

Recherche biologique

Introduction

La recherche fondamentale liée à l'activité des médicaments homéopathiques et aux doses ultra-faibles emprunte simultanément les chemins de la biologie, des biomathématiques, ainsi que de la physique.

Cette branche de la recherche se donne pour but de démontrer l'activité pharmacologique ou physique de substances hautement diluées et de tenter d'en expliquer le mécanisme d'action. Elle est directement confrontée au problème de l'infinitésimalité, véritable pierre d'achoppement de la méthode homéopathique. Dans les plus hautes dilutions, il n'y a en effet plus de molécules provenant de la substance de base. Ceci laisse à penser que ces dilutions sont inactives (d'où la réduction de l'efficacité de l'homéopathie à un simple effet placebo) ou qu'il existe un fait inconnu dans les conceptions scientifiques actuelles.

Confrontés à une problématique de cette envergure, certains des chercheurs dont les travaux sont présentés en pages suivantes ont construit leur protocole de manière à présenter en premier lieu des résultats obtenus en dilutions dites "basses" (5 CH par exemple), puis d'autres obtenus progressivement avec des dilutions plus élevées (30 CH par exemple, soit la plus haute dilution délivrable pour un médicament homéopathique en France).

L'ensemble de ces travaux souligne aujourd'hui l'intérêt majeur de cinq thèmes de recherche :

- Études conduites en allerge-immunologie.
- Études sur l'aspirine à doses ultra-faibles.
- Études sur une série de molécules intervenant sur des cellules cancéreuses.
- Études de physiopathologie portant sur des dilutions d'arsenic.
- Études de thermoluminescence.

Les quatre premiers ne cessent d'être confirmés par de nombreuses publications.

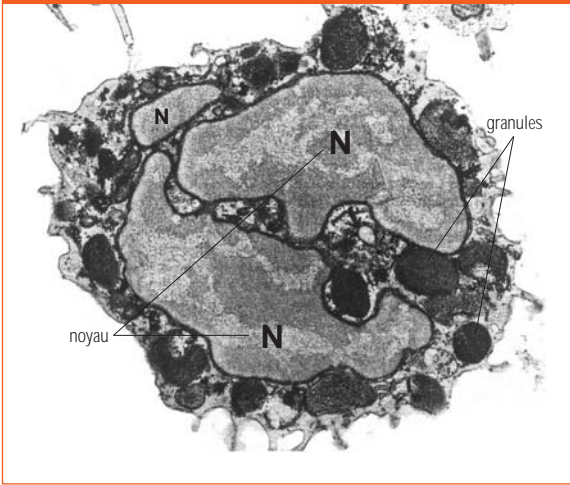
Le cinquième est nouveau dans l'édition de cet ouvrage.

Activité de dilutions d'histamine sur la dégranulation des basophiles

Les basophiles sont des cellules sanguines polynucléaires caractérisées par leurs granules cytoplasmiques contenant de nombreux médiateurs préformés, dont l'histamine, et ayant une affinité pour les colorants basiques [voir figure 28]. Outre leur implication dans la réaction d'hypersensibilité immédiate, le rôle pro-inflammatoire majeur des basophiles est aujourd'hui clairement démontré.

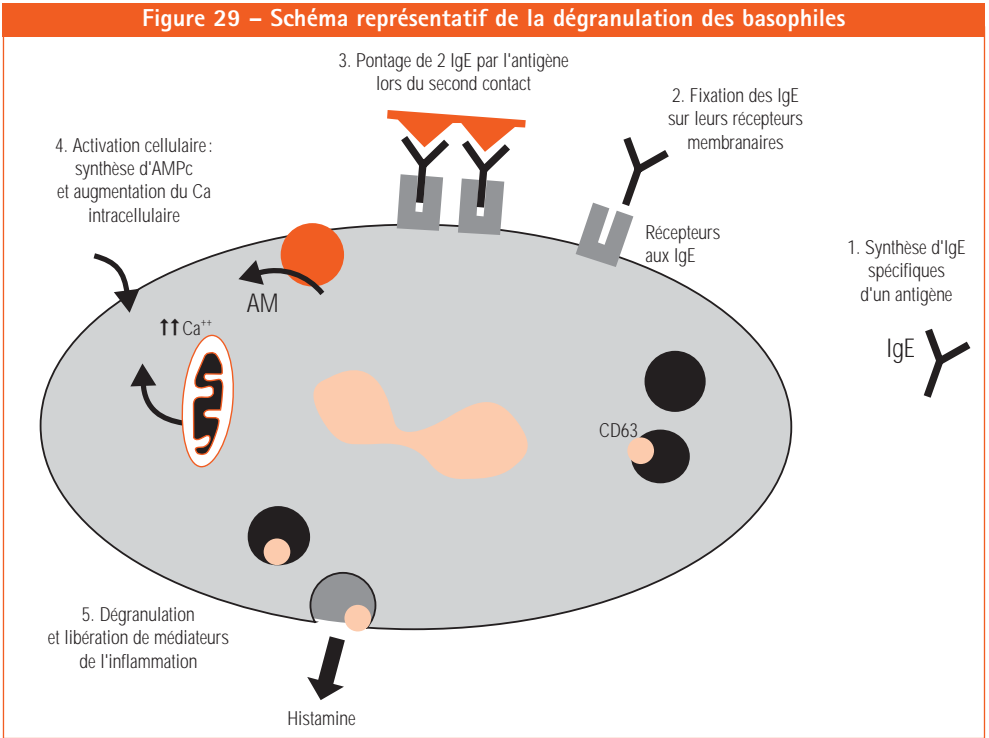
Figure 28 – Basophile

Photographié au microscope électronique. Le noyau est composé de plusieurs lobes ; des granules fortement colorés sont présents dans le cytoplasme



L'hypersensibilité immédiate est une réaction normale de défense de l'organisme, devenant pathologique lorsque ses mécanismes de régulation sont dépassés. Elle est médiée par les immunoglobulines E, anticorps de faible concentration qui ont une haute affinité pour des récepteurs présents sur la membrane plasmique de nombreuses cellules parmi lesquelles les éosinophiles, les cellules de Langerhans, les mastocytes et les basophiles.

Les principales étapes de l'activation de basophiles sont les suivantes [voir figure 29]:



1. Des IgE spécifiques sont synthétisées à la suite d'un premier contact avec l'antigène.
2. Grâce à leur haute affinité, elles se fixent aux récepteurs présents sur la membrane des basophiles.
3. Lors du second contact avec le même antigène, celui-ci peut se lier à plusieurs molécules d'IgE fixées sur leurs récepteurs.
4. L'agrégation des récepteurs induit leur modification structurale et l'activation des basophiles via une cascade de médiateurs intracellulaires: synthèse d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), augmentation de la concentration en calcium dans le cytosol.
5. Il en résulte une migration des granules et la fusion avec la membrane plasmique. Cette dégranulation conduit à la libération des médiateurs initialement présents dans les granules (en particulier l'histamine). L'activation cellulaire induit également la synthèse de médiateurs néo-formés (comme les peptido-leucotriènes).

La réaction d'hypersensibilité immédiate est soumise, *in vivo*, à des mécanismes de régulation très complexes. Citons le rétro-contrôle négatif de la libération de l'histamine induit par elle-même et par de nombreux agonistes via les récepteurs H₂ présents sur la membrane du basophile.

L'intérêt de l'étude des basophiles est multiple :

- Il s'agit d'un matériel d'origine humaine, relativement facile à obtenir par simple prélèvement sanguin. Il est aujourd'hui admis que la réactivité *in vitro* du basophile est un bon reflet du status immunitaire de l'allergique.
- Ce modèle expérimental est très reproductible et permet de réaliser un grand nombre d'expériences.
- Il rend possible l'investigation des principes de l'homéopathie. L'infinitésimal peut être facilement abordé en mettant les cellules en contact avec des souches homéopathiques diluées à volonté. La similitude peut être étudiée en utilisant des souches correspondant aux allergènes responsables de l'hypersensibilité ou aux médiateurs de l'allergie.

L'activation des basophiles peut être étudiée expérimentalement à l'aide de plusieurs techniques ; trois d'entre elles ont été utilisées dans les études présentées ici :

1. Le dosage de l'histamine libérée dans le milieu extracellulaire (nous parlerons du test d'histaminolibération).
2. La coloration : lorsqu'ils sont activés, les basophiles perdent leur affinité pour les colorants basiques, du type bleu de toluidine ou bleu alcian (nous parlerons de test de dégranulation des basophiles).
3. L'expression de marqueurs membranaires : l'exocytose des granules s'accompagne de l'augmentation de l'expression de marqueurs (comme le CD63, initialement présent à l'intérieur des granules et quasi absent de la membrane du basophile au repos).

Nous parlerons de test d'activation des basophiles.

Depuis maintenant plus de vingt ans, une, puis plusieurs équipes de chercheurs étudient l'action de dilutions infinitésimales d'histamine sur la dégranulation des basophiles. De nombreux résultats ont été obtenus ; les principales données issues des études publiées sont présentées ici.

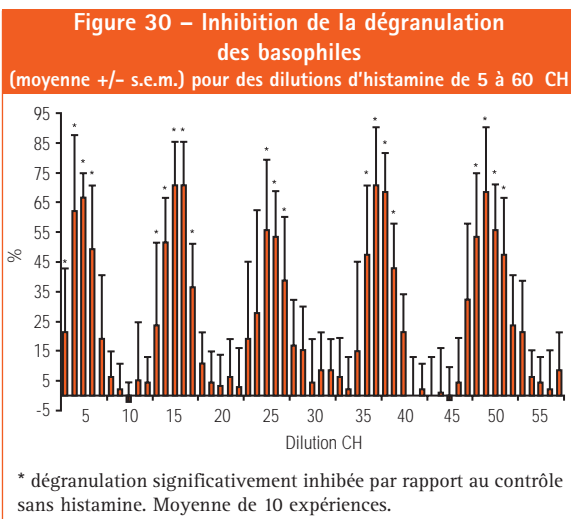
Effet de dilutions d'histamine sur le test de dégranulation des basophiles

Méthodes

Des basophiles humains, isolés à partir de prélèvements sanguins, sont passivement sensibilisés à un allergène donné (ici l'acarien *Dermatophagoïdes pteronyssinus*) par incubation en présence de plasma riche en IgE spécifiques prélevé chez des sujets allergiques aux acariens. Les cellules sont ensuite incubées en présence des dilutions d'histamine à étudier. La dégranulation est induite par addition d'une concentration optimale de l'allergène dans le milieu réactionnel. Les basophiles sont finalement colorés par le bleu alcian; seules les cellules n'ayant pas réagi à l'allergène se colorent puisque les granules des cellules activées ont perdu leur affinité tinctoriale. Le pourcentage de basophiles activés est calculé par rapport à un témoin sans allergène; le pourcentage d'inhibition par comparaison de deux tests de dégranulation avec ou sans dilution d'histamine.

Résultats

Une gamme très large de dilutions d'histamine est étudiée (5 à 60 CH). Il apparaît que certaines d'entre elles réduisent significativement la dégranulation des basophiles alors que d'autres sont inefficaces [voir figure 30]³. Cet effet est spécifique puisqu'il n'est pas retrouvé avec des dilutions d'histidine, chimiquement proche de l'histamine mais ne possédant pas ses propriétés pharmacologiques⁹. Ces données confirment des résultats préliminaires similaires¹; leur régularité lors de la reproduction en grandes séries a permis une modélisation mathématique de cet effet².



Confirmation de l'effet de dilutions d'histamine sur le test de dégranulation par une étude multicentrique

Méthodes

L'activation des basophiles peut être provoquée par l'allergène spécifique, comme pour les expériences précédentes, mais peut également être induite par des stimuli non spécifiques tels que des anticorps anti-IgE. Cette technique présente l'avantage de ne pas nécessiter de phase de sensibilisation passive.

