

## Faits divers

### Exemples de Biotechnologies Marines au Japon

Les biotechnologies marines englobent un ensemble de techniques et de disciplines scientifiques mettant en jeu des organismes marins. En toute simplicité, il s'agit plutôt d'appliquer au milieu marin des connaissances acquises dans le domaine des biosciences et des biotechnologies. Plus encore, si l'on considère ce milieu comme un vaste réservoir de matière vivante (ce qui est le cas), quiconque recherche de nouvelles molécules ou de nouveaux organismes est concerné. Pourtant, le potentiel d'innovation que présente les biotechnologies marines ne doit pas être surestimé. Compte tenu des coûts d'obtention du matériel vivant il doit être évalué au plus juste.

J'ai choisi de développer ici trois thèmes liés aux ressources marines dont les résultats offrent des perspectives à court ou moyen terme. Un accent particulier sera mis sur les travaux réalisés au Japon dont l'organisation fait preuve d'originalité et de cohésion.

Le premier thème, celui des substances biologiquement actives est peut-être le plus ancien. De nombreux travaux ont été réalisés et quelques programmes de grande envergure sont en cours en France, au Japon et aux U.S.A. Les perspectives qui se profilent autour de cet axe sont paradoxalement dirigées vers la chimie fine et la synthèse organique plutôt que vers la pharmacologie. La recherche de telles substances est essentiellement orientée vers la quête de métabolites secondaires. Ces molécules sont les véritables chefs d'orchestre de l'organisation de la vie dans un écosystème donné en rythmant et guidant les comportements des individus appartenant à une même espèce ou à une espèce différente. Le plus étonnant est que ces métabolites secondaires semblent répondre à des critères de spécificité voisins des hormones, des cytokines et même des molécules exogènes à visées thérapeutiques, c'est à dire en agissant par l'intermédiaire de systèmes récepteurs ligands.

Ensuite, le thème des micro-organismes sera abordé. En dehors de souches typiquement marines dont l'isolement et la caractérisation peut offrir des avantages significatifs par rapport aux souches déjà connues, les micro-organismes marins sont très étudiés car le rôle de leur métabolisme dans l'écosystème marin est encore sous estimé. En effet, contre toute attente, les métabolites secondaires issus des organismes supérieurs comme les éponges ou les autres invertébrés marins sont originaires des micro-organismes. La collecte de ces formes de vies à la base de la chaîne alimentaire intéresse plusieurs domaines. J'ai choisi de développer deux pour l'originalité et l'audace avec laquelle ils sont traités dans l'archipel japonais.

Le premier concerne l'étude et la collection de nouvelles souches bactériennes dites extrêmophiles. Il s'agit des bactéries vivant à grande profondeur (entre 2000 et 6000m) à des températures situées entre 80 et 110 °C. Ces bactéries possèdent donc un arsenal enzymatique thermostable capable de catalyser des réactions chimiques essentielles à hautes températures susceptibles d'intéresser l'industrie chimique.

Le second est d'étudier les micro-organismes capables de fixer le CO<sub>2</sub> gazeux. L'augmentation de ce gaz dans l'atmosphère est un problème écologique d'actualité. Au cours du cycle du carbone, une étape importante de dissolution du CO<sub>2</sub> atmosphérique dans l'océan permet à l'atmosphère de se décharger d'une partie de ce gaz. Les coccolithophores sont des micro algues photosynthétiques qui s'entourent d'une carapace calcaire CaCO<sub>3</sub> en utilisant le CO<sub>2</sub> dissous. La maîtrise d'organismes de ce type est un débouché certain pour des industries polluantes.

Le troisième thème étudié correspond au "biofouling". Ceci traduit la capacité de certains organismes à adhérer sur un support solide en milieu aquatique. C'est le cas de nombreux invertébrés qui se fixent sur la partie

immergée de la coque des bateaux et dont le résultat est une progression rapide vers le phénomène de corrosion ce qui impose la mise en cale sèche du bateau. Tous les systèmes de refroidissement par échange calorifique sont également concernés par ce problème. L'impact économique du "biofouling" se chiffre à 5 milliards \$US sur l'ensemble de la planète excepté la Chine et la C.I.S.

