

DIVERSITE BIOLOGIQUE TROPICALE ET INNOVATION THERAPEUTIQUE. LES RECHERCHES MENEES PAR L'ORSTOM

par

C. MORETTI, C. DEBITUS, A. FOURNET, M. SAUVAIN, G. BOURDY & D. LAURENT

Unité de Recherche «Substances Naturelles d'Intérêt Biologique»,
Département Santé - ORSTOM,
213, rue La Fayette, F-75480, Paris Cedex 10, France

Résumé. — Les organismes vivants élaborent des molécules dont la complexité dépasse l'imagination des chimistes. Leurs complexités chimiques vont de pair avec leurs remarquables propriétés biologiques. Les forêts tropicales sont avec les récifs coralliens parmi les biomes les plus riches en nombre d'espèces et constituent un gisement encore peu exploré de nouvelles molécules.

En Nouvelle-Calédonie, l'ORSTOM dispose de moyens océanographiques indispensables pour l'étude et la récolte des Organismes Marins vivant dans le plus grand lagon du monde. De nombreux organismes marins ont été étudiés dans le cadre du programme SMIB (ORSTOM-CNRS) à Nouméa. Les extraits de ces organismes sont soumis à un large criblage biologique. Certains des composés isolés, comme la girolline, en sont au stade des essais cliniques.

Pour ce qui est des espèces végétales, les chances de découverte de principes actifs sont augmentées grâce à l'ethnobotanique qui valorise l'expérience ancestrale des guérisseurs. En Bolivie, une équipe franco-bolivienne étudie l'activité leishmanicide des drogues végétales employées dans la médecine traditionnelle.

L'étude des extraits actifs, *in vitro* et *in vivo*, sur les leishmanies du nouveau monde a été conduite jusqu'à l'isolement et la détermination des composés responsables de l'activité appartenant aux groupes chimiques des alcaloïdes, des quinones et des terpènes.

En conclusion, les enjeux scientifiques et géopolitiques de la biodiversité sont rappelés.

KEYWORDS: Biotechnology; Biologicals; Chemotherapy; Research; ORSTOM

Introduction

Les organismes vivants élaborent des molécules dont la complexité dépasse l'imagination des chimistes. Leurs complexités chimiques vont de pair avec leurs remarquables propriétés biologiques. L'étude de ces substances naturelles représente l'une des voies de l'innovation thérapeutique. Les forêts tropicales sont avec les récifs coralliens parmi les biomes les plus riches en nombre d'espèces, et constituent un gisement encore peu exploré de nouvelles molécules. Des recherches sont actuellement menées par les équipes de l'ORSTOM sur ces deux milieux, respectivement en Bolivie, en Nouvelle-Calédonie et depuis peu à Madagascar.

A. Diversité biologique - diversité biochimique

La diversité biologique, sa richesse, sa conservation, il en fut beaucoup question lors de la conférence de Rio de Janeiro. Elle fournit essentiellement :
- de nouvelles semences, résistantes au froid et à la sécheresse par exemple, et des produits pharmaceutiques.

Dans la compétition qui sévit entre les espèces pour la lumière, la nourriture, l'espace, interviennent des messagers chimiques. Ces métabolites appelés improprement « secondaires » sont doués de propriétés biologiques remarquables, liées à leur rôle et mode d'action dans les écosystèmes. Ils déterminent les relations, entre les êtres vivants, en participant à la reconnaissance inter- et intra spécifique (allelchimie), et avec le milieu (protection contre les radiations, défense chimique). Ces composés sont l'expression biochimique de la diversité biologique; par opposition aux métabolites primaires qui expriment l'unité du monde vivant.

Des exemples extraits du monde marin illustreront ces notions d'écologie chimique. De nombreux Invertébrés marins vivent fixés dès qu'ils ont dépassé le stade larvaire, et le seul moyen de défense dont ils disposent alors est la diffusion dans l'environnement de substances toxiques afin de gagner le combat pour la dominance du lieu. D'autres organismes marins apparemment sans protection survivent parfaitement aux expositions prolongées au soleil lors des marées basses.

