

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

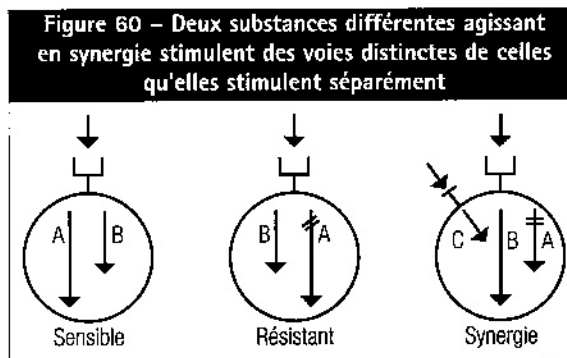
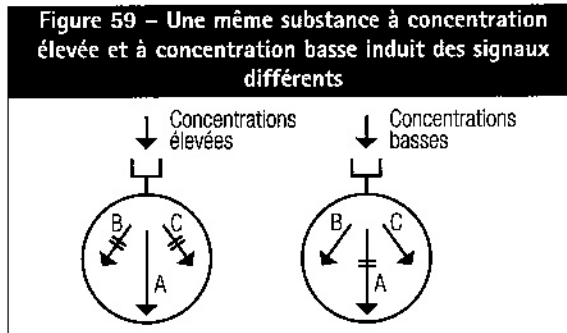
L'objectif général de ces études est l'identification de nouveaux effets biologiques de composés utilisés à très hautes dilutions et de la synergie obtenue par l'association de deux composés ou plus. Ces études incluent des recherches portant sur les mécanismes biologiques, biochimiques et moléculaires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



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 associés⁶.

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 diphthérique (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 cytolitique 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

* Voir glossaire page 103.

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 NGF, 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.

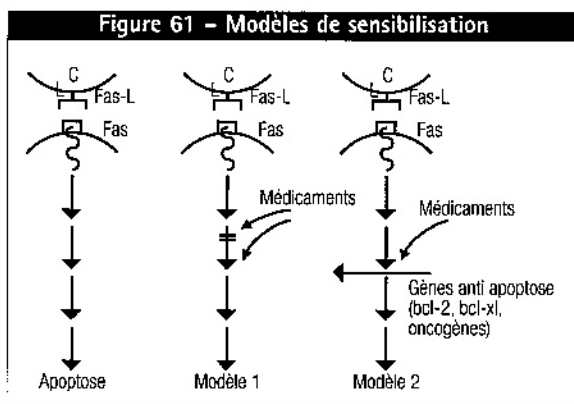
Les résultats de ces études ont été confirmés sur des lignées cellulaires de cancer ovarien sélectionnées présentant des sensibilités différentes à Fas et aux médicaments ; nous avons aussi examiné les mécanismes sous-jacents potentiels.

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].



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'actinomycine-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'actinomycine-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 de 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'actinomycine-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.

Bibliographie

(par ordre chronologique)

