

DEBITUS C.

Conférence donnée à
l'ICSN, CNRS, de
Gif sur Yvette le 19-11-1987

INTRODUCTION

LES SUBSTANCES MARINES D'INTERET BIOLOGIQUE

Le programme SMIB, Substances Marines d'Intérêt Biologique, a débuté en 85, au centre ORSTOM de NOUMEA, en collaboration avec le CNRS. Il fait suite à une première approche de l'étude chimique des Organismes Marins entreprise dès 77 en Nouvelle Calédonie. Devant l'essor de la chimie des substances d'origine marine aux Etats Unis, en Belgique et en Angleterre, ainsi qu'en Australie avec l'Institut de recherches des industries ROCHE, M. POTIER a émis à l'époque le projet d'un programme de recherches en collaboration avec l'ORSTOM et Rhône-Poulenc. L'ORSTOM est en effet depuis longtemps bien implanté en Nouvelle Calédonie et y possède les moyens océanographiques lourds indispensables pour la récolte des Organismes Marins. De plus, sur terre comme sous mer, la Nouvelle Calédonie possède d'importantes ressources d'organismes nouveaux et pour beaucoup endémiques.

Devant des problèmes divers liés pour certains à la réalisation d'un criblage d'activités biologiques à 18000km du lieu de récolte et d'extraction des Organismes, ce programme a été abandonné. Dominique Laurent, membre de cet ancien projet, a donc repris celui-ci en implantant à NOUMEA plusieurs essais simples d'un criblage général dont la présence sur place s'avère efficace

de ces organismes, qui oppose parfois les taxonomistes.

Une autre préoccupation du chimiste est le "pourquoi" de l'existence de métabolites inhabituels identifiés chez ces organismes marins, et qui l'amène à s'intéresser à leur environnement particulier et leurs interactions, qui assurent la survie de ces espèces

Devant le nombre et la diversité des organismes marins, surtout en milieu tropical, s'impose le choix des espèces à étudier. Ce choix peut s'effectuer selon deux grands types d'approches, une approche écologique et une approche plus systématique par criblage d'activités biologiques.

APPROCHE CHIMIO-ÉCOLOGIQUE

Les Invertébrés marins, auxquels nous nous intéressons plus particulièrement dans le cadre du programme SMIB, peuvent être mobiles et se déplacer librement, ou bien sessiles, la migration de ces dernières espèces étant toutefois assurée par leurs larves.

Un exemple tout à fait représentatif de la chimie marine est l'étude des Aplysies. Ce sont des Mollusques Gastéropodes Opisthobranches. Ces Aplysies se nourrissent essentiellement d'Algues. Des terpènes halogénés ont été isolés chez des couples "APLYSIE-ALGUE", comme par exemple *Aplysia limacina* ou *A. californica* et l'Algue *Placodium cartilagineum* dont elles se nourrissent. Ces terpènes sont les produits chiraux de voies de biosynthèse mal connues.

La présence parmi de nombreux composés polyhalogénés de molécules simples telles que l'iodoforme, le bromoforme, et des petites molécules à 2, 3 ou 4 carbones polyhalogénées chez l'algue *Asparagopsis taxiformis* est à noter, d'autant plus que cette algue est couramment consommée par les Hawaïens, sans que ces métabolites ne soient détruits par leur préparation culinaire.

L'abondance de métabolites bromés et chlorés chez les Invertébrés marins, que ce soient des

fait produite par les Dinoflagellées du genre *Goniaulax*. Ces Bivalves filtrent en effet de grandes quantités d'eau et concentrent ces algues toxiques dans leur organisme.

Cette toxine agit de la même façon que la tétrodotoxine isolée chez certains Poissons sans que toutefois il ne soit prouvé qu'elle est de leur propre production. Elle empêche la transmission de l'influx nerveux par blocage des canaux à sodium. La tétrodotoxine (Dose Létale = 10µg/kg d'homme frais) est 160.000 fois plus puissante que la cocaïne; elle a été essayée comme anesthésique local, décontracturant et analgésique dans la phase terminale de certains cancers et de la lèpre, mais actuellement est surtout un modèle pharmacologique pour les études de physiologie nerveuse.

