

Etude complémentaire de la cytotoxicité de la mélinonine F, alcaloïde dérivé de la β -carboline

Complementary Study of Cytotoxic Activity of Melinonine F

R. Bassleer*, J.-M. Marnette*, Ph. Wiliquet*, M.-Cl. De Pauw-Gillet*, 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: January 16, 1983; accepted: March 15, 1983

Key Word Index

Strychnos species; Loganiaceae; Indole alkaloids; Melinonine F; Cytotoxic agents; Cancer cells; DNA; Intercalation.

Abstract

The cellular effects of melinonine F, an alkaloid isolated from *Strychnos melinoniana* (South America) and *Strychnos usambarensis* (Central Africa), are analysed in cancer or normal cells in culture. A cytotoxic action is noted in both types of cells, at least for relatively high concentrations. These effects are probably due to interaction of the drug with chromatin. Physico-chemical analysis demonstrates partial intercalation of melinonine F on pure DNA *in vitro*.

Introduction

Lors d'essais réalisés sur des souches cancéreuses en culture, nous avons préalablement constaté que la mélinonine F, alcaloïde extrait du *Strychnos melinoniana* [1] et plus récemment du *S. usambarensis* [2] présente certaines propriétés antimitotiques. Cependant, ces effets ne s'exercent qu'à concentration relativement élevée (50 $\mu\text{g/ml}$) [3].

Etant donné la parenté structurale de cet alcaloïde avec d'autres bases anhydronium naturelles, alstonine, serpentine et sempervirine pour lesquelles une activité antitumorale spécifique a été récemment mise en évidence [4], les recherches ont été poursuivies dans deux directions. Concomitamment aux essais complémentaires sur culture de cellules relatés dans

ce travail, il est apparu intéressant d'envisager l'étude de l'interaction de la mélinonine F avec le DNA, cible habituelle des dérivés antitumoraux dans la cellule, tels que les anthracyclines et l'actinomycine D. Le caractère hétérocyclique cationique et plan de cette molécule suggère un mode de fixation réversible en éliminant la fixation covalente.

Nous décrivons ici l'activité au niveau cellulaire de la mélinonine F et succinctement les résultats de l'étude physico-chimique de son interaction avec le DNA, cette étude étant détaillée ailleurs [5].

Matériels et Méthodes

Echantillon

La mélinonine F est obtenue selon les procédés décrits précédemment [3]. L'extraction à partir des racines du *S. usambarensis* est détaillée ailleurs [6].

Souches cellulaires en culture et paramètres cellulaires étudiés

La mélinonine F est ajoutée au milieu de culture liquide de cellules provenant de différentes souches: mélanome B16 de la souris [3]; fibroblastes pulmonaires embryonnaires humains WI38; synoviocytes adultes (fibroblastes) humains normaux S33. Ces cellules, cancéreuses ou non-cancéreuses, sont cultivées dans des flacons de type Falcon, où elles se multiplient activement. Le milieu nutritif se compose de: sérum de veau foetal 10 % et milieu MEM Gibco 90 %; pénicilline 100 U/ml.

Après le traitement par la mélinonine F, les cellules, fixées puis colorées par la réaction de Feulgen (spécifique du DNA), sont analysées du point de vue cytologique en microscopie optique. Les index mitotiques sont établis: nombres moyens de cellules en mitose pour 1000 cellules; dans chaque cas, deux à trois lamelles portant les cellules cultivées et 3 à 5000 cellules par lamelle sont examinées. Les pourcentages des différentes phases de la mitose sont calculés; rappelons que cette méthode est de nature à mettre en évidence d'éventuelles modifications du déroulement de la mitose.

La mélinonine F étant fluorescente (λ excitation: 383 nm; λ émission: 442 nm), des examens en microscopie à fluorescence (cytofluoromètre Leitz MPV équipé du système Ploem Opak) ont

été réalisées dans des cellules (S33, B16) mises en contact pendant 10 min. à 24 h, avec une solution de l'alcaloïde (100 µg/ml).