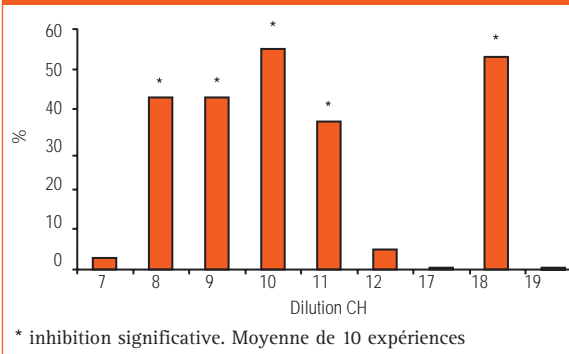
Ces études ont été conduites en deux étapes :

1. Vérification de l'activité biologique inhibitrice des dilutions d'histamine sur la dégranulation des basophiles induite par un anti-IgE [voir figure 31]⁴.
2. Réalisation d'une étude européenne multicentrique: cette étude avait pour but de confirmer la reproductibilité de l'effet observé dans différents laboratoires avec plusieurs expérimentateurs. Ceci paraît particulièrement intéressant dans le cas de l'étude des dilutions homéopathiques dont l'effet reste encore très controversé. Les tests sont réalisés, en aveugle, dans quatre laboratoires différents.

Le contrôle de l'étude ainsi que la préparation des dilutions sont effectués dans un cinquième laboratoire. Enfin, l'analyse statistique est réalisée par un statisticien indépendant. Des dilutions d'histamine (15, 16, 17, 18 et 19 CH) sont étudiées comparativement aux dilutions correspondantes d'eau distillée.

Figure 31 – Inhibition de la dégranulation des basophiles

(moyenne) induite par des anti-IgE et mesurée par coloration.
Action des dilutions d'histamine de 7 à 19 CH



Résultats

Sur l'ensemble des données recueillies par les quatre laboratoires (3906 mesures!), les dilutions d'histamine inhibent significativement la dégranulation des basophiles par rapport à un témoin H₂O ($p \leq 0,0001$).

Cette étude multicentrique menée en aveugle confirme les résultats du premier laboratoire^{8, 10}.

Confirmation par des techniques différentes

Test d'activation des basophiles (expression du CD63)

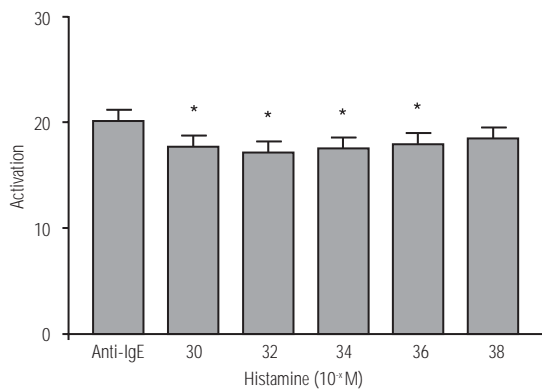
Méthodes

Une méthode automatisée a été mise au point au début des années 1990, fondée sur l'analyse par cytométrie* en flux⁷. Le rapport de cellules exprimant le CD63 dans les lots contrôles et traités permet de calculer le pourcentage d'inhibition de l'activation.

Résultats

L'étude de l'inhibition de l'activation des basophiles par des dilutions d'histamine montre que cette inhibition est significative pour les dilutions allant de 15 à 18 CH (moyenne de 36 expériences)⁵ [voir figure 32].

Figure 32 – Pourcentage d'activation des basophiles après incubation avec l'anti-IgE et en absence ou en présence de différentes dilutions d'histamine (les chiffres se rapportent aux concentrations molaires théoriques)

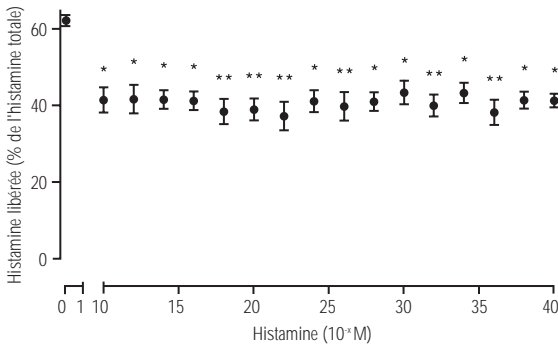


Les données représentent la moyenne de 36 expériences réalisées trois fois chacune. L'activation des basophiles a été déterminée par la mesure du pourcentage de cellules exprimant le CD63 en cytométrie de flux. Toutes les dilutions testées, à l'exception de 10⁻³⁸ M, sont significativement différentes du contrôle d'après le test de Wilcoxon ($p < 0,01$)

Test d'histamino-libération

Un dosage de l'histamine libérée après dégranulation des basophiles est réalisé dans le milieu extra-cellulaire. Ceci a permis de confirmer, par une troisième technique, que des dilutions d'histamine diminuaient l'activation des basophiles [voir figure 33]¹⁰.

Figure 33 – Effet sur le relargage de l'histamine de pré-incubation avec des dilutions d'histamine



Les résultats représentent la moyenne +/- s.e.m. de 14 expériences. La concentration en anti-IgE était de 0,2 µg/ml. Pour chaque dilution d'histamine, il existait une différence significative par rapport au contrôle selon le test de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,001$). Une autre analyse par le test de comparaisons multiples de Dunn montre une différence significative par rapport au contrôle de toutes les dilutions testées ($10^{-10} - 10^{-40}$ M) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$)

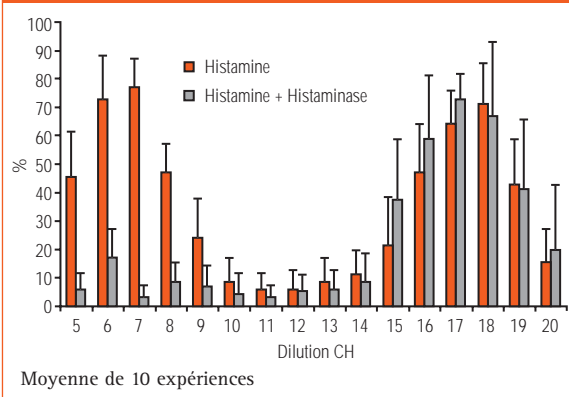
Modulations de l'action de l'histamine

A l'aide des différentes techniques décrites ci-dessus, il a été possible d'étudier la modulation pharmacologique des dilutions d'histamine.

Action de l'histaminase

L'histaminase est une enzyme susceptible de lyser l'histamine. La technique de coloration des basophiles a permis de montrer que l'histaminase, à concentration pharmacologique, inhibe l'action de l'histamine à forte concentration (5 à 8 CH) mais pas celle des hautes dilutions d'histamine [voir figure 34]³.

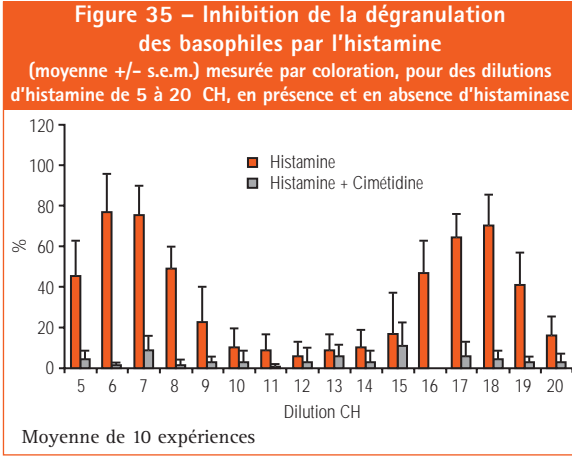
Figure 34 - Inhibition de la dégranulation des basophiles
(moyenne +/- s.e.m.) mesurée par coloration, pour des dilutions d'histamine de 5 à 20 CH, en présence et en absence de cimétidine



Action d'antagonistes des récepteurs H₂ à l'histamine

a) par test de dégranulation des basophiles

A concentration pharmacologique, l'histamine exerce un rétrocontrôle, sur sa propre libération, via les récepteurs H₂. Des études réalisées par coloration des basophiles [voir figure 35]³.



b) par test d'activation des basophiles

Des résultats similaires ont été obtenus pour les hautes dilutions puisque leur action est en partie inhibée par un antagoniste H₂, la cimétidine [voir figure 36]⁶,
- par un laboratoire avec la cimétidine ;
- par un autre laboratoire avec la cimétidine et la ranitidine [voir tableau 7].

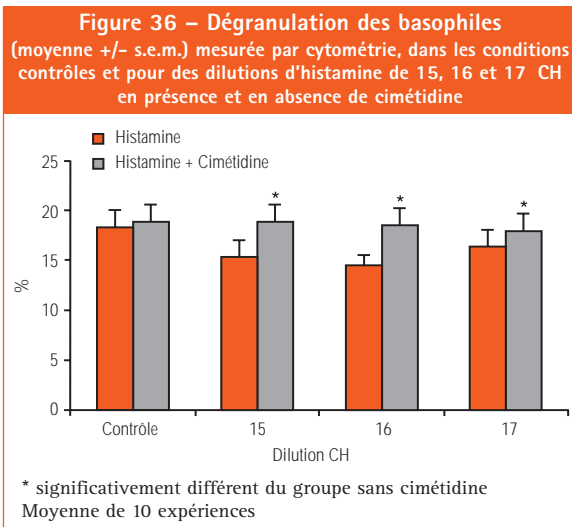


Tableau 7 – Comparaison du pourcentage de dégranulation en présence et en absence de dilutions d'histamine (moyenne +/- s.e.m.) pour un nombre de mesures n dans les 4 laboratoires. La dégranulation est induite par 0,04 µg/ml d'anti-IgE

	Tous contrôles	Toutes dilutions d'histamine
Laboratoire 1 (n=54)	46,2 ± 0,96	34,1 ± 2,5 *
Laboratoire 2 (n=156)	50,3 ± 0,82	47,8 ± 2,42
Laboratoire 3 (n=93)	51,3 ± 0,94	47,3 ± 1,46 *
Laboratoire 4 (n=75)	46,4 ± 1,29	37,4 ± 2,14 *

* significativement différent du contrôle correspondant

Bibliographie

(par ordre chronologique)

- 1 – Sainte-Laudy J., Belon P., Halpern G., Homeopathy. Effect of histaminum on “in vitro” basophil degranulation, *Abstract of XI ICACI*, London, 1982; 338 p.
- 2 – Cherruault Y., Guillez A., Sainte-Laudy J., Belon P., Étude mathématique et statistique des effets de dilutions successives de chlorhydrate d’histamine sur la réactivité des basophiles humains, *Bio-sciences*, 1989; 7: 63-72.
- 3 – Sainte-Laudy J., Sambucy J.L., Belon P., Biological activity of ultra low doses: I / Effects of ultra low doses of histamine on human basophil degranulation triggered by D. pteronissinus extract, In *Ultra Low Doses*, Taylor & Francis Ltd., 1991; 127-138.
- 4 – Sainte-Laudy J., Belon P., Inhibition of human basophils activation by high dilutions of histamine, *Agents Actions*, 1993; 38: C245-7.
- 5 – Sainte-Laudy J., Belon P., Analysis of immunosuppressive activity of serial dilutions of histamine on human basophil activation by flow cytometry, *Inflammation Research*, 1996; 45: S33-S34.
- 6 – Sainte-Laudy J., Belon P., Application of flow cytometry to the analysis of the immunosuppressive effects of histamine dilutions on human basophil activation: effects of cimetidine, *Inflammation Research*, 1997; 46: S27-S28.
- 7 – Sainte-Laudy J., Sabbah A., Vallon C., Guerin J.-C., Analysis of anti-IgE and allergen induced human basophil activation by flow cytometry, Comparison with histamine release, *Inflammation Research*, 1998; 47 (10): 401-8.
- 8 – Belon P., Cumps J., Ennis M., Mannaioni P.F., Sainte-Laudy J., Roberfroid M. et Wiegant F.A.C., Inhibition of human basophil degranulation by successive histamine dilutions: results of a european multicentre trial, *Inflammation Research*, 1999; 48: S17-S18.
- 9 – Sainte-Laudy J., Modulation of allergen and anti-IgE induced human basophil activation by serial histamine dilutions, *Inflammation Research*, 2000; 49: S5-S6.
- 10 – Belon P., Cumps J., Ennis M., Mannaioni P.F., Roberfroid M., Sainte-Laudy J., Wiegant F.A.C., Histamine dilutions modulate basophil activation, *Inflammation Research*, 2004; 53: 001-08.

