

Jean-Michel KORNPBST
Faculté de Pharmacie, Nantes

ÉCHANTILLONNAGE DES PRÉLÈVEMENTS BIOLOGIQUES SOUS-MARINS

Les prélèvements d'organismes benthiques - algues ou invertébrés - réalisés en plongée autonome sont destinés à la recherche fondamentale (identification de nouvelles espèces biologiques ou de nouvelles molécules chimiques) ou à la mise en évidence d'activités biologiques à visées pharmacologiques (antibiotiques, antitumoraux, antiviraux). Dans tous les cas, l'échantillonnage pose des problèmes importants qui s'articulent autour des trois questions suivantes :

- Quoi ? (que récolte-t-on exactement ?).
- Où ? (un même organisme récolté à des endroits différents contient-il toujours les mêmes métabolites ?).
- Quand ? Cette dernière question traduit le très important problème des variations saisonnières, lui-même lié au cycle biologique de « l'organisme » récolté, lequel est le plus souvent inconnu,... et on en revient à la première question.

L'échantillonnage de matériel biologique sous-marin répond à deux objectifs distincts et doit être réalisé dans le cadre d'une coopération interdisciplinaire nécessitant une logistique qui peut devenir prépondérante.

Ces deux objectifs sont ceux de la recherche que l'on considère encore comme fondamentale ou appliquée mais il est devenu de plus en plus difficile de les distinguer dans la mesure où elles se « nourrissent » l'une de l'autre. La recherche appliquée, à finalité commerciale, ne trouve sa substance que dans les résultats de la recherche fondamentale, à visée plus académique, mais celle-ci n'est en général financée que grâce aux possibilités d'applications qu'elle est supposée induire.

Concernant le domaine des substances naturelles d'origine marine, la recherche fondamentale vise à identifier de nouvelles structures chimiques qui serviront ultérieurement de modèles pour des applications prévues à l'avance. Cependant, pour éviter de récolter « en aveugle » tout ce qui peut se trouver sous l'eau il est essentiel de pouvoir « cibler » les organismes *a priori* les plus intéressants. C'est le but de la chimiotaxonomie qui permet maintenant, et avec de bonnes chances de succès, de sélectionner les organismes censés produire un type donné de structure chimique.

Le champ des applications potentielles des substances naturelles, qu'elles soient d'origine marine ou terrestre, est évidemment très large et nous n'en avons sélectionné que quelques-unes qui « pèsent » très lourd dans le marché mondial de la chimie au sens large.

Ces quelques aspects préliminaires sont schématisés dans les deux tableaux suivants.

L'échantillonnage sous-marin, pourquoi ?

Objectifs	FONDAMENTAL	<ul style="list-style-type: none"> ● Recherche en chimie : nouvelles structures associées à l'immense variété biologique des océans. ● Recherche en chimiotaxonomie : relations structures/phylum pour éviter de chercher n'importe quoi n'importe où.
	APPLIQUÉ	<ul style="list-style-type: none"> ● Mise au point de nouveaux modèles de molécules : <ul style="list-style-type: none"> - en pharmacologie (antitumoraux, antiviraux, anti-inflammatoires, antibiotiques) - en cosmétologies (AHAS, photoprotecteurs, ...) - en biologie appliquée (antifouling, complexants, ...) - en agrochimie (antifongiques, pesticides, ...)
Cadre		<ul style="list-style-type: none"> ● Coopération interdisciplinaire obligée compte-tenu du nombre des « maillons de la chaîne d'activité »

La richesse biologique des océans est résumée dans le tableau 2 qui rappelle que la plupart des espèces animales sont marines et qu'il existe dans les mers deux « mondes » végétaux inconnus sur terre et dont les métabolites, souvent bien connus (gélifiants et épaississants alimentaires) n'ont aucun équivalent terrestre.

