

**ETUDE DES PROPRIETES IMMUNODULATRICES
D'UN EXTRAIT ISOLE ET PARTIELLEMENT PURIFIE
A PARTIR DE
L'ALOE VAHOMBE.**

**3. ETUDE DES PROPRIETES ANTITUMORALES ET CONTRIBUTION
A L'ETUDE DE LA NATURE CHIMIQUE DU PRINCIPE ACTIF.**

par

L. RALAMBORANTO, L.H. RAKOTOVAO et J.Y. LE DEAUT. Département de Biochimie. E.E.S. Sciences. B.P. 906 Université de TANANARIVE (Madagascar).

D. CHAUSSOUX et J.C. SALOMON
Laboratoire d'Immunopathologie du C.N.R.S.
Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer, B.P. 8, 94 800 — VILLEJUIF (France).

B. FOURNET et J. MONTREUIL
Laboratoire de Chimie biologique. Université des Sciences et Techniques de LILLE I
59655 — VILLENEUVE D'ASCQ Cedex

P.J. RAKOTONIRINA-RANDRIAMBELOMA, C. DULAT et P. COULANGES Institut Pasteur de Madagascar, B.P. 1274 TANANARIVE (Madagascar).

I — INTRODUCTION

Nous avons montré dans deux précédents articles (1,2) qu'un extrait isolé d'une plante endémique malgache, l'*Aloe vahombe*, partiellement purifié par filtration sur *Sephadex G50* (fraction *Alva*), injecté par voie sous-cutanée (s.c.) ou intraveineuse (i.v.) à des souris les protège contre des infections bactériennes (*Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia pestis*), parasitaires (*Plasmodium berghei*) ou fongiques (*Candida albicans*). Les résultats sont hautement significatifs et reproductibles.

Des expériences préliminaires nous avaient donné des résultats encourageants chez des souris ayant reçu le sarcome TG 180 sous forme d'ascite : les souris protégées par la fraction Alva avaient un temps de survie supérieur à celui des souris témoins. Aussi, nous avons voulu vérifier si la fraction *Alva* possédait une activité antitumorale. Une publication récente (3) faisant l'inventaire des propriétés médicinales des plantes du Sud de Madagascar confirme des données ethnobotaniques de P. BOITEAU (4) et indique que les habitants de la province de TULEAR utilisent l'*Aloé vahombe* par ingestion et appliquent également le suc extrait des feuilles de la plante sur les tumeurs. Nous avons donc étudié l'effet de la fraction *Alva* sur le développement des fibrosarcomes de souris (Mcp C3H-5 et Mc C3-1) et d'un mélanome (B16m) par injection i.v., s.c., ou intratumorale (i.t.) de la fraction *Alva*. Nous avons poursuivi la purification du principe actif contenu dans la fraction *Alva* par chromatographie sur DEAE Cellulose et filtration sur *Ultrogel ACA 34*. La nature chimique de l'extrait a été déterminée par chromatographie sur papier et par chromatographie en phase gazeuse. Enfin, plusieurs expériences préliminaires ont été menées afin d'élucider le mode d'action de la fraction *Alva*, étude de la protection des souris immunodéprimées par le cyclophosphamide, action de la fraction *Alva* sur les macrophages intrapéritonéaux de souris, recherche de l'effet adjuvant avec de l'anatoxine tétanique comme antigène.

II - MATERIEL ET METHODES

Les animaux d'expériences, les souches bactériennes, parasitaires et fongiques utilisées, le mode de culture et d'inoculation des agents pathogènes, le mode de préparation de la fraction *Alva* (F1), les tests d'immunostimulation et les modes de traitement statistiques ont été décrits dans les précédentes publications.

II.1. ETUDE DE L'ACTION DE LA FRACTION ALVA SUR DES SARCOMES EXPERIMENTAUX.

II.1.1. Tumeurs

Le fibrosarcome *McpC3H-5* fut induit initialement chez des souris C3H, par l'implantation, sous la peau de l'abdomen, de membranes *Millipore* (6 mm de diamètre) imprégnées de méthylcholanthrène-3 (PREHN: 1977, (5)).

La tumeur *McC3-1* est un fibrosarcome induit par le 3 méthylcholanthrène dissous dans l'huile d'olive. La tumeur a été passée par une série de transplantation s.c. au trocar chez des souris syngéniques.

La tumeur *B16m* est un mélanome malin de la souris *C57B1/6* qui nous a été fourni par le Dr. DECHAMBRE (Institut Gustave ROUSSY) et est entretenue *in vivo* dans le laboratoire. Cette tumeur donne naissance à des métastases.

II.1.2. Préparation des suspensions de la tumeur *B16m*.

Le mélanome *B16m* est une tumeur à couleur noirâtre. La souris porteuse de la tumeur *B16m* est tuée par élongation. Les fragments de tumeurs viables sont ensuite prélevés stérilement après avoir enlevé les parties nécrosées et hémorragiques. Ces fragments de tumeurs sont découpés en petits morceaux et placés dans du tampon PBS et les cellules viables sont comptées par la méthode d'exclusion au bleu Trypan. Les préparations qui renferment plus de 80p.100 de cellules viables seront utilisées.

II.1.3. Conservation des tumeurs.

Les tumeurs primitives, qui apparaissent chez les souris non traitées par un immunostimulant, après induction par le méthylcholanthrène-3, sont excisées. Les fragments bien vascularisés sont mis dans un milieu nutritif additionné de 10 p. 100 de glycérol, congelés lentement et maintenus à moins 80° C.

II.1.4. Transplantation des tumeurs.

Un fragment de tumeur d'environ 1mm³, rapidement décongelé est placé sous la peau de l'abdomen de l'animal à l'aide d'un trocard. Dans les essais de suppression (avec la tumeur *B16m*), les suspensions tumorales sont mélangées à la fraction *Alva* chez les animaux traités ou au sérum physiologique chez les animaux témoins.

II.1.5. Immunothérapie des tumeurs

Quand la tumeur transplantable *McC3-1* atteint chez les souris un diamètre moyen de 4 à 9 mm, les animaux sont traités par 2 injections espacées de 7 jours. Les voies d'administration *s/c.* ou *i.v.* ont été utilisées. Les doses administrées furent de 2,5 mg ou 10 mg de fraction *Alva* ou de *C. parvum* en suspension dans 0,1 ml de sérum physiologique.

Lors des séries d'expériences faites avec la tumeur transplantable *McpC3H-5*, les animaux sont traités par deux injections espacées de 7 jours par l'extrait d'*Alva* ou de *C. parvum*. La fraction *Alva* est administrée à différents lots d'animaux soit par voie *s.c.*, soit par voie *i.t.* Une dose de 2,5 mg par animal a été injectée à 3 lots

et une dose de 10 mg par animal à un lot de souris. Le *C. parvum* a été administré par voie i.t. à un autre lot à raison de 10^9 bactéries tuées par animal. Les lots témoins ont reçu du sérum physiologique dans les mêmes conditions.

II.1.6. Observation des animaux

Les animaux sont examinés deux fois par semaine. Les tumeurs étudiées ayant une forme ovoïde, on mesure la moyenne du plus grand et du plus petit diamètre à l'aide d'un pied à coulisse. Les différences de temps de survie chez les animaux témoins et traités sont analysées par le test *t* de *STUDENT*.

II.1.7. Observation des métastases pulmonaires.

Les souris ont reçu d'abord par voie s.c. 10^4 cellules tumorales de *B16m* (J_0) ; puis au 14ème jour après la greffe des cellules tumorales ($J + 14$), un lot est traité par voie i.v. avec 2,5 mg de la fraction *Alva* tandis que le lot témoin reçoit 0,1 ml de sérum physiologique par voie i.v. Au 24ème jour, toutes les souris sont tuées à l'éther et autopsiées aussitôt pour l'observation des métastases pulmonaires. L'injection par voie trachéale de liquide de *BOUIN* permet de gonfler les poumons.

On observe alors des nodules blanchâtres ou grisâtres qui sont les métastases au sein des lobes pulmonaires. On note également le nombre de métastases au niveau des ganglions.