Activité de l'acide acétylsalicylique à doses ultra-faibles

Depuis 1985, l'équipe de Christian Doutremepuich, professeur d'hématologie à la faculté de pharmacie de Bordeaux, étudie l'action de l'acide acétylsalicylique (aspirine) sur les plaquettes sanguines, les cellules pariétales vasculaires et leurs interactions.

L'acide acétylsalicylique agit en transférant son radical acétyl- à un acide aminé du site actif d'une enzyme: la cyclo-oxygénase. Cette dernière est ainsi rendue non fonctionnelle. Ce phénomène est irréversible; on le qualifie d'inhibition non compétitive. Les propriétés pharmacologiques (la plupart des effets secondaires inclus) de l'aspirine sont liés à l'inhibition de la synthèse d'eïcosanoïdes par la cyclo-oxygénase.

A forte dose (1 g), l'aspirine est utilisée pour ses propriétés anti-inflammatoires et anti-pyrétiques. A faible dose (50 mg), son action anti-thrombotique et anti-agrégant plaquettaire est prédominante.

La question posée par cette équipe a été d'identifier l'éventuelle activité de l'aspirine à très faible dose en utilisant des dilutions homéopathiques moyennes et hautes (5 et 15 CH). Plus de quinze années de recherche sur ce thème ont été couronnées par de nombreuses publications dans des revues scientifiques internationales dont les principaux résultats sont résumés ici.

Étude préliminaire in vivo chez l'homme^{1, 2, 3}

Méthodes

Dix volontaires sains reçoivent successivement trois traitements différents à 8 jours d'intervalle :

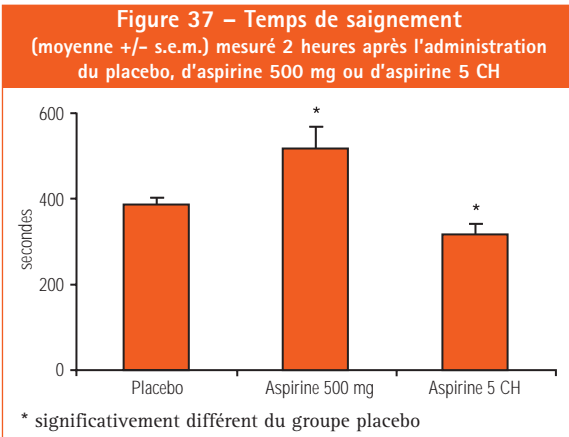
- aspirine 500 mg,
- aspirine 5 CH,
- placebo.

Leur temps de saignement est mesuré 2, 4 et 6 heures après l'administration.

Résultats

L'aspirine à dose pondérale augmente le temps de saignement, l'aspirine 5 CH le diminue, dans les deux cas, de façon significative par rapport au placebo [voir figure 37].

Ces données sont en accord avec la littérature en ce qui concerne l'effet de l'aspirine 500 mg (effet anti-agrégant plaquettaire). En revanche, les résultats concernant l'aspirine 5 CH sont les premiers à démontrer un effet de cette substance à une dose si faible. Ils nécessitent une confirmation par une seconde étude réalisée avec toutes les précautions d'usage destinées à éliminer les biais méthodologiques possibles.



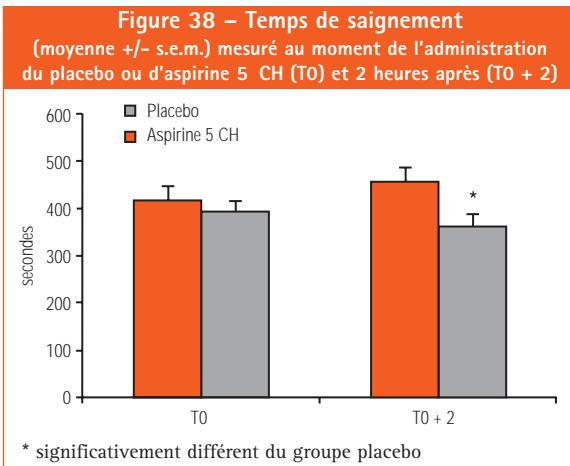
Étude randomisée en double aveugle contre placebo⁴

Méthodes

Vingt volontaires sains de sexe masculin sont traités de façon aléatoire par de l'aspirine 5 CH ou par un placebo. Leur temps de saignement est mesuré, dans les conditions contrôle puis 2, 4 et 6 heures après le traitement.

Résultats

Les résultats obtenus confirment ceux de l'étude précédente puisque le temps de saignement est significativement diminué deux heures après traitement par l'aspirine 5 CH [voir figure 38]. Il est possible de montrer, de façon reproductible, que l'aspirine à dose ultra-faible diminue le temps de saignement. Afin de déterminer les mécanismes responsables de cette activité, diverses études *in vitro*, permettant une analyse plus fine de la fonction plaquettaire, ont été réalisées⁶.



Mécanisme d'action de l'aspirine à dose ultra-faible⁵

Divers facteurs d'origine vasculaire sont susceptibles d'influencer l'agrégation plaquettaire. Afin de déterminer si l'aspirine 5 CH agit via certains de ces médiateurs, une étude *in vitro* est réalisée.

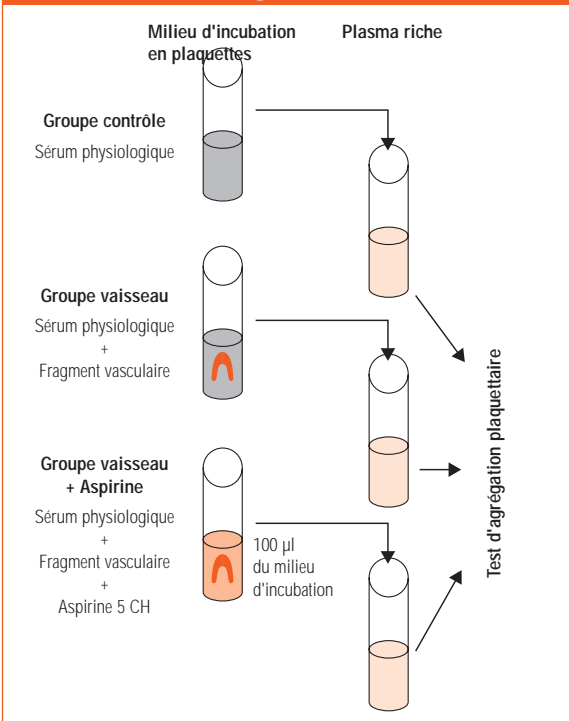
Méthodes

Le modèle expérimental consiste à incuber 10 minutes à 37 °C les trois préparations suivantes :

- sérum physiologique (groupe contrôle),
- un fragment vasculaire humain dans du sérum physiologique (groupe vaisseau),
- une préparation identique à la précédente en présence d'aspirine 5 CH (groupe vaisseau + aspirine 5 CH).

100 µl de ces milieux d'incubation sont ajoutés à un échantillon de plasma riche en plaquettes dont on étudie l'agrégation (amplitude et vitesse) [voir figure 39].

Figure 39 – Schéma du protocole d'évaluation de l'activité des dilutions d'aspirine en présence d'un fragment veineux



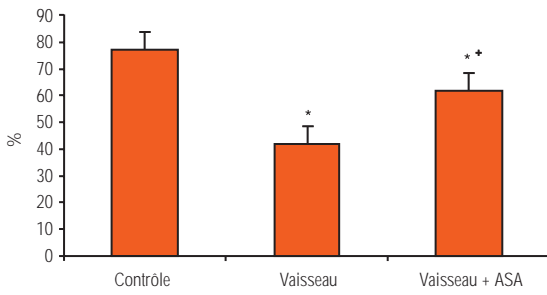
Résultats

Cette étude met en évidence [voir figure 40] :

- une diminution de l'agrégation plaquettaire en présence du vaisseau,
- une inhibition partielle de cet effet en présence d'aspirine 5 CH.

Ainsi, les vaisseaux libèrent des substances qui modifient l'agrégation plaquettaire. L'aspirine, à dose ultra-faible, semble moduler la sécrétion de ces substances pour rétablir l'agrégation plaquettaire.

Figure 40 - Amplitude de l'agrégation plaquettaire (moyenne +/- s.e.m.) mesurée en présence d'un échantillon du milieu d'incubation contrôlé, contenant un vaisseau ou un vaisseau et de l'aspirine 5 CH (ASA)



* significativement différent du groupe contrôle,
+ significativement différent du groupe vaisseau

Nature des substances responsables de l'effet vasculaire de l'aspirine 5 CH⁷

Méthodes

Afin d'étudier les mécanismes responsables de l'action de l'aspirine 5 CH sur la paroi vasculaire, un dosage de la prostacycline est réalisé dans les milieux d'incubation précédemment décrits.

Résultats

Il est ainsi montré que seuls certains vaisseaux ont une production basale de prostacycline élevée: concentration dans le milieu d'incubation en 6-keto-PGF_{1α} (métabolite stable de la prostacycline) supérieure à 200 pg/100 μl. Dans ces conditions seulement, l'aspirine 5 CH inhibe la libération de prostacycline par le vaisseau [voir figure 41] et rétablit l'agrégation plaquettaire [voir figure 42].

Ces résultats permettent de conclure que la paroi vasculaire libère de la prostacycline ayant pour action biologique une diminution de l'agrégation plaquettaire. L'aspirine 5 CH diminue la quantité de prostacycline pariétale libérée et rétablit ainsi l'agrégation plaquettaire. Cette action n'est observée que lorsque la libération de prostacycline par les vaisseaux est suffisante.