Sur le plan de la recherche, le "biofouling" est étudié de deux façons. D'abord l'étude de la biochimie de la fixation des organismes marins, puis la recherche d'inhibiteurs agissant à différents stades de la formation des substances adhésives.

Le domaine des biotechnologies marines au Japon est activement exploré et fait l'objet d'une coopération serrée entre l'industrie et l'université comme dans beaucoup d'autres domaines d'ailleurs. Le gouvernement japonais, par l'intermédiaire du Ministry of International Trade and Industry (M.I.T.I.), a effectué un investissement significatif de 1,5 Milliard de Y en 1990 avec la construction de deux centres de biotechnologies marines et de deux navires océanographiques. Vingt quatre sociétés japonaises participent à hauteur d'environ 30 Millions de Y chacune et par an à ces projets. Ces sociétés couvrent des secteurs très variés comme la peinture, la sidérurgie, l'agrochimie et la verrerie. Le secteur des biotechnologies marines au Japon est l'exemple type d'un investissement à moyen et long terme et générateur d'emplois.

Au cours d'un stage post doctoral de dix huit mois à l'université de Chiba, j'ai travaillé sur la synthèse chimique d'un alcaloïde antitumoral, extrait d'une éponge. A cette occasion et afin d'illustrer le thème de la recherche des substances biologiquement actives, j'utiliserai partiellement les résultats et perspectives obtenus au cours de ce travail.

### 1. Les métabolites secondaires pharmacologiquement actifs.

Historiquement, c'est la découverte du principe actif du poisson lune (la Tetro-dotoxine) dont la structure fut déterminée en 1964, qui marque le début de ce type de recherche au Japon. Les travaux modernes sur la quête de métabolites secondaires ont été initiés par des

chimistes tels que I. KITAGAWA de l'université d'Osaka et T. HIGA de l'université des Ryukyus. Aujourd'hui, la plupart des universités ont un programme de recherche de métabolites secondaires d'origine marine ou terrestre. Plusieurs équipes se partagent les organismes de l'archipel subtropical d'Okinawa. J. I. KOBAYASHI et H. NAKAMURA de l'université de Sapporo ainsi que N. FUSEYANI et K. TACHIBANA de l'université de Tokyo ont accumulé une série impressionnante de résultats tant sur le nombre de molécules extraites que sur la diversité des activités pharmacologiques.

Les métabolites secondaires sont des substances fabriquées ou ingérées par les organismes vivants marins ou terrestres. Conformément à leur définition, ils ne sont pas absolument indispensables aux fonctions vitales de l'organisme en question, contrairement aux acides nucléiques et aux molécules à caractère énergétique. Néanmoins, ils régulent de façon décisive les comportements sexuels, nutritionnels et guerriers des individus à l'intérieur d'un écosystème donné. La spécificité et la sélectivité du fonctionnement des métabolites secondaires rappelle celui des systèmes récepteurs ligands que l'on trouve à la base de toute communication cellulaire chez les organismes supérieurs. Cette apparente analogie justifie l'espoir de trouver dans le milieu marin mais aussi terrestre des composés à vocation thérapeutique.

L'archipel d'Okinawa au sud du Japon jouit d'un climat subtropical favorable à l'épanouissement d'une vie marine riche. Bien qu'il soit vain de faire ici une liste complète des composés doués de propriétés pharmacologiques et isolés dans cet archipel, quelques exemples significatifs de molécules isolées de cônes, d'éponges, de tuniciers ou de micro algues symbiotiques peuvent cependant être retenus.

En 1983, S. SATO isole deux peptides de vingt deux acides aminés comme composant principal du cône *Conus geographus* (1). Ces peptides bloquent sélectivement les canaux sodium musculaires alors qu'ils sont sans effet sur les canaux sodium nerveux. Geographotoxines I et II sont, depuis, un outil pharmacologique utile pour discriminer les différents sous types de canaux sodium.