II.2. STIMULATION IN VITRO PAR LA FRACTION ALVA DES MACROPHAGES INTRAPERITONEAUX DE SOURIS

Les souris sont immunisées par la fraction *Alva* par voie s.c. ($J-2$) et les souris témoins ont reçu du sérum physiologique. Au jour J_0 , on injecte à tous les animaux par voie i.p. 10 ml de milieu *Eagle MEM* hépariné (milieu synthétique utilisé pour la croissance et l'entretien des cellules). Après avoir tué la souris par élongation, une boutonnière est pratiquée au niveau de l'abdomen et le contenu liquide du péritoine, prélevé à l'aide d'une pipette Pasteur, est placé dans un tube à centrifuger maintenu au froid dans de la glace pilée. On lave les cellules 2 à 3 fois dans du *MEM* par centrifugation à 4°C pendant 10 min à une vitesse de 1 000 t/min. Le comptage des macrophages se fait à l'aide d'un hématimètre. Ensuite, pour sensibiliser les globules rouges de poulet (G.R.P.), ceux-ci sont mis en contact avec un antisérum de souris ou de lapin pendant 20 à 30 minutes à 4°C. Du sérum de veau foetal (20% dans du *MEM*) est ajouté au culot de macrophages obtenu précédemment par centrifugation (le sérum de veau foetal favorise l'adhérence des macrophages au verre).

2 ml de cette suspension de macrophages sont mis dans un tube de *Leighton* (tube à fond plat) à l'intérieur duquel est placée une lamelle (soit $2 \cdot 10^6$ macrophages/tube). Après addition de 0,2 ml de G.R.P. sensibilisés (3 G.R.P. pour un macrophage), les tubes sont placés dans l'étuve à 37°C pendant 2 à 3 heures. Un lavage à l'eau distillée assure l'élimination des cellules qui n'ont pas adhéré à la lamelle. Une coloration par le colorant de *GIEMSA* permet le comptage des macrophages qui ont phagocyté les globules rouges de poulet.

II.3. TEST DE STIMULATION PAR LE *CORYNEBACTERIUM PARVUM*.

Il s'agit d'une suspension préparée par le Dr. DUCLUZEAU (NRA), ajustée à 10^9 bactéries tuées par 0,01 ml de solution.

II.4. ESSAI DE PURIFICATION DE LA FRACTION ALVA ET DE DETERMINATION DE SA COMPOSITION CHIMIQUE.

II.4.1. Filtration sur *Ultrogel ACA 34* et *ACA 54*.

Dans le cas de l'Ultrogel ACA 54, la colonne utilisée a une hauteur de 86 cm et un diamètre de 2,6 cm. Elle est préalablement équilibrée dans du NaCl 90/00. Le débit obtenu est de 30 ml/h. L'élu-tion est suivie à 220 nm.

En ce qui concerne la colonne d'Ultrogel ACA 34, le gel est équilibré par du bicarbonate d'ammonium 0,1 M.

II.4.2. *Chromatographie sur DEAE-cellulose*

Le résine, de type *DE-52*, a été utilisée sur une colonne ayant une hauteur de 22 cm et un diamètre de 1 cm. L'échantillon est équilibré par dialyse avec du tampon Tris-HCl 50 mM pH 8,3. L'élu-tion se fait par gradient continu d'une solution formée par le mélange d'une solution de tampon Tris-HCl pH 8,3 et d'une solution de NaCl 3M.

II.4.3. Extraction directe des polysaccharides à partir de l'extrait d'*Aloe vahombe*.

Des feuilles entières d'*Aloe vahombe* sont lavées et désinfectées dans l'eau de Javel (1 p. 100). Après rinçage, elles sont découpées en petits morceaux puis broyées au mixer. Une centrifugation à 3 000 tours/minute pendant 15 minutes nous a permis de séparer le surnageant du culot.

Ce surnageant a été repris dans 2 volumes d'alcool absolu afin de précipiter les polysaccharides. La précipitation par l'alcool est

répétée 2 à 3 fois jusqu'à l'obtention d'un produit blanc de consistance mucilagineuse, qui renferme les polysaccharides. On purifie ensuite les polysaccharides par les méthodes décrites précédemment.

II.4.4. *Chromatographie sur papier de l'hydrolysat.*

On utilise du papier Whatman n°3 pour la chromatographie ; comme solvant, le mélange : Butanol-acide acétique — eau (4 : 1 : 5 V/V/V) et les sucres sont révélés après migration avec du phtalate d'aniline. On fait migrer parallèlement plusieurs témoins.

II.4.5. *Chromatographie en phase gazeuse.*

Elle a été effectuée dans le laboratoire de chimie biologique de l'Université des Sciences et Techniques de LILLE I par méthanolyse, trifluoroacétylation et CLG sur OV 210 5 %.

II.4.6. *Etude de l'efficacité du traitement Alva par calcul statistique.*

La comparaison de la croissance des tumeurs chez les souris traitées et chez les souris témoins a été mesurée par la méthode de PEARSON (X²).

III. — RESULTATS

III.1. TRAITEMENT DU FIBROSARCOME *McpC₃H-5* DE SOURIS.

III.1.1. *Effet de l'injection de la fraction Alva par voie sous-cutanée.*

Les tumeurs de diamètre compris entre 5 mm et 9 mm sont traitées par une injection s.c. de la fraction *Alva* (2,5 mg d'*Alva* dans 0,1 ml de sérum physiologique). Les animaux témoins ont reçu par la même voie 0,1 ml de sérum physiologique. La vitesse de croissance des tumeurs est à peu près la même dans les 2 lots pendant 10 jours après le premier traitement (Figure 1).

Mais la différence de croissance devient significative à partir du 20ème jour ($p < 0,02$) (Tableau 1).

Les tumeurs des témoins se développent très vite alors que la croissance se ralentit chez les animaux traités par la fraction *Alva*. On observe même que les tumeurs ont diminué de volume chez deux animaux.

La comparaison du temps de survie ne donne pas de différence significative bien que la moyenne de survie soit plus grande chez les animaux traités que chez les témoins.

Toutefois, l'effet de la fraction *Alva* persiste encore d'une manière significative 32 jours après le 1er traitement ($p < 0,001$) (Tableau 1). L'*Alva* a donc un effet suffisant pour ralentir la croissance mais non pour stopper le développement du fibrosarcome.

III.1.2. Effet de l'injection intratumorale de la fraction *Alva* et du *Corynebacterium parvum* tué.

Le traitement intratumoral a été fait avec deux doses de la fraction *Alva* (2,5 mg et 10 mg). Les tumeurs croissent normalement chez les animaux témoins n'ayant reçu que du sérum physiologique. Le ralentissement de la croissance des tumeurs traitées par la fraction *Alva* est encore ici observé mais de façon moins spectaculaire que lors du traitement par voie s.c. Le traitement par 2,5 mg de la fraction *Alva* augmente le temps de survie de manière significative ($p < 0,001$). Il est de $23,07 \pm 1,64$ chez les souris témoins, $37,20 \pm 3,36$ chez les souris traitées (figure 2) par la fraction *Alva* et $34,33 \pm 2,80$ chez les souris traitées par *C. parvum* (figure 3). Bien que le temps de survie soit plus long chez les animaux traités par la fraction *Alva*, la tumeur *McpC3H-5* est plus sensible au traitement par *C. parvum* et on observe dans ce modèle expérimental la guérison d'un animal sur dix. Il n'existe aucune différence entre l'effet obtenu par 2,5 mg et par 10 mg de la fraction *Alva*.

III.1.3. Traitement par injection de la fraction *Alva* par voie intraveineuse

Dans le cas des animaux traités par une dose de 2,5 mg de la fraction *Alva*, les courbes de croissance des tumeurs montrent clairement qu'il y a un retard de croissance des tumeurs traitées alors que les tumeurs observées chez les souris témoins croissent rapidement et entraînent la mort de 80 p. 100 d'animaux dans les 20 jours qui suivent la greffe de la tumeur.

L'effet thérapeutique de l'injection i.v. de la fraction *Alva* est indéniable et on constate que le temps moyen de survie des animaux traités ($31,30 \pm 3,03$) est supérieur à celui des animaux témoins ($20,43 \pm 3,21$). Cette différence est significative ($p < 0,05$) (Tableau 2).

III.2. ESSAI DE GUERISON DE LA TUMEUR TRANSPLANTABLE *McC3-1* par la fraction *Alva*.

La tumeur *McC3-1* est un fibrosarcome induit initialement par le méthylcholanthrène -3 chez les souris *C3H*. Les courbes de croissance des tumeurs, des souris traitées par la fraction *Alva* (voies i.v., s.c., i.t.) et par le *C. parvum* sont présentées dans les figures 4, 5 et 6.

