



**HAL**  
open science

# ÉTUDE DES EFFETS DES ONDES MILLIMÉTRIQUES AU NIVEAU CELLULAIRE : CAS DES MEMBRANES BIOLOGIQUES ARTIFICIELLES ET DE L'EXPRESSION GÉNÉTIQUE

Maxim Zhadobov

► **To cite this version:**

Maxim Zhadobov. ÉTUDE DES EFFETS DES ONDES MILLIMÉTRIQUES AU NIVEAU CELLULAIRE : CAS DES MEMBRANES BIOLOGIQUES ARTIFICIELLES ET DE L'EXPRESSION GÉNÉTIQUE. Autre. Université Rennes 1, 2006. Français. NNT: . tel-00121677

**HAL Id: tel-00121677**

**<https://theses.hal.science/tel-00121677>**

Submitted on 21 Dec 2006

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Thèse

présentée devant

l'UNIVERSITÉ DE RENNES I

pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Rennes I**

Mention : *Traitement du Signal et Télécommunications*

par

Maxim ZHADOBOV

Équipe d'accueil : Institut d'électronique et de télécommunications de Rennes

École doctorale : Matisse

Composante universitaire : Université de Rennes I

## **ÉTUDE DES EFFETS DES ONDES MILLIMÉTRIQUES AU NIVEAU CELLULAIRE: CAS DES MEMBRANES BIOLOGIQUES ARTIFICIELLES ET DE L'EXPRESSION GÉNÉTIQUE**

Soutenu le 30 novembre 2006 devant la commission d'Examen

*Composition du jury*

### *Rapporteurs*

M. F. BERSANI

Professeur. Université de Bologne

M. B. VEYRET

Directeur de Recherche CNRS. PIOM - ENSCPB, Université de Bordeaux

### *Examineurs*

M. P. LEVEQUE

Chargé de Recherche CNRS. XLIM

M. Y. LE DREAN

Maître de conférences. ICM, Université de Rennes 1

M. R. SAULEAU

Maître de conférences, HDR. IETR, Université de Rennes 1

M. D. THOUROUDE

Professeur. IETR, Université de Rennes 1

### *Membres invités*

M. F. PERROT

Docteur. Président du Directoire d'ANTENNESSA

M. G. DUBOST

Professeur émérite. IETR, Université de Rennes 1

M. D. MICHEL

Professeur. ICM, Université de Rennes 1

Mme. V. VIÉ

Maître de Conférences, HDR. GMCM, Université de Rennes 1



# Remerciements

*Je tiens à remercier Professeur Daniel Thouroude de m'avoir accueilli au sein de l'IETR. Je suis très reconnaissant à Ronan Sauleau de m'avoir conseillé, encouragé et soutenu à chaque fois que j'en exprimais le besoin. Ses idées originales, ces qualités humaines ont été extrêmement précieuses.*

*J'exprime mes plus sincères remerciements à Véronique Vié pour avoir partagé ses connaissances et son expérience en biophysique. Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Yves Le Dréan et à Professeur Denis Michel qui m'avaient donné la possibilité de découvrir le monde passionnant de la biologie cellulaire. Je remercie les thésards et les scientifiques du groupe "Antennes et Hyperfréquences" de l'IETR avec qui j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler.*

*Je remercie vivement Professeur Ferdinando Bersani et Professeur Barnard Veyret qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteur de ce manuscrit. Je les remercie également pour m'avoir donné la possibilité de participer aux écoles de bioélectromagnétisme qui m'ont permis de progresser dans mes recherches.*

*Je exprime ma sincère reconnaissance à Professeur Gérard Dubost qui a proposé cette thématique de recherche à l'IETR et a suivi, avec beaucoup d'intérêts, le déroulement de cette étude.*

*Je remercie très sincèrement Paul et Bernadette Gauthier pour leur soutien permanent durant ces trois années.*

*Enfin, toute mes pensées vont à ma chère Anna, car elle a eu la patience de lire et relire ce mémoire, mais aussi et surtout de m'encourager lors des moments les plus difficiles.*



# Résumé

Les systèmes de communication sans fil se sont considérablement développés durant la dernière décennie. En raison de la saturation de la partie basse du spectre micro-onde et des besoins croissants en transmissions haut débit (vidéo, contenus multimédia, etc.), les fréquences de fonctionnement des systèmes émergents à usage grand public ou professionnel se décalent progressivement vers les fréquences millimétriques. Celles situées au voisinage de 60 GHz (bande 57-64 GHz) sont parfaitement adaptées aux communications très haut débit à courte portée (WPANs, WLANs).

Cependant, les rayonnements autour de 60 GHz sont absents du spectre naturel et les organismes vivants n'y ont encore jamais été exposés dans les conditions environnementales. Les expositions des nouveaux systèmes de communication sans fil pourraient donc avoir des conséquences imprévues sur les systèmes vivants et la connaissance de l'impact potentiel des ondes millimétriques de faible puissance au niveau cellulaire est de la plus haute importance.

Ce travail de thèse porte sur l'analyse des effets potentiels des rayonnements millimétriques de faible puissance au niveau cellulaire. Les études sont axées sur deux directions de recherche.

*Premièrement*, nous avons considéré l'influence des ondes millimétriques à 60 GHz sur la structure et les propriétés biophysiques des modèles artificielles des membranes biologiques. Deux méthodes d'analyse ont été utilisées pour caractériser les modifications dans les membranes phospholipidiques pendant l'exposition : *(i)* mesure de la dynamique de pression superficielle en temps réel et *(ii)* analyse topographique de la surface membranaire par microscopie à force atomique. Le rôle des différents paramètres d'exposition (densité de puissance, polarisation, modulation d'amplitude, régimes d'exposition continu et intermittent) a été étudié. Les résultats obtenus pour des puissances d'exposition inférieures à celles établies par les normes et les recommandations internationales ont montré une augmentation de la pression superficielle

pour les membranes exposées. L'analyse par microscopie à force atomique n'a pas démontré de changements significatifs de la distribution des microdomaines dans les membranes mixtes à séparation de phase.

*Deuxièmement*, nous avons étudié l'influence du rayonnement millimétrique autour de 60 GHz sur les modifications de l'expression génétique des protéines chaperones dans les cellules gliales du cerveau humain. En combinant les approches génomique et protéomique nous avons considéré les effets potentiels des ondes millimétriques de faible puissance sur trois étapes clefs de l'expression génétique *in vitro* : (i) modifications potentielles au niveau de l'activation des facteurs de transcription, activité des gènes-promoteurs avec comme conséquence les changements potentiels d'initiation de transcription ; (ii) modifications post-transcriptionnelles de l'ARN messenger ; (iii) changements au niveau de la formation et l'accumulation des protéines. Dans le premier cas, nous avons utilisé la méthode de transfection qui permet d'effectuer le transfert des constructions génétiques dans les cellules. Nous avons examiné l'activité de trois rapporteurs génétiques qui sont sensibles aux différents stress physiques et chimiques. Dans le deuxième cas, RT-PCR a été utilisé pour quantifier les niveaux des ARN messagers après exposition aux rayonnements millimétriques. Enfin, dans le dernier cas, les niveaux des protéines ont été analysés par Western blot. Les résultats ont montré l'absence des modifications significatives de l'expression génétique des protéines chaperones pour les paramètres d'exposition étudiés.

# Abstract

Wireless communication systems operating at microwave frequencies have been widely deployed over the last decade. Due to the saturation of the lower part of the microwave spectrum and the need of very high data rate transmissions (video, multimedia contents, etc.), the operating frequencies of new civil and professional wireless communication systems have recently shifted towards the millimeter wave frequency band. Frequencies around 60 GHz (frequency band of 57-64 GHz) attract a tremendous attention especially for broadband short-range communication systems (WPANs, WLANs).

Due to the absence of 60-GHz radiations from the natural spectrum, biological organisms have never been exposed to this radiation in the environmental conditions. New wireless communication systems could have unforeseen consequences upon biological systems. Therefore, the knowledge of the potential impacts of low-power millimeter wave radiations at the cellular level is of utmost importance.

The research work deals with the analysis of the potential biological effects of the low-power millimeter-wave radiation at the cellular level. The investigations have been conducted in two main research directions.

*Firstly*, we considered the influence of the millimeter-wave radiation at 60 GHz on the structure and biophysical properties of artificial models of biomembranes. Two methods of analysis were used in order to characterize the modifications in the phospholipids membranes during the exposure : *(i)* real time measurement of the superficial pressure dynamics and *(ii)* topographic analysis of the membranes surface by the atomic force microscopy. The role of the different exposure parameters, namely power density, polarization, amplitude modulation, continuous and intermittent exposure, was studied. An increase of the superficial pressure of the exposed membranes was evidenced for power levels situated well below those established by the international standards and guidelines. The analysis of the images obtained by the atomic force



microscopy did not reveal any modifications in the microdomains distribution in the mixed membranes with phase separation.

*Secondly*, we studied the influence of the 60-GHz radiation on the modifications of gene expression of chaperon proteins in human brain cells. Using both genomic and proteomic approaches, we considered potential effects of the low-power millimeter waves on the three main stages of the gene expression *in vitro* : *(i)* potential modifications at the level of the transcription factor activation ; *(ii)* post-transcriptional modifications of the messenger RNA ; *(iii)* changes at the level of formation and accumulation of the proteins. In the first case we used the transfection method in order to transfer specific genetic constructions into the cell. We analysed the activity of three reporter genes highly sensitive to various physical and chemical stresses. In the second case, RT-PCR was used to determine the quantity of messenger RNA after exposure to millimeter-wave radiation. Finally, at the third stage, the protein levels were analysed by Western blot. Our results demonstrated the absence of the statistically significant modifications in the gene expression of chaperon proteins for the considered exposure parameters.

# Table des matières

<b>Remerciements</b>	<b>i</b>
<b>Résumé</b>	<b>iii</b>
<b>Abstract</b>	<b>v</b>
<b>Introduction générale</b>	<b>1</b>
<b>I Contexte et état de l'art</b>	<b>5</b>
<b>1 Contexte de l'étude</b>	<b>7</b>
1.1 Effets biologiques des ondes électromagnétiques . . . . .	7
1.1.1 Couplage direct . . . . .	8
1.1.2 Effets thermiques . . . . .	8
1.1.3 Effets non-thermiques . . . . .	9
1.2 Choix de la fréquence . . . . .	10
1.2.1 Spectre d'absorption atmosphérique . . . . .	11
1.2.2 Données de spectroscopie micro-ondes . . . . .	13
1.2.3 Systèmes de communications à 60 GHz . . . . .	14
1.2.3.1 Wireless Local Area Network (WLAN) . . . . .	14
1.2.3.2 Wireless Personal Area Network (WPAN) . . . . .	15
1.3 Conclusion . . . . .	16

<b>2</b>	<b>Bibliographie</b>	<b>17</b>
2.1	Effets biologiques thermiques et non-thermiques . . . . .	18
2.1.1	Micro-ondes . . . . .	18
2.1.2	Ondes millimétriques . . . . .	19
2.2	Étude des mécanismes d'interaction . . . . .	20
2.3	Effets sur les solutions aqueuses . . . . .	22
2.4	Systèmes d'exposition pour les expériences <i>in vitro</i> . . . . .	23
2.4.1	Micro-ondes . . . . .	24
2.4.2	Ondes millimétriques . . . . .	26
2.5	Effets sur les membranes biologiques . . . . .	28
2.5.1	Micro-ondes . . . . .	29
2.5.2	Ondes millimétriques . . . . .	29
2.5.3	Autres études . . . . .	30
2.6	Expression génétique . . . . .	31
2.6.1	Activation des facteurs de transcription . . . . .	31
2.6.2	Induction de l'expression des protéines chaperons . . . . .	32
2.7	Génotoxicité et cancer . . . . .	37
2.8	Effets sur l'activité neuronale . . . . .	38
2.9	Effets oculaires . . . . .	39
2.10	Effet sur la peau . . . . .	39
2.10.1	Micro-ondes . . . . .	40
2.10.1.1	Apoptose <i>in vitro</i> . . . . .	40
2.10.1.2	Inflammation <i>in vitro</i> . . . . .	40
2.10.1.3	Inflammation <i>in vivo</i> . . . . .	41
2.10.1.4	Protéines de choc thermique <i>in vitro</i> . . . . .	41
2.10.1.5	Prolifération cellulaire <i>in vitro</i> . . . . .	41
2.10.1.6	Prolifération cellulaire <i>in vivo</i> . . . . .	42
2.10.2	Ondes millimétriques . . . . .	42

---

2.10.2.1	Effets sur les kératinocytes humains <i>in vitro</i> . . . . .	42
2.11	Applications thérapeutiques des ondes millimétriques . . . . .	43
2.12	Conclusion . . . . .	45
<b>II</b>	<b>Effet sur les membranes biologiques artificielles</b>	<b>47</b>
	<b>Introduction</b>	<b>49</b>
<b>3</b>	<b>Membranes biologiques</b>	<b>51</b>
3.1	Rôle et composition des membranes biologiques . . . . .	51
3.1.1	Rôle des membranes biologiques . . . . .	51
3.1.2	Lipides membranaires . . . . .	51
3.1.3	Protéines membranaires . . . . .	52
3.1.4	Transport membranaire . . . . .	53
3.1.5	Propriétés physiques des biomembranes . . . . .	53
3.2	Lipides membranaires . . . . .	54
3.2.1	Rôle des lipides membranaires . . . . .	54
3.2.2	Bicouche lipidique . . . . .	54
3.2.3	Classes des lipides . . . . .	55
3.2.4	Diversité de composition lipidique . . . . .	56
3.3	Potentiel dipolaire des membranes biologiques . . . . .	57
<b>4</b>	<b>Modèles artificiels des membranes biologiques</b>	<b>59</b>
4.1	Films phospholipidiques . . . . .	59
4.2	Phases lipidiques . . . . .	60
4.3	Méthode de Langmuir-Blodgett . . . . .	61
4.3.1	Préparation de la monocouche à l'interface eau/air . . . . .	61
4.3.2	Transfert de la monocouche . . . . .	63
4.4	Méthodes d'analyse des membranes phospholipidiques . . . . .	63
4.4.1	Mesure de la pression superficielle par la méthode de Wilhelmy . . . . .	63

4.4.2	Analyse topographique par Microscopie à Force Atomique . . . . .	66
4.5	Avantages et limitations de l'approche modèle . . . . .	66
<b>5</b>	<b>Dispositifs et paramètres de rayonnement</b>	<b>69</b>
5.1	Système d'exposition . . . . .	69
5.2	Mesure de la puissance . . . . .	71
5.3	Spectre du signal . . . . .	74
5.4	Stabilité en fréquence et en puissance du générateur . . . . .	74
5.5	Modulation d'amplitude . . . . .	75
5.6	Diagramme de rayonnement et distribution de champ . . . . .	76
5.6.1	Cornet pyramidal . . . . .	76
5.6.1.1	Zones de rayonnement . . . . .	77
5.6.1.2	Distributions de champs et de densité de puissance . . . . .	77
5.6.1.3	Mesures de l'amplitude et de la phase sur l'axe . . . . .	79
5.6.1.4	Diagrammes de rayonnement dans les plans E et H . . . . .	80
5.6.1.5	Distribution de la densité de puissance . . . . .	83
5.6.1.6	Densité superficielle de puissance et valeur de champ . . . . .	83
5.6.2	Cornet conique . . . . .	85
5.6.2.1	Zones de rayonnement . . . . .	85
5.6.2.2	Mesures de l'amplitude et de la phase sur l'axe . . . . .	85
5.6.2.3	Diagrammes de rayonnement dans les plans E et H . . . . .	85
5.6.2.4	Densité superficielle de puissance et valeur de champ . . . . .	86
<b>6</b>	<b>Effets des ondes millimétriques sur les biomembranes artificielles</b>	<b>89</b>
6.1	Caractérisation des conditions expérimentales . . . . .	89
6.1.1	Préparation d'un film phospholipidique à l'interface eau/air . . . . .	90
6.1.2	Stabilité du film monomoléculaire . . . . .	91
6.1.3	Influence du rayonnement sur la sous-phase . . . . .	92
6.1.4	Température . . . . .	93

---

6.1.5	Reproductibilité des expériences . . . . .	93
6.2	Résultats expérimentaux . . . . .	94
6.2.1	Exposition des membranes en phase condensée . . . . .	94
6.2.1.1	Monocouche phospholipidique DPPC . . . . .	94
6.2.1.2	Monocouche phospholipidique DOPC . . . . .	97
6.2.1.3	Monocouche phospholipidique DPPG . . . . .	99
6.2.1.4	Interprétation des résultats . . . . .	99
6.2.2	Exposition des membranes en séparation de phases . . . . .	100
6.2.2.1	Monocouche phospholipidique DPPC . . . . .	100
6.2.2.2	Monocouche phospholipidique mixte DPPC/DOPC . . . . .	101
<b>Conclusion</b>		<b>107</b>
<b>III Effet sur l'expression génétique</b>		<b>109</b>
<b>Introduction</b>		<b>111</b>
<b>7 Rappel sur la biologie cellulaire</b>		<b>115</b>
7.1	Dogme central de la biologie cellulaire . . . . .	115
7.2	Acides nucléiques . . . . .	116
7.3	Transcription génétique . . . . .	118
7.4	Modifications post - transcriptionnelles de l'ARN messenger . . . . .	120
7.5	Traduction . . . . .	120
<b>8 Protocole expérimental</b>		<b>123</b>
8.1	Méthodes . . . . .	123
8.1.1	Transcription génétique . . . . .	124
8.1.1.1	Gènes-rapporteurs . . . . .	125
8.1.1.2	Culture cellulaire . . . . .	126
8.1.1.3	Méthode de transfection . . . . .	126

8.1.1.4	Contrôle positif . . . . .	126
8.1.2	Accumulation de l'ARN messenger . . . . .	127
8.1.2.1	RT-PCR . . . . .	127
8.1.3	Niveau des protéines . . . . .	128
8.1.3.1	Western blot . . . . .	129
8.2	Dispositifs d'expérience . . . . .	130
8.2.1	1 <sup>ère</sup> étape. Transcription . . . . .	130
8.2.2	2 <sup>ème</sup> et 3 <sup>ème</sup> étapes. ARN messagers et niveaux des protéines . .	130
8.3	Paramètres d'exposition et système d'exposition . . . . .	131
8.3.1	Conditions d'exposition . . . . .	131
8.3.2	Système d'exposition . . . . .	132
<b>9</b>	<b>Résultats</b>	<b>137</b>
9.1	Effet de l'exposition sur la mortalité et la croissance cellulaires . . . . .	137
9.2	Effet sur la transcription génétique . . . . .	138
9.2.1	Contrôle interne CMV- $\beta$ -galactosidase . . . . .	139
9.2.2	Activité transcriptionnelle . . . . .	139
9.3	Accumulation de l'ARN messenger . . . . .	140
9.4	Accumulation des protéines . . . . .	142
	<b>Discussion et conclusions</b>	<b>145</b>
	<b>Perspectives</b>	<b>147</b>
	Types de stress cellulaires étudiés . . . . .	148
	Stress réticulaire . . . . .	148
	Effets synergétiques . . . . .	149
	Signalisation cellulaire . . . . .	149
	Méthodologie . . . . .	149
	Stress cellulaires . . . . .	149
	RT-PCR quantitative . . . . .	149

---

Puces à ADN . . . . .	150
Validation des résultats . . . . .	150
Effets synergétiques . . . . .	150
RT-PCR quantitative . . . . .	150
Puces à ADN . . . . .	151
Validation des résultats . . . . .	151
Signalisation cellulaire . . . . .	151
Phosphorylation . . . . .	151
Activation transcriptionnelle . . . . .	151
Différents paramètres d'exposition . . . . .	152
Mesure spectroscopiques pour des solutions biologiques . . . . .	152
Résonances moléculaires . . . . .	153
<b>Bibliographie</b>	<b>155</b>
<b>Acronymes &amp; Abréviations</b>	<b>167</b>
<b>Désignations</b>	<b>169</b>
<b>Liste des publications</b>	<b>171</b>





# Introduction générale

Les problématiques d'interactions bioélectromagnétiques entre le corps humain et les ondes électromagnétiques (EMs) intéressent la communauté scientifique depuis que les phénomènes EMs ont été découverts par Michael Faraday et décrits mathématiquement par James Clerk Maxwell.

Actuellement, les gammes d'ondes EMs utilisées en télécommunication s'agrandissent avec le besoin en communications de notre société. Depuis une dizaine d'années, les effets biologiques des ondes EMs attirent une attention toute particulière à cause de l'apparition des expositions aux champs EMs induites artificiellement par les nouveaux systèmes de communication.

Aujourd'hui la saturation de la partie basse du spectre micro-onde ainsi que le besoin croissant en transmission haut débit imposent une montée en fréquence. Dans ce contexte, la bande de fréquence millimétrique présente un intérêt particulier pour de nombreuses applications actuelles et potentielles en télécommunications (radars, communications par satellites, réseaux locaux, systèmes de transport intelligents, communications point à point et point à multipoints, *etc.*).

Certaines fenêtres fréquentielles de cette bande sont caractérisées par une forte atténuation atmosphérique due aux précipitations, à la vapeur d'eau et à l'absorption résonante par l'oxygène moléculaire. Ces sous-bandes fréquentielles sont absentes dans le spectre naturel. Parmi celles-ci se situe la sous-bande 57-64 GHz qui est identifiée pour accueillir les systèmes de communications sans fil intra-bâtiments à courte portée dans le cadre des réseaux personnels sans fil (WPANs<sup>1</sup>) et des réseaux locaux sans fil (WLANs<sup>2</sup>). Les avantages de tels systèmes sont multiples : taille réduite des éléments rayonnants, haut débit de transmission, utilisation de spectre très efficace, sécurité de communications améliorée, *etc.*

---

<sup>1</sup> Wireless Personal Area Networks

<sup>2</sup> Wireless Local Area Networks

Par conséquent, le développement de nouveaux systèmes utilisés par le grand public va entraîner des expositions aux rayonnements EMs auxquels l'organisme humain n'est pas soumis naturellement. Il est donc essentiel de comprendre comment les expositions qui sont initialement absentes dans le spectre naturel peuvent perturber notre environnement et agir sur les systèmes biologiques et, en particulier, sur l'organisme vivant. C'est dans ce cadre général que s'inscrit notre travail.

Il est intéressant de noter que les mêmes longueurs d'ondes sont déjà utilisées pour certaines applications thérapeutiques. La thérapie aux ondes millimétriques (TOM) de faible puissance est reconnue dans certains pays de l'Europe de l'Est (Russie, Ukraine, *etc.*) et elle est utilisée en médecine avec succès pour le traitement des maladies cardiovasculaires ou du diabète, pour la réduction des effets toxiques de chimiothérapie lors du traitement contre le cancer, *etc.* Cependant, cette méthode est basée sur des données empiriques, et les mécanismes physiques et biologiques de tels effets restent totalement inconnus.

Pour comprendre les effets biologiques potentiels des ondes millimétriques (OMs) sur le vivant, il est nécessaire d'étudier les mécanismes d'interactions biophysiques au niveau cellulaire. Dans ce travail de thèse, nous nous focaliserons sur les effets des OMs de faible puissance aux niveaux cellulaire et moléculaire, en particulier sur (i) la structure et les propriétés biophysiques des membranes biologiques, ainsi que sur (ii) l'expression génétique des protéines chaperons dans les cellules gliales du cerveau humain.

Le manuscrit comporte trois parties.

Dans la *première partie*, nous définirons le contexte scientifique dans lequel s'inscrit l'étude des effets biologiques potentiels des OMs de basse puissance. L'état de l'art sur les effets biologiques des OMs et des micro-ondes sera décrit.

Dans la *deuxième partie*, nous étudierons les modèles artificiels des membranes biologiques exposées au rayonnement millimétrique de faible puissance. L'état structurel des membranes phospholipidiques sera analysé par différentes méthodes biophysiques.

La *troisième partie* sera consacrée à l'étude de la réponse génétique cellulaire au rayonnement millimétrique à 60 GHz. Nous analyserons trois étapes clés de l'expression génétique des protéines chaperons pour les cellules du cerveau humain avant et après l'exposition aux OMs.

Cette étude s'appuie sur trois disciplines scientifiques : la physique des ondes EMs, la biophysique et la biologie. Ce travail de thèse est réalisée dans le cadre de collabo-

rations entre trois laboratoires de l'Université de Rennes 1 :

- l'Institut d'Électronique et de Télécommunications de Rennes (IETR), UMR CNRS 6164 ;
- l'Équipe Biophysique du Groupe Matière Condensée et Matériaux (GMCM), UMR CNRS 6626 ;
- l'Équipe d'Information et de Programmation Cellulaire du laboratoire des Interactions Cellulaires et Moléculaires, UMR CNRS 6026, IFR 140.



# Première partie

## Contexte et état de l'art



# Chapitre 1

## Contexte de l'étude

Le but de ce chapitre est de décrire le contexte scientifique dans lequel se situe le travail. Nous allons présenter les différents types d'effets biologiques et l'allure chronologique du développement des études bioélectromagnétiques. Le choix de la bande millimétrique pour la recherche sur les effets biologiques des ondes EMs est justifié par les particularités de la propagation des OMs dans l'atmosphère et par les données de spectroscopie micro-ondes. Les systèmes de communication émergents intra-bâtiments en bande millimétrique sont présentés à la fin de ce chapitre.

### 1.1 Effets biologiques des ondes électromagnétiques

Les propriétés physiques des champs EMs sont essentiellement caractérisées par leur fréquence (ou longueur d'onde dans le vide), leur intensité, leur densité de puissance et leur polarisation. Les ondes EMs correspondent à l'association d'un champ électrique et d'un champ magnétique qui varient dans le temps et se propagent dans l'espace. Elles représentent une forme de propagation d'information et d'énergie sans support matériel.

Le spectre fréquentiel est divisé en deux parties : *(i)* rayonnement ionisant (rayons X, rayons gamma, *etc.*) et *(ii)* rayonnement non-ionisant (ondes radio, micro-ondes, infrarouge, *etc.*). D'un point de vue des interactions avec la matière, l'énergie des photons d'un rayonnement non-ionisant, contrairement au rayonnement ionisant, n'est pas suffisante pour casser les liaisons chimiques dans les molécules.

Les mécanismes d'interactions entre les ondes EMs et la matière biologique (vivant) sont devenus le sujet de nombreuses études suite au développement des systèmes de



télécommunication qui soumettent au quotidien le grand public ou les professionnels aux rayonnements EMs. Historiquement, les polémiques sur les effets potentiels des ondes EMs sur l'homme sont liées au développement des lignes aériennes à très haute tension à proximité des habitations (50-60 Hz). L'utilisation des radars (77 GHz) au cours de la deuxième Guerre Mondiale avait attiré l'attention sur les effets biologiques des OMs de forte puissance.

Le développement récent des réseaux cellulaires (GSM, DCS, UMTS) et des réseaux locaux sans fil en micro-ondes (Bluetooth, WiFi, WiMAX, *etc.*) – partie intégrante des moyens modernes de télécommunications – a été l'objet de nombreuses polémiques se basant sur les résultats expérimentaux [1–4]. La plupart de ces systèmes opèrent à des fréquences de fonctionnement typiquement comprises entre 0.9 GHz et 5.2 GHz. Plusieurs études ont exploré des voies biologiques qui pourraient relier l'exposition des systèmes biologiques aux micro-ondes (essentiellement à 0.9 GHz, à 1.8 GHz ou à 2.45 GHz) et les modifications de fonctionnement de ces systèmes.

De manière générale, les effets biologiques des micro-ondes et des OMs peuvent être divisés en trois catégories selon leurs mécanismes d'actions sur les systèmes biologiques :

- *Couplage direct* entre le rayonnement émis par un système de communication et d'autres dispositifs électroniques implantés dans le corps humain ;
- *Effets thermiques* du rayonnement de forte puissance ;
- *Effets non-thermiques* à court terme ou à long terme.

### 1.1.1 Couplage direct

La première catégorie des effets biologiques se rapporte à l'interaction entre le rayonnement EM et des systèmes électroniques intégrés dans le corps humain suite au dysfonctionnement des organes ou des systèmes internes de l'organisme humain. De tels implants sont en développement rapide ; en particulier nous pouvons citer les microsystèmes pour la stimulation de la rétine photosensible de l'œil [5], pour les prothèses neuronales [6], *etc.*

### 1.1.2 Effets thermiques

Les effets biologiques des micro-ondes et du rayonnement millimétrique de forte puissance ont déjà été étudiés [7, 8]. Les applications thérapeutiques des micro-ondes

sont basées sur l'échauffement des couches internes des tissus biologiques jusqu'à une certaine température. L'hyperthermie micro-onde (42°C) en combinaison avec la radiothérapie ou la chimiothérapie a été développée comme une méthode prometteuse de traitement du cancer [9–11]. La thérapie coagulante micro-onde (60°C) est utilisée pour les applications médicales dans le traitement des tumeurs des tailles réduites [12]. Actuellement les micro-ondes sont également appliquées pour le traitement de l'arythmie cardiaque [13]. Toutes ces méthodes sont basées sur l'échauffement des régions internes des tissus biologiques. Jusqu'au présent, seules les micro-ondes ont été exploitées pour les applications thérapeutiques thermiques.

Les effets thermiques des OMs ressemblent à ceux des micro-ondes, mais ils correspondent essentiellement à l'échauffement superficiel des tissus biologiques [14]. La faible pénétration dans les tissus biologiques conduit à l'utilisation potentielle des OMs dans la région superficielle des tissus ou à l'échauffement des zones internes locales lors de thérapies invasives. L'augmentation de la température est essentiellement déterminée par la dissipation de l'énergie du champ EM et par la thermorégulation dans l'organisme vivant.

### 1.1.3 Effets non-thermiques

Les études récentes mettent en évidence l'existence d'effets non-thermiques des micro-ondes et des OMs. De tels effets sont sélectifs par rapport à la fréquence et, dans certains cas, dépendent de caractéristiques d'exposition : densité de puissance, modulation, polarisation, régime temporel d'exposition, *etc.* [15–18]. La nature exacte des effets non-thermiques n'est pas connue jusqu'à présent. La bibliographie sur les effets non-thermiques des micro-ondes et, en particulier des OMs, sera présentée dans le chapitre 2 de cette partie.

Toutes les normes d'exposition et les directives des commissions internationales [19] pour les OMs ne prennent en compte que les effets connus actuellement. Les effets thermiques étant les seuls connus, ils servent de base à la définition des limites d'exposition. Ces limites sont établies en termes de débit d'absorption spécifique (SAR) qui détermine l'énergie thermique absorbée par les tissus et en termes de densité superficielle de puissance pour la partie supérieure du spectre micro-ondes.

Les standards internationales fixent le niveau de densité superficielle de puissance des OMs pour la population générale à 5 mW/cm<sup>2</sup> [19]. Le tableau et 1.1 montrent les

recommandations de “International commission on Non-Ionizing Radiation Protection (ICNIRP)” pour la population générale et travailleurs.

Caractéristiques d'exposition	Densité superficielle de puissance, mW/cm <sup>2</sup>
Grand public	5
Travailleurs	1

**Tab. 1.1:** Recommandations de ICNIRP pour la densité superficielle de puissance dans la bande 10-300 GHz [19].

Dans ce travail nous allons considérer de faibles niveaux de puissance d'exposition : cela ne correspond qu'aux effets *non-thermiques*, c'est-à-dire aux mécanismes d'interactions non liés directement à l'échauffement du matériel biologique.

## 1.2 Choix de la fréquence

Le terme “ondes millimétriques” détermine la gamme des fréquences comprises entre 30 GHz et 300 GHz. Comme son nom l'indique, la longueur d'onde dans le vide  $\lambda_0$  des OMs se situe entre 1 mm et 1 cm. A ces fréquences, les bandes disponibles sont larges et plusieurs fenêtres fréquentielles sont particulièrement attrayantes. Les applications grand public les plus prometteuses aujourd'hui concernent notamment :

- la bande autour de 60 GHz pour les réseaux locaux intra-bâtiments à très haut débit [20, 21] ;
- la bande 40.5 GHz - 43.5 GHz (LMDS<sup>1</sup> en Europe [22]) ;
- les systèmes de transports intelligents (communications inter-véhicules et véhicules-infrastructures (63 GHz - 64 GHz)).

De nombreux travaux y sont actuellement consacrés ; ils portent sur différents aspects : systèmes, propagation, antennes, circuits et composants, *etc.* Elles s'intensifient de plus en plus à mesure que les technologies millimétriques deviennent plus performantes et moins coûteuses. Cependant, le progrès dans le développement des nouveaux moyens de communication exige les études des effets potentiels des OMs sur les systèmes biologiques. En fonction des résultats de telles études, des précautions d'utilisation par le grand public peuvent être nécessaires.

L'exposition de l'organisme humain aux rayonnements millimétriques est caractérisée par une très faible pénétration du champ EM dans le corps. La profondeur

<sup>1</sup> Local Multipoint Distribution Service

de pénétration des OMs dans les tissus biologiques est de l'ordre de quelques millimètres en fonction de la fréquence et du type de tissus. Cela implique que la peau et les couches superficielles des tissus sont les cibles principales pour les rayonnements millimétriques. Pour la même intensité de champ EM, le SAR en bande millimétrique est plus élevé par rapport à celui mesuré pour les micro-ondes car la conductivité des tissus biologique augmente avec la fréquence. Ainsi l'énergie reçue par unité de masse de tissu est plus localisée. Dans ce cadre, une attention particulière doit être attribué aux effets potentiels locaux des OMs dans les zones superficielles des tissus.

Dans ce travail nous nous focaliserons sur la sous-bande de 57-64 GHz et particulièrement sur la fréquence de 60 GHz. Les raisons principales qui nous mènent à l'étude de cette bande de fréquences peuvent se résumer de la façon suivante :

- L'atténuation spécifique des fréquences autour de 60 GHz dans l'atmosphère terrestre conduit à *l'absence de cette sous-bande dans le spectre naturel* ;
- Les données de spectroscopie micro-ondes montrent *l'existence des résonance de nombreuses molécules et groupes moléculaires biologiques dans cette sous-bande* ;
- *Les systèmes sans fil à 60 GHz pourraient être largement utilisés par le grand public* pour les communications à très courte portée dans l'avenir proche.

### 1.2.1 Spectre d'absorption atmosphérique

Le spectre EM naturel représente une des caractéristiques fondamentales de notre planète (Fig. 1.1). Certaines bandes de fréquence sont transmises à travers l'atmosphère et représentent une distribution spectrale homogène dans notre environnement. Par exemple c'est le cas de la lumière visible et des ondes radio. D'autres bandes de fréquences sont totalement absentes dans l'environnement terrestre (infrarouge lointain). Il existe également des bandes qui sont très sélectives par rapport à fréquence (infrarouge proche, micro-ondes). Cette sélectivité est essentiellement déterminée par les résonances des molécules présentes dans l'atmosphère.

Les fenêtres de transmission et d'atténuation spécifiques dans l'atmosphère dans la *bande millimétrique* sont dues principalement à la résonance électronique des atomes d'oxygène et aux transitions rotationnelles des molécules d'eau. Ces absorptions sont étudiées expérimentalement et théoriquement depuis un demi-siècle. La figure 1.2 montre les spectres d'absorption de O<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O dans la bande de fréquences 10 GHz - 400 GHz.

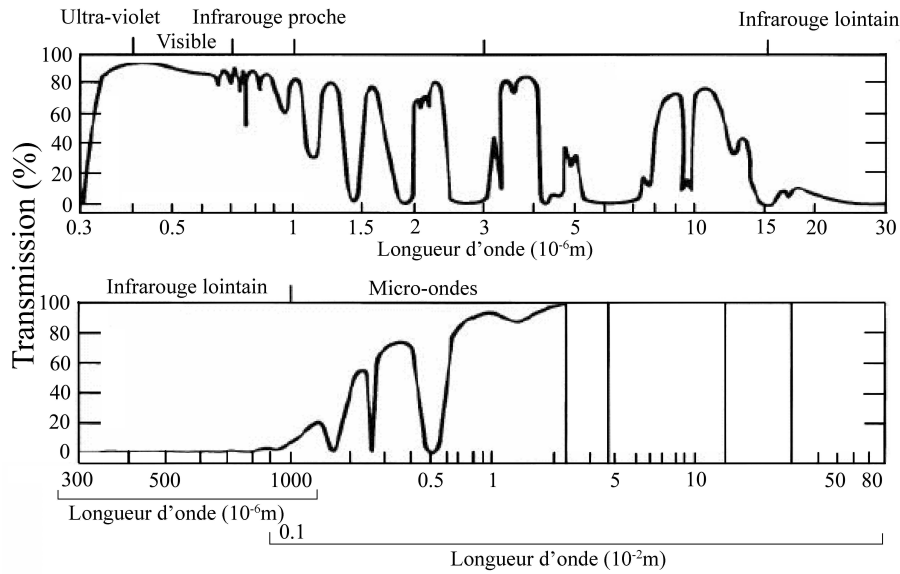


Fig. 1.1: Spectre de transmission de l'atmosphère de la Terre.

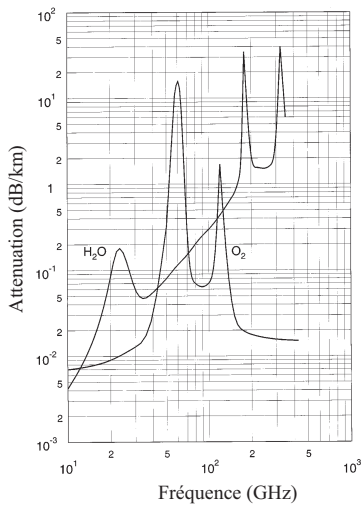


Fig. 1.2: Spectre d'absorption des molécules d'oxygène et d'eau dans l'atmosphère [23].

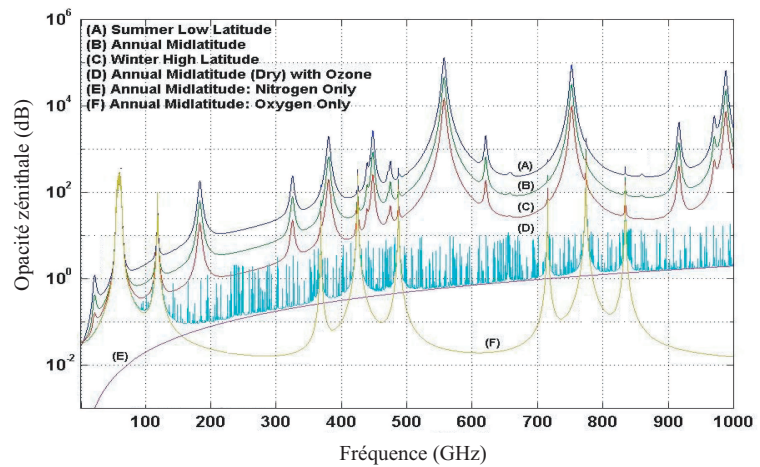


Fig. 1.3: Absorption atmosphérique le long d'un chemin zénithal [24].

L'atténuation spécifique du signal dans l'atmosphère (Fig. 1.3) permet de mettre en évidence plusieurs fenêtres fréquentielles [25] :

- les bandes 30 GHz - 40 GHz et 90 GHz - 100 GHz correspondent aux fenêtres fréquentielles de transmission (très faible niveau d'atténuation) ;
- les bandes situées autour de 60 GHz, 120 GHz et 185 GHz répondent à une forte absorption du signal radio.