Arg-Asp-Cys-Cys-Thr-Hyp-Hyp-Lys-Lys-Cys-Lys-  
Asp-Arg-Gln-Cys-Lys-Hys-Gln-Arg-Cys-Cys-Ala-NH<sub>2</sub>.  
*Geographutoxine I.*

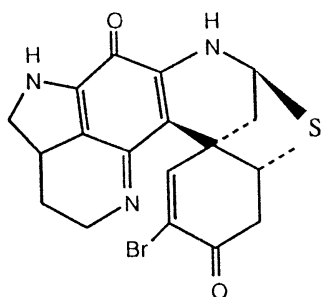
Depuis 1987 et 1988, J.I.KOBAYASHI a isolé de très nombreux alcaloïdes doués de propriété scytotoxiques à partir de tuniciers ou d'éponges. Cette activité est le plus souvent antitumorale *in vitro* sur des lignées cellulaires du type L1210 et cellules KB comme dans le cas des Prianosines et des Cystodytines (2,3). Plus récemment, il a isolé les Ircinals A et B, dont la ressemblance respective avec les Manzamines A et B indique une probable filiation métabolique (4). Pourtant, Ircinals et Manzamines ont été isolées d'espèces d'éponges différentes. Ces quatre alcaloïdes sont également antitumoraux *in vitro*.

Des molécules de type macrolides ont également été isolées à partir de microorganismes par J. I. KOBAYASHI en 1988. L'exemple des amphidinolides cytotoxiques sur cellules tumo-

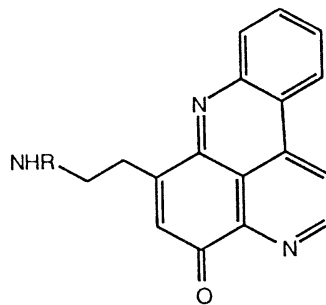
rales L1210 et KB, mais également activateurs de l'ATPase liée à l'actomyosine sur muscles blancs de lapin est parmi les plus intéressants.

I. KITAGAWA a également extrait des macrolides cytotoxiques, comme les Swinholides en 1990 à partir de micro algues.

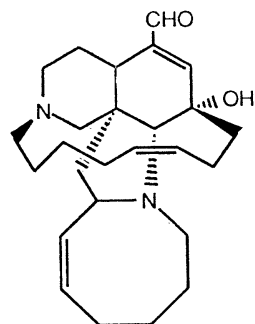
N. FUSEYANI travaille aussi sur des extraits d'éponges cytotoxiques et certains inhibiteurs enzymatiques. En 1989, il publie la structure originale de la déoxytédanolide qui présente une bonne activité antitumorale *in vitro* sur la leucémie murine P388. Des inhibiteurs de protéine phosphatase 2A, de Serine protéase et d'ATPase H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> dépendante ont également été décrits par son groupe (5). Aujourd'hui, ses efforts semblent se concentrer vers l'origine métabolique de ces composés et en particulier, le phé-



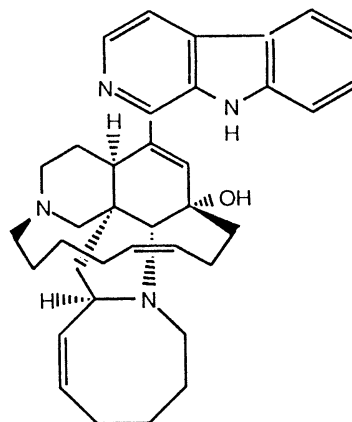
*Prianosine A.*



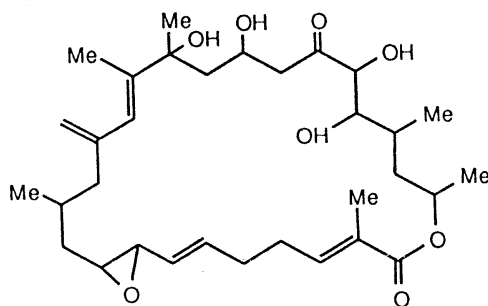
*Cystoditine A.*



*Ircinal A.*



*Manzamine A.*



*Amphidinolide B.*

nomène de symbiose entre les éponges et les micro algues.

