

**Effets de la dihydroflavopéirine et de la sempervirine
(alcaloïdes dérivés de la β -carboline)
sur des cellules cancéreuses en culture**

**R. BASSLEER *, D. CLERMONT *, J.M. MARNETTE *, M. CAPRASSE **,
M. TITS ** et L. ANGENOT ****

(*) *Service d'Histologie et Cytologie, Faculté de Médecine,
20, rue de Pitteurs, B 4020 Liège.*

(**) *Service de Pharmacognosie, Institut de Pharmacie,
5, rue Fusch, B 4000 Liège.*

Effects of dihydroflavopereirine and sempervirine (β -carbolinium alkaloids) on cancer cells in culture,

R. BASSLEER, D. CLERMONT, J.M. MARNETTE, M. CAPRASSE, M. TITS and L. ANGENOT. *Ann. Pharm. Fr.*, 1985, 43, 83-88.

SUMMARY. — The cellular effects of dihydroflavopereirine and sempervirine (two alkaloids isolated from Loganiaceae) are analysed by cytological methods in experimental tumours cultivated in vitro (B₁₆ mouse melanoma cells, mouse Ehrlich tumour cells ELT). Under some experimental conditions, a certain degree of antimitotic activity is demonstrated and related to the molecular structure.

Effets de la dihydroflavopéirine et de la sempervirine (alcaloïdes dérivés de la β -carboline) sur des cellules cancéreuses en culture,

R. BASSLEER, D. CLERMONT, J.M. MARNETTE, M. CAPRASSE, M. TITS et L. ANGENOT. *Ann. Pharm. Fr.*, 1985, 43, 83-88.

RÉSUMÉ. — Les effets cellulaires de la dihydroflavopéirine et de la sempervirine (deux alcaloïdes indoliques issus des Loganiacées) ont été analysés par des méthodes cytologiques appliquées à des tumeurs expérimentales cultivées in vitro (mélanome B₁₆ de la Souris, et tumeur ascitique d'Ehrlich de la Souris, souche ELT). Dans les conditions expérimentales décrites, un effet antimitotique est clairement démontré. Ces observations sont comparées aux résultats antérieurs physicochimiques et biologiques, ce qui autorise certaines corrélations structure-activité.

INTRODUCTION

Les premières recherches effectuées en vue de mettre en évidence les effets antimitotiques éventuels exercés par trois molécules alcaloïdiques de structure différente (strychnofoline, dihydro-18, 19 usambarine et mélinonine F) extraites du *Strychnos usambarensis*, principal ingrédient d'un poison de flèche africain [1], avaient surtout pour but d'orienter les essais futurs vers les composés les plus intéressants [2].

Sur base de critères comparatifs avec d'autres produits pour lesquels un effet antitumoral avait été mis en évidence, nous avons choisi la mélinonine F (fig. 1) pour un examen plus approfondi de ses propriétés cytotoxiques manifestées aussi bien à l'encontre de cellules cancéreuses que de cellules normales [3].

L'activité antimitotique relativement faible manifestée par cet alcaloïde nous a incités à étudier deux autres molécules dont la structure présente d'étroites corrélations: la dihydroflavopéirine (fig. 2) et la sempervirine (fig. 3). Ces deux alcaloïdes dérivés de la β -carboline ont été analysés dans le but de mettre en évidence une éventuelle relation entre leur structure, leur activité biologique et leur action au niveau de macromolécules cellulaires. L'activité de plusieurs médicaments antitumoraux actuellement sur le marché ou à l'étude, est en effet principalement due à leur capacité d'interagir avec l'ADN. Le caractère plan des molécules étudiées suggérait un processus d'intercalation entre les paires de bases de l'ADN (colorants d'acridine, actinomycine, bromure d'éthidium, ellipticine...). Nous avons tenté de mettre ce processus en évidence, à l'aide d'un ensemble de méthodes physicochimiques [8, 10, 11]. Les résultats obtenus, s'écartant sensiblement des réponses données par les agents intercalaires classiques, nous ont amenés à proposer pour ces composés un processus d'intercalation partielle. Sur base des tests réalisés, nous avons classé les dérivés selon leur degré de pénétration entre les bases hétérocycliques de la double hélice d'ADN: la mélinonine F étant nettement moins active que la dihydroflavopéirine, elle-même un peu moins engagée que la sempervirine [6, 9]. Afin de savoir si cette différence de comportement pouvait être à l'origine d'une activité cytotoxique plus ou moins intense, nous avons entrepris les expériences faisant l'objet de cet article.