D'autres espèces doivent probablement leur prospérité à des substances « antifouling », c'est-à-dire qui empêchent la fixation d'autres invertébrés. Autant de pistes qui conduisent les chimistes à identifier des produits filtrant les U.V., ou bien des toxines protégeant les mollusques ou permettant aux alcyonaires de s'étendre.

B. *Le programme Substances Marines d'Intérêt Biologique*

L'étude des produits d'origine marine est en pleine expansion comme en témoigne le nombre croissant de publications : 500 jusqu'en 1970, 3 700 entre 1970 et 1990. Pour l'instant, 4 médicaments d'origine marine sont utilisés en santé humaine : la vidarabine et la cytarabine, antitumoraux dont proviennent aussi l'ARA-C et l'AZT, la céphalosporine (antibiotique issu d'un champignon marin) et les prostaglandines aux actions diverses, mais qui sont présentes dans tout le règne animal (fig. 1).

Le programme Substances Marines d'Intérêt Biologique (SMIB) réalisé avec le CNRS a démarré en Nouvelle-Calédonie en 1985. Il s'agit de mettre en évidence de nouvelles molécules actives à partir d'organismes marins, en particulier les invertébrés.

En Nouvelle-Calédonie, L'ORSTOM dispose des moyens océanographiques indispensables pour l'étude et la récolte des organismes marins, vivant dans le plus grand lagon du monde. Un système de récifs complexe, comprenant toutes les formations existantes (récif frangeant, isolé, barrière ou atoll) s'étend de part et d'autre de la Grande Terre de Nouvelle-Calédonie, enserrant ainsi 800.000 km² de lagon. La grande variété géomorphologique de ces fonds marins est particulièrement intéressante : on trouve en effet dans un espace relativement restreint des pentes récifales, des monts sous-marins récemment découverts, un bassin sédimentaire, une fosse de subduction et des volcans actifs. La faune sous-marine, ainsi d'ailleurs que la flore terrestre, a longtemps été protégée par le « Grand Récif » corallien, qui forme une barrière aux invasions.

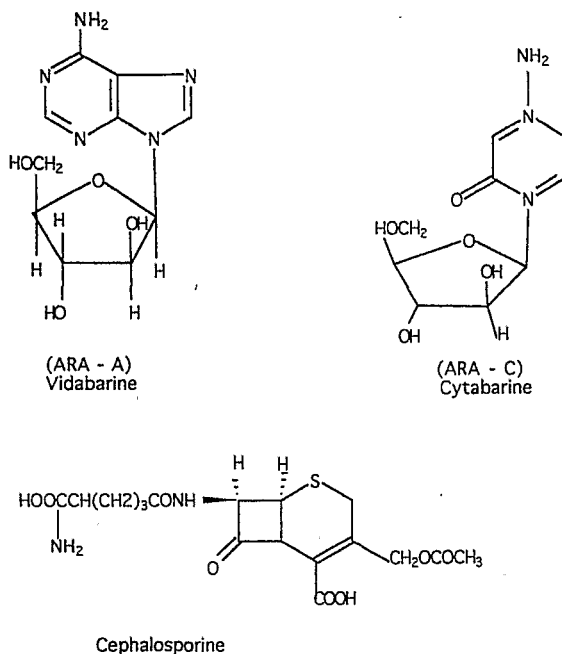


Figure 1

Médicaments actuellement utilisés d'origine marine.
Anticancéreux: Cytabarine; antiviraux: Vidabarine; antibiotique: Cephalosporine.

Méthodes de récolte et de sélection des organismes marins

La plongée sous-marine autonome reste le moyen privilégié pour la récolte, l'observation écologique, l'évaluation de l'abondance et la localisation géographique précise des différentes espèces étudiées. Les récoltes sont assurées pour la plus grande partie par l'équipe de plongeurs de l'ORSTOM. Il est à noter l'importance de l'observation des récifs de jour et de nuit: en effet, certains organismes ne se déploient que la nuit. Chaque station de récolte donne lieu à l'établissement d'une fiche de station qui permettra de garder en mémoire l'aspect de la station à un moment donné, de suivre son évolution et de répertorier les organismes à traiter.