De nombreux Invertébrés marins vivent fixés dès qu'ils ont dépassé le stade larvaire, et le seul moyen de défense et de développement dont ils disposent alors est la diffusion dans l'environnement de substances toxiques afin de gagner le combat pour la dominance du lieu.

Des diterpènes toxiques ont été isolés en grande quantité (1% du poids sec) d'Octocoralliaires comme par exemple ceux de *Pteroides laboutei*, Pennatulinaire néocalédonien, ou du *Xenia membranacea*, Alcyonaire assez fréquent. La toxicité de ces organismes est retrouvée *in vitro*, en particulier sur les tests d'ichtyotoxicité.

Ces organismes doivent probablement leur prospérité à ces substances, qui sont "antifouling", c'est à dire qui empêchent la fixation d'autres invertébrés, et anorexigènes chez les poissons. Là encore, il faut noter l'intervention d'Algues photosynthétiques unicellulaires, les Zooxanthelles: ces algues colonisent les polypes de ces Invertébrés et jouent probablement un rôle important dans la production de ces terpènes, dont la biosynthèse est liée à la photosynthèse. Deux spécimens d'une même espèce d'Alcyonaire, déjà difficiles à identifier, ne présentent ni la même composition chimique ni les mêmes Zooxanthelles. Il a été montré que les Gorgones des eaux tempérées, dépourvues de ces symbiotes ne produisent pas de diterpènes.

A propos des Gorgones et des Alcyonaires ou Coraux mous, de l'ordre des Octocoralliaires (symétrie des polypes à 8 secteurs), il faut rappeler ici la découverte qui est à l'origine de l'essor de la chimie des organismes marins: des prostaglandines de type A₂ (estérifiées ou non) ont été isolées en quantité importante (1,5%) du cortex de la Gorgone *Plexaura homomala*, première source importante de prostaglandines. Le carbone 15 de ces molécules est de configuration R, opposée donc aux prostaglandines 15S des mammifères. Toutefois, l'étude ultérieure de plusieurs lots de cette *Plexaura* a mis en évidence l'existence de deux variétés chimiques de cette gorgone: variété R produisant des prostaglandines de configuration 15R et la variété S. L'hémisynthèse des prostaglandines de type E₂ et F_{2α} 15S a été mise au point en quelques étapes à partir des

prostaglandines A₂ 15S et 15R naturelles, cette dernière mettant en jeu les étapes supplémentaires nécessaires pour l'inversion de la configuration du carbone 15. L'utilisation de cette Gorgone comme source de matière première pour l'hémisynthèse de prostaglandines était alors envisageable, mais la source de prostaglandines privilégiée est désormais la synthèse totale. Le rôle de ces prostaglandines chez les Organismes Marins n'est pas connu.

APPROCHE PHARMACOCHEMIQUE

La deuxième approche de la chimie des Organismes Marins est plus systématique et consiste à sélectionner selon leur activité biologique les échantillons à étudier ultérieurement en chimie pour l'isolement de nouveaux principes actifs. C'est cette approche que nous avons adoptée en priorité dans le cadre du programme SMIB.

RECHERCHE PRATIQUE DE NOUVELLES SUBSTANCES

* Au niveau pratique, il faut rappeler les méthodes de récolte utilisées sur le terrain, en Nouvelle Calédonie, et souligner la grande richesse zoologique du lagon et des récifs de cette région. De nombreuses espèces sont endémiques, et l'originalité de la faune sous-marine, ainsi d'ailleurs que de la flore terrestre, a longtemps été protégée par le Grand Récif corallien, qui forme une barrière aux invasions.

La plongée sous-marine autonome reste le moyen privilégié pour la récolte, l'observation écologique, l'évaluation de l'abondance et la localisation géographique précises des différentes espèces étudiées.

Les faibles profondeurs explorées en Plongée (jusqu'à 50m) subissent les variations saisonnières et climatiques, ainsi que l'influence directe de la lumière. Ces caractéristiques sont importantes si l'on se rappelle que les Invertébrés marins sont en interaction constante avec le milieu environnant et ses microorganismes photosynthétiques ou non, dont la prolifération est sensible à la température de l'eau.

Certains individus ne sortent que la nuit, telle cette espèce de *Cavernularia*, qui est en cours d'étude à l'antenne ORSTOM de MONTPELLIER pour ses propriétés cytotoxiques: chaque individu pèse quelques grammes et contient 95% d'eau, d'où l'importance de la récolte possible de quantités d'Organisme suffisantes pour mener à bien l'étude chimique approfondie.