Par exemple, à 60 GHz, taux d'atténuation du signal est d'environ 16 dB/km avec une ouverture à mi-puissance de l'ordre de 5 GHz. Les données extrêmement pré-

cises dans la bande 50 GHz - 70 GHz obtenues par l'équipe de Liebe [26] montrent la présence de plusieurs pics d'absorption résonante autour de 60 GHz (Fig. 1.4). L'atténuation totale à travers l'atmosphère pour cette bande est comprise entre 150 dB et 275 dB selon la fréquence.

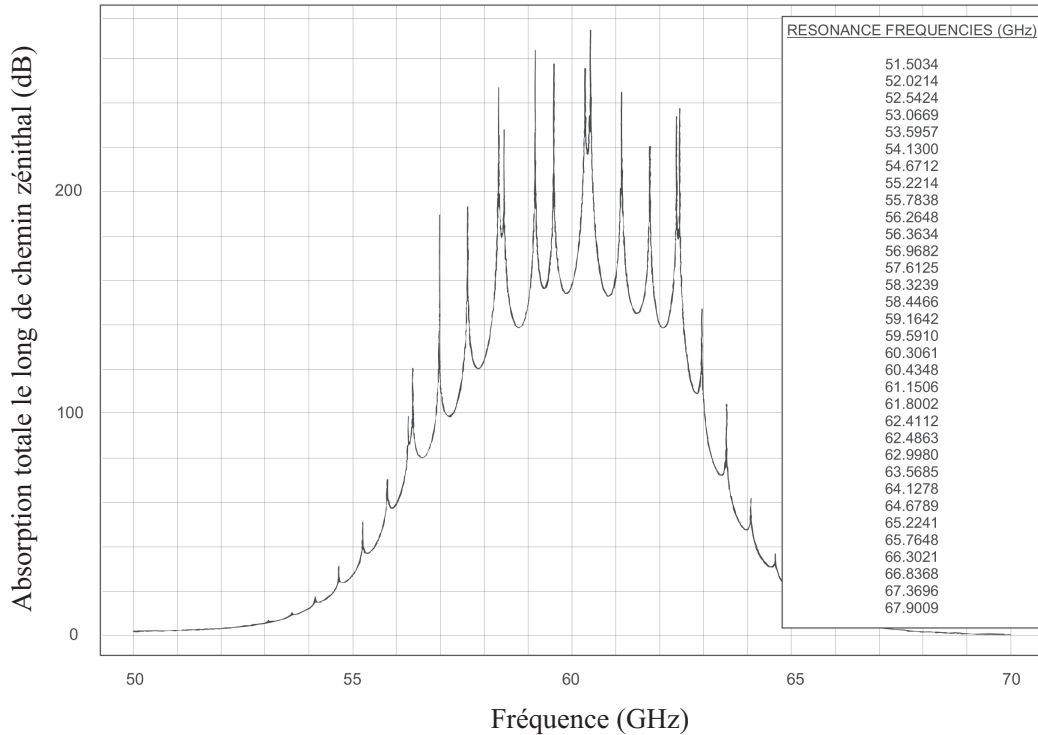


Fig. 1.4: Spectre d'absorption de  $O_2$  autour de 60 GHz (multiples lignes d'absorption).

### 1.2.2 Données de spectroscopie micro-ondes

Les données sur les spectres rotationnels des molécules diatomiques, triatomiques et hydrocarboniques sont disponibles actuellement dans la littérature scientifique. La bande de fréquences 50 GHz - 70 GHz est caractérisée par les résonances multiples des molécules diverses, y compris les molécules qui jouent un rôle important dans le fonctionnement des cellules biologiques. Par exemple, 1442 lignes résonantes sont identifiées pour les fréquences comprises entre 55 GHz et 65 GHz [27]. 376 de ces lignes d'absorption résonante sont concentrées entre 59 GHz et 61 GHz. La coïncidence des fréquences de fonctionnement de systèmes de communications avec les fréquences de résonances des groupes moléculaires pourrait être une des causes de sélectivité des effets biologiques.

## 1.2.3 Systèmes de communications à 60 GHz

### 1.2.3.1 Wireless Local Area Network (WLAN)

La notion de “réseaux locaux sans-fil (WLANs)” recouvre un ensemble de technologies permettant d'établir un réseau informatique sans utilisation de câblage pour les liaisons : ce câblage est remplacé par des communications radio (Fig. 1.5). A l'ori-



Fig. 1.5: Exemple d'un système WLAN.

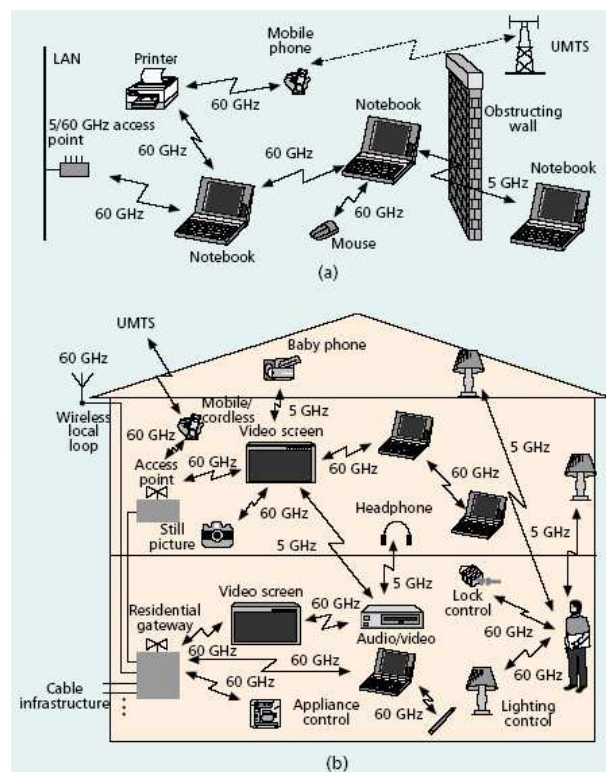


Fig. 1.6: Exemples des systèmes WLANs 5 GHz/60 GHz dans l'environnement a) de travail ; b) domestique [28].

gine, les WLANs étaient destinés à remplacer une infrastructure filaire limitée à une zone géographique très restreinte. Les réseaux sans fil se sont avant tout développés comme réseaux internes, propres à un bâtiment : soit comme réseau d'entreprise, soit comme réseau domestique (Fig. 1.6). Les avantages de ces systèmes sont multiples : confidentialité et sécurité de communications, réduction des interférences entre pico-cellules adjacentes, faible encombrement des systèmes, *etc.*

Les systèmes WLANs utilisés actuellement sont basés sur les standards IEEE 802.11. Les bandes de fréquence impliquées sont 2.4 GHz - 2.48 GHz ; 5.15 GHz - 5.35 GHz ; 5.725 GHz - 5.825 GHz. Récemment, les fréquences autour de 40 GHz et 60 GHz ont

été considérées comme très prometteuses pour les systèmes WLANs de quatrième génération (4G) [21, 28]. Le choix de la fréquence est essentiellement déterminé par les particularités de propagation dans l'atmosphère [23, 29]. La zone de propagation dans l'espace libre est limitée à 2-3 kilomètres (l'atténuation est de l'ordre 30 dB) et le signal est fortement absorbé par les matériaux solides. Ces propriétés permettent le positionnement proche des points de communication assurant ainsi l'utilisation très efficace du spectre et la confidentialité de transmission des données. Environ 8 GHz de bande fréquentielle sont disponibles autour de 60 GHz pour les communications sans fil à courte portée. Selon le pays, entre 3 GHz et 7 GHz ont été attribués aux WLANs 4 G [28].

### 1.2.3.2 Wireless Personal Area Network (WPAN)

Les "réseaux personnels sans fil (WPANs)" sont destinés à assurer les communications multi-media à haut débit dans l'infrastructure des réseaux locaux. Les WPANs permettent la connections sans fil entre les dispositifs centrés autour de l'espace de travail personnel, ce qui assure la flexibilité du système. La zone de fonctionnement de WPAN est restreinte à environ 10 mètres, ce qui permet son utilisation dans une pièce ou dans l'espace du bureau. Ils peuvent être également utilisés dans les cas plus spécifiques, par exemple pour permettre la communication entre les chirurgiens et autres membres de l'équipe pendant l'opération. Les débits sont plus élevés (la valeur ciblée est de 2 Gb/s [30]) et les distances de communications plus courtes par rapport aux systèmes WLANs IEEE 802.11. Les systèmes WPANs sont actuellement en cours de standardisation par le comité IEEE 802.15 [31] créé en 2002. Les fréquences autour de 60 GHz sont considérées comme les fréquences les plus attractives pour WPANs [32].



### 1.3 Conclusion

Le développement des systèmes de communications dans la bande de fréquences millimétriques dû au progrès dans le domaine de communications et à la saturation du spectre radio pose la question sur la sécurité environnementale et sur les risques potentiels sanitaires. Les systèmes de communications sans fil intra-batiment avec les fréquences de fonctionnement comprises entre 57 GHz et 64 GHz vont apporter dans notre environnement les fréquences qui sont initialement absentes dans le spectre naturel. Les données de spectroscopie micro-ondes montrent la présence de résonances pour plusieurs groupes moléculaires autour de 60 GHz, ce qui peut être à l'origine des effets biologiques potentiels. Ce sont les raisons principales qui montrent la nécessité d'une étude approfondie des effets biologiques du rayonnement millimétrique au niveau cellulaire et qui déterminent essentiellement le choix de la bande de fréquence étudiée dans ce travail de thèse.

# Chapitre 2

## Bibliographie

Pour situer notre travail de thèse, il est important de considérer les résultats qui ont été publiés dans la littérature scientifique sur les effets biologiques des champs EMs durant ces dernières années. Les travaux publiés sur ce sujet peuvent être divisés selon les différents paramètres physiques et biologiques étudiés :

1. Paramètres biologiques :
  - études sur l’homme, sur l’animal ou *in vitro* ;
  - fonctions biologiques étudiées ;
2. Paramètres physiques :
  - fréquence ;
  - autres paramètres d’exposition (zone de rayonnement, densité de puissance, modulation, polarisation, régime temporel d’exposition) ;
3. Études biophysiques des modèles artificiels.
4. Études des mécanismes biologiques et physiques des interactions bioélectromagnétiques.

En fonction du type d’exposition et des fréquences considérées, les études bioélectromagnétiques sont orientées selon cinq directions de recherches principales :

- Les impulsions électriques ultracourtes de haute intensité concernant les applications thérapeutiques [33] ;
- Les champs magnétiques statiques ;
- Les champs EMs très basse fréquence (50 Hz et 60 Hz), dont les sources courantes sont constituées des lignes électriques haute-tension et des appareils domestiques électriques ;
- Les radio-fréquences (entre 0.9 GHz et 5.4 GHz). Cette bande correspond aux applications actuelles de la téléphonie mobile et de la grande majorité des sys-

tèmes sans fil ;

- Les OMs pour les applications médicales développées dans certains pays de l’Europe de l’Est (voir section I.2.11 Applications thérapeutiques des ondes millimétriques).

Dans cette étude bibliographique, nous considérerons les récentes publications scientifiques qui portent essentiellement sur les effets biologiques des OMs et des micro-ondes. Les travaux publiés dans la littérature scientifique avant 1998 sont résumés dans un article de Pakhomov *et al.* [34].

La bibliographie décrite dans ce chapitre n’est pas exhaustive et ne représente que les études les plus appropriées à ce travail de thèse. Nous résumerons les travaux qui portent sur les effets thermiques et non-thermiques, sur les mécanismes d’interactions, ainsi que sur les effets des OMs sur les solutions biologiques. Nous considérerons également différents systèmes d’exposition en micro-ondes, et particulièrement en bande millimétrique. Ensuite nous résumerons les publications bioélectromagnétiques sur les membranes cellulaires, l’expression génétique, la génotoxicité et le développement du cancer, ainsi que sur les effets oculaires et les effets sur l’activité neuronale. Prenant en compte le caractère superficiel de l’absorption des OMs, nous considérerons séparément les effets observés pour la peau. Les applications thérapeutiques des OMs de faible intensité seront décrites à la fin de ce chapitre.

## 2.1 Effets biologiques thermiques et non-thermiques

Les effets thermiques des micro-ondes et des OMs sont étudiés depuis longtemps et ils sont relativement bien connus. Pour les tissus biologiques, les effets thermiques sont les effets causés par l’élévation de la température. Les effets biologiques thermiques sont *indirects* car ils sont produits par l’intermédiaire de l’échauffement. Les effets non-thermiques peuvent être définis comme les effets produits *directement* par les champs EMs appliqués [35]. La caractéristique utilisée pour quantifier les effets thermiques est le SAR pour les micro-ondes et la densité superficielle de puissance pour les OMs.

### 2.1.1 Micro-ondes

Parmi les travaux qui portent sur la détermination de seuil de l’effet thermique des micro-ondes chez l’homme, nous pouvons citer les études de Adair *et al.* [36,

[37, 2001], [38, 2003]. Les auteurs ont étudié l'effet thermique des micro-ondes sur la température centrale du corps humain. Les volontaires ont été exposés aux micro-ondes à 2.45 GHz pendant 45 min avec un SAR local de 15.4 W/kg (70 mW/cm<sup>2</sup>) [36, 2001]. Pour différentes températures ambiantes de 24°C à 31°C les auteurs ont constaté que la circulation sanguine et la transpiration ont maintenu la stabilité de la température centrale. Dans un autre travail d'Adair *et al.* [37, 2001], les volontaires ont été exposés avec les mêmes conditions mais aux micro-ondes pulsées (impulsions de 65  $\mu$ s à 10 kHz de récurrence) à un SAR local de 7.7 W/kg. Les auteurs ont observé une augmentation de la température de la peau à la surface du dos. Cependant, la température centrale du corps restait constante.

### 2.1.2 Ondes millimétriques

Le seuil de puissance au delà duquel apparaît un effet d'échauffement de la peau senti par l'organisme a été mesuré à 2.45, 7.5, 10.35 et 94 GHz dans le travail de Blick *et al.* [39, 1998]. La valeur de la densité superficielle de puissance diminuait selon la fréquence et était de  $4.5 \pm 0.6$  mW/cm<sup>2</sup> à 94 GHz et de  $63.1 \pm 6.7$  mW/cm<sup>2</sup> à 2.45 GHz. Le rayonnement infrarouge (IR) était utilisé pour comparer l'effet des différentes bandes de fréquence. La valeur de densité de puissance à 94 GHz était proche de celle mesurée pour le rayonnement IR ( $5.34 \pm 1.07$  mW/cm<sup>2</sup>).

Dans leur travail, Walters *et al.* [40, 2000] ont déterminé le seuil de douleur due à l'effet thermique des OMs chez les hommes exposés à 94 GHz avec un SAR de 1.8 W/cm<sup>2</sup>. Pendant chaque exposition, la température de la peau a été mesurée par thermométrie infrarouge. Le seuil de sensibilité à l'exposition a été trouvé à  $43.9 \pm 0.7$ °C ce que correspond à une augmentation de la température de 9.9°C.

Pour les fréquences millimétriques, les études les plus récentes se rapportent à un travail d'Alekseev *et al.* [41, 2003], [42, 2005]. Les auteurs ont étudié l'influence de la circulation sanguine sur l'échauffement local de la peau (avant-bras et médus) exposés à 42.25 GHz par un guide ouvert (la densité maximale de puissance est de 208 mW/cm<sup>2</sup>) ou en utilisant un dispositif thérapeutique YAG (la densité maximale de puissance égale à 55 mW/cm<sup>2</sup>). Dans les conditions ambiantes normales et avec une densité superficielle de puissance de 208 mW/cm<sup>2</sup>, l'élévation de la température ( $\Delta T$ ) du médus ( $2.5 \pm 0.3$ °C) avec une circulation sanguine plus élevée est inférieure à celle obtenue pour l'avant-bras ( $4.7 \pm 0.4$ °C). Les auteurs ont montré que l'exposition aux OMs induit l'échauffement des couches des tissus situées au-dessous de la profondeur

de pénétration (0.56 mm). Ainsi il a été montré que les OMs d'intensité suffisante peuvent affecter les structures thermosensibles situées dans la peau ou les couches superficielles des tissus.

La distribution superficielle de la température pour les mêmes conditions d'exposition a été calculée analytiquement et confirmée par les mesures (thermographie infrarouge) dans une autre étude du même groupe [43, 2003].

Dans leur travail Riu *et al.* [44, 1997] ont montré que ce sont les processus de conductibilité thermique et non pas la circulation du sang qui jouent un rôle essentiel pour le refroidissement de la peau pendant l'exposition.

## 2.2 Étude des mécanismes d'interaction

Avant de citer les travaux bibliographiques sur les mécanismes biophysiques des interactions ondes-vivant, il est important de considérer quelques aspects généraux des interactions bioélectromagnétiques non-thermiques.

Des charges et des courants électriques existent à l'état naturel dans l'organisme humain et constituent une partie essentielle des fonctions organiques normales. Tous les nerfs transmettent leurs signaux par des impulsions électriques. La plupart des réactions biochimiques, depuis celles associées à la digestion jusqu'à celles impliquées dans l'activité cérébrale, font intervenir des phénomènes électriques.

Selon la fréquence, les mécanismes d'action des champs EMs sur les systèmes biologiques sont fondamentalement différents. Cette différence est déterminée par l'énergie de quantum de champ EM, les effets de résonance, la profondeur de pénétration des ondes EMs dans le milieu biologique, *etc.* Les principes physiques suggèrent que l'énergie des photons des rayonnements non-ionisants n'est pas suffisante pour casser les liaisons chimiques ou amorcer les réactions chimiques dans les cellules biologiques [45,46]. Par exemple, pour le rayonnement millimétrique, l'énergie des photons est  $10^3$  fois plus faible que l'énergie de liaison avec les atomes d'hydrogène [47]. La complexité des systèmes biologiques rend difficile l'identification des mécanismes exactes des interactions bioélectromagnétiques. La cible des ondes EMs concerne plutôt les interactions intermoléculaires faibles qui jouent un rôle important dans le fonctionnement des systèmes biologiques. Les interactions bioélectromagnétiques peuvent être liées à la présence du moment dipolaire et aux degrés de liberté mécaniques dans les biomolécules.

Barnes *et al.* [48, 1977] ont étudié les mécanismes d'actions non-thermiques des micro-ondes sur les systèmes biologiques. Les résultats des calculs analytiques ont montré les modifications des flux des ions à travers des membranes biologiques et les changements d'orientation de chaînes moléculaires dues à l'exposition aux micro-ondes.

Dans son travail, Cain [49, 1980] a présenté un modèle de mécanisme non-thermique d'interaction entre les micro-ondes et les membranes cellulaires. L'auteur a montré analytiquement que les micro-ondes de faible intensité peuvent changer la conductivité d'une membrane par rapport aux ions qui traversent les canaux membranaires.

Récemment, Stoykov *et al.* [50, 2004] ont proposé un modèle d'activation des canaux ioniques de sodium par le champ EM modulé en amplitude.

Kotnik *et al.* [51, 2000] ont étudié théoriquement la dissipation d'énergie dans le modèle sphérique de cellule biologique en fonction de la fréquence. Les auteurs ont montré que pour les micro-ondes et les OMs les dissipations de puissance dans les cellules sont localisées. Ces résultats présument que l'exposition aux rayonnements EMs qui ne produisent pas d'augmentation significative de la température au niveau macroscopique peut être la cause d'effets locaux. Les auteurs ont suggéré que la membrane cellulaire puisse être l'endroit spécifique d'une absorption des micro-ondes plus importante que l'intérieur de la cellule ou le milieu extracellulaire.

Wachner *et al.* [52, 53, 2002] ont étudié théoriquement l'absorption d'énergie du champ EM dans les modèles des cellules biologiques. Ils ont conclu que la distribution du champ électrique interne et l'absorption du champ EM dépendent fortement de la géométrie de la cellule.

Picard *et al.* [54, 2001] ont montré théoriquement que l'absorption multiphotonique et l'effet direct du champs EMs dans la bande 300 MHz - 3 GHz sur les ions ne peuvent pas être l'origine d'un effet non-thermique au niveau cellulaire.

Dans son travail, Adair [55, 2003] a montré qu'aucun phénomène physiologique n'est prévisible aux fréquences utilisées autour de 1 GHz à faible niveau de puissance incidente (inférieur à  $10 \text{ mW/cm}^2$ ).

Dans un travail récent de Dubost *et al.* [56, 2006], les auteurs ont proposé un mécanisme d'induction de la protéine de stress HSP 27 par le rayonnement infrarouge de faible puissance. Des fibroblastes 3T3 de souris et des cellules épithéliales CV1 ont été irradiées en infrarouge proche à  $0.8 \mu\text{m}$  avec une densité de puissance de  $0.2 \text{ mW/cm}^2$  (le champ électrique est de  $40 \text{ V/m}$ ). La pression de radiation interne à la cellule

entraîne un stress. La protéine de stress HSP 27 qui intervient dans l'allongement des filaments d'actine lors du déplacement cellulaire est synthétisée par la cellule. Sa phosphorylation détermine la mobilité de la cellule via le cytosquelette.

### 2.3 Effets sur les solutions aqueuses

L'eau joue un rôle important dans le fonctionnement des systèmes biologiques. Plus de la moitié de la masse du corps est constituée de l'eau. Les résonances moléculaires d'eau dans la bande de fréquences 1 GHz - 200 GHz sont localisées autour de 22 GHz et de 182 GHz. Un certain nombre d'études ont montré des modifications des propriétés de l'eau après l'exposition aux OMs de faible puissance [57–59].

Les effets biologiques non-thermiques sont étudiés dans une vaste bande de fréquences (de zero hertz jusqu'aux centaines de gigahertz) et pour de différents niveaux de densité superficielle de puissance (de quelques  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  jusqu'à plusieurs  $\text{mW}/\text{cm}^2$ ). Fesenko *et al.* [57, 1995] ont suggéré que pour la plupart des effets biologiques observés en micro-ondes et en millimétrique c'est l'eau qui joue un rôle de récepteur primaire. L'eau représente un "intermédiaire" entre le rayonnement EM et les cellules biologiques. Dans leurs expériences, les auteurs ont caractérisé l'état de l'eau par les variations du spectre de densité de puissance d'oscillations de la tension pendant le rechargement du condensateur. La durée de l'exposition est de 10 min, les puissances utilisées sont de  $50 \mu\text{W}$  et de  $50 \text{mW}$ . La présence d'un effet prolongé sur l'eau distillée ( $21^\circ\text{C}$ , pH 6.0) a été observée pendant et après l'exposition à 36 GHz. Les résultats ont montré que l'état de l'eau peut être changé par le rayonnement millimétrique de faible puissance. L'influence de l'exposition est plus importante et plus durable pour la puissance de  $50 \mu\text{W}$ . Le nouvel état de l'eau se conserve après l'exposition. Les auteurs ont supposé que les changements prolongés des propriétés de l'eau peuvent jouer un rôle dominant dans les interactions entre les OMs et les milieux biologiques. Cet effet doit être pris en considération pour l'interprétation des résultats d'expérimentations au niveau cellulaire.

Dans un autre travail de Fesenko *et al.* [58, 1995], l'effet des OMs a été étudié en comparant le pouvoir activateur de solutions salines (+/- irradiées) sur l'ouverture des canaux à potassium-dépendant du calcium, dans des cellules de rein. Une solution saline contenant  $100 \text{mmol/l}$  de KCl (ainsi que du calcium) a été exposée ou non pendant 20 min à 42.25 GHz (signal continu). Les auteurs ont ensuite montré que

le remplacement de la solution d'eau saline non-exposée par la solution pré-exposée ( $2\text{ mW/cm}^2$ ) induit des changements d'activité des canaux à potassium des cellules modèles. La solution "retient" le nouvel état induit par les ondes, pendant 10 à 20 min après l'exposition. Il semble donc que la solution aqueuse irradiée acquiert de nouvelles propriétés qui sont importantes pour l'activité des canaux ioniques. La nature de ces changements n'est pas connue, mais les résultats obtenus sont compatibles avec une autre étude qui avait regardé la perméabilité ionique de cellules exposées pendant 20-30 min aux OMs à 42.25 GHz, avec une densité superficielle de puissance de  $100\ \mu\text{W/cm}^2$  [60, 1995].

Les résultats des travaux décrits ci-dessus doivent être pris avec la précaution et ils exigent la réplication. Aucune preuve sérieuse n'a été apportée dans la littérature scientifique d'une "mémoire" de l'eau, soumise aux ondes EMs.

## 2.4 Systèmes d'exposition pour les expériences *in vitro*

La compréhension des mécanismes d'interactions des ondes EMs avec les systèmes biologiques est souvent basée sur des données expérimentales. En conséquence, la reproductibilité des données obtenues dans les expériences bioélectromagnétiques joue un rôle essentiel. La précision et la répétition des résultats des tests biologiques sont assurées par une statistique sur l'ensemble des échantillons étudiés. D'autre part, les paramètres d'exposition doivent être strictement contrôlés et le champ EM doit avoir la distribution la plus homogène possible sur la surface de l'objet biologique étudié pour tous les échantillons (la valeur cible est voisine de 30% [61]).

Un grand nombre de systèmes expérimentaux pour les études *in vivo* et *in vitro* a été décrit dans la littérature scientifique. Un système d'exposition est caractérisé par :

- la fréquence centrale, la bande passante, la stabilité de fréquence ;
- le niveau de puissance de sortie, le niveau de bruit, la stabilité de puissance ;
- la distribution du champ EM dans l'espace libre et au niveau des objets biologiques étudiés ;
- la polarisation, la modulation du champ incident ;
- le régime d'exposition (durée, intermittence, *etc.*).

Outre le système d'exposition, les dispositifs d'expérimentation comprennent un incubateur avec contrôle des paramètres ambiants : température, humidité, concen-



tration de  $\text{CO}_2$ , *etc.* En règle générale, les systèmes expérimentaux comportent une source micro-ondes et une unité de contrôle des conditions ambiantes. Ils peuvent être divisés en deux catégories : ouverts et fermés [62]. Dans les systèmes du type fermé, la source de rayonnement et l'unité de contrôle des conditions ambiantes (souvent incubateur  $\text{CO}_2$ ) sont communs [61, 63–65]. Dans les systèmes ouverts, les dispositifs d'exposition et l'incubateur sont séparés [62].

### 2.4.1 Micro-ondes

Dans leur travail, Schönborn *et al.* [61, 2000] décrivent un dispositif expérimental qui permet l'exposition des cellules dans la bande de fréquences 1.2 GHz - 1.7 GHz et l'utilisation des différents types de modulation intervenants dans les systèmes de communications existants et futurs. Les boîtes de Petri sont localisées au niveau des maxima de champs électriques dans un guide rectangulaire R14 de dimensions  $165.1 \text{ mm} \times 82.6 \text{ mm}$  (Fig. 2.1). Les variations maximales de distribution de densité de puissance pour chaque boîte est de 40%. Grâce à un incubateur ( $620 \text{ mm} \times 545 \text{ mm} \times 700 \text{ mm}$ ), les conditions ambiantes sont strictement contrôlées : température  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , concentration de  $\text{CO}_2$ , humidité supérieure à 90%. Ce système a été utilisé pour l'étude des modifications et des défauts dans le fonctionnement des cellules embryonnaires.

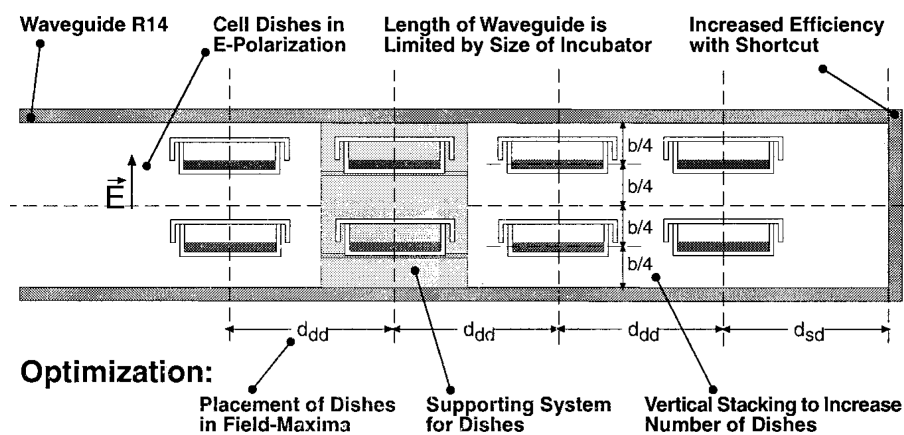


Fig. 2.1: Système d'exposition *in vitro* (1.2 GHz-1.7 GHz) [61].

Laval *et al.* [64, 2000] ont utilisé une antenne imprimée de type patch ( $150 \text{ mm} \times 150 \text{ mm} \times 29 \text{ mm}$ ) à 900 MHz . Quatre boîtes de Petri (35 mm de diamètre) ont été placées dans la cavité de l'antenne (Fig. 2.2). Ce système permet d'obtenir une valeur de champ électrique assez élevée (1.3 kV/m pour la puissance de sortie maximale de 1 W) par rapport aux autres systèmes utilisés [66, 1996] (240 V/m pour la puissance

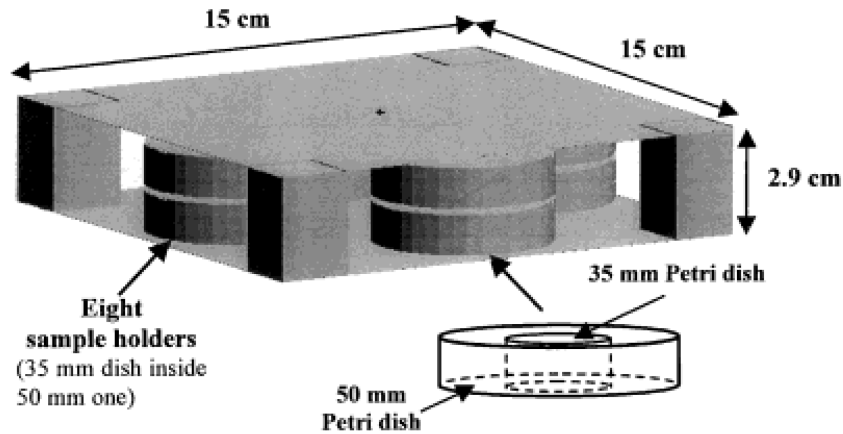


Fig. 2.2: Antenne patch filaire avec les boîtes de Petrie à l'intérieur [64].

de 1 W). Les variations de SAR pour les cellules étudiées ont été estimées à 20% par des simulations EM basées sur la méthode FDTD. Ce dispositif est compact et placé dans une étuve dont la température est maintenue à 37°C.

Un système d'exposition de type ouvert comprenant une antenne cornet pyramidal et des lentilles diélectriques a été développé par Iyama *et al.* [62, 2004] (Fig. 2.3). Le dispositif fonctionnant à 2.14 GHz est placé dans une chambre anéchoïde per-

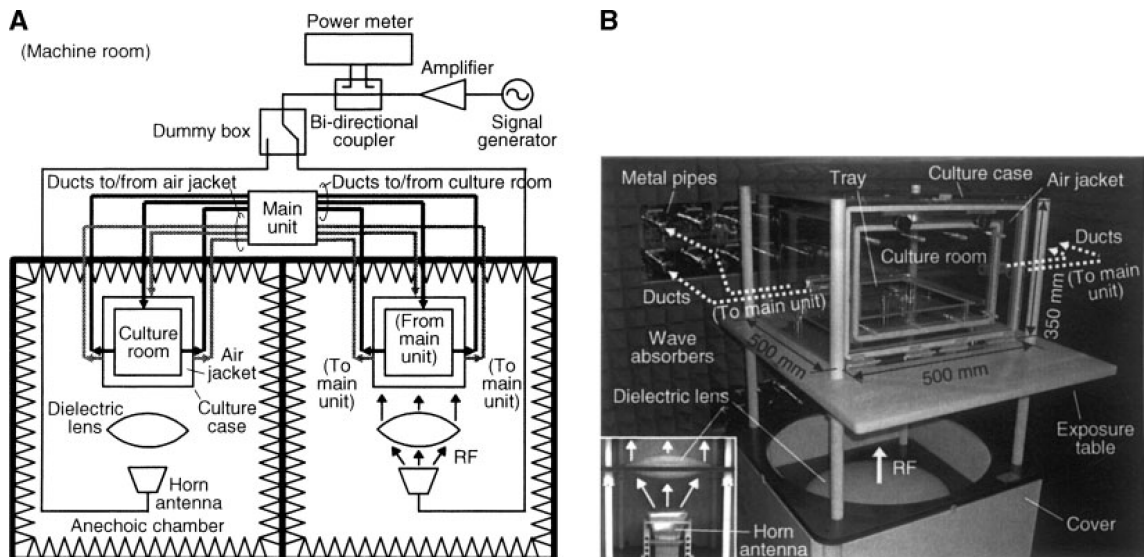


Fig. 2.3: Système d'exposition pour les expériences *in vitro*. Ce système comprend une antenne pyramidale et une lentille diélectrique. A) Diagramme schématique, B) Photographie du système dans la chambre anéchoïde [62].

mettant ainsi l'exposition d'un grand nombre de boîtes de Petri simultanément (la surface exposée est de 300 mm × 300 mm ; 25 boîtes de Petri). La fréquence utilisée

dans les expériences correspond à la fréquence centrale de IMT - 2000<sup>1</sup>. Les variations de champ électrique sont de  $\pm 1.5$  dB. Une lentille diélectrique de gain de 7 dB focalise le rayonnement dans la direction de la boîte de culture pour assurer une distribution uniforme de champ. Les mesures de distribution de champ sans lentille donnent une valeur de variation de  $\pm 3$  dB. Les cellules se trouvent dans une boîte de dimensions de 250 mm  $\times$  400 mm  $\times$  400 mm à  $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$  sous conditions ambiantes contrôlées (la concentration de CO<sub>2</sub> est de 5%, la taux d'humidité est supérieur à 90%). Les cellules exposées et les cellules témoins sont placées dans deux incubateurs différents sous les mêmes conditions ambiantes. La valeur de SAR calculée en utilisant la méthode FDTD est estimée à 0.175 W/kg pour une puissance de sortie de 1 W. Ce système a été utilisé pour étudier le changement de prolifération dans la lignée de cellules H4 après 72 heures d'exposition aux micro-ondes.

## 2.4.2 Ondes millimétriques

La réalisation de système de type fermé dans la bande millimétrique est limitée par les dimensions des guides ( $\sim \lambda_0/2$ ) par rapport aux dimensions des échantillons étudiés. Les systèmes d'exposition de type ouvert utilisent soit les conditions du champ proche [67], soit celles de rayonnement en champ lointain [68]. Dans le premier cas, l'échantillon est placé près de l'antenne dans la zone de Rayleigh où la distribution de champ est fortement non-homogène et difficile à caractériser. Cette inhomogénéité spatiale est parfois faussement interprétée comme la sélectivité des effets biologiques par rapport à la fréquence [69]. Par ailleurs, la présence d'un objet dans la zone proche perturbe la distribution des courants équivalents sur l'ouverture de l'antenne et ainsi modifie la distribution du champ EM.

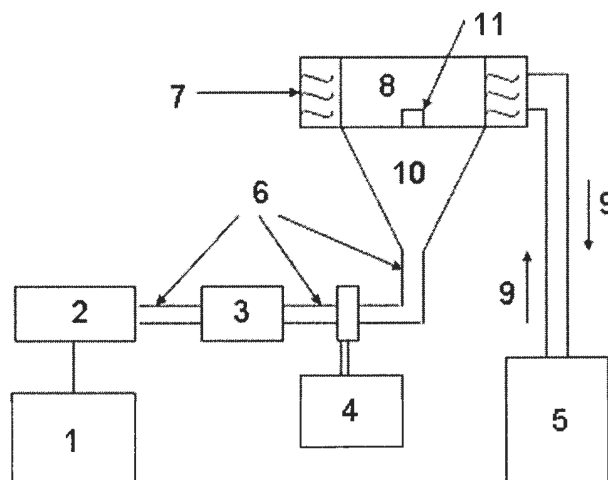
Les systèmes d'expositions en millimétrique utilisés dans les études bioélectromagnétiques récentes sont décrits ci-dessous.

Chen *et al.* [67, 2004] ont étudié l'effet des OM à 30.16 GHz sur les jonctions communicantes dans les kératinocytes HaCaT. Les cellules sont placées dans la zone de champ proche pendant une heure (Fig. 2.4).

Szabo *et al.* [70, 2001], [71, 2003] ont étudié l'influence des OM à 61.22 GHz sur les cellules kératinocytes HaCaT. Le système d'exposition comprend un générateur G4-142, un wattmètre ML4803 A, un analyseur de spectre Hewlett Packard 8565 B.

---

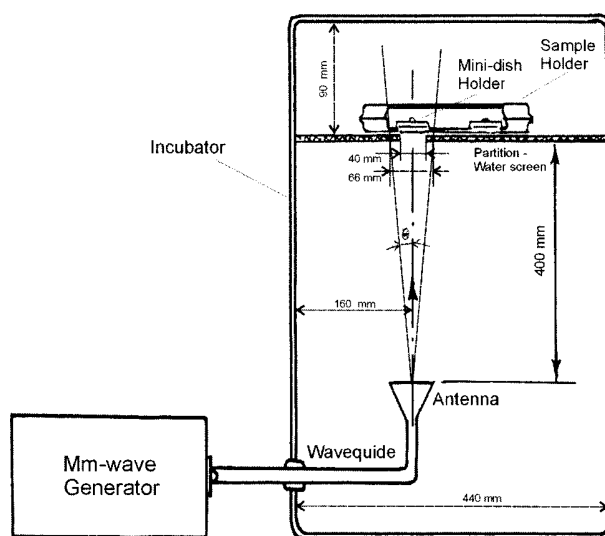
<sup>1</sup> International Mobile Telecommunication 2000 cellular system



**Fig. 2.4:** Dispositif d'expérimentation et système d'exposition à 30.16 GHz : (1) cuve avec les cellules, (2) générateur, (3) atténuateur, (4) contrôle de fréquence, (5) pompe thermostatique, (6) guides, (7) circulation d'eau thermostatique, (8) chambre d'exposition, (9) circulation d'eau, (10) antenne cornet pyramidal, (11) échantillon [67].

Une boîte de Petri avec 24 puits est placée au-dessus d'une antenne cornet pyramidal (16 mm × 16 mm). La durée d'exposition est de 15-30 min, la densité superficielle de puissance est de  $29 \pm 2$  mW/cm<sup>2</sup> et le SAR correspondant est de  $770 \pm 42$  W/kg.

Dans leur travail, Safronova *et al.* [68, 2002] ont utilisé la zone lointaine d'exposition. Deux plaques de culture avec 6 puits par plaque ont été exposées à un rayonnement continu à 41.95 GHz dans un incubateur (à une température ambiante de 20°C). Une antenne cornet pyramidal (40 mm × 40 mm) a été placée au fond d'incubateur à la distance de 40 cm de culture cellulaire (Fig. 2.5). La puissance de sortie



**Fig. 2.5:** Dispositif d'expérimentation et système d'exposition à 41.95 GHz [68].

du générateur correspond à une densité superficielle de puissance de  $150 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ . Le système assure une bonne homogénéité de distribution de puissance sur l'objet biologique étudié ( $\theta \approx 4.7^\circ$ ).

