

Effets de trois Alcaloïdes Extraits du *Strychnos usambarensis* sur des Cellules Cancéreuses en Culture

Effects of three Alkaloids Isolated from *Strychnos usambarensis* on Cancer Cells in Culture

R. Bassleer*, M.-Cl. Depauw-Gillet*, Br. Massart*, J.-M. Marnette*, Ph. Wiliquet*, M. Caprasse**
et L. Angenot**

* Service d'Histologie et Cytologie, Faculté de Médecine, Université de Liège, Belgique

** Laboratoire de Pharmacognosie, Institut de Pharmacie, Université de Liège, Belgique

Received: December 12, 1981

Key Word Index:

Strychnos usambarensis; Loganiaceae; Melinonine F; Strychnofoline; 18,19-dihydro-usambarine; anticancer agents; cancer cells.

Abstract

The cellular effects of three alkaloids isolated from *Strychnos usambarensis* (melinonine F, strychnofoline, 18–19-dihydro-usambarine) are analysed by cytological methods in experimental animal tumours cultivated *in vitro* (B 16 mouse melanoma cells, mouse Ehrlich tumour cells ELT, HW 165 rat hepatoma). Under some experimental conditions, a certain degree of antimitotic activity is demonstrated.

Introduction

Depuis une dizaine d'années, les recherches phytochimiques consacrées au genre *Strychnos* L. nous ont permis d'isoler et de déterminer la structure de plus de 70 alcaloïdes dont la plupart constituent de nouvelles molécules à noyau indolique.

Ayant constaté des analogies de structure avec certains produits antimitotiques réputés, nous avons jugé intéressant d'entreprendre des recherches préliminaires dans ce domaine.

Nous avons choisi, en premier lieu, trois alcaloïdes du *Strychnos usambarensis*, principal ingrédient d'un poison de flèche africain [1], car il a été récemment établi que ce sont les plantes utilisées dans la préparation de ce type de poisons qui constituent la source principale de molécules naturelles douées de propriétés antitumorales [2]. De surcroît, une recherche

préliminaire d'activité inhibitrice de la tumeur P388 (leucémie lymphocytaire) *in vivo* chez la souris a été positive dans le cas d'un extrait chloroformique des feuilles de *Strychnos usambarensis*, récoltées en Afrique Orientale [3]. Par conséquent, il nous semblait très intéressant de tester les alcaloïdes purifiés et identifiés dont nous disposions.

Les essais ont été réalisés en traitant des cellules de tumeurs animales expérimentales cultivées *in vitro*. Les trois alcaloïdes testés ont été ajoutés aux milieux de culture, à différentes concentrations et pendant des durées variables. C'est à l'exposé des résultats ainsi obtenus qu'est consacré le présent article.

Matériels et Méthodes

Substances alcaloïdiques testées

La mélinonine F a été extraite de la sous-fraction F₇ d'alcaloïdes quaternaires des racines du *S. usambarensis*. Elle peut également être aisément obtenue par méthylation de l'harmane, substance préalablement identifiée parmi les alcaloïdes tertiaires de ce *Strychnos* [1, 4].

La strychnofoline et la 18,19-dihydro-usambarine ont été purifiées à partir des feuilles du *S. usambarensis* [5, 6]. Nous les avons transformées respectivement en acétate et en oxalate pour permettre une solubilisation aisée dans les cultures de cellules.

Souches cancéreuses en culture et paramètres cellulaires analysés

Chacune de ces substances est ajoutée au milieu de culture (milieux liquides) de cellules cancéreuses de différentes souches: mélanome B 16 de la souris, tumeur ascitique d'Ehrlich de la souris ELT ou hépatome du rat HW 165. Le mélanome B 16 provient de tumeurs primitives greffées à la souris C 57 Bl; on note la présence de cellules pigmentées plus ou moins fréquentes et participant, comme les cellules peu ou non pigmentées de la même souche, à la multiplication. La tumeur ascitique d'Ehrlich, souche ELT, hypertétraploïde est inoculée dans la cavité péritonéale de souris C 57 Bl. L'hépatome de la souche HW 165 est inoculé au rat Wistar par voie sous-cutanée. Les cellules sont directement prélevées à l'animal porteur (tumeurs primitives et non métastases) et mises

en culture. Elles se multiplient activement *in vitro*, s'étalent sur le substrat et se disposent en une à deux couches de cellules d'épaisseur. Elles sont cultivées dans des flacons de type Falcon. Le milieu de culture se compose de: sérum de veau foetal 10 % et, soit liquide de Hanks 45 % et milieu NCTC 109 Difco 45 % pour la souche ELT, soit milieu MEM Gibco 90 % pour le mélanome B 16 ou l'hépatome; pénicilline 100 U/ml.