Nos travaux tendent également à compléter les travaux antérieurs consacrés à trois bases anhydronium: l'alstonine, la serpentine et la sempervirine, que nous avons également testée. Ces trois molécules pentacycliques exercent une activité antimitotique dix fois plus élevée à l'encontre de cellules cancéreuses qu'à l'égard de cellules non cancéreuses [5]. Une inhibition sélective de la synthèse *in vitro* de l'ADN cancéreux a même été proposée pour ces trois composés [4].

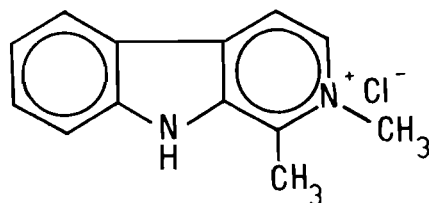


FIG. 1. — Mélinonine F (chlorure).

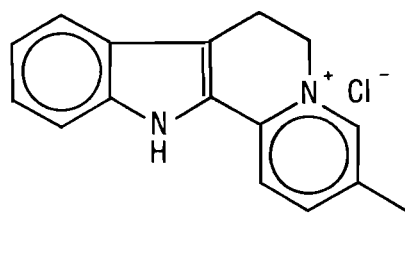


FIG. 2. — Dihydroflavopéireine (chlorure).

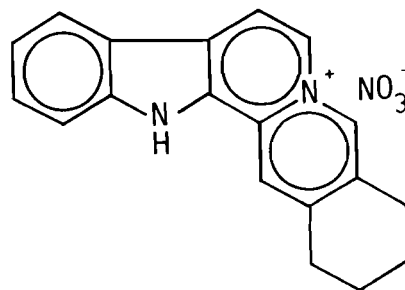


FIG. 3. — Sempervirine (nitrate).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

SUBSTANCES ALCALOÏDIQUES TESTÉES

Le chlorure de dihydroflavopéireine a été purifié par chromatographie à contre courant (DCCC) à partir d'un extrait d'alcaloïdes quaternaires du *Strychnos usambarensis* (*Loganiaceae*) [7].

Le nitrate de sempervirine, alcaloïde principal de *Gelsemium sempervirens* (*Loganiaceae*) nous a été fournie par la firme SARSYNTEX (Mérignac, France).

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 B₁₆ de la Souris, tumeur ascitique d'Ehrlich de la Souris (ELT). Le mélanome B₁₆ provient de tumeurs primitives greffées à la souris C 57 Bl. La tumeur ascitique d'Ehrlich souche ELT hypertétraploïde, est inoculée dans la cavité péritonéale de souris C 57 Bl. 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 fœtal 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 B₁₆; 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 3 000 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

EFFETS DE LA DIHYDROFLAVOPÉREIRINE (DHFP)

Sur le mélanome B₁₆

A 10 µg/ml, la DHFP n'exerce aucun effet sur la multiplication cellulaire, même après 72 h de traitement. Elle se révèle toutefois active à 50 µg/ml : après 24 h, l'index mitotique moyen tombe à 14,1‰ (contre 32,7‰ chez les témoins, P = 99,7); après 48 h, il n'est que de 4,7‰ (contre 11,8‰ chez les témoins, P = 99,8); après 72 h, il est de 1,5 contre 6,2‰ (P = 98,2). Le degré de dégénérescence reste modéré, sauf à 72 h, période de l'expérience où la pycnose est très fréquente.

Sur la tumeur d'Ehrlich

Dans cette souche, les résultats sont tout à fait concordants avec les précédents. Inactive à 10 µg/ml, la DHFP inhibe nettement la multiplication à 50 µg/ml : index mitotique moyen 7,3 contre 12,1‰ chez les témoins, après 24 h (P = 98,8) et 3,3 contre 5,8 chez les témoins, après 48 h (P = 98,1). Ici aussi, il y a plus de pycnoses nucléaires que chez les témoins.

On notera que, à 50 µg/ml, la DHFP n'arrête pas complètement la prolifération cellulaire. Les pourcentages des différentes phases de la mitose ne sont pas modifiés sensiblement.

EFFETS DE LA SEMPERVIRINE

Ici, les expériences ont porté sur le mélanome B₁₆; le milieu nutritif, additionné de sempervirine, a été renouvelé chaque jour.

