

## Recherche d'une activité antitumorale de saponosides triterpéniques

STEINMETZ M.D., ELIAS R., MAILLARD C., RÉGLI P., BALANSARD G.\*

Collaboration technique : CHASTIN C., BOUDON G.

\* Laboratoire de Pharmacognosie-Fac de Pharmacie, 27, bd Jean-Moulin, 13385 Marseille Cedex 5

### INTRODUCTION

Nos travaux précédents ont permis d'évaluer l'activité antifongique *in vitro* de saponosides triterpéniques extraits du lierre<sup>1</sup> (*Hedera helix* L.) sur les levures et les dermatophytes<sup>2,3</sup>.

De plus, les saponosides sont généralement réputés avoir une activité anti-bactérienne<sup>4</sup>. Nous avons cherché à savoir si ces substances : l' $\alpha$ -hédérine, la  $\delta$ -hédérine, l'hédérasaponine C et l'hédéragénine, possédaient une activité antitumorale. Nous avons adapté le test classique, simple, proposé par GALSKY *et coll.*<sup>5</sup>, McLAUGHLIN *et coll.*<sup>6</sup> : le bio-essai crown-gall de pomme de terre. En effet, l'application de ce test pour la détection de l'activité antitumorale de différents extraits végétaux comme de produits purifiés a déjà été adoptée par de nombreux auteurs<sup>7,8,9</sup>. Il semble statistiquement fiable. Il était donc intéressant de l'utiliser sur nos produits.

### MATÉRIEL ET MÉTHODE

Ce test consiste à induire l'apparition de tumeurs sur des disques de tissu interne de tubercules de pomme de terre, par inoculation d'une suspension d'*Agrobacterium tumefaciens*, souche B<sub>6</sub>S<sub>3</sub>. Les extraits végétaux sont appliqués simultanément. Le nombre de tumeurs est évalué après 14 jours d'incubation à 27 °C et comparé aux valeurs obtenues pour les témoins.

#### MATÉRIEL VÉGÉTAL

Nous avons utilisé des tubercules de pomme de terre variété Roseval, sans traitement antigerminatif et de 8 cm de longueur moyenne.

La préparation des disques de tubercules est réalisée de façon classique<sup>9</sup>. Après stérilisation des surfaces de coupe, un cylindre de 1,2 cm de diamètre de tissu interne est prélevé dans l'axe central de chaque tubercule au moyen d'un emporte-pièce. Ce cylindre est débité en disques de 0,5 cm d'épaisseur constituant les explantats. Ces disques sont ensuite placés, leur face apicale au contact du milieu, dans des boîtes de Pétri renfermant 30 ml de gélose à 2 % et inoculés immédiatement.

#### SOUCHE BACTÉRIENNE

La souche d'*Agrobacterium tumefaciens* B<sub>6</sub>S<sub>3</sub> (INRA Angers) est repiquée sur milieu solide YMA Difco, tous les 15 jours, de façon à la maintenir en croissance active.

L'inoculum des disques est effectué avec une suspension de bactéries cultivées en milieu liquide YMB Difco, à 27 °C sous agitation, de sorte que la densité bactérienne de l'inoculat soit 5.10<sup>9</sup> UFC/ml.

#### SUBSTANCES VÉGÉTALES TESTÉES

Ce sont des saponosides extraits du lierre (*Hedera helix* L.) et purifiés dans nos laboratoires<sup>1</sup> :

- |                                    |   |
|------------------------------------|---|
| – Hédérasaponine C                 | } à la concentration de<br>25 µg par disque, cette<br>concentration étant la<br>plus souvent utilisée<br>dans ce type de screening <sup>8</sup> . |
| – $\delta$ hédérine sel de sodium  |   |
| – Hédéragénine sel de sodium       |   |
| – $\alpha$ -hédérine sel de sodium |   |

Produits de référence :

- |             |                                       |
|-------------|---------------------------------------|
| émétine     | } 5 µg par disque<br>10 µg par disque |
| vincristine |                                       |
|             | } 5 µg par disque<br>10 µg par disque |
|             |                                       |

#### INOCULUM

50 µl d'un inoculum contenant 5.10<sup>9</sup> UFC/ml d'*Agrobacterium tumefaciens* B<sub>6</sub>S<sub>3</sub> et 25 µg des différentes substances à tester sont déposés sur chaque disque de pomme de terre.

Les valeurs sont déterminées pour des séries de 2 fois 30 disques.

Toutes les manipulations sont réalisées sous hotte à flux laminaire.