Après le traitement, (différentes durées et diverses concentrations du produit), les cellules fixées et colorées (hématoxyline de Harris ou réaction de Feulgen) font l'objet d'analyses cytologiques en microscopie optique. Les index mitotiques sont établis (nombre de cellules en mitose pour 1.000 cellules; dans chaque cas, deux à trois lamelles de culture et 3 à 5.000 cellules par lamelle sont examinées). De plus, les pourcentages des différentes phases de la mitose sont calculés, en vue de rechercher d'éventuelles modifications du déroulement de la mitose. Les index mitotiques moyens ont été comparés à l'aide du test t de Student.

Résultats

A. Effets de la mélinonine F

a) Sur le mélanome B 16

Après 24 heures de traitement (1 ou 10 µg/ml), les index mitotiques sont peu modifiés:

Témoins: 5,4 ‰

Traité 1 µg/ml: 8,2 ‰ (P = 99,3 ‰)

Traité 10 µg/ml: 8,6 ‰ (P = 97 ‰)

L'apparente augmentation d'index (quoique minime) paraît être due à une légère augmentation de la durée de la métaphase, dont les pourcentages sont un peu plus élevés que chez les témoins (50 % et 62 % contre 45 % chez les témoins). On ne note ni pycnose, ni figures mitotiques anormales.

Après 92 heures de traitement, les index sont les suivants:

Témoins: 14 ‰

Traité 1 µg/ml: 18 ‰ (non significatif, P = 80 ‰)

Traité 10 µg/ml: 16 ‰ (non significatif, P = 78 ‰)

Les pourcentages des phases de la mitose ne sont pas modifiés. On ne note donc pratiquement aucun effet antimittotique. Toutefois, après la même durée de traitement (92 heures), dans une autre souche de mélanome B 16 à croissance moins active, on note, pour une plus forte concentration du produit:

Témoins: 7,5 ‰

Traité 50 µg/ml: 5,2 ‰ (non significatif, P = 52 ‰) avec 90 % de métaphases contre 27 % chez les témoins. Cet allongement de la durée de la métaphase accroît artificiellement l'index relevé chez les traités. Chez ces derniers, on note donc un certain effet antimittotique de la substance mais à concentration relativement élevée (50 µg/ml). Cependant, on n'observe pas de dégénérescence cellulaire, ni de figures mitotiques anormales.

b) Sur la tumeur ascitique d'Ehrlich ELT

Après 21 heures de traitement, on note:

Témoins: 10,1 ‰

Traités 50 µg/ml: 0 ‰ (P = 99,5 ‰)

Il y a nettement moins de cellules dans les cultures traitées. L'effet antimittotique est donc plus net que dans la tumeur B 16, à la même concentration (50 µg/ml). Cette plus grande sensibilité de cette souche d'Ehrlich par rapport au mélanome B 16 est d'observation générale, notamment pour d'autres agents cytotoxiques que nous avons testés antérieurement.

EN CONCLUSION, la mélinonine F est peu active, dans ces conditions expérimentales. A concentration relativement élevée, elle exerce toutefois un certain effet antimittotique (50 µg/ml).

B. Effets de la strychnofoline

a) Sur le mélanome B 16

Après 72 heures de traitement, les index mitotiques sont les suivants:

Témoins: 12,6 ‰

Traité 1 µg/ml: 13,8 ‰ (non significatif, P = 65 ‰)

Traité 10 µg/ml: 9,3 ‰ (P = 90 ‰)

Traité 50 µg/ml: 1,8 ‰ (P = 99,9 ‰)

On ne note pas de modifications des pourcentages des phases de la mitose mais, pour 50 µg/ml, il y a plus de cellules pycnotiques (150 ‰) que chez les témoins (100 ‰).