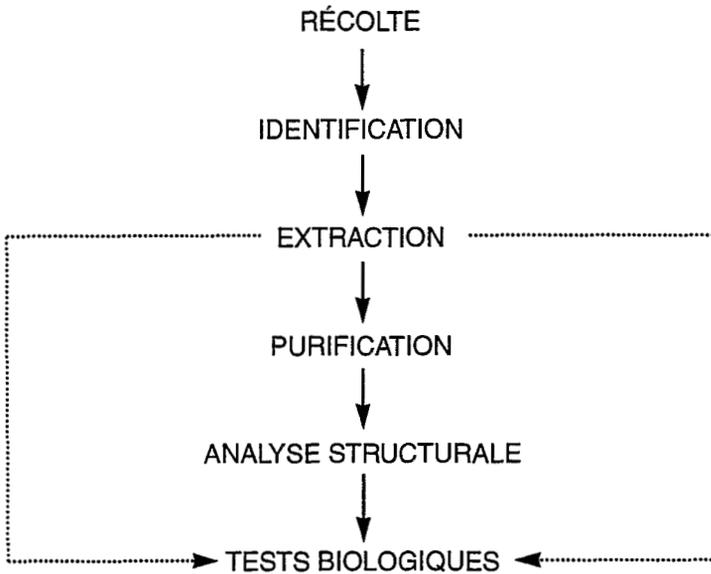
L'Océan, réserve de nouvelles structures moléculaires

<p>Depuis des siècles les médicaments ont été préparés à partir d'organismes terrestres, principalement les plantes, mais ... on estime que 90 % de toutes les espèces vivantes se trouvent dans la mer.</p>	
Faune :	<p>Les océans contiennent environ 500 000 espèces, soit près de 80 % des formes animales de la planète.</p>
Flore :	<p>Il n'existe qu'un seul « Monde botanique » sur terre, le « Monde Vert ». Les végétaux marins issus des « Mondes » rouge et brun n'ont aucun équivalent sur terre ; les substances qu'ils contiennent ne peuvent donc provenir que de l'océan (alginates, carraghénanes, agars, ...)</p>

La méthodologie d'échantillonnage est résumée dans le schéma ci-dessous et peut être conçue de deux manières différentes. Dans la méthodologie « en ligne », on passe directement de l'organisme récolté à une substance pure et identifiée sur le plan structural. Celle-ci est ensuite envoyée dans des laboratoires spécialisés pour en tester une activité éventuelle. Cette méthodologie est plus particulièrement prisée par les industriels qui préfèrent savoir dès le départ avec quelle molécule ils travaillent plutôt que d'utiliser un extrait actif mais de composition encore inconnue. C'est ce qu'on obtient avec la seconde méthodologie, l'extraction biodirigée, qui consiste à préparer un extrait d'activité maximale afin d'intéresser un laboratoire extérieur. Le cas échéant, l'analyse structurale et la synthèse éventuelle sont entreprises, sous contrat, avec le laboratoire concerné.

La première méthode a l'avantage de préserver les substances non actives mais néanmoins intéressantes du point de vue fondamental. La deuxième méthode a l'avantage d'être rapide car on ne conserve que les extraits bruts « actifs » mais néglige *a priori* l'aspect fondamental.

MÉTHODOLOGIE GÉNÉRALE



Comme pour toutes les chaînes d'activités, si un maillon est médiocre c'est toute la chaîne qui est médiocre, et le premier maillon, ici, c'est la récolte ! Cette première étape est donc essentielle et, contrairement aux apparences, très délicate à mettre en œuvre car quelles que soient les précautions prises on est jamais certain d'avoir réalisé un prélèvement représentatif. Sur le plan logistique, les techniques de prélèvement d'organismes sous-marins ont beaucoup évolué afin d'en améliorer l'efficacité, mais avec une logistique de plus en plus lourde nécessitant un financement de plus en plus important. Ces techniques sont résumées ci-dessous.

ÉVOLUTION DES TECHNIQUES DE RÉCOLTE

-
- 1 Récolte littorale manuelle, avec ou sans marée
 - 2 Récolte infra littorale par dragage et/ou chalutage
 - 3 Récolte infra littorale manuelle en scaphandre autonome
 - 4 Récolte infra littorale télécommandée à l'aide de véhicules, habités ou non
 - 5 Expédition organisée avec options simultanées L 2, 3, 4.

alourdissement progressif de la logistique et des coûts.

