOTOXICITE:

- : $<30\%$ à $10\mu\text{g}/\text{ml}$
- + : $30\% < \text{toxicité} < 50\%$ à $10\mu\text{g}/\text{ml}$
- ++ : $50\% < \text{toxicité} < 80\%$ à $10\mu\text{g}/\text{ml}$
- +++ : toxicité $> 80\%$

TOXICITE:

- : $\text{CL}_{50} > 1000\mu\text{g}/\text{ml}$
- + : $50 < \text{CL}_{50} < 100\mu\text{g}/\text{ml}$
- ++ : $10 < \text{CL}_{50} < 50\mu\text{g}/\text{ml}$
- +++ : $\text{CL}_{50} < 10\mu\text{g}/\text{ml}$

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) P.J. Magistretti, *TIPS* , **11**, 1990, p. 250-254.
- (2) H. Schmitt, *Eléments de pharmacologie . 7ème éd.* Paris : Flammarion.1986.
- (3) P. Valet, *Pour la Science*, 1991, p. 159.
- (4) E.K. Potter, *Pharmac. Ther.*, **37**, 1988, p. 251-273.
- (5) Y. Cohen, *Abrégé de pharmacologie* . Paris : Masson. 1986.
- (6) J. Lavayre, Comm. personnelle à A. Vassas, 1992.
- (7) G.Helynck, Comm. personnelle à A. Vassas, 1991.
- (8) A. Vassas, Criblage pharmacologique par technique de "binding" appliqué aux invertébrés marins. Nouméa : ORSTOM. *Rapp. Missions : Sci. Vie : Pharmacol.*,1991, 45 p., multigr.
- (9) G. Bourdy, A. Vassas, Résultats préliminaires du criblage d'organismes marins du lagon Néo-Calédonien à l'aide de différents récepteurs membranaires. (Projet de publication pour *C.r. Acad. Sci., Paris*)
- (10) V.T. Tran, M.F. Beal, J.B. Martin, *Science* , **221**, 1985, p. 492-495.
- (11) H. Yoshizaki, M. Takayima, T Okada, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **146**, 1987, p. 443-451.
- (12) A. Uden, K. Tatemoto, V. Mutt, T. Bartfai, *Eur. J. Biochem.* , **145**, 1984, p. 525-530.
- (13) P. Robberecht, P. De Neef, Lammens, Deschodt-Lanckman, J.P. Christophe, *Eur. J. Pharmacol.*, **145**, 1978, p. 525-530.
- (14) D.P. Taylor, C.B. Pert, *Proc. natn Acad. Sci. , USA* , **76**, 1979, p. 660-664.

- (15) A. Schotte, J.E. Leysen, P.M. Laduron, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **333**, 1986, p. 400-405.
- (16) A.L. Cheung, P. ying, V.A. Fischetti, *Anal. Biochem.*, **193**, 1991, p. 20-23.
- (17) P.T. Northcote, R.J. Andersen, *J. anal. Chem. Soc.*, 1989, **111**, (6), p. 6276-6280.
- (18) E. Quinoa, E. Kho, U. Manes, P. Crews, J. Bakus, *J. org. Chem.*, **9**, (22), 1986, p. 4260-4264.
- (19) N. Harada, H. Uda, M. Kobayashi, N. Shimizu, I. Kitagawa, *J. anal. Chem. Soc.*, **111**, (19), 1989, p. 5668-5674.
- (20) H. Nakamura, J. Kobayashi, M. Kobayashi, Y. Ohizumi, Y. Hirata, *Chem. Lett.*, 1985, p. 713.
- (21) M. Kobayashi, N. Shimizu, Y. Kyogoku, I. Kitawaga, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 1985, p. 1305.
- (22) T.C. Mc Kee, C.M. Ireland, *J. nat. Prod.*, **50**, 1987, p. 757.
- (23) A. Kubo, Y. Kitahara, S. Nakahara, *Chem. Pharmacol. Bull.*, **37**, (5), 1989, p. 1384-1486.
- (24) E. Quinoa, P. Crews, *Tetrahedron Lett.*, **29**, (17), 1988, p. 2037-2040.
- (25) R.J. Quinn, D.J. Tucker, *Tetrahedron Lett.*, **26**, 1985, p. 1671.
- (26) S. Hirsh, S. Carmely, Y. Kashman, *Tetrahedron Lett.*, **43**, (14), 1987, p. 3257-3261.
- (27) F.J. Schmitz, Y. Gopichandy, *Tetrahedron Lett.*, **39**, 1978, p. 3637-3640.
- (28) M. Kobayashi, K. Kawazoe, I. Kitagawa, *Tetrahedron Lett.*, **30**, 1989, p. 4149.

- (29) M. Nakagawa, M. Endo, N. Tanaka, Lee Gen Pei, *Tetrahedron Lett.*, **25**, (30), 1984, p. 3227-3230.
- (30) T. Ichiba, R. Sakai, S. Kohmoto, G. Saucy, *Tetrahedron Lett.*, **29**, (25), 1988, p. 3083-3086.
- (31) J.C. Quirion, Comm. personnelle à G. Bourdy, 1992
- (32) F.J. Schmitz, S.P. Gunasekera, G. Yalamanchili, M.B. Hossain, *J. am. chem. Soc.*, **106**, 1984, p. 7251
- (33) R.L. Dillman, J.H. Cardellina, *J. nat. Prod.* , **54**, 1991, p.1056
- (34) R.J. Quinn, R.P. Gregson, A.F. Cook, R.T. Bartlett, *Tetrahedron Lett.*, **21**, 1980, p. 567
- (35) A.F. Cook, R.T. Bartlett, R.P. Gregson, R.J. Quinn, *J. org. Chem.* , **45**, 1980, p.4020
- (36) D. Jamieson, P. Davis, *Chem. Abstr.*, **94**, 1981, p.11371.
- (37) D. Mebs, *Toxicol* , **22**, 1984, p.821
- (38) C. Sevcik, C.A. Barboza, *Toxicol* , **21**, 1983, p.191.
- (39) A.J. Mijares, C. Sevcik, C.A. Barboza, J.A. Saavedra, *Toxicol* , **23**, 1985, p.221.
- (40) T. Higa, J. Tanaka, T. Kohagura, T. Wauke, *Chem. Lett.* , 1990, p. 145-148
- (41) M.H. Baslow, *Marine Pharmacology*. New-York : R.E. Krieger. 1969, 327 p.
- (42) D. Mebs, *Toxicol*, **22**, 1984, p. 306-307.