La figure 4 (i et j) compare les croissances respectives de la tumeur MC C3-1 chez les souris traitées par 2,5 mg de la fraction *Alva* et chez les souris témoins. Le graphique montre que 40 p. cent des tumeurs MC C3-1 régressent et se résorbent dans le lot des souris traitées.

Par voie i.t., une dose de 2,5 mg de la fraction *Alva* entraîne également la régression, puis la guérison de 40 p.100 des tumeurs des souris traitées (Figure 5 k). C'est également le cas (45 p. 100 de guérisons) quand les tumeurs sont traitées par 10 mg de la fraction *Alva* (Figure 5 l.). La croissance des tumeurs chez les souris non traitées (elles reçoivent 0,1 ml de sérum physiologique par voie i.t.) n'est pas significativement différente de celle observée dans le cas des souris témoins ayant reçu le sérum physiologique par voie s.c. (Figure 4 i).

La tumeur *McC3-1* est guérie par le *C. parvum* injectée par voie i.t. (Figure 6).

— La fraction *Alva*, injectée par voie i.v. n'empêche pas le développement.

Nous exposons l'ensemble des résultats obtenus dans les essais de guérison de la tumeur *McC3-1* par la fraction *Alva* et par la suspension de *C parvum* dans le tableau 3.

On remarque que la fraction *Alva* (injectée par voies s.c. et i.t.) peut induire la guérison de la tumeur *McC3-1* des souris *C3H*. Au total, 4 tumeurs sur 10 sont guéries par la fraction *Alva* injectée par voie i.t. La fraction administrée à 2,5 mg ou 10 mg entraîne la régression puis la guérison de près de la moitié des tumeurs.

III.3. ESSAI DE SUPPRESSION DU MELANOME *B16m*.

III.3.1. Comparaison des courbes de croissance.

Le *B16m* est un mélanome de la souris *C57B₁/6*. Les travaux de J.C. SALOMON et N. LYNCH (1976) ont démontré que la *B16m* est résistant à l'effet du *BCG* et du *C. parvum* injectés par voie i.t. (6). Aucune guérison n'a été observée par ces auteurs.

La comparaison des courbes moyennes de croissance de la tumeur *B16m* chez les souris *C57* traitées et chez les souris témoins montre que la fraction *Alva* provoque un retard de croissance au début, mais il y a un rattrapage de croissance dans les jours qui suivent. Un seul traitement (2,5 mg de la fraction *Alva*) semble être insuffisant pour induire une guérison du mélanome.

III.3.2. Effet de la fraction *Alva* sur la formation des métastases pulmonaires.

La *B16m* est une tumeur qui donne des métastases. L'injection de la fraction *Alva* (2,5 mg) par voie s.c. au 14ème jour après la

transplantation de la tumeur entraîne une diminution du nombre de métastases pulmonaires comptées 24 jours après la greffe (Tableau 4).

Toutes les souris témoins présentent des métastases, certaines plusieurs ; ce n'est pas le cas chez les souris traitées par la fraction *Alva*.

III.4. PURIFICATION ET ESSAI DE DETERMINATION DE LA NATURE CHIMIQUE DE LA FRACTION IMMUNOSTIMULANTE.

III.4.1. Poursuite de la purification de la fraction *Alva* par filtration sur Ultrogel ACA54, sur Ultrogel ACA 34 et par chromatographie sur DEA Cellulose.

La Figure 7 représente le profil d'éluion de la fraction *Alva* après filtration sur *ULTROGEL ACA 54*. Les conditions expérimentales de la filtration ont été définies dans le paragraphe II.4.1. Nous avons collecté quatre fractions d'après le profil spectrophotométrique. Nous poursuivons actuellement la purification du pic B, qui a montré une activité biologique dans des expériences préliminaires, par chromatographie sur *DEAE-cellulose*. Ce support a été en effet utilisé par différents auteurs (G. GOWDA et coll., 1979 (7) ; G. CHIHARA et coll., 1970 (8)) pour séparer les polysaccharides des végétaux supérieurs. Une publication récente décrit également l'utilisation de cette résine pour le fractionnement des polysaccharides d'une variété d'*Aloes* (G. MANDAL et coll., 1980 (9)).

La fraction F1 a également été chromatographiée sur Ultrogel ACA 34 équilibrée dans du bicarbonate d'ammonium. Nous avons obtenu 6 fractions. Toutes ces fractions sont incluses dans le gel ACA34, ce qui signifie qu'elles possèdent une masse moléculaire inférieure à 350 000.

III.4.2. Analyse chimique de la fraction *Alva* active.

III.4.2.1. *Chromatographie sur papier de l'hydrolysate.*

Cette expérience a été effectuée après hydrolyse acide, d'une part, de la fraction F1 et d'autre part de la fraction correspondant au premier pic élué après chromatographie sur colonne de *DEAE-cellulose*. Les résultats représentés sur la figure 8, montrent notamment :

— que les deux fractions sont principalement constituées de trois sucres : le mannose, le glucose et un sucre que nous n'avons pas encore identifié. Le mannose est largement prédominant. Le

glucose et le sucre non identifié sont présents dans le même rapport. Ces deux fractions (fractions F1 et le premier pic isolé par chromatographie sur *DEA-cellulose*), qui sont isolées à des stades différents de la purification, ont d'après les résultats, la même composition chimique. Il est également intéressant de noter que les polysaccharides isolés de deux espèces, l'*Aloe vera* (D. GOWDA et coll., 1979 (7) et l'*Aloe pilsanis* Miller (B. PAULSEN et coll., 1978 (10)) sont constitués de longues chaînes de glucomannanes acétylés et le mannose est également prédominant dans le rapport mannose : 2,8 — glucose : 1. Il se pourrait également que le sucre non identifié qui migre peu sur le chromatogramme (Rf. d'environ 0,2) corresponde à une molécule acétylée.

III.4.2.2. *Chromatographie en phase gazeuse.*

Les 6 fractions obtenues par filtration sur Ultrogel ACA34 ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse. La composition en monosaccharides de la fraction *Alva* est indiquée dans le tableau 4. Elle confirme les résultats obtenus par chromatographie sur papier, à savoir que la fraction active est principalement constituée de glucose et de mannose dans le rapport 1 :3. Nous travaillons actuellement à la détermination de la séquence de cet extrait polysaccharidique et à l'extraction directe des polysaccharides de l'*Aloe vahombe* (§ II.4.3) par l'alcool absolu.

III.5. CONTRIBUTION A L'ETUDE DU MODE D'ACTION DE LA FRACTION IMMUNOMODULATRICE.

Nous avons décrit dans les précédentes publications les expériences préliminaires d'étude de l'immunité acquise vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae*, des essais d'immunostimulation par voie orale et l'infection expérimentale par *Klebsiella pneumoniae* de la souris immunodéprimée par le cyclophosphamide (endoxan). Nous poursuivons actuellement la comparaison de l'action immunostimulante de la fraction *Alva* et de l'immuno-BCG, en présence ou non de cyclophosphamide. Nous avons également montré l'absence d'activité bactéricide du sérum et recherché la présence de substances pyrogènes.

III.5.1. *Recherche de l'effet adjuvant avec l'anatoxine tétanique comme antigène.*

Au cours d'une expérience préliminaire, on a pu mettre en évidence un effet adjuvant comparable à celui obtenu avec l'hydroxyde d'alumine ou avec le MDP-butyl. L'effet est particulièrement net 37 jours après l'administration de l'antigène.

III.5.2. Action de la fraction *Alva* sur les macrophages intrapéritonéaux de souris.

Cette expérience préliminaire a été faite sur 3 souris témoins et 3 souris préalablement traitées avec 2,5 mg de la fraction *Alva* par voie s.c.

Les résultats sont les suivants :

36,06 p.100 de macrophages intrapéritonéaux des souris traitées ont phagocyté les globules rouges de poulet (photo 1) alors que chez les souris témoins, ce pourcentage n'a été que de 10 p. 100.

Ceci nous permet de dire que la fraction *Alva* stimule les macrophages intrapéritonéaux de souris en augmentant leur capacité phagocytaire. Il est important aussi de noter qu'au cours de cette expérience nous avons observé, après comptage, une augmentation du nombre de macrophages des souris traitées par la fraction *Alva* (4.10^6 macrophages par ml) par rapport à celui des souris témoins ($2.3.10^6$ macrophages par ml). La fraction *Alva* agirait non seulement sur la stimulation de la phagocytose des macrophages intrapéritonéaux, mais favoriserait aussi la multiplication de ces macrophages.