Un très léger effet antimittotique apparaît donc à partir d'une concentration de 10 µg/ml. Il devient très net, à 50 µg/ml, concentration relativement élevée.

b) Sur la tumeur ascitique d'Ehrlich

Après 26 heures de traitement, les index sont les suivants:

Témoins: 10,1 ‰

Traité 1 µg/ml: 6,4 ‰ (non significatif, P = 83 ‰)

Traité 10 µg/ml: 5,0 ‰ (P = 95 ‰)

Traité 50 µg/ml: 2,6 ‰ (P = 98 ‰)

On note donc un effet antimittotique dont l'intensité est fonction de la concentration. On note de nouveau une sensibilité un peu plus grande de la souche d'Ehrlich par rapport au mélanome.

c) Sur l'hépatome HW 165

Après 26 heures de traitement:

Témoins: 23 ‰

Traité 50 µg/ml: 0 ‰ (P = 95 ‰); les cellules sont beaucoup moins nombreuses et on note une forte nécrose.

EN CONCLUSION, la strychnofoline est capable d'exercer un effet antimittotique. Celui-ci est net à concentration assez élevée (50 µg/ml) mais il est déjà légèrement apparent à concentration plus faible (10 µg/ml). De la nécrose cellulaire est observée pour la concentration de 50 µg/ml.

C. Effets de la 18,19 dihydro-usambarine

a) Sur le mélanome B 16

Après 72 heures de traitement, on note les index mitotiques suivants:

Témoins: 12,8 %
 Traité 1 µg/ml: 13,0 % (non significatif, P = 4 %)
 Traité 10 µg/ml: 10,2 % (non significatif, P = 62 %)
 Traité 50 µg/ml: 4,8 % (P = 96 %)
 Les pourcentages des phases de la mitose restent quasi normaux. Il n'y a pas de nécrose cellulaire accrue.
 Inexistant à la concentration de 10 µg/ml, un certain effet antimittotique apparaît par contre à 50 µg/ml.

b) Sur la tumeur d'Ehrlich

Après 25 heures de traitement, les index sont les suivants:

Témoins: 10,1 %
 Traité 1 µg/ml: 3,8 % (P = 97 %)
 Traité 10 µg/ml: 4,5 % (P = 96 %)
 Traité 50 µg/ml: 0 % (la densité de la population a fortement diminué; P = 99,5 %)

On note un certain effet antimittotique déjà à 1 µg/ml, mais il devient beaucoup plus net à 50 µg/ml. De nouveau, on remarque une plus grande sensibilité de la souche ELT par rapport au mélanome B 16.

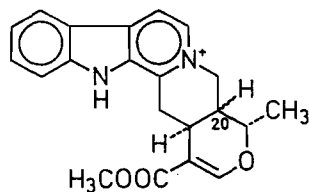
EN CONCLUSION, la 18,19-dihydro-usambarine se révèle douée de certaines propriétés antimittotiques, déjà à 1 et 10 µg/ml mais très nettes à 50 µg/ml, concentration toutefois assez élevée.

Discussion

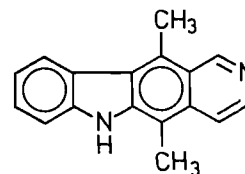
Ces résultats préliminaires démontrent l'intérêt que présente la poursuite des recherches sur les alcaloïdes indoliques des *Strychnos* dont la parenté chimiotaxinomique avec les représentants des *Apocynaceae* (*Rauwolfia*, *Catharanthus*, *Vinca*, *Ochrosia* . . .) et des *Rubiaceae* (*Cinchona*, *Ipeca*, *Yohimbe* . . .) ne doit pas être perdue de vue.

La mélinonine F évoque l'ellipticine dont les essais cliniques continuent [7] et surtout le noyau de base anhydronium de l'alstonine et de la serpentine, substances qui inhiberaient spécifiquement les cellules cancéreuses [8].

La dihydro-usambarine est un alcaloïde dimère asymétrique présentant des analogies avec l'émétine. En effet, tous deux résultent de la condensation d'une unité monoterpénique et de deux unités aminées: la tryptamine pour la dihydro-usambarine et la tyramine pour l'émétine. Il convient de rappeler que l'émétine a été soumise à des tests cliniques où elle se

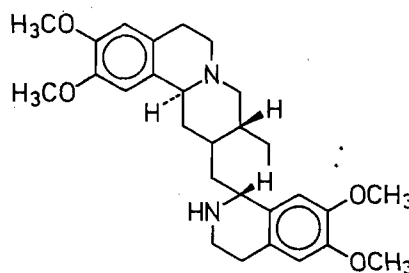


ALSTONINE α H 20
 SERPENTINE β H 20

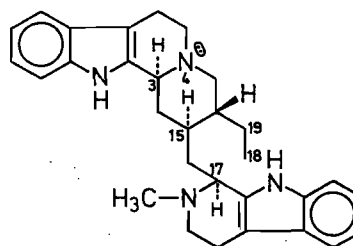


ELLIPTICINE

révélaient active, mais la toxicité et les effets secondaires indésirables de cette substance ont entraîné l'arrêt des expériences, dans l'attente d'analogues doués d'un meilleur index thérapeutique [2, 7].