Une autre méthode de récolte que nous utilisons est le dragage dans des profondeurs de 250 à 650 m. La zone économique exclusive de Nouvelle Calédonie possède de nombreux monts sous-marins, véritables refuges de la faune, tant au niveau des organismes fixés que des poissons. Plusieurs campagnes de dragages ont montré la richesse de la faune benthique en Invertébrés, particulièrement en Éponges et en Echinodermes; cette faune ayant la particularité d'être extrêmement archaïque et riche en «fossiles vivants». L'étude de ces organismes consitue en partie l'originatilité du programme SMIB. Nous en verrons un exemple.

Le premier problème posé lors de l'étude des organismes marins est l'identification de ceux-ci: l'identification des produits isolés, malgré la

complexité des structures chimiques rencontrées, est parfois plus rapide que la détermination zoologique de ces organismes. Aussi, à chaque récolte, un individu est photographié puis conservé dans le milieu adéquat. L'identification zoologique est réalisée par les biologistes de l'ORSTOM à Nouméa et du Museum d'Histoire Naturelle à Paris.

En Europe, les principaux collaborateurs de ce programme sont, pour la chimie, les partenaires universitaires (universités françaises, mais aussi italiennes) et l'Institut de Chimie des Substances Naturelles du CNRS.

La sélection des échantillons par les essais biologiques

Entre 300 g et 3 kg d'organismes sont récoltés dans le cas d'une première récolte, puis broyés et lyophilisés. Trois extraits différents par leur polarité sont préparés, sur lesquels sont réalisés plusieurs essais permettant la sélection sur place des organismes récoltés.

Les essais réalisés à Nouméa ont pour cibles :

- les bactéries et levures pathogènes pour l'homme,
- les champignons phytopathogènes,
- les cellules tumorales KB, cellules Véro en lignée continue,
- les virus de l'Herpès cultivés sur cellules Véro.

Des essais sur œufs embryonnés d'oursins et larves d'*Artemia salina* permettent une première appréciation de la toxicité des extraits.

Récemment, de nouveaux essais ont été mis en œuvre; il s'agit de déceler dans les extraits marins des composés de nature non protéique réagissant spécifiquement avec 4 récepteurs membranaires. Ces essais sont réalisés en collaboration avec Rhône-Poulenc Santé.

Les résultats les plus marquants du programme Substances Marines d'Intérêt Biologique

Environ 300 organismes marins ont été étudiés dans le cadre du programme SMIB à Nouméa. Seulement une cinquantaine d'organismes ont été retenus pour des études chimiques et pharmaceutiques, ou sont en cours d'étude actuellement. Si certains de ces travaux sont purement fondamentaux, d'autres ont permis de découvrir des molécules originales actives. En voici quelques exemples.

La corallistine A, (fig. 2) est une curiosité du monde marin, car il s'agit en fait de la deuxième porphyrine libre isolée d'un organisme vivant, en l'occurrence une éponge. Faut-il y voir l'influence des cyanobactéries symbiotiques? La détermination de sa structure fort complexe a nécessité l'usage intensif des nouvelles méthodes de RMN. Ce composé est actif sur les cellules KB (5).

A l'origine purement académique, car il s'agissait d'étudier la composition chimique d'organismes vivant en eau profonde, l'étude de *Gymnocrinus richeri*, a permis l'isolement d'autres pigments remarquables : les gymnochro-