La troisième méthode de récolte que nous utilisons est le dragage à l'extérieur du Grand Récif, dans des profondeurs de 250 à 650m. Ces profondeurs assurent un environnement très stable et dépourvu de symbiotes photosynthétiques. Cette stabilité est retrouvée dans le contenu chimique et l'activité des extraits des Organismes récoltés à plusieurs reprises. Plusieurs campagnes de dragages ont permis de repérer géographiquement les différentes espèces et montrent la richesse de la faune benthique en Invertébrés, particulièrement en Eponges et en Echinodermes, même si cette faune semble être moins originale que celle du Lagon. Les dragues utilisées sont légères et permettent de remonter des échantillons entiers d'individus, de quelques millimètres à plusieurs dizaines de centimètres, ce qui est important pour l'échantillonnage zoologique.

Les différentes récoltes sont ensuite triées. Un individu est photographié (dans son milieu dans le cas des organismes récoltés en plongée) puis conservé dans le formol pour l'identification zoologique. Cette identification est réalisée par les biologistes de l'ORSTOM à NOUMEA et du Muséum d'Histoire Naturelle à Paris. Les différents lots sont alors pesés et congelés immédiatement à bord des navires.

* Traitement au laboratoire

Les différentes récoltes sont ensuite ramenées au laboratoire où elles subissent le traitement suivant: broyage, lyophilisation et extraction de la poudre sèche par différents types de solvants.

Ces extraits sont alors testés sur plusieurs souches microbiologiques : bactéries, champignons phytopathogènes, cellules eucaryotes KB et oeufs embryonnés d'oursins. La toxicité

plus générale de ces extraits est recherchée sur des larves de crustacés d'*Artemia salina*, de jeunes tiques du bétail *Boophilus microplus* et des poissons "guppies" *Gambusia affinis*, dont l'observation permet de déceler les divers troubles du comportement provoqués par les extraits additionnés dans les aquariums.

Lorsqu'un extrait se révèle actif sur l'un ou plusieurs de ces essais, une deuxième récolte est effectuée afin de confirmer ces résultats. Si cet extrait est actif sur bactéries ou bien sur les champignons qui sporulent rapidement (*Fusarium* ou *Penicillium*), un autogramme est réalisé

Etant donné la forte teneur en sulfates de l'eau de mer, et en produits soufrés dans les milieux pauvres en oxygène, il est probable que les êtres marins renferment beaucoup d'autres métabolites soufrés.

Une Eponge, du genre *Podospongia*, récoltée lors des différentes campagnes de dragages, s'est révélée être particulièrement active sur les souches de champignons phytopathogènes avec un seuil d'activité exceptionnel d'environ 0,5µg d'extrait brut /disque, et une toxicité elle aussi très forte sur les larves de tiques. Cette toxicité est retrouvée *in vitro* sur les cellules Kb. Cette Eponge est en cours d'étude à l'Institut en collaboration avec Rhône-Poulenc Agrochimie.

Les tiques représentent en effet un problème important pour les éleveurs néo-calédonien: celles-ci prolifèrent rapidement, et deviennent résistantes progressivement aux traitements utilisés dans les exploitations agricoles. Ceci a donc motivé la recherche de nouveaux acaricides, en collaboration avec le laboratoire d'entomologie du centre ORSTOM de NOUMEA: les tiques sont prélevées sur le bétail, les oeufs des femelles matures sont prélevés, mis à éclore en étuve dans un tube. Les larves adultes montent par tropisme en haut des tubes où elles sont recueillies. Les larves utilisées sont donc de première génération. C'est le stade le plus favorable pour le traitement du bétail.

L'essai sur larves de tiques a permis de sélectionner et de suivre à NOUMEA la purification du principe actif d'une gorgone du genre *Euplexaura*. Cette molécule a été identifiée au guaiazulène, déjà décrit comme étant le pigment responsable de la couleur bleue intense des Gorgones de la famille des Plexauridées, mais surtout comme anti-inflammatoire et antibiotique, sans qu'aucune mention de son pouvoir acaricide n'ait été faite.