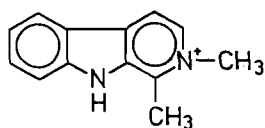


EMETINE

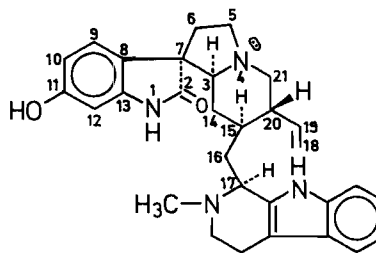


18,19-DIHYDRO USAMBARINE

La strychnofoline est une molécule bâtie selon le schéma biogénétique de la dihydro-usambarine mais à un état d'oxydation plus poussé. Il en résulte que la molécule est devenue plus polaire par la présence d'une fonction phénolique et d'un noyau oxindolique. Il est à noter que l'oxindole est à classer parmi les amides que l'on rencontre assez souvent dans les structures d'agents antimittotiques [7].



MELINONINE F



STRYCHNOFOLINE

Conclusions Générales

Ces trois alcaloïdes de *Strychnos* présentent certaines propriétés antimitotiques dans des souches cancéreuses en culture. Ces effets ne s'exercent en général qu'à concentration relativement élevée (10 µg/ml et surtout 50 µg/ml). Les résultats, tout en indiquant l'existence de certaines différences liées à la sensibilité propre à chacune des souches étudiées, sont concordants. Lorsqu'un effet antimitotique est noté, celui-ci est fonction de la concentration de la substance dans le milieu de culture.

Si l'on veut essayer de classer les trois produits par ordre croissant d'activité relative, on obtient l'ordre suivant: mélinonine F puis 18,19-dihydro-usambarine et strychnofoline, les deux derniers ayant à peu près la même activité antimitotique, du moins dans nos conditions expérimentales.

Remerciements

Les observations effectuées dans les cellules cancéreuses ont été réalisées grâce à l'aide financière du Centre Anticancéreux près l'Université de Liège et du Fonds de la Recherche Scientifique Médicale de Belgique.

Mlle Maryse CAPRASSE remercie le Fonds National de la Recherche Scientifique de Belgique qui lui a accordé un mandat d'aspirant.

L'aide technique de Mme D. JACO-SCABERS a été vivement appréciée ainsi que celle de Mme B. CORNET.

Références

- (1) Angenot, L., M. Dubois, C. Ginion, W. van Dorsser et A. Dresse: *Arch. Intern. Pharmacodyn. Ther.* 215, 246 (1975).
- (2) Farnsworth, N. R. et C. J. Kaas: *J. Ethnopharmacology*, 3, 85 (1981).
- (3) Rolfsen, W.: *Phytochemistry and Pharmacology of some African Strychnos species: Abstracts of Uppsala Dissert., Fac. Pharm.* 55, (1980).
- (4) Caprasse, M. et L. Angenot: Résultats non publiés.
- (5) Angenot, L.: *Pl. Méd. Phyt. XII*, 123 (1978).
- (6) Angenot, L., C. Coune et M. Tits: *J. Pharm. Belg.*, 33, 11 (1978).
- (7) Suffness, M. et J. Douros: *Cancer Drug Development, Part A*, chap III, p. 79, London, 1979, Academic Press.
- (8) Beljanski, M. et J. Bugiel: *Demande de Brevet français - n° 78-07155*, (1979).

*Adresses: Prof. Dr. R. Bassleer,
Dir. du Service d'Histologie et Cytologie,
Université de Liège,
Rue de Pitteurs, 20,
B-4020 Liège (Belgique)*

*Prof. Dr. L. Angenot,
Dir. du Service de Pharmacognosie,
Université de Liège,
Rue Fusch, 5,
B-4000 Liège (Belgique)*