L'option 3, récolte manuelle infra littorale en plongée autonome, présente le meilleur rapport « qualité/prix » dans la mesure où elle permet d'obtenir le maximum d'échantillons avec le minimum de coût. Parmi les avantages de cette méthode, il y a l'échantillonnage « en direct » par un plongeur scientifique qui connaît ce qu'il va chercher ou qui va reconnaître ce qui peut être potentiellement intéressant. Il n'y a donc pas de récolte « en aveugle », souvent dévastatrice pour l'environnement (lors des dragages ou des chalutages), mais au contraire récolte ponctuelle et donc protection de l'environnement sous-marin côtier, fragile et menacé. Par ailleurs, cette technique permet de faire des photographies et des films vidéo *in situ* qui constitueront des diapothèques et des vidéothèques, encore très rares, pour permettre ultérieurement de reconnaître une espèce.

Il y a deux types de limites à cette méthode de prélèvement ; les limites absolues qui sont imposées par la physiologie humaine en matière de plongée et par les normes de sécurité. Dans la pratique, il est exceptionnel de récolter en-dessous de 50 mètres, la plupart des plongées se situant entre 15 et 35 m. Enfin, les

limites « concrètes » qui sont imposées par le financement. Habituellement on a recours aux clubs de plongée qui existent maintenant sur toutes les côtes des pays « développés » et qui permettent de faire les observations préalables indispensables à toute récolte en utilisant l'expérience des moniteurs qui connaissent de façon très précise les sites de plongée. Les contacts préliminaires avec ces responsables permettent très souvent de réaliser tout de suite des plongées « utiles ».

Les expéditions organisées du type 5 restent évidemment la meilleure possibilité pour l'exploration de zones vierges, encore nombreuses sur notre planète, mais il est exceptionnel d'obtenir les moyens nécessaires pour monter de telles missions. A notre connaissance, l'Orstom est le seul organisme français à avoir organisé des expéditions de ce genre. La mission Alis II de février 1990, au nord de la Nouvelle-Calédonie et à laquelle j'ai eu le privilège de participer, a été à cet égard particulièrement fructueuse.

Maintenant, que récolte-t-on exactement ?

Cette question est apparemment banale mais en réalité elle soulève un grave problème qui n'a que très rarement de solution immédiate et simple. En effet, en milieu marin il est rare de récolter **un organisme**, on récolte le plus souvent **une association** formée par l'organisme macroscopique visible et un ou plusieurs micro-organismes invisibles, et qui risquent donc d'être *a priori* négligés bien que leurs biomasses soient souvent importantes.

Dans le cas des algues le problème posé est relativement simple dans la mesure où les micro-organismes étrangers sont extérieurs au végétal (épibioses). Un lavage soigné de l'échantillon permet donc de les éliminer. Les épiphytes sont très fréquents mais variables selon les espèces et ainsi, lorsqu'on trouve une substance intéressante dans des algues fondamentalement différentes (une rouge et une verte par exemple) il est très probable que la véritable origine de cette substance soit un micro-organisme épiphyte qui n'a fait que changer de support. Les épiphytes les plus répandus sont les cyanobactéries et les diatomées ; les unes et les autres produisent souvent des substances originales mais en général inconnues dans les macrophytes, cela peut donc être un moyen de vérification *a posteriori* de l'origine réelle du composé isolé.

Dans le cas des épibioses animales (animaux encroûtants), le problème est à la fois plus simple car on les distingue parfaitement du reste du végétal, mais en même temps plus délicat à résoudre car il est souvent très difficile de les éliminer sans détruire en même temps le support végétal. Ce cas est particulièrement net avec certains bryozoaires qui arrivent à recouvrir la quasi-totalité du thalle d'une algue.