- 1 – Chang M.P., Bramhall J., Graves S., Bonavida B., Wisnieski B.J., Internucleosomal DNA cleavage precedes diphtheria toxin-induced cytolysis. Evidence that cell lysis is not a simple consequence of translation inhibition, *J. Biol. Chemistry*, 1989, 264 : 15261-67.
- 2 – Bonavida B., Safrit J., Tsuchitani T., Zigelboim J., Overcoming tumor cell drug resistance by low doses of recombinant tumor necrosis factor and drug, In : *Ultra Low Doses*, C. Douremepuich, ed. Taylor & Francis, 1991, Washington, D.C., 27-43.
- 3 – Morimoto H., Safrit J.T., Bonavida B., Synergistic effect of tumor necrosis factor- α and diphtheria toxin-mediated cytotoxicity in sensitive and resistant human ovarian tumor cell lines, *J. Immunol.*, 1991, 147 : 2609-2616.
- 4 – Safrit J.T., Tsuchitani T., Berek J., Zigelboim J., Bonavida B., Overcoming drug resistance by synergistic activity of drug and tumor necrosis factor, In : *New frontiers in the therapy of malignancies*. From biological approaches to clinical studies, Serono Symposium Rev., No. 25. Mantovani G., Bonavida B., Del Giacco G.S., Granger G.A., Kirkwood J.M., eds., Published by Ares Serono Symposia via Ravencia 8, Rome, Italy, 1991, 11-17.
- 5 – Tsuchitani T., Zigelboim J., Berek J., Bonavida B., Potentiation of cytotoxicity against human ovarian cell-lines with combinations of subtoxic concentrations of tumor necrosis factor and adriamycin or cis-platinum, *J. Cell. Pharmacol.*, 1991, 2 : 32-40.
- 6 – Morimoto H., Bonavida B., Diphtheria-toxin and Pseudomonas. A toxin-mediated apoptosis : ADP-ribosylation of EF-2 is required for DNA fragmentation and cell lysis and synergy with Tumor Necrosis Factor- α , *J. Immunol.*, 1992, 49 : 2089-2094.
- 7 – Safrit J.T., Berek J.S., Bonavida B., Sensitivity of drug-resistant human ovarian tumor cell lines to combined effects of tumor necrosis factor (TNF- α) and doxorubicin. Failure of the combination to modulate the MDR phenotype, *Gynecol. Oncol.*, 1992, 48 : 214-220.
- 8 – Safrit J.T., Bonavida B., Sensitivity of resistant human tumor cell lines to TNF and adriamycin used in combination : correlation between down-regulation of TNF-mRNA induction and overcoming resistance, *Cancer Res.*, 1992, 52 : 6630-6637.
- 9 – Morimoto H., Yonehara S., Bonavida B., Overcoming tumor necrosis and drug resistance of human tumor cell lines by combination treatment with anti-Fas antibody and drugs or toxins, *Cancer Res.*, 1993, 53 : 2591-2596.
- 10 – Safrit J.T., Beldegrun A., Bonavida B., Sensitivity of human renal cell carcinoma lines to TNF, adriamycin and combination : role of TNF-mRNA induction in overcoming resistance, *J. Urology*, 1993, 149 : 1202-1208.
- 11 – Morimoto H., Bonavida B., Lack of involvement of protein tyrosine kinases in the synergistic cytotoxic and apoptotic activities mediated by tumor necrosis factor and diphtheria toxin (DTX) in a TNF- α resistant ovarian carcinoma cell line, *Cell. Pharmacol.*, 1995, 2 : 147-152.
- 12 – Mori S., Murakami-Mori K., Jewett A., Nakamura S., Bonavida B., Resistance of AIDS-associated Kaposi's sarcoma cells to Fas-mediated apoptosis, *Cancer Res.*, 1996, 56 : 1874-1879.
- 13 – Uslu R., Bonavida B., Involvement of the mitochondrion respiratory chain in the synergy achieved by treatment of human ovarian carcinoma cell lines with both tumor necrosis factor- α and cis-diamminedichloroplatinum, *American Cancer Society*, 1996, 77 : 725-732.
- 14 – Frost P., Ng C.P., Beldegrun A., Bonavida B., Immunosenitization of prostate carcinoma cell lines for lymphocytes (CTL, TIL, LAK) – mediated apoptosis via the Fas-ligand pathway of cytotoxicity, *Cell. Immunol.*, 1997, 180 : 70-83.

- 15 – Linde K., Clausius N., Ramirez G., Melchart D., Eitel F. Hedges, L.V., Jonas W.B., Are the clinical effects of homeopathy placebo effects? A meta-analysis of placebo-controlled trials, *The Lancet*, 1997, 350 : 834-843.
- 16 – Garban H.J., Bonavida B., Nitric oxide sensitizes ovarian tumor cells to Fas-induced apoptosis, *Gynecol. Oncol.*, 1999, 73 : 257-264.
- 17 – Kersh E.N., Shaw A.S., Allen P.M., Fidelity of T cell activation through multistep T cell receptor zeta phosphorylation, *Science*, 1998, 281(5376) : 572-575.
- 18 – Torigoe C., Inman J.K., Metzger H., An unusual mechanism for ligand antagonism, *Science*, 1998, 281 : 568-572.