Un système d'exposition dans la bande de fréquences 41 GHz - 43 GHz a été développé par Yu *et al.* [72, 2002] pour étudier l'effet des OMs sur le taux d'accroissement et le spectre d'absorption de *E. coli* (Fig. 2.6). Les échantillons contenant la suspension

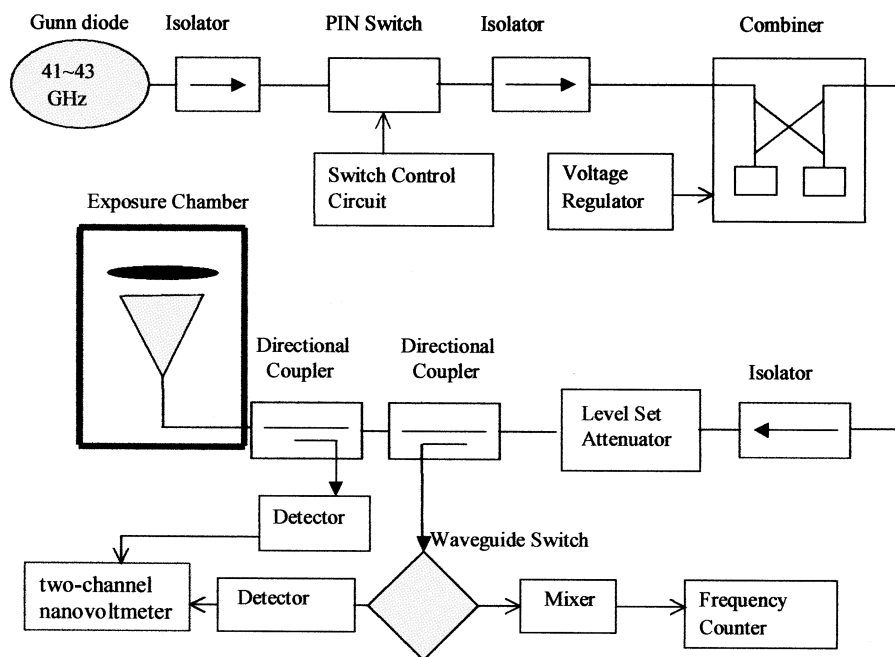


Fig. 2.6: Système d'exposition à 41 GHz - 43 GHz [72].

de *E. coli* dans des plaques 12 puits ont été placés sur l'ouverture de l'antenne cornet pyramidal. La densité superficielle de puissance maximale au centre de la plaque a été estimée à  $32 \text{mW}/\text{cm}^2$ . Les échantillons ont été exposés pendant 40 min.

## 2.5 Effets sur les membranes biologiques

Dans cette section nous considérerons les effets des micro-ondes et des OMs sur les membranes biologiques naturelles et sur les modèles artificiels des biomembranes. Il est intéressant de noter que certaines études sur les mécanismes des interactions bioélectromagnétiques indiquent que les membranes biologiques sont un site spécifique d'action des rayonnements haute fréquence (voir section I.2.2 Étude des mécanismes d'interaction). Le rappel sur la constitution et les fonctions des membranes biologiques ainsi que les modèles artificiels des biomembranes seront présentés dans la partie II

de ce manuscrit (voir chapitre II.3 Membranes biologiques et chapitre II.4 Modèles artificiels des membranes biologiques).

### 2.5.1 Micro-ondes

Kim *et al.* [73, 1985] ont étudié l'effet des micro-ondes à 900 MHz et à 340 MHz sur les membranes des erythrocytes. L'exposition au rayonnement à 900 MHz ( $10 \text{ mW/cm}^2$ ) a diminué la viscosité des lipides et a modifié l'état structural de la région de contact lipide-protéine. Ces changements coïncident avec les modifications dues à l'action thermique des micro-ondes.

Dans leur travail, Rotkowska *et al.* [74, 1993] ont étudié *in vitro* les membranes des cellules de la moelle exposées à 2.45 GHz (CW, SAR de  $12 \text{ W/kg}$ ). Les auteurs ont constaté l'absence de changements structuraux dans l'interface protéine-lipide après 9 min d'exposition.

Les propriétés biophysiques des modèles lipidiques des membranes biologiques ont été étudiées par Ioffe *et al.* [75, 2004]. Les bicouches phospholipidiques (liposomes) ont été exposées à un rayonnement à 1.885 GHz avec une densité superficielle de puissance de  $0.9 \text{ mW/cm}^2$ . En utilisant des marqueurs fluorescents localisés dans la membrane, les auteurs ont observé une différence entre les spectres fluorescents des membranes exposée et non exposée. La réponse de la membrane à l'exposition était différente pour les diverses compositions des bicouches phospholipidiques.

Une autre étude sur les propriétés biophysiques des liposomes a été réalisée récemment par Gaber *et al.* [76, 2005]. Les changements de perméabilité des liposomes après 5 heures d'exposition à 900 MHz ( $12 \pm 1 \text{ W/kg}$ ) ont été étudiés par LST (Light Scattering Technique). Les résultats ont montré des modifications conformationnelles d'organisation des chaînes hydrocarbonées, mais pas de changements dans la structure des têtes polaires des lipides.

### 2.5.2 Ondes millimétriques

Petrov [77, 1990] a montré des changements du potentiel membranaire induit par les OMs. L'auteur a utilisé un rayonnement millimétrique à 42 GHz avec une densité superficielle de puissance de  $10 \text{ mW/cm}^2$ . L'exposition aux OMs a modifié la différence des potentiels de la membrane plasmique dans des cellules végétales.

Alekseev *et al.* [78, 1995] ont étudié l'influence des OMs dans la bande de fréquences allant de 54 GHz à 76 GHz sur la capacité et la conductivité des bicouches lipidiques dans les biomembranes. Ils ont utilisé un signal modulé par impulsions (répétition de 1 à 100 pulses par sec ; ou 1000 pulses par sec) ou continu avec une puissance maximale de sortie de 20 mW. L'exposition au rayonnement millimétrique continu a diminué la capacité de la membrane de  $1.2 \pm 0.5\%$ . Le même effet était produit par un échauffement à  $1.1^\circ\text{C}$ . En même temps le courant transmembranaire induit par TPhB (tetraphenylboron anions) est augmenté de  $5 \pm 1\%$ . Le changement de conductivité des canaux ioniques formés par gramicidine A et amphotéricine B a été non significatif ( $0.6 \pm 0.4\%$ ).

Dovbeshko *et al.* [79, 2001] ont étudié les modèles artificiels des membranes biologiques en utilisant la technique de Langmuir-Blodgett. La monocouche phospholipidique a été exposée à une fréquence incluse dans la bande 54-78 GHz avec une puissance de sortie comprise entre 3 mW et 5 mW. La pression superficielle et le potentiel superficiel en fonction de l'aire moléculaire ont été enregistrés simultanément. Les auteurs ont observé le décollage entre les isothermes obtenus pour les monocouches exposées et non exposées. La monocouche était plus compressée dans le cas "membrane exposée".

Dans leur travail, Szabo *et al.* [80, 2006] ont exposé le sang aux OMs à  $42.2 \pm 2.1$  GHz avec une densité superficielle de puissance de  $34.5$  mW/cm<sup>2</sup>. Les auteurs ont observé la formation de caillots de coagulation et l'altération de la surface des membranes cellulaires après exposition. L'analyse quantitative par cytométrie de flux a montré une externalisation réversible des molécules de phosphatidylserine après 30 min d'exposition. Ces résultats suggèrent que certains effets biologiques induits par les OMs de faible puissance peuvent être initiés par les changements dans les membranes des cellules exposées.

### 2.5.3 Autres études

Dans son travail, Goltsov [81, 1999] a investigué théoriquement la distribution des microdomaines dans les membranes phospholipidiques après l'exposition aux ondes EMs à 10 kHz. Les simulations ont montré des modifications de répartition des phases phospholipidiques dans les membranes mixtes après exposition.

L'effet potentiel des OMs à 60 GHz sur les propriétés biophysiques des biomembranes artificielles est un des objets d'études de ce travail de thèse (voir partie II.

Effet du rayonnement millimétrique sur les membranes biologiques artificielles).

## 2.6 Expression génétique

Les cellules biologiques réagissent aux conditions physiologiques anormales par l'induction de l'expression génétique (voir section III.7.1 Dogme central de biologie cellulaire) de protéines cytoprotectrices, comme par exemple les protéines de choc thermique (HSPs<sup>2</sup>). Ces protéines chaperons jouent un rôle important dans la protection des cellules par leur expression en réponse aux stress protéotoxiques. D'autre part, une forte expression des HSPs de longue durée pourrait favoriser l'émergence de cancers ou de maladies neurodégénératives à cause de leur forte activité anti-apoptotique<sup>3</sup>. L'induction de l'expression des HSPs par les ondes EMs a été déjà étudiée dans une large bande de fréquence (voir section I.2.6.2 Induction de l'expression des protéines chaperons).

L'induction de la synthèse des HSPs exige l'activation de gènes spécifiques ; ce processus est réglementé par des protéines spéciales appelées facteurs de transcription (TFs<sup>4</sup>). Ces TFs se lient à des séquences spécifiques d'ADN au niveau des promoteurs<sup>5</sup> de gènes et règlent l'initiation de transcription<sup>6</sup> qui est la première étape de l'expression génétique. La nature des TFs impliqués et leur mode d'activation possible par les ondes EMs ne sont pas connues pour le moment. Les trois étapes principales de l'expression génétique seront décrites en détails dans la partie III du manuscrit (voir chapitre III.7 Rappel sur la biologie cellulaire et moléculaire).

Les études des mécanismes moléculaires impliqués dans l'induction de l'expression génétique par les rayonnements non-ionisants concernent essentiellement les champs EMs de basses fréquences (BFs). C'est pourquoi, dans cette section, la bibliographie n'est pas seulement restreinte aux micro-ondes et aux OMs.

### 2.6.1 Activation des facteurs de transcription

Les TFs peuvent être activés par de nombreux signaux responsables des stress cellulaires, y compris une exposition aux ondes EMs de BF. Il a été démontré que

---

<sup>2</sup> HSP-Heat Shock Protein

<sup>3</sup> Apoptose – mort cellulaire programmée

<sup>4</sup> TF – Transcription Factor

<sup>5</sup> Promoteur - la région d'ADN sur laquelle se fixe l'ARN-polymerase pour la transcription

<sup>6</sup> Transcription - processus par lequel la séquence d'un gène est copiée en ARN



l'exposition aux rayonnements BF peut activer certains TFs spécifiques comme AP-1, c-myc ou CREB [82–84].

Dans leur travail en 1998, Lin *et al.* [82] ont étudié la participation de la protéine Myc dans l'induction de l'expression des HSP par les ondes BF à 60 Hz. Ils ont examiné les TFs AP-1, AP-2, SP-1 dans quatre lignées de cellules humaines<sup>7</sup> après 20-120 min d'exposition au champ magnétique (8  $\mu$ T, 37 °C) ou suite à une augmentation de la température ambiante (43 °C). L'analyse par électrophorèse des cellules exposées a montré une augmentation de l'activité de fixation à l'ADN des TFs, tandis qu'aucune modification n'est notée pour le choc thermique.

Une lignée de cellules sanguines HL 60 a été exposée aux ondes BF à 50 Hz (100  $\mu$ T) pour étudier les changements potentiels de transcription [84, 2002]. Les auteurs ont examiné la liaison du TF CREB<sup>8</sup> à ADN après 10 min d'exposition à 37 °C. Le pic d'augmentation de l'activité liant le CREB a été trouvé une heure après exposition. Le retour au niveau basal a été constaté 4 heures après exposition.

Il a été proposé que les changements dans l'expression génétique dépend des interactions directes entre les ondes EMs et les mouvements des électrons dans les molécules des ADNs [85–87].

## 2.6.2 Induction de l'expression des protéines chaperons

L'organisme est doté de mécanismes lui permettant de résister aux changements de son environnement. Toutes les cellules soumises à des températures de quelques degrés au-dessus du niveau physiologique normal ou à diverses formes d'agressions chimiques ou physiques (exposition à des métaux lourds ou à d'autres agents chimiques comme l'ozone, l'hypoxie, l'anoxie, le manque de glucose ou les infections) répondent par l'induction d'une classe particulière de protéines appelées les protéines de choc thermique ou heat shock proteins (HSPs). Cette réponse cellulaire au choc thermique est un mécanisme conservé au travers de l'évolution depuis les bactéries jusqu'à l'homme. Les HSPs sont classées selon leur masse moléculaire (27 kiloDaltons<sup>9</sup> (kD), 40 kD, 70 kD, 90 kD, *etc.*) et elles font partie des molécules chaperons qui s'associent à d'autres molécules (protéines, ARNs).

---

<sup>7</sup> Lignée cellulaire - désigne les populations cellulaires qui se développent parfois en culture lorsque les cellules sont propagées à l'infini

<sup>8</sup> CREB - cyclic-AMP responsive element binding protein

<sup>9</sup> 1 Dalton - masse d'un atome d'hydrogène ( $1.67 \times 10^{-24}$ g)

Le rôle des HSPs est d'empêcher l'accumulation de protéines anormales. En tant que chaperons, les HSPs sont impliquées dans de nombreux processus pathologiques qui s'accompagnent d'altérations des protéines comme pendant les maladies chroniques et dégénératives. Ces protéines sont impliquées dans plusieurs fonctions cellulaires de base, notamment dans le repliement et l'assemblage des complexes protéiques et dans leur transport vers divers compartiments intracellulaires. Elles protègent les protéines d'une dégradation enzymatique, empêchent ou stimulent l'expression de certains gènes, jouant un rôle majeur dans la prévention des mutations et l'apparition de certains cancers [88].

Par ailleurs, certaines HSPs représentent un moyen de défense de la cellule car elles diminuent la susceptibilité des cellules à d'autres facteurs de stress, comme par exemple les facteurs pro-apoptotiques [89, 90]. Ces protéines assurent une protection lors d'un second stress et induisent ainsi une tolérance aux agressions qui suivent. L'expression de ces protéines est donc un excellent indicateur de stress imposé aux cellules.

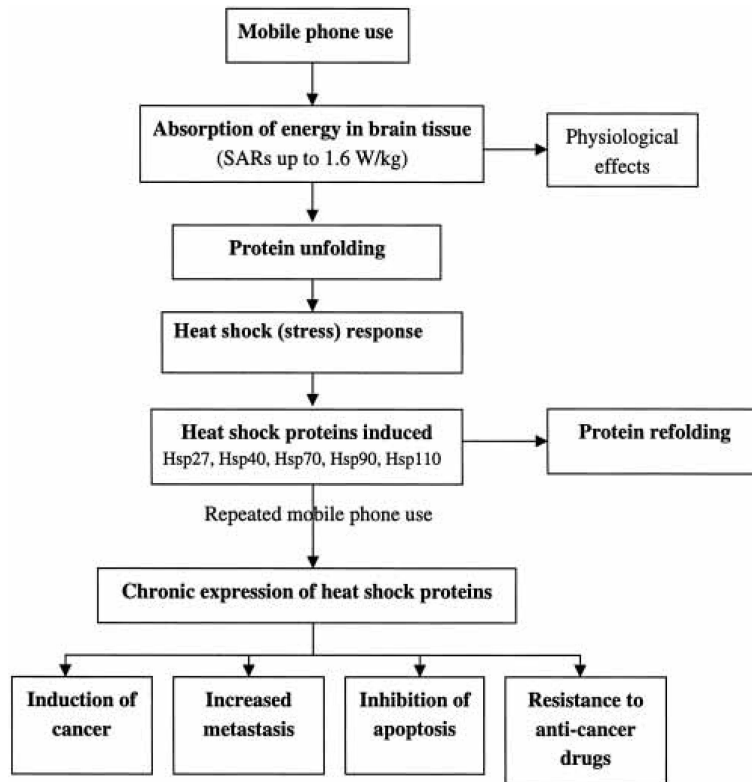
Les résultats de certaines études ont montré que les protéines de choc thermique pourraient être une cible des micro-ondes à des niveaux de puissance non-thermiques.

Cleary *et al.* [91, 1997] ont exposé les cellules HeLa pendant 2 heures à un rayonnement à 27 MHz ou à 2.45 GHz (CW) avec un SAR de 25 W/kg dans les conditions isothermiques ( $37 \pm 0.2^\circ\text{C}$ ). Ensuite les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) ont été exposées à 27 MHz avec un SAR de 100 W/kg. L'induction des HSPs a été testée après 24 heures de traitement par électrophorèse. Aucun effet sur l'induction des protéines de stress n'a été détecté dans les cellules exposées.

Dans une autre étude, une lignée de cellules humaines épithéliales amniotiques transformées (cellules AMA) a été exposée à un signal à 960 MHz (modulation d'amplitude par impulsions carrées à 217 Hz) de 2.1 mW/kg ( $E_{max} = 17 \text{ mV/cm}$ ) pendant 20 minutes [92, 2001]. Les résultats obtenus par immunofluorescence (soit immédiatement, soit 30, 60 et 90 minutes après l'exposition) ont montré une augmentation transitoire de l'expression de HSP 70 après exposition, tandis qu'aucune modification n'a été observée pour HSP 27.

Dans leur travail, French *et al.* [90, 2001] ont supposé que les micro-ondes favoriseraient le développement du cancer par l'induction de l'expression des HSPs. L'hypothèse est basée sur plusieurs publications scientifiques qui montrent le lien entre l'expression des HSPs et le développement du cancer, l'inhibition d'apoptose, et le

temps de survie [89, 2000]. Les auteurs ont proposé un schéma selon lequel l'exposition aux micro-ondes induit une expression augmentée des HSPs (Fig. 2.7).



**Fig. 2.7:** Mécanisme potentiel d'induction du cancer suite à une exposition chronique aux micro-ondes [90].

Leszczinski *et al.* [93, 2002] ont utilisé un rayonnement de monopole à 900 MHz (signal modulé par un carré; durée d'une impulsion valant 0.577 ms; fréquence d'impulsion égale à 0.2 kHz) (Fig. 2.8). Ils ont montré que l'exposition d'une heure avec un SAR de 2 W/kg à  $37 \pm 0.3^\circ\text{C}$  induit une augmentation transitoire de l'expression de HSP 27 dans les cellules endothéliales humaines (lignée EA.hy 926). La méthode de détection de l'expression de HSP 27 dans le milieu de culture est l'immunofluorescence indirecte (Fig. 2.9).

En utilisant les cellules humaines de gliome MO 54, Tian *et al.* [94, 2002] ont étudié l'expression de la protéine HSP 70 après 2, 4, 8 et 16 heures d'exposition à 2.45 GHz avec un SAR de 5, 20, 50 et 100 W/kg (0.8, 3.2, 7.8 et 13 W). Le taux de survie des cellules a augmenté de 30% après 24 heures d'exposition avec un niveau de puissance assez élevé (13 W, le SAR correspondant est de 100 W/kg). Les auteurs ont constaté l'absence de changements de l'expression de HSP 70 après l'exposition.

Dans leur travail, Szabo *et al.* [71, 2003] ont étudié l'influence du rayonnement mil-

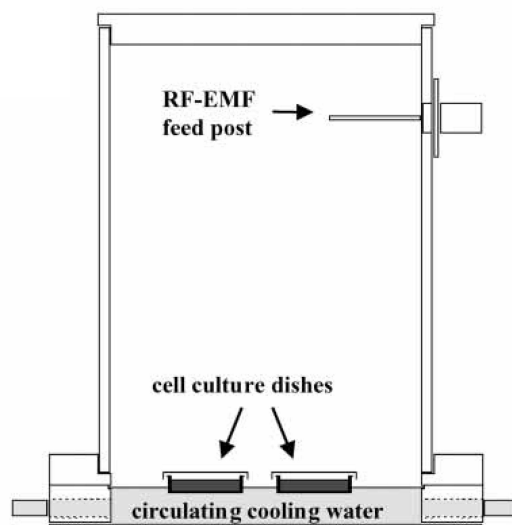


Fig. 2.8: Schéma de la chambre d'exposition à 900 MHz [93].

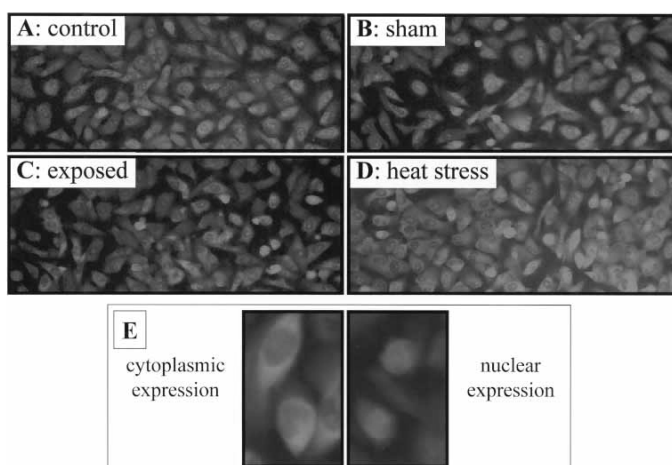


Fig. 2.9: Détection de l'expression de la protéine HSP 27 par l'immunofluorescence [93].

limétrique à  $61.2 \pm 2.1$  GHz non-modulé ( $20$  mW,  $29 \pm 2$  mW/cm<sup>2</sup>, SAR =  $770 \pm 42$  W/kg) sur l'expression des HSPs 70 dans les kératinocytes (HaCaT). L'augmentation de la température durant une heure d'exposition n'a pas dépassé  $1.6^\circ\text{C}$ . Les résultats n'ont pas montré d'augmentation de l'expression des HSPs 70 après exposition contrairement aux cas du stress thermique ( $43^\circ\text{C}$ , 1 heures) ou de l'exposition aux OMs de forte puissance ( $225$  mW,  $1.67$  mW/cm<sup>2</sup>, SAR de  $37 \pm 3$  kW/kg, 30 min, augmentation de la température jusqu'à  $45.2^\circ\text{C}$ ) à  $42.25$  GHz. Il faut remarquer que dans ce travail les auteurs rapportent les valeurs de SAR très élevés. Elles sont déterminées par la localisation de l'échantillon près de l'antenne (champ proche) et par l'utilisation de forte puissance d'émission.

Dans une étude protéomique de Nylund *et al.* [95, 2004], les auteurs ont observé l'expression de 38 protéines après une heure d'exposition à 900 MHz avec un SAR de 2.4 W/kg.

En France, les travaux récents *in vitro* sur les fibroblastes exposées aux micro-ondes à 900 MHz [96, 97] sont réalisés par le laboratoire PIOM (voir sous-section I.2.10.1.4 Protéines de choc thermique *in vitro*).

Les travaux récents *in vivo* ont confirmé les résultats des études *in vitro*. L'augmentation des HSPs a été montrée pour l'exposition aux micro-ondes ainsi qu'aux OMs.

Dans un travail publié dans la revue *Nature*, Pomerai *et al.* [98, 2000] ont observé l'activation du gène codant pour la protéine HSP 16 chez un ver (*Caenorhabditis elegans*) après exposition à 750 MHz-1 GHz avec un SAR de 1 mW/kg à 24°C. La même augmentation de l'expression de HSP 16 est observée pour un stress thermique (28°C). L'effet observé a été confirmé dans une autre étude du même groupe [99, 2002]. Dans une publication récente [100, 2006], les auteurs ont infirmé les résultats précédents en montrant que l'effet observé est probablement causé par la différence des températures entre les échantillons exposée et non-exposée.

Dans leur travail, Sypniewska *et al.* [101, 2003] ont comparé l'effet des OMs et de l'échauffement des tissus sur l'expression des protéines HSPs 27. Les rats ont été exposés à 35 GHz avec une densité superficielle de puissance de 70 mW/cm<sup>2</sup> pendant 45 min (le changement correspondant de température locale est de 36°C à 41.5°C) ou placés dans un incubateur dont la température était maintenue à 42°C. Dans les expériences, 10% de la surface cutanée des animaux a été soumis au rayonnement, tandis que l'augmentation de la température ambiante a provoqué l'échauffement de 100% de la surface du corps. Les auteurs ont supposé que cette différence puisse entraîner des réponses différentes au niveau cellulaire. Après marquage immunohistochimique, les prélèvements de la peau dans la zone exposée des animaux sacrifiés ont été analysés 0 h, 7 h ou 96 h après exposition. L'expression des protéines HSPs 27 a augmenté dans les deux cas (exposition et augmentation de la température ambiante).

Dans le travail de Bes *et al.* [102, 2004], des rats anesthésiés placés dans des fusées de contention ont été exposés aux ondes GSM (900 MHz, pulsées à 217 Hz) pendant 45 min à deux SAR : 1.5 et 5.25 W/kg (valeurs de SAR moyennées sur l'ensemble du cerveau). La température du corps de chaque animal pendant et après l'exposition était maintenue constante grâce à une couverture thermostatée jusqu'à leur sacrifice

trois heures après le début de l'exposition. Les cerveaux ont été prélevés immédiatement après le sacrifice et congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Les régions cérébrales les plus exposées (différents cortex frontal, visuel et auditif) ont été prélevées, puis la présence des HSPs 70 a été déterminée par Western blot. La présence de l'immunoréactivité HSP 70 a été révélée par la méthode de chimiluminescence. Les résultats ont montré l'absence totale d'expression de HSP 70 dans les différentes régions corticales examinées chez les trois groupes d'animaux. En revanche, d'autres protéines (Tyrosine Hydroxylase) ont été détectées chez ces trois groupes d'animaux.

Récemment, Belyaev *et al.* [103, 2006] ont étudié des effets génotoxiques (cassures d'ADN, conformation de chromatine) et protéotoxiques (modification de l'expression génétique) des micro-ondes à 915 MHz (SAR de  $0.4\text{ W/kg}$ ) chez les rats. Aucun effet génotoxique n'a été observé par les auteurs. L'expression de 8800 gènes a été étudiée par Affymetrix U34 GeneChips et ensuite analysée par un logiciel Affymetrix Microarray Suite. Onze gènes ont été surexprimés avec un facteur d'induction de 1.34 à 2.74. Ainsi les résultats ont montré que les micro-ondes ne sont pas génotoxiques mais plutôt protéotoxiques.

## 2.7 Génotoxicité et cancer

Les effets potentiels génotoxiques des micro-ondes ont été largement étudiés dans la littérature scientifique car la formation du cancer ainsi que de certaines autres maladies commence par des modifications du matériel génétique d'une cellule. La plupart des travaux suggèrent que les micro-ondes de faible puissance ne sont pas génotoxiques [103, 104]. Ci-dessous, nous considérons les résultats des études sur les effets génotoxiques des OMs.

Bellossi *et al.* [105, 106, 2000] ont étudié l'effet potentiel des OMs à 60 GHz de faible puissance ( $0.51\text{ mW/cm}^2$ ) sur la survie de souris greffées avec la leucémie L 1210. Les résultats ont montré la croissance des tumeurs pour les souris exposées exprimée soit par une mortalité plus rapide, soit par des tumeurs plus volumineuses.

Les OMs sont utilisées dans les pays de l'Europe de l'Est pour réduire l'effet toxique de la chimio- et radio-thérapie lors des traitements contre le cancer. Dans leur travail, Logani *et al.* [107, 2000] ont étudié l'effet protecteur des OMs vis à vis d'une substance anticancéreuse toxique (le cyclophosphamide). Les souris étaient exposées à une fréquence de 42.2 GHz avec un SAR de  $622 \pm 100\text{ W/kg}$  ( $31.13 \pm 5.04\text{ mW/cm}^2$ ).

Les résultats ont montré l'absence d'un effet quelconque pour les leucocytes et pour les cellules de moelle osseuse.

Vijayalaxmi *et al.* [108, 2004] ont étudié l'effet génotoxique des OMs à  $42.2 \pm 0.2$  GHz chez les souris BALB/c. Les souris ont été exposées 30 min par jour pendant trois jours avec une densité superficielle de puissance de  $31.5 \pm 5.0$  mW/cm<sup>2</sup> (SAR de  $622 \pm 100$  W/kg). En utilisant le test des micro-noyaux, les auteurs n'ont observé aucun effet génotoxique pour les souris exposées.

Beneduci *et al.* [109, 2005] ont étudié l'effet des OMs de faible puissance sur la lignée cellulaire tumorale RPMI 7932. Les cellules ont été exposées pendant trois heures à 53.57-78.33 GHz (signal large bande), à 51.05 GHz ou à 65 GHz. Les résultats ont montré que l'exposition à 53.57-78.33 GHz a inhibé la croissance des cellules tumorales contrairement aux expositions à 51.05 GHz ou à 65 GHz qui n'ont induit aucun effet.

Dans une autre étude récente, Logani *et al.* [110, 2006] ont examiné si les OMs à 42.2 GHz peuvent inhiber la formation de métastases dans des tumeurs chez les souris C57BL/6. Les auteurs ont utilisé un générateur YAV-1 avec une densité superficielle de puissance de  $36.5 \pm 5$  mW/cm<sup>2</sup> et un SAR de  $730 \pm 100$  W/kg. La région nasale des souris a été exposée pendant 30 min. Les résultats ont montré que l'exposition aux OMs réduit la tumeur métastatique par l'activation des cellules NK (natural killer).

## 2.8 Effets sur l'activité neuronale

Alekseev *et al.* [111, 1999] ont étudié l'effet des OMs à 60.22-62.22 GHz et à 75 GHz sur les courants de type A de K<sup>+</sup> et l'effet des OMs à 61.22 GHz sur les courants de Ca<sup>2+</sup> dans les neurones de *Lymnaea*. En utilisant la technique du "patch-clamp", les auteurs ont observé l'augmentation de l'amplitude et du taux d'activation des courants ioniques après exposition. Il a été montré que le changement d'amplitude et de dynamique des courants est dû à un effet thermique produit par le rayonnement millimétrique. Ainsi les résultats ont montré que les OMs ne modifient pas la distribution des charges membranaires ainsi que la fixation des ions de calcium dans la zone de localisation des canaux.

## 2.9 Effets oculaires

L'œil est sensible aux rayonnements puisqu'il reçoit peu de sang et peut difficilement dissiper la chaleur. De plus, il ne dispose pas de la protection osseuse que le crâne procure au cerveau. Prenant en compte le caractère superficiel de l'absorption des OMs par les tissus biologiques, les études des effets oculaires potentiels sont nécessaires.

Dans une étude de Kues *et al.* [112, 1999], aucun effet oculaire n'a été observé chez le lapin ou le singe après une exposition simple ou répétée à 60 GHz (10 mW/cm<sup>2</sup>).

Dans une autre étude Lu *et al.* [113, 2000] n'ont détecté aucune dégénération de la cornée chez le singe après une exposition aux micro-ondes à 1.25 GHz (4.3 W/kg, 8.4 W/kg ou 20.2 W/kg).

## 2.10 Effet sur la peau

Outre les paramètres physiques de l'exposition aux champs EMs (fréquence, intensité de rayonnement, densité de puissance, polarisation et modulation du champ), les effets biologiques observés dépendent aussi des dimensions de l'objet biologique étudié ainsi que des propriétés électriques des milieux, essentiellement de sa conductivité  $\sigma$  et de sa permittivité  $\varepsilon_r$  qui varient fortement en fonction de fréquence. Aux BFs, les champs EMs passent à travers l'organisme alors qu'aux fréquences radio ils sont partiellement absorbés et ne pénètrent que très peu dans les tissus (environ 1 mm à 60 GHz).

Par conséquent, la peau joue un rôle particulier car c'est le premier organe impliqué dans les interactions ondes-vivant lors d'une exposition aux OMs. En raison de la faible pénétration des hautes fréquences dans le corps humain, elle est la cible principale pour les rayonnements. La peau est constituée de trois couches, de l'extérieur vers l'intérieur : l'épiderme, le derme, l'hypoderme et elle représente une surface d'environ 2 m<sup>2</sup> chez l'adulte, avec une épaisseur de 0.6 à 2.5 mm. C'est la barrière principale de protection du corps humain contre les agressions environnementales.

La profondeur de pénétration des OMs dans la peau varie des centaines de nanomètres jusqu'à quelques millimètres en fonction de longueur d'onde et de propriétés diélectriques du tissu. Par exemple, la pénétration d'une onde plane à 20 GHz dans



la peau est égale à 1.85 mm (pour  $\sigma=15\text{ S/m}$ ,  $\epsilon_r=25$ ) [106] et elle diminue avec la fréquence.

Par ailleurs, la peau comporte de nombreux types cellulaires et interagit avec tous les autres systèmes de l'organisme (immunitaire, endocrinien, nerveux). Par exemple, c'est un fait connu que les maladies des différents organes correspondent aux changements locaux de la température superficielle de la peau [114].

### 2.10.1 Micro-ondes

Jusqu'à récemment, les travaux scientifiques étaient essentiellement orientés vers la recherche d'une limite thermique, au delà de laquelle apparaissent les effets néfastes pour la peau. Quelques articles ont porté sur les effets des micro-ondes sur la perception cutanée [39, 40, 44, 115, 116] (voir section I.2.1 Effets thermiques et non-thermiques).

Actuellement l'équipe Bioélectromagnétisme du laboratoire PIOM de l'Université de Bordeaux mène des recherches pour évaluer des effets biologiques des radiofréquences sur la peau [117–122]. Nous allons résumer ci-dessous travaux effectués par ce laboratoire sur l'apoptose cellulaire, sur l'inflammation, sur les protéines de choc thermique et sur la prolifération cellulaire.

#### 2.10.1.1 Apoptose *in vitro*

Les kératinocytes, les mélanocytes et les fibroblastes ont été exposés à 900 MHz (48 heures, SAR de 2 W/kg) dans les conditions optimales de culture [119, 2003]. Après traitement, les cellules ont été analysées par cytométrie de flux pour détecter l'apoptose cellulaire. L'analyse statistique n'a pas montré de différence significative entre les kératinocytes exposés et non exposés.

#### 2.10.1.2 Inflammation *in vitro*

Après exposition à 900 MHz (48 heures, SAR de 2 W/kg) les cytokines, le TNF alpha (tumor necrosis factor  $\alpha$ ), l'IL-1 (interleukine 1 $\alpha$ ) et le PGE2 (prostaglandine 2) ont été dosés par ELISA (kits Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) dans le surnageant des cellules exposées. Les valeurs obtenues pour le TNF alpha se situaient au

dessous des limites détectables par le kit utilisé. Une sécrétion d'IL-1 alpha a été observée pour les kératinocytes [96, 2003]. Une tendance à la diminution de sécrétion de PGE 2 a été constatée pour les mélanocytes et les fibroblastes mais qui n'était pas significative après l'analyse statistique. Les mesures d'épaisseur moyenne des épidermes reconstruits exposés à 900 MHz ont été analysées et ont montré une concordance avec une évolution normale de stratification d'un épiderme suivant le temps de culture.

### 2.10.1.3 Inflammation *in vivo*

Les rats exposés à 900 MHz (4 semaine, 2 h/j, 5 j/s, SAR de 2 W/kg) ont été sacrifiés, puis une partie de la peau de la zone exposée et une partie de la zone controlatérale ont été prélevées [96, 2003]. Les échantillons de peau ont été ensuite traités jusqu'à la coloration histologique, puis mesurés au niveau de l'épaisseur de leur épiderme (50 mesures tous les 15  $\mu\text{m}$ , par coupe histologique). Les analyses histologiques (Coloration Hématoxyline Eosine Safran, HES) des coupes réalisées sur les peaux, n'ont montré aucune variation significative au niveau de l'épaisseur de l'épiderme entre les différents groupes de rats.

### 2.10.1.4 Protéines de choc thermique *in vitro*

Des fibroblastes cultivés sur lamelle ont été exposés au signal GSM-900 (2 heures, SAR de 2 W/kg), puis les cellules ont été traitées par immunofluorescence en vue d'une détection des protéines de choc thermique HSP 27, HSP 70 et HSC 70 [97, 2003]. Les résultats étaient basés sur l'analyse des images de chaque lamelle. Une moyenne de l'intensité de fluorescence a été réalisée pour chaque expérience. L'analyse statistique n'a pas montré de différence significative de l'expression des HSPs pour les échantillons exposés et non exposés, contrairement à l'exposition aux UV (50 mJ/cm<sup>2</sup>) qui a augmenté de façon significative l'expression de toutes les protéines considérées.

### 2.10.1.5 Prolifération cellulaire sur les épidermes reconstruits (ER)

La prolifération cellulaire a été étudiée par marquage de la protéine Ki-67 qui est exprimée à toutes les phases du cycle cellulaire (sauf en phase G0) et qui est identifiée grâce à un anticorps monoclonal spécifique. Chaque coupe d'ER a été traitée par immunohistochimie (kit EnVision<sup>TM</sup>+ System) pour détecter la protéine Ki-67. Les

résultats ont montré l'absence d'une différence significative entre les épidermes exposés à 900 MHz (48 heures, SAR de 2 W/kg) et non-exposés [96, 2003].

#### 2.10.1.6 Prolifération cellulaire *in vivo*

Des parties de la peau des rats de la zone exposée à 900 MHz et de la zone non-exposée ont été analysées [120, 121, 2003]. Les noyaux activés ont été détectés par marquage immunohistochimique de la protéine Ki-67. Les analyses de quantification du marquage Ki-67 ont été exprimées en nombre de cellules dont le noyau est activé. La quantification des noyaux bruns au niveau de l'épiderme des animaux exposés (900 MHz, SAR de 2 W/kg, 2 h/j, 5 j/s, 4 semaines) ou non-exposés n'a pas montré de différence significative entre les groupes de rats étudiés.

Les résultats des travaux considérés ci-dessus montrent que les expositions à 900 MHz avec un SAR de 2 W/kg ne constituent pas un stress pour les cellules de la peau. Il faut remarquer que l'extrapolation des résultats obtenus pour des cellules *in vitro* sur des organes ou sur le corps entier est limitée par les plusieurs facteurs. La totalité des interactions qui ont lieu dans un organe ou dans un système d'organes ne peut pas être représentée que par les études *in vitro* ou par un modèle tridimensionnel comme l'ER.

### 2.10.2 Ondes millimétriques

Les OMs ont été utilisées en médecine clinique comme moyen thérapeutique indépendant ou supplémentaire pour le traitement de maladie variées (voir section I.2.11 Applications thérapeutiques des ondes millimétriques). La question sur les modifications potentielles de fonctionnement des cellules épidermiques après une exposition aux OMs reste toujours ouverte. Dans ce contexte, quelques travaux ont été réalisés pour étudier les changements dans les cellules de kératinocytes exposées aux OMs. Les kératinocytes représentent environ 95 % de la totalité des cellules épidermiques.

