

## 37. LES VENINS DE SERPENTS, SOURCE D'ENZYMES ANTICANCÉREUX

### II. ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

C. WIRTHEIMER et L. GILLO

*Laboratoire d'Enzymologie Tumorale, Bruxelles, Belgique*

#### MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Nos recherches ont porté sur des souris porteuses de 10 espèces différentes de tumeurs spontanées ou greffées. Notre choix fut guidé par la facilité d'élevage de ces animaux et la possibilité de disposer facilement de tumeurs variées:

#### TUMEURS SPONTANÉES (1)

Ces tumeurs de nature mammaire apparaissent spontanément entre le 5<sup>e</sup> et le 9<sup>e</sup> mois chez les souris de lignée C<sub>3</sub>H ou R III dans des conditions particulières. Ces souris nous ont été fournies par le Centre Anticancéreux de Villejuif et par le Professeur Rudali de l'Institut Curie de Paris.

Les tumeurs se développent en quelques mois d'une manière irrégulière tout comme les tumeurs humaines et peuvent atteindre un volume énorme correspondant au tiers du poids de l'animal. Les métastases externes sont fréquentes et on observe quelquefois un envahissement des organes internes. Nous n'avons jamais observé de regression spontanée de ces tumeurs.

La nature histologique de cette tumeur est celle d'un adénocarcinome mammaire. Elle est fortement vascularisée, de nature kystique tubulaire pleine ou mixte. Des zones de nécrose ne s'observent que dans les très grosses tumeurs.

#### TUMEURS GREFFÉES

Deux variétés de tumeurs greffées d'origine mammaire nous ont été fournies par les Professeurs Mühlbock d'Amsterdam et Neukomm de Lausanne (2, 3). Elles sont greffées sur des souris C<sub>3</sub>H et Swiss et leur évolution est plus rapide et plus régulière que celle des tumeurs spontanées.

Contrairement aux tumeurs spontanées dont la localisation se fait au hasard au niveau des nombreuses glandes mammaires, on peut choisir une place d'implantation favorable, notamment dans la paroi abdominale latérale.

## TUMEUR KOPROWSKA

Cette tumeur, greffée dans la région abdominale, nous a été fournie par Madame Koprowska de Philadelphie. Il s'agit d'une tumeur d'origine cervicale utérine provoquée par des attouchements au benzopyrène. La tumeur croît d'une manière rapide et possède un caractère histologique stable.

## CARCINOME D'EHRLICH (4, 5)

Ce carcinome a été obtenu à partir d'un adénocarcinome mammaire. Les cellules tumorales isolées, injectées par voie intrapéritonéale développent rapidement un cancer ascitique à évolution aigüe; les mêmes cellules, injectées par voie sous-cutanée, donnent naissance à des tumeurs solides très malignes.

L'évolution des tumeurs malignes fut contrôlée par la mesure régulière de la surface tumorale ou par le poids de la tumeur. Les animaux furent pesés régulièrement et une observation clinique journalière nous permit de juger de l'état de santé des animaux traités et des animaux témoins. Chaque expérience fut contrôlée par l'observation d'un nombre au moins égal d'animaux témoins traités de façon identique par sérum physiologique. Nous avons noté la survie en jours et l'apparition éventuelle des métastases. Dans la plupart des cas, un examen anatomo-pathologique fut pratiqué à la mort de l'animal; il comprenait un examen macroscopique de la tumeur et des principaux organes ainsi qu'un examen histologique complet.

Nous avons utilisé, pour le traitement des animaux, un extrait stable de venin de Cobra (*Naja naja atra* et *Naja melanoleuca*). La solution est préparée à partir d'une poudre obtenue par lyophilisation du venin frais, dans une solution isotonique de chlorure de sodium. Ce venin est injecté en général à des doses variant entre  $\frac{1}{4}$  de gamma à 1 gamma. La voie utilisée pour le traitement dépend de la nature de la tumeur:

Les tumeurs solides sont traitées par des injections intratumorales de venin, tous les deux jours, à la dose de 1 gamma en général. Dans certains cas particulièrement résistants, la dose de 5 gamma a été utilisée. Enfin, dans une autre variété de tumeur solide, le carcinome d'Ehrlich, la voir intrapéritonéales a été essayée.

Les tumeurs ascitiques ont été traitées classiquement par des injections intrapéritonéales à partir du 3<sup>e</sup> jour qui a suivi la greffe et pendant 6 jours.

Dans le cas du carcinome ascitique d'Ehrlich, nous avons utilisé une méthode consistant à traiter par le venin les cellules cancéreuses *in vitro* avant leur injection aux animaux, en concentrant l'action de faibles doses dans un petit volume. Ce test, s'effectue de la manière suivante: on prélève des cellules cancéreuses d'Ehrlich sur un animal porteur d'ascite. On compte ces cellules et on fait incubé, à 37° durant 3 heures, 1.000.000 de ces cellules en suspension dans le sérum physiologique. On les injecte ensuite par voie intrapéritonéale à des souris.

Le test d'activité du venin est réalisé dans les mêmes conditions, les cellules étant incubées au contact de 1 gamma de venin.

## RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX ET DISCUSSION

*Tumeurs mammaires spontanées*

Pour la facilité de l'expérience, nous avons réparti ces tumeurs en trois classes suivant leur grandeur:

- inférieures à 150 mm<sup>2</sup>;
- comprises entre 150 et 350 mm<sup>2</sup>;
- supérieures à 350 mm<sup>2</sup>.

Les résultats obtenus sont repris dans le tableau ci-dessous.

	Surface tumorale		Poids		Survie	
	Témoins (%)	Traités (%)	Témoins (%)	Traités (%)	Témoins (jours)	Traités (jours)
<i>Classe I</i>						
NM 0,5 $\gamma$	+ 177	+ 31	- 2	0	24	20
NM 1 $\gamma$	+ 177	- 63	- 2	- 6	24	32
NNA 1 $\gamma$	+ 177	+ 35	- 2	+ 3	24	20
<i>Classe I sans métastases</i>						
NM 0,5 $\gamma$	+ 177	- 13	- 2	+ 10	24	20
NM 1 $\gamma$	+ 177	- 63	- 2	- 6	24	32
NNA 1 $\gamma$	+ 177	- 12	- 2	+ 3	24	20
<i>Classe I</i>						
Tumeurs 100 mm <sup>2</sup>	+ 151	- 51				
Tumeurs entre 100 et 150 mm <sup>2</sup>	+ 223	+ 29				
<i>Résultats réunis</i>						
Sans métastases	+ 177	- 17	- 2	0	24	24
Avec métastases	+ 177	+ 6	- 2	0	24	23
<i>Classe II</i>						
NM 0,5 et 1 $\gamma$	+ 62	+ 5	- 6	0	23	24
NNA 1 $\gamma$	+ 62	+ 15	- 6	0	23	20
<i>Classe III</i>						
NM 1 $\gamma$	+ 15	- 52	- 12	- 11	16	17
NNA 1 $\gamma$	+ 15	- 13	- 12	- 13	16	17
Classe II + III	+ 47	- 27	- 7	0	21	21
Classe I + II + III	+ 84	- 20	- 4	- 4	23	22

Par un souci de rigueur, afin de ne pas fausser les statistiques, tous les animaux observés ont été considérés dans ce tableau, même ceux qui ont succombé prématurément et subitement, par choc à la suite d'une injection de venin ou de sérum physiologique.

Ce tableau analyse, en moyennes arithmétiques des valeurs relatives l'évolution des surfaces tumorales, des poids et de la survie.

Il apparaît clairement que les tumeurs des animaux témoins se sont développées d'une manière impressionnante, atteignant le triple de la surface primitive. Quant à la plupart des animaux traités, ils montrent un ralentissement net de la croissance, un arrêt, une régression et parfois même une disparition de la tumeur.

La surface tumorale, dans la classe I, des témoins augmente uniformément de près de 177%. Chez les animaux traités, cette surface tumorale subit une régression allant jusque — 63% (1 gamma de venin de *Naja melanoleuca*).

L'augmentation de la surface, des tumeurs dans la classe II des animaux témoins, est moins nette (+ 62%), les tumeurs étant déjà plus grosses à l'origine. Les animaux traités subissent un arrêt total de croissance.

Les tumeurs, dans la classe III, déjà considérables à l'origine ne croissent guère (+ 15%). Malgré cela, le traitement fait apparaître une nette régression allant jusque — 52%.

De l'examen des trois classes réunies, on peut conclure que les venins de Cobra ont une action freinatrice et régressive (— 20%, témoins + 84%).

On n'observe pas d'action bien particulière du venin sur l'évolution du poids et la survie par rapport aux témoins. Il faut remarquer à ce sujet que nous avons injecté du venin total et qu'il faut tenir compte de sa toxicité.

L'inhibition et la régression des tumeurs sous l'influence du traitement par le venin total de Cobra est confirmée par l'examen anatomopathologique. Ces examens des coupes des traitées montrent que les zones malignes sont progressivement étouffées par des tissus fibronécrotiques. Les cellules cancéreuses sont dispersées mais encore parfaitement reconnaissables. Une telle image ne s'observe qu'exceptionnellement dans les petites tumeurs témoins. Dans un certain nombre de cas, le tissu cancéreux a complètement disparu. Il est remplacé par du tissu fibronécrotique ou par du tissu inflammatoire. Les modifications des caractères histologiques que nous venons de décrire et qui correspondent à une disparition progressive du tissu cancéreux se retrouvent dans 80% des tumeurs traitées.

### *Tumeurs greffées solides*

Nous avons étudié 3 tumeurs solides dont deux adénocarcinomes et un épithélioma.

Ce dernier s'est révélé insensible à l'action du venin de Cobra. D'ailleurs tous les auteurs anciens avaient fait la même remarque au sujet des tumeurs provoquées par le goudron.

Dans l'adénocarcinome Gaspari, les animaux témoins et traités ont tous été sacrifiés après trois semaines d'observation ce qui correspond au temps d'évolution naturel de la tumeur témoin. Les tumeurs ont été disséquées et pesées. Le tableau témoigne que les poids moyens des tumeurs des animaux traités ne sont que la moitié du poids des tumeurs témoins. Cette action s'est révélée statistiquement significative après analyse de la variance.