L'un des objectifs de cet article est de cerner quelles sont les contraintes mais aussi les perspectives liées à l'étude des métabolites secondaires d'intérêts pharmacologiques. Voyons cela au travers d'un exemple concret, la Manzamine B sur laquelle j'ai travaillé au laboratoire du Pr HINO à l'Université de Chiba, nous allons examiner ces différents points.

Les Manzamines sont une famille d'alcaloïdes extraits d'éponges d'espèces différentes par des équipes également différentes entre 1986 et 1988. Leur structure chimique originale ainsi que leurs activités cytotoxiques (contre des cellules tumorales et contre le staphylocoque doré) ont rendu nécessaire la synthèse chimique de cette molécule. Cette démarche, en effet, est classique. Dès lors qu'un composé a été extrait, sa structure déterminée et ses activités pharmacologiques caractérisées, la synthèse chimique de celui-ci est indispensable pour au moins deux raisons :

1) Pour disposer d'une quantité suffisante de

la molécule pour des tests pharmacologiques et toxicologiques approfondis.

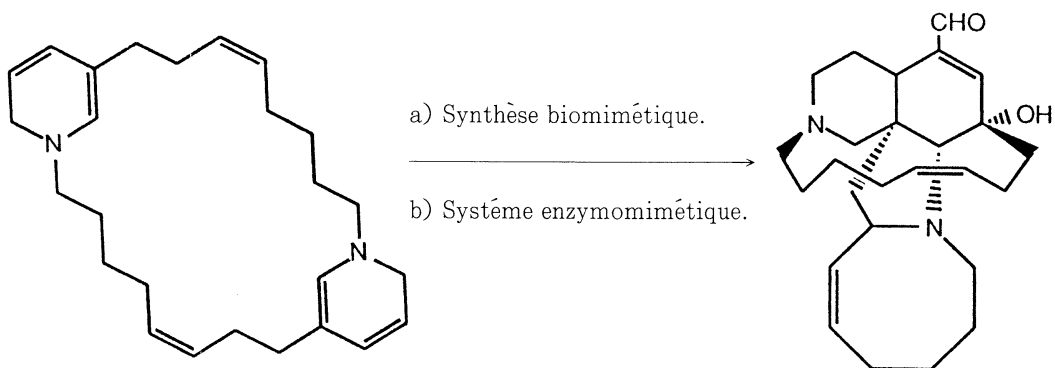
2) Pour être capable de fabriquer des analogues de cette molécule afin d'en améliorer l'activité ou d'en diminuer la toxicité.

Cependant, la synthèse totale des métabolites secondaires est souvent difficile pour la simple raison que ces molécules ont une structure chimique complexe.

Prenons l'exemple de la Manzamine A. Elle possède cinq centres asymétriques, et une structure pentacyclique reliée à une  $\beta$  carboline. Parmi les cinq cycles, l'un est à quatre cotés, un autre à huit cotés et un troisième à treize cotés, c'est à dire des cycles peu ordinaires dont la stabilité thermodynamique est moyenne et qu'il est par définition difficile de reconstruire.

Le raisonnement est donc le suivant; nous avons des composés potentiellement intéressants sur le plan pharmacologique dont la synthèse chimique est souvent très complexe donc très chère et très longue, et dont le développement nécessite quand même qu'on en dispose en quantité raisonnable. Pourtant, ces molécules ont été produites par la nature, elles sont donc biosynthétisables. Puisque nous aussi on essaie de les produire, intéressons nous à leur biosynthèse. D'ailleurs, la découverte des différentes étapes métaboliques et des enzymes responsables de celles-ci est un double facteur de progrès pour la synthèse organique, ce que l'on peut illustrer dans le cas de la Manzamine A :

1) Le chimiste s'inspire de la voie empruntée par la nature; c'est la synthèse biomimétique. Baldwin (6) a proposé pour la biosynthèse de la Manzamine un schéma réactionnel dont l'étape



*Étape clef de la biosynthèse des Manzamines (d'après Baldwin et Al) (6).*

clef est la suivante:

La synthèse biomimétique serait dans ce cas précis de faire une réaction chimique capable d'effectuer cette étape, comme par exemple une réaction de Diels Alder intramoléculaire.