#### 2.10.2.1 Effets sur les kératinocytes humains *in vitro*

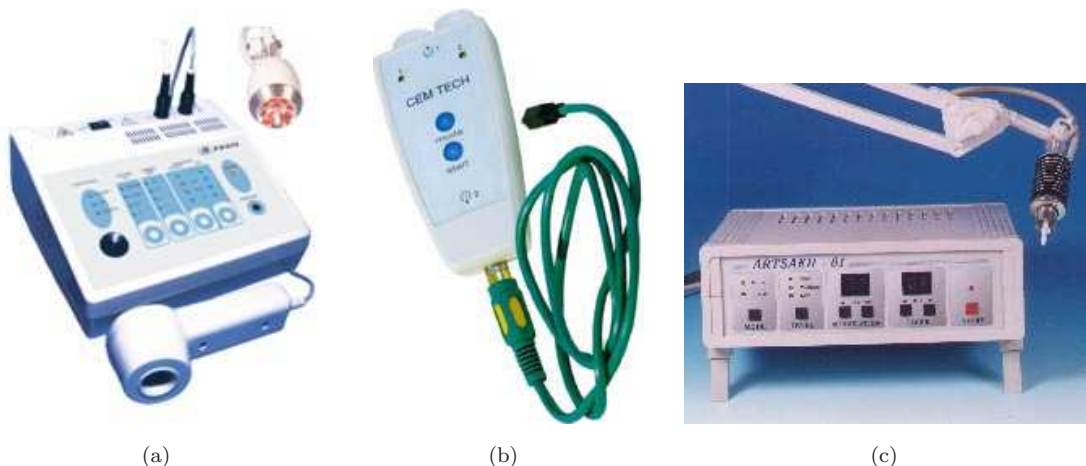
Dans leur travail, Szabo *et al.* [70, 2001] ont étudié l'effet des OMs sur les kératinocytes humains en utilisant la lignée cellulaire HaCaT. La prolifération, l'adhésion, le chimiotactisme et la production d'interleukine-1 $\beta$  ont été analysés après 15-30

min d'exposition aux OMs à 61.22 GHz (SAR de 770 W/kg). La prolifération spontanée, l'adhésion aux plaques des cellules, la migration et l'hémostase induites par l'interleukine-8 et RANTES n'ont pas été affectées par les OMs. En même temps, les auteurs ont constaté une augmentation faible mais statistiquement significative du niveau intracellulaire d'interleukine-1 $\beta$ .

Dans une autre étude, Szabo *et al.* [71, 2003] ont étudié l'effet des OMs sur la production des chimiokines (RANTES et IP-10) dans les kératinocytes. L'expression de HSP 70 a été analysée après une heure d'exposition. Les auteurs n'ont observé aucun effet non-thermique après une exposition au OMs à  $61.2 \pm 2.1$  GHz (SAR de  $770 \pm 42$  W/kg).

## 2.11 Applications thérapeutiques des ondes millimétriques

Le rayonnement millimétrique de faible puissance (1 - 10 mW/cm<sup>2</sup>) est utilisé pour les applications thérapeutiques [123, 124]. Cette méthode est reconnue dans certains pays (Russie, Ukraine et d'autres pays de l'Europe de l'Est) comme un moyen de traitement performant et elle trouve des applications en médecine clinique [125–127].



**Fig. 2.10:** Exemples d'appareils utilisés en thérapie par OMs : (a) RIKTA-M2K (42-95 GHz) ; (b) CEM-TECH (40-78 GHz) ; (c) ARSAH-01 (42-95 GHz)

Les premiers appareils ont été développés et commercialisés dans les années quatre-vingts. Les trois fréquences le plus fréquemment utilisées sont 42.2 GHz ( $\lambda_0=7.1$  mm), 53.6 GHz ( $\lambda_0=5.6$  mm) et 61.2 GHz ( $\lambda_0=4.9$  mm). Les résultats cliniques ont été obtenus

nus pour le traitement de différentes maladies : désordres cardiovasculaires, diabète, dermatite, ulcère gastrique, asthme bronchique, diplégie cérébrale infantile, cancer, *etc* [128]. Les OMs sont utilisées en monothérapie ou en combinaison avec d'autres méthodes de traitement. Comme la thérapie adjuvante, elles sont utilisées pour diminuer l'effet toxique des chimio- et radio-thérapie dans le traitement contre le cancer [129]. La méthode de thérapie par OMs (TOM) consiste en exposition locale de la peau aux OMs. La durée d'exposition est de 30-40 min par jour pendant 7-15 jours [130]. La figure 2.10 montre quelques exemples d'appareils développés en TOM.

Le choix de la fréquence et des paramètres d'exposition est souvent basé sur des données empiriques [131] car les mécanismes d'interactions entre les OMs et le vivant sont peu connus à présent. Plusieurs questions restent ouvertes : quelles sont les voies d'action des faibles doses du rayonnement millimétrique sur les systèmes biologiques ? Pourquoi certaines fréquences possèdent-elles d'un effet thérapeutique, mais pas les autres ? Comment les expositions locales de la peau peuvent-elles conduire aux effets thérapeutiques au niveau des organes internes ?

## 2.12 Conclusion

Les études dans le domaine de bioélectromagnétisme s'intensifient avec l'apparition des nouveaux moyens de communications sans fil et avec le développement des nouvelles techniques et tests biologiques de plus en plus performants. Les systèmes d'expositions actuels pour tel type d'études garantissent un contrôle et une dosimétrie précise des paramètres d'expositions. Ils peuvent être intégrés dans les systèmes qui assurent aussi les conditions ambiantes nécessaires.

Les membranes biologiques sont très sensibles aux faibles modifications des propriétés électriques et plusieurs études montrent que leur fonctionnement peut être perturbé par les champs EMs externes. Les changements les plus prononcés apparaissent au niveau des flux ioniques et au niveau d'organisation des molécules phospholipidiques.

La plupart des études récentes *in vitro* et *in vivo* montrent que les micro-ondes et les OMs ne sont pas génotoxiques mais plutôt protéotoxiques. L'expression des protéines chaperons qui sont impliquées dans plusieurs fonctions cellulaires de base est un excellent indicateur de stress cellulaire. Les travaux en micro-ondes ont montré une augmentation de l'expression des protéines chaperons après l'exposition. Le nombre des études en OMs est très restreint.



## Deuxième partie

### Effet du rayonnement millimétrique sur les membranes biologiques artificielles





# Introduction

L'un des premiers effets des ondes EMs observés au niveau des membranes biologiques est la modification du flux d'ions à travers la membrane cellulaire. La possibilité de modification de la concentration d'ions à travers des biomembranes et de changement d'orientation des longues chaînes moléculaires par les micro-ondes a été montrée théoriquement dans les années soixante-dix [48].

Étant le premier composant cellulaire “touché” par une exposition extérieure, la membrane biologique représente une barrière entre le milieu intra et extracellulaire. Les modifications structurales de la membrane peuvent avoir des conséquences pour tous les autres mécanismes impliqués dans la régulation cellulaire. Les lipides et les protéines étant les composants principaux d'une membrane biologique, ils forment sa structure de base. C'est au niveau de cette structure que nous nous focaliserons pour étudier les effets potentiels des OMs de faible puissance sur les propriétés biophysiques des couches phospholipidiques.

Cette partie du manuscrit sera consacrée à l'étude de l'influence du rayonnement millimétrique de faible puissance à 60 GHz sur les modèles phospholipidiques des membranes biologiques. Deux séries de résultats expérimentaux seront considérées.

Dans un *premier temps*, nous étudierons la dynamique de pression latérale des monocouches phospholipidiques exposées aux OMs à 60 GHz. Nous considérerons le rôle des différents paramètres d'exposition (polarisation, modulation d'amplitude, niveau de puissance, durée et régime temporel d'exposition) ainsi que les différents composants lipidiques des membranes biologiques (phospholipides DPPC, DOPC, DPPG et le mélange DPPC/DOPC).

Dans un *deuxième temps*, nous étudierons les modifications potentielles de distribution des microdomaines phospholipidiques dans les membranes après exposition aux OMs de faible puissance. L'analyse topographique de la surface des monocouches phospholipidiques en séparation de phase (liquide condensé et liquide expansé) sera

effectuée par Microscopie à Force Atomique (AFM).

Cette partie du travail de thèse a été réalisée en collaboration entre l'Institut d'Électronique et de Télécommunications de Rennes et le Groupe Matière Condensée et Matériaux de l'Université de Rennes 1.

# Chapitre 3

## Membranes biologiques

### 3.1 Rôle et composition des membranes biologiques

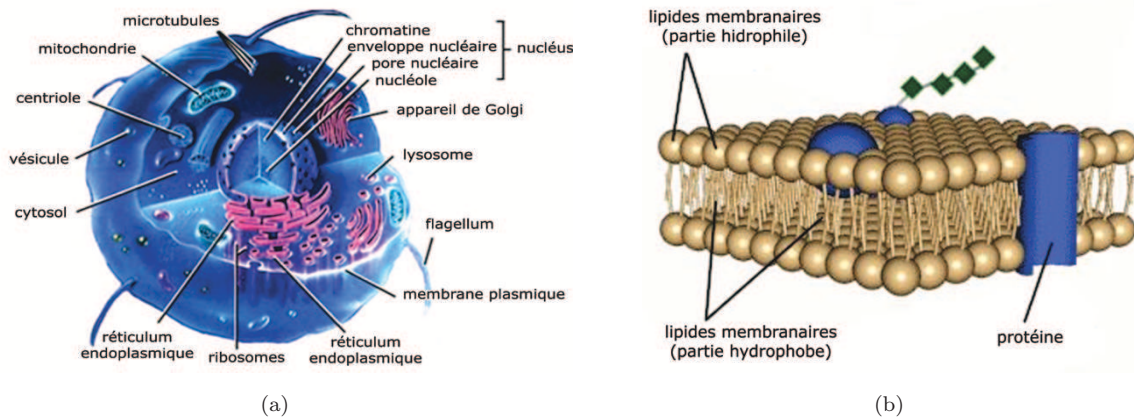
#### 3.1.1 Rôle des membranes biologiques

La cellule biologique, l'unité structurale de tout être vivant, est un compartiment limité par une membrane. Les membranes biologiques sont des structures délimitant les cellules mais aussi les organites intracellulaires (mitochondries, noyau, chloroplastes, *etc.*) (Fig. 3.1) [132]. Le rôle premier de ces membranes est de permettre des compartimentations. La membrane plasmique sépare les milieux aqueux intracellulaire et extracellulaire et maintient la différence de compositions entre le milieu interne et le milieu externe. Elle contient en particulier des pores permettant le passage d'ions ou de macromolécules.

#### 3.1.2 Lipides membranaires

La fonction de compartimentation est dévolue aux lipides membranaires, l'un des deux constituants principaux des membranes. Les lipides sont des molécules amphiphiles qui possèdent une partie polaire et une partie apolaire situées dans deux régions distinctes de l'espace.

Les cellules et les organites ne sont pas des entités autonomes, leur survie et leur fonctionnement nécessitent des échanges continuels de matière et d'information de part et d'autre de la membrane qui les délimite. Ces échanges sont possibles grâce à la présence de protéines, second constituant majeur des membranes.



**Fig. 3.1:** (a) Modèle d'une cellule biologique [133] et (b) modèle de membrane cellulaire en "mosaïque fluide" (Singer et Nicolson, 1972 [134]).

### 3.1.3 Protéines membranaires

Les protéines membranaires se classent en deux grandes catégories : les protéines extrinsèques (ou périphériques) et intrinsèques (ou intégrales).

Les chaînes polypeptidiques des protéines extrinsèques ne sont associées à la membrane que de manière relativement faible par des interactions électrostatiques avec les parties polaires des lipides ou des parties polaires de protéines intrinsèques qui émergent hors de la membrane ; elles sont donc en contact avec le milieu aqueux. Leur localisation leur permet de participer à des réactions qui s'effectuent à l'interface entre la membrane et les compartiments aqueux. De plus, leur confinement dans un milieu à deux dimensions (le plan de la membrane), permet souvent des interactions efficaces entre différentes protéines membranaires participant à une série de réactions séquencées.

Les protéines intrinsèques sont associées à la membrane de manière plus étroite par un ensemble d'interactions hydrophobes avec les parties apolaires des lipides ; ce sont des protéines transmembranaires dont la chaîne polypeptidique est accessible des deux côtés de la membrane. Dans certains cas, la quasi-totalité de la protéine est localisée dans la bicouche lipidique ; dans d'autres cas, les masses protéiques sont localisées en dehors de la membrane, soit d'un côté, soit des deux. Leur disposition dans la membrane leur permet de participer à des transformations et à des réactions qui s'effectuent de part et d'autre de la membrane. C'est cette classe de protéines qui permet le transport de matière et le transfert d'information.

### 3.1.4 Transport membranaire

Le transport de matière, ainsi que le transfert d'information et la transformation d'énergie sont trois fonctions de base des membranes associées aux protéines membranaires.

Les membranes plasmiques sont le lieu privilégié des échanges entre les milieux extra et intracellulaires. Le transfert d'information est médié par des récepteurs qui fixent des messages extracellulaires (hormones, neurotransmetteurs). Le transport de matière (solutés organiques, ions inorganiques) est catalysé par des transporteurs et des canaux. Chaque type de membrane possède sa propre collection de récepteurs, transporteurs et canaux lui conférant une spécificité dans les domaines du transfert d'information et du transport.

Les membranes sont également le siège de transformation de l'énergie. Certaines sont spécialisées dans cette fonction. C'est le cas de la membrane interne des mitochondries qui possède tout un ensemble de complexes protéiques permettant d'utiliser l'énergie libérée par l'oxydation de certains substrats pour synthétiser de l'ATP (Adénosine-Triphosphate). Mais, par ailleurs, toutes les membranes utilisent cette capacité de transformation d'énergie pour effectuer des transports actifs de solutés et d'ions contre leur gradient de concentration (dans le sens de leur potentiel électrochimique croissant).

### 3.1.5 Propriétés physiques des biomembranes

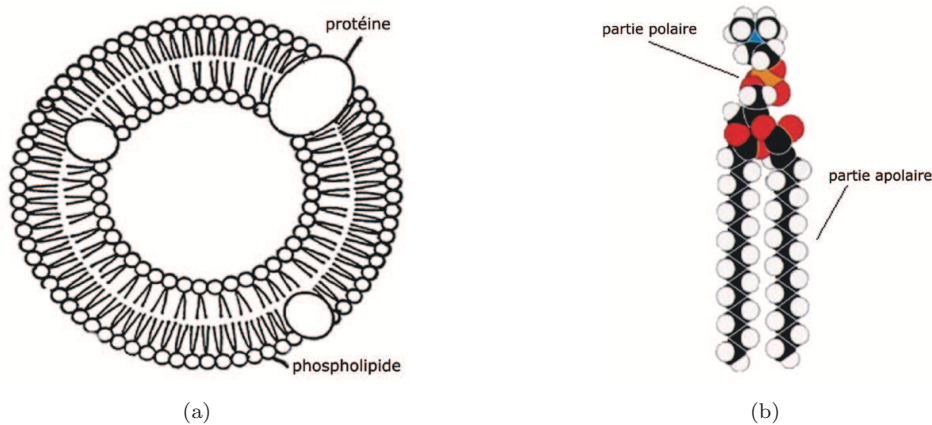
Deux propriétés caractérisent les membranes biologiques : l'*asymétrie* d'une part, c'est-à-dire le fait que leurs deux faces ne sont jamais identiques (c'est vrai pour toutes les membranes connues [135]), et la fluidité, liée à une organisation relativement lâche, non covalente, des différentes composantes membranaires, d'autre part. Les membranes sont, par nature des milieux anisotropes, c'est-à-dire qu'elles ne présentent pas les mêmes caractéristiques dans toutes les directions de l'espace.

On peut à leur sujet parler de *fluidité*, mais seulement par rapport au plan qu'elles définissent. Cette fluidité traduit la possibilité, manifestée par leurs différents constituants, de tourner sur elles mêmes ou de se déplacer, parfois sur de relativement grandes distances (le coefficient de diffusion des lipides est de  $10^{-15}$ - $10^{-12}$  m<sup>2</sup>/s). Cette propriété est une condition nécessaire pour de nombreuses activités cellulaires.

## 3.2 Lipides membranaires

### 3.2.1 Rôle des lipides membranaires

Le rôle principal des lipides est structural. L'organisation en bicouche lipidique qu'ils adoptent généralement est à la base de la structure membranaire (Fig. 3.2). Pourtant certains lipides possèdent des propriétés fonctionnelles importantes. En effet, parfois ils jouent le rôle de récepteurs et sont à l'origine de seconds messagers intracellulaires [132].



**Fig. 3.2:** (a) Vésicule lipidique (bicouche) et (b) structure d'un phospholipide.

### 3.2.2 Bicouche lipidique

En milieu aqueux, l'organisation la plus stable des lipides est celle qui permet de minimiser les interactions entre les parties hydrophobes et les molécules d'eau. Les lipides s'organisent le plus souvent en bicouche : partie apolaire au centre de la bicouche où l'eau n'a pas accès, partie polaire en contact avec le milieu aqueux de part et d'autre de la bicouche. La structure se referme sur elle-même formant une vésicule close qui sépare un compartiment interne aqueux du milieu aqueux externe. Les lipides extraits de leur contexte membranaire et remis en suspension dans l'eau peuvent adopter d'autres types d'organisation en fonction des conditions expérimentales (concentration, température).

La présence d'une structure close continue empêche le libre passage de macromolécules d'un compartiment à un autre; de plus, l'existence de la partie apolaire au centre de la bicouche bloque pratiquement toute diffusion d'ions inorganiques ( $K^+$ ,

$\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ) et freine considérablement la diffusion de solutés organiques polaires (sucres, acides aminés). Seuls quelques solutés très hydrophobes diffusent librement et rapidement à travers la bicouche ; c'est le cas de certaines hormones stéroïdes.

L'épaisseur d'une bicouche lipidique est au plus égale à 2 fois la plus grande longueur d'un lipide, soit environ 6 nm ( $2 \times 3$  nm). L'épaisseur d'une membrane, du fait de la présence de protéine, peut être légèrement supérieure. En tout état de cause, elle est inférieure à 10 nm, et seules les techniques de microscopie électronique à haute résolution permettent de visualiser les bicouches lipidiques et les membranes.

### 3.2.3 Classes des lipides

Les lipides membranaires peuvent être classés en 4 catégories principales : les phospholipides, les glycolipides, les sphingolipides et les stérols. Les phospholipides constituent un groupe de lipides qui porte une charge négative dans la tête polaire et la charge globale du phospholipide dépend donc de la nature du substituant X (Fig. 3.3). S'il est lui même neutre, par exemple comme dans le cas du lipide dipalmitoyl phosphatidylglycérol (DPPG), le phospholipide est chargé négativement. Si le substituant X porte une charge positive, comme dans le cas du dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC), le phospholipide est électriquement neutre. Malgré ces différences, toutes les têtes polaires s'alignent étroitement dans la bicouche phospholipidique. La valeur du potentiel transmembranaire est déterminée partiellement par les charges de têtes polaires des lipides. La bicouche se stabilise par les interactions de Van der Waals entre les atomes, les liaisons hydrogène et les interactions électrostatiques entre les groupes des têtes polaires et les molécules d'eau [136].

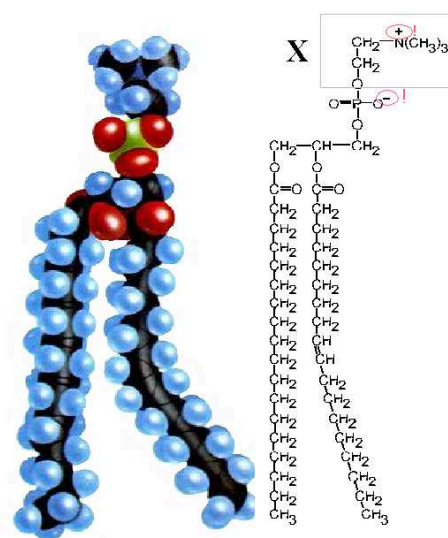


Fig. 3.3: Phosphatidylcholine.



### 3.2.4 Diversité de composition lipidique

La diversité de composition lipidique des différentes membranes est très grande (Tableau 3.1). Certaines membranes ne possèdent qu'une seule classe de lipides : c'est

	Myéline	Érythrocyte	Mitochondrie	E.coli	Chloroplaste
Lipide/Protéine (en poids)	3 : 1	1 : 3	1 : 3	1 : 3	1 : 1
Phospholipide	32	56	95	100	12
<b>PC</b>	<b>11</b>	<b>23</b>	<b>48</b>		
PE	14	20	28	80	
PI		2	8		
PS	7	11			
PG				15	12
DPG			11	5	
Glycolipide					80
MGDG					41
DGDG					23
SQDG					16
Sphingolipide	40	18			
Stérol	25	25	5		

**Tab. 3.1:** Composition lipidique des différentes membranes. *PC, PE, PI, PS, PG* : phosphatidylcholine, éthanolamine, inositol, sérine, glycérol; *DPG* : diphosphatidylglycérol; *MGDG, DGDG* : monogalactosyl, digalactosyl diacylglycérol; *SQDG* : sulfolipide. La composition est donnée en pourcents de la quantité totale des lipides.

le cas par exemple de la membrane cytoplasmique d'*E.coli* qui ne contient que des phospholipides. D'autres membranes possèdent un mélange à peu près égal de trois classes : c'est le cas par exemple des membranes de myéline. La diversité se retrouve au sein de chacune des classes : certaines membranes possèdent en majorité un lipide d'une classe donnée ; d'autres membranes possèdent un mélange de différents lipides de cette classe. Au-delà de la diversité lipidique, le contenu total des lipides par rapport à l'autre constituant membranaire, les protéines, est variable. Certaines membranes ont un contenu majoritairement lipidique, d'autres un contenu majoritairement protéique.

Dans ce travail de thèse, nous restreignons notre approche à une étude de modèles artificiels de membranes biologiques représentées par une monocouche phospholipidique (les lipides dipalmitoyl phosphatidylcholine, dipalmitoyl phosphatidylglycérol et dioléoyl phosphatidylcholine). Prenant en compte la faible pénétration des OMs dans les tissus biologiques, il est intéressant de noter que les phospholipides représentent 67% de la quantité totale des lipides des membranes de kératinocytes qui constituent environ 95% des cellules épidermiques [137].

### 3.3 Potentiel dipolaire des membranes biologiques

Comme nous l'avons mentionné auparavant, l'organisation des lipides dans les cellules ainsi que dans les modèles artificiels des membranes biologiques est déterminée par les propriétés amphiphiles (hydrophobes et hydrophiles) des phospholipides. La tête polaire d'un phospholipide, neutre (dipôle) ou chargée (charge négative), se situe dans le milieu aqueux et polarise la couche superficielles des molécules d'eau [138]. Environ 18-24 molécules d'eau sont associées à un lipide DPPC [139]. L'organisation des molécules d'eau détermine les propriétés de la membrane, en particulier le potentiel dipolaire.

Le potentiel dipolaire joue un rôle important dans l'organisation de monocouches lipidiques sur la surface aqueuse. Le potentiel dipolaire fait partie du potentiel transmembranaire et est déterminé par l'orientation des molécules chargées à l'interface eau/lipides. La perméabilité de la membrane à certains ions et ces interactions avec certaines protéines dépendent du potentiel dipolaire [140]. Pour la membrane lipidique DPPC la valeur du potentiel transmembranaire est de 220-280 mV, le champ électrostatique correspondant est de  $10^8$ - $10^9$  V/m [141, 142]. Les normes internationales définies pour la valeur du champ électrique dans la bande de fréquence millimétrique sont de 60 V/m à 300 kV/m (voir section 2.1 Effets non-thermiques). Il faut remarquer que les champs statiques et les champs de BF changent l'orientation des molécules dipolaires et agissent sur les charges libres. Les champs EMs de haute fréquence correspondent essentiellement aux vibrations des molécules et groupes moléculaires chargés.



# Chapitre 4

## Modèles artificiels des membranes biologiques

### 4.1 Films phospholipidiques

Comme nous l'avons vu dans la section précédente, les membranes biologiques sont constituées d'un mélange complexe de lipides. La composition varie selon la nature de la cellule ; autrement dit il existe une relation étroite entre la composition lipidique et l'activité de la cellule.

Le modèle qui se rapproche le plus de la membrane biologique est l'association de deux "feuillettes" lipidiques dans lesquels sont insérées des protéines. Le plus souvent le modèle physique de la membrane biologique est représenté par une bicouche ou par une monocouche phospholipidique (Fig. 4.1).

Prenant en compte que dans l'état actuel des connaissances le couplage entre deux couches phospholipidiques est négligeable (très faibles interactions ( $\text{CH}_3/\text{CH}_3$ ) dans les parties apolaires des molécules) [143] nous avons restreint notre approche à une monocouche phospholipidique. Des effets potentiels de résonance entre deux couches lipidiques peuvent être a priori éliminés car la longueur d'onde en bande millimétrique est  $10^5$ - $10^6$  fois plus grande que l'épaisseur de la bicouche phospholipidique. Ainsi la bicouche peut être considérée comme une superposition de deux mo-

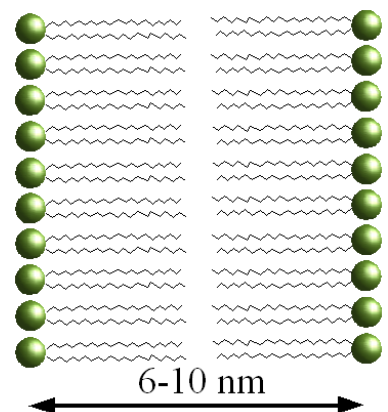


Fig. 4.1: Bicouche lipidique.

monocouches phospholipidiques.

Les films monomoléculaires des phospholipides sont utilisés en biophysique pour étudier les effets des facteurs environnementaux sur les modèles artificiels des membranes biologiques [144]. La méthode de Langmuir-Blodgett<sup>1</sup> a été utilisée dans ce travail pour étudier les monocouches phospholipidiques [145,146]. Cette méthode permet d'obtenir des couches de molécules amphiphiles à l'interface eau/air, ce que l'on appelle un film de Langmuir. L'étude biophysique de tels films artificiels est d'un intérêt considérable pour la compréhension de la structure et des propriétés des membranes biologiques. Parmi les avantages de cette méthode, nous pouvons citer une bonne reproductibilité des préparations d'échantillons.

## 4.2 Phases lipidiques

Si on dépose sur la surface aqueuse une goutte de solution lipidique (lipide dissous dans un solvant organique), une monocouche lipidique se forme à l'interface eau/air au cours de l'évaporation du solvant. Les parties polaires, hydrophiles, des phospholipides sont en contact avec le milieu aqueux ; les parties apolaires, hydrophobes, sont en contact avec l'air. Ainsi les propriétés amphiphiles des lipides déterminent leur orientation à l'interface liquide/air.

L'état biophysique d'un film monomoléculaire est caractérisé par la tension superficielle en fonction de l'aire moléculaire. La tension superficielle moyenne pour des conditions données caractérise une phase lipidique. Les différents états biophysiques d'une monocouche sont déterminés essentiellement par les conformations adoptées par les chaînes aliphatiques. Les têtes polaires sont organisées dans un plan (surface de l'eau) et leur compactage dépend de la capacité des chaînes aliphatiques à s'ordonner. On considère, pour les molécules couramment étudiées, que les états physiques sont au nombre de quatre (Fig. 4.2).

**Gaz (G).** L'état gazeux correspond à l'absence d'interaction entre les molécules. Elles sont extrêmement diluées à la surface et les chaînes aliphatiques sont totalement désorganisées.

**Liquide Expansé (LE).** L'état liquide expansé définit l'état pour lequel les têtes hydrophiles sont organisées en réseau 2D parallèlement à la surface et les chaînes

---

<sup>1</sup> En l'honneur d'un physicien américain Langmuir et de son assistante Blodgett.

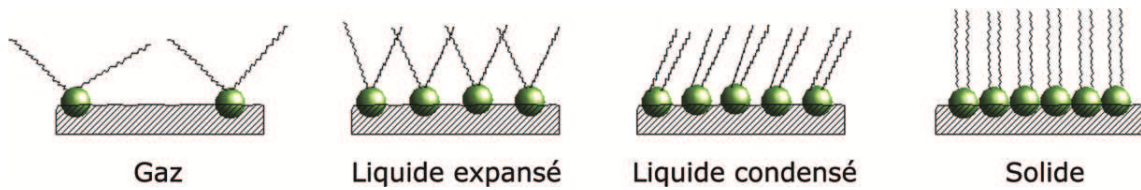


Fig. 4.2: Différentes phases d'une monocouche lipidique sur la surface d'eau.

aliphatiques restent mobiles. Cette mobilité est due à de rapides isomérisations trans-gauches des liaisons carbone-carbone.

**Liquide Condensé (LC).** L'état liquide condensé décrit l'état où toutes les chaînes aliphatiques sont en conformation trans; elles occupent une aire minimale et les têtes polaires se rapprochent. Une légère inclination des chaînes est observée, l'angle maximal rencontré est de  $30^\circ$ .

**Solide (S).** L'état solide se différencie du liquide condensé par un alignement normal des chaînes aliphatiques.

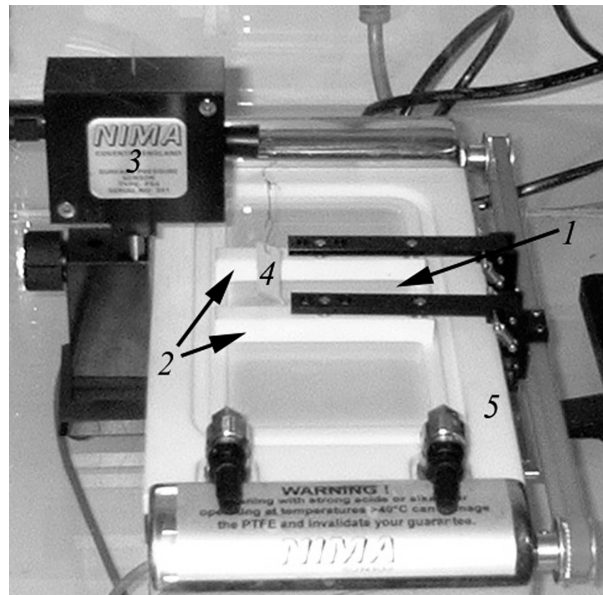
Dans le cas tridimensionnel LE et LC correspondent à la phase liquide et gel, respectivement.

## 4.3 Méthode de Langmuir-Blodgett

Historiquement, le physicien Langmuir et son assistante Blodgett ont étudié le comportement des molécules amphiphiles déposées sur une surface statique d'eau qui s'étalent pour former un film monomoléculaire. La méthode de Langmuir-Blodgett est une méthode permettant le transfert de la couche monomoléculaire formée à l'interface eau/air sur un support solide. Cette technique nous permettra d'étudier les propriétés biophysiques des monocouches phospholipidiques exposées aux OMs.

### 4.3.1 Préparation de la monocouche à l'interface eau/air

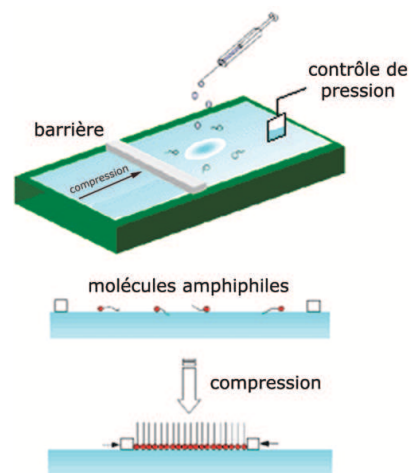
Une petite quantité d'une solution phospholipidique est déposée à la surface du liquide contenu dans la cuve de Langmuir (Fig. 4.3). Le liquide ici est de l'eau ultra-pure. Les volumes déposés sont estimés pour satisfaire deux conditions : (i) obtention d'une aire moléculaire minimale en fin de compression ; (ii) les interactions entre molécules en début de compression sont minimales.



**Fig. 4.3:** Cuve de Langmuir : 1 – film monomoléculaire des phospholipides (dimensions 50 mm × 70 mm), 2 – barrières mobiles ayant une vitesse de compression variable, 3 – tensiomètre (microbalance de Wilhelmy), 4 – papier-filtre, 5 – cuve de téflon.

L'utilisation d'une cuve de téflon de très bonne qualité est obligatoire, de même que l'emploi d'eau extrêmement pure si l'on veut, d'une part, contrôler le processus et, d'autre part, avoir une bonne reproductibilité des résultats. Les molécules s'étalent sur la surface et leur état physique est caractérisé par une phase gazeuse. Au cours de l'évaporation du solvant un film monomoléculaire se forme sur la surface aqueuse.

La cuve de Langmuir est munie de deux barrières mobiles qui permettent la compression des molécules avec une vitesse variable. Pour atteindre une valeur de pression déterminée, la monocouche est comprimée quasi-statiquement (Fig. 4.4).



**Fig. 4.4:** Préparation de la monocouche lipidique.

De manière générale, les vitesses de compression sont faibles (1-2 cm<sup>2</sup>/min) pour permettre aux molécules de s'organiser d'elles-mêmes. La compression est terminée quand les paramètres désirés (aire et pression superficielle de monocouche) sont atteints.

### 4.3.2 Transfert de la monocouche

Après la stabilisation de la monocouche à l'interface, le film peut être transféré sur un support solide pour permettre l'utilisation de nombreuses techniques d'analyse, y compris visualisation des films par microscopie.

Le prélèvement est effectué grâce à un dispositif constitué d'une pince mobile qui bloque le support (mica). Le prélèvement de la monocouche est réalisé en retirant le mica de la sous-phase (perpendiculairement à la surface) à une vitesse contrôlée (Fig. 4.5).

La vitesse constante permet d'obtenir un dépôt régulier. Les prélèvements sont effectués à partir d'un film monomoléculaire étalé sur la surface aqueuse dans une cuve de surface maximale de 85 cm<sup>2</sup> et d'aire minimale de 25 cm<sup>2</sup>. Pendant le transfert, la pression superficielle est maintenue constante afin de garder les mêmes propriétés du film. Les molécules amphiphiles se fixent sur le mica qui est hydrophile avec une bonne adhérence en formant une structure monomoléculaire.

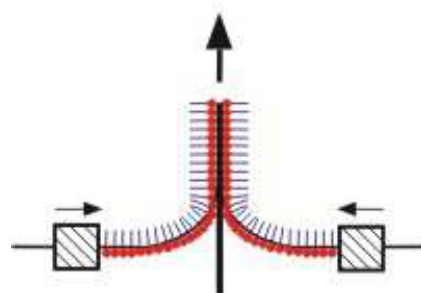


Fig. 4.5: Prélèvement de monocouche.

## 4.4 Méthodes d'analyse des membranes phospholipidiques

### 4.4.1 Mesure de la pression superficielle par la méthode de Wilhelmy

Les propriétés physiques des films monomoléculaires phospholipidiques sont caractérisées par la mesure de la dynamique de pression superficielle et de l'aire de la cuve. La pression superficielle est mesurée par la méthode de Wilhelmy [147, 148]. Dans cette méthode, on plonge vers la surface du liquide une fine lame de platine ou une feuille de papier absorbant (la lame de Wilhelmy possède un périmètre d'environ 40 mm) et la force orientée vers le bas est mesurée. Le contrôle et l'enregistrement des valeurs de la pression superficielle et de l'aire moléculaire moyenne en fonction de temps sont réalisés par le logiciel NIMA.

Par définition la pression superficielle est la force déterminée par la différence



entre la tension superficielle de la sous-phase (l'eau pure dans notre cas) et la tension superficielle en présence du film moléculaire. Le faible étalement du liquide correspond à des valeurs de tension superficielle élevées.

Pour l'eau pure, sous les conditions normales (température et pression ambiantes), la tension superficielle est égale à 72.8 mN/m, la pression superficielle est égale à 0 mN/m. En présence de molécules sur la surface, la pression superficielle augmente et la tension diminue, pendant que leur somme reste constante.

La pression superficielle est mesurée par la méthode de Wilhelmy. Une lame de papier est légèrement plongée dans l'eau (Fig. 4.6). On a alors la formation d'un ménisque. Les forces s'exerçant sur la lame sont : (i) les forces de gravitation et la tension superficielle qui tirent la lame vers la sous-phase et (ii) la force d'Archimède qui la pousse hors de l'eau.

Si la lame a comme dimensions  $l \times w \times t$  (longueur, largeur, épaisseur) et comme masse  $m$  et si elle est plongée dans l'eau sur une profondeur  $h$ , la force totale exercée sur la lame est donnée par l'équation :

$$F = \text{poids} - \text{force d'Archimède} + \text{tension superficielle} \quad (4.1)$$

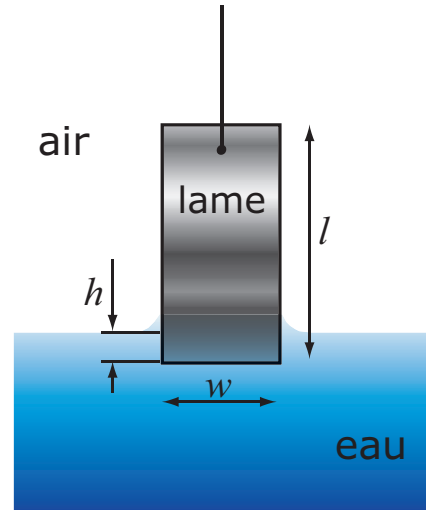
$$F = mg - \rho_l h w t g + 2(w + t)\gamma \cos \theta_0 \quad (4.2)$$

où  $\rho_l$  est la densité du liquide,  $\gamma$  est la tension superficielle de l'eau,  $\theta_0$  est l'angle de contact lame-liquide et  $g$  est l'accélération de la gravité. La pression superficielle  $\pi = \Delta\gamma$  est la différence entre les forces s'exerçant sur la lame de la part de l'eau pure et de la part de monocouche à la surface de sous-phase.

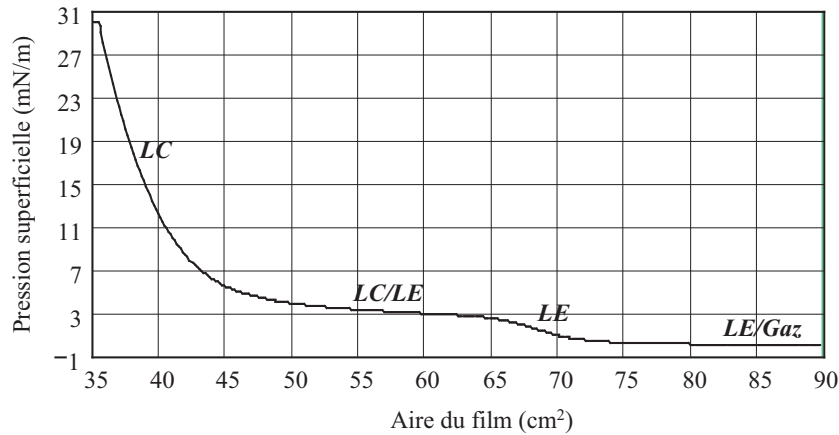
$$\Delta F = 2(w + t)(\gamma - \gamma') \cos \theta_0 = 2(w + t)\Delta\gamma \cos \theta_0 \quad (4.3)$$

$$\pi = \Delta\gamma = \frac{\Delta F}{2(w + t) \cos \theta_0} \quad (4.4)$$

où  $\Delta F$  est la force mesurée expérimentalement par la microbalance de Wilhelmy et  $\gamma'$  est la tension superficielle d'une monocouche lipidique dans l'interface eau/air. La



**Fig. 4.6:** La lame de Wilhelmy.



**Fig. 4.7:** Isotherme de compression mesurée pour un film phospholipidique DPPC à la température ambiante. Les phases lipidiques et les points de transition des phases sont disposés en fonction de la pression superficielle et de l'aire moléculaire.

lame de platine ou le papier filtre permet d'avoir  $\theta_0 = 0$  et  $t \ll w$  :

$$\pi = \frac{\Delta F}{2w}, \quad \left[ \frac{mN}{m} \right] \quad (4.5)$$

Avant de mesurer la pression superficielle, on calibre le rapport entre  $\pi$  et  $\Delta F$  et on met le niveau initial de la pression superficielle de l'eau égal à 0 mN/m.

