

**ANALYSE DE L'ARTICLE:  
"CYTOTOXIC EFFECTS OF ULTRA-DILUTED REMEDIES ON  
BREAST CANCER CELLS"**

Moshe Frenkel *et al.* Int.J.Oncology, **36**: 395-403, 2010

Par Jean Roussaux, Biologiste, Professeur honoraire, Université Pierre et Marie Curie

[jeanroussaux@free.fr](mailto:jeanroussaux@free.fr)

Avril 2010

**L'article rend compte d'une étude portant sur l'activité *in vitro* de hautes dilutions de *Carcinosinum*, *Phytolacca*, *Conium* et *Thuya* sur trois lignées de cellules en culture provenant d'adénocarcinome mammaire (souches MCF-7 et MDA-MB-231) et d'une souche immortalisée d'épithélium mammaire (HTMLLE)**

Dans l'introduction les auteurs indiquent que l'observation d'une activité anticancéreuse partielle de hautes dilutions de ces remèdes chez des patients traités à la clinique Banerji à Kolkata (Inde) a été à l'origine de l'expérimentation décrite dans l'article.

Les méthodes utilisées pour tester les caractéristiques et les effets des dilutions sont respectivement la chromatographie haute performance (HPLC), l'analyse de la viabilité cellulaire à l'aide d'une coloration spécifique, la détermination de l'index mitotique, la détection des télomères par hybridation avec un composé fluorescent, l'analyse des profils de répartition des divers stades du cycle cellulaire par cytométrie en flux, la détection de l'apoptose par marquage à l'annexine et enfin celle de protéines associées au cycle cellulaire et à l'apoptose par western blot. Il s'agit donc d'une batterie très complète de tests permettant d'explorer les diverses phases du cycle de cellules en culture. Les dilutions utilisées sont selon les remèdes 30 CH et 200 C (la concentration 3C pour *Conium* est vraisemblablement une erreur typographique).

#### **Analyse des résultats**

L'analyse par HPLC indique que les profils des dilutions sont analogues et présentent quelques traces indéterminées. La succussion est sans effet sur le solvant (alcool). Une ambiguïté subsiste sur l'absence dans les dilutions du pic majeur observé sur le solvant.

La viabilité des trois types cellulaires est réduite par le solvant ce qui est curieux puisque la teneur en alcool est au plus de 1%, teneur qui est souvent considérée comme dépourvue d'activité. En outre le solvant paraît un peu plus actif sur les souches MCF et MDA que sur HTMLLE et il en est de même de l'activité des 4 remèdes. La souche MCF étant la plus sensible, en particulier à *Phytolacca* et *Carcinosinum* (70-80% de réduction de viabilité). Les auteurs allèguent une relation dose-effet pour les concentrations en remèdes. Elle ne paraît pas évidente sur la fig. 1.

L'analyse en cytométrie en flux de l'évolution des populations cellulaires entre 24 et 96h (fig. 2A) montre que les résultats les plus nets sont obtenus avec la souche MCF. *Carcinosinum* et *Phytolacca* provoquent un arrêt du cycle en phase G1 après 24h et l'apparition entre 24 et 72h de cellules en phase G0 ainsi qu'en phases S et G2-M. Le blocage est donc transitoire, le cycle cellulaire reprenant son cours mais certaines cellules restant inertes (G0) A 96h les cellules sont bloquées en phase S. Cette évolution est beaucoup moins nette pour MDA, en particulier on n'observe pas de blocage en G1 à 24 h mais une accumulation de cellules en phase G2-M. Les 2 remèdes provoquent donc un ralentissement

voire un blocage du cycle. Pour HTMLLE l'effet le plus net est une accumulation des phases S et G2 correspondant également à un blocage partiel. L'interprétation de l'ensemble des résultats est rendue très aléatoire du fait des variations observées dans les effets du solvant sur les trois souches et de l'absence d'indications sur la reproductibilité de ces observations.

Un résultat intéressant est la réduction du signal donné par les télomères induite par les remèdes dans le cas des cellules d'adénocarcinome (MCF, MDA). Cette réduction est plus faible dans le cas des cellules saines (HTMLLE). La fig. 3 est particulièrement probante dans le cas des cellules MDA et MCF traitées par la *Carcinosinum*. Malheureusement aucune image n'illustre le cas des cellules HTMLLE qui servent de témoin sain.