2) Le chimiste utilise les outils de la nature; c'est le système enzymomimétique. C'est à dire, faire la réaction avec des enzymes connues et déjà isolés ou tenter d'isoler directement l'enzyme responsable de cette étape dans l'organisme en question.

Ainsi, la recherche de métabolites secondaires pharmacologiquement actifs est susceptible d'apporter des résultats dans:

1) La découverte de nouveaux produits d'intérêt pharmaceutiques.

2) La découverte de nouvelles voies de synthèse chimique par compréhension de la biosynthèse.

3) La découverte de nouvelles enzymes d'intérêt biotechnologique.

Cette approche de l'étude des métabolites secondaires est très répandue au Japon et fait l'objet d'un travail de fond en particulier pour les organismes marins de l'archipel d'Okinawa, mais également sur les forêts tropicales des pays en voie de développement de l'Asie du sud est (projet Jungle Bio).

Par ailleurs, l'étude de la biosynthèse des métabolites secondaires d'origine marine a permis d'en découvrir un aspect fondamental; la majorité des métabolites secondaires trouvés dans les éponges, les tuniciers, ou les autres invertébrés marins, ont pour origine des micro-organismes. Ainsi donc, soit par une association symbiotique, soit par une accumulation au niveau de la chaîne alimentaire, ces métabolites secondaires sont en fait produits par des bactéries ou des micro algues. Ceci renforce l'intérêt scientifique consacré au second thème de cet article.

## 2. La bactériologie.

L'intérêt pour les micro-organismes (donc pour les bactéries marines) se justifie déjà comme nous venons de le voir, par la recherche de nouvelles substances bioactives. Ceci constitue un premier motif de collecte systématique. Nous allons au cours de ce paragraphe examiner deux autres centres d'intérêts pour les bactéries

marines.

### a) *Les bactéries ultrathermophiles.*

Elles sont par définition capables de vivre et de se reproduire à des températures supérieures à 80°C. L'une des particularités du milieu marin est d'offrir des conditions physicochimiques variables d'une région à l'autre de la planète mais également en fonction de la profondeur. La conséquence est que les formes de vie qui le peuple sont également variables car elles doivent mettre en place pour survivre, des réponses appropriées à ces contraintes physicochimiques. La pression, (fonction de la hauteur de la colonne d'eau) est un paramètre fondamental du milieu marin. En effet, avec l'augmentation de la pression, c'est la profondeur qui grandit donc la température et la luminosité qui décroissent. Le long de cette colonne d'eau, un gradient s'établit et tout au long, des micro-organismes développent des systèmes enzymatiques capables de résister aux conditions en vigueur à cette profondeur. Des bactéries ultrathermophiles (archéobactéries) ont été découvertes près de sources hydrothermales situées entre 2000 et 6000m de profondeur. Celles ci sont capables de survivre à des températures situées entre 80 et 110°C, ce qui implique la présence d'un matériel enzymatique hors du commun, surtout en ce qui concerne la stabilité thermique. L'intérêt de collecter de tels organismes, est précisément de caractériser ces systèmes enzymatiques et de vérifier s'ils n'ont pas d'application industrielle possible dans la catalyse de diverses réactions à haute température.

Ce thème est relativement neuf car il n'a été initié que vers la fin des années 1970 par des équipes françaises et nord américaines (les seules possédant des submersibles de grande profondeur). Aujourd'hui, le Japon entre dans la compétition par l'intermédiaire du JAMSTEC grâce à la construction de deux submersibles de ce type (Shinkai I et II actuellement en service). Une partie des travaux est effectuée aux centres de biotechnologies marines de Shimizu et Kamaishi (M. B. I.) en association avec le navire océanographique Shogen maru. Le JAMSTEC est pour sa part l'initiateur du projet Deepstar dont les principaux thèmes abordés

sont:

-L'étude des techniques allant du prélèvement des micro-organismes marins jusqu' à leur mise en oeuvre dans les fermenteurs.