Figure 41 - Concentration en 6-keto-PGF_{1α} (métabolite stable de la prostacycline)

(moyenne +/- s.e.m.) dans le milieu d'incubation avec le vaisseau ou avec vaisseau + aspirine 5 CH (ASA) exprimée en % du contrôle. Séparation de deux sous-populations pour lesquelles la concentration en 6-keto-PGF_{1α} dans le groupe vaisseau est inférieure ou supérieure à 200 pg/100 μl

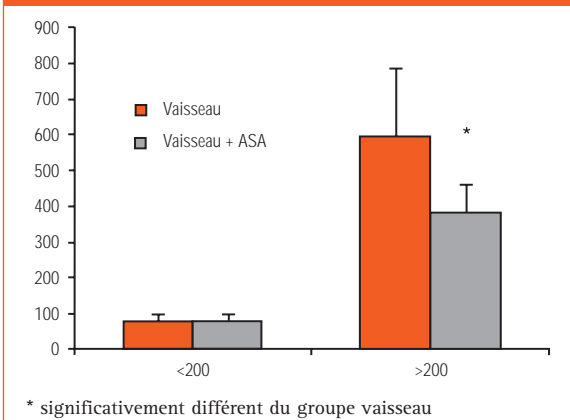
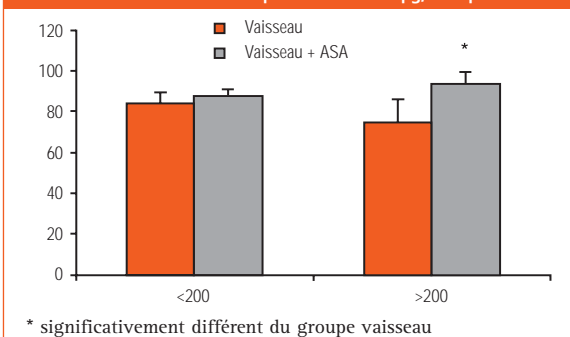


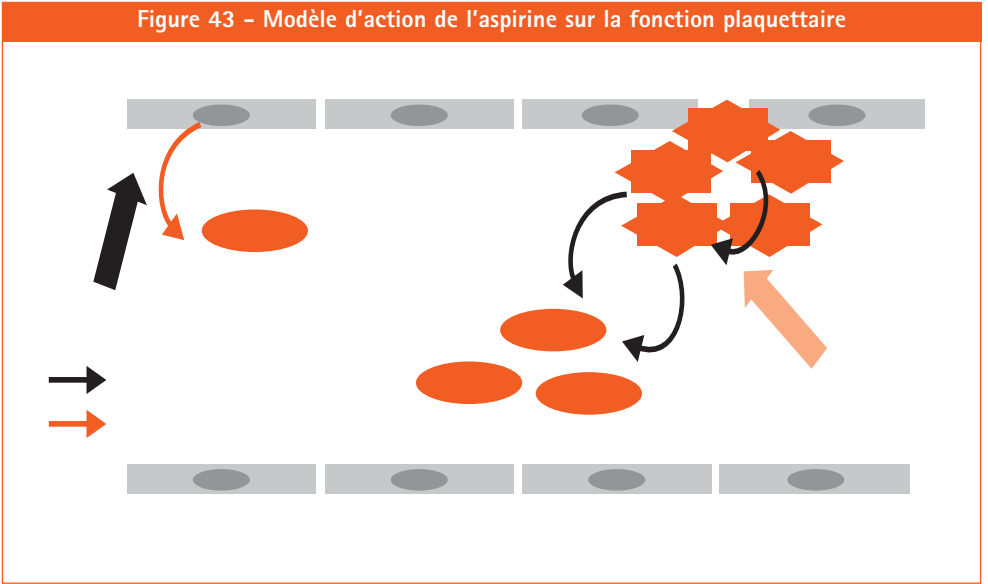
Figure 42 - Amplitude de l'agrégation plaquettaire

(moyenne +/- s.e.m.) exprimée en % par rapport au groupe contrôle. Séparation des sous-populations pour lesquelles la concentration en 6-keto-PGF_{1α} dans le groupe vaisseau est inférieure ou supérieure à 200 pg/100 μl



L'aspirine à forte et ultra-faible doses semble donc agir *via* un système commun : les prostaglandines, mais pas au niveau du même type cellulaire (les plaquettes à forte dose, la paroi vasculaire à dose ultra-faible) [voir figure 43].

Figure 43 – Modèle d'action de l'aspirine sur la fonction plaquettaire



Expérimentation *in vivo* chez le rat

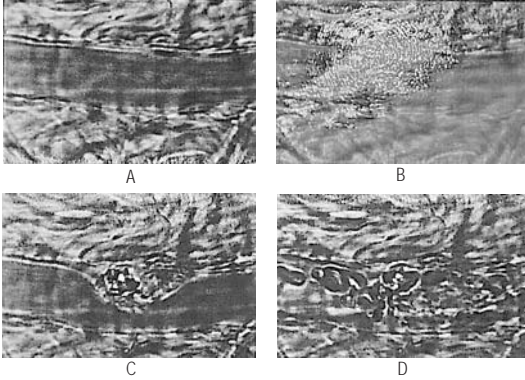
Méthodes

Afin d'explorer plus finement les mécanismes d'action de l'aspirine à très faible dose sur la fonction plaquettaire *in vivo*, un nouveau modèle a été développé⁸. Il consiste à provoquer, à l'aide d'un faisceau laser, des micro-lésions à l'intima de vaisseaux mésentériques (artériole ou veinule) chez un rat anesthésié. Ces lésions entraînent la formation d'agrégats plaquettaire en quelques secondes [voir figure 44]. La présence de ce thrombus s'accompagne de l'émission d'embolus pendant quelques minutes. L'utilisation d'un système d'enregistrement vidéo automatique, relié à un microscope, permet la mesure de nombreux paramètres caractéristiques :

- le nombre de tirs laser nécessaires à l'induction du thrombus,
- la surface et la durée du thrombus,
- la durée d'embolisation et le nombre d'embolus émis.

Chez ces mêmes animaux, il est également possible de mesurer le temps de saignement, l'amplitude et la vélocité de l'agrégation plaquettaire.

Figure 44 – Photographie d'une artériole mésentérique vue au microscope lors de l'induction de la thrombose par le faisceau laser



- A. Avant l'application du faisceau laser,
- B. Pendant le tir laser (1/30^e de seconde),
- C. 3 secondes après le tir laser, formation du thrombus au niveau de la lésion artériolaire,
- D. 30 secondes après le tir, le thrombus occupe pratiquement toute la lumière.

L'administration de différentes doses d'aspirine avant l'induction du thrombus permet d'évaluer leur action sur l'agrégation plaquettaire *in vivo*^{9, 10}. Différents groupes expérimentaux ont été étudiés :

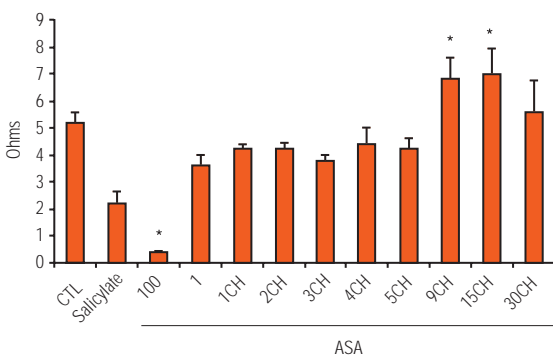
- groupe contrôle (CTL) traité au sérum physiologique,
- groupe salicylate : traité au salicylate 100 mg/kg,
- groupes ASA : traités à l'aspirine aux doses, en mg/kg, de 100, 1, 10⁻² (1 CH), 10⁻⁴ (2 CH), 10⁻⁶ (3 CH), 10⁻⁸ (4 CH), 10⁻¹⁰ (5 CH), 10⁻¹⁸ (9 CH), 10⁻³⁰ (15 CH), 10⁻⁶⁰ (30 CH).

Résultats

On observe un effet opposé de l'aspirine à forte et à ultra-faible doses sur la plupart des paramètres mesurés : vélocité et amplitude [voir figure 45] de l'agrégation plaquettaire, durée d'embolisation et nombre d'emboles [voir figure 46]. En revanche, le temps de saignement est augmenté par la forte dose mais pas significativement modifié par les dilutions [voir figure 47].

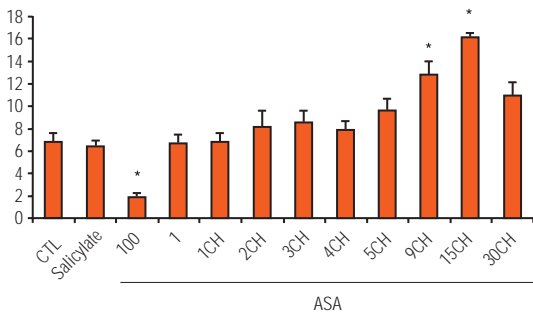
L'aspirine 100 mg/kg présente donc des propriétés anti-agrégantes et anti-thrombotiques alors que l'aspirine hautement diluée (9, 15 et 30 CH) est pro-agrégante et pro-thrombotique.

Figure 45 – Amplitude de l'agrégation plaquettaire (moyenne) mesurée dans les conditions contrôles (CTL), après traitement au salicylate (Salicylate 100 mg/kg) ou à l'aspirine (ASA) 100 et 1 mg/kg, 1, 2, 3, 4, 5, 9, 15 et 30 CH



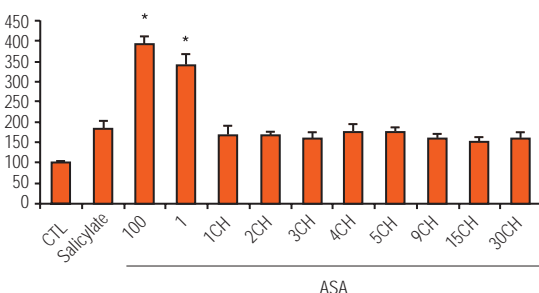
* significativement différent du groupe contrôle

Figure 46 – Nombre d'emboles (moyenne) mesuré suite à l'induction d'une thrombose artérielle, dans les conditions contrôles (CTL), après traitement au salicylate (Salicylate 100 mg/kg) ou à l'aspirine (ASA) 100 et 1 mg/kg, 1, 2, 3, 4, 5, 9, 15 et 30 CH



* significativement différent du groupe contrôle

Figure 47 – Temps de saignement (moyenne) mesurée dans les conditions contrôles (CTL), après traitement au salicylate (Salicylate 100 mg/kg) ou à l'aspirine (ASA) 100 et 1 mg/kg, 1, 2, 3, 4, 5, 9, 15 et 30 CH



* significativement différent du groupe contrôle

Étude de l'action de l'aspirine plusieurs jours après son administration¹¹

Méthodes

Le modèle de thrombose induite par faisceau laser est utilisé pour évaluer la fonction plaquettaire pendant 16 jours après administration de 100 mg/kg d'aspirine à des rats.

Résultats

2 jours après l'administration de l'aspirine, on observe l'effet anti-thrombotique classique comme en témoigne la diminution de la durée d'embolisation [voir figure 48] et du nombre d'emboles [voir figure 49].

De 4 à 6 jours après son administration, plus aucun effet n'est observé sur ces paramètres. En revanche, 8 à 10 jours après son administration, l'effet inverse de celui initialement mesuré est mis en évidence: augmentation de la durée d'embolisation [voir figure 48] et du nombre d'emboles [voir figure 49].

Cette action est semblable à celle observée dans l'étude précédente lors d'une administration d'aspirine hautement diluée. L'effet pro-thrombotique de l'aspirine, plusieurs jours après son administration, pourrait expliquer les phénomènes thrombo-emboliques observés chez des patients à l'arrêt du traitement par l'aspirine.

Figure 48 – Durée d'embolisation

(moyenne +/- s.e.m.) mesurée dans des conditions contrôles (CTL) et 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 et 16 jours (respectivement J2, J4, J6, J8, J10, J12, J14 et J16) après administration de 100 mg/kg d'aspirine

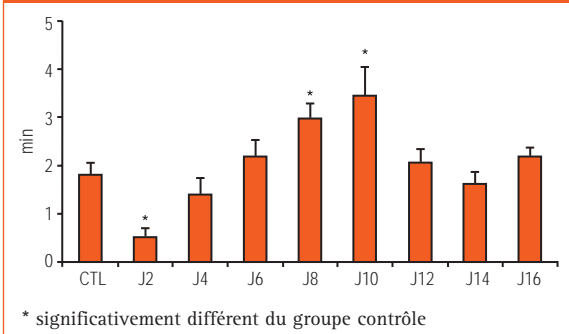
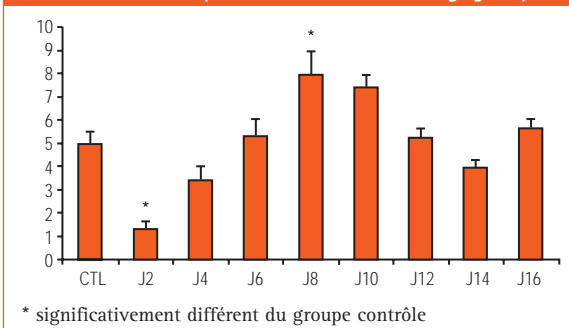


Figure 49 – Nombre d'emboles

(moyenne +/- s.e.m.) mesuré dans des conditions contrôles (CTL) et 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 et 16 jours (respectivement J2, J4, J6, J8, J10, J12, J14 et J16) après administration de 100 mg/kg d'aspirine



Effet de l'administration répétée d'aspirine à forte dose¹³

Méthodes

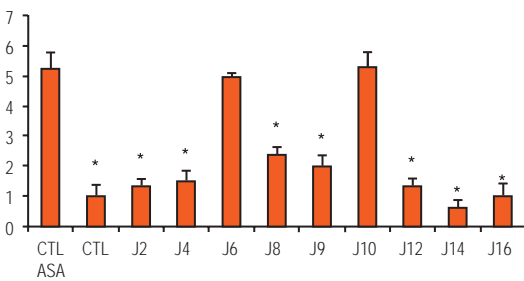
100 mg/kg d'aspirine sont administrés à des rats à J0. Une seconde administration est réalisée 30 minutes avant l'induction de la thrombose (par la méthode de laser précédemment décrite) à J0+2, +4, +6, +8, +9, +10, +14 et +16 jours. Deux groupes contrôles sont réalisés : un traité au sérum physiologique (CTL), l'autre traité une seule fois à l'aspirine 30 minutes avant l'induction de la thrombose (CTL ASA).