Pour les invertébrés le problème est beaucoup plus complexe du fait que le, ou les, micro-organismes étrangers, sont le plus souvent situés à l'intérieur des tissus de l'animal macroscopique. L'étude de ces associations a permis d'en distinguer trois types distincts :

- « l'hébergement ». C'est un des problèmes fondamentaux posés par les invertébrés filtreurs qui « retiennent tout ce qui passe », nourriture planctonique ou particule inerte. La majorité de ces micro-organismes, ou micro particules, sont donc sans rapport direct avec l'invertébré étudié et leurs métabolites se retrouvent dans l'hôte à des proportions variables d'une expérience à l'autre. Ce phénomène, qui concerne toutes les éponges et la plupart des ascidies, n'est en fait pas strictement limité au micro-organismes. Les éponges, en particulier, sont de véritables « HLM » où l'on trouve très souvent des vers, des échinodermes (ophiures) et des crustacés (crabes et crevettes). Les éponges doivent être obligatoirement coupées en petits dés et débarrassées de toute hypobiose avant d'entamer une extraction.

- le « circuit alimentaire ». Cela concerne également les filtreras mais surtout les mollusques herbivores et les « brouteurs » qui puisent dans l'organisme consommé les métabolites qu'ils ne peuvent faire eux-mêmes ou les substances chimiques qui assureront leur défense vis-à-vis des prédateurs. Tous les cas de figure sont possibles et on connaît de nombreux exemples pour chacun d'eux ; en voici quelques-uns.

La plupart des aplysies (lièvres de mer) se nourrissent d'algues rouges et n'en consomment parfois qu'une seule espèce. On retrouvera donc dans le mollusque un ou plusieurs métabolites de l'algue mais seuls quelques-uns d'entre eux auront été chimiquement transformés par l'animal. Il existe une espèce d'aplysie qui contient un métabolite original, manifestement d'origine algale mais pour lequel la source n'a pas encore été trouvée. Certains mollusques nudibranches broutent des éponges afin d'assurer leur défense chimique, ces animaux n'ayant ni coquille ni aucun moyen mécanique de se défendre et étant de fort piètres nageurs. On a constaté à maintes reprises que la même espèce de mollusque broutant des éponges différentes prélevait sur chacune d'elle une substance particulière avec lesquelles elle se préparait un « cocktail » d'armes chimiques ! On connaît aussi l'autre cas de figure, celui de nudibranches d'espèces différentes broutant la même éponge et transformant différemment le même métabolite ! Au total on ne récupère qu'un seul et même produit, initialement produit par l'éponge mais susceptible de transformations diverses par des nudibranches.

- la symbiose. C'est le problème général de la biochimie des invertébrés fixés qui ont un besoin absolu de micro-organismes photosynthétiques pour assurer leur métabolisme. Les symbioses produisent donc toujours les mêmes

mélanges de substances mais il est délicat de distinguer ce qui revient directement à l'hôte, ce qui est produit par le symbiote et tout ce qui provient par ailleurs du circuit alimentaire ou de l'hébergement. La seule technique actuellement utilisée pour tenter de déterminer ce qui est apporté par le symbiote est de le cultiver « hors hôte », mais ce n'est pas toujours possible et on n'est jamais certain que le micro-organisme symbiotique, cultivé séparément, produira les mêmes substances qu'en présence de son hôte naturel.

A ces trois types d'associations entre invertébré macroscopique et micro-organisme il convient d'ajouter le commensalisme qui est un type d'association beaucoup plus simple car il associe deux partenaires macroscopiques, assez souvent un coelentéré ou une éponge et un crustacé. La séparation des deux partenaires ne pose alors aucun problème et on peut déterminer facilement leurs apports respectifs et leurs relations biochimiques.

Un dernier cas, peut-être le plus recherché par les plongeurs biochimistes, est celui des organismes totalement dépourvus d'épibioses. Cela se rencontre chez certaines algues et dans la plupart des phyla d'invertébrés et, bien que rares, ils sont très facilement repérables sous l'eau. Ces organismes sont toujours *a priori* intéressants car ils indiquent qu'ils produisent des substances empêchant la fixation d'autres organismes, en d'autres termes des « antifoulings » naturels ; la plupart d'entre elles sont des toxines qui interviennent en même temps comme agents de défense chimique.