Ceci nous paraît confirmé par le fait que la fraction *Alva* n'a plus aucun pouvoir protecteur chez la souris immunodéprimée par le cyclophosphamide : Ce produit censé agir essentiellement sur l'immunité humorale semble capable d'interférer dans les phénomènes d'immunité cellulaire en intervenant dans les phénomènes de multiplication des macrophages. Le cyclophosphamide agit par l'introduction de groupement alkyles au niveau du DNA créant des « ponts » alkoyles entre les chaînes de DNA qui ne peuvent plus se séparer. Les cellules atteintes ne meurent pas immédiatement. C'est seulement quand elles entrent en phase proliférative et qu'elles commencent la synthèse du DNA qu'elles sont tuées.

Cette étude a été effectuée sur un petit nombre de souris, aussi, nous-avons l'intention de reproduire le test afin de confirmer nos résultats.

IV – DISCUSSION ET CONCLUSION

L'étude de l'effet protecteur de la fraction *Alva* sur les tumeurs expérimentales de souris nous a donné des résultats très encourageants.

Pour tester l'activité anti-tumorale de la fraction *Alva*, nous avons réalisé des essais à visée curative et des essais à visée suppressive. Dans le premier cas, la tumeur est latente au début du traitement. Dans le second cas, les cellules tumorales sont mélangées à la

substance immunomodulatrice au moment de la transplantation de la tumeur.

Le traitement des tumeurs de souris par l'injection d'immunostimulants a déjà été étudié par plusieurs auteurs (J.C. SALOMON et LYNCH, (6) ; D. CHASSOUX et J.C. SALOMON, 1975 (11) ; G. RENOUX et M. RENOUX, 1972 (12)). Ceux-ci ont constaté qu'il est difficile d'induire une immunorégression des tumeurs établies. Ceci est aussi vrai pour les tumeurs humaines (MORTON et all., 1970) (13), pour les tumeurs de cobayes (ZBAR et TANAKA, 1971) (14) et pour les tumeurs de rats, (BALDWIN et PIMM, 1971) (15) après injection de *Mycobacterium bovis*. En général, lorsque la tumeur s'est organisée, aucune réaction ne semble d'aucun secours pour modifier son évolution.

Il convient tout d'abord de préciser les limites de l'effet thérapeutique de la fraction *Alva*. Nous n'avons observé que peu de guérisons, et celles-ci ont seulement eu lieu sur la tumeur *McC3-1* ; il est cependant à noter que la vitesse de croissance des tumeurs traitées est nettement plus lente que celle des tumeurs des animaux témoins. Dans le traitement de la tumeur transplantable *McpC3H-5* par la fraction *Alva*, la différence de croissance des tumeurs des souris témoins et des souris traitées est significative ($p < 0,001$) au 32ème jour après le traitement. De plus, la fraction *Alva* seule prolonge significativement la survie des animaux traités. L'injection intratumorale de 2,5 mg de la fraction *Alva* augmente le temps moyen de survie des animaux traités et porteurs de la tumeur transplantable *McpC3H-5* ($p < 0,001$). Or, d'autres travaux ont montré que pour être efficaces, les immunostimulants bactériens doivent être combinés entre eux. Ainsi, J.C. SALOMON et LYNCH (1976) (6) ont décrit que le BCG a un effet thérapeutique meilleur lorsqu'il est mélangé au *Corynebacterium parvum* tué ; RIBI et coll. en 1976 (16) ont étudié l'activité antitumorale d'un mélange d'une endotoxine et du tréhalose mycolate. D. CHASSOUS et J.C. SALOMON (1975) (11) ont montré que le *Corynebacterium parvum* a induit une régression de 9 des tumeurs de rat *McpC3H-5*. Le temps moyen de survie des souris traitées par la fraction *Alva* ($37,20 \pm 3,36$) est supérieur à celui des animaux traités par le *Corynebacterium parvum* ($34,33 \pm 2,80$). Pourtant le *Corynebacterium parvum* est un des immunostimulants connus pour son activité antitumorale. Ceci montre l'intérêt de la poursuite de l'étude de l'action de la fraction *Alva* sur des modèles tumoraux, car, aucun immunostimulant ne permet actuellement d'obtenir des guérisons sur la tumeur transplantable *McpC3H-5*. La tumeur *McC3-1* est une tumeur sensible à l'action de la fraction *Alva*, puisque nous avons observé quelques guérisons chez les animaux traités par voie s.c. (40 p. 100 des tumeurs sont guéries par la fraction *Alva*). Nous avons remarqué

que les meilleures voies d'administration de la fraction *Alva* sont les voies s.c. et i.v. La voie i.t. est peu efficace alors que les travaux de ZBAR et TANAKA 5 (1971) (14) et de BALDWIN et PIMM (1971) (15) ont montré que l'effet thérapeutique du BCG nécessite un contact direct entre le BCG et les cellules tumorales. On peut supposer que le mécanisme d'action de la fraction *Alva* fait appel au système de défense immunitaire de la souris.

Le mélanome *B16m* est difficile à guérir ; néanmoins, nous avons pu observer au premier jour un retard de croissance ($p < 0,01$). Dans les jours qui suivent, la tumeur a de nouveau repris son développement.

La dose 2,5 mg de la fraction *Alva* ne peut pas supprimer totalement la mélanome du fait de la croissance trop rapide de la tumeur.

Par contre, la fraction *Alva* entraîne une remarquable diminution de la fréquence des métastases et de leur nombre.

D'après les résultats obtenus sur les tumeurs expérimentales de souris, nous espérons qu'un traitement à long terme pourrait donner un meilleur effet thérapeutique ; car chez les souris non guéries, la croissance a repris en moyenne 9 à 14 jours après le deuxième traitement. Cette constatation, ainsi que nos résultats observés dans le cas de la tumeur *McpC3H-5* soulèvent le problème du choix du protocole expérimental dans l'étude de l'immunostimulation dans les modèles tumoraux (difficulté de la détermination du temps séparant la transplantation de la tumeur du traitement par l'immunostimulant, nécessité de rappels, éventualité d'utilisation des deux types de thérapies complémentaires).

Nos études préliminaires réalisées pour déterminer la structure du principe actif nous ont permis de conclure que la fraction *Alva* est une substance hydrosoluble, thermostable, de haut poids moléculaire ($PM > 30\ 000$), constituée de polysaccharides. Les sucres prédominants sont le glucose et le mannose.

Le mécanisme d'action de l'effet immunostimulant et antitumoral des polysaccharides est encore mal connu. BORECKY et coll., 1976 (17) ont montré que les polysaccharides jouent un rôle inducteur de la production d'interféron. L'efficacité du pré-traitement par la fraction *Alva* (J-2) sur le développement des tumeurs expérimentales de souris suggère que le mode d'action du principe actif fait appel au système immunitaire de l'hôte infecté, mais qu'il ne s'agit pas d'une action directe de la substance sur les cellules tumorales. En effet, nos résultats montrent que l'injection intratumorale de la fraction *Alva* n'est pas aussi efficace que si d'autres voies d'inoculation sont choisies.

L'activation des macrophages et la stimulation du système réticulo-endothélial (SRE) par un immunostimulant non spécifique, dans

la destruction *in vivo* des cellules tumorales ont été déjà signalées par certains auteurs (R.L. TUTTLE et coll., 1975 (18), M.D. ZBAR BERTON, 1972 (19)). Ces données nous semblent intéressantes pour étudier le mécanisme d'action de la fraction *Alva*, car nos tumeurs ont permis de montrer que celle-ci stimule l'activité phagocytaire des macrophages péritonéaux des souris.

L'étude du mode d'action est préliminaire, mais plusieurs points sont intéressants :

— L'immunité acquise vis à vis de *Klebsiella pneumoniae* 467 pourrait indiquer que la fraction *Alva* renforce l'action des vaccins bactériens. Car, à notre connaissance, les laboratoires de productions n'ont pas réussi à mettre au point un vaccin spécifique contre *Klebsiella pneumoniae*.

Nous avons pour objectif de rechercher l'action éventuelle de la fraction *Alva* :

- sur les lymphocytes B et les effecteurs de l'immunité humorale.
- sur l'immunité cellulaire (lymphocytes T, monocytes, macrophages).
- sur la restauration de l'immunité cellulaire lorsque celle-ci est déficiente.