Résultats

L'effet de l'administration de deux doses fortes, successives, d'aspirine est variable selon l'intervalle de temps qui les sépare. Un effet anti-thrombotique (diminution du nombre d'emboles [voir figure 50]) et anti-agrégant plaquettaire (augmentation du temps de saignement [voir figure 51] et diminution de l'amplitude de l'agrégation [voir figure 52]) est observé après une prise unique d'aspirine ou deux prises à 2 jours d'intervalle.

Figure 50 – Nombre d'emboles

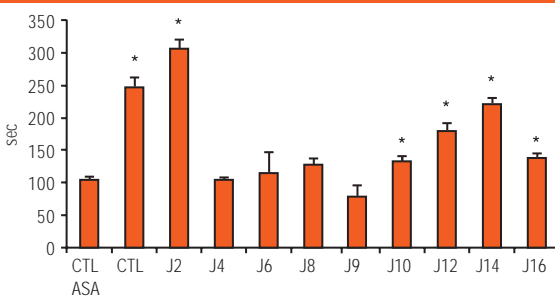
(moyenne) mesuré 30 minutes après la dernière administration, dans des groupes d'animaux contrôles traités au sérum physiologique (CTL), traités par une dose unique d'aspirine 100 mg/kg (CTL ASA) et par deux doses d'aspirine 100 mg/kg à 2, 4, 6, 8, 9, 10, 12, 14 et 16 jours d'intervalle (respectivement J2, J4, J6, J8, J9, J10, J12, J14 et J16)



* significativement différent du groupe contrôle

Figure 51 – Temps de saignement

(moyenne) mesuré 30 minutes après la dernière administration, dans des groupes d'animaux contrôles traités au sérum physiologique (CTL), traités par une dose unique d'aspirine 100 mg/kg (CTL ASA) et par deux doses d'aspirine 100 mg/kg à 2, 4, 6, 8, 9, 10, 12, 14 et 16 jours d'intervalle (respectivement J2, J4, J6, J8, J9, J10, J12, J14 et J16)

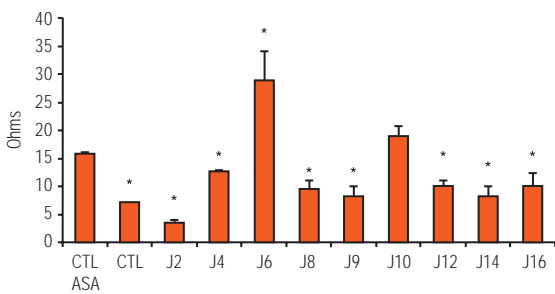


* significativement différent du groupe contrôle

En revanche, lorsqu'un délai plus long est observé entre les deux prises, certains effets de l'aspirine ne sont plus mis en évidence. Particulièrement avec 6 et 10 jours d'intervalle entre les deux prises, on n'observe ni diminution du nombre d'emboles [voir figure 50] ni enfin diminution de l'amplitude de l'agrégation plaquettaire [voir figure 52]. Le temps de saignement reste inchangé si la seconde administration est réalisée entre J4 et J9 [voir figure 51].

Tout se passe comme si l'action pro-thrombotique rémanente de la première administration (mise en évidence dans l'étude précédente) inhibait l'action de la seconde. Ces données présentent un intérêt majeur dans le suivi des traitements anti-agrégants plaquettaire utilisant des prises régulières d'aspirine.

Figure 52 – Amplitude de l'agrégation plaquettaire (moyenne) mesurée 30 minutes après la dernière administration, dans des groupes d'animaux contrôles traités au sérum physiologique (CTL), traités par une dose unique d'aspirine 100 mg/kg (CTL ASA) et par deux doses d'aspirine 100 mg/kg à 2, 4, 6, 8, 9, 10, 12, 14 et 16 jours d'intervalle (respectivement J2, J4, J6, J8, J9, J10, J12, J14 et J16)



* significativement différent du groupe contrôle

Neutralisation de l'effet de deux doses d'aspirine¹²

Méthodes

Utilisant la technique de thrombose induite par laser, cette étude a pour objectif d'évaluer l'effet de deux doses différentes cumulées d'aspirine.

4 groupes expérimentaux sont étudiés :

- un groupe contrôle (CTL) traité au sérum physiologique,
- un groupe traité par de l'aspirine 15 CH (ASA 15 CH),
- un groupe traité par de l'aspirine 100 mg/kg (ASA 100),
- un groupe traité par de l'aspirine 100 mg/kg et de l'aspirine 15 CH (ASA 100 + 15 CH).

Dans tous les cas, une thrombose est induite après le traitement et les paramètres classiquement étudiés sont enregistrés.

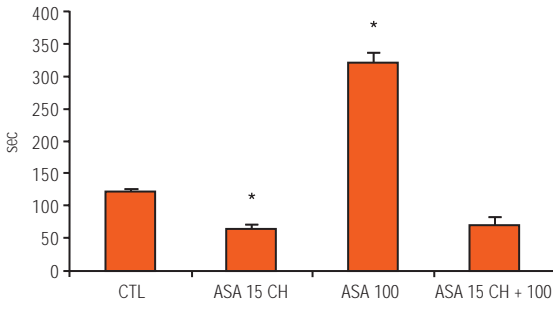
Résultats

On retrouve dans cette étude l'action anti-agrégante (augmentation du temps de saignement [voir figure 53] et diminution de l'agrégation plaquettaire [voir figure 54]), anti-thrombotique (diminution du nombre d'emboles [voir figure 55]) de l'aspirine à forte dose. De la même façon, on retrouve l'effet en miroir de l'aspirine 15 CH.

Il est très intéressant de noter que les effets de l'aspirine à dose pondérale sont totalement inhibés lorsque l'aspirine 15 CH est administrée en même temps. Pour la plupart des paramètres mesurés, l'action de l'association aspirine 100 mg/kg et aspirine 15 CH ne diffère pas de celle du contrôle. Cependant, la concentration plasmatique de l'aspirine dans le groupe ASA 100 + 15 CH (0,23 +/- 0,05 $\mu\text{mol/l}$) n'est pas statistiquement différent de celle du groupe ASA 100 (0,28 +/- 0,1 $\mu\text{mol/l}$).

Figure 53 – Temps de saignement

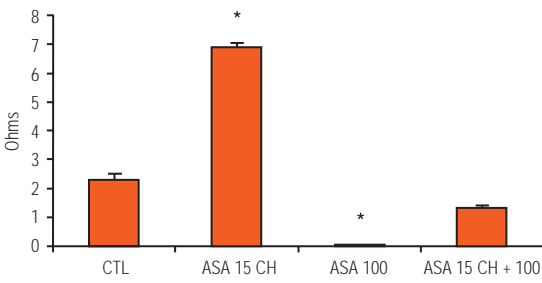
(moyenne +/- s.e.m.) mesuré dans les groupes contrôle (CTL), traités par l'aspirine 15 CH (ASA 15 CH), l'aspirine 100 mg/kg (ASA 100) et ces deux doses ensemble (ASA 15 CH + 100)



* significativement différent du groupe contrôle

Figure 54 – Amplitude de l'agrégation plaquettaire

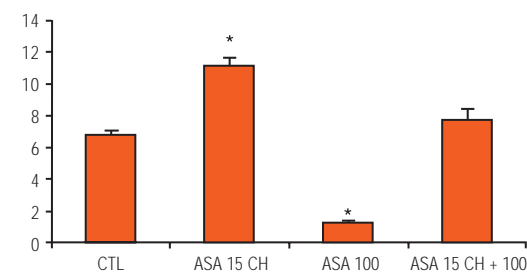
(moyenne +/- s.e.m.) mesurée dans les groupes contrôle (CTL), traités par l'aspirine 15 CH (ASA 15 CH), l'aspirine 100 mg/kg (ASA 100) et ces deux doses ensemble (ASA 15 CH + 100)



* significativement différent du groupe contrôle

Figure 55 – Nombre d'embolies

(moyenne +/- s.e.m.) mesuré dans les groupes contrôle (CTL), traités par l'aspirine 15 CH (ASA 15 CH), l'aspirine 100 mg/kg (ASA 100) et ces deux doses ensemble (ASA 15 CH + 100)



* significativement différent du groupe contrôle

Ainsi, il s'agit d'une neutralisation des effets des deux doses et non, bien entendu, d'une interaction entre les substances administrées.

Bien que le mécanisme responsable de cette neutralisation reste à déterminer, celle-ci pourrait avoir des applications directes dans l'utilisation de hautes dilutions d'aspirine comme antidote à l'aspirine à forte dose pour réduire les risques hémorragiques lors d'une intervention chirurgicale par exemple.

Il est intéressant de noter que ce phénomène de neutralisation a également été observé pour une autre substance, la dexaméthasone. L'addition d'une 15 CH à une dose de 0,5 mg/kg annule l'action anti-inflammatoire de cette dernière dans un modèle l'œdème à la caragénine chez la souris¹⁵.

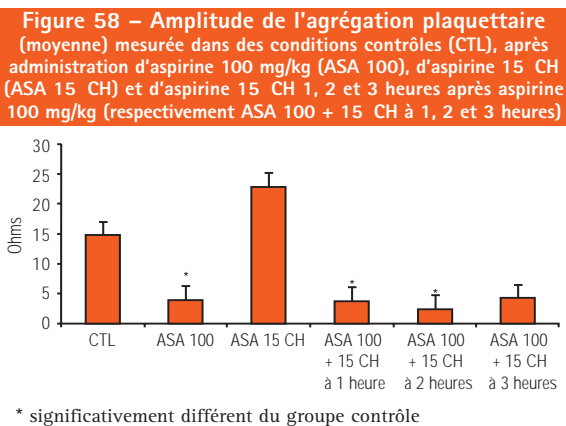
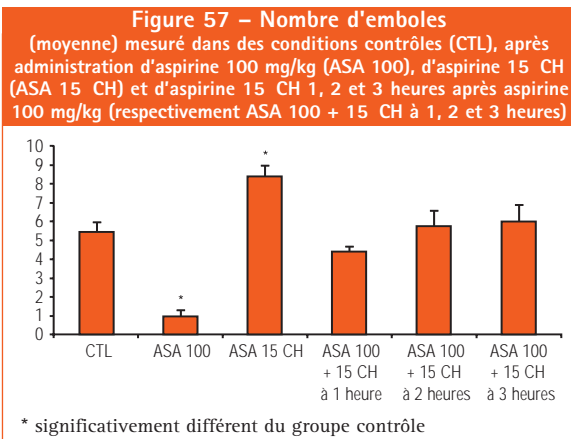
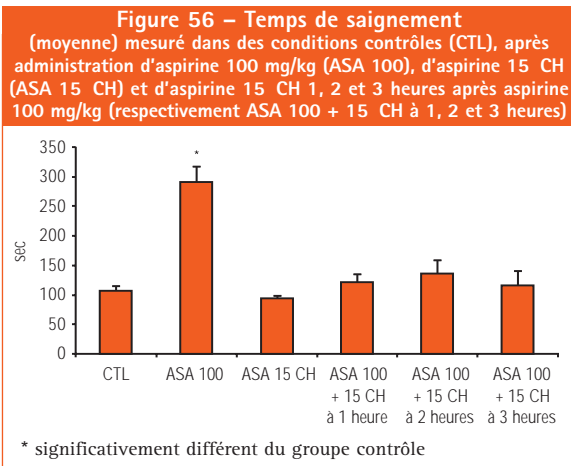
Cinétique de neutralisation de deux doses d'aspirine¹⁴

Méthodes

Cette étude a pour but d'étudier la neutralisation de l'effet d'aspirine à dose pondérale (100 mg/kg) par l'utilisation d'aspirine 15 CH administrée 1, 2 et 3 heures après. Des techniques identiques à celles de l'étude précédente sont utilisées.