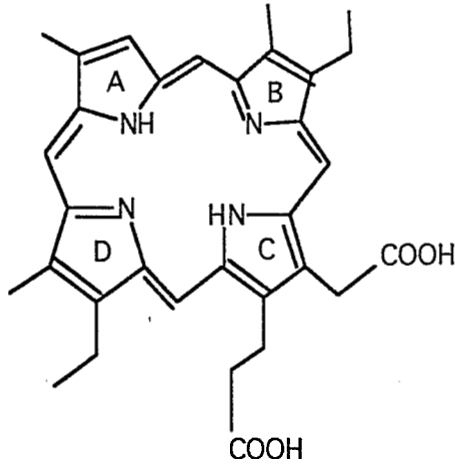
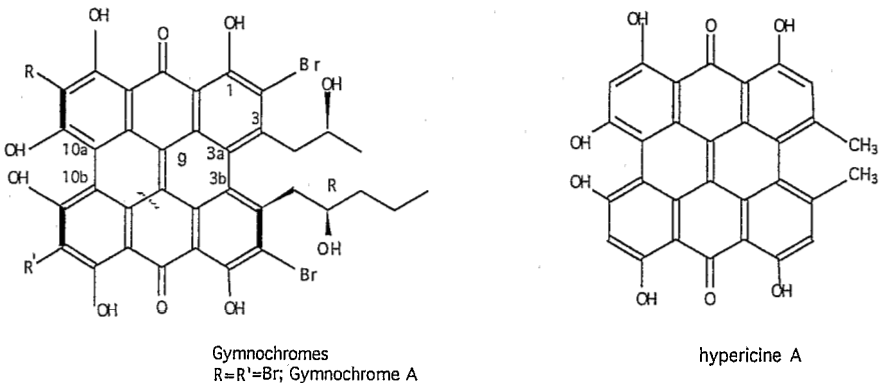


Figure 2

Structure chimique de la Corallistine A, une des rares porphyrines libres isolées d'un organisme vivant *Corallistes sp.*
D'après D'Ambrosio et al. (1989).



Gymnochromes
R=R'=Br; Gymnochrome A

hypericine A

Figure 3

Comparaison des structures chimiques des Gymnochromes, isolés de *Gymnocrinus richeri* avec celle des hypericines, quinones polycycliques isolées de végétaux possédant des propriétés antirétrovirus; (D'après De Riccardis et al., 1991).

mes (fig. 3). Etrange organisme que ce Crinoïde, véritable fossile vivant qui, bien que vivant à plus de 500 m de profondeur, se pare de couleurs les plus vives. Les gymnochromes sont des composés du type phénanthroperylène — quinones bromosubstitués; leurs structures sont à rapprocher des hypericines (fig. 4), composés isolés de végétaux, et qui ont montré de remarquables activités anti-sida. Les essais des produits isolés sur HIV sont en cours (4).

Plusieurs Ascidies ont été étudiées; il a été démontré que les cytotoxines résistantes à l'eau chaude, isolées de *Lissoclinum voeltzkowi*, sont responsables des intoxications observées en Nouvelle-Calédonie, lors de la consommation d'huîtres associées à ces ascidies (11).

Enfin on ne peut passer sous silence le girodazole, composé isolé dans les années 80 d'une éponge baptisée «girolle» par les océanographes en raison de la ressemblance avec le champignon du même nom. L'étude pharmacologique de ce composé aux propriétés antitumorales remarquables a été conduite jusqu'au stade clinique par Rhône-Poulenc Santé. Pour ce faire, il fallut récolter en 1989 quelques 150 kg de cette petite éponge pour obtenir les 100 g de «Girodazole» nécessaires pour les essais cliniques. Les derniers ont été arrêtés en 1991 (9).

C. Les recherches sur les plantes à activité antileishmanienne de Bolivie

Les chances de découverte de principes actifs chez les espèces végétales sont augmentées grâce à l'ethnobotanique qui valorise l'expérience ancestrale des guérisseurs. En Bolivie, une équipe franco-bolivienne étudie actuellement l'activité leishmanicide des drogues végétales employées dans la médecine traditionnelle.

La leishmaniose cutanée (espundia) présente des signes cliniques identifiés par les populations natives, ce qui facilite la collecte d'informations sur l'emploi de remèdes locaux à base de plantes (10).

Les données ethnobotaniques et les échantillons de plantes sont recueillis dans les zones d'endémie des parasitoses, là où les populations natives sont supposées avoir une bonne connaissance de ces maladies. Les études de terrain ont porté sur deux régions du piémont andin, semblables d'un point de vue biogéographique, mais différentes quant à leur peuplement. Dans l'Alto Beni, les enquêtes ont été réalisées chez les Indiens Chimanés, une communauté indigène bien intégrée dans son écosystème et ayant une médecine traditionnelle encore vivace. D'autres enquêtes ont aussi été menées dans les terres basses du Chaparé, une région au caractère très amazonien, fortement perturbée par l'afflux récent de nombreux colons. Ces migrants, pauvres et démunis, n'ont pas accès aux médicaments antileishmaniens, trop onéreux pour eux, et d'administration trop délicate pour être utilisés dans un milieu rural médicalement sous-équipé. Aussi font-ils un large usage des remèdes populaires essentiellement à base de plantes.