A cause des interactions latérales entre les molécules lipidiques, la valeur de la pression superficielle dépend directement de la concentration superficielle des molécules. En augmentant la concentration des molécules ou la pression superficielle d'un film phospholipidique, les molécules phospholipidiques adoptent l'une des phases suivantes : gaz (G), liquide expansé (LE), liquide condensé (LC) ou solide (S).

La figure 4.7 montre une isotherme typique pour le lipide DPPC (température ambiante) qui représente la dynamique de pression superficielle en fonction de l'aire du film. Les isothermes, comme leur nom l'indique, sont mesurées pour une température constante pendant la compression de la monocouche. Les plateaux correspondent à une coexistence de deux phases ; les changements de pente donnent les pressions de transition de phase. Les points de transition de phase dépendent du type de phospholipides et de la température.

#### 4.4.2 Analyse topographique par Microscopie à Force Atomique (AFM)

Après prélèvement, la monocouche phospholipidique est analysée par Microscopie à Force Atomique (AFM, Atomic Force Microscopy) [149]. Le principe de fonctionnement de l'AFM est basé sur le contrôle des interactions locales entre une pointe montée sur un microlevier et la surface de l'échantillon. La mesure de la flexion du levier (dans un sens ou dans l'autre) donne une mesure directe de la force d'interaction entre la surface sondée et la pointe. La pointe se déplace point par point sur la surface et fléchit sous l'effet des forces d'interactions avec la surface. Un ordinateur enregistre ces variations de hauteur et peut ainsi reconstituer une image topographique de la surface sondée.

L'information topographique obtenue par AFM permet d'analyser les microdomaines phospholipidiques par la différence des hauteurs moléculaires. Les forces détectées sont de l'ordre de  $10^{-6}$  à  $10^{-12}$  N. La résolution latérale est de l'ordre de quelques nanomètres, mais la résolution verticale est par contre de l'ordre de l'Angström (0.1 nm) : on peut aisément visualiser des marches atomiques sur une surface propre.

Dans notre travail, le microscope AFM a été utilisé pour l'observation de membranes biphasiques (lipides condensés et lipides expansés) composées de deux sortes de lipides différents avant et après une exposition au rayonnement millimétrique à 60 GHz de faible puissance.

### 4.5 Avantages et limitations de l'approche modèle dans les expériences bioélectromagnétiques

Contrairement aux études *in vivo*, la considération des modèles artificiels des membranes biologiques fournit l'information sur les propriétés biophysiques des membranes pendant une exposition à un stimulus extérieur comme par exemple le rayonnement millimétrique.

Les avantages d'une telle approche sont multiples :

- Étude de la structure fondamentale des membranes biologiques ;
- Pas de conditions environnementales spécifiques ;
- Caractérisation des paramètres biophysiques de l'échantillon ;

- Reproductibilité des résultats.

Les limitations d'une telle approche sont les suivantes :

- Pas de prise en compte des processus de thermorégulation dans les organismes vivants ;
- Nous ne considérons pas le couplage entre les deux feuilles phospholipidiques.

Cependant les données obtenues dans telles expériences permettent d'approcher des mécanismes d'interactions bioélectromagnétiques au niveau cellulaire.



# Chapitre 5

## Dispositifs et paramètres de rayonnement

Dans ce chapitre nous allons décrire le système d'exposition. Les méthodes de mesure et de calcul des différents paramètres d'exposition seront considérés en détails. Pour assurer une bonne reproductibilité et précision des expériences bioélectromagnétiques une bonne dosimétrie est indispensable.

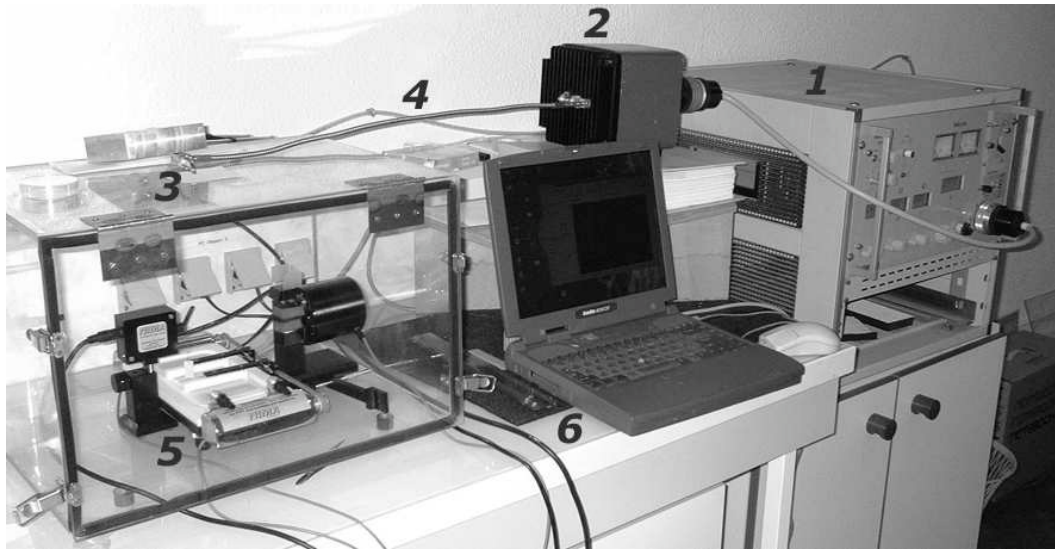
### 5.1 Système d'exposition

Un système d'exposition basé sur des antennes cornet pyramidal ou cornet conique a été développé pour l'exposition des membranes artificielles phospholipidiques aux OMs (Fig. 5.1). Le système fonctionne dans une large gamme de fréquences. En changeant l'oscillateur à tube carcinotron et en adaptant le système de guides d'onde, une bande de fréquences s'étendant de 30 GHz à 170 GHz peut être couverte. Les paramètres d'exposition qui peuvent être assurés par le système à la base de l'oscillateur à tube carcinotron 50-75 GHz sont présentés dans le tableau 5.1.

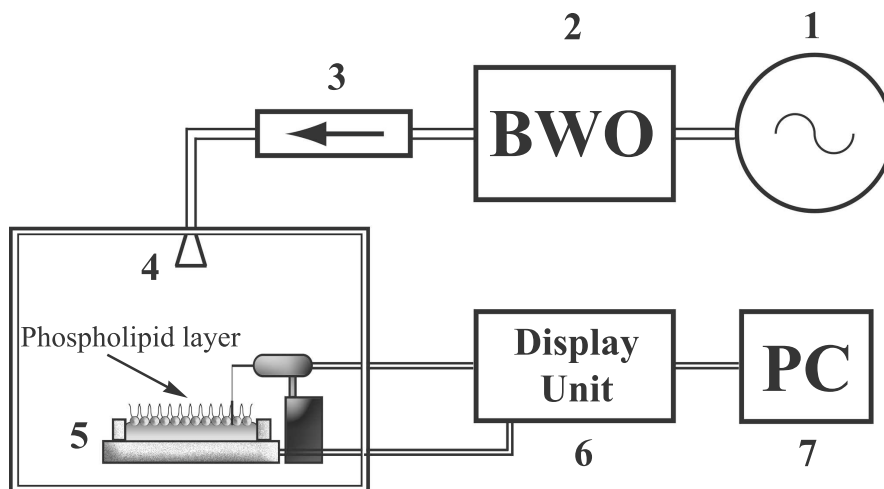
Fréquence, GHz	Puissance, mW	Polarisation	Modulation	Durée d'exposition
50-75	0-50 (à 60 GHz)	Linéaire ou circulaire	Modulation d'amplitude 1kHz	Jusqu'à une semaine

**Tab. 5.1:** Paramètres d'exposition dans la bande V.

Le schéma-bloc des dispositifs d'expérience est montré sur la figure 5.2. Un os-



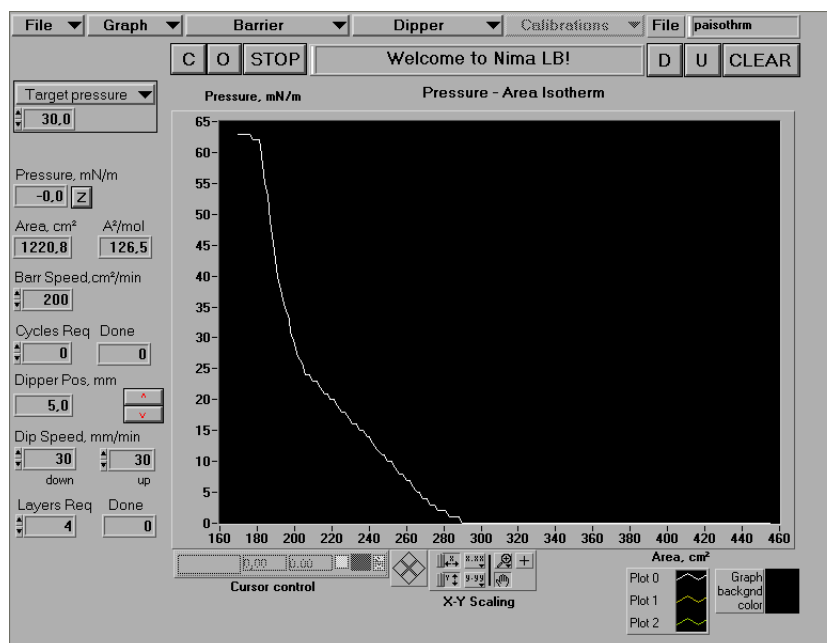
**Fig. 5.1:** Dispositifs et système d'exposition : (1) un générateur à haute tension RWON 14; (2) un oscillateur à tube carcinotron RWO 75, (3) une antenne cornet pyramidal ou conique, (4) des guides, (5) une cuve de Langmuir, (6) un ordinateur pour l'enregistrement de la pression superficielle.



**Fig. 5.2:** Dispositifs d'expériences : (1) un générateur à haute tension Siemens RWON 14; (2) un oscillateur à tube carcinotron RWO 75 (Backward-Wave-Oscillator, BWO) avec une puissance contrôlable ( $P_{max} = 50 \text{ mW}$  à  $60 \text{ GHz}$ ); (3) un isolateur de signal HP V365A; (4) une antenne cornet pyramidal ou conique; (5) une cuve de Langmuir; (6) l'interface électronique; (7) un ordinateur avec le logiciel de monitoring NIMA (Fig. 5.3).

cillateur à tube carcinotron (Backward-Wave-Oscillator, BWO) fonctionnant dans la bande V (50-75 GHz) (2) est alimenté par les courants et les tensions produits par le générateur à haute tension (1). La sortie du BWO est connectée à un guide d'onde rectangulaire dont la section est de  $3.76 \text{ mm} \times 1.88 \text{ mm}$  et qui fonctionne en mode  $\text{TE}_{10}$ . Un isolateur de signal (isolation large bande de  $-30 \text{ dB}$ ) a été intégré dans le circuit pour minimiser l'effet de réflexion de la source et pour réduire la désadaptation (3).

Une membrane phospholipidique déposée à l'interface eau/air est située dans une cuve de Langmuir (5). La cuve de Langmuir et le tensiomètre sont pilotés par une unité de l'interface électronique connectée à un ordinateur (6). Un logiciel NIMA permet le pilotage de la cuve et l'enregistrement de la dynamique de pression superficielle du film (Fig. 5.3).



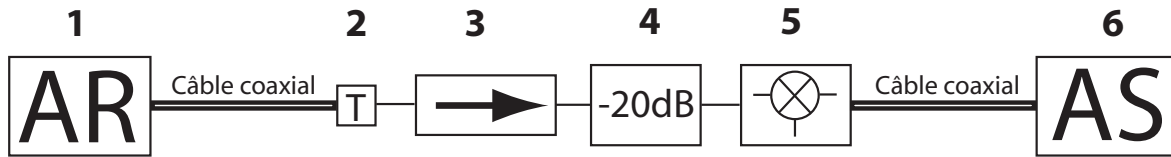
**Fig. 5.3:** Interface du logiciel NIMA responsable du pilotage de la cuve de Langmuir et de l'enregistrement de la dynamique de pression superficielle du film.

## 5.2 Mesure de la puissance

La puissance d'émission peut être mesurée directement à l'aide d'un "power meter". Ici nous utilisons une méthode indirecte basée sur la comparaison de puissance d'une source de puissance inconnue avec celle d'une source dont la puissance de sortie est connue. La comparaison s'effectue à l'aide d'un analyseur de spectre. Une mesure de puissance d'émission peut être divisée en deux étapes : (i) mesure à l'aide d'analyseur de spectre d'une source dont la puissance est connue, (ii) mesure à l'aide d'analyseur de spectre d'une source dont la puissance est inconnue.

(1) *Mesure à l'aide d'analyseur de spectre de puissance d'une source dont la puissance est connue* (Fig. 5.4). Nous avons utilisé le générateur de l'analyseur de réseau à 60 GHz pour calibrer l'analyseur de spectre. Cette étape est indispensable pour les raisons suivantes :



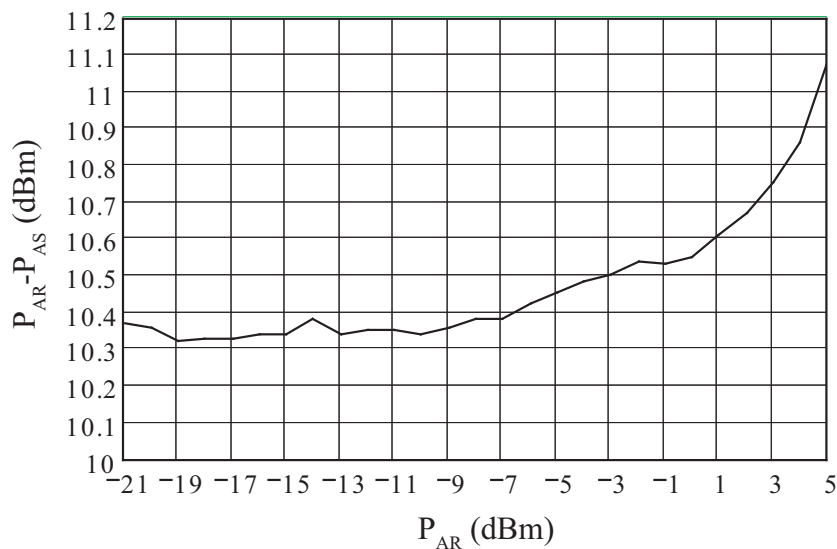


**Fig. 5.4:** Schéma-bloc pour le calibrage de l'analyseur de spectre à l'aide d'un analyseur de réseau.  
 (1) Analyseur de réseau; (2) transition câble coaxial/guide; (3) isolateur -30 dB; (4) coupleur -20 dB; (5) mélangeur 50-75 GHz; (6) analyseur de spectre.

- L'analyseur de spectre dont on dispose (R3182 Spectrum Analyzer) fonctionne dans la bande de 9 kHz-40 GHz et il ne couvre pas la bande autour de 60 GHz;
- Un élément actif (mélangeur, 50-75 GHz Mixer M15HWD) a été intégré dans le schéma pour pouvoir mesurer la puissance à 60 GHz.

Pour déterminer la bande de puissance qui correspond à une atténuation constante de mélangeur et pour trouver le coefficient d'atténuation de tel schéma, les mesures suivantes ont été effectuées :

- Mesure de la différence entre la puissance mesurée par l'analyseur de spectre ( $P_{AS}$ ) et la puissance de sortie d'analyseur de réseau ( $P_{AR}$ ) en fonction de  $P_{AR}$  (Fig. 5.5). Les effets non-linéaires apparaissent à partir de la valeur de  $P_{AR}$  de



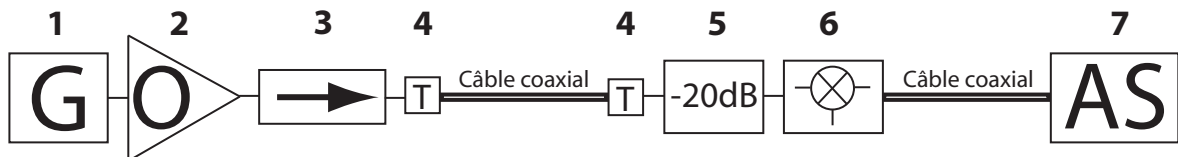
**Fig. 5.5:** La puissance mesurée par analyseur du spectre ( $P_{AS}$ ) sans coupleur en fonction de puissance d'analyseur de réseau ( $P_{AR}$ ).

- 10 dBm. Pour rester dans la zone linéaire des mesures de puissance, un coupleur - 20 dB a été placé devant le mélangeur.
- Mesures des pertes des différents éléments du circuit : pertes d'isolateur à 60 GHz égales -3 dB; pertes intégrales de deux transitions et un câble coaxial à 60 GHz

égales  $-3.47$  dB. Ces mesures permettront de prendre en compte les pertes des différents éléments du schéma de mesures.

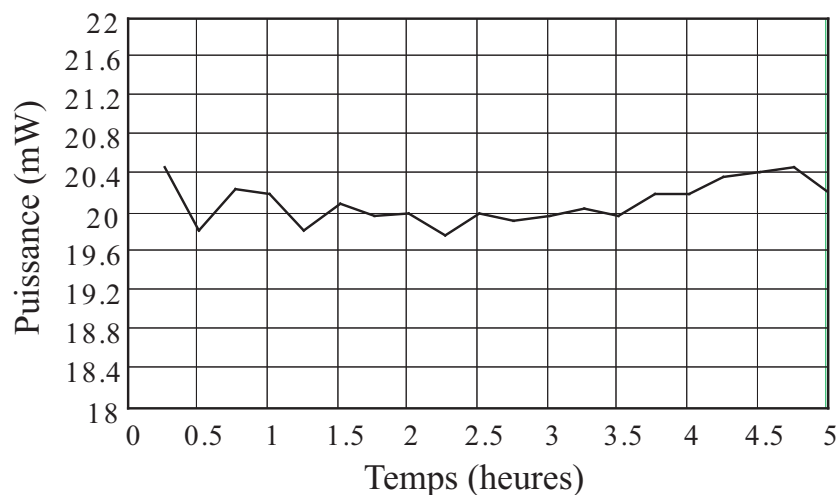
Finalement, les pertes intégrales qui comprennent les pertes du coupleur, du mélangeur, de l'isolateur et des guides à  $60$  GHz sont égales à  $-31$  dB. C'est la valeur qui doit être déduite de la valeur affichée par analyseur de spectre pour obtenir la valeur de puissance du générateur. Cette méthode est valide pour des mesures de puissance du générateur inférieure à  $21$  dBm ( $125$  mW).

(2) *Mesure à l'aide d'analyseur de spectre de puissance d'une source dont la puissance est inconnue* (Fig. 5.6).



**Fig. 5.6:** Schéma-bloc pour les mesures de puissance. (1) générateur de haute tension (G); (2) - oscillateur à tube carinotron (O); (3) isolateur -  $30$  dB; (4) transition câble coaxial/guide; (5) coupleur  $-20$  dB; (6) mélangeur ( $50$ - $75$  GHz); (7) analyseur de spectre (AS).

La stabilité de puissance du générateur mesurée pendant  $5$  heures pour une puissance moyenne de  $20$  mW ( $13$  dBm) est de  $0.694$  mW (Fig. 5.7). Le rapport signal sur bruit égal à  $28.8$ .

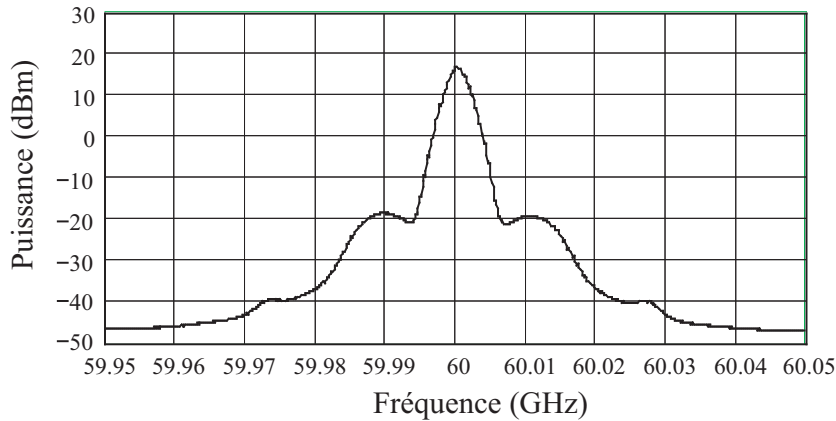


**Fig. 5.7:** Stabilité en puissance pour une puissance moyenne de  $20$  mW.

Dans nos expériences, trois niveaux de puissance ont été utilisés :  $0.5$ ,  $20$  et  $50$  mW. La puissance a été mesurée avant et après chaque expérience.

### 5.3 Spectre du signal

Le spectre du signal mesuré à l'aide d'un analyseur de spectre (R3182 Advantest) pour la fréquence centrale de 60 GHz est montré sur la figure 5.8.



**Fig. 5.8:** Spectre du signal mesuré à l'aide de l'analyseur de spectre.

La bande passante à -3 dB de la fréquence centrale (60 GHz) est de 2.8 MHz.

### 5.4 Stabilité en fréquence et en puissance du générateur

Les stabilités en fréquence et en puissance du générateur sont basses pendant les 1-2 premières heures d'exposition car la température de tous les éléments du générateur n'est pas encore stabilisée. Les valeurs de puissance maximale et de fréquence du signal ont été mesurées pendant les premières 90 min de l'exposition toutes les 10 min. Pour la puissance moyenne égale à 50 mW (17 dBm) la variation maximale de la valeur moyenne est égale à 0.58 mW, ce qui correspond à une stabilité de puissance de 1.16% (Fig. 5.9). La figure 5.10 montre les variations de fréquence autour de 60.0038 GHz. La stabilité de fréquence pendant les premières 90 min de l'exposition est de 2.4 MHz ( $\Delta f/f = 4 \times 10^{-5}$ ). Ces caractéristiques assurent la localisation du signal émis dans la bande de fréquence de forte absorption par l'oxygène moléculaire.

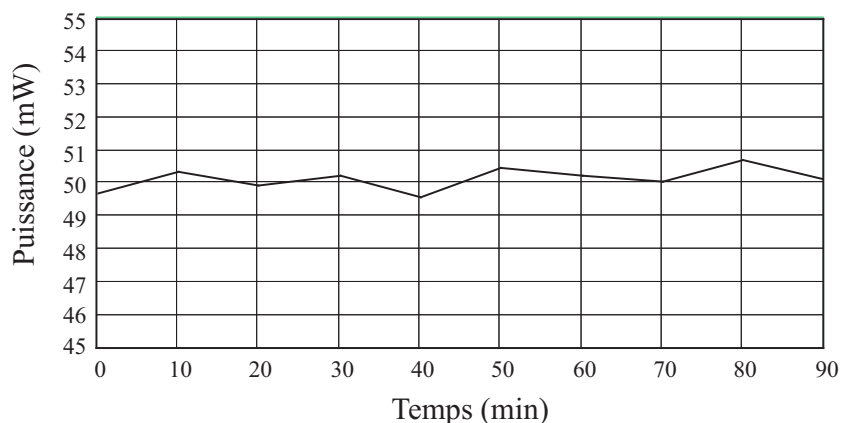


Fig. 5.9: Stabilité en puissance du générateur.

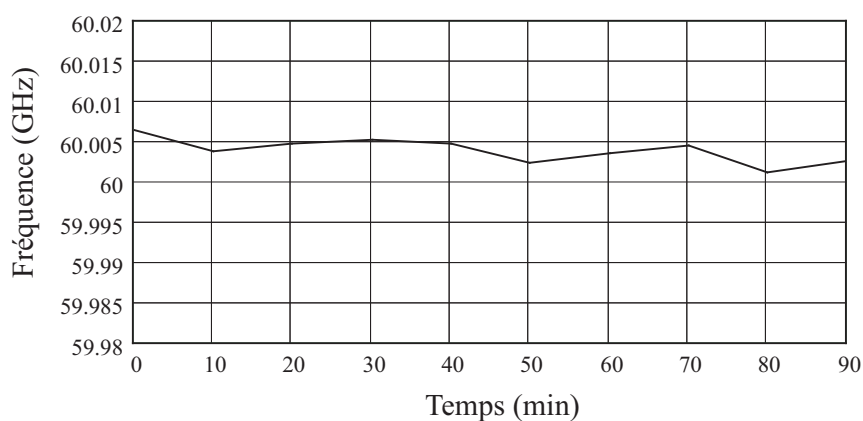


Fig. 5.10: Stabilité en fréquence du générateur.

## 5.5 Modulation d'amplitude

Le générateur à haute tension permet de moduler la porteuse par des impulsions carrées de fréquence de modulation égal à 1 kHz. Les spectres mesurés pour un signal continu et un signal modulé à 1 kHz sont présentés sur la figure 5.11. La mesure de puissance de rayonnement pour le régime avec la modulation indique la diminution de niveau de puissance de -3 dB. Ainsi la puissance maximale de générateur à 60 GHz pour un signal modulé est de 14 dBm (25 mW). Pour une antenne cornet conique cette valeur correspond à la densité superficielle de puissance et au champ électrique de  $\Phi_m=0.26 \text{ mW/cm}^2$  et  $|\vec{E}|=58.3 \text{ V/m}$  à la distance de 22 cm de l'antenne (voir sous-section 5.6.2 Cornet conique).

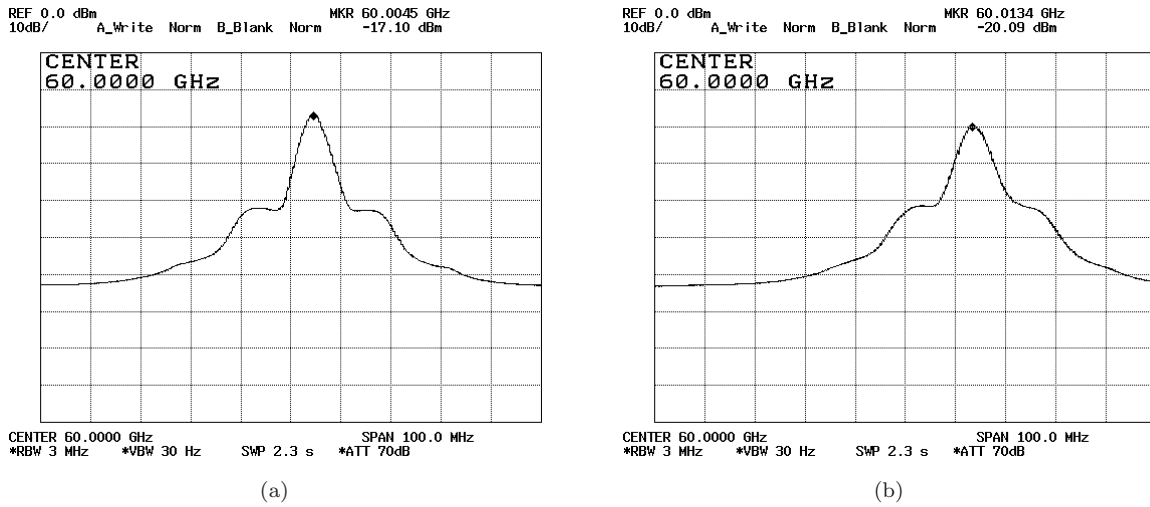


Fig. 5.11: Diagrammes spectraux de puissance : (a) sans modulation et (b) avec modulation d'amplitude carrée 1 kHz.

## 5.6 Diagramme de rayonnement et distribution de champ au niveau de la membrane

Les antennes utilisées dans les expériences sont un cornet pyramidal et un cornet conique. Le cornet pyramidal a pour dimensions  $a=22.2$  mm (plan E) et  $b=16.7$  mm (plan H) et il a une polarisation linéaire. Le cornet conique possède une ouverture de diamètre  $D=23.8$  mm et le champ rayonné a une polarisation circulaire. Le cornet conique est plus directif tandis que le diagramme du cornet pyramidal est plus large. Le choix de l'antenne et de la distance entre l'antenne et l'échantillon permet d'avoir des répartitions différentes de champ au niveau de la membrane.

### 5.6.1 Cornet pyramidal

Dans cette sous-section nous déterminerons les zones de rayonnement pour l'antenne cornet pyramidal utilisée dans nos expériences. Ensuite nous comparerons les diagrammes de rayonnement calculés pour la zone de Fresnel (zone où se trouve la membrane) et pour la zone de Fraunhofer. Nous montrerons que l'approximation de champ lointain est applicable pour les conditions de nos expériences. Cela sera confirmé par les mesures de l'amplitude et de la phase sur l'axe principal de l'antenne. Les diagrammes de rayonnement pour les plans E et H calculés en utilisant deux méthodes différentes seront confirmés par les mesures en chambre anéchoïde. Enfin, nous calculerons la distribution de la densité superficielles de puissance au ni-

veau de la membrane, ainsi que les valeurs de la densité de puissance moyenne, la densité de puissance maximale, les champs électriques et magnétiques maximaux au niveau de la membrane.

### 5.6.1.1 Zones de rayonnement

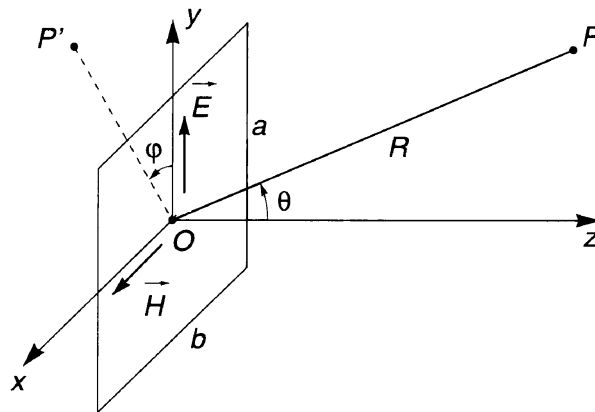


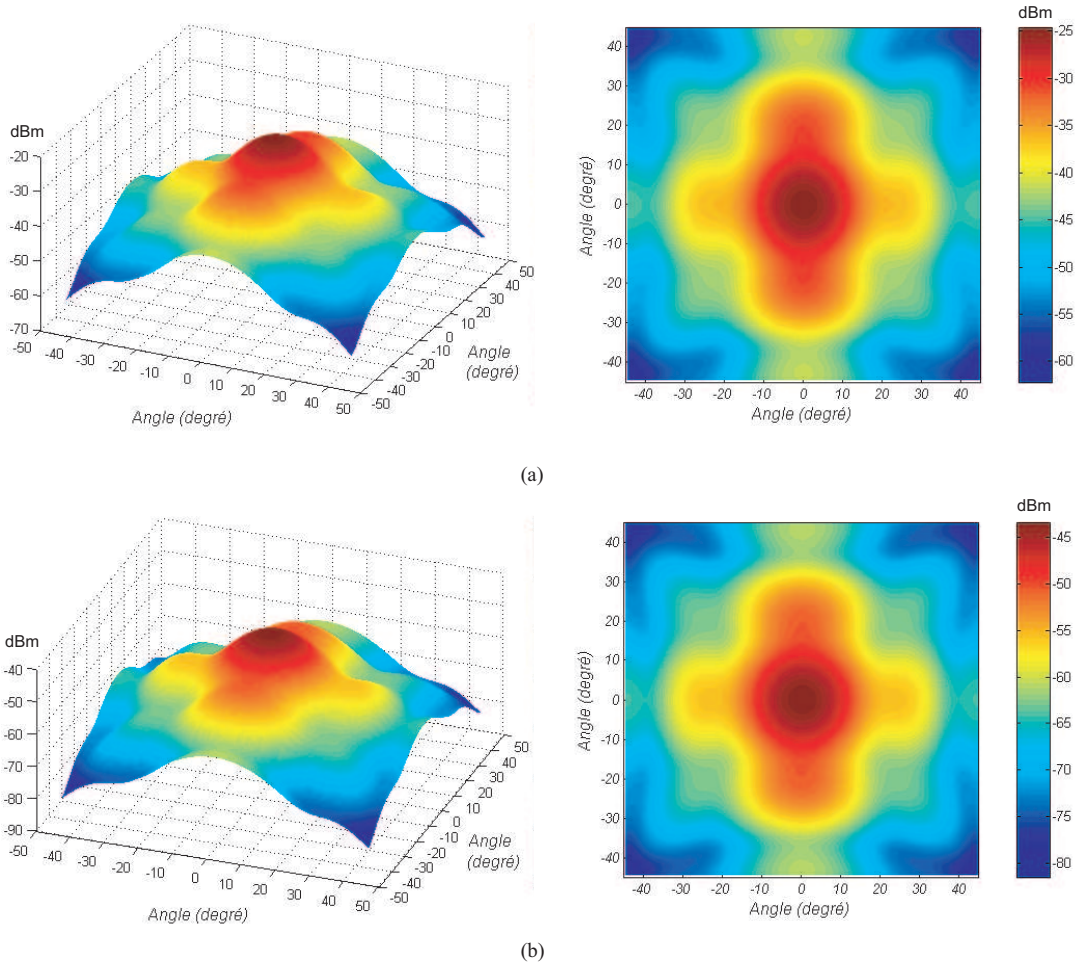
Fig. 5.12: L'ouverture de l'antenne cornet pyramidal.

L'entrée de l'antenne est fixée sur un guide rectangulaire de dimensions  $3.75 \text{ mm} \times 1.88 \text{ mm}$ , qui fonctionne en mode  $\text{TE}_{10}$ . Le mode  $\text{TE}_{10}$  correspond à une distribution d'amplitude constante dans le plan E et une répartition cosinusoidale dans le plan H. A partir de  $2(a^2 + b^2)/\lambda$  (la distance de Fraunhofer), on peut considérer avec une bonne approximation que l'onde rayonnée est une onde sphérique et que le diagramme de rayonnement est le même quelle que soit la distance. Pour le cornet pyramidal à 60 GHz ( $\lambda_0$  est de 5 mm), la zone lointaine dans le vide correspond à  $R > 308 \text{ mm}$  (pour  $a=22.2 \text{ mm}$ ,  $b=16.7 \text{ mm}$ ), la zone de Fresnel (zone transitoire) est la zone à partir de  $0.62\sqrt{(a^2 + b^2)^{3/2}/\lambda_0} = 40 \text{ mm}$  à 308 mm. Dans les conditions de nos expériences la distance entre l'antenne et la membrane est de  $r=220 \text{ mm}$ , ainsi la membrane se trouve dans la zone transitoire.

### 5.6.1.2 Distributions de champs et de densité de puissance théoriques

La figure 5.13 montre les distributions de puissance calculées sur des surfaces planes éloignées de l'antenne de 22 cm (zone de Fresnel) et de 2 m (zone de Fraunhofer).

Considérons le cornet comme une ouverture rayonnante sur laquelle le champ EM a la même répartition, en amplitude, en phase et en polarisation que sur l'embouchure rectangulaire du cornet (principe d'Huygens). Les champs rayonnés sont



**Fig. 5.13:** Distribution de puissance de rayonnement ( $P=1$  dBm) de l'antenne cornet pyramidal à 60 GHz sur un surface plane éloignée de l'antenne de (a) 22 cm (zone de Fresnel); (b) 2 m (zone lointaine).

déduits des potentiels vecteurs électriques et magnétiques obtenus par intégration des courants  $J_y(x, y)$  et  $M_x(x, y)$  dans l'ouverture du cornet [150]. Les courants électrique et magnétique équivalents sur l'ouverture rectangulaire sont données pour un cornet pyramidal par les équations suivantes [151] :

$$\begin{aligned}
 J_y(x, y) &= \frac{-E_0}{\eta} \cos\left(\frac{\pi}{b}x\right) e^{-j[k(x^2/\rho_2+y^2/\rho_1)/2]} & -b/2 \leq x \leq b/2 \\
 M_x(x, y) &= E_0 \cos\left(\frac{\pi}{b}x\right) e^{-j[k(x^2/\rho_2+y^2/\rho_1)/2]}
 \end{aligned} \tag{5.1}$$

où  $k = \frac{2\pi}{\lambda_0} = 1.1256 \text{ mm}^{-1}$  est la constante de propagation à 60 GHz,  $\rho_1 = 24.5 \text{ mm}$  et  $\rho_2 = 20.5 \text{ mm}$  sont les distances entre le centre de phase du cornet et le centre de son ouverture dans les plans H et E respectivement [151]. L'intervalle d'échantillonnage des courants sur l'ouverture est de 0.2 mm.

Les effets de diffraction sur les arêtes du cornet sont négligés. Ce modèle ne considère pas des réflexions multiples dans la cuve de Langmuir.

Les diagrammes montrent une bonne concordance de distribution de puissance au niveau du premier lobe pour les distances de 22 cm et de 2 m (Fig. 5.13). Ainsi pour la membrane qui se trouve dans la zone de rayonnement inférieure à  $10^\circ$  nous pouvons utiliser le diagramme de rayonnement de l'antenne cornet pyramidal mesuré expérimentalement dans la chambre anechoïde pour la zone lointaine.

### 5.6.1.3 Mesures de l'amplitude et de la phase sur l'axe principal de l'antenne

Pour confirmer les calculs théoriques et évaluer l'hypothèse de champ lointain, nous avons mesuré la distribution de l'amplitude et de la phase sur l'axe principal pour différentes distances.

Chaque composante du champ dans la zone lointaine d'un point radiant s'écrit comme :

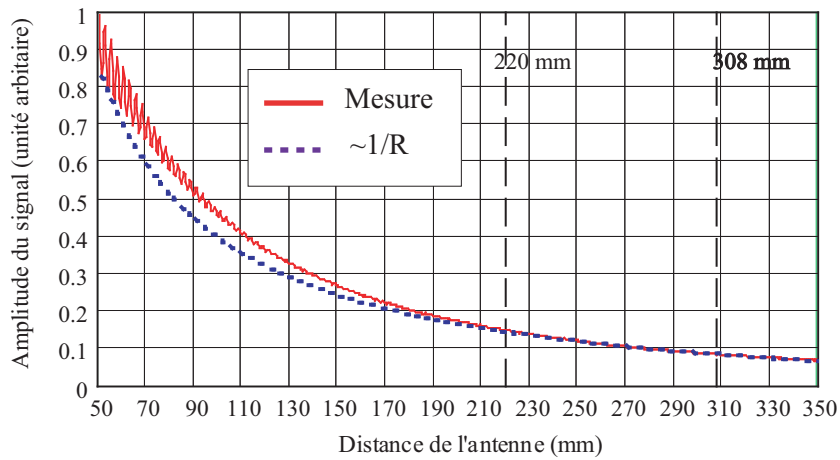
$$\tilde{E}(\theta, \varphi, R) = E(\theta, \varphi) \exp\left(i\psi(\theta, \varphi)\right) \frac{\exp(-jkR)}{R} \quad (5.2)$$

ou  $\vec{R}$  est le vecteur du milieu de l'ouverture au point d'observation ;  $\theta$  est l'angle entre  $\vec{R}$  est l'axe de cornet ;  $x$  est l'axe parallèle à  $b$  ;  $y$  est l'axe parallèle à  $a$  ;  $E(\theta, \varphi)$  et  $\psi(\theta, \varphi)$  sont respectivement les variations de l'amplitude et de la phase en fonction de  $(\theta, \varphi)$  (Fig. 5.12).