Si à 1 µg/ml, les effets sur la multiplication sont nuls, à 10 et 50 µg/ml, la sempervirine se révèle active, comme l'indique le tableau ci-dessous (index mitotique ‰) :

	Témoins	10 µg/ml	50 µg/ml
24 h	39,5	22,1	5,6
48 h	35,4	20,2	4,0
72 h	34,1	18,4	3,5

Toutes les différences sont hautement significatives ($P > 99,9$). Les pourcentages des phases de la mitose ne sont cependant pas modifiés. Pour 50 $\mu\text{g/ml}$, la prolifération est fortement ralentie, mais non arrêtée; on note ici de la nécrose cellulaire.

DISCUSSION

Les observations cytologiques corroborent les analyses physicochimiques d'intercalation dans l'ADN [6, 9].

D'une part, la dihydroflavopéireine et la sempervirine se sont montrées plus actives que la mélinonine F, petite molécule préalablement testée [2]; il est probable que la taille des molécules joue dans ce cas un rôle déterminant.

D'autre part, l'action antimittotique de la sempervirine apparaît un peu plus forte que celle de la dihydroflavopéireine. Cette activité peut être mise en relation avec la structure moléculaire; en effet, la sempervirine correspond assez bien aux deux critères permettant l'intercalation: planéité et aromaticité. La dihydroflavopéireine, quant à elle, se distingue de la sempervirine par une hydrogénation partielle d'un cycle pyridinique et, de ce fait, a perdu une partie de son aromaticité et sa planéité n'est plus parfaite, d'où une intercalation diminuée.

D'après nos premiers résultats, il se confirme qu'une meilleure compréhension des relations entre la structure des alcaloïdes indoliques et leur activité biologique devrait conduire à l'obtention d'analogues de structure doués d'une activité optimale.

C'est avec cet espoir et dans ce but que l'étude du vaste monde des alcaloïdes indoliques doit désormais être poursuivie.

CONCLUSIONS

La dihydroflavopéireine et la sempervirine exercent des effets antimittotiques sur des couches cancéreuses en culture. Ces effets ne s'observent qu'à concentration relativement élevée (10 $\mu\text{g/ml}$ et surtout 50 $\mu\text{g/ml}$), mais sont cependant plus prononcés qu'avec la mélinonine F, préalablement testée. Des relations entre taille moléculaire, planéité, aromaticité et activité antimittotique sont déductibles de nos observations cytologiques.

REMERCIEMENTS

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

Mme 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. SCABERS a été vivement appréciée, ainsi que celle de Mme B. CORNET.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ANGENOT L., *Ann. Pharm. Fr.*, 1971, 29, 353-364.
- [2] GASSLEER R., DEPAUW-GILLET M.-C., MASSART B., MARNETTE J.-M., WILQUET P., CAPRASSE M. & ANGENOT L., *Planta Méd.*, 1982, 45, 123-126.
- [3] BASSLEER R., MARNETTE J.-M., WILQUET P., DEPAUW-GILLET M.-C., CAPRASSE M. & ANGENOT L., *Planta Med.*, 1983, 49, 158-161.
- [4] BELJANSKI M. & BELJANSKI M.S., *Exp. Cell. Biol.*, 1982, 50, 79-87.
- [5] BELJANSKI M. & BUGIEL J., Brevets d'invention n° 7807155 et n° 7830663, France, 1978.
- [6] CAPRASSE M., *Contribution à l'étude phytochimique du genre Strychnos. Isolement et structure d'alcaloïdes indoliques. Interactions avec l'ADN.* Thèse Doct. Sc. Pharm., Université de Liège, 1983.
- [7] CAPRASSE M., COUNE C. & ANGENOT L., *J. Pharm. Belg.*, 1983, 38, 135-139.
- [8] CAPRASSE M. & HOUSSEIER C., *Biochimie*, 1983, 65, 157-167.
- [9] CAPRASSE M. & HOUSSEIER C., *Biochimie*, 1984, 66, 31-41.
- [10] DUPORTAIL G., *Contribution à l'étude des interactions entre acides nucléiques et molécules fluorescentes.* Thèse Doct. Sc., Université de Strasbourg, 1978.
- [11] DUPORTAIL G., *Int. J. Biol. Macromol.*, 1981, 3, 188-192.