Ces thèmes de recherche seront explorés par l'étude de l'épuration sanguine grâce au système réticuloendothélial (carbone colloïdal, bactéries, ...), l'étude de l'activation des cellules phagocytaires du foie, de la rate, l'utilisation des souris thymectomisées ou splenectomisées, des souris *nude*, l'étude de l'induction du chimiotactisme des polynucléaires et des macrophages par la fraction *Alva*, la recherche des propriétés lectines par agglutination et dégranulation des mastocytes, l'étude de la réponse spécifique par la recherche des propriétés antigéniques (étude de l'action de la fraction *Alva* en association avec l'adjuvant incomplet de Freund), ainsi que des propriétés adjuvantes : *in vivo* en association avec un antigène en solution saline ou en émulsion eau-huile, *in vitro* par la méthode de MISHALL et DUTTON, par la poursuite de l'étude de la réponse spécifique (étude des effets mitogènes, recherche de l'induction d'interféron). Enfin, nous avons également abordé l'étude des réactions secondaires : pyrogénicité, toxicité chez la souris, sensibilisation aux endotoxines.

TABLEAU 1

Croissance de la Tumeur transplantable *McpC3H-5* chez les souris traitées (2,5 mg *Alva* voie s.c.) et chez les souris témoins.

a = moyenne de dimensions de tumeurs \pm écart à la moyenne
b = écart-type
c = nombre d'animaux.

Jour après traitement	20	24	28	32
Lots comparés				
<i>Alva</i> 2,5 mg a	15,65 \pm 0,45	17,25 \pm 0,35	16,94 \pm 0,58	18,13 \pm 1,05
voie s.c. b	1,43	1,14	1,74	2,96
c	10	10	9	8
Témoin a	17,64 \pm 0,63	22,07 \pm 0,58	25 \pm 0,92	26,25 \pm 0,83
Sérum physiologique b	1,68	1,54	2	1,66
voie s.c. c	7	7	7	4
Significativité de comparaison	P < 0,02	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,01

TABLEAU 2

Croissance de la tumeur Mcp C3H-5 des souris traitées par le *Corynebacterium parvum* (voie i.t.) et des souris témoins.

a = moyenne des dimensions de tumeurs ± écart à la moyenne
 b = écart type
 c = nombre d'animaux.

Jour après traitement		16	20	24	28	32	34	37
Lots comparés								
Cp.10 ⁹ i.t.	a	12,25 ± 0,42	13,35 ± 0,72	14 ± 1,57	16,05 ± 2,04	18,80 ± 2,53	19,80 ± 2,43	18,92 ± 3,96
	b	1,32	2,29	4,97	6,47	8	7,70	9,71
	c	10	10	10	10	10	10	6
Tém. S i.t.	a	13,60 ± 0,28	17,93 ± 0,42	22,12 ± 0,53	25,30 ± 0,64	26,79 ± 0,49	27,75 ± 0,48	28,50 ± 0,87
	b	1,09	1,62	1,92	2,02	1,29	0,96	1,50
	c	15	15	13	10	10	7	6
Significativité de		p < 0,02	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,01	p < 0,02	p < 0,05

T A B L E A U 3

Essai de guérison de la tumeur *McC3-1* par la fraction *Alva* et par la suspension de *C. parvum* (Voies s.c., i.t., i.v.)

2,5 mg ou 10 mg de la fraction *Alva* ou 10^9 Cp sont injectés 2 fois à 7 jours d'intervalle.

	Nombre d'animaux guéris/total		
	1ère série	2ème série	Total
2,5 mg <i>Alva</i> s.c.	2/5	2/5	4/10
Témoins S s.c.	0/5	0/5	0/5
2,5 mg <i>Alva</i> i.t.	1/5		1/5
Témoins S i.t.	0/5	0/5	0/10
10^9 <i>C. parvum</i> i.t.	4/4		4/4
10 mg <i>Alva</i> i.t.	2/4	2/5	4/9
2,5 mg <i>Alva</i> i.t.	2/5	1/5	3/10
Témoins S i.v.	0/5		0/5
2,5 mg <i>Alva</i> i.v.	1/5		1/5

T A B L E A U 4

Métastases pulmonaires au 24ème jour.

Injection de 2,5 mg Alva au 14ème jour après transplantation de tumeur.

Traitement	Nombre de métastases pulmonaires	Animaux porteurs de métastases/ Total
2,5 mg <i>Alva</i> voie s.c.	9	3/10
0,1 ml Sérum physiologique Voie s.c.	21	10/10

T A B L E A U 5

Composition en monosaccharides du polysaccharide *ALVA* et des fractions de la chromatographie sur ultrogel ACA 34 effectuée par chromatographie en phase gazeuse.

Fractions	RAPPORT MOLAIRESUR LA BASE DE 1 RESIDU du GLC	
	Glucose	Mannose
ALVA total	1	3,3
I	1	2
II	1	2,45
III	1	2,9
IV	1	2,74
V	1	1,28
VI	1	2,9

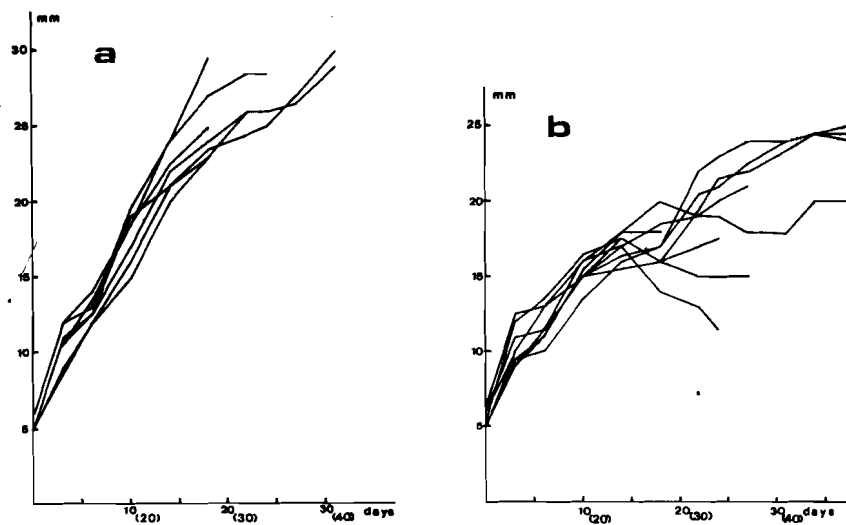


FIGURE 1 :

Croissance de la tumeur *McpC3H-5* des souris traitées par la fraction *Alva* (voie s.c.) et des souris témoins.

— a : Courbe de croissance de la tumeur dans le lot de 10 souris témoins
 — b : Courbe de croissance de la tumeur chez les 10 souris traitées par 2,5 mg de la fraction *Alva* (voie s.c.) : Le premier traitement a lieu au 10^{ème} jour qui suit la greffe de la tumeur qui a atteint un diamètre de 5 mm à 9 mm. Le deuxième traitement a lieu une semaine plus tard dans les mêmes conditions. On mesure chaque jour le diamètre moyen de la tumeur (cf Paragraphe II.1.5). Les chiffres entre parenthèses indiquent les jours qui suivent la transplantation de la tumeur *McpC3H-5*. Les autres chiffres correspondent aux jours qui suivent le premier traitement par la fraction *Alva*.