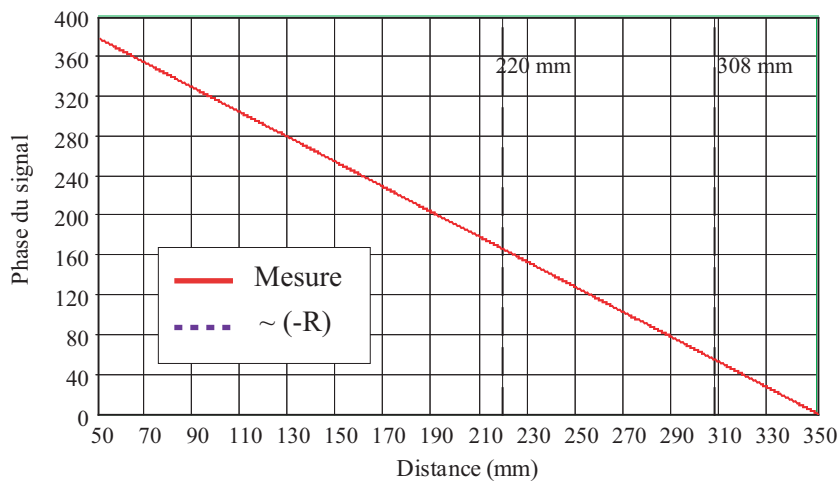
Ainsi, dans la zone de Fraunhofer, pour des valeurs fixes de  $(\theta, \varphi)$  l'amplitude de champ est inversement proportionnelle à  $R$  et la phase est proportionnelle à  $(-R)$ . Nous avons mesuré la distribution d'amplitude et de phase de signal sur l'axe principal de l'antenne en fonction de la distance de l'antenne de 50 mm à 350 mm avec un pas de mesure de 0.4 mm (Fig. 5.14).

Les résultats montrent que les mesures pour les distances de 22 cm et de 2 m coïncident avec les courbes théoriques pour le champ lointain. Donc nous pouvons considérer les conditions de l'exposition dans nos expériences comme les conditions de la zone de rayonnement lointaine avec une bonne approximation.





(a)



(b)

**Fig. 5.14:** Mesure de l'amplitude (a) et de la phase (b) du signal du cornet pyramidal à 60 GHz en fonction de distance de l'antenne sur l'axe principal.

#### 5.6.1.4 Diagrammes de rayonnement dans les plans E et H

Nous calculons maintenant les diagrammes de rayonnement pour deux plans principaux E et H dans la zone lointaine et comparons le résultat avec les mesures en chambre anéchoïde. Considérons les variations de phase sur l'ouverture données par l'expression  $\frac{ky^2}{2\rho_1}$  dans le plan E et  $\frac{kx^2}{2\rho_2}$  dans le plan H. Dans ces conditions, les trois composantes du champ électrique s'écrivent dans le système de coordonnées sphé-

riques [151] :

$$\begin{cases} E_r = 0 \\ E_\theta = j \frac{k E_0 e^{-jkR}}{4\pi R} [\sin \varphi (1 + \cos \theta) I_1 I_2] \\ E_\varphi = j \frac{k E_0 e^{-jkR}}{4\pi R} [\cos \varphi (1 + \cos \theta) I_1 I_2] \end{cases} \quad (5.3)$$

où

$$\begin{aligned} I_1 &= \frac{1}{2} \sqrt{\frac{\pi \rho_2}{k}} \left( e^{j(k'_x \rho_2 / 2k)} \left\{ [C(t'_2) - C(t'_1)] - j[S(t'_2) - S(t'_1)] \right\} + \right. \\ &\quad \left. + e^{j(k'_x \rho_2 / 2k)} \left\{ [C(t'_2) - C(t'_1)] - j[S(t'_2) - S(t'_1)] \right\} \right) \\ I_2 &= \sqrt{\frac{\pi \rho_1}{k}} e^{j(k'_y \rho_1 / 2k)} \left\{ [C(t_2) - C(t_1)] - j[S(t_2) - S(t_1)] \right\} \end{aligned} \quad (5.4)$$

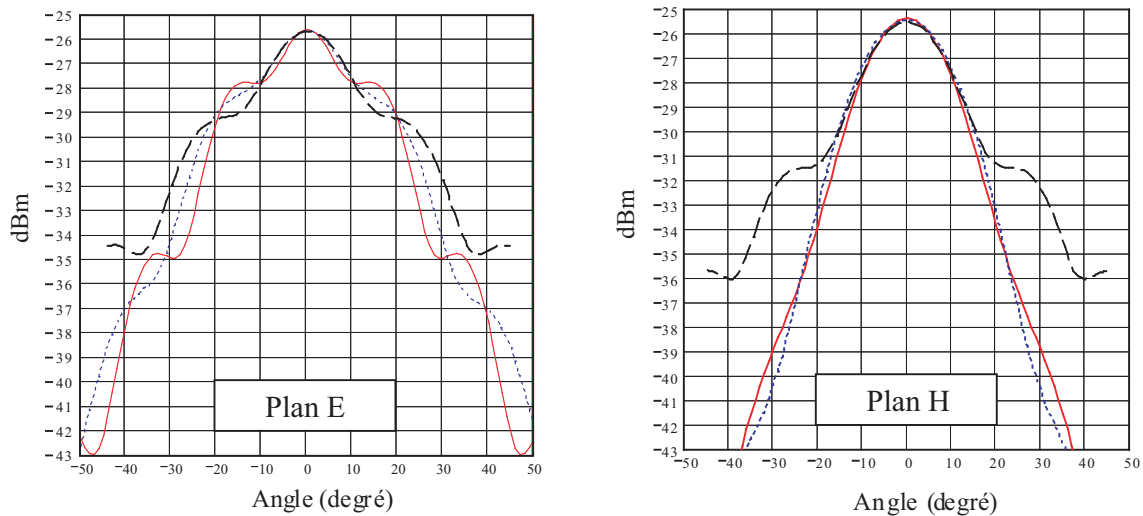
$$\begin{aligned} C(x) &= \int_0^x \cos \left( \frac{\pi}{2} t^2 \right) dt \\ S(x) &= \int_0^x \sin \left( \frac{\pi}{2} t^2 \right) dt \end{aligned} \quad (5.5)$$

$$\begin{aligned} t_1 &= \sqrt{\frac{1}{\pi k \rho_1}} \left( -\frac{kb}{2} - k_y \rho_1 \right) \\ t_2 &= \sqrt{\frac{1}{\pi k \rho_1}} \left( \frac{kb}{2} - k_y \rho_1 \right) \\ k_y &= k \sin(\theta) \sin(\varphi) \end{aligned} \quad (5.6)$$

$$\begin{aligned} t'_1 &= \sqrt{\frac{1}{\pi k \rho_2}} \left( -\frac{kb}{2} - k'_x \rho_2 \right) \\ t'_2 &= \sqrt{\frac{1}{\pi k \rho_2}} \left( \frac{kb}{2} - k'_x \rho_2 \right) \\ k'_x &= k \sin(\theta) \cos(\varphi) + \frac{\pi}{b} \end{aligned} \quad (5.7)$$

$$\begin{aligned}
 t_1'' &= \sqrt{\frac{1}{\pi k \rho_2}} \left( -\frac{kb}{2} - k_x'' \rho_2 \right) \\
 t_2'' &= \sqrt{\frac{1}{\pi k \rho_2}} \left( \frac{kb}{2} - k_x'' \rho_2 \right) \\
 k_x'' &= k \sin(\theta) \cos(\varphi) + \frac{\pi}{b}
 \end{aligned} \tag{5.8}$$

La figure 5.15 montre les diagrammes de rayonnement dans les deux plans principaux (plan E et plan H) : (i) diagrammes calculés analytiquement pour la distribution de phase quadratique sur l'ouverture de l'antenne (champ lointain) ; (ii) diagrammes mesurés dans une chambre anéchoïde à 60 GHz (champ lointain) ; (iii) diagrammes obtenue à partir des distributions de puissance de rayonnement calculées dans la sous-section 5.6.1.2 Distributions de champs et de densité de puissance théoriques (champ proche et champ lointain).

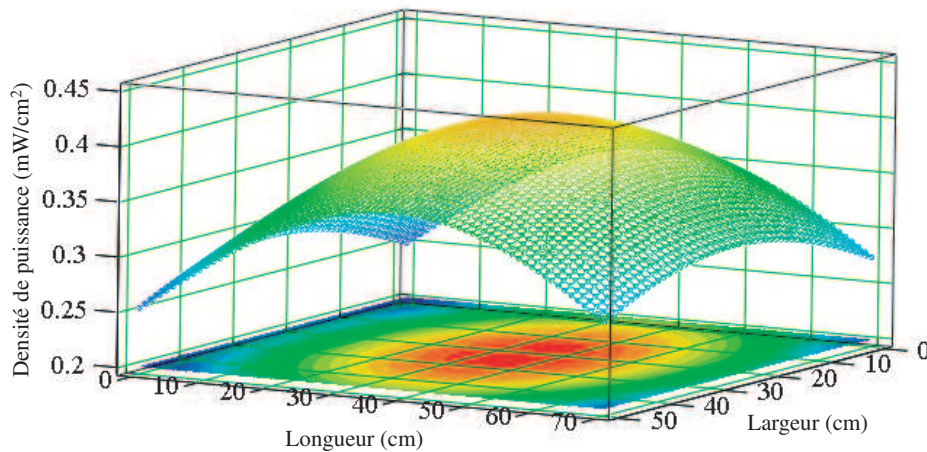


**Fig. 5.15:** Diagrammes de rayonnement de l'antenne cornet pyramidal dans le plan E et dans le plan H à 60 GHz. Courbe en trait plein – distribution de l'amplitude de champ électrique calculée analytiquement pour la distribution de phase quadratique sur l'ouverture de l'antenne. Courbe en pointillés – mesures en chambre anéchoïde. Courbe en tirets – distribution de l'amplitude de champ électrique obtenue à partir des diagrammes calculés dans la sous-section 5.6.1.2 Distributions de champs et de densité de puissance théoriques.

Les angles d'ouverture à -3 dB dans le plan E et le plan H valent respectivement  $\alpha_1=17^\circ$  et  $\alpha_2=13^\circ$ . Ainsi la région de rayonnement au niveau -3 dB dans deux plans principaux à la distance 220 mm est de 146.75 mm  $\times$  110.8 mm. La membrane se trouve toujours dans la région de rayonnement où les variations de la puissance sont inférieures à 3 dB (les dimensions de la surface sont de 70 mm  $\times$  50 mm).

### 5.6.1.5 Distribution de la densité superficielle de puissance sur la membrane

La figure 5.16 représente la distribution de densité superficielle de puissance de rayonnement sur la surface de la membrane de dimensions de 50 mm × 70 mm.



**Fig. 5.16:** Distribution de puissance de rayonnement sur la surface de la membrane de dimensions de 50 mm × 70mm pour une antenne cornet pyramidal à 60 GHz à la distance de 22 cm de la membrane.

Les variations maximales de la densité superficielle de puissance au niveau de la membrane sont inférieures à 2.1 dB (38%) par rapport à la valeur de la densité de puissance maximale au centre de la membrane. La fraction de la puissance totale incidente sur la membrane est de  $\delta=15\%$ . Cette valeur a été calculée à partir du diagramme de rayonnement mesuré dans la chambre anechoïde.

### 5.6.1.6 Densité superficielle de puissance et valeur de champ

Nous estimons la *densité de puissance moyenne* au niveau de la membrane à partir des valeurs de puissance moyenne totale rayonnée en espace libre par l'antenne ( $P$ ), de l'aire de la membrane ( $S$ ) et  $\delta$  :

$$\Phi_m = \frac{P \cdot \delta}{S} \quad (5.9)$$

Les valeurs de la densité de puissance moyenne pour les puissances de rayonnement utilisées dans nos expériences sont données dans le tableau 5.2.

La *densité de puissance maximale* (dans l'axe) rayonnée à la distance  $R$  est calculée par la formule suivante :

$$\Phi_M = \frac{P \cdot G}{4\pi r^2} \quad (5.10)$$

où  $G$  est le gain isotropique maximal de l'antenne,  $r$  - la distance entre l'antenne et la membrane. Le gain maximal pour un cornet pyramidal est donné par la formule de Schelkunoff [152] :

$$G(dB) = 10.08 + 10 \log \frac{S}{\lambda^2} - L_e - L_h \quad (5.11)$$

$L_e$  et  $L_h$  sont des facteurs qui tiennent compte de la réduction du gain due à la variation de phase. Pour l'antenne que nous avons utilisée  $L_e=4$  dB et  $L_h=0.5$  dB. Ainsi la valeur de gain théorique est de  $G=17.29$  dB (53.5). Le gain maximal isotropique mesuré dans la chambre anechoïde est égal à 16.97 dB (49.7). C'est à partir de cette valeur de gain que nous avons calculé la densité superficielle de puissance au niveau de la membrane. Les valeurs de la densité superficielle de puissance maximale pour les différentes puissances de rayonnement sont présentées dans le tableau 5.2.

Les champs électrique  $|\vec{E}|$  et magnétique  $|\vec{H}|$  maximaux (dans l'axe) rayonnés à la distance  $r$  pour la zone de Fraunhofer sont donnés par les formules suivantes :

$$\begin{aligned} |\vec{E}| &= \frac{1}{r} \sqrt{\frac{PG}{2\pi}} \sqrt{\frac{\mu_0}{\epsilon_0}} \\ |\vec{H}| &= \frac{1}{r} \sqrt{\frac{PG}{2\pi}} \sqrt{\frac{\epsilon_0}{\mu_0}} \end{aligned} \quad (5.12)$$

Les valeurs des champs électrique et magnétique calculées pour trois puissances de rayonnement sont présentées dans le tableau 5.2.

$P$ , mW	$\Phi_m \times 10^2$ , mW/cm <sup>2</sup>	$\Phi_M \times 10^2$ , mW/cm <sup>2</sup>	$ \vec{E} $ , V/m	$ \vec{H}  \times 10^2$ , A/m
50	21.4	40.9	55.5	14.7
20	8.6	16.4	35.1	9.3
0.5	0.2	0.4	5.6	1.5

**Tab. 5.2:** Antenne cornet pyramidal. Valeurs de la densité superficielle de puissance moyenne  $\Phi_m$ , de la densité superficielle de puissance maximale  $\Phi_M$ , du champ électrique  $|\vec{E}|$  et magnétique  $|\vec{H}|$  au niveau de la membrane pour trois valeurs de puissance de rayonnement utilisées dans nos expériences.

Ces valeurs se situent au-dessous de celles définies par les standards et les recom-

mandations internationales (voir section 2.1 Effets non-thermiques).

## 5.6.2 Cornet conique

Dans cette sous-section nous déterminerons les zones de rayonnement pour l'antenne cornet conique. Ensuite nous confirmerons par les mesures de l'amplitude et de la phase sur l'axe principal de l'antenne que l'approximation de champ lointain est valide pour les conditions de nos expériences. Nous présenterons les diagrammes de rayonnement pour les plans E et H mesurés en chambre anéchoïde. Enfin, nous calculerons les valeurs de la densité de puissance moyenne, la densité de puissance maximale, ainsi que les champs électriques et magnétiques maximaux au niveau de la membrane.

### 5.6.2.1 Zones de rayonnement

La zone de Fraunhofer pour une antenne cornet conique de diamètre d'ouverture de  $D=23.8$  mm correspond à  $R>226$  mm ; la zone de Fresnel (zone de transition) est la zone à partir de  $0.26\sqrt{D^3/\lambda}$  jusqu'à 226 mm.

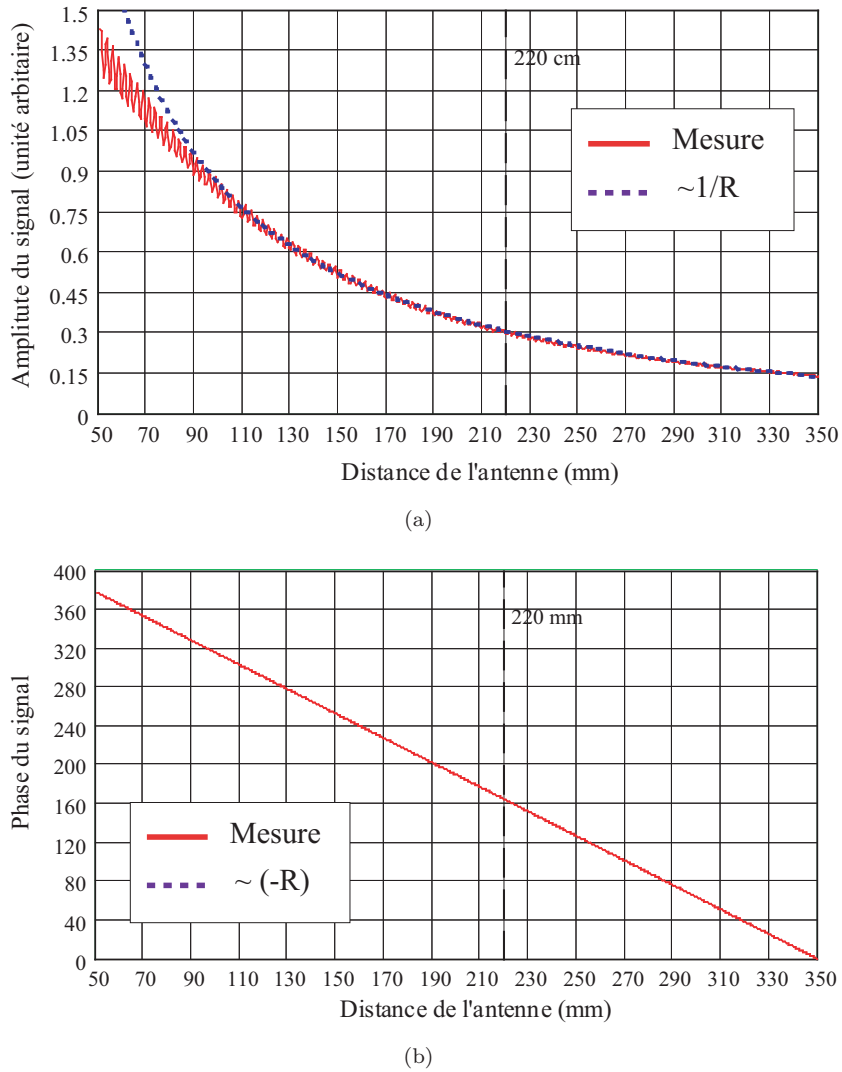
### 5.6.2.2 Mesures de l'amplitude et de la phase sur l'axe principal de l'antenne

La figure 5.17 montre la distribution de l'amplitude et de la phase du signal sur l'axe principal de l'antenne en fonction de la distance de l'antenne de 50 mm à 350 mm avec un pas de mesure de 0.4 mm.

Ainsi pour la région proche de l'axe principal de l'antenne nous pouvons considérer les conditions d'exposition dans nos expériences ( $d=22$  cm) comme les conditions de la zone de rayonnement lointaine.

### 5.6.2.3 Diagrammes de rayonnement dans les plans E et H

La figure 5.18 montre les diagrammes de rayonnement dans deux plans principaux (plans E et H) à 60 GHz, mesurés dans une chambre anéchoïde. Les angles d'ouverture à - 3 dB dans les plans E et H font respectivement  $\beta_1=8^\circ$  et  $\beta_2=9^\circ$ . Ainsi la région de rayonnement au niveau - 3 dB dans deux plans principaux à la distance 220 mm est



**Fig. 5.17:** Distribution de (a) l'amplitude et (b) de la phase du signal de l'antenne cornet conique à 60 GHz en fonction de distance de l'antenne sur l'axe principale.

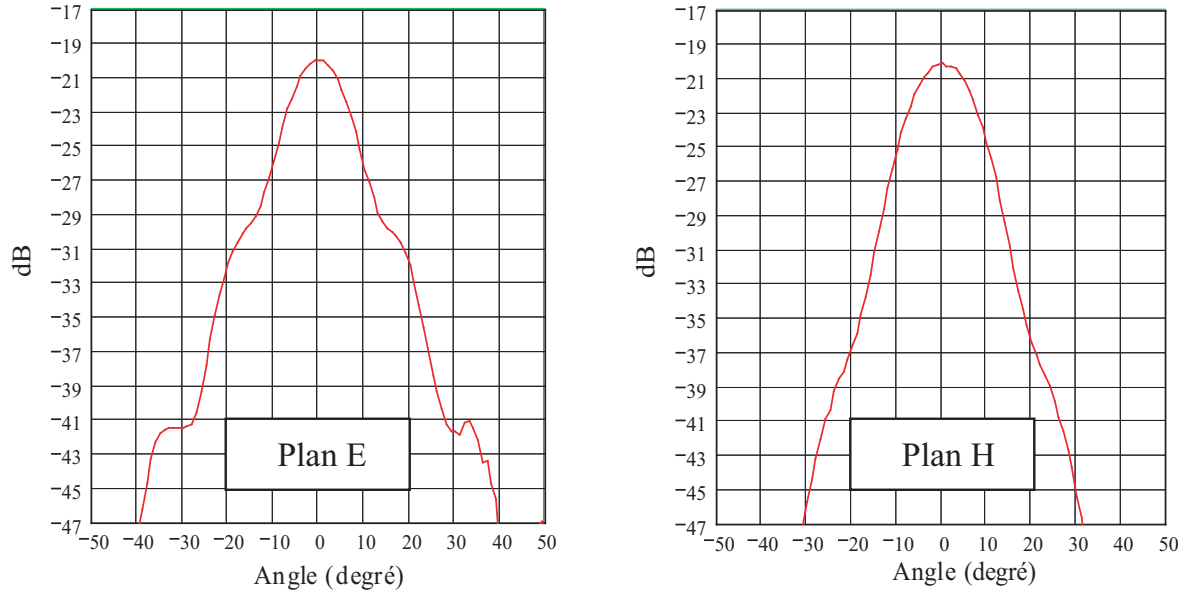
de 81.4 mm × 72.4 mm (les dimensions de l'échantillon sont de 70 mm × 50 mm). La partie de puissance totale absorbée par la membrane est estimée à  $\delta=36\%$ .

#### 5.6.2.4 Densité superficielle de puissance et valeur de champ

La *densité superficielle de puissance moyenne* au niveau de la membrane calculée à partir de l'expression 5.9 est donnée dans le tableau 5.3.

La valeur du gain d'un cornet conique est donnée par [153] :

$$G = \left( \frac{\pi D}{\lambda} \right)^2 F_g f_g \quad (5.13)$$



**Fig. 5.18:** Diagrammes de rayonnement de l'antenne cornet conique dans deux plans principaux (plan E et plan H) mesurés à 60 GHz dans la chambre anéchoïde.

$F_g$  est un facteur inférieur à un tenant compte de la réduction de gain due à la variation de phase sur l'ouverture.  $f_g$  est le facteur de gain qui dépend de la loi d'éclairement de l'ouverture circulaire créée par le guide d'ondes d'alimentation fonctionnant en mode fondamental  $TE_{11}$ . Il est égal à 0.837 [153]. En décibels, la formule 5.13 s'écrit comme :

$$G(dB) = 20 \log \left( \frac{\pi D}{\lambda} \right) - L, \quad \text{où } L = 10 \log \left( \frac{1}{0.837 F_g} \right) \quad (5.14)$$

Pour notre antenne  $L$  est égal à 2.1, et  $G$  est égal à 21.3 dB (134.8). Le gain de l'antenne cornet conique mesuré dans la chambre anéchoïde à 60 GHz est de 20.4 dB (109.6).

La *densité de puissance maximale* rayonnée dans l'axe à la distance  $R=220$  mm calculée à partir de formule 5.10 est donnée dans le tableau 5.3.

Les champs électrique  $|\vec{E}|$  et magnétique  $|\vec{H}|$  maximaux rayonnés dans l'axe à la distance  $R=220$  mm pour la zone de Fraunhofer et calculés par la formule 5.12 pour trois puissances de rayonnement sont présentés dans le tableau 5.3.



$P$ , mW	$\Phi_m \times 10^2$ , mW/cm <sup>2</sup>	$\Phi_M \times 10^2$ , mW/cm <sup>2</sup>	$ \vec{E} $ , V/m	$ \vec{H}  \times 10^2$ , A/m
50	51.4	90.1	82.4	21.9
20	20.6	36.1	52.1	13.8
0.5	0.5	0.9	8.2	2.2

**Tab. 5.3:** Antenne cornet conique. Valeurs de la densité superficielle de puissance moyenne  $\Phi_m$ , de la densité superficielle de puissance maximale  $\Phi_M$ , du champ électrique  $|\vec{E}|$  et magnétique  $|\vec{H}|$  au niveau de la membrane pour trois valeurs de puissance de rayonnement utilisées dans nos expériences.

# Chapitre 6

## Effets des ondes millimétriques sur les membranes biologiques artificielles

Dans ce chapitre nous considérerons les résultats expérimentaux d'exposition des films phospholipidiques aux OMs de faible puissance à 60 GHz. Les films phospholipidiques représentent un modèle artificiel de la partie lipidique des membranes biologiques. La structure, la composition et les propriétés des membranes biologiques ainsi que les méthodes de création et de caractérisation des membranes artificielles ont été décrits au début de cette partie.

Les composants phospholipides les plus fréquemment rencontrés dans les biomembranes (DPPC, DOPC et DPPG) seront considérés dans ce chapitre. Le rôle de divers paramètres d'exposition (puissance, polarisation, modulation d'amplitude et durée d'exposition) sera examiné.

### 6.1 Caractérisation des conditions expérimentales

Dans cette section nous allons décrire le protocole expérimental de préparation d'une membrane phospholipidique à l'interface eau/air. La stabilité d'une couche monomoléculaire et la reproductibilité des expériences seront étudiées pour les phospholipides DPPC. L'absence des modifications de dynamique de pression superficielle pour la sous-phase sera également montrée.

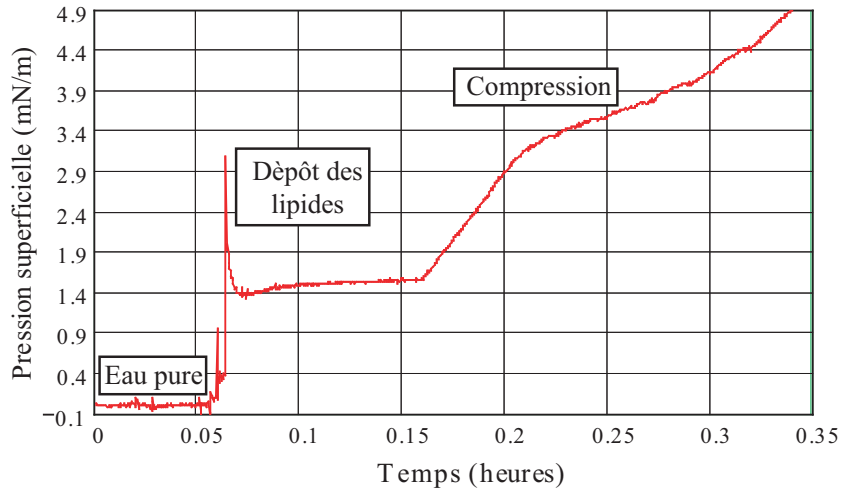


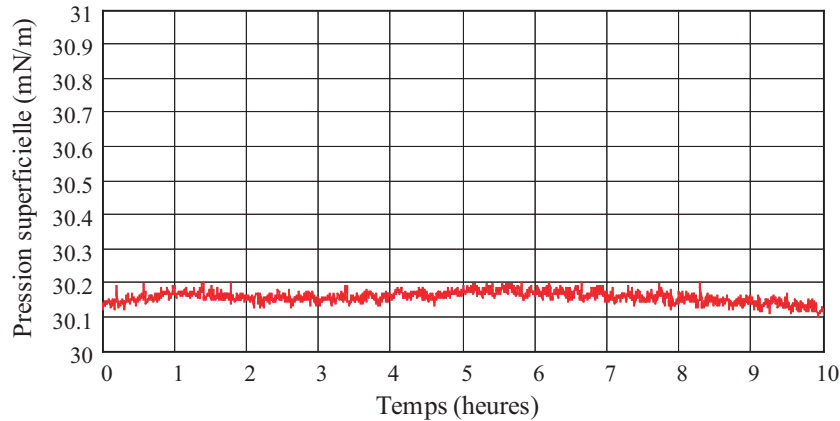
Fig. 6.1: Préparation d'un film monomoléculaire phospholipidique.

### 6.1.1 Préparation d'un film phospholipidique à l'interface eau/air

Nous allons nous intéresser aux monocouches phospholipidiques à l'interface eau/air. Les lipides DPPC seront essentiellement utilisés dans nos expériences car leur organisation à l'interface eau/air permet d'obtenir des échantillons stables pour une durée d'environ 12 heures.

L'ordre de préparation d'une couche phospholipidique monomoléculaire est le suivant. Nous déposons quelques gouttes de solution lipidique sur la surface de l'eau (les barrières de la cuve sont ouvertes, l'aire de surface est de  $S \approx 80 \text{ cm}^2$ ). Nous attendons environ 10 min, ce qui permet l'évaporation du solvant (chloroforme) et l'homogénéité de répartition des molécules. Nous rapprochons ensuite les barrières jusqu'à une pression cible située entre 30 mN/m et 35 mN/m, ce qui correspond à une pression moyenne normale dans les membranes des cellules biologiques. Ces valeurs de pression superficielle correspondent à la phase liquide condensée pour les lipides DPPC (voir section 4.2 Phases lipidiques). Pendant la compression, l'aire de la surface diminue jusqu'à  $S \approx 30\text{-}40 \text{ cm}^2$ . La dynamique de pression superficielle pendant le dépôt des lipides et pendant la compression est montrée sur la figure 6.1.

Après dépôt des molécules, nous laissons le film se stabiliser pendant 2-3 heures. Si la pression superficielle est relativement constante (les variations de pression sont inférieures à 0,1 mN/m), nous commençons l'exposition pour une durée de 5 heures. Après cela, nous éteignons le générateur et poursuivons l'enregistrement de la dynamique de pression superficielle de la membrane durant encore quelques heures.



**Fig. 6.2:** Stabilité d'une monocouche DPPC. Conditions expérimentales : pression moyenne – 30.15 mN/m ; durée d'observation – 10 heures ; température – 20°C ; aire de surface – 35 cm<sup>2</sup>.

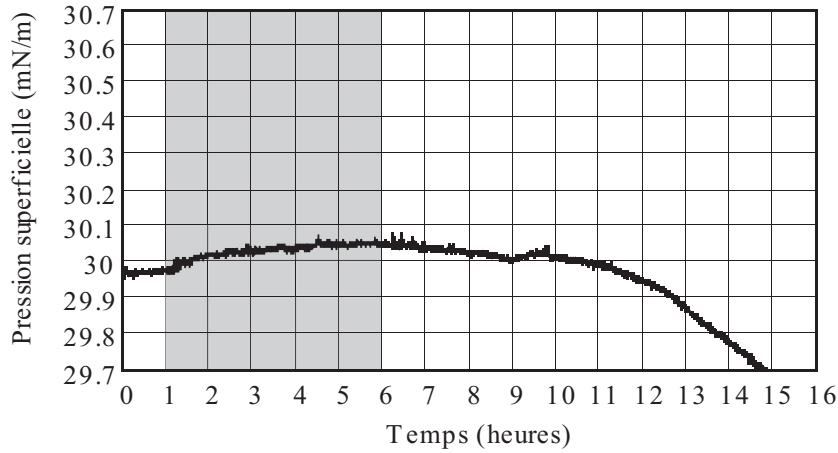
### 6.1.2 Stabilité du film monomoléculaire

Dans ce travail, nous étudions les propriétés biophysiques des membranes biologiques artificielles par les mesures de dynamique de pression superficielle  $\pi$  (voir section II.4.4.1 Mesure de pression superficielle par la méthode de Wilhelmy). Les résultats des études bioélectromagnétiques *in vitro* au niveau cellulaire sont souvent caractérisés par les tests statistiques pour les cellules exposées, non-exposées et contrôles. Contrairement aux études *in vitro*, dans les conditions de nos expériences, les échantillons biophysiques sont caractérisés par la stabilité de l'échantillon.

La dynamique de pression superficielle d'une membrane phospholipidique est une caractéristique très sensible aux conditions externes. Ainsi, elle peut caractériser la stabilité de la membrane à l'interface eau/air. La stabilité d'un film phospholipidique dépend de la composition de la membrane et des paramètres physiques de la monocouche tels que la pression superficielle moyenne, l'aire moyenne par molécule et la température. Elle dépend aussi de la durée d'observation. La figure 6.2 montre la dynamique de pression superficielle d'une monocouche DPPC pendant 10 heures d'observation.

La stabilité mesurée pour une monocouche phospholipidique DPPC est de 0.08-0.1 mN/m pour 10 heures d'observation. Il a été remarqué pendant les expériences que les valeurs de la pression moyenne les plus basses correspondent à une meilleure stabilité. Pour l'eau pure et pour les lipides DPPC en séparation de phases ( $\pi=15\text{mN/m}$ ), la stabilité de pression superficielle est d'environ 0.05 mN/m.

Les lipides DOPC et DPPG ne sont pas stables sur la surface de l'eau. La pression superficielle des monocouches formées de ces lipides diminue constamment avec le



**Fig. 6.3:** Influence du rayonnement sur la sous phase. La zone hachurée représente la durée d'exposition. Les paramètres d'exposition sont les suivants : polarisation circulaire ;  $t_{exp}=5$  heures ;  $\Delta\pi=0.07$  mN/m ;  $P=50$  mW ;  $\Phi_M=0.9$  mW/cm<sup>2</sup> ;  $\Phi_m=0.51$  mW/cm<sup>2</sup> ;  $|\vec{E}|=82.4$  V/m ;  $|\vec{H}|=0.219$  A/m.

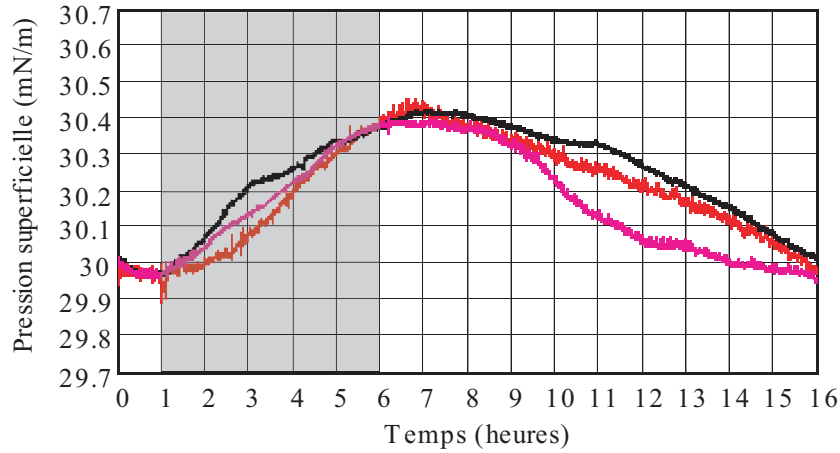
temps. Dans ce cas les résultats sont comparés pour les données obtenues avec et sans exposition.

### 6.1.3 Influence du rayonnement sur la sous-phase

L'épaisseur de la monocouche phospholipidique est de quelques nanomètres. Dans les cellules biologiques la membrane se retrouve sur la surface de cytoplasme - milieu aqueux d'une cellule. Ainsi le modèle de monocouche lipidique sur la surface de l'eau décrit l'interface lipides-cytoplasme dans une cellule biologique.

Dans notre cas, la sous-phase est représentée par l'eau pure. Pour séparer l'effet du rayonnement sur l'eau et sur les lipides nous avons examiné la sous-phase sous les mêmes conditions d'exposition que celles utilisées pour une monocouche lipidique. Les mesures de pression superficielle de l'eau pure sans monocouche lipidique sont présentées sur la figure 6.3. La sous-phase a été exposée à un rayonnement à 60 GHz en polarisation circulaire. Les variations de la température de la couche superficielle d'eau pendant l'expérience ne dépassaient pas les variations de la température ambiante ( $\Delta T \approx 0.3$  K, mesures à l'aide de thermocouple).

On observe une légère augmentation de pression superficielle de  $0.07$  mW/cm<sup>2</sup> qui est beaucoup plus faible par rapport aux augmentations qui seront observées pour les films phospholipidiques (voir section II.6.2.1.1 Monocouche phospholipidique DPPC. Rôle des différents paramètres d'exposition). La diminution de  $\pi$  après 11-12 heures



**Fig. 6.4:** Reproductibilité des expériences. Membrane phospholipidique DPPC exposée à 60 GHz. Les paramètres d'exposition sont les suivants : polarisation circulaire;  $t_{exp}=5$  heures;  $\Delta\pi=0.43 \pm 0.03$  mN/m;  $P=50$  mW;  $\Phi_M=0.9$  mW/cm<sup>2</sup>;  $\Phi_m=0.51$  mW/cm<sup>2</sup>;  $|\vec{E}|=82.4$  V/m;  $|\vec{H}|=0.219$  A/m.

d'observation est due à l'évaporation de l'eau. Cette évaporation perturbe les mesures de  $\pi$ .

Cette expérience montre également que l'exposition n'a pas d'impact sur les dispositifs de mesure de pression superficielle.

Il est intéressant de noter que l'influence de rayonnement millimétrique sur l'état de l'eau a été étudiée dans la littérature scientifique (voir section I.2.3 Effets sur les solutions aqueuses). En se basant sur les résultats expérimentaux il a été proposé que pour les certaines fréquences d'exposition les molécules d'eau jouent un rôle médiateur dans les effets des OMs sur les systèmes biologiques.

#### 6.1.4 Température

Toutes les expériences ont été réalisées à la température ambiante ( $T=20 \pm 0.3^\circ\text{C}$ ). Il a été noté que les légères variations de la température de la membranes ( $\pm 0.5^\circ\text{C}$ ) ne modifient pas la dynamique de pression superficielle.

#### 6.1.5 Reproductibilité des expériences

Dans les expériences bioélectromagnétiques l'un des paramètres importants est la reproductibilité des résultats obtenus. Une monocouche lipidique est très sensible aux conditions ambiantes et la reproductibilité des expériences joue un rôle clef.

La figure 6.4 montre trois courbes de dynamique de pression superficielle d'une monocouche phospholipidique DPPC exposée aux OMs. Les trois expériences ont été réalisées sous les mêmes conditions ambiantes et avec les mêmes paramètres d'exposition.

Le graphique montre une bonne reproductibilité des résultats. La valeur absolue d'étalement des valeurs de l'amplitude maximale est de 0.03 mN/m ; la valeur relative par rapport à l'amplitude maximale de  $\Delta\pi$  est de 7%.