-L'étude des bactéries ultrathermophiles des grands fonds, en particulier celles capables de dégrader les hydrocarbures sous une forte pression.

En France, ces recherches sont confiées à un spécialiste de l'IFREMER, Mr G. BARBIER auteur de plusieurs articles sur ce sujet.

Ce sont, jusqu'à présent, plusieurs dizaines de souches qui ont été décrites et maintenues en culture. La possibilité d'en extraire les enzymes thermostables est activement étudiée. Les premiers essais de fermentation ont montré que des problèmes liés à ce type de souche (faible biomasse en phase exponentielle de croissance et problèmes de corrosion) sont des facteurs limitants. La publication du clonage et de l'expression d'une B galactosidase thermostable dans une souche bactérienne courante confirme l'aspect prometteur de cette approche alternative.

#### b) Les bactéries fixatrices du CO<sub>2</sub>.

Le problème de l'accroissement du CO<sub>2</sub> atmosphérique mondial et de ses possibles conséquences (tel que l'effet de serre) implique la mise en place de systèmes de traitement pour ce gaz.

A l'échelle géologique, les organismes marins calcifiants ont diminué le CO<sub>2</sub> atmosphérique en fabriquant des dépôts de CaCO<sub>3</sub>. Aujourd'hui, on sait que ce dépôt est un processus lié à la photosynthèse dont les principaux sites marins sont les barrières de corail. S. MIYACHI de l'institut des biotechnologies marines a étudié la fixation du CO<sub>2</sub> et la production de CaCO<sub>3</sub> par les récifs coralliens de l'île de Ishigaki (Ryukyus). La conclusion de son étude est que 1,4% de la production annuelle de CO<sub>2</sub> par le Japon peut être fixée par le corail de cettèle. A moyen terme, et en tenant compte des objectifs de diminution de la production du CO<sub>2</sub>, cette technique sera capable d'absorber entre 10 et 20 % de la production annuelle japonaise. Tous les efforts de recherche consistent maintenant à "exporter" cette technologie près des sources polluantes des sites industriels.

Un autre moyen de résoudre ce problème de pollution est également étudié. Il s'agit de l'étude de la production de CaCO<sub>3</sub> (à partir de CO<sub>2</sub>) par certaines algues vertes calcaires. Chez ces organismes, le calcaire est déposé sous forme de coccolithes. Les premières mesures effectuées ont montré que la culture en masse de ces micro algues unicellulaires peut également répondre de façon significative aux problèmes de pollution par le CO<sub>2</sub>. Ainsi, qu'il s'agisse de bactéries ou de micro algues, la collecte et l'étude de ces organismes est en mesure d'apporter une contribution raisonnable à ce problème de pollution.

### 3. Le "biofouling"

Nous avons définis en introduction ce phénomène comme la capacité d'adhésion de certains organismes sur un support solide en milieu aqueux. L'importance économique de ce phénomène n'a pas échappé aux investisseurs japonais. Les sociétés Kansai paint (peintures), Hazama-gumi, Kagima, Shimizu et Taisei (génie civil) ont investi dans les projets du M.B.I.

Le "biofouling" est un axe particulièrement étudié dans cet organisme, où l'on observe deux voies d'approche:

1) L'étude de la biochimie de la fixation des organismes marins. La connaissance de ce phénomène permettra de dégager des cibles enzymatiques (ou de type récepteur) qu'il faudra chercher à inhiber.

2) La recherche d'inhibiteurs d'enzymes responsables de la formation des substances adhésives (comme la polyphénol oxydase).

Des résultats très récents ont pu mettre en évidence le rôle de certaines familles de molécules. M. WATARU du centre de Shimizu a montré dans un journal japonais (7) que certains acides gras insaturés sont responsables de l'activité "antifouling" de la moule bleue *Mytilus edulis*. D'autre part il a également mis en évidence le rôle de certains dérivés indoliques possédant également une activité "antifouling".