Techniques physico-chimiques de l'étude du mécanisme d'interaction avec le DNA

L'étude du processus d'interaction de la mélinonine F avec le DNA (DNA pur de thymus de veau) permettant de distinguer entre un mécanisme d'intercalation et un mode de fixation externe a été entreprise à l'aide des méthodes physico-chimiques préalablement mises au point dans ce but, à savoir: spectrophotométrie d'absorption, dichroïsmes linéaire et circulaire, polarisation de fluorescence, augmentation de la viscosité du DNA linéaire ultrasonné et déroulement du DNA circulaire PM2.

Ces techniques ont été décrites ailleurs [5].

Résultats

Effets cellulaires de la mélinonine F

Ayant constaté antérieurement [3] que cette substance exerce un faible effet antimitotique dans diverses cellules cancéreuses en culture (à la concentration finale de 50 µg/ml), nous avons poursuivi cette étude en traitant des cellules du mélanome B16 par de la mélinonine F à plus haute concentration (100 ou 200 µg/ml). Après 24 h de traitement (100 µg/ml), l'activité mitotique est quasi nulle (0,1 ‰ contre 17 ‰ chez les témoins); pour 200 µg/ml (24 h), les cellules en mitose ont disparu et la densité de la population a nettement diminué (pynose nucléaire et nécrose cellulaire). Après 48 h (200 µg/ml), les cellules sont devenues rares et l'index mitotique est de 0 ‰ contre 13 ‰ chez les témoins correspondants.

Ces observations complémentaires confirment donc que la mélinonine F peut exercer des effets cytotoxiques, néanmoins à concentration relativement élevée, dans ces conditions expérimentales (arrêt des mitoses et nécrose cellulaire). Par rapport à nos résultats antérieurs [3], on notera que l'effet cellulaire s'accroît nettement en fonction de la concentration du produit.

Ce résultat étant acquis, nous avons essayé de savoir si la mélinonine F est toxique aussi pour des cellules non cancéreuses en culture. En d'autres termes, cette action cellulaire est-elle spécifique de cellules cancéreuses?

Des fibroblastes humains normaux (WI38) sont cultivés jusqu'à confluence et traités par la mélinonine F (100 µg/ml). Les cellules cultivées étant confluentes, on n'observe pas de divisions en cours, ni chez les témoins, ni chez les traités. Toutefois, chez ces derniers, un phénomène curieux apparaît dès la 24e heure de traitement: dans près de 100 % des cellules, le noyau contient de nombreux et gros blocs de chromatine, surtout contre l'enveloppe nucléaire. Cet effet s'intensifie avec le temps; vers 72 h de traitement, la pynose nucléaire est évidente et quasi générale. Chez les témoins correspondants, par contre, la chromatine (bien mise en évidence grâce à la réaction de Feulgen) est d'aspect tout à fait normal (grains fins, avec quelques chromocentres habituels).

La même expérience a été répétée mais en utilisant une autre souche normale: des fibroblastes synoviaux humains S33 (100 µg/ml). Chez les témoins (cellules confluentes), l'activité mitotique est très faible: 2 à 1 ‰ entre 24 et 72 h de culture, durée de l'expérience. Les cellules, parfaitement étalées, sont tout à fait normales au point de vue cytologique. Chez les traités, par contre, après 24 h, les cellules sont déjà moins nombreuses, parfois à noyau pynotique ou, le plus souvent, à noyau rempli de gros blocs de chromatine dense. Après 48 h, toutes les cellules se rétractent et ont un noyau en pynose. Après 72 h, les cellules sont nécrosées et disparaissent. Aucune cellule en division n'a été observée chez les traités.

Les observations cytologiques réalisées au microscope à fluorescence ont montré que la mélinonine F pénètre rapidement dans les cellules synoviales humaines S33 et dans les cellules cancéreuses (mélanome B 16). Après 10 à 30 min., le cytoplasme des cellules traitées par la solution de mélinonine F devient fluorescent. Le noyau reste négatif, vraisemblablement parce que l'on constate une extinction de la fluorescence lorsque le produit se fixe au DNA (observation réalisée sur du DNA pur isolé).