## 6.2 Résultats expérimentaux

Dans cette section nous allons considérer les résultats expérimentaux d'exposition des membranes phospholipidiques aux OMs pour les différentes sortes de lipides et différents paramètres d'exposition. Dans un premier temps nous allons étudier la dynamique de pression superficielle pour les films monomoléculaires DPPC, DOPC et DPPG. Dans un deuxième temps les membranes phospholipidiques DPPC et les membranes mixtes DPPC/DOPC seront analysées par Microscopie à Force Atomique (AFM<sup>1</sup>).

### 6.2.1 Exposition des membranes phospholipidiques en phase condensée. Mesures de la pression superficielle

#### 6.2.1.1 Monocouche phospholipidique DPPC. Rôle des différents paramètres d'exposition

Dans cette sous-section, nous allons étudier l'influence du rayonnement millimétrique à 60 GHz sur la dynamique de pression superficielle des films phospholipidiques DPPC. Les monocouches phospholipidiques en phase condensée (pression superficielle moyenne de 28.5-31 mN/m) ont été exposées pendant une durée de 3 ou 5 heures. Ces valeurs de pression superficielle ont été choisies car elles correspondent à une pression superficielle normale dans les membranes biologiques naturelles [143]. Le rôle des paramètres d'exposition a été étudié pour différents niveaux de puissances (0.5 mW, 20 mW et 50 mW), différentes polarisations (linéaire et circulaire) et plusieurs types d'exposition (expositions continues, exposition avec modulation d'amplitude carrée 1 kHz, expositions intermittentes (1 heure d'exposition/ 1 heure sans exposition)).

---

<sup>1</sup> AFM - Atomic Force Microscopy

La figure 6.5 (a - f) montre les dynamiques de pression superficielle pour les diverses conditions d'exposition. Les zones hachurées sur les graphiques représentent la durée de l'exposition. Les données ont été obtenues avec un intervalle de 5 sec entre chaque mesure.

Pour étudier la dynamique de pression superficielle, nous avons caractérisé l'inclinaison des courbes par la vitesse de changement de la pression superficielle  $v = \Delta\pi/\Delta t$ . Cette caractéristique montre la dynamique de changement de la pression superficielle et permet de comparer les résultats obtenus pour les différentes conditions d'exposition.

L'augmentation de pression superficielle pendant l'exposition a été observée pour les différentes configurations des expériences. Pour caractériser l'effet observé, des paramètres suivants ont été comparés :

1. *Polarisations linéaire et circulaire*

Les expériences n'ont pas démontré de rôle particulier de la polarisation de l'onde (Figs. 6.5 (a) et (b)). La légère divergence entre les résultats obtenus pour la polarisation linéaire et circulaire est attribuée à la différence de densités superficielles de puissance pour les antennes cornet pyramidal et cornet conique.

2. *Modulation d'amplitude*

L'exposition avec la modulation d'amplitude (Fig. 6.5 (c)) donne une dynamique de pression superficielle similaire à celle obtenue pour le régime continu (Figs. 6.5 (a) et (b)).

3. *Exposition intermittente*

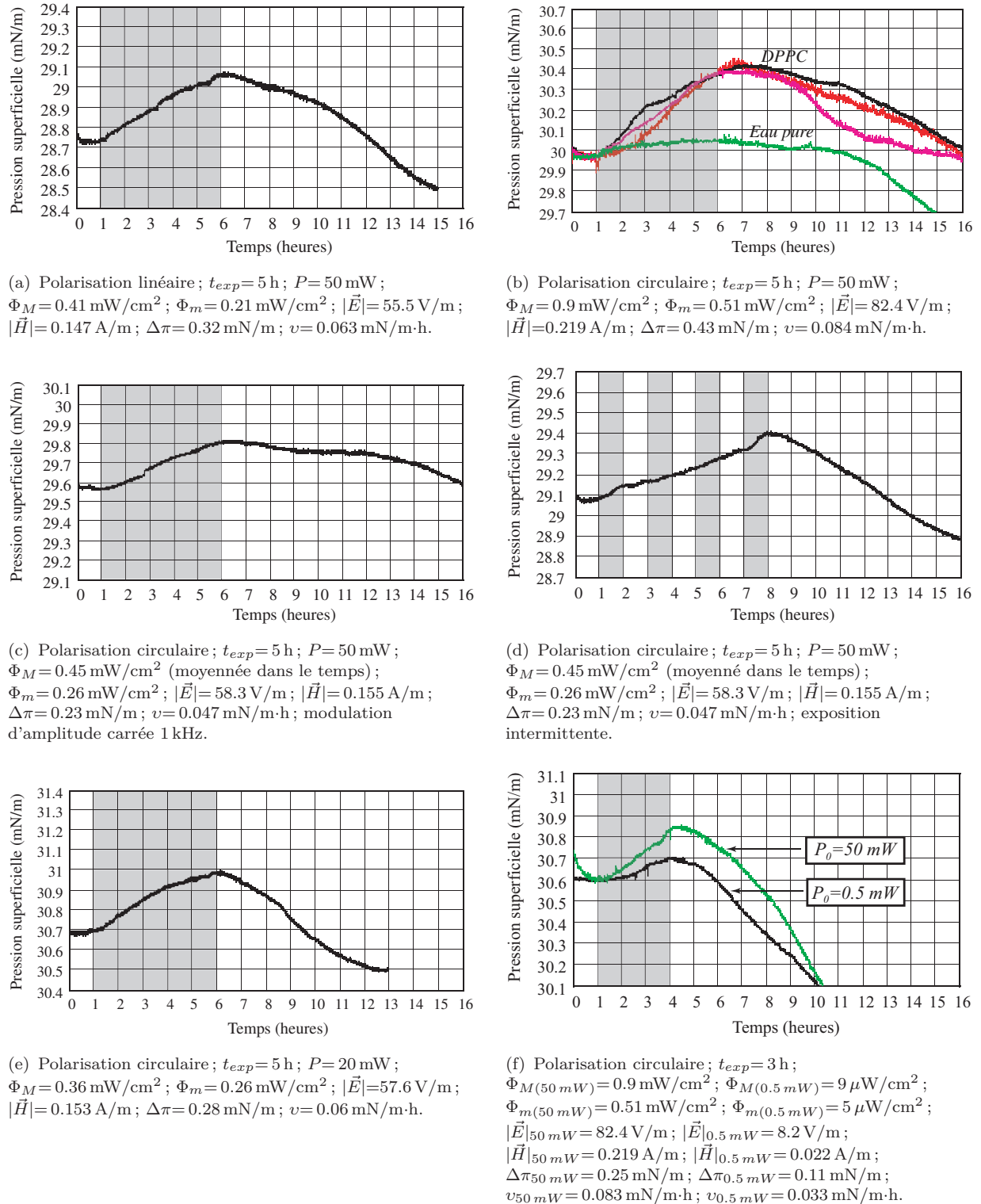
Il est intéressant de noter que la pression superficielle continue d'augmenter entre les périodes d'expositions (Fig. 6.5 (d)).

4. *Puissance de rayonnement*

Les trois puissances de rayonnement ont été étudiées. La diminution de puissance de rayonnement de 50 mW ( $\Phi_M = 0.9 \text{ mW/cm}^2$ ) à 0.5 mW ( $\Phi_M = 9 \mu\text{W/cm}^2$ ) correspond à une diminution de variation de pression superficielle  $\Delta\pi$  de 0.25 mN/m à 0.1 mN/m (Fig. 6.5 (f)). Cela signifie que le rapport entre la puissance de rayonnement et l'augmentation de pression superficielle est non-linéaire. Les très faibles densités superficielles de puissance de rayonnement millimétrique à 60 GHz augmentent significativement la pression superficielle.

Ces données sont en accord avec les résultats rapportés dans la littérature scientifique [79] en affirmant que l'exposition aux OMs de faible puissance modifie le empa-





**Fig. 6.5:** Les dynamiques mesurées de pression superficielle des films phospholipidiques DPPC exposés à 60 GHz avec les différents paramètres de rayonnement.  $t_{exp}$  - durée d'exposition ;  $\Phi_M$  - puissance maximale ;  $\Phi_m$  - puissance moyenne ;  $|\vec{E}|$  - amplitude de champ électrique ;  $|\vec{H}|$  - amplitude de champ magnétique ;  $\Delta\pi$  - augmentation de pression superficielle ;  $v$  - vitesse de l'augmentation de pression superficielle.

Type de la membrane/ L'eau pure	DPPC	Eau	DPPC	DPPC	Eau	DPPC	DPPC	DPPC	DPPC
Phase lipidique	LC	--	LC	LC	--	LC	LC	LC	LC
$P_0$ (mW)	50	50	50	50	50	50	50	20	0.5
Type d'exposition	CW	CW	CW	CW	CW	Modulation d'amplitude carrée 1 kHz	Exposition intermittente (1heure/1heure)	CW	CW
Polarisation	Circulaire	Circulaire	Circulaire	Linéaire	Linéaire	Circulaire	Circulaire	Circulaire	Circulaire
Durée d'exposition (heures)	5	5	3	5	5	5	4 (exposé)/ 4 (non-exposé)	5	3
$ \vec{E} $ (V/m)	82.4	82.4	82.4	55.5	55.5	58.3	58.3	57.6	8.2
$ \vec{H} $ (A/m)	0.219	0.219	0.219	0.147	0.147	0.155	0.155	0.153	0.022
$\Phi$ (mW/cm <sup>2</sup> )	0.9	0.9	0.9	0.41	0.41	0.45	0.45	0.36	0.009
$\Delta\pi$ (mN/m)	0.43	0.08	0.25	0.32	0.09	0.23	0.32	0.28	0.1
$v$ (mN/m.h)	0.086	0.016	0.082	0.064	0.018	0.046	0.064	0.056	0.033

**Tab. 6.1:** Résultats expérimentaux de l'exposition des membranes phospholipidique DPPC aux OMs à 60 GHz.

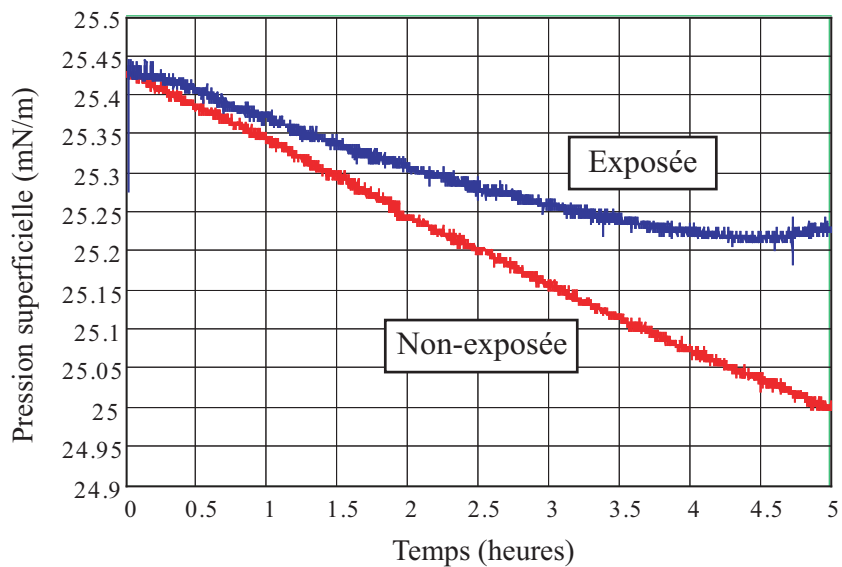
quetage des molécules dans les films phospholipidiques.

Les résultats complets des données obtenues pour les monocouches phospholipidiques DPPC sont présentés dans le tableau 6.1. Les valeurs d'augmentation de pression superficielle  $\Delta\pi$  et la vitesse d'augmentation de pression superficielle sont comparées pour les différents paramètres d'exposition.

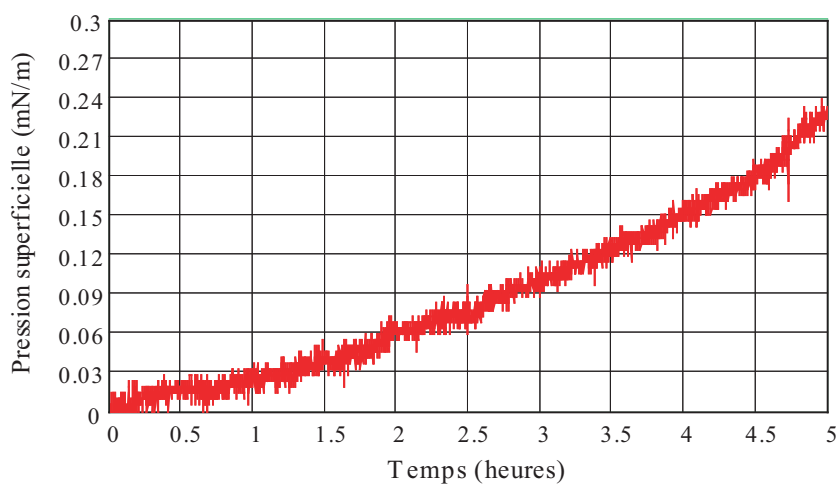
### 6.2.1.2 Monocouche phospholipidique DOPC

Les lipides DOPC (dioléoyl phosphatidylcholine) comme les lipides DPPC portent une charge négative et une charge positive dans la tête polaire; ainsi ces phospholipides sont électriquement neutres mais ils représentent des dipôles (Fig. 3.3). Les lipides DOPC ne sont pas stables à l'interface eau/air – la pression superficielle diminue constamment avec le temps. Nous avons comparé la dynamique de pression superficielle obtenue pour une monocouche exposée pendant 5 heures avec la dynamique d'une monocouche non-exposée (Fig. 6.6).

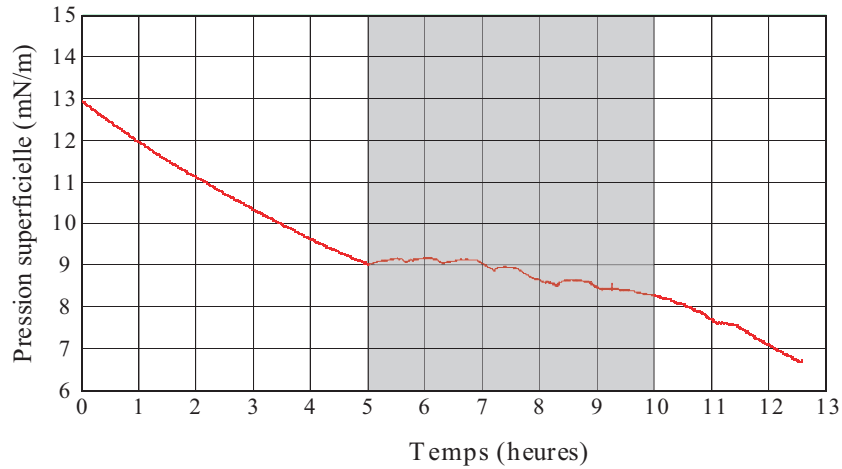
La figure 6.7 montre la différence entre les dynamiques des monocouches exposée et non-exposée. L'augmentation de pression superficielle du film exposé par rapport au film non-exposé est de  $\Delta\pi=0.23$  mN/m.



**Fig. 6.6:** Dynamiques de pression superficielle obtenues pour les films phospholipidiques DOPC exposé à 60 GHz et non-exposé. Conditions de l'exposition : polarisation linéaire ;  $t_{exp}=5$  h ;  $P=50$  mW ;  $\Phi_M=0.41$  mW/cm<sup>2</sup> ;  $\Phi_m=0.21$  mW/cm<sup>2</sup> ;  $|\vec{E}|=55.5$  V/m ;  $|\vec{H}|=0.147$  A/m.



**Fig. 6.7:** Différence  $\Delta\pi$  entre les dynamiques de pression superficielle des monocouches exposée et non-exposée pour 5 heures d'exposition.  $\Delta\pi=0.23$  mN/m ;  $v=0.047$  mN/m.h.



**Fig. 6.8:** Dynamique de pression superficielle d'une monocouche phospholipidique DPPG. La zone hachurée correspond à la période d'exposition. Conditions de l'exposition : polarisation circulaire ;  $t_{exp}=5$  h ;  $P=50$  mW ;  $\Phi_M=0.9$  mW/cm<sup>2</sup> ;  $\Phi_m=0.51$  mW/cm<sup>2</sup> ;  $|\vec{E}|=82.4$  V/m ;  $|\vec{H}|=0.219$  A/m.

### 6.2.1.3 Monocouche phospholipidique DPPG

Les lipides DPPG (dipalmitoyl phosphatidylglycérol) portent une charge négative dans la tête polaire, ainsi la partie hydrophile des lipides est chargée négativement. Les films phospholipidiques DPPG ne sont pas stables à l'interface eau/air.

La figure 6.8 montre la dynamique de pression superficielle d'une membrane DPPG exposée aux OMs à 60 GHz.

Nous observons une augmentation de la pression superficielle pendant l'exposition par rapport à la zone non-exposée.

### 6.2.1.4 Interprétation des résultats

Pour interpréter l'augmentation de la pression superficielle au cours de l'exposition aux OMs, trois hypothèses sont proposées :

1. *Excitation des groupes bicarbonatés dans les parties apolaires des phospholipides*

Les groupes bicarbonatés suivants ont des résonances autour de 60 GHz :

- HCCCCH avec les lignes spectrales à 59.677 GHz, 59.846 GHz et 59.937 GHz ;
- CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CCH avec les lignes spectrales à 60.047 GHz, 60.151 GHz, 60.379 GHz, 60.490 GHz, 60.498 GHz, 60.734 GHz, 60.762 GHz.

Ce sont des données issues de spectroscopie micro-onde [27]. Cependant, les phospholipides que nous étudions ne contiennent pas de ces groupes. Il faut pourtant remarquer que la liste présentés ci-dessus n'est pas exhaustive et ne

représente que les données disponibles à présent. Il est possible que les autres groupes CH possèdent des résonances autour de 60 GHz.

2. *Interaction du champ EM avec le moment dipolaire de la partie polaire des molécules phospholipidiques*

Les modifications de la dynamique de pression superficielle peuvent être dues aux changements d'orientation des molécules phospholipidiques ou aux vibrations des parties polaires des phospholipides.

3. *Enfoncement des molécules dans l'eau et ondulation dans l'interface*

Un effet similaire a été décrit dans la littérature [79]. Les auteurs ont observé une diminution de l'aire moléculaire pour une monocouche phospholipidique DOPC après l'exposition aux OMs à 54-78 GHz. Ils ont supposé que la réorganisation des monocouches est due à l'enfoncement des molécules dans l'eau ou aux ondulations des molécules phospholipidiques dans l'interface.

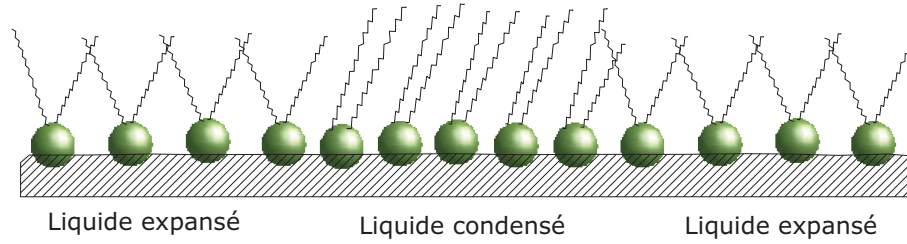
## 6.2.2 Exposition des membranes phospholipidiques en séparation de phases. Analyse topographique par la microscopie à force atomique (AFM)

Dans cette sous-section, nous allons étudier des membranes phospholipidiques en séparation de phases exposées au rayonnement millimétrique à 60 GHz. Dans un premier temps nous allons considérer le cas des monocouches DPPC en phase liquide condensé/liquide expansé. Dans un deuxième temps nous allons étudier les membranes mixtes DPPC/DOPC en séparation de phases par AFM.

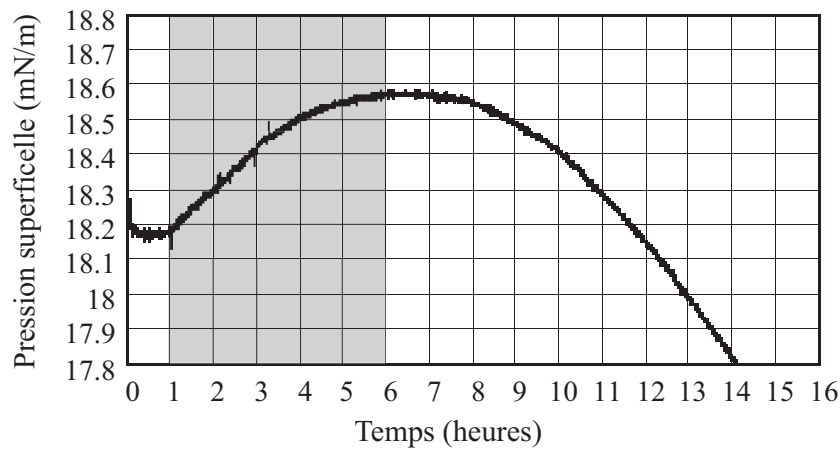
### 6.2.2.1 Monocouche phospholipidique DPPC

Les phospholipides ne sont pas toujours distribués de façon homogène dans les membranes. Ils peuvent être organisés comme des microdomaines latéraux dans les films phospholipidiques en séparation de phases [154]. Ces domaines reflètent les particularités fonctionnelles des différentes régions d'une biomembrane et ils jouent un rôle important dans les processus membranaires [155]. Dans ce paragraphe nous allons étudier le mélange de deux phases de lipides DPPC (Fig. 6.9).

Dans les conditions de nos expériences, les pressions moyennes des monocouches phospholipidiques DPPC de 15 mN/m et de 18 mN/m correspondent à co-existence de



**Fig. 6.9:** Représentation schématique de la distribution des molécules phospholipidiques dans une membrane biphase à l'interface eau/air.



**Fig. 6.10:** Dynamique de pression superficielle de monocouche DPPC en séparation de phases LC/LE pour une pression superficielle moyenne de 18.4 mN/m. Conditions de l'exposition : polarisation linéaire ;  $t_{exp} = 5$  h ;  $P = 50$  mW ;  $\Phi_M = 0.41$  mW/cm<sup>2</sup> ;  $\Phi_m = 0.21$  mW/cm<sup>2</sup> ;  $|\vec{E}| = 55.5$  V/m ;  $|\vec{H}| = 0.147$  A/m,  $\Delta\pi = 0.38$  mN/m,  $v = 0.076$  mN/m·h.

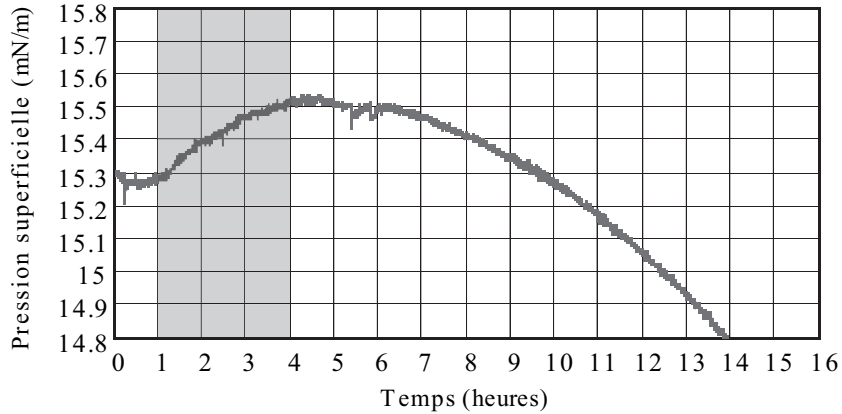
deux phases : expansée et condensée. Le taux des lipides dans la phase condensée est plus élevé par rapport à celui des lipides dans la phase expansée. Sans exposition, cet état (mélange de deux phases lipidiques) est stable. Nous avons vérifié que l'exposition aux OMs induit un changement de pression superficielle de tel système.

Les figures 6.10 et 6.11 montrent les dynamiques de pression superficielle des membranes biphases DPPC pour 3 et 5 heures d'exposition et pour les valeurs de pression superficielle moyenne de 15.4 mN/m et de 18.4 mN/m.

L'augmentation de pression superficielle observée pour les monocouches DPPC en séparation de phases est plus forte par rapport à celle observée pour une membrane en phase condensée (voir Figs. 6.10, 6.11 et 6.5 (a)).

### 6.2.2.2 Monocouche phospholipidique mixte DPPC/DOPC

Dans cette partie du travail, nous allons vérifier si l'exposition aux OMs de faible puissance induit des changements des propriétés biophysiques des membranes mixtes



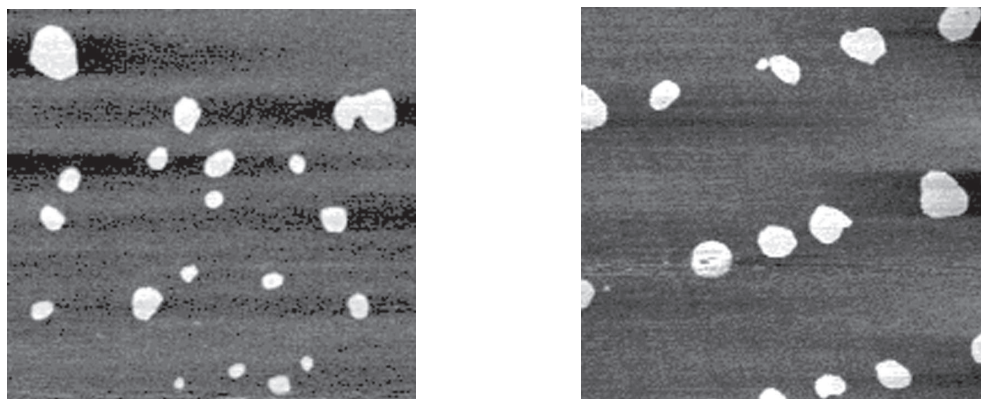
**Fig. 6.11:** Dynamique de pression superficielle de monolayer DPPC en séparation de phases LC/LE pour une pression superficielle moyenne de 15.4 mN/m. Conditions de l'exposition : polarisation linéaire ;  $t_{exp} = 3$  h ;  $P = 50$  mW ;  $\Phi_M = 0.41$  mW/cm<sup>2</sup> ;  $\Phi_m = 0.21$  mW/cm<sup>2</sup> ;  $|\vec{E}| = 55.5$  V/m ;  $|\vec{H}| = 0.147$  A/m,  $\Delta\pi = 0.24$  mN/m,  $v = 0.073$  mN/m·h.

(deux composants) en séparation de phases. L'analyse topographique de la surface de monolayer phospholipidique est réalisé par AFM.

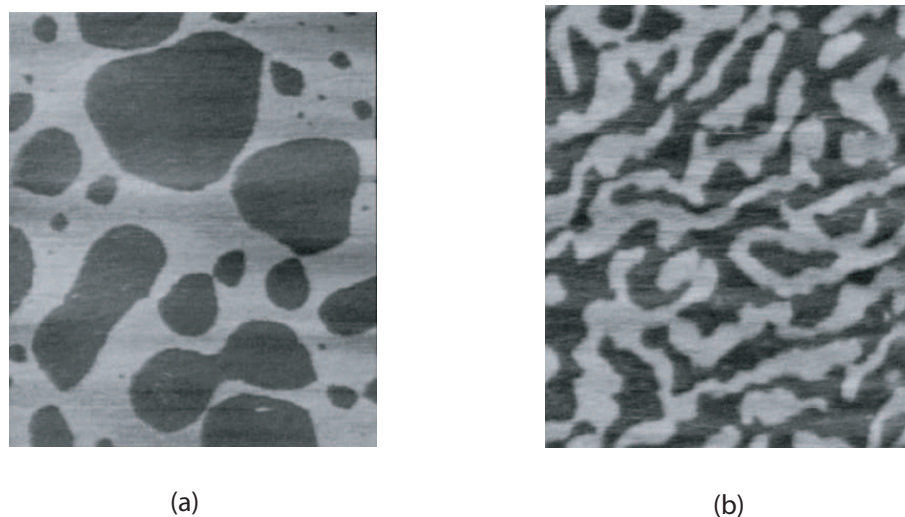
L'AFM permet d'observer les surfaces monomoléculaires avec une résolution latérale de quelques nanomètres. Elle donne l'information tridimensionnelle topographique de la surface de l'échantillon. En utilisant cette technique, nous pouvons obtenir les données sur l'organisation des composants membranaires, car les différentes phases lipidiques correspondent aux différentes hauteurs des lipides.

Nous avons étudié le mélange de deux sortes de lipides DOPC et DPPC de pression superficielle moyenne valant 15 mN/m. Pour cette valeur de pression superficielle, deux phases des lipides DPPC (condensée et expansée) et une phase des lipides DOPC (expansée) sont présentes. Les lipides condensés forment les domaines entourés par les lipides expansés. La figure 6.12 montre deux images typiques obtenues par AFM. Les régions sombres correspondent à une phase expansée, les domaines clairs à une phase condensée.

Nous avons étudié la distribution des phases dans les films phospholipidiques avant et après exposition aux OMs. Il a été noté que la distribution des phases lipidiques pour une monolayer reste constante avec le temps si la membrane n'est pas soumise à un stress qui peut perturber son état. Les modifications dans la distribution des domaines comme réponse à un impact extérieur peuvent être caractérisées par : (i) des variations de forme des domaines ; (ii) la fusion des domaine ; ou (iii) le changement de configuration et de taux des phases des domaines. Les figures 6.13 et 6.14 montrent des exemples des formations différentes des microdomaines dans les membranes.



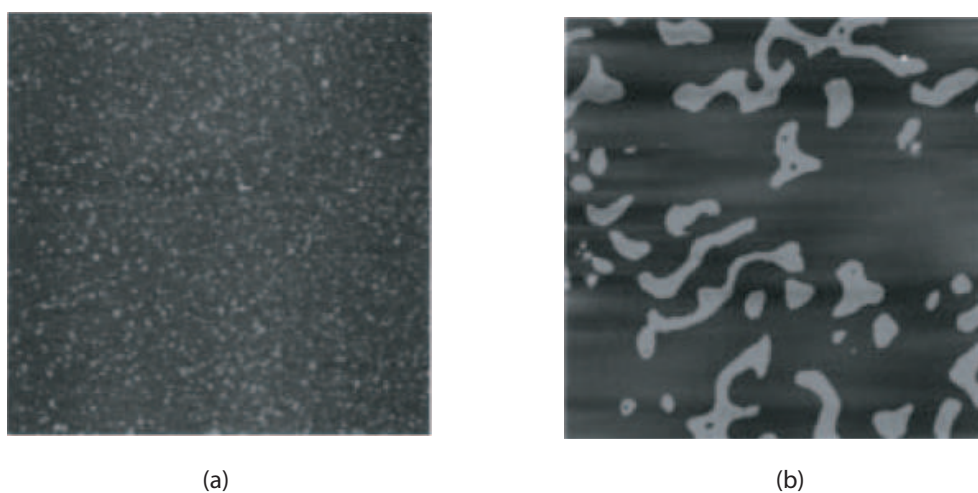
**Fig. 6.12:** Images ( $3\mu\text{m} \times 3\mu\text{m}$ ) typiques obtenues par AFM pour les monocouches phospholipidiques mixtes DPPC/DOPC en séparation de phases.



(a)

(b)

**Fig. 6.13:** Changements dans la formation des domaines pour le même type de membranes en fonction du type de la sous-phase : (a) l'eau pH 2; (b) l'eau pH 8 [156]. ( $2\mu\text{m} \times 3\mu\text{m}$ ).

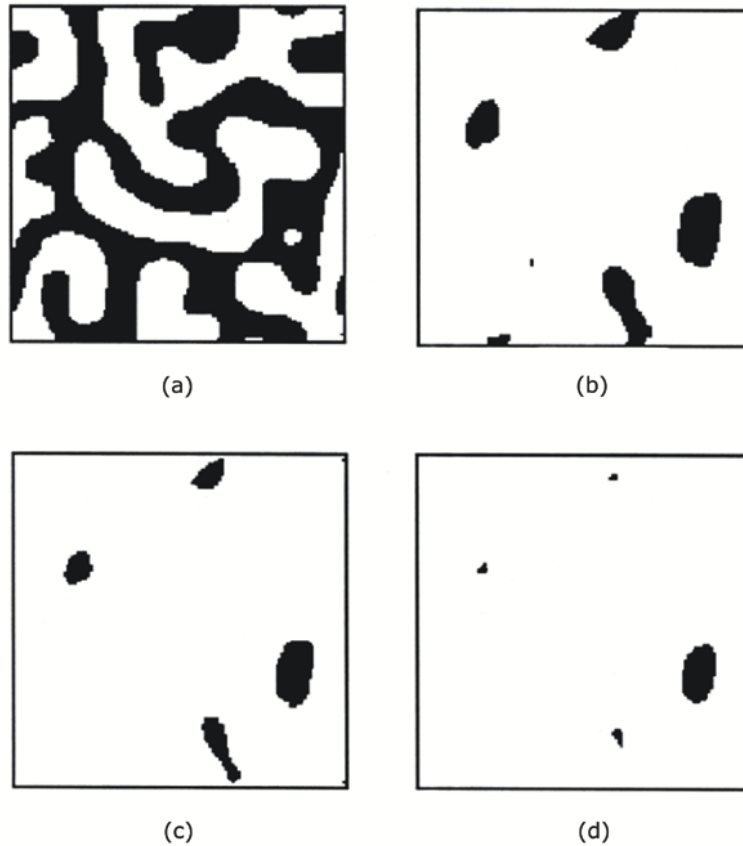


(a)

(b)

**Fig. 6.14:** Changements dans la formation des domaines pour le même type de membranes en fonction des valeurs de la pression superficielle moyenne : (a)  $13.7\text{ mN/m}$ ; (b)  $14\text{ mN/m}$  [157]. ( $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$ ).



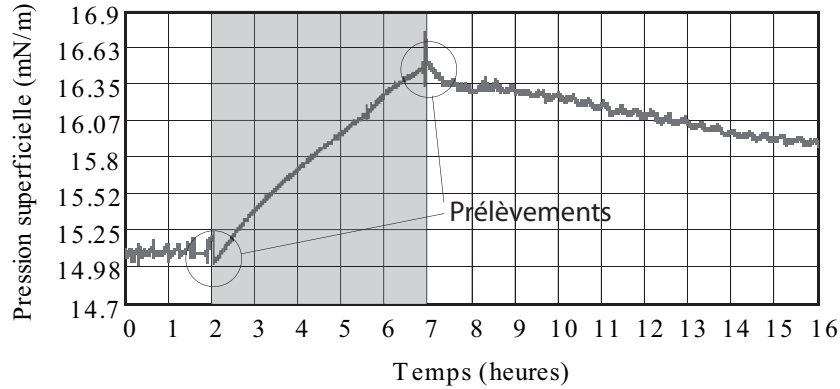


**Fig. 6.15:** Distribution théorique des phases dans la membrane phospholipidique  $C_{14}DPC : C_{18}DPC$  exposée à 10 kHz pour les différentes durées : (a)  $t = 2 \times 10^{-3} \Delta t$ ; (b)  $t = 2.5 \times 10^{-3} \Delta t$ ; (c)  $t = 2.6 \times 10^{-3} \Delta t$ ; (d)  $t = 2.7 \times 10^{-3} \Delta t$ , où  $\Delta t = 1$  s.

Les modifications dans la distribution des phases dans une membrane phospholipidique exposée à un rayonnement EM ont été étudiées théoriquement par A. N. Goltsov [81]. Il a modélisé la distribution des phases dans la membrane phospholipidique  $C_{14}DPC : C_{18}DPC$  (3 : 2) exposée au rayonnement BF à 10 kHz. Les simulations se basaient sur l'équation de la diffusion non-linéaire de Cahn-Hilliard. Les résultats des calculs analytiques ont montré que l'exposition induit une transformation des phases (Fig. 6.15). La phase condensée devient dominante à cause de l'effet de rayonnement EM. Les auteurs ont supposé que telles modifications peuvent interférer avec les processus de transport membranaire.

Nous avons étudié expérimentalement la distribution des microdomaines dans les membranes biphasiques DPPC : DOPC (2 : 1) exposées aux OM à 60 GHz. Le protocole expérimental est le suivant.

Une couche monomoléculaire a été formée à l'interface eau/air comme cela a été décrit dans les sections II.4.3.1 et II.6.1.1. La valeur de pression superficielle moyenne

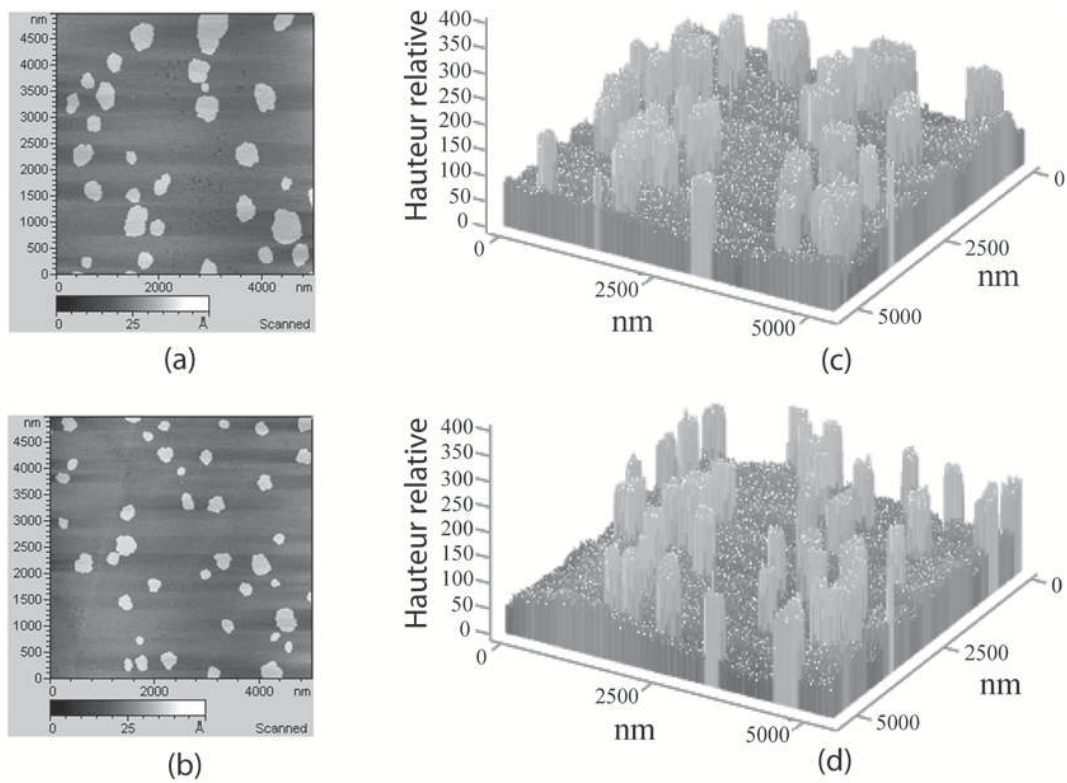


**Fig. 6.16:** Dynamique de pression superficielle des lipides DPPC/DOPC en séparation de phases. Conditions de l'exposition : polarisation linéaire ;  $t_{exp} = 5$  h ;  $P = 50$  mW ;  $\Phi_M = 0.41$  mW/cm<sup>2</sup> ;  $\Phi_m = 0.21$  mW/cm<sup>2</sup> ;  $|\vec{E}| = 55.5$  V/m ;  $|\vec{H}| = 0.147$  A/m ;  $\Delta\pi = 1.6$  mN/m,  $\nu = 0.32$  mN/m·h.

est choisie pour avoir des lipides en séparation de phases LE/LC. Après stabilisation de la monocouche, un prélèvement est réalisé à une pression superficielle constante (voir section II.4.3.2 Transfert de la monocouche). Ensuite la membrane a été exposée pendant 5 heures aux OMs. Un autre prélèvement est effectué à la fin de l'exposition. Ensuite les images obtenues avant et après exposition ont été analysées par AFM (Molecular Imaging Pico<sup>+</sup>, USA) et comparées (voir section II.4.4.2 Analyse topographique par la Microscopie à Force Atomique).