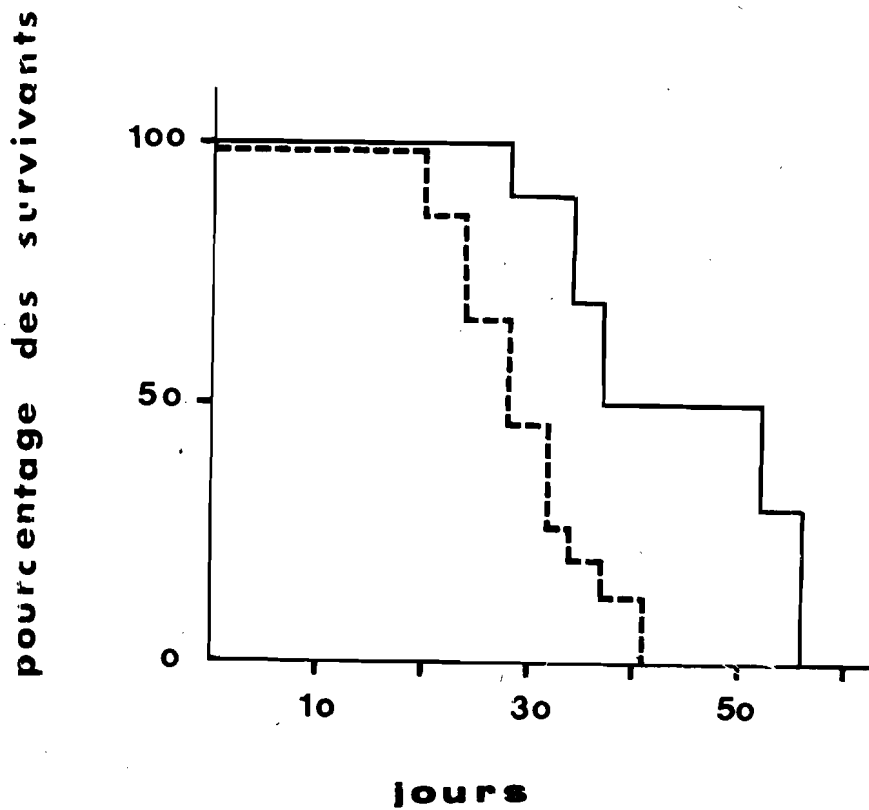


FIGURE 2 :

Effet du traitement avec la fraction *Alva* (voie i.t.) sur la longévité des souris C3H porteuses de la tumeur *McpC3H-5* $p < 0,001$.

— animaux traités

- - - animaux témoins

Les animaux traités ont reçu 2 injections de 2,5 mg de la fraction *Alva* (voie i.t.) espacées de 7 jours.

— en abscisse : nombre de jours après transplantation de la tumeur.

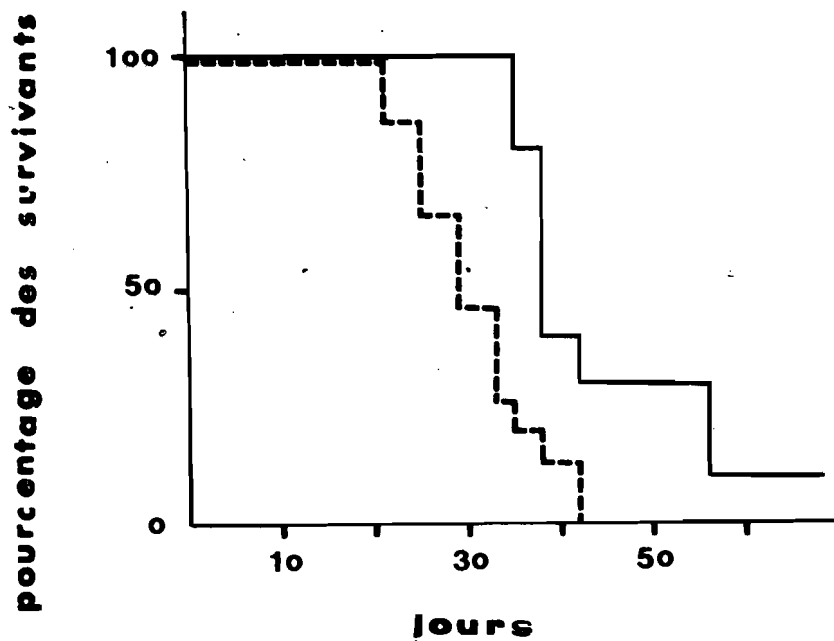


FIGURE 3 :

Effet du traitement avec le *Corynebacterium parvum* (voie i.t.) sur la longévité des souris porteuses de tumeur *McpC3H-5*, $p < 0,001$.

- animaux traités par *C. parvum*
- - animaux témoins

- Le lot traité a reçu 2 injections de *C. parvum* (voie i.t.) espacées d'une semaine.

- en abscisse : nombre de jours après transplantation de la tumeur.

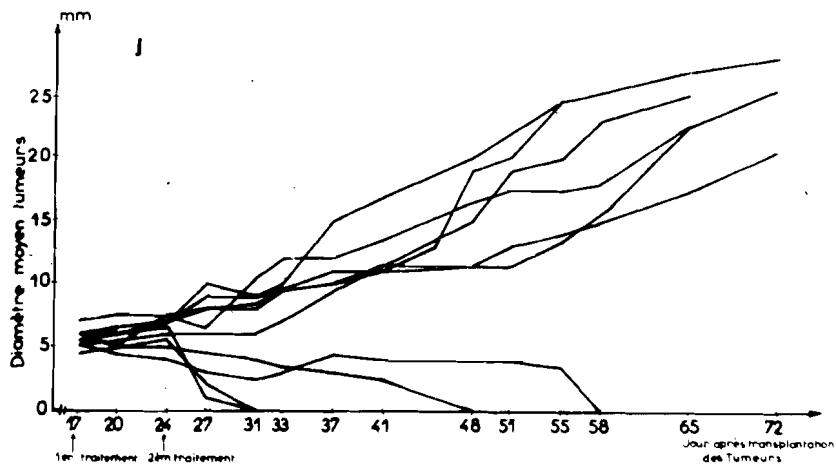
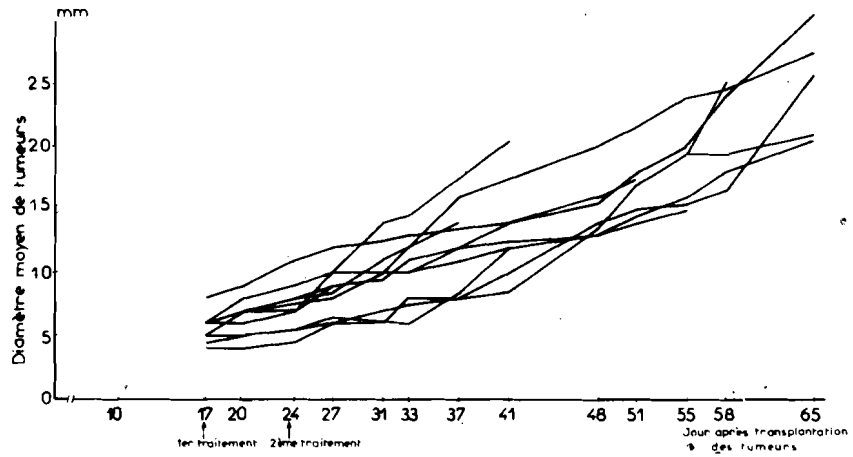


FIGURE 4 :

Croissance de la tumeur *McC3-1* des souris traitées par la fraction *Alva* (voie s.c.) et des souris témoins.

- *i* = Courbe de croissance de la tumeur dans le lot de 10 souris témoins.
- *j* = Courbe de croissance de la tumeur chez les souris traitées par 2,5 mg de la fraction *Alva* (voie s.c). Les souris ont reçu deux traitements à 7 jours d'intervalle.

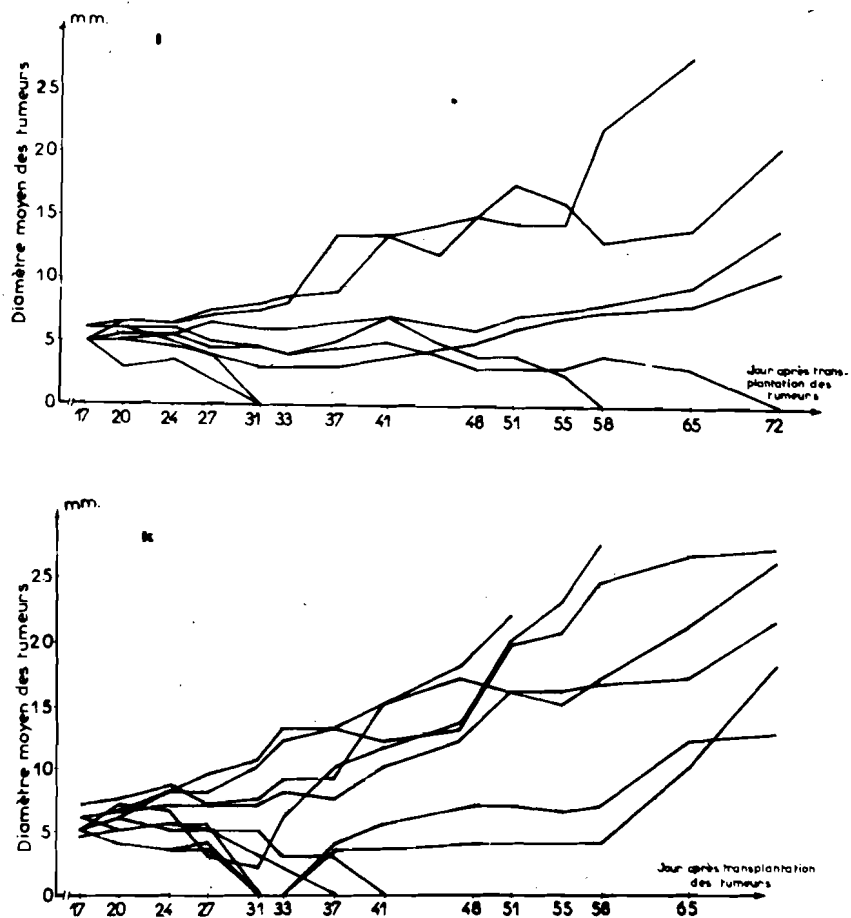


FIGURE 5

Croissance de la tumeur *McC3-1* des souris traitées par de la fraction *Alva* (voie i.t.)