Ces observations cytologiques suggérant fortement l'existence d'interactions entre la mélinonine F et la chromatine, une analyse physico-chimique de DNA pur mis en présence de ce produit était amplement justifiée.

Mécanisme d'interaction de la mélinonine F avec le DNA

Lors de la fixation, les propriétés spectroscopiques des complexes mélinonine F-DNA sont identiques à celles observées avec les composés hétérocycliques plans s'intercalant entre les paires de bases du DNA (dérivés amino-acridines et éthidium).

Cependant, les deux autres critères habituels d'intercalation (allongement du DNA linéaire et déroulement du DNA circulaire) ne sont pas respectés.

Les résultats des différents essais sont repris dans le tableau I.

Le comportement de la mélinonine F ne nous permet pas de conclure à un mécanisme d'intercalation strictement semblable à celui des dérivés intercalaires typiques.

Nous supposons que la mélinonine F se fixe parallèlement aux paires de bases du DNA, par intercalation partielle, dans la gorge de la double hélice, la petite taille de la molécule empêchant vraisemblablement une pénétration plus importante [5].

Discussion et conclusions

Venant confirmer nos observations antérieures [3], ces résultats indiquent bien que la mélinonine F

Tableau I

Etude physico-chimique du mode de fixation de la mélinonine F au DNA [5]

-
1. Propriétés spectroscopiques du complexe MEL F – DNA
 - a. Titration spectrophotométrique des alcaloïdes par le DNA
Effet bathochrome et hypochrome: MEL F seule $\epsilon = 15000$ (λ_{\max} 304 nm); $\epsilon = 3900$ (λ_{\max} 369 nm)
MEL F totalement fixée au DNA ($P/D \geq 10$) $\epsilon = 6400$ (λ_{\max} 310 nm); $\epsilon = 2200$ (λ_{\max} 380 nm)
Processus de fixation forte caractérisé par une constante de fixation K supérieure à $10^6 M^{-1}$ et par un nombre limite de sites de fixation $n \approx 0.11$.
 - b. Activité optique induite
 $P/D \geq 10$: dichroïsme circulaire induit négatif dû à l'asymétrie des sites de fixation
 $\Delta A = -(0.5-1) 10^{-5}$ (λ_{\max} 314 nm) $\Delta A = -(1.5-2) 10^{-5}$ (λ_{\max} 380-380 nm)
 $0.5 \leq P/D < 10$: dichroïsme circulaire induit positif vraisemblablement dû à une interaction excitonique
 $\Delta A_{\max} = + (19-19.5) 10^{-5}$ ($P/D = 4$) ($\lambda = 314$ nm)
 $\Delta A = 0$ ($\lambda = 380-390$ nm)
 - c. Dichroïsme électrique
 $P/D \geq 10$ $\Delta A/A \approx (0.45-0.5)$; valeur très négative proche de celle observée pour le DNA seul ($\Delta A/A = -(0.5-0.55)$) à 12.5 KV/cm. Orientation de l'alcaloïde parallèle aux paires de bases du DNA
-
2. Propriétés hydrodynamiques du DNA lors de la fixation de la MEL F
 - a. Mesure de l'allongement de l'hélice du DNA ultrasonné (accroissement de viscosité)
Faible augmentation de viscosité: pour $r = 0.1$ $[n] [n_0] \approx 1.2$ (MEL F)
 ≈ 1.5 (Proflavine)
 - b. Mesure du déroulement de l'hélice de DNA circulaire PM2 (méthodes électrophorétique et viscosimétrique)
Pas de déroulement du DNA circulaire même pour des valeurs élevées de r
-

P/D représente le rapport de la concentration molaire des mononucléotides de DNA à celle de la MEL F ($5 \cdot 10^{-5}$ M) en milieu non tamponné (NaCl 1 mM) et r désigne le nombre de molécules de ligand fixé par mononucléotide.

est capable d'exercer des effets antimitotiques et cytotoxiques dans des cellules cancéreuses en culture. De tels effets ne sont toutefois évidents que pour des concentrations relativement élevées. Il y a nettement une relation entre effets cellulaires et concentration finale du produit.