Pour en finir avec la question Quoi ? Il faut évoquer le problème crucial de l'identification de l'espèce récoltée. Ce problème est doublement fondamental car d'une part il n'est pas imaginable de travailler sur une espèce inconnue et d'autre part le nombre de systématiciens spécialistes des phyla marins sont, hélas, de plus en plus rares. La systématique semble avoir été délibérément délaissée depuis de nombreuses années et les biochimistes du milieu marin risquent d'en faire les frais à brève échéance.

Ce problème semble du reste très général et non limité à la France ou à l'Europe. Dans un article prémonitoire paru en 1988, Judith E. Winston, du Muséum d'histoire naturelle de New York précise l'état de la situation sous forme d'un tableau indiquant le nombre de systématiciens, spécialistes reconnus internationalement pour un phylum déterminé. Nous reproduisons ce tableau sur l'autre page.

Où récolte-t-on ?

Cette question pose le très délicat problème des variations géographiques qui, à notre connaissance, n'a pas encore trouvé de solution générale. Un exemple simple va montrer l'ampleur des difficultés rencontrées. *Plocamium cartilagineum* est une algue rouge bien connue parce qu'elle est ubiquiste, on la

Le problème de l'identification

Phyla	Nombre Espèces	Nombre systématiciens
Algues	~ 3.000	40
Éponges	~ 10 000	16
Cnidaires	~ 10 000	
- hexacoralliaires	~ 4.000	40
- anémones	~ 1.000	10
- octocoralliaires	~ 1.000	3
- hydraires	~ 2.000	23
Némertes	~ 1.000	14
Bryozoaires	~ 5 000	20
Ascidies	~ 2 000	12
Mollusques	~ 75 000	60
Echinodermes	~ 6.000	
- astéroïdes, ophiures	~ 2.000	16
- oursins, holothuries	~ 1.400	27

Judith E. Winston

The Stematist's perspective in "Biomedical Importance of Marine Organisms"

Edited by Daphne G. Fautin, California Academy of Sciences, San Francisco

1988, pp. 14.

rencontre sur la quasi-totalité des rivages de la planète. Une étude de ses principaux métabolites a cependant montré que des échantillons récoltés en Manche, dans l'Atlantique (côtes du Sénégal), dans le Pacifique (côtes de la Californie), et en Antarctique ne contenaient que rarement les mêmes composés, et de toute façon jamais dans les mêmes proportions. Et pourtant il s'agit de la même espèce, botaniquement parlant. Ce phénomène est loin d'être rare et a conduit les biochimistes à envisager l'existence de « races chimiques » pour désigner ces organismes biologiquement identiques mais biochimiquement différents.

Ce problème des variations géographiques est encore plus important pour les invertébrés filtreurs car, d'un océan à l'autre, on est jamais certain que ce sont les mêmes micro-organismes qui vivent en symbiose ou qui sont intégrés dans le même organisme. Le cas inverse est également bien connu ; telle substance, souvent une toxine, est initialement attribuée à un invertébré puis on découvre que cette

même toxine est également présente dans d'autres animaux (invertébrés ou poissons) totalement différents du premier organisme étudié. Ce fut le cas de la célèbre Palytoxine, et plus récemment pour un ensemble de substances cytotoxiques initialement isolées d'ascidies du Pacifique mais provenant en réalité du même symbiote, une microalgue du groupe des Prochlorons (*). La conclusion est alors claire, ce n'est pas l'animal qui est à l'origine de la toxine mais un micro-organisme, souvent phytoplanctonique, que l'on « suit à la trace » tout au long des chaînes alimentaires. Ces chaînes alimentaires, nous le savons tous, vont parfois jusqu'à l'homme par le biais de coquillages habituellement inoffensifs mais devenus brutalement toxiques, à certaines époques de l'année et en certains points du globe, du fait de certains micro-organismes, des dinoflagellés, dont le développement devenu localement explosif constitue les « marées colorées », souvent appelées « rouges » (**).

Il y a quand même des conséquences positives dans l'étude des variations géographiques. Ainsi, lorsqu'un métabolite est retrouvé dans des espèces récoltées dans des mers différentes, et à différentes époques de l'année, c'est qu'il est très probablement lié à la nature de l'organisme étudié et donc qu'il peut servir de « marqueur » à des fins chimiotaxonomiques. Nous avons ainsi montré qu'un acide gras très particulier est systématiquement présent dans les algues rouges appartenant à une famille bien précise, qu'elles proviennent de l'Atlantique tropical, de la Méditerranée ou du Pacifique.