#### RÉSULTATS

Les tumeurs sont dénombrées sur toute la surface du disque après ajout d'une solution de Lugol, et après 14 jours d'incubation à 27 °C.

Les résultats sont exprimés en :

a) Valeur moyenne de tumeurs par disque ( $\pm$  écart type).

b) Pourcentage d'inhibition par rapport aux témoins.

Inoculum déposé sur chaque disque (50 $\mu$ l)	Nombre moyen de tumeurs/disque $\pm$ écart-type (a)	% d'inhibition des tumeurs (b)
Témoin		
B <sub>6</sub> S <sub>3</sub> + eau distillée stérile 25 $\mu$ g	47.7 $\pm$ 4.9	0 %
B <sub>6</sub> S <sub>3</sub> + hédérasaponine C 25 $\mu$ g	43.2 $\pm$ 4.7	9 %
B <sub>6</sub> S <sub>3</sub> + $\delta$ -hédérine 25 $\mu$ g	40.7 $\pm$ 3.2	11 %
B <sub>6</sub> S <sub>3</sub> + hédéragénine 25 $\mu$ g	36.1 $\pm$ 4.4	24 %
B <sub>6</sub> S <sub>3</sub> + $\alpha$ -hédérine 25 $\mu$ g	16.1 $\pm$ 3.6	66 %
Émétine 5 $\mu$ g*	20.6 $\pm$ 2.1	55 %
	10 $\mu$ g	70 %
Vincristine 5 $\mu$ g*	31.2 $\pm$ 1.5	34 %
	10 $\mu$ g	46 %

\* Nos valeurs sont en rapport avec celles déjà obtenues par GALSKY et coll.<sup>5,7</sup> et FERRIGNI<sup>8</sup> pour ces produits de référence.

Dans nos conditions expérimentales : l' $\alpha$ -hédérine provoque une inhibition de 66 % des tumeurs par rapport aux témoins. Cette valeur peut être considérée comme significative.

Les trois autres produits testés ne semblent pas entraîner de variations importantes de la tumorigénèse. En effet, seuls sont pris pour significatifs les pourcentages d'inhibition supérieurs à 20<sup>8</sup>.

Par rapport aux produits de référence, l' $\alpha$ -hédérine testée (à la concentration de 25  $\mu$ g/disque) a une action voisine de celle de l'évétine à 10  $\mu$ g/disque.

## CONCLUSION

L' $\alpha$ -hédérine seule semble présenter une activité antitumorale selon l'application du bio-essai crown-gall de pomme de terre, dans nos conditions opératoires. Cette inhibition voisine de 70 % par rapport aux témoins est obtenue à la concentration de 25  $\mu$ g par disque. Des recherches permettront de déterminer une éventuelle dose minimale active sur le développement des tumeurs. Les autres produits testés n'affectent pas la tumorigénèse.

## RÉFÉRENCES

- ELIAS R., DIAZ-LANZAA M., VIDAL-OLLIVIER E., BALANSARD G., FAURE R., BABADJAMIAN A., 1991, *J. Nat. Prod.*, 54 : 98 - 103.
- FAVEL A., STEINMETZ M.D., REGLI P., OLLIVIER E., ELIAS R., BALANSARD G., 1992, *40th Annual Congress of the Society for the Medicinal Plant Research*, Trieste, Italy.
- FAVEL A., STEINMETZ M.D., REGLI P., VIDAL-OLLIVIER E., ELIAS R., BALANSARD G., 1994, *Planta Medica*, 60, n°1, 50 - 53.
- HILLER K., 1987, in *Biologically Active Natural Products*, pp 167 - 184, Oxford University Press.
- GALSKY A.G., WILSEY J.P., POWELL R.G., 1980, *Plant Physiol.* 65 : 184 - 85.
- MCLAUGHLIN J.L., 1991, *Methods in Plant Biochemistry*, Vol. 6 : 2 - 32.
- GALSKY A.G., KOZIMOR R., PIOTROWSKI D., POWELL R.G., 1981, *J. N. Cl.* 67 689 - 692.
- FERRIGNI N.R., PUTNAM J.E., ANDERSON B., JACOBSEN L.B., NICHOLS D.E., MOORE D.S., MC LAUGHLIN J.L., 1982, *J. Nat. Prod.*, 45, 6 : 679 - 685.
- BOUDJENIBA M., HUNAULT G., 1989, *Ann. Sc. Nat. Bot.*, Paris, 10 : 35 - 48.