Trois types d'essais sont réalisés pour apprécier l'activité leishmanicide des drogues. Les deux premiers consistent à mesurer les effets des extraits végétaux sur les cultures *in vitro* de *Leishmania*, en premier lieu sur la forme extracellulaire du parasite (promastigotes), ainsi que sur des macrophages péritonéaux de souris infectées par des amastigotes de *Leishmania mexicana amazonensis* (L.m.a.).

Le premier essai a l'avantage d'être facile à réaliser, les promastigotes de *leishmania spp* se cultivant assez facilement. Cependant il n'est pas suffisant quand on sait qu'un médicament de référence comme le glucantime n'est pas actif sur ce modèle (3).

Les activités *in vivo* des extraits ou produits isolés actifs *in vitro* sont appréciées sur des souris immunodéficientes BALB c. auxquelles on injecte au niveau du coussinet plantaire des amastigotes de L.m.a. (2). Le traitement est effectué dans les jours qui suivent l'infection, à des doses inférieures aux doses toxiques pour la souris (mesure de la DL50). Nous injectons les

substances ou extraits actifs en intro-lésionnel, conditions opératoires qui se rapprochent des conditions d'utilisation des plantes en médecine traditionnelle. La drogue de référence utilisée pour ces essais est le Glucantime® .

Les résultats des recherches sur les plantes antileishmaniennes de Bolivie

Les enquêtes ethnobotaniques ont permis de relever 18 plantes utilisées pour traiter «l'espundia». Sept espèces végétales ont montré une activité leishmanicide significative sur l'un des 3 essais effectués. Elles sont indiquées dans le tableau 1 suivant.

L'étude des extraits actifs *in vitro* et *in vivo* sur les leishmanies du Nouveau Monde, a été menée jusqu'à l'isolement et la détermination des composés responsables de l'activité.

Des alcaloïdes indoliques toxiques pour les leishmanies ont été isolés de *Peschiera van heurkii* (12). Parmi eux la conodurine et la déméthyl-conodurine inhibent totalement les amastigotes de L.m.a. à la dose de 25 µg/ml; à cette dose le glucantime est totalement inactif. *In vivo*, cependant, ces alcaloïdes indoliques sont toxiques (toxicité cutanée) aux doses actives.

Les quinones isolées de *Pera benensis* ont montré une activité *in vitro* et *in vivo*. Dans ce dernier cas l'activité est comparable au médicament de référence, le glucantime. Les effets secondaires de ce type de composés sont bien connus et hypothèquent leurs utilisations dans le traitement des leishmanioses. Cependant ces résultats justifient l'usage traditionnel qui est fait de la drogue végétale par les Chimanes (8). La mise en évidence des propriétés leishmanicides des alcaloïdes quinoléiques isolés d'une espèce employée par les Chimanes a conduit à la synthèse de dérivés très actifs sur les leishmanioses (7). Il est intéressant de remarquer que 2 espèces seulement sur les 13 employées dans la médecine populaire du Chaparé ont montré une activité leishmanicide. En revanche, les 3 espèces utilisées par les Chimanes, ont montré une activité significative *in vivo*. Ces résultats démontrent tout l'intérêt de la démarche ethnopharmacologique lorsqu'elle porte sur des populations comme les Chimanes, bien intégrées dans leur écosystème et sur lequel elles ont des connaissances remarquables.

D. Conclusion : Les enjeux de la biodiversité

La situation actuelle peut être présentée schématiquement de la manière suivante :

- Le Nord est propriétaire des biotechnologies, les pays du Sud de la biodiversité, tout au moins se considèrent-ils comme tels.
- On assiste actuellement à une accélération de l'érosion de la diversité biologique.
- Les Biotechnologies offrent de nouvelles possibilités de domestication des êtres vivants.