Ces problèmes étant posés, il va de soi que l'on récolte surtout où on peut et rarement où on veut car si les rivages des pays développés ont été et continuent d'être très activement explorés, il reste encore, Dieu merci, des zones entièrement vierges du point de vue de la biologie marine mais qui sont, hélas, fort peu accessibles et qui nécessiteraient de monter de véritables expéditions. Je tiens à préciser qu'à cet égard l'ORSTOM est très en pointe dans ce domaine et que des missions de ce type sont organisées au départ de Nouméa dans le cadre du programme SMIB de Madame Cécile Débitus (***) .

En conclusion de cet aspect du problème de l'échantillonnage biologique sous-marin, on n'est jamais certain de retrouver toujours les mêmes métabolites, quelles qu'en soient les proportions, dans deux espèces réputées identiques mais récoltées à des endroits différents. Mais au fond, cela n'a guère d'importance car

* Le centre ORSTOM de Nouméa est à l'origine de ce résultat.

** Voir à ce propos le récent article de D. Anderson, Eaux colorées et phytoplancton toxique, *Pour la Science*, octobre 1994, pp. 68-76.

*** C'est dans ce cadre que j'ai pu participer, en 1990, à la campagne ALIS II au nord de la Nouvelle-Calédonie, dans les parages du « Grand Passage ». Qu'elle trouve ici l'expression de ma plus vive reconnaissance.

ce que nous cherchons dans le monde marin, ce sont surtout des modèles d'activité biologique. Lorsqu'une « piste » se révèle intéressante, c'est moins l'origine de cette piste qui compte que la possibilité de réobtenir celle-ci par synthèse, à moins de vouloir faire « aussi » de la recherche fondamentale !

Quand récolte-t-on ?

Avec cette question *Quand ?* Nous pouvons presque entièrement répéter ce qui vient d'être dit précédemment avec la question *Où ?*

Évidemment on peut récolter quand on veut, à condition de travailler à proximité d'un site intéressant, ou quand on peut, si l'on participe à une expédition organisée à cet effet, mais on n'est jamais certain de récolter toujours le même organisme, c'est-à-dire ayant les mêmes métabolites dans les mêmes proportions. En milieu marin, il faut en effet toujours tenir compte des variations saisonnières, aussi bien pour les algues qui ont des cycles végétatifs souvent complexes, que pour les invertébrés filtreurs qui hébergent des micro-organismes photosynthétiques dont la nature et la quantité peuvent varier dans le temps. Ce problème des variations saisonnières est particulièrement important dans le cas des algues marines cultivées à grande échelle à des fins industrielles (mannitol, alginates, carraghénanes, agars). Tout se passe finalement comme en agriculture terrestre où il existe des moments bien précis pour récolter des légumes, des fruits ou des céréales.

La conclusion finale va sembler pessimiste au lecteur non averti, *un échantillon biologique sous-marin n'est pratiquement jamais représentatif de l'espèce censée avoir été récoltée*. Ce n'est le cas que pour des espèces particulièrement connues et souvent cultivées ou produites de manière quasi industrielle comme les grandes laminaires ou les éponges de toilette. Pour l'immense majorité des autres organismes qui sont étudiés d'un point de vue fondamental ou d'un point de vue appliqué, ce n'est que lorsqu'une substance ou une activité intéressante aura été décelée que le véritable travail ne fait que commencer. Il va falloir en effet répondre aussi exactement que possible aux questions suivantes :

- quel est le véritable producteur de la substance en question ?
- à quelle époque de l'année la teneur en cette substance est-elle maximale, ou à quelle époque de l'année la composition du mélange actif est-elle la plus simple ?
- peut-on trouver cette substance dans une espèce voisine en plus grande quantité ou dans une autre espèce mais d'accès plus facile ?

Ceci étant, cette recherche est passionnante car elle associe la réflexion à l'action, ou la science à l'aventure !