Une autre Eponge, *Stylotella species* a été étudiée à Gif par l'équipe PAIS pour son activité acaricide. Un nouvel exemplaire de terpène portant un groupement isonitrile, la stylotelline en a été isolé. Les isonitriles naturels restent rares et sont décrits pour leurs différentes activités biologiques. L'un d'eux a été isolé d'abord comme étant un métabolite toxique excrété par un Nudibranche, le *Phyllidia varicosa*, dans son mucus de défense, jusqu'à ce que celui-ci ait été trouvé en grande quantité dans l'Eponge du genre *Hymeniacidon* sur laquelle il se nourrit. Le genre *Stylotella* est d'ailleurs zoologiquement proche du genre *Hymeniacidon*.

Plusieurs Organismes se sont révélés cytotoxiques sur cellules Kb; cette toxicité se traduit en général par une action cytotoxique ou tératogène sur les oeufs embryonnés d'Oursins; ce dernier essai est réalisé, lorsque la saison le permet, sur les extraits actifs sur les cellules Kb. Cette toxicité est ensuite confirmée ou non sur différentes souches de cellules P388 *in vitro* puis *in vivo* par l'équipe Rhône-Poulenc Santé. Les organismes ainsi sélectionnés sont en cours d'étude ou le seront prochainement. Cependant, comme dans le cas de beaucoup de produits naturels terrestres,

les produits actifs isolés sont souvent plus intéressants en tant que modèles moléculaires pour les chimistes et pharmacologues, qu'en tant que médicaments potentiels. Un exemple illustrant ceci est l'isolement d'une Eponge antillaise, *Cryptotethia crypta*, de quantités importantes de nucléosides inhabituels dont le sucre est l'arabinose. La découverte de ces nucléosides cytotoxiques a conduit les chimistes à préparer des analogues dont l'un d'entre eux, l'arabinosyl cytosine (ARA-C[®]) est utilisé en chimiothérapie pour le traitement des leucémies. Le mécanisme d'action de l'ARA-C est connu: il est lentement phosphorylé en 5' et est alors incorporé, à la place de la cytosine, dans l'ADN des cellules tumorales dont il bloque ainsi la répllication.

Ce mécanisme d'action et la structure de l'ARA-C sont à rapprocher de l'AZATHYIMIDINE ou AZT, principal médicament anti-sida actuellement: l'Azathymidine est incorporée sous forme 5'-triphosphate dans la chaîne de rétro-synthèse de l'ADN à partir de l'ARN viral, la reverse transcriptase reconnaissant l'azathymidine comme la thymidine normale. La répllication du virus est alors bloquée.

Le nombre et la diversité des essais biologiques au laboratoire de NOUMEA doit prochainement s'augmenter d'essais enzymatiques et sur organes isolés de cobaye, afin d'élargir le domaine de recherche de nouveaux modèles moléculaires actifs.

CONCLUSION

Il faut finalement souligner l'importance du travail de terrain, tant au niveau récoltes et observations qu'au niveau criblage biologique qui permet donc d'orienter efficacement la recherche de nouvelles molécules biologiquement actives. Etant donné leur origine et la limitation de leur source naturelle, ces molécules ne deviendront probablement pas un médicament en tant que telles. Elles ont souvent l'intérêt pour les chimistes et les biochimistes d'être des molécules originales, et parfois d'être à la base des modèles pharmacologiques importants pour la recherche de nouveaux médicaments. Ce sont aussi des modèles pour l'imagination du chimiste.

Avant de finir cet exposé et de repartir pour NOUMEA, je tiens à remercier la Direction de l'ICSN et M^{lle} PAIS de m'avoir accueillie pendant quelques mois ici, et de m'avoir permis ainsi de resserrer les liens entre le CNRS et l'ORSTOM.