Une des entraves à l'exploitation des produits issus de la biodiversité est la difficulté de l'approvisionnement en matière première. Soixante-huit heures de plongées furent nécessaires pour la récolte de 4 kg frais d'ascidie, sur des récifs à plusieurs heures de bateau de Nouméa. De plus, la complexité

TABLEAU 1
Plantes utilisées dans l'Orient bolivien pour le traitement des leishmanioses,
ayant montré une activité significative *in vitro* et/ou *in vivo*

Espèces	Famille	Région/ communautés (1)	Type de composés actifs isolés	Composés chimiques actifs	Références
<i>Peschiera van heurkii</i> L. Allorge	Apocynaceae	Chaparé/Gambas	alcaloïdes bisindoliques	conodurine demethyl- conodurine	Moretti et al 1991
<i>Pera benensis</i> Rusby	Euphorbiaceae	Béni/Chimanes	naphthoquinones	plumbagine biplumbagine	Fournet et al. 1992
<i>Bocconia frutescens</i> H. & B., et <i>B</i> spp.	Papaveraceae	Chaparé, Béni/ colons Gambas	alcaloïdes benzophénanthridiques	sanginarine chelerithrine	Moretti et al, en préparation
<i>Potomorphe peltata</i> L.	Piperaceae	Chaparé, Béni/ colons Gambas	?		
<i>Galipea longiflora</i> Kr.	Rutaceae	Béni/Chimanes	alcaloïdes quinoléiques	quinoléines 2- substituées	Fournet et al. 1992
<i>Dictyoloma peruviana</i> Planch.	Rutaceae	Chaparé/Gambas	alcaloïdes, groupe des quinolones	quinolones substituées	Moretti et al., en préparation
<i>Ampelocera edentulata</i> Kulm	Ulmaceae	Béni/Chimanes	quinones	tétralones	Fournet et al., en préparation

(1) Chapare et Béni: région des piémonts andins. Gambas: nom donné aux plus anciennes communautés de colons des basses régions tropicales de Bolivie. Chimanes: communauté amérindienne du Béni.

de la structure des toxines ne permet généralement pas d'envisager leur synthèse. Or des études récentes montrent que des micro-organismes symbiotiques semblent souvent impliqués dans la biosynthèse des molécules actives (6). Ainsi se dessine la possibilité de produire ces composés par culture des micro-organismes. C'est une des voies de recherche que nous explorons actuellement.

Les techniques biotechnologiques permettant d'agir toujours plus sur le vivant, l'important est donc maintenant de disposer des gènes. C'est la raison pour laquelle nous assistons depuis quelque temps à la mise en œuvre de programmes de « Gene prospecting » : — contrat entre la « Brazilian Foundation for Medicinal plants » et le National Cancer Institute en 1990. Moyennant le versement de 4 500 000 \$ à cette dernière institution, le NCI recevra des extraits végétaux récoltés et préparés par les équipes brésiliennes. — contrat entre Madagascar et le NCI, en 1990 — contrat entre l'Institut national costaricain de la biodiversité (INBIO), soutenu par l'USAID et la National Science Foundation aux USA, avec le laboratoire Mercks (1 million de \$). Ces contrats témoignent d'un changement des mentalités, et constituent un premier pas vers l'abandon de comportements qualifiés par les PED de « pillage ». Les équipes de l'ORSTOM, plus modestement, proposent d'associer les chercheurs des PED à des projets sur la valorisation de la biodiversité, donnant une large place à la formation des personnels de la recherche.

En conclusion, les recherches sur les produits issus de la diversité biologique peuvent permettre de nouvelles avancées dans le domaine thérapeutique, à condition qu'elles accordent une plus grande place aux recherches sur le terrain, et qu'elles se situent résolument à l'interface chimie-biologie.