Résultats

L'aspirine 15 CH neutralise les effets de l'aspirine 100 mg/kg dans des délais variables selon les paramètres étudiés. Le temps de saignement [voir figure 56] et le nombre d'emboles [voir figure 57] sont normalisés dès la première heure alors que les paramètres de l'agrégation plaquettaire ne le sont qu'à la troisième [voir figure 58].



Conclusion

Sur plusieurs modèles expérimentaux (*in vivo* et *in vitro*, chez l'homme et chez l'animal) il a été mis en évidence une action de l'aspirine à dose ultra-faible (5 CH à 30 CH soit 10^{-10} à 10^{-60} mg/ml). Cette action est pro-agrégante et thrombogène; elle est l'opposée de celle observée avec l'aspirine à dose pharmacologique. De plus, l'aspirine 15 CH peut neutraliser les effets d'une prise d'aspirine à dose pondérale.

Ces résultats ont un intérêt théorique car ils soulignent la réalité de l'effet des très hautes dilutions. Mais ils ont également un intérêt pratique si l'utilisation d'aspirine à dose ultra-faible s'avère capable, chez l'homme, d'inhiber les risques hémorragiques liés à la prise d'aspirine à dose pharmacologique.

De nombreuses questions concernant le mécanisme d'action de l'aspirine à dose ultra-faible restent posées. Des études en cours et à venir devraient nous permettre d'enrichir encore nos connaissances sur cette substance.

Bibliographie

(par ordre chronologique)

- 1 – Doutremepuich C., Pailley D., Anne M.C., De Seze O., Paccalin J., Quilichini R., Template bleeding time after ingestion of ultra low dosages of acetyl salicylic acid in healthy subjects, Preliminary study, *Thromb. Res. Suppl.*, 1987; 48(4) : 501-4.
- 2 – Doutremepuich C., De Seze O., Anne M.C., Hariveau E., Quilichini R., Platelet aggregation on whole blood after administration of ultra low dosage acetylsalicylic acid in healthy volunteers, *Thromb. Res. Suppl.*, 1987; 47(3) : 373-7.
- 3 – Doutremepuich C., Paillet D., De Seze O., Anne M.C., Paccalin J., Quilichini R., Variation of bleeding time after administration of acetyl salicylic acid at different doses in the healthy volunteer, *Ann. Pharm. Fr.*, 1988; 46(1) : 35-9.
- 4 – Doutremepuich C., De Seze O., Le Roy D., Lalanne M.C., Anne M.C., Aspirin at very ultra low dosage in healthy volunteers: effects on bleeding time, platelet aggregation and coagulation, *Haemostasis*, 1990; 20(2) : 99-105.
- 5 – Lalanne M.C., Doutremepuich C., De Seze O., Belon P., What is the effect of acetylsalicylic acid at ultra low dose on the interaction platelets/vessel wall?, *Thromb. Res. Suppl.*, 1990; 60(3) : 231-6.
- 6 – Lalanne M.C., De Seze O., Doutremepuich C., Belon P., Could proteolytic enzyme modulate the interaction platelets/vessel wall in presence of ASA at ultra low doses?, *Thromb. Res. Suppl.*, 1991; 63(4) : 419-26.
- 7 – Lalanne M.C., Ramboer I., De Seze O., Doutremepuich C., In vitro platelets/endothelial cells interactions in presence of acetylsalicylic acid at various dosages, *Thromb. Res.*, 1992; 65(1) : 33-43.
- 8 – Vesvres M.H., Doutremepuich F., Lalanne M.C., Doutremepuich C., Effects of aspirin on embolization in an arterial model of laser-induced thrombus formation, *Haemostasis*, 1993; 23(1) : 8-12.
- 9 – Doutremepuich C., Aguejouf O., Pintigny D., Sertillanges M.N., De Seze O., Thrombogenic properties of ultra-low-dose of acetylsalicylic acid in a vessel model of laser-induced thrombus formation, *Thromb. Res.*, 1994; 76(2) : 225-9.
- 10 – Doutremepuich C., Aguejouf O., Belon P., Effects of ultra-low-dose aspirin on embolization in a model of laser-induced thrombus formation, *Semin Thromb. Hemost.*, 1996; 22 Suppl 1 : 67-70.
- 11 – Aguejouf O., Belougne-Malfatti E., Doutremepuich F., Belon P., Doutremepuich C., Thromboembolic complications several days after a single-dose administration of aspirin, *Thromb. Res.*, 1998; 89(3) : 123-7.
- 12 – Belougne-Malfatti E., Aguejouf O., Doutremepuich F., Belon P., Doutremepuich C., Combination of two doses of acetyl salicylic acid: experimental study of arterial thrombosis, *Thromb Res.*, 1998; 90(5) : 215-21.
- 13 – Aguejouf O., Malfatti E., Belon P., Doutremepuich C., Effects of acetyl salicylic acid therapy on an experimental thrombosis induced by laser beam, *Thromb. Res.*, 2000; 99(6) : 595-602.
- 14 – Aguejouf O., Malfatti E., Belon P., Doutremepuich C., Time related neutralization of two doses acetyl salicylic acid, *Thromb. Res.*, 2000; 100(4) : 317-23.
- 15 – Bonamin L.V., Martinho K.S., Nina A.L., Caviglia F., Do Rio R.G., Very high dilutions of dexamethasone inhibit its pharmacological effects in vivo, *British Homeopathic Journal*, 2001; 90(4) : 198-203.

Activité biologique de quelques antimitotiques* à doses ultra-faibles

Pr Benjamin Bonavida

Professeur du département de Microbiologie et d'Immunologie de l'Université de Californie Los Angeles (UCLA). Il explore l'effet biologique de certaines molécules pouvant modifier la réponse tumorale de cellules cancéreuses

Remerciements

Ces travaux ont été financés par Boiron Research Foundation. Ils ont été menés par des membres du laboratoire du Pr Benjamin Bonavida: les Drs Yoichi Mizutani, Hideki Morimoto, Jeffrey Safrit, Patrick Frost et Hermes Garban. Nous remercions vivement Samantha Nguyen pour la préparation du manuscrit.

Introduction

Par le Pr Benjamin Bonavida

La plupart des études scientifiques publiées décrivent la biologie et les mécanismes d'action moléculaires d'agents utilisés à des concentrations physiologiques ou légèrement inférieures aux concentrations toxiques. Néanmoins, on n'a jamais envisagé l'étude de dilutions supérieures de ces agents puisque ces dilutions ne permettent normalement pas l'obtention des effets physiologiques recherchés. C'est pourquoi on s'est peu préoccupé de l'effet de ces mêmes agents utilisés à des dilutions très hautes, soit seuls, soit associés à d'autres agents, en se basant pour cela sur des techniques d'analyse plus sensibles.

L'étude de très hautes dilutions de composés biologiques peut relever du domaine des préparations homéopathiques. Les préparations homéopathiques sont très variées dans leur composition et dans la (les) concentration(s) finale(s) de l'agent ou des agents utilisés. Certaines préparations utilisent des composés purifiés bien définis à des concentrations finales différentes allant de dilutions physiologiques à de très hautes dilutions. Les très hautes dilutions inférieures au nombre d'Avogadro contiennent encore "physiquement" les composés d'origine. D'autres très hautes dilutions, supérieures au nombre d'Avogadro, ne contiennent plus les composés d'origine. Enfin, des préparations homéopathiques utilisent aussi des extraits mal définis, comprenant plusieurs composés à des niveaux de concentration finale différents.

Il est évident que les effets biologiques de ces préparations sont dus aux interactions associées de plusieurs composés présents dans le mélange. Un grand nombre des effets biologiques des préparations homéopathiques a été révélé par la réponse clinique obtenue par ces préparations lorsqu'elles sont utilisées pour des symptômes cliniques spécifiques. L'explication scientifique des effets cliniques bénéfiques des préparations homéopathiques n'est pas encore complètement élucidée et reste douteuse pour beaucoup.

Notons que K. Linde et al. ont récemment publié les résultats d'une méta-analyse d'études contrôlées de préparations homéopathiques contre placebo¹⁵. Ces résultats révèlent que les effets cliniques de l'homéopathie ne sont pas uniquement liés à l'effet placebo. Les auteurs insistent sur l'urgence de mener des études rigoureuses et systématiques sur l'homéopathie. C'est la direction que nous avons déjà prise au cours des dix dernières années, et ce avec le soutien de Boiron Research Foundation.

Objectif général

Depuis 1990, le laboratoire du Pr B. Bonavida est engagé dans des recherches scientifiques concernant les effets biologiques de composés utilisés à des dilutions très hautes soit seuls, soit en association avec d'autres agents.

Les principaux objectifs de ces études sont d'établir et de valider de manière scientifique le fait que des composés utilisés à des dilutions bien supérieures aux dilutions physiologiques conventionnelles (très hautes dilutions) peuvent exercer, par des mécanismes distincts, un effet biologique sur des tissus normaux et que leur association avec d'autres agents permet l'obtention d'un effet synergique.

En comparant les mécanismes biologiques et moléculaires sous-jacents à l'effet de composés utilisés à hautes dilutions, on devrait pouvoir définir les bases de leur utilisation clinique et de la création de nouvelles classes d'agents thérapeutiques utiles.

Afin d'atteindre les deux objectifs présentés ci-dessus, un projet de recherche a été entrepris :

Il s'agit d'étudier, à l'aide de modèles de systèmes, les mécanismes biologiques et moléculaires d'agents utilisés à hautes dilutions, soit seuls, soit en association avec d'autres agents, pour l'obtention d'interactions synergiques.

Études immunologiques à très hautes dilutions : nouveaux principes et interactions synergiques

Objectif et exposé des motifs

L'objectif général de ces études est l'identification de nouveaux effets biologiques de composés utilisés à très hautes dilutions et de la synergie obtenue par l'association de deux composés ou plus. Ces études incluent des recherches portant sur les mécanismes biologiques, biochimiques et moléculaires sous-jacents aux phénomènes observés.

Les résultats de ces études devraient apporter une explication scientifique aux effets des agents utilisés à très hautes dilutions. En outre, ces études permettront peut-être de justifier l'utilisation thérapeutique potentielle d'agents hautement dilués et d'expliquer leurs interactions synergiques pour le traitement de certaines manifestations cliniques.

Hypothèses

Nous nous basons sur l'hypothèse selon laquelle des agents utilisés à des dilutions très élevées transmettent aux cellules un signal par des voies intracellulaires différentes de celles utilisées à des concentrations physiologiques [voir figure 59].

Nous nous basons aussi sur l'hypothèse que deux agents ou plus, utilisés de manière associée à de hautes dilutions, ont un effet synergique [voir figure 60].