Sur le plan du mécanisme, le "biofouling" débute toujours par la formation en trois étapes d'un film bactérien. D'abord, c'est la surface qui se recouvre d'un mince film organique composé de substances adhésives. Ensuite ce film se superpose de bactéries colonisantes primaires.

Enfin, ce sont des bactéries secondaires qui remplacent les premières souches, cela rend le terrain favorable à la fixation des particules et des micro-organismes.

De nouveaux, l'action des micro-organismes est à l'origine du phénomène de "biofouling". L'importance que prennent ces formes de vie primitive dans l'écosystème marin ne cesse de croître, ce qui étonne plus d'un spécialiste.

### Conclusion.

Dans cet article, nous avons vu que l'observation du milieu marin est en mesure d'apporter un élément de réponse non négligeable à des problèmes encore sans réponse satisfaisante. La quête de nouvelles molécules à vocation thérapeutique est, plus que par le passé, devenu une nécessité. La recherche de ce type de composés peut également et paradoxalement apporter des innovations dans le domaine de la synthèse organique par l'utilisation d'enzymes issues directement du métabolisme de ces molécules. C'est aujourd'hui l'axe prometteur de ce type de recherches.

Les trois exemples qui ont été traités ici, ont permis de dégager l'importance des microorganismes marins. La collecte, l'étude systématique du matériel enzymatique, de ces organismes et une bonne diffusion de l'information, est l'approche qui a été choisie au Japon. Outre les premiers résultats qui ont été publiés, le domaine des biotechnologies marines génère des emplois.

Nous avons en France des atouts de choix pour réussir dans ce domaine. Notre présence par l'intermédiaire des DOM-TOM dans pratiquement toutes les mers du monde en est un. Sur le plan technologique, nous occupons une place de premier plan en particulier pour la quête des grandes profondeurs. Des résultats prometteurs sont obtenus aussi bien dans la collecte de

bactéries marines que dans celui des substances naturelles en Nouvelle-Calédonie dont l'exceptionnelle qualité de la flore et de la faune est reconnue dans le monde entier et au Japon en particulier.

Des progrès immédiats sont peut être à notre portée si beaucoup d'entreprises dont le domaine d'activité, à priori éloigné des biotechnologies, engagent un effort de réflexion sur ce que ce type de recherche peut apporter, non seulement à court terme mais aussi en réfléchissant sur une période de dix ou vingt ans.

Les exemples de cet article sont en partie évocateurs des possibilités existantes, mais ils ne reflètent pas tous les aspects actuellement étudiés. Les domaines de la cosmétique et de l'agro-alimentaire sont également concernés.

### Bibliographie:

- 1) SATO, S. et Al, FEBS Lett., 1983, **155**, 277-280.
- 2) KOBAYASHI, J.I. et Al, Tetrahedron Lett., 1987, **28**, 4939-4942.
- 3) KOBAYASHI, J.I. et Al, J. Org. Chem., 1988, **53**, 1800-1804.
- 4) KOBAYASHI, J.I. et Al, J. Org. Chem., 1992, **57**, 2480-2483.
- 5) FUSEYANI, N., New J. Chem., 1990, **14**, 721.
- 6) BALDWIN, J.E. et WHITEHEAD, R.C., Tetrahedron Lett., 1992, 2059-2062.
- 7) WATARU, M., Nippon Suisan Gakkaishi, 1993, **59**(7), 1195-1199.

Cet article a été rédigé par Fabrice TAVET, boursier Lavoisier du gouvernement français au Japon, membre de l'association Bioscope Japon et de la S.F.J.O.

Fabrice TAVET  
12, Passage Abel  
Leblanc  
75012 Paris.  
Tel: 43.41.60.05.

S.F.J.O.  
c/o NISHIKAWA Akiko  
2, rue Caron, 75004 Paris.  
Tel: 48.87.93.16.