- k - Un lot de souris C3H est traité par deux injections de 2,5 mg de la fraction *Alva* espacées de 7 jours (voie i.t.),
- l - un deuxième lot de souris a reçu 10 mg de la fraction *Alva* par la même voie.

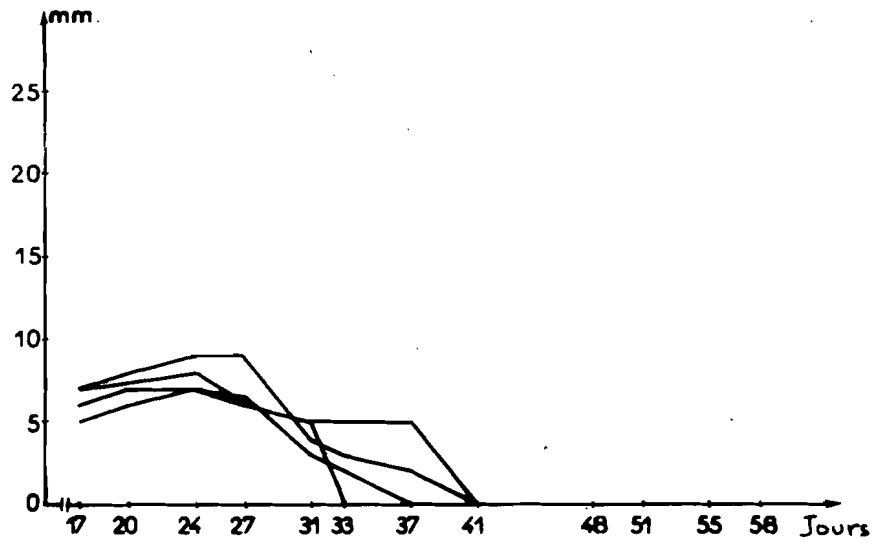


FIGURE 6 :

Croissance de la tumeur *McC3-1* des souris traitées avec le *Corynebacterium parvum*.

- en abscisse : nombre de jours après transplantation de la tumeur *McC3-1*.
- en ordonnée : diamètre moyen des tumeurs (mm).

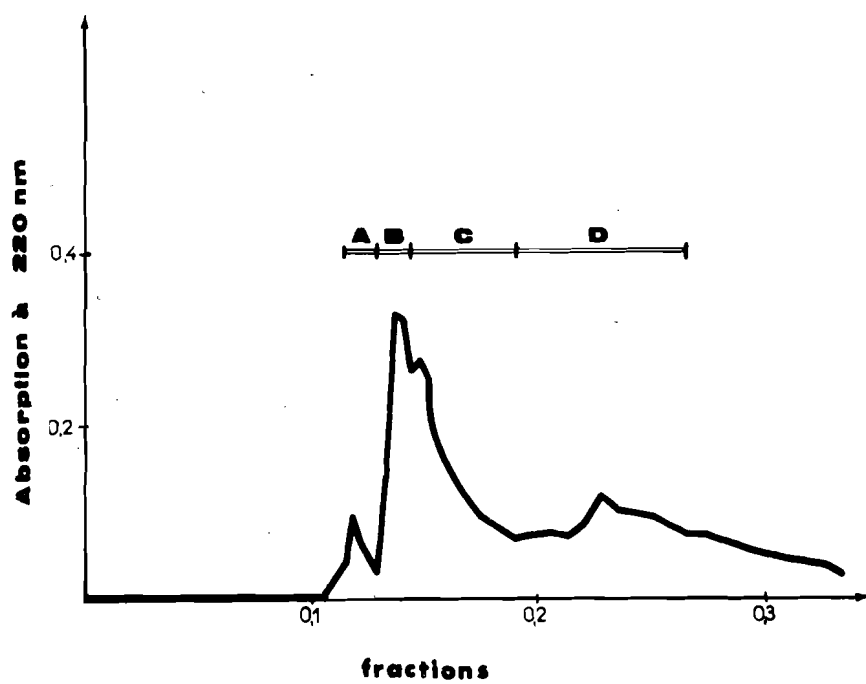


FIGURE 7 :

Profil d'éluion de la fraction *Alva* après filtration sur *Ultrogel Aca 54*.

Les conditions expérimentales sont détaillées au paragraphe II.4.1.

FRONT

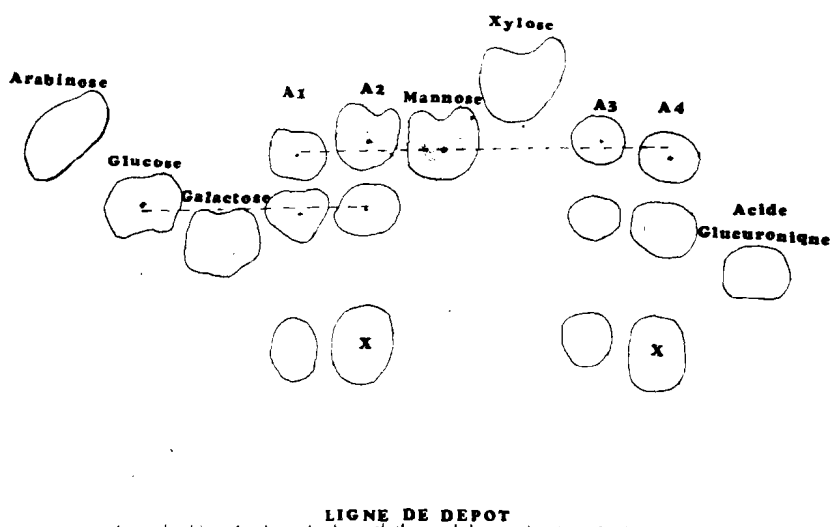


FIGURE 8 :

Chromatographie sur papier de l'hydrolysât correspondant à la fraction immunostimulante.

La chromatographie est effectuée après hydrolyse acide par H_2SO_4 (3N) à $100^\circ C$ pendant 4 heures (paragraphe II.) sur papier Whatman n°3

Les fractions testées sont :

- A_1 et A_2 : fraction F_1 purifiée par filtration sur Sephadex G_{50} . A_2 correspond à un dépôt équivalent au double du matériel A_1 .
- A_4 correspond au double du matériel déposé en A_3 et représente la première fraction élue après chromatographie sur DEAE cellulose. Les sucres témoins utilisés sont : l'arabinose, le glucose, le mannose, le xylose et l'acide glucuronique.