**RECHERCHE PRATIQUE DE NOUVELLES MOLECULES BIOLOGIQUEMENT
ACTIVES A PARTIR D'ORGANISMES MARINS**

Récolte

(à pied, en plongée ou par dragage)

Congélation à bord

Echantillonnage Zoologique

**Broyage, Lyophilisation,
Extraction,**

Criblage d'Activités Biologiques

essais microbiologiques

- Bactéries:
Escherichia coli
Staphylococcus aureus
Pseudomonas aeruginosa
- Champignons phytopathogènes
Fusarium oxysporum
Phytophthora parasitica
Penicillium italicum
- Cellules KB (P 388 *in vitro* et *in vivo* chez RPS)
- Oeufs embryonnés d'oursins
Echinometra mathei

essais de toxicité

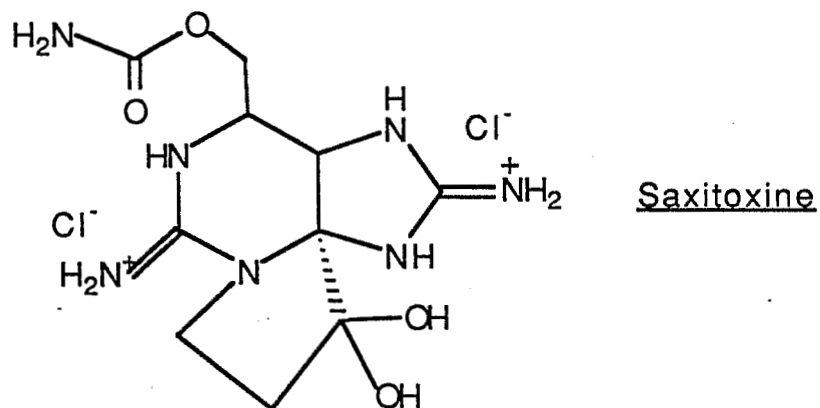
- Larves de crustacés (brine shrimp):
Artemia salina
- Larves de tiques du bétail:
Boophilus microplus
- Poissons (Guppies):
Gambusia affinis
- Phytotoxicité:
blé
amarante

Sélection des organismes à étudier

**Proposition de ces O.M. aux partenaires
CNRS, Universitaires et/ou Industriels**

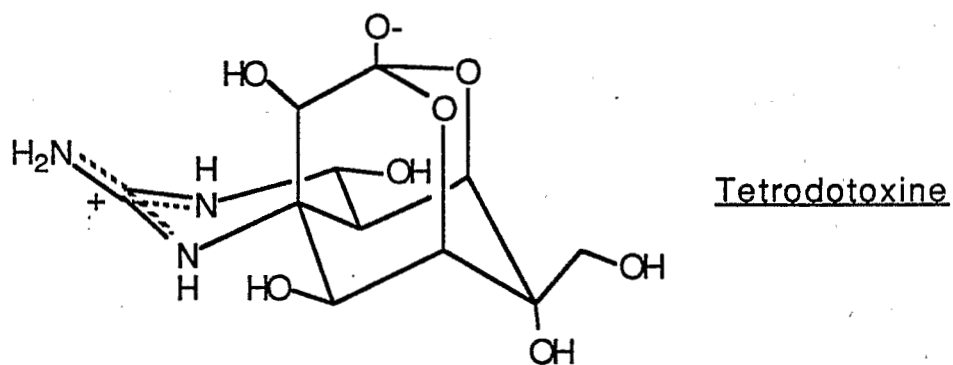
**Etude chimique et pharmacologique des Principes Actifs et
développement des résultats**

EXEMPLES DE TOXINES D'ORIGINE MARINE



Toxine isolée de Mollusques Bivalves et de *Goniaulax catanella* (Dinoflagellée)

Y. SHIMIZU, Fortschr. Chem. organisch. Naturst., 45, 235, (1984)

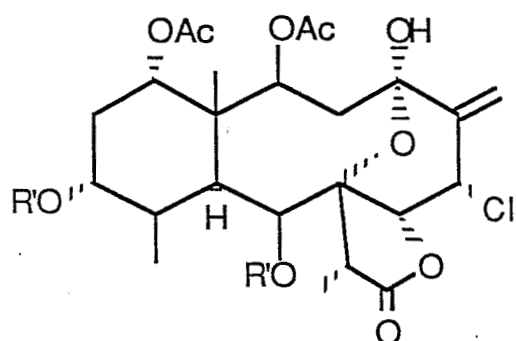


Toxine présente chez plusieurs genres de Poissons

E. LARSON et Coll., "Bioactive compounds from the Sea", Ed. H.J. HUMMS et C.E. LANE, Marcel DECKER NEW YORK, 1974, p. 139