Ces effets cytotoxiques ne sont pas spécifiques de cellules cancéreuses. En effet, des fibroblastes humains normaux en culture dégénèrent en présence de la mélinonine F à haute concentration. Manifestement, c'est au niveau de la chromatine nucléaire qu'apparaissent les premières lésions cellulaires; elles précèdent la mort de la cellule.

Les résultats d'une analyse physico-chimique de DNA pur mis en présence de mélinonine F indiquent que celle-ci s'y fixe par intercalation partielle. Une telle action sur le DNA pourrait expliquer les effets cellulaires néfastes que nous avons observés. On notera cependant que l'étude physico-chimique a été réalisée sur du DNA pur „normal“ (c'est-à-dire non cancéreux), puisqu'il provient de thymus de veau. Ce fait cadre bien aussi avec les effets cellulaires constatés ici sur des souches non cancéreuses.

Ces observations sont apparemment en contradiction avec celles d'autres auteurs selon lesquels des alcaloïdes dérivés de la β -carboline (alstonine, serpentine et sempervirine) inhiberaient spécifiquement les cellules tumorales cultivées in vitro ainsi que le déve-

loppement de différents types de cancers chez la souris [4].

Ces mêmes auteurs ont également observé un effet inhibiteur spécifique de la synthèse de DNA cancéreux, par les alcaloïdes précités ainsi que par la flavopéridine. D'après leurs travaux, cet effet inhibiteur serait dû à la capacité qu'auraient ces alcaloïdes de former un complexe avec le DNA cancéreux [7].

Nos recherches indiquant l'existence d'un effet cellulaire exercé par la mélinonine F, même si celui-ci ne s'observe qu'à concentration élevée, montrent l'intérêt de développer les recherches vers d'autres dérivés de la β -carboline, éventuellement plus actifs et plus spécifiques du DNA cancéreux. Dans ce sens, des analyses en cours concernent la dihydroflavopéridine, un analogue de la mélinonine F possédant un cycle supplémentaire.

Remerciements

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

Les études cytologiques ont été réalisées grâce à l'aide du Centre Anticancéreux près l'Université de Liège et du Fonds de la Recherche Scientifique Médicale de Belgique.

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

Références

- (1) Bächli, E., C. Vamvacas, H. Schmid, P. Karrer: *Helv. Chim. Acta* 40, 1167 (1957).
 (2) Caprasse, M., L. Angenot: *Planta Med.* 45, 149 (1982).
 (3) Bassleer, R., M.-Cl. De Pauw-Gillet, Br. Massart, J.-M. Marnette, Ph. Wiliquet, M. Caprasse, L. Angenot: *Planta Med* 45, 123-126 (1982).
 (4) Beljanski, M., J. Bugiel: *Demande de brevet français n° 78-07155* (1979).
 (5) Caprasse, M., Cl. Houssier: *Biochimie* 65, 157 (1983).
 (6) Caprasse, M., C. Coune, L. Angenot: *J. Pharm. Belg.* 38, 135 (1983).
 (7) Beljanski, M., M. S. Beljanski: *Expl. Cell. Biol.* 50, 79 (1982).

*Adresses des auteurs: 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-4020 Liège (Belgique)*

An increasing problem of critical importance!

Drug Resistance in Bacteria

Genetics, Biochemistry, and Molecular Biology

Edited By

Susumu Mitsuhashi

Laboratory of Drug Resistance
at the Department of
Microbiology,
School of Medicine, Gunma
University in Maebashi, Japan

1982. 441 pages, 103 figures,
74 tables,
cloth DM 148,-; approx. \$ 62.00

Prices subject to change

- Genetics and Molecular Biology of Plasmids
 - Mechanisms of Drug Resistance
 - New Drugs Against Resistant Bacteria
- Microorganisms which have grown resistant to drugs are a worldwide health menace. Their spread cannot be checked without appreciating their mode of action. Since drug resistance is transmitted among bacteria by conjugative resistance plasmids, this book deals with the basics for their control. It also shows how such plasmids can be utilized as helpful vehicles in gene engineering.



Thieme

Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York
Thieme-Stratton Inc., New York