Dans le cas de l'adénocarcinome Mühlbock les tumeurs, ont été traitées par des doses de 1 à gammas de venin total de *Naja naja atra*. A la dose de 1 gamma, aucun effect significatif n'apparaît alors qu'à la dose de 5 gammas une activité se manifeste, statistiquement significative, aussi bien si l'on prend pour critère l'évolution de la surface tumorale que si l'on se base sur le poids de la tumeur.

Le traitement des tumeurs solides d'Ehrlich s'est fait par voie intratumorale et intrapéritonéale à la dose de 1 gamma. Les rapports des moyennes des surfaces tumorales en fin d'expérience sont de 512/316 par voie intratumorale et 512/400 par voie intrapéritonéale. Si l'on prend comme critère le poids des tumeurs, le rapports sont respectivement de 12,1/6,7 et 12,1/7,6. L'analyse de la variance a confirmé l'action freinatrice du venin sur ces tumeurs.

Les tumeurs ascitiques d'Ehrlich ont été provoquées par inoculation intrapéritonéale de 1.000.000 de cellules ascitiques d'Ehrlich à des souris Swiss. Trois jours après l'inoculation, on a injecté 1 à 5 gammas de venin total en répétant cette opération pendant 6 jours. A la dose de 1 gamma, aucune action statistiquement significative n'est apparue et à la dose de 5 gammas, la moitié des animaux a succombé. Dans ce cas également, l'action sur l'ensemble des animaux est peu nette, mais nous avons été cependant frappés par le fait que certains animaux ont survécu jusqu'à 37 jours alors que les témoins n'ont pas dépassé 21 jours.

Dans le test *in vitro*, après l'injection des cellules ascitiques d'Ehrlich, tous les animaux développent de l'ascite à partir du 8<sup>ème</sup> jour et succombent au 20<sup>ème</sup> jour. Contrairement les animaux injectés avec les cellules ascitiques d'Ehrlich incubées au contact avec 1 gamma de venin, ne font jamais d'ascite.

Nous avons vérifié la validité de ce nouveau test en l'appliquant à un chimiothérapeutique anticancéreux bien connu et bien étudié: l'Actinomycine D, inhibiteur du RNA messenger. A la dose de 0,5 gamma, l'Actinomycine D, tout comme 0,5 gamma de *Naja naja atra*, supprime complètement *in vitro* la possibilité d'apparition de l'ascite. Il est intéressant de remarquer que le venin total de *Naja naja atra* est moins toxique que l'Actinomycine D alors qu'il agit à la même dose.

Nous avons appliqué notre test *in vitro* à l'étude de l'action des deux principales substances toxiques du venin de Cobra: la cobratoxine qui nous avait été fournie par le Professeur Yang et la lysolécithinase, isolée par nous.

A des doses croissantes allant jusqu'aux doses sublétales, aucune action anticancéreuse ne fut observée.

La question qui se pose ensuite est de savoir ce que deviennent les cellules d'Ehrlich après l'action du venin total. Nos premières expériences semblent montrer qu'elles ne sont pas simplement détruites comme on pourrait le supposer mais qu'elles restent vivantes et l'examen microscopique révèle qu'elles conservent leurs caractères morphologiques normaux. Leur nombre n'a pas diminué ainsi qu'en témoigne le comptage. Ce travail est actuellement en cours dans notre laboratoire et fera l'objet de la suite de nos recherches dans ce domaine.

#### SUMMARY

Ten different types of spontaneous or grafted tumors of the Mouse are treated by Cobra venom.

The product is injected by intratumoral and sometimes by intraperitoneal routes, particularly in the case of solid tumors.

Ascitic abdominal tumors are treated by intraperitoneal route. The mammary spontaneous tumors, treated in this way, regress about 20% whereas the tumors of the control group grow 177%.

The anatomopathological examination confirms that there is a resolving action on the cancerous cell due to a fibronecrosis process.

All the solid carcinomas that we studied showed a statistically significant inhibition of their growth.

Isolated Ehrlich's cancerous cells, after treatment with *Naja naja atra* venom failed to produce ascitis when injected in mice. This action of the Cobra venom can be compared to that of Actinomycin D at an equal dose.

The toxic components of the venom (Cobratoxin, lecithinase) showed no activity on the Ehrlich's cell.

#### BIBLIOGRAPHIE

1. DOBROVOLSKAIA, Z., *C. R. Soc., Biol.*, **126**, 287, 1937.
2. MÜHLBOCK, et BOOT, *Cancer Res.*, **19**, 402, 1959.
3. NEUKOMM, S., PEGUIRON, L., et HERVE, A., *Action de la cystéamine sur les tumeurs greffées irradiés in loco — Problèmes de cancérologie contemporaine*, Lausanne, 1961, p. 663.
4. EHRLICH, *Z. Arztl. Forbild.*, **3**, 205, 1906.
5. SEGLER, K., *Cancer Res.*, **22**, 1278, 1962.