Diterpènes ichthyotoxiques isolés d'un Pennatulaire (Octocoralliaires), le

Pteroides laboutei



R=R'=Ac: Pteroidine

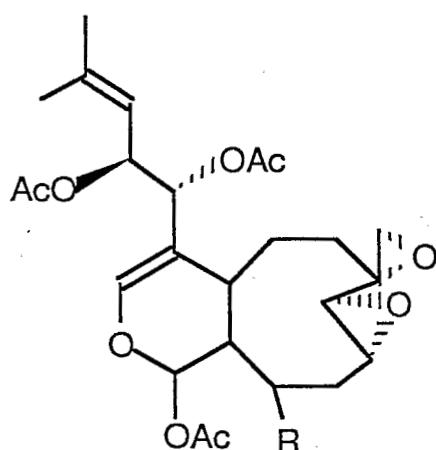
R=Ac, R'=COAr: O-désacétyl-12
O-benzoyl-12
pteroidine

A. CLASTRES, A. AHOND, C. POUPAT, P. POTIER et S.K. KAN,

J. Nat. Prod., 47, 155 (1984)

Métabolites diterpéniques isolés du Corail mou (Octocoralliaire)

Xenia membranacea



 =R: Havannahine

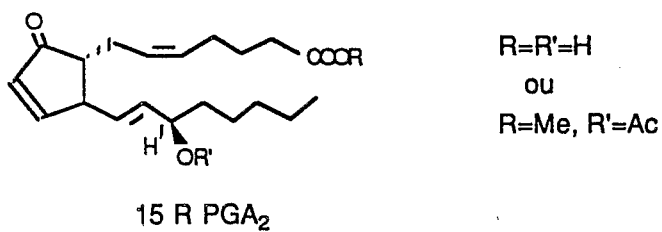
H₂C= =R: Désoxyhavannahine

H. LELONG, A. AHOND, A. CHIARONI, C. POUPAT, C. RICHE, P. POTIER, J. PUSSET,
M. PUSSET, P. LABOUE et J.-L. MENOUE,

J. Nat. Prod., 50, 203 (1987)

Premières prostaglandines A₂ isolées de la Gorgone (Octocoralliaires)