La tache X n'a pas été identifiée

Le front du solvant a migré à 38 cm

Macrophage en diapédèse

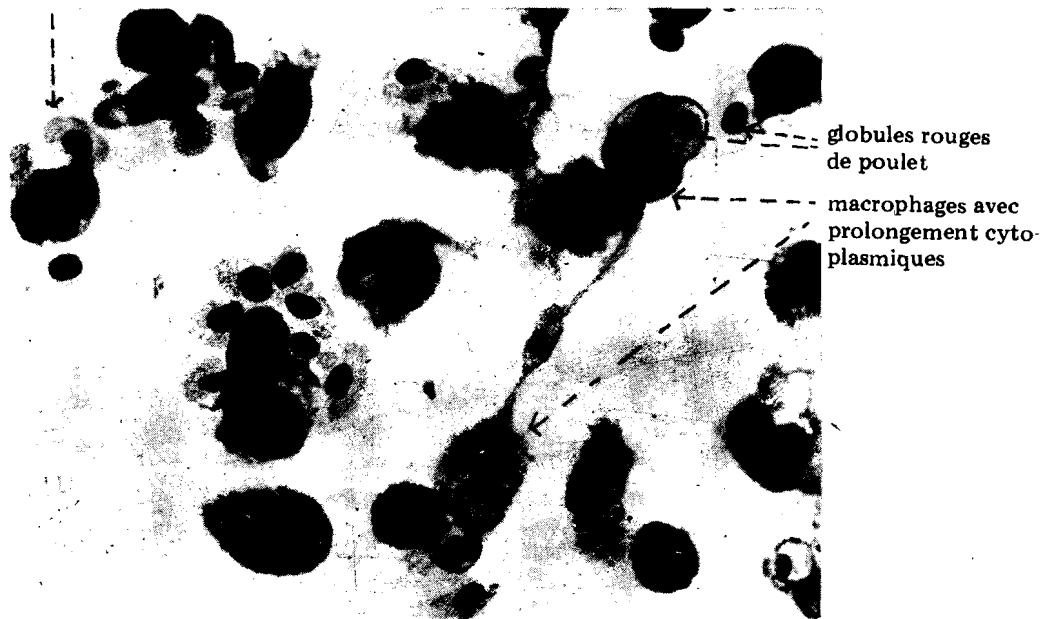


PHOTO 1 :

Phagocytose des globules rouges de poulet par les macrophages péritonéaux de souris.

Les macrophages sont stimulés in vitro par la fraction Alva.

RESUME

Une fraction immunomodulatrice (*Alva*) extraite d'une plante endémique du Sud de Madagascar, l'*Aloe vahombe*, protège significativement les souris contre des infections bactériennes, parasitaires ou fongiques. Nous avons voulu vérifier si la fraction *Alva* possédait une activité anti-tumorale et nous avons étudié son effet sur le développement de fibrosarcomes expérimentaux, et d'un mélanome de souris, par injections intraveineuse, sous cutanée ou infratumorale de la fraction immunostimulante.

Nous n'avons observé des guérisons que dans les cas de la tumeur McC3-1, mais il est encourageant de noter que dans différentes conditions expérimentales, la vitesse de croissance des tumeurs des animaux traités est plus lente que celle des animaux témoins.

La fraction *Alva* est une substance hydrosoluble, thermostable, de poids moléculaire supérieur à 30 000, de nature polysaccharidique. Les sucres prédominants sont le glucose et le mannose dans le rapport 3 : 1.

Des études préliminaires sur le mode d'action semblent indiquer que la fraction *Alva* agit sur la stimulation de la réponse non spécifique et stimule l'activité phagocytaire des macrophages péritonéaux de souris.

SUMMARY

An immuno-modulator fraction (*Alva*) extracted from an endemic plant, in the south of Madagascar, the *Aloe vahombe*, significantly protects mice against bacterial, parasitic and fungal infections. Wishing to verify whether the fraction *Alva* was active in tumour reduction, we studied its effect on the development of experimental fibrosarcoma and melanoma in mice by intravenous and intracutaneous injections and injections directly into the tumour of the immunostimulant fraction.

We have observed cures, only in the case of the McC3-1 tumour but it is encouraging to note that under different experimental conditions the rate of growth of tumours in animals which were treated is slower than in those not treated.

The *Alva* fraction is a substance which is hydrosoluble, thermostable, having a molecular weight exceeding 30 000 and is a polysaccharide. The predominant sugars are glucose and mannose in 3 : 1 ratio.

Preliminary studies of its action seem to indicate that the *Alva* fraction acts upon non-specific response and could possibly stimulate the phagocyte activity of the peritoneal macrophagus.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) SOLAR (S.), ZELLER (H.), RASOLOFONIRINA (N.), COULANGES (P.), RALAMBORANTO (L.), ANDRIANTSIMAHAVANDY (A.A.), RAKOTOVAO (L.H.), et LE DEAUT (J.Y.), 1980. — Mise en évidence et étude des propriétés immunostimulantes d'un extrait isolé et partiellement purifié à partir d'*Aloe vahombe*. — *Arch. Inst. Pasteur Madag.*, 47, 1, 9-39.
- (2) BROSSAT (J.Y.), LE DEAUT (J.Y.), RALAMBORANTO (L.), RAKOTOVAO (L.H.), SOLAR (S.), GUEGUEN (A.) et COULANGES (P.), 1981. — Etude des propriétés immunostimulantes d'un extrait isolé à partir d'*Aloe vahombe*. 2. Protection de la souris par la fraction F₁, contre des infections par *Listeria monocytogenes*, *Yersinia pestis*, *Candida albicans* et *Plasmodium berghei*. — *Arch. Inst. Pasteur Madag.*, 48-1, 11-34.
- (3) RABESANDRATANA (R.N.), 1976. — Résultats d'enquêtes et de localisation de plantes médicinales de la région de Tuléar. — *Ann de l'Univ. de Madagascar*, 13, 131-150.
- (4) BOITEAU (P.), 1980. — *Arch. Inst. Pasteur Madag.*, 48, 2, 94-96.
- (5) PREHN (R.T.) et MAIN (J.M.), 1957. — Immunity to methylcholanthrene induced sarcomas. — *J. Nat. Cancer. Inst.*, 18, 769.
- (6) SALOMON (J.C.) et LYNCH (N.), 1976. — Intralesional injection of immunostimulants in rat and mouse tumors. — *Cancer Immunol Immunotherapy*, 1, 145-151.
- (7) GOWDA (D.C.), NEELISIDDAIAH (B.) et ANJANEYALU (Y.V.), 1979. — Structural studies of polysaccharides from *Aloe vera*. — *Carbohydr. Res.*, 72, 201-205.
- (8) CHIHARA (G.), MAEDA (Y.Y.), HAMURO (J.), SASAKI (T.), FUFUQKA (F.) 1969. — Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk). — *Nature (Lond.)*, 222, 687-688.
- (9) MANDAL (G.) et DAS (A.), 1980. — Structure of the D-Galactan isolated from *Aloe barbadensis*. — *Carbohydr. Res.*, 86, 247-257.
- (10) PAULSEN (B.) et coll., 1978. — Structural studies of the Galactonmannan isolated from *Aloe pilsanis* Miller. — *Carbohydr. Res.*, 11, 240-250.
- (11) CHASSOUX (D.) et SALOMON (J.C.), 1975. — Therapeutic effect of intratumoral injection of BCG and other substances in rats and mice. — *Int J Cancer*, 16, 515-525.
- (12) RENOUX (G.) et RENOUX (M.), 1972. — Levamisole inhibits and cures a solid malignant tumour and its pulmonary metastases in mice. — *Nature (New Biol.)*, 240, 217-218.
- (13) MORTON (D.L.), EILBERT (F.R.), MALMGREN (R.A.) and WOOD (W.C.), 1970. — Immunological factors which influence response to immunotherapy in malignant melanoma. — *Surgery*, 68, 158-164.
- (14) ZBAR (B.) and TANAKA (T.), 1971. — Immunotherapy of cancer : regression of tumors after intralesional injection of living *Mycobacterium bovis*. — *Science*, 172, 271-273.
- (15) BALDWIN (R.W.) et PIMM (N.W.), 1971. — Influence of BCG infection on growth of 3-methylcholanthrene induced rat sarcomas. — *Europ. J. Clin. Biol. Res.*, 16, 875-881.

(16)RIBI (R.), RAKAYAMA (K.), MILNER (K.), GRAY (G.R.), GOREN (M.), PARKER (R.), McLAUGHLIN (C.) et KELLY (M.), 1976c. — Regression of tumors by an endotoxin combined with trehalose mycolates of differing structure. — *Cancer Immunol Immunother.*, 265-270.

(17)BORECKY (L.), LADKOVIC (V.), BLASCJIVUC (D.), MARLER (L.) and SIKI (D.), 1967. — An interferon — like substance induced by mannan. *Acta. Virol. (Prague)*, 11, 264-266.

(18)TUTTLE (R.L.) et NORTH (J.R.), 1975. — Mechanisms of antitumor action of *Corynebacterium parvum* : Non specific tumor cell destruction at site of an immunologically mediated sensitivity reaction to *C. parvum* — *J. Natl. Cancer Inst.*, 55, 1403-1411.

(19)ZBAR (B.M.D.), 1972. — Tumor regression mediated by *Mycobacterium bovis* (strain BCG). — *Natl. Cancer Inst.*, 35, 341-344.