Remerciements. — Nos remerciements vont à Monsieur le Professeur L. Eyckmans, Directeur de l'Institut de Médecine tropicale Prince Léopold, ainsi qu'à l'Académie Royale des Sciences d'Outre-Mer, pour leur invitation, en m'offrant ainsi la possibilité de présenter les recherches que mène actuellement l'ORSTOM sur la biodiversité tropicale et ses applications dans la recherche pharmaceutique.

REFERENCES

1. Ahond A, Laboute P, Laurent D, Potier P, Poupat C, Puset J, Puset M, Thoison O: Nouvelle substance biologiquement active, appelée girolline, extraite de l'éponge *Pseudaxinyssa cantharella*, son procédé de préparation et les compositions pharmaceutiques qui la contiennent. Brevet 18/VII/1985, Rhône-Poulenc-Santé, n° 85 10997 et CO7D233/88; A61K31/415 (Chem. Abstr. 1987, 107: 168795q) 1-9.
2. Avila JL, Rojas T, Monzon H, Convit J: Sinfungin as treatment for American *Leishmania* in sensitive BALB/c and resistant C57BL/6 mice. Am. J. Trop. Hyg., 1990; 43: 139-145.
3. Croft SL: In vitro screens in the experimental chemotherapy of leishmaniasis and trypanosomiasis. Parasitol. Today, 1986; 2: 64-69.
4. De Riccardis F, Iorizzi M, Minale L, Riccio R, Richer de Forges, B, Debitus C: The gymnochromes: novel marine brominated phenanthroperylene quinone pigments from the stalked Crinoid *Gymnocrinus richeri*. J. Org. Chem., 1991; 56: 6781-6787.
5. D'Ambrosio M, Guerriero A, Debitus O, Ribes O, Richer de Forges B, Pietra F: Corralistin A, a second example of a free porphyrin from a living organism. Isolation from the demosponge *Corralistes* sp. of the coral sea and inhibition of abnormal cells. Helvet. Chim. Acta, 1989; 1451-1454.
6. Fenical W, Jensen PR, Gustafson K, Pathirana C, Trischman, JA, Tapiolas D: Antitumor-antibiotics from marine microorganisms. In: Actes du 3^e Symposium sur les substances naturelles d'intérêt biologique de la région Pacifique-Asie (Nouméa, 26-30 août 1991), Paris, ORSTOM, 1992: 237-244.

7. Fournet A, Angelo-Barrios A, Munoz V, Hocquemiller R, Bruneton J, Richomme P, Gantier: Quinoleines 2 - substituées pour le traitement des leishmanioses. Brevet International. PCT, n° PCT/FR92/OO903, 1992.
8. Fournet A, Angelo-Barrios A, Munoz V, Hocquemiller R, Cave A: Effect of natural napthoquinones in balb/c mice infected with *Leishmania amazonensis* and *L. venezuelensis*. Trop. Med. Parasitol., 1992; 43: 219-222.
9. Lavelle F, Curaudeau A, Bayssas M, Ahond A, Poupat C, Puset J, Laurent D, Potier P: Girodazole: « from the lagoon of Noumea to cancer patients ». In: Actes du 3^e Symposium sur les substances naturelles d'intérêt biologique de la région Pacifique-Asie (Nouméa, 26-30 août 1991), Paris, ORSTOM, 1992: 221-225.
10. Le Pont F, Desjeux P, Torres Espero JM, Fournet A, Mouchet J: Leishmanioses et Phlébotomes en Bolivie. Paris, ORSTOM-INSERM, 1992: 116 p.
11. Malochet-Grivois C, Cotelle P, Biard JF, Henichart JP, Debitus C, Roussakis C, Verbist J: Dichlorolissoclinide C, a new cytotoxic labdane derivative from *Lissoclinum voeltzkowi* Michaelson (Urochordata). Tetrahedron Letters, 1991: 6701-6702.
12. Moretti C, Munoz V, Sauvain M, Caron C, Porzel A, Massiot G, Le Men-Olivier L: Activité antileishmanienne et antimicrobienne des alcaloïdes de *Peschiera van heurkii*. In: Actes du 3^e Symposium sur les substances naturelles d'intérêt biologique de la région Pacifique-Asie (Nouméa, 26-30 août 1991), Paris, ORSTOM, 1992: 183-185.