Figure 59 – Une même substance à concentration élevée et à concentration basse induit des signaux différents

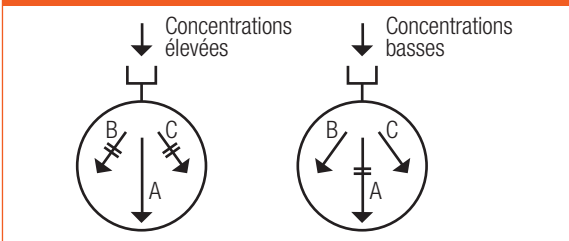
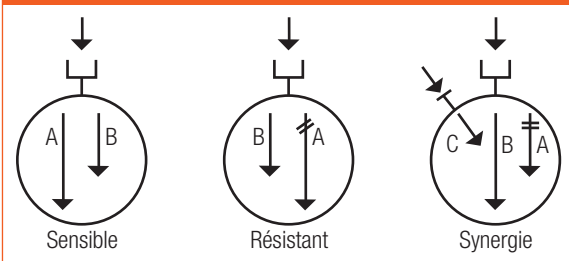


Figure 60 – Deux substances différentes agissant en synergie stimulent des voies distinctes de celles qu'elles stimulent séparément



Modèles de systèmes utilisés pour tester les hypothèses

Nous avons choisi d'étudier des agents cytotoxiques (par ex. TNF- α , Fas-L, CDDP, ADR, VP-16) à très hautes dilutions et la réponse des lignées cellulaires cancéreuses à ces agents cytotoxiques. Ce modèle de système permet l'utilisation d'agents cytotoxiques bien définis et purifiés dotés de mécanismes d'actions connus lorsqu'ils sont utilisés à des concentrations physiologiques.

Les lignées cellulaires cancéreuses ont été choisies comme cellules cibles afin de permettre la détermination de l'effet cytotoxique obtenu de manière précise et reproductible. En outre, les cellules tumorales présentent plusieurs avantages sur d'autres types de tissus, à savoir :

- il est possible d'obtenir des lignées de clones susceptibles de réagir de manière homogène à des agents particuliers,
- les lignées cellulaires tumorales ont une croissance continue en culture et sont utilisables,
- il est possible de dériver des variants sélectionnés à partir d'une lignée parentale pour mener des analyses moléculaires,
- un grand nombre de ces cellules peut être obtenu, ce qui permet l'analyse biochimique et moléculaire,
- les lignées cellulaires tumorales peuvent être cultivées chez la souris expérimentale, ce qui permet une application *in vivo* des résultats obtenus *in vitro*.

Objectifs spécifiques

Deux objectifs spécifiques ont été fixés :

- examen de l'activité cytotoxique d'un agent cytotoxique seul ou de deux agents cytotoxiques associés, à de hautes dilutions, contre des lignées cellulaires tumorales sensibles ou résistantes à l'un des agents ou aux deux,
- examen des mécanismes biochimiques et moléculaires pouvant être sous-jacents aux effets cytotoxiques observés au cours du premier objectif.

Résultats scientifiques

Synergie obtenue par l'association de deux agents utilisés à haute dilution

Synergie obtenue avec le TNF et des produits cytotoxiques

Il a été montré à plusieurs reprises qu'il est possible d'obtenir une activité cytotoxique synergique au cours du traitement de lignées cellulaires tumorales humaines en associant du TNF recombinant et des produits de chimiothérapie. Cet effet synergique est obtenu avec des concentrations légèrement inférieures à la dose toxique de TNF et de produits comme l'adriamycine (ADR), le cisplatine (CDDP) et le 5-FU.

Des tumeurs relevant de types histologiques différents comme le cancer des ovaires, le cancer des poumons et le mélanome, sont sensibles à ces traitements d'association. Il est remarquable que des cellules cancéreuses résistantes au TNF- α et/ou aux produits cités ci-dessus administrés séparément soient sensibles à l'association des deux, ce qui permet de résoudre le problème des résistances multiples. En outre, l'activité cytotoxique synergique est efficace à un niveau intracellulaire, c'est-à-dire après le transport des produits dans la tumeur présentant une résistance multiple^{2,4,5}.

Des études ont été entreprises afin de déterminer les mécanismes susceptibles d'être sous-jacents à cet effet synergique. Nous avons étudié la sensibilité au TNF- α et à l'ADR de plusieurs lignées cellulaires tumorales humaines d'origines histologiques diverses. Le traitement d'association a permis de supprimer la résistance et un effet synergique a été obtenu.

Concernant les cellules tumorales qui synthétisent du TNF- α et qui sont résistantes au TNF, nous avons avancé l'hypothèse selon laquelle l'ADR réduit l'activité de l'ARNm du TNF et l'activité protéique, rendant ainsi les cellules sensibles au TNF- α . L'ADR administrée seule a réduit le taux constitutif d'ARNm du TNF- α ; en association avec du TNF- α , elle a réduit le niveau d'induction lié au TNF.

Ces résultats suggèrent que la réduction de l'activité de l'ARNm du TNF- α par l'ADR est susceptible de jouer un rôle dans l'augmentation de la cytotoxicité observée lorsque ces deux agents sont associés⁸.

Nous avons aussi cherché à déterminer si les cellules tumorales exprimant le phénotype MDR (résistance multiple) sont sensibles à un traitement associant TNF et ADR.

A l'aide de plusieurs lignées cellulaires tumorales, nous avons pu démontrer que l'association du TNF- α et de l'ADR permettait d'obtenir une cytotoxicité plus importante, que la lignée cellulaire concernée soit sensible ou résistante. Nous avons de plus démontré que la résistance au traitement liée ou non à l'expression du phénotype MDR peut être surmontée par le TNF- α et l'ADR. Enfin, nous avons démontré que ni le TNF- α ni l'ADR ne modulaient le phénotype MDR, ni au niveau protéique ni au niveau de l'ARNm. Des résultats similaires ont été obtenus sur des lignées cellulaires du cancer du rein.

Ces résultats suggèrent qu'il est possible de résoudre le problème de la résistance liée à différents mécanismes en obtenant un effet synergique avec des agents utilisés à hautes dilutions^{7,10}.

Synergie obtenue avec le TNF- α et des toxines bactériennes

Nous avons constaté que la toxine diphtérique (DTX), inhibiteur de la synthèse protéique, peut aussi être un médiateur de mort cellulaire par apoptose*, comme le TNF- α ¹.

Nous avons donc avancé l'hypothèse selon laquelle la DTX et le TNF- α utilisés en association peuvent aussi avoir une action cytotoxique synergique.

Nos résultats montrent que l'utilisation des deux agents cytotoxiques TNF- α et DTX à hautes dilutions permet l'obtention d'une synergie par association de leurs activités cytotoxiques respectives contre des lignées cellulaires sensibles ou résistantes³.

Nous avons examiné le mécanisme susceptible de permettre d'obtenir une synergie entre la DTX et le TNF- α en matière de cytotoxicité. Nous avons cherché à déterminer quelle étape du mécanisme d'inhibition protéique induite par la DTX était importante pour l'induction de la cytotoxicité et pour la synergie. Nous avons aussi cherché à déterminer si l'activité catalytique induite par la DTX intervenant dans la ribosylation du facteur d'élongation 2 (EF-2) par l'ADR, qui a pour résultat l'inhibition de la synthèse protéique, est impliquée dans la lyse des cellules cibles par la DTX.

Nous avons pu prouver que le blocage de l'activité catalytique de la DTX aboutit à l'absence de fragmentation de l'ADN et de cytolyse. En outre, l'activité cytotolytique synergique obtenue par l'association de la DTX et du TNF- α est aussi inhibée par le blocage de l'activité catalytique de la DTX.

Nous en avons conclu que l'apoptose induite par la DTX utilise la même voie que la ribosylation de l'EF-2 par l'ADR et qu'elle a lieu plus tard que cette dernière⁶.

Nous avons ensuite étudié le rôle des protéines tyrosines kinases (PTK) dans la cytotoxicité et l'apoptose liées au TNF- α sur une lignée de cellules ovariennes sensibles au TNF et sur une autre lignée de cellules ovariennes résistantes au TNF. Avec ces deux lignées cellulaires, on a montré l'existence d'une synergie lorsque le TNF- α et la DTX sont associés. Nous avons choisi la génistéine, un inhibiteur des PTK, qui n'a eu aucun effet sur la cytotoxicité liée à la DTX.

La génistéine a inhibé la cytotoxicité liée au TNF- α ainsi que l'effet synergique du TNF- α et de la DTX sur la lignée ovarienne sensible au TNF mais elle n'a pas inhibé l'effet synergique obtenu sur la variante résistante au TNF. Les mêmes résultats ont été obtenus pour l'apoptose.

Ces résultats montrent que la cytotoxicité liée au TNF- α est liée à deux voies distinctes, à savoir une voie dépendante des PTK et une voie indépendante des PTK, en fonction du degré de dilution choisi.

Néanmoins, cela doit être examiné avec précaution car les agents utilisant des voies intracellulaires peuvent ne pas être universels en raison des réponses variées obtenues selon les lignées cellulaires tumorales^{3, 6, 11}.

Synergie obtenue avec Fas et soit des médicaments soit des toxines

Les résultats présentés ci-dessus, qui démontrent qu'un effet synergique est obtenu en associant le TNF- α et des médicaments ou des toxines, nous ont poussés à déterminer s'il est possible aussi d'obtenir un effet synergique en associant des lymphocytes cytotoxiques et des médicaments ou des toxines.

Les lymphocytes cytotoxiques agissent par deux mécanismes mis en évidence dans des essais à court terme: la voie perforine et granzyme et la voie Fas-L. La voie Fas-L fonctionne par reconnaissance des récepteurs Fas sur les cellules cibles. Le récepteur Fas est une protéine polypeptidique appartenant à la famille du TNF- α , qui comprend le NKG2D, le CD40, etc. Un anticorps anti-Fas, agoniste du Fas-L et doté d'une activité cytotoxique contre les cibles sensibles Fas+, a été développé.

Nous avons étudié l'effet cytotoxique de l'anticorps anti-Fas associé à des toxines (DTX et ricine) et à des médicaments (CDDP, ADR) utilisés à des dilutions élevées suboptimales.

Les résultats que nous avons obtenus montrent que l'association de l'anticorps anti-Fas avec la DTX, l'ADR et le CDDP augmente la cytotoxicité et la synergie et supprime la résistance au TNF, aux médicaments et aux toxines pour une batterie de lignées cellulaires cibles. Lorsque la ricine, toxine végétale, a été utilisée, on n'a pas observé de synergie avec l'anticorps anti-Fas mais bien plutôt un effet d'ajout. Les lignées cellulaires résistantes soit à l'ADR soit au CDDP et/ou exprimant le phénotype MDR ont été rendues sensibles par l'association de médicaments et de l'anticorps anti-Fas. Dans tous les cas, une augmentation de la cytotoxicité a été observée lorsque les cellules cibles ont été pré-traitées avec de l'IFN- γ qui stimule l'expression de l'antigène Fas.

Ces résultats suggèrent qu'une immunothérapie peut être rendue plus efficace en sensibilisant les cellules à la cytotoxicité induite par les lymphocytes porteurs du Fas-L⁹.

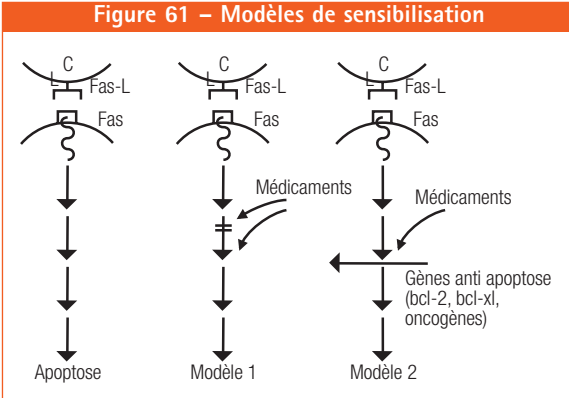
Les résultats de ces études ont été confirmés sur des lignées cellulaires de cancer ovarien sélectionnées présentant des sensibilités différentes à Fas et aux médicaments; nous avons aussi examiné les mécanismes sous-jacents potentiels.