L'analyse de plusieurs des protéines intervenant dans la régulation du cycle cellulaire par western blot a également été entreprise. En ce qui concerne les cyclines D1 et D3, leurs concentrations diminuent fortement après traitements dans HTMLLE alors qu'elles ne sont pas affectées dans les deux souches pathologiques. Les kinases (CDKs) présentent des variations en fonction du temps peu cohérentes dans HTMLLE, toutefois la diminution de l'expression de CDK6 semble corrélative d'une augmentation de l'expression de p27 et d'une diminution de pRb. Ces variations sont en accord avec le blocage observé pour ces cellules. En revanche l'évolution de ces paramètres est bien caractérisée dans le cas des souches MCF et MDA. Dans le cas de MDF le niveau des enzymes CDKs reste constant en fonction du temps pour les deux remèdes *Carcinosinum* et *Phytolacca* alors qu'il s'effondre dans le cas de MDA. Cette observation est en faveur d'un blocage des cellules MCF en G1 et d'une progression du cycle dans le cas des MDA. Enfin les auteurs spéculent sur des différences de densité des bandes de pRb et p27 (peu visibles sur le document) pour affirmer que la synthèse de l'inhibiteur p27 serait responsable de la réponse cytotatique tardive observée dans la souche MDA. D'une manière générale les évolutions des profils de CDK6 et pRb dans HTMLLE semblent sujet à discussion

L'étude de l'importance de l'apoptose et de la nécrose dans les diverses conditions expérimentales est abordée ensuite par séparation en cytométrie en flux des cellules fixant l'annexine fluorescente (apoptotiques) de celles colorées par l'iodure de propidium (nécrotiques). La fig. 5 qui illustre les résultats montre nettement l'existence de cellules apoptotiques dans les deux conditions MCF et MDA par rapport à HTMLLE qui n'en présente pratiquement pas. *Carcinosinum* et *Phytolacca* augmentent la proportion de cellules apoptotiques, très nettement dans MCF (23% ?), moins nettement pour MDA (8% ?). Le commentaire de la fig. est ambigu, en particulier sur la nature du témoin. En outre rien n'est indiqué en ce qui concerne les cellules nécrotiques.

L'analyse des effets apoptotiques des remèdes est complétée par une étude (western blot) de l'évolution en fonction du temps de deux marqueurs de l'apoptose, le poly-ADP ribose (PARP) et une caspase (C 7) qui sont activés tous deux par clivage. L'examen de la fig. 6 rend difficilement compte des diverses conclusions qu'en tirent les auteurs, seul le clivage de la C7 est assez nettement perceptible. Particulièrement curieux est l'absence de clivage de PARP dans la condition MDA.

En conclusion de leur travail les auteurs indiquent que les remèdes ultra-dilués exercent un effet cytotoxique préférentiel sur les cellules des lignées cancéreuses MCF et MDA. Ils provoquent en effet une altération de l'expression de protéines du cycle cellulaire et induisent une activation de l'apoptose. La discussion est l'occasion d'introduire des informations non

référéncées, ce qui est inhabituel, et de confronter leurs résultats à des données bibliographiques sur la régulation du cycle cellulaire.

**Que peut-on conclure de l'examen de ce travail :**

L'article a été publié dans une revue internationale avec comité de lecture (me semble-t-il) *c'est un gage de sérieux*. Le travail fait intervenir des *méthodes modernes d'analyse* du cycle cellulaire. Néanmoins, on peut être étonné que le manuscrit ait été accepté dans cette forme pour publication : il présente en effet de *nombreuses imperfections de fond*, en particulier une absence d'informations sur la reproductibilité et la valeur statistique de certains résultats ainsi que des commentaires de figures parfois difficilement compatibles avec ce qu'on y observe. En ce qui concerne la forme, on retiendra *certaines ambiguïtés* concernant les témoins (milieu de culture seul ou avec adjonction de solvant?) ou des imprécisions (analyse HPLC) demandant au moins des explications complémentaires.

**Trois idées peuvent être retenues de l'analyse de cet article :**

- 1) *les hautes dilutions (30 C et 200 C) ont une activité sur des cellules tumorales en culture*. L'ampleur de cet effet reste à préciser.
- 2) Les hautes dilutions provoquent un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et (ou) un ralentissement du cycle et une activation de l'apoptose, *ces effets étant modulés* par l'existence ou non dans les cellules d'un gène p53 antitumoral muté.
- 3) Une étude complémentaire paraît indispensable pour bien démontrer ces conclusions et éclaircir certaines observations peu cohérentes.

**Jean Roussaux,**  
Biologiste, Professeur honoraire, Université Pierre et Marie Curie  
[jeanroussaux@free.fr](mailto:jeanroussaux@free.fr)