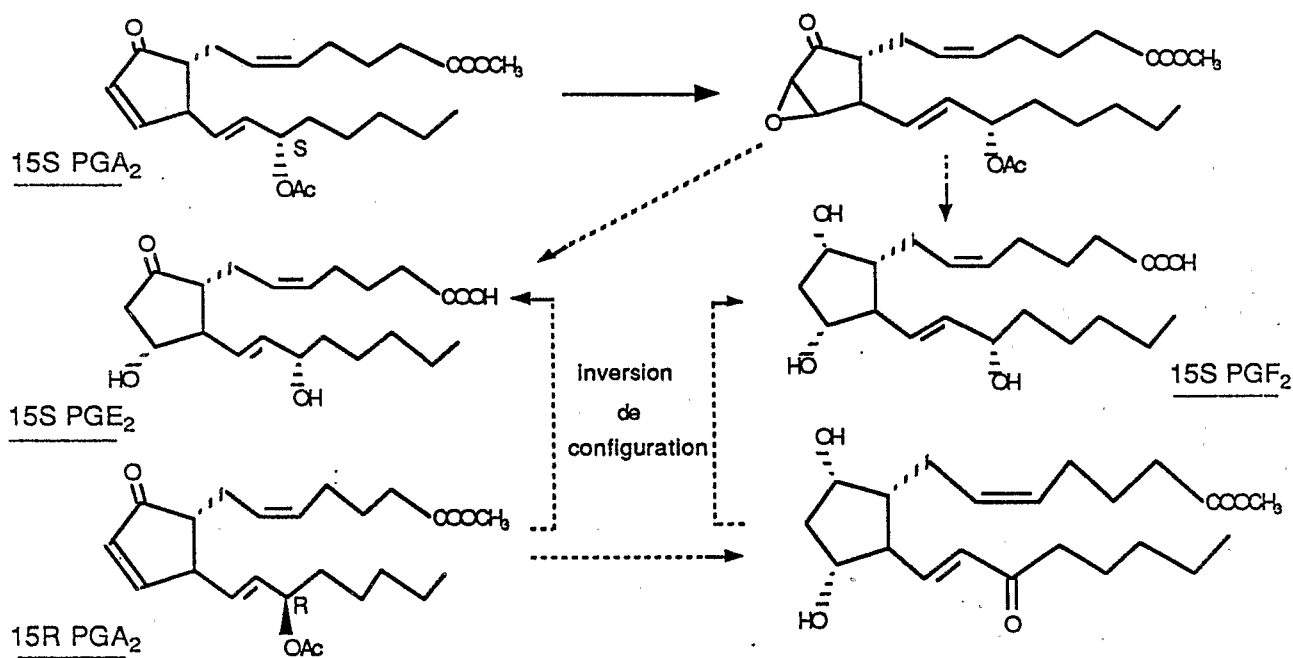
Plexaura homomalla



A.J. WEINHEIMER et R. SPRAGGINS, *Tetrahedron Lett.*, 59, 5185 (1969)

Hémisynthèse de prostaglandines de type "Mammifère" (15S) à partir des PGA₂

15R ou S isolées de *Plexaura homomalla*

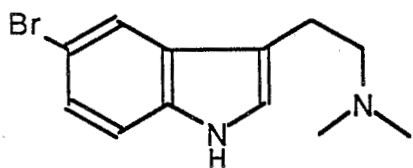


W.P. SCHNEIDER, R.D. HAMILTON et L.E. RHULAND, *J. Am. Chem. Soc.*, 94, 2122 (1972)

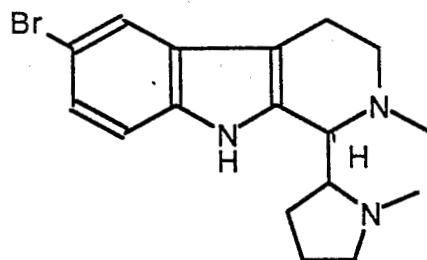
G.L. BUNDY, E.G. DANIELS, F.H. LINCOLN et J.E. PIKE, *ibid.* p. 2124

Alcaloïdes antibiotiques et/ou cytotoxiques d'Ascidies du genre *Eudistoma*

Alcaloïdes de *Eudistoma sp.*, Ascidie néo-calédonienne



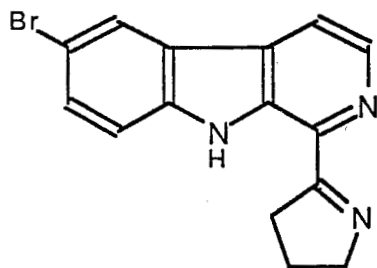
4-Bromo N,N-diméthyl tryptamine



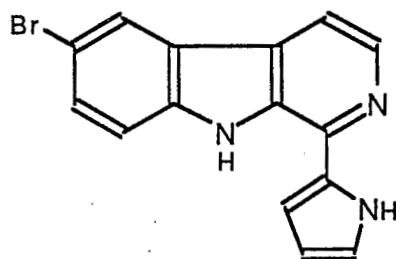
Woodinine

C. DEBITUS, M. PAIS et D. LAURENT, publication en cours

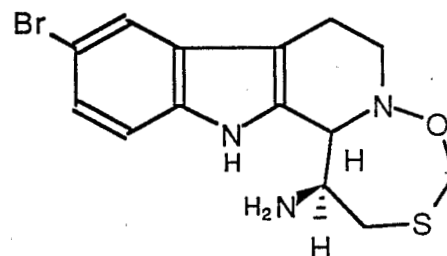
Alcaloïdes isolés de l'Ascidie des Caraïbes, l'*Eudistoma olivaceum*



Eudistomine H



Produit synthétisé



Eudistomine L

K. L. RINEHART, Jr et Coll., J. Am. Chem. Soc., 106, 1524 (1984)

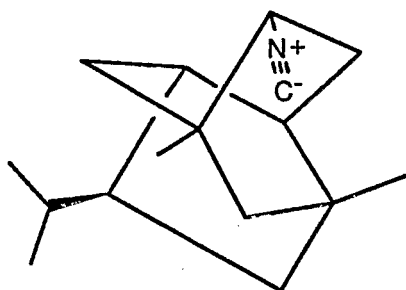
idem, p. 1526

idem, J. Am. Chem. Soc., 109, 3378 (1987)

14 1/2" (Echinoderm) "Actinopyga flammea"

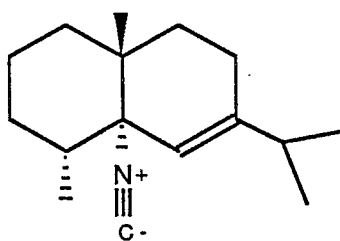
Exemples d'isonitriles isolés d'Invertébrés Marins

Isonitrile isolé d'un Nudibranche, le *Phyllidia varicosa* et de l'Eponge dont il se nourrit,
Hymeniacidon sp.