Les effets cytotoxique et synergique ont pu être accrus au cours du traitement de cellules tumorales sensibles ou résistantes aux médicaments grâce à une association d'anticorps anti-Fas et de médicaments. Les trois lignées étaient résistantes à l'anticorps anti-Fas utilisé seul.

Un effet synergique a été obtenu grâce à un pré-traitement avec du CDDP suivi d'un traitement aux anticorps anti-Fas, ce qui suggère que ce produit sensibilise les cellules à l'apoptose induite par Fas. Cette constatation est corroborée par le fait que l'effet synergique est bloqué par neutralisation des anticorps anti-Fas. Le CDDP a augmenté l'expression de l'antigène Fas par les cellules tumorales. Nous avons ensuite montré que le CDDP exerce un effet sensibilisant à l'apoptose induite par Fas via un mécanisme différent de celui habituellement mis en jeu dans la cytotoxicité directe du CDDP contre les lignées sensibles.

Ces résultats suggèrent une nouvelle approche pour l'accroissement des interactions immunitaires induites par les lymphocytes cytotoxiques dans le traitement des tumeurs ovariennes résistantes¹³ [voir figure 61].

Figure 61 – Modèles de sensibilisation



Dans une autre étude, nous avons étudié la sensibilité d'explants de sarcome de Kaposi à la mort cellulaire induite par Fas et à la synergie obtenue avec l'actinamycine-D. Le sarcome de Kaposi (SK) est l'affection maligne la plus communément associée au SIDA, mais sa pathogénie n'est pas connue. Trois isolats de SK liés à un SIDA ont été étudiés. Bien que les cellules SK expriment Fas à leur surface, ces cellules étaient résistantes à l'anticorps anti-Fas cytotoxique. Le traitement du SK lié au SIDA avec l'actinamycine-D sensibilise les cellules à la cytotoxicité et à l'apoptose induites par les anticorps anti-Fas.

Nous avons examiné trois mécanismes possibles de résistance du SK lié au SIDA à la cytotoxicité induite par les anticorps anti-Fas. Premièrement, la synthèse et la sécrétion de Fas soluble par les cellules tumorales peuvent neutraliser la cytotoxicité liée aux anticorps; cependant, la plupart des cellules n'exprimaient pas Fas soluble.

Deuxièmement, l'expression du proto-oncogène Bcl-2 peut protéger les cellules des signaux d'apoptose. Les trois isolats avaient un niveau d'expression d'ARNm du Bcl-2 très bas.

Troisièmement, la phosphatase associée à Fas (FAP) est une molécule anti-apoptique, connue pour interagir avec Fas et qui peut bloquer la transduction du signal d'apoptose. Les trois isolats de SK avaient un niveau d'expression de l'ARNm de la FAP-1 très élevé et l'actinamycine-D a permis de réduire de manière significative les taux de FAP-1.

Ces résultats montrent que les cellules de SK lié au SIDA sont résistantes à l'apoptose induite par Fas et suggèrent que la FAP-1 peut être impliquée dans l'acquisition d'une résistance du SK lié au SIDA à l'apoptose induite par les anticorps anti-Fas¹².

Les résultats présentés ci-dessus concernant l'anticorps anti-Fas agoniste du Fas-L ont été confirmés à l'aide de lymphocytes porteurs du Fas-L en raison de leur implication dans l'immunothérapie des cancers. En outre, nous avons constaté que le succès d'une immunothérapie dépend de la présence de lymphocytes cytotoxiques anti-tumoraux et/ou de la sensibilité des cellules tumorales à la mort cellulaire induite par les lymphocytes. Cette étude portait sur la sensibilité de lignées cellulaires du cancer de la prostate à la cytotoxicité induite par le Fas-L et sur la sensibilisation des cellules tumorales à la mort cellulaire induite par le Fas-L par des produits cytotoxiques utilisés à hautes dilutions.

Les trois lignées cellulaires de cancer de la prostate étaient résistantes à la mort cellulaire induite par le Fas-L. Néanmoins, l'ajout de concentrations légèrement inférieures aux concentrations toxiques de CDDP ou de VP-16 a permis de sensibiliser de manière significative les lignées tumorales à la mort cellulaire induite par le Fas-L et à l'apoptose induite par des lymphocytes porteurs du Fas-L. La sensibilisation des cellules tumorales par des médicaments était inhibée en neutralisant l'anticorps anti-Fas.

Nous avons ensuite étudié la sensibilisation des cellules de cancer de la prostate par des lymphocytes TIL et des lymphocytes LAK.

Ces résultats démontrent que les cellules tumorales du cancer de la prostate résistantes aux médicaments et au Fas+ peuvent être sensibilisées par des médicaments à la mort cellulaire induite par des lymphocytes CTL, TIL et LAK porteurs du Fas-L.

Ces résultats suggèrent aussi que la sensibilisation des cellules tumorales par des concentrations légèrement inférieures aux concentrations toxiques de médicaments peut augmenter l'efficacité de l'immunothérapie dans l'éradication de cellules tumorales résistant à la mort cellulaire induite par les lymphocytes¹⁴.

Mécanisme moléculaire de la sensibilisation des cellules tumorales par l'IFN- γ

Nous avons déjà signalé le fait que l'interféron gamma (IFN- γ) sensibilise des lignées cellulaires du cancer ovarien humain à l'apoptose induite par Fas. L'IFN- γ stimule l'induction de la NO synthase inductible (NOSi) et la production d'oxyde nitrique (NO).

Nous avons cherché à déterminer si l'oxyde nitrique est un médiateur de la sensibilisation induite par l'IFN- γ des lignées cellulaires du cancer ovarien humain à l'apoptose induite par Fas et si l'oxyde nitrique régule l'expression du récepteur Fas. Le traitement de cellules tumorales avec de l'IFN- γ a induit l'expression de NOSi et la production d'oxyde nitrique. Comme l'IFN- γ , l'oxyde nitrique exogène a sensibilisé les cellules tumorales à la mort cellulaire par apoptose induite par Fas. L'oxyde nitrique endogène a également augmenté l'expression de Fas.

Ces résultats montrent que la sensibilisation par l'IFN- γ des lignées cellulaires du cancer ovarien humain à l'apoptose induite par Fas peut être due en partie à l'induction de la NOSi et à la régulation de l'expression du gène Fas par des intermédiaires réactifs de l'azote¹⁶.

Signification

Les résultats présentés ci-dessus révèlent que la cytotoxicité par apoptose peut être stimulée par différents agents tels que ceux qui sont déjà couramment utilisés pour le traitement des cancers, à savoir les produits de chimiothérapie, les toxines, les cytokines et les cellules cytotoxiques. Ces résultats révèlent aussi qu'il existe des actions croisées entre les différents agents cytotoxiques utilisés et que plusieurs agents cytotoxiques utilisent les mêmes voies intracellulaires d'apoptose.

Les résultats prouvent qu'une résistance à un agent ou plus peut être éliminée en utilisant des traitements d'association hautement dilués. Les traitements d'association peuvent envoyer des signaux aux cellules par des voies distinctes de celles utilisées par les signaux émis par un seul agent. De plus les traitements d'association peuvent entraîner la mort cellulaire soit par l'action simultanée de chaque agent, soit par sensibilisation des cellules par un premier agent à l'effet cytotoxique du deuxième agent, ce qui correspond dans ce cas à un effet synergique.

Les résultats récents concernant la chimiosensibilisation des cellules tumorales à la cytotoxicité induite par Fas par des médicaments à des concentrations inférieures aux concentrations toxiques donnent lieu à des approches cliniques nouvelles valables aux côtés des approches actuelles immunologiques ou géniques du traitement du cancer.

L'utilisation de l'immunothérapie et de la thérapie génique pour obtenir l'induction d'une réponse cytotoxique anti-tumorale efficace se base sur l'hypothèse selon laquelle des cellules tumorales résistantes à la chimiothérapie seront supprimées par des lymphocytes cytotoxiques. Cependant cette hypothèse peut ne pas se révéler justifiée puisque, d'une part des cellules tumorales peuvent être résistantes à la mort cellulaire induite par les lymphocytes cytotoxiques, et d'autre part parce qu'il y a une sélection des cellules résistantes.

Dans les deux cas, les cellules tumorales se multiplient et l'immunothérapie échoue. De ce fait, la sensibilisation des cellules tumorales à la mort cellulaire induite par des lymphocytes cytotoxiques est une nouvelle approche pour la suppression des résistances à l'immunothérapie et, comme on l'a montré ici, cette sensibilisation peut être obtenue par le traitement des cellules tumorales avec des médicaments cytotoxiques à des concentrations inférieures aux concentrations toxiques.

De plus, en déterminant quelles sont les cibles intracellulaires qui régulent la résistance des cellules à l'apoptose, il serait possible de trouver de nouvelles techniques thérapeutiques visant à inhiber directement le fonctionnement de ces gènes anti-apoptose et ainsi à supprimer les résistances.

Directions à suivre à l'avenir

Nous avons fait plusieurs observations capitales sur les effets biologiques des très hautes dilutions et nous avons commencé à déterminer de nouveaux mécanismes moléculaires.

Nous proposons d'orienter les études à venir sur la définition des voies intracellulaires activées de manière préférentielle par les produits à très hautes dilutions et sur l'identification des nouveaux produits de gènes impliqués.

Nous proposons également d'effectuer une analyse plus poussée des interactions moléculaires qui ont lieu lorsque deux agents sont utilisés simultanément ou l'un après l'autre. Il est important de connaître par quels moyens ces agents envoient des signaux aux cellules et comment les voies intracellulaires de ces signaux interagissent.

Ces études devraient aussi s'associer à des recherches visant à comprendre la régulation de la transcription au niveau de l'ADN par des produits à hautes dilutions et à l'identification de ces facteurs de transcription. Ces études *in vitro* devraient être confirmées par des modèles *in vivo* afin de commencer à confirmer les effets démontrés au niveau de systèmes complexes du corps.

Ces diverses directions de recherche devraient montrer la voie pour la création de nouveaux produits thérapeutiques avec des agents utilisés à hautes dilutions et ayant des implications thérapeutiques.

Conclusions générales

Les résultats que nous avons obtenus sont un premier pas fondamental dans l'étude des effets physiologiques et moléculaires de composés utilisés seuls ou en association à de très hauts niveaux de dilution. Les résultats présentés dans ce chapitre ont démontré l'existence de plusieurs nouveaux phénomènes; ils ont aussi révélé de nouveaux concepts et de nouveaux principes en matière de très hauts niveaux de dilution.

Des résultats parallèles aux nôtres ont été publiés récemment par Torigoe et al.¹⁸ et par Kersh et al.¹⁷. Ces chercheurs ont clairement montré comment les récepteurs antigéniques traduisent les différences quantitatives des liaisons au ligand en réponses biologiques qualitativement différentes. Par analogie, des ligands très dilués sont susceptibles de stimuler les récepteurs d'une manière différente de celle obtenue à des concentrations supérieures, ce qui est en accord avec les résultats préliminaires présentés dans ce chapitre.

Nous sommes encore loin de connaître les événements d'activation déclenchés par ces récepteurs; l'étape suivante nécessite de savoir comment les différents composants moléculaires interagissent dans une cellule intacte, c'est-à-dire dans un compartiment clos.

Les résultats préliminaires concernant l'immunomodulation de certains composants de la réponse immunitaire obtenus avec deux préparations homéopathiques sont très encourageants car ils mettent à jour pour la première fois des effets qui sont peut-être liés aux réponses cliniques observées *in vivo*. Il est cependant prématuré pour l'instant de transposer nos observations *in vitro* en mécanismes et modes d'action *in vivo*. Néanmoins, ces résultats nous poussent à persister dans cette direction de recherche et à tester d'autres préparations homéopathiques dans la même optique. Nous souhaitons que d'autres chercheurs entrent dans ce champ de la recherche et qu'apparaissent de nouvelles ressources de financement pour ces recherches.

Benjamin Bonavida, Los Angeles, octobre 1998.