B.J. BURRESON, P.J. SCHEUER, J. FINER et J. CLARDY, J. Am. Chem. Soc., 97, 4763 (1965)

Isonitrile terpénique nouveau isolé d'une Eponge Benthique de Nouvelle Calédonie, *Stylotella sp.*

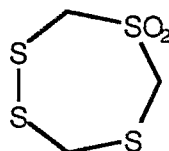
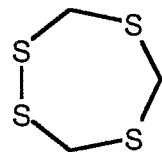
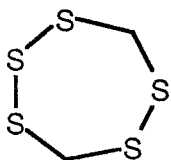
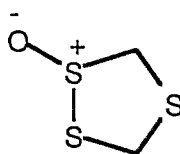
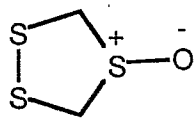
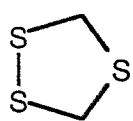


Stylotelline

M. PAIS, C. FONTAINE, D. LAURENT, S. LA BARRE et E. GUITTET,
Tetrahedron Letters, 28, 1409 (1987)

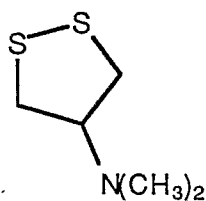
Exemples de produits soufrés isolés d'Organismes Marins

Produits polysoufrés antibiotiques isolés de l'Algue Rouge *Chondria californica*

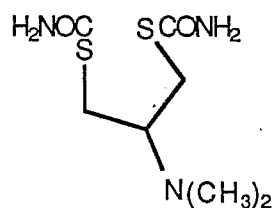


S.J. WRATTEN et D.J. FAULKNER, *J. Org. Chem.*, 41, 2465 (1976)

Amine dissoufrée insecticide du Ver Marin *Lumbriconereis heteropoda*



Nereistoxine

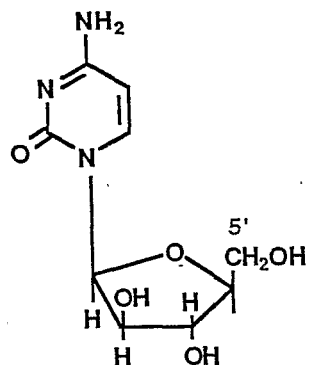


PADAN[®]

Y. HASHIMOTO, M. SAKAI et K. KONISHI, *Food-Drugs from the Sea Proceedings*, p. 129, Mar. Tech. Soc. (1972)

Exemples de Nucléosides biologiquement actifs

l'AraC, molécule dérivée de nucléosides inhabituels isolés de l'Eponge
Cryptotethia crypta



Cytosine arabinoside
AraC[®]

AraC 5'-monophosphate

AraC 5'-diphosphate

AraC 5'-triphosphate (AraCTP)

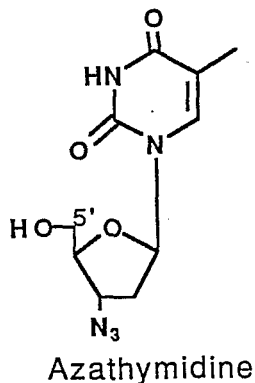
ADN polymérase

Inhibition de la polymérisation du ADN

Incorporation dans le DNA cellulaire

J.-B. LE PECQ, Chimiothérapie Anticancéreuse, HERMANN, PARIS, p.45 (1978)

Mécanisme d'action d'un nucléoside modifié sur le virus du SIDA, l'Azathymidine (AZT)



Azathymidine

Phosphorylation
en 5'

AzaTTP

Lymphocyte T

HIV

Bloquage de la Transcriptase
Réverse virale

RETROVIR (ZIDOVUDINE), Product Monograph, Wellcome, Mai 1987