La figure 6.16 montre la dynamique de pression superficielle de monocouche. Une augmentation de pression superficielle de  $\Delta\pi = 1.6$  mN/m est observée pendant l'exposition.

Les figures 6.17 (a,b) montrent un exemple d'images obtenues avant et après 5 heures l'exposition. Les figures 6.17 (c,d) représentent la reconstruction du relief de surface de monocouche en 3-D. L'aire moyenne occupée par chaque phase a été calculée. L'analyse des images obtenues avant et après l'exposition aux OMs a démontré une transition moyenne entre les phases de 5%. Ces modifications sont faibles et elles ne sont pas significatives. Par conséquent, les résultats expérimentaux ne montrent pas de modifications claires de la distribution des domaines lipidiques dans les membranes phospholipidiques mixtes en séparation de phases.



**Fig. 6.17:** (a) et (b) : analyse de la surface de monocouche phospholipidique par AFM.

(c) et (d) : reconstruction topographique du relief de surface de la membrane.

(a, c) Distribution des phases lipidiques avant l'exposition,  $S_{LE}=39260$  (86.3%),  $S_{LC}=6320$  (13.7%).  
 (b, d) Distribution des phases lipidiques après l'exposition,  $S_{LE}=42313$  (91.2%),  $S_{LC}=3912$  (8.8%).

# Conclusion

Dans cette partie du travail, nous avons étudié les modifications biophysiques dans les membranes phospholipidiques artificielles exposées aux OMs de faible puissance à 60 GHz. Nous avons considéré la structure générale et la composition des membranes biologiques ainsi que le rôle des différentes composantes membranaires. Les méthodes de formation et d'analyse des membranes phospholipidiques ont été décrites. Un système d'exposition a été développé pour les expériences. Les caractéristiques de rayonnement ont été calculées analytiquement et confirmées par les mesures pour assurer la dosimétrie rigoureuse des expériences. Les données expérimentales ont été obtenues en utilisant les différents types des membranes (DPPC, DOPC, DPPG et DPPC/DOPC) et différents paramètres d'exposition (densité de puissance, modulation d'amplitude, polarisation, durée et intermittence de l'exposition).

Les **résultats principaux** de la partie II du travail sont résumés ci-dessous :

1. *Variations de pression superficielle*

Les mesures en temps réel ont mis en évidence des variations faibles mais reproductibles de pression superficielle des monocouches phospholipidiques après une exposition aux OMs de faible puissance ( $0.01-1.07 \text{ mW/cm}^2$ ) à 60 GHz [158–160]. Des stress environnementaux, comme par exemple des rayonnements millimétriques, qui sont responsables des variations locales des paramètres membranaires peuvent perturber des processus membranaires de régulation. Il est difficile de savoir si de telles variations observées pour les membranes artificielles peuvent impliquer des dysfonctionnements dans les biomembranes naturelles et ainsi perturber le fonctionnement cellulaire (par exemple induire le passage des ions à travers la membrane biologique). Cependant, il est intéressant de noter que de plus en plus de modèles des membranes biologiques expliquent une variabilité de l'activité de certaines protéines par des variations locales de la pression

latérale [161].

2. *Rôle des différents paramètres d'exposition*

Nous n'avons pas observé de rôle particulier des paramètres d'expositions telles que la polarisation, la modulation d'amplitude ou l'intermittence de l'exposition. Les changements de pression superficielle sont déterminés premièrement par la densité de puissance de rayonnement. Même de très faibles densités de puissance ( $9\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ) produisent une augmentation significative de pression superficielle dans les monocouches phospholipidiques [162, 163].

3. *Modifications des microdomaines dans les monocouches phospholipidiques en séparation de phases*

L'analyse topographique par AFM a montré que le rayonnement millimétrique de faible puissance n'induit pas de transformations structurales dans l'organisation des domaines dans les monocouches phospholipidiques en séparation de phases. Ces résultats montrent que l'exposition aux OMs à court terme n'induit pas un effet suffisamment important pour produire des perturbations dans l'organisation des microdomaines phospholipidiques [164, 165].

L'analyse des résultats présentés dans cette partie ainsi que des données publiées dans la littérature scientifique [79] montre que les propriétés biophysiques des membranes phospholipidiques peuvent être modifiées par les rayonnements millimétriques de faible puissance.

## Troisième partie

Effet des ondes millimétriques à  
60 GHz sur l'expression génétique  
des protéines chaperons



# Introduction

Les résultats rapportés dans la littérature suggèrent que les micro-ondes et les OMs ne sont pas génotoxiques mais plutôt protéotoxiques [103,166]. Ces observations sont en conformité avec la stabilité de l'ADN, molécule sélectionnée pendant l'évolution comme matériel de stockage de l'information génétique. L'ADN et les protéines sont les composants cellulaires les plus affectés par les conditions physiques et chimiques. Cependant, ces deux catégories de molécules présentent une vulnérabilité différente aux stress environnementaux. Par exemple, l'ADN est très sensible aux UV, aux ultrasons ou encore aux rayonnements ionisants, alors que les protéines y sont particulièrement résistantes. A l'inverse, les protéines sont très sensibles à d'autres conditions environnementales telles que l'augmentation de la température, ainsi qu'à certains composants chimiques, tels que les métaux lourds.

Les protéines sont des éléments fondamentaux des cellules biologiques, et, en même temps, ce sont des composants cellulaires très fragiles. A l'inverse de l'ADN dont la structure est représentée par la double hélice et dont la détérioration principale correspond à de simples coupures, la structure et la solubilité des protéines sont toutes les deux conditionnées par leur repliement tridimensionnel (états conformationnels). La stabilité de ces conformations est particulièrement fragile car les énergies impliquées sont considérablement plus faibles que les énergies des liaisons chimiques.

Les faibles interactions intermoléculaires au niveau de la structure des protéines sont souvent sensibles aux délocalisations d'électrons, aux vibrations ou aux rotations des constituants atomiques des molécules biologiques. Par conséquent, les protéines peuvent être facilement affectées par de faibles variations de l'environnement physico-chimique. C'est à ce niveau que l'impact potentiel des OMs pourrait être significatif.

Un quantum de champ EM dans la bande millimétrique possède une énergie plus importante par rapport à celle des micro-ondes, et par conséquent la probabilité d'avoir une action protéotoxique est plus élevée pour les OMs. Ainsi il est important



de déterminer si les rayonnements millimétriques peuvent induire des stress protéotoxiques dans les cellules biologiques.

Une altération de la structure des protéines cellulaires induit l'expression rapide des protéines chaperons. Ces chaperons sont exprimés dans toutes les cellules eucaryotes en réponse au choc thermique, ainsi qu'aux autres altérations physiques et chimiques (voir section I.2.6 Expression génétique). Ainsi c'est un excellent indicateur de stress potentiel induit suite à une exposition aux ondes EMs.

Les modifications au niveau de l'ADN ou des protéines ont des conséquences diverses sur la santé humaine. Par exemple, les défauts conformationnels des protéines sont connus pour générer deux principaux types de pathologies.

Premièrement, une protéine mal repliée présentera de graves défauts de solubilité; cela peut être très nocif pour la cellule puisque c'est en soi un processus auto-propagateur au sein duquel les protéines mal conformées recrutent les protéines environnantes par contacts hydrophobes, générant ainsi des agrégats protéiques qui s'agrandiront avec le temps. Les agrégats protéiques insolubles ont clairement prouvé leur *cytotoxicité*. Il a déjà été montré que ces agrégats peuvent piéger des molécules impliquées dans les machineries cellulaires contrôlant l'apoptose ou le système de contrôle-qualité des protéines. Ainsi, la présence des défauts protéiques interfère grandement avec le fonctionnement normal de la cellule, pouvant aller jusqu'à être directement responsable de la perte intense des neurones observée dans les maladies neurodégénérative [167].

Deuxièmement, les stress protéotoxiques peuvent également être indirectement responsables de l'*apparition des cancers*. En effet, la présence de protéines mal conformées dans la cellule mène à l'expression soutenue des HSPs. La plupart de ces HSPs ont des propriétés anti-apoptotiques efficaces et leur expression prolongée favorise fortement l'apparition du cancer provenant de cellules mutantes qui auraient échappé au programme cellulaire d'auto-destruction [168]. Il est intéressant de noter qu'un tel mécanisme a été récemment proposé comme base moléculaire des relations possibles entre les rayonnements des téléphones mobiles et les cancers [90, 93].

L'hypothèse d'une relation entre les ondes EMs et le stress protéotoxique a déjà été proposée par la communauté scientifique et plusieurs études ont été entreprises dans cette direction (voir section I.2.6 Expression génétique). Ces études ont porté principalement sur les ondes BFs et sur les micro-ondes.

Dans cette partie du travail nous étudierons l'influence du rayonnement millimé-

trique à 60 GHz sur les modifications de l'expression génétique des protéines chaperonnes dans les cellules gliales du cerveau humain. En combinant différentes approches de la biologie moléculaire nous avons considéré les effets potentiels des OMs sur trois étapes clefs de l'expression génétique *in vitro* :

- Modifications potentielles au niveau de l'activation des facteurs de transcription (TFs), avec comme conséquence des changements potentiels d'initiation de la transcription ;
- Modifications au niveau de la stabilité post-transcriptionnelles des ARNs messager ;
- Changements au niveau de la synthèse et l'accumulation des protéines.

Dans le premier cas, nous avons utilisé la méthode de transfection qui permet de faire pénétrer des constructions génétiques dans les cellules. Nous avons examiné l'activité de trois gènes rapporteurs qui sont sensibles aux différents types de stress physiques et chimiques. Dans le deuxième cas, la RT-PCR<sup>2</sup> a été utilisée pour la quantification des niveaux des ARN messagers (ARNm) après exposition ou non-exposition aux OMs de faible puissance. Enfin, les niveaux des protéines ont été analysés par Western blot.

Cette partie du travail de thèse a été réalisée en collaboration entre l'Institut d'Électronique et de Télécommunications de Rennes et l'équipe Information et Programmation Cellulaire du laboratoire Interactions Cellulaires et Moléculaires de l'Université de Rennes 1.

---

<sup>2</sup> RT-PCR – Reverse transcription-polymerase chain reaction.



# Chapitre 7

## Rappel sur la biologie cellulaire et moléculaire

Dans ce chapitre nous rappellerons quelques notions de la biologie cellulaire. Nous décrirons le dogme central de la biologie cellulaire ainsi que les trois étapes principales de l'expression génétique.

### 7.1 Dogme central de la biologie cellulaire

Le “dogme central”<sup>1</sup> de la biologie cellulaire veut que chez tous les êtres vivants l'information ne soit transmise que dans un sens : de l'ADN, où repose l'information, à l'ARN, une structure transitoire permettant la transmission à une machine de traduction, et puis aux protéines, les constituants de base qui font fonctionner la cellule et l'organisme entier. Les protéines constituent plus de la moitié de la masse sèche totale de la cellule et leur synthèse est capitale pour l'entretien, la croissance et le développement de la cellule. Elles jouent un rôle structurel dans la cellule et sont impliquées dans la transmission des signaux, le métabolisme énergétique, ainsi que dans la synthèse des autres molécules biologiques.

L'expression des protéines dépend du flux de l'expression génétique qui est un processus très contrôlé. Différents niveaux de régulation sont impliqués à chaque étape de l'expression génétique. La figure 7.1 représente schématiquement l'expression génétique qui est déterminée d'une part par la *transcription* de l'ADN en ARNm, et

---

<sup>1</sup> Ce dogme est introduit par Francis Crick (le co-découvreur de la structure de l'ADN) à la fin des années cinquante. Dogme quelque peu bouleversé par les virus

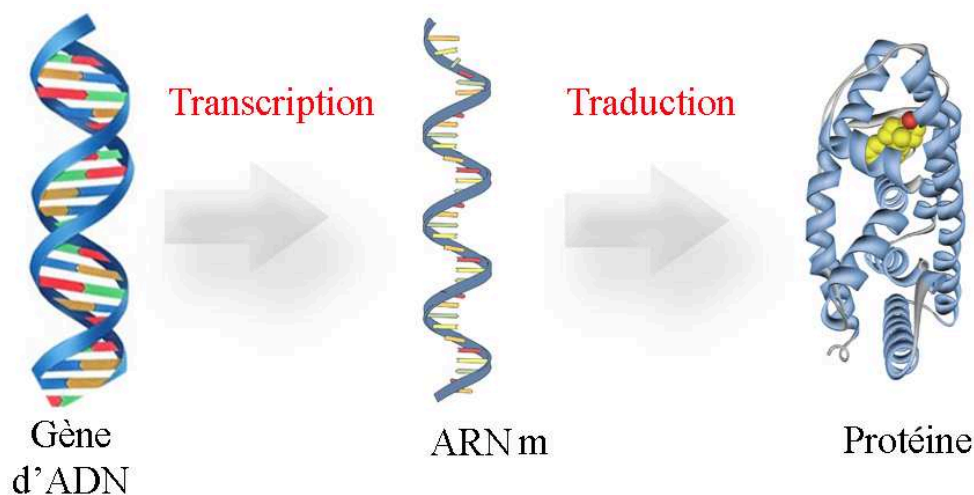


Fig. 7.1: Expression génétique.

d'autre part par la *traduction* de l'ARNm en protéine.

## 7.2 Acides nucléiques

Les cellules biologiques contiennent quatre familles de molécules organiques : les glucides simples, les acides gras, les acides aminés et les nucléotides. Chacune de ces familles est composée d'un grand nombre de membres différents qui possèdent des caractéristiques chimiques communes. Ces quatre familles ainsi que les macromolécules qui en sont composées représentent une grande partie de la masse cellulaire (tableau 8.1).

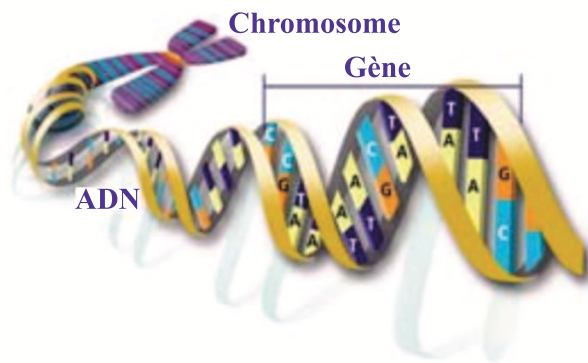
	Pourcentage du poids cellulaire total	Nombre de types de chaque molécule
Eau	70	1
Ions inorganiques	1	20
Glucides et précurseurs	1	250
Acides aminés et précurseurs	0.4	100
Nucléotides et précurseurs	0.4	100
Lipides et précurseurs	1	50
Autres petites molécules	0.2	300
Macromolécules (protéines, acides nucléiques et polysaccharides)	26	3 000

Tab. 7.1: Composition chimique approximative d'une cellule bactérienne [169].

Chez tous les êtres vivants connus, l'information génétique est stockée dans des polymères de structure relativement simple connus sous le nom d'*acides nucléiques*. Il en existe deux types : l'acide désoxyribonucléique ou ADN, et l'acide ribonucléique ou ARN.

Le stockage de l'information génétique doit se faire dans une structure physiquement et chimiquement stable, mais néanmoins capable d'autoreproduction aussi bien que d'autoréparation. Pour l'ADN, le matériel génétique de la majorité des êtres vivants (exceptions faites de certaines catégories de virus), cette structure stable est la double hélice formée de brins antiparallèles, décrite par Watson et Crick à la fin des années 1950 [170].

La quantité importante d'ADN stockée dans la cellule (1.4 m dans un noyau de quelques microns de diamètre) nécessite des techniques d'empaquetage sophistiquées, capables de le stocker de façon compacte tout en lui permettant de se répliquer et d'être partagé entre cellules filles lors de la division cellulaire. La structure de stockage, trouvée chez tous les eucaryotes<sup>2</sup>, est le chromosome<sup>3</sup> (Fig. 7.2).



**Fig. 7.2:** Représentation schématique de la constitution d'un chromosome [171].

L'*expression du génome* se fait par deux mécanismes principaux :

- La structure primaire de l'ADN est copiée par la synthèse d'ARN dont la structure primaire est identique à celle de l'ADN.
- La structure transcrite sur certains ARN, dits "messagers", s'exprime enfin par la synthèse de protéines dont la structure primaire traduit en acides aminés

<sup>2</sup> Eucaryotes - organismes avec des cellules pourvues de noyaux. Les champignons, les plantes, les animaux sont des eucaryotes.

<sup>3</sup> Chromosome - structure en forme de bâtonnet, située dans le noyau de toute cellule vivante et servant de support aux caractères génétiques propres à la cellule.

l'information portée par la structure primaire de l'ADN.

### 7.3 Transcription génétique

Le dogme central dit que l'ARN est l'intermédiaire entre le plan directeur stocké dans l'ADN et les agents d'exécution que sont les protéines. Ceci est vrai en partie, mais certains types d'ARN ont aussi des rôles directement fonctionnels. Seul l'ARNm, qui ne représente que 3-5% de l'ARN total de la cellule, remplit strictement la définition donnée par le dogme central. Néanmoins, il est vrai que tous les types d'ARN sont codés dans le génome, et doivent être transcrits depuis l'ADN. On distingue 3 classes principaux d'ARN qui diffèrent suivant leur taille, leur localisation et leur fonction :

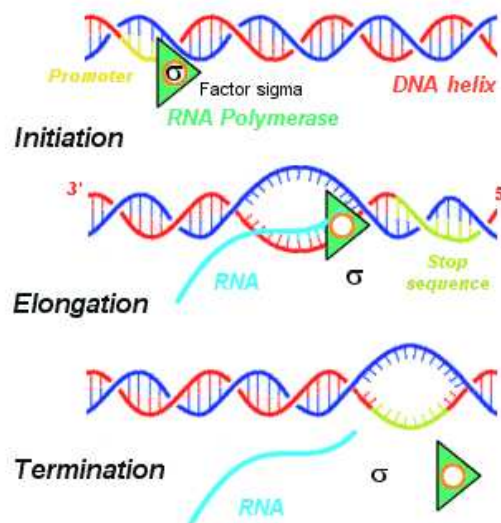
- ARNr - ARN ribosomique, environ 80% de l'ARN total de la cellule (4 types d'ARNr différents) ;
- ARNt - ARN de transfert, environ 15% du total (40 à 60 types d'ARNt différents en fonction du type de cellule) ;
- ARNm - ARN messenger, 3-5% du total (très grande diversité, environ 10 000 ARNm différents dans une cellule, mais en quantité restreinte).

Les ARNm sont une copie de la séquence codante d'un gène, servant de matrice pour l'expression en protéine. Les ARNr et les ARNt fournissent les structures et les outils nécessaires à l'expression de l'ARNm en protéine.

Alors que l'ADN a dans la vaste majorité des cas une structure en double hélice, les ARN ne contiennent normalement qu'un seul brin, et ne forment donc pas de structure stable avec leur complément. Par contre, les bases de l'ARN peuvent s'apparier avec d'autres régions du même brin, et former donc des structures dites secondaires, entièrement dictées par la séquence du brin d'ARN. Ces appariements intramoléculaires jouent un rôle central dans la fonction de tous les ARN, en leur imposant une structure tridimensionnelle unique. Ainsi l'ARNt jouent un rôle d'adaptateurs qui permet de décoder les ARNm.

Par définition, la transcription est le processus par lequel la séquence d'un gène est copiée en ARN. La transcription de l'ADN en ARN est accomplie par les *ARN polymérases*. Ce complexe enzymatique déroule et disjoint les deux brins de l'ADN hélicoïdale. Il recrute les mononucléotides du futur brin d'ARN et les assemble par complémentarité avec les bases de la séquence du brin d'ADN.

La transcription s'effectue en trois étapes successives : initiation, élongation et terminaison [172]. L'*initiation* de la transcription ne peut se faire qu'à des endroits précis sur la double hélice d'ADN, que l'on appelle promoteurs. Chez la plupart des organismes, l'initiation de la transcription demande l'assemblage d'un complexe multiprotéique sur le promoteur, et ouvre donc la porte à des mécanismes régulateurs sophistiqués (Fig. 7.3). L'*élongation* de la chaîne d'ARN s'effectue par polymérisation successive de nucléotides. L'étape de *terminaison* intervient lorsqu'un signal indiquant la fin du gène est lu.



**Fig. 7.3:** Trois étapes de transcription : initiation, élongation et terminaison [172].

Considérant que le génome de chaque cellule est complet pour former un nouvel organisme, il faut que l'expression des gènes soit strictement réglée pour permettre la différenciation et l'adaptation aux conditions externes de chaque cellule individuelle. Une partie importante de cette régulation se fait au niveau de la transcription des gènes.

Un mode de régulation très fréquent chez les eucaryotes implique des séquences à une certaine distance du promoteur, les "enhancers", qui sont reconnus par des protéines régulatrices activatrices (TFs) dans certaines conditions mais pas dans d'autres. La reconnaissance peut dépendre de la migration du facteur vers le noyau, de son association avec une autre protéine ou de modifications de sa structure (phosphorylation, glycosylation, *etc.*). La liaison du facteur de transcription sur "l'enhancer" provoque un changement de structure de l'ADN, et le recrutement d'autres facteurs menant finalement à l'assemblage d'un complexe d'initiation actif. La plupart des gènes sont soumis à un mécanisme de régulation plus complexe.



## 7.4 Modifications post - transcriptionnelles de l'ARN messager

L'ARN, copie d'une partie du génome, va encore subir une série de modifications avant de devenir une molécule fonctionnelle. Chez les procaryotes les modifications sont relativement mineures, tandis que chez les eucaryotes, pratiquement tous les types d'ARN sont modifiés après leur transcription.

L'ARN a une durée de vie limitée et la stabilité de l'ARN peut être réglée par les signaux cellulaires. Certains facteurs cellulaires accélèrent la dégradation de l'ARN, tandis que d'autres la ralentissent. Le nombre des protéines traduites à partir d'un ARNm varie en fonction de la durée de vie d'ARN. La demi-vie d'ARN varie de quelques minutes à plusieurs heures.

La fonction principale de l'ARNm transcrit est de spécifier une protéine à synthétiser. Une grande partie des autres ARN cellulaires participent aussi à cette tâche, mais en tant que machines à décoder plutôt que porteurs du code.

Le code à déchiffrer comporte quatre lettres, correspondant aux nucléotides (A - adenine, G - guanine, C - cytosine, U - uracile (dans ARNm ou thymine dans ADN)), alors que sa traduction compte 20 acides aminés. Le nombre minimum de nucléotides nécessaires pour spécifier un acide aminé est trois, atant donné que deux lettres tirées d'un alphabet de quatre ne peuvent coder que 16 combinaisons différentes. Avec trois nucléotides, le nombre est de 64, ce qui permet d'incorporer une "ponctuation" nécessaire à la bonne lecture du code et implique une redondance avec plusieurs triplets de nucléotides spécifiant le même acide aminé.

Il est très important que le code soit déchiffré correctement. Des mutations qui introduisent ou enlèvent 1 ou 2 nucléotides de la partie codante d'un gène vont décaler le cadre de lecture et donc provoquer la synthèse de protéines non fonctionnelles. Ceci est une cause fréquente de mutations naturelles.

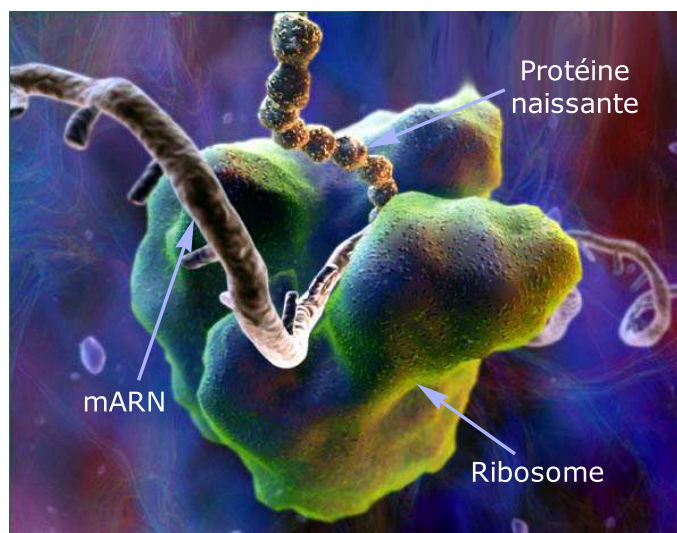
## 7.5 Traduction

La traduction est un processus de synthèse de protéine à partir d'un ARNm. La traduction du code génétique en protéine utilise les trois types principaux d'ARN : l'ARNm comme porteur du code, les ARNr comme machines à fabriquer les protéines

et les ARNt comme clés du code. Les trois ARN se retrouvent dans la machine à décoder, le ribosome.

Le mécanisme de décodage implique un appariement complémentaire entre les codons se trouvant sur l'ARNm et les anticodons se trouvant à une extrémité des ARNt. Cet appariement de trois paires de bases est guidé par le ribosome. Le ribosome est une structure extrêmement complexe. Son architecture précise n'est pas toujours connue, seulement sa forme générale et l'identité de ses composants. Plusieurs ARN différents, connus sous des noms correspondant à leurs constantes de sédimentation, forment l'échafaudage, et jouent aussi un rôle essentiel dans les propriétés associatives et catalytiques du ribosome. La majeure partie de la masse des ribosomes est formée de protéines, qui avec les ARN correspondants forment deux sous-unités, séparées au moment de l'initiation de la traduction, mais toutes les deux nécessaires à sa progression.

Une vue plus exacte de la forme tridimensionnelle des ribosomes a pu être déduite par l'analyse d'images en microscopie électronique et par la diffraction des neutrons. Elle montre plusieurs protubérances associées à la région où coulisse l'ARNm pendant la traduction, et un "tunnel" à travers lequel passe la chaîne peptidique nouvellement synthétisée (Fig. 7.4). La structure et la position des ARNt pendant le processus de traduction ne sont pas encore intégralement connues.



**Fig. 7.4:** Modèle tridimensionnel d'un ribosome bactérien fonctionnel [173]. La petite sous-unité et la grande sous-unité forment un complexe à travers lequel passe l'ARNm.

La traduction d'un brin d'ARNm en une chaîne polypeptidique est un processus complexe qui se décompose en trois étapes : initiation, élongation, terminaison. La

première étape de la traduction est l'*initiation*. Une sous-unité du ribosome se fixe sur l'extrémité d'ARNm, accompagnée de l'ARNt qui porte la méthionine (dont l'anticodon est UAC). Le ribosome et la sous-unité se déplacent jusqu'à ce qu'ils parviennent au codon AUG, codant pour la méthionine : ce codon est le codon initiateur. Une autre sous-unité ribosomale vient se poser sur ce codon. La synthèse commence. La seconde phase est *élongation*. Le ribosome se déplace de codon en codon sur l'ARNm, et associe chaque codon à un ARNt lui correspondant qui apporte le bon acide aminé au bon endroit. Ce nouvel acide aminé est relié au peptide en cours d'élongation grâce à une liaison peptidique créée par une enzyme. Les ARNt sont libérés successivement. La chaîne d'acides aminés s'allonge suivant l'ordre précis donné par les codons d'ARNm. L'étape de *termination* commence lorsque le ribosome rencontre un des trois codons stop (UAA, UAG, UGA). L'ARNm ainsi que la méthionine initiale sont libérés, le peptide créé est libéré et le ribosome commence la synthèse d'une nouvelle protéine sur un autre brin.

Les protéines ont une durée de vie limitée et la stabilité de ces protéines peut être également réglée par les signaux cellulaires. Certains facteurs accélèrent ou ralentissent la dégradation des protéines et leur demi-vie varie de quelques minutes à plusieurs jours.

# Chapitre 8

## Protocole expérimental

### 8.1 Méthodes

L'expression génétique est un processus à étapes multiples. Pour étudier les effets des OM d'une manière complète, nous avons analysé trois étapes clés de l'induction des protéines chaperons (Fig. 8.1). Les expériences biologiques décrites ci-dessous ont été réalisées au sein de l'équipe d'Information et de Programmation Cellulaire de l'Université de Rennes 1.

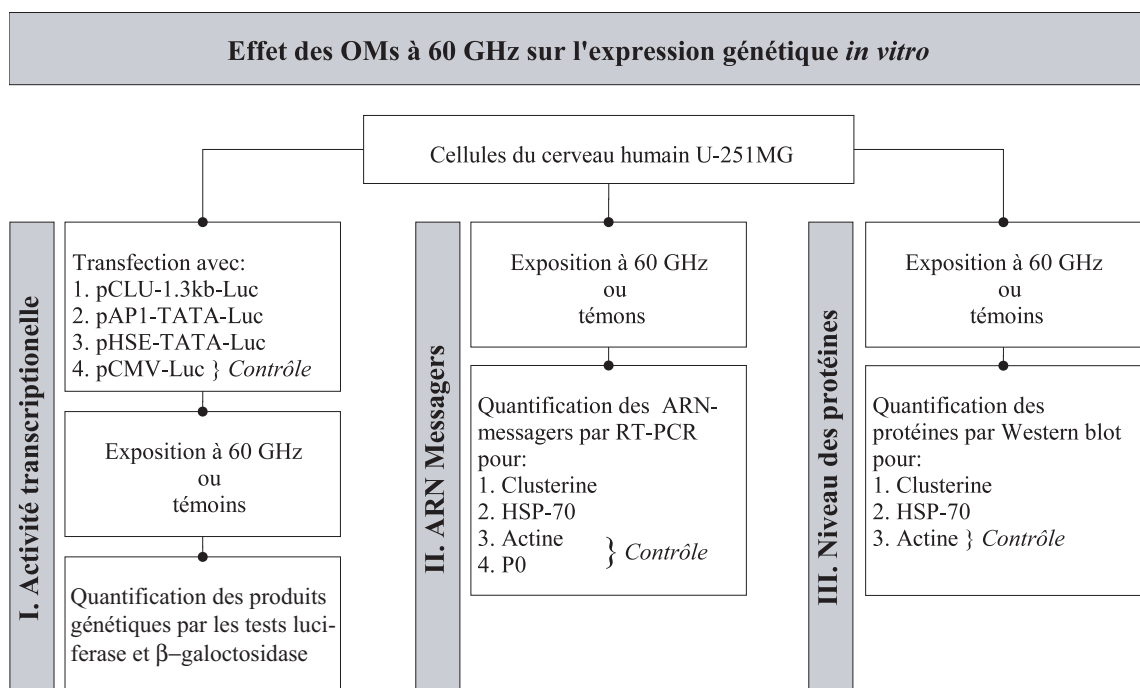
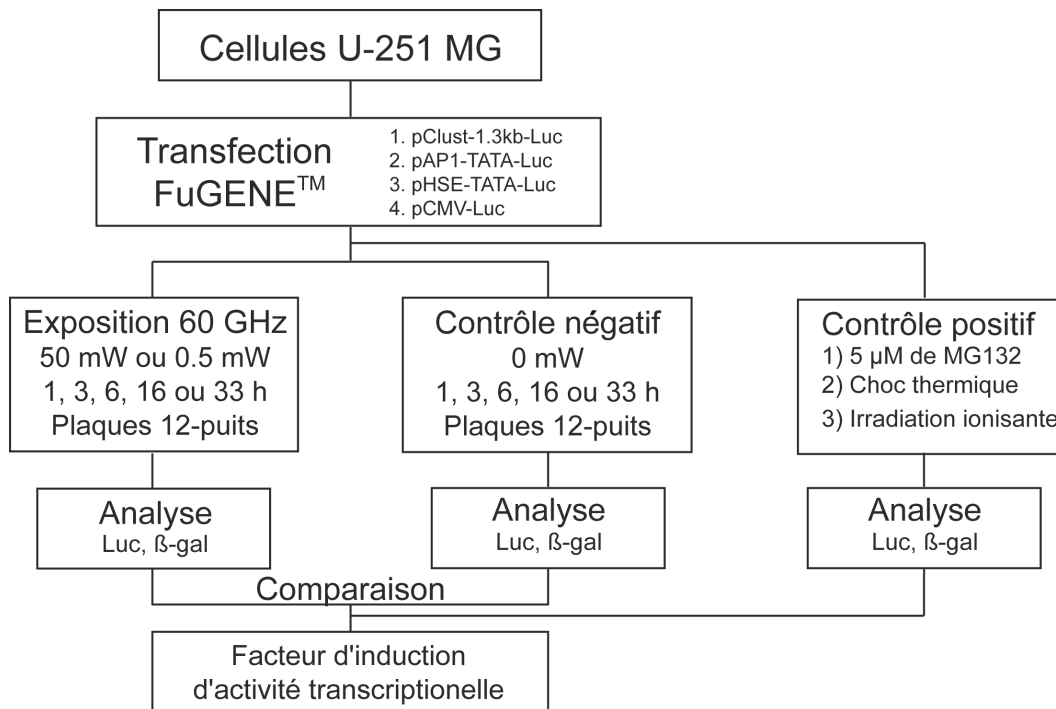


Fig. 8.1: Schéma général des expériences.

### 8.1.1 Transcription génétique

Pour vérifier si les rayonnements millimétriques à 60 GHz peuvent activer certains TFs et donc par là même changer l'activité transcriptionnelle des gènes codant les protéines chaperons, nous avons examiné l'activité de gènes-rapporteurs spécifiques (Fig. 8.2).



**Fig. 8.2:** Induction transcriptionnelle après une exposition à 60 GHz.

Les cellules U-251 MG ont été transfectées<sup>1</sup> avec quatre constructions génétiques : pCLU-1.3kb-Luc, pAP1-TATA-Luc, pHSE-TATA-Luc et pCMV-Luc, comparées avec le contrôle interne pCMV-β-gal. Le contrôle interne correspond à un promoteur qui n'est pas sensé d'être sensible aux stress physiques et chimiques. C'est un promoteur viral avec une activité constante qui reflète l'efficacité de transfection d'un puits à l'autre.

Après transfection, les cellules ont été exposées ou non-exposées aux OMs de faible puissance pendant 1, 3, 6, 16 ou 33 heures. Ensuite, les cellules ont été récoltées, lysées et analysées par des tests biochimiques. Les données d'activité de luciférase ont été normalisées par rapport à l'activité de β-galactosidase.

<sup>1</sup> Transfection - introduction de matériel génétique dans une cellule.

### 8.1.1.1 Gènes-rapporteurs

Pour étudier l'activité transcriptionnelle nous avons utilisé quatre gènes-rapporteurs qui représentent un large éventail de réponses aux différents stress cellulaires.

1. **pCLU-1.3kb-Luc** est un plasmide contenant le promoteur de la clusterine devant le gène luciférase. La clusterine (CLU) est une protéine chaperon [174] qui est surexprimée dans certaines pathologies telles que cancer, les maladies neurodégénératives, *etc.* La synthèse de la CLU est stimulée par les différents stress physiques et chimiques : thermique, oxydatif, irradiation ionisante, *etc.* [175–177]. Ce rapporteur est également activé par les stress protéotoxiques et génotoxiques d'un facteur 4 à 8. Par rapport à l'apoptose cellulaire, la CLU possède, selon sa localisation, deux activités opposées : elle serait pro-apoptotique lorsqu'elle s'accumule dans le compartiment nucléaire, et anti-apoptotique et donc protumorigène sous sa forme cytosolique et extracellulaire. Ainsi la CLU est un gène de “haut risque” pour l'apparition des tumeurs cérébrales.
2. Un autre gène rapporteur **pAP1-TATA-Luc**, contenant l'élément AP-1, a été utilisé pour étudier l'activité transcriptionnelle. Le facteur AP-1 peut être activé par différents stress, y compris les irradiations ionisantes et les UVs qui endommagent l'ADN, le stress oxydatif, la dépolarisation neuronale. Il a été montré que l'activité d'AP-1 augmente après l'exposition aux rayonnements BF [82].
3. Nous avons utilisé un gène rapporteur **pHSE-TATA-Luc** qui contient deux éléments de choc thermique (HSEs<sup>2</sup>) en tandem. Dans les situations protéotoxiques, les HSEs sont reconnus par les facteurs de choc thermique (HSFs<sup>3</sup>). Ces facteurs sont responsables de l'induction des protéines chaperons de type HSP. Cela mène à l'induction transcriptionnelle de ce gène-rapporteur avec le facteur 15. Cette construction génétique a été décrite auparavant dans [178].
4. Le promoteur du gène du cytomégalovirus **pCMV-Luc** a été utilisé comme contrôle négatif. Ce gène n'est pas sensible aux différents stress physiques et chimiques, y compris les champs BF [179]. Dans les conditions de nos expériences, il présente une activité transcriptionnelle constante. Ce vecteur<sup>4</sup> a été décrit précédemment dans [180].

---

<sup>2</sup> HSE - heat shock element.

<sup>3</sup> HSF - heat shock factor.

<sup>4</sup> Vecteur - véhicule de fragments d'ADN dans un organisme. Les plasmides, les virus et les bactériophages sont des vecteurs utilisés pour cloner des fragments d'ADN.

Les constructions génétiques contenant le promoteur CLU (pCLU-1.3kb-Luc) ou le promoteur AP-1 ont été gracieusement fourni par Dr Howe (Case Western Reserve, University of Cleveland, Ohio) et par Dr Castellazzi (ENS, Lyon, France), respectivement.

#### 8.1.1.2 Culture cellulaire

Les cellules humaines astrocytaires U-251 MG ont été cultivées dans le milieu DMEM (Gibco/Life Technologies) complété par 10% de Fœtal Calf Serum, 1mM Glutamine et pénicilline/streptomycine (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>). Les cellules ont été placées dans une boîte 12-puits (3×10<sup>4</sup> cellules par puits) un jour avant transfection. 400 ng de plasmide rapporteur luciférase ont été mélangés avec 100 ng de CMV-β-galactosidase. Le mélange des plasmides a été introduit dans les cellules par la transfection au FuGENE. Après transfection, les cellules ont été exposées aux OMs de faible puissance à 60 GHz dans une étuve avec la température maintenue à 37 °C. Ensuite les cellules ont été récoltées et analysées par les tests luciférase (Promega Kit) et β-galactosidase [180].

#### 8.1.1.3 Méthode de transfection

La transfection est une méthode d'introduction du matériel génétique à l'intérieur des cellules. Dans notre cas, pour effectuer le transfert des construction d'ADN nous avons utilisé un réactif FuGENE<sup>TM</sup> à base de lipides qui, associé à l'ADN, permet leur passage à travers la membrane. 400 ng de plasmide rapporteur et 100 ng de plasmide contrôle pCMV-β-gal ont été utilisés par transfection et ensuite les cellules (30 000 cellules/puits) ont été placées dans un incubateur (37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>) pendant 24 heures. Après le changement du milieu, les cellules ont été soumises au rayonnement millimétrique.

#### 8.1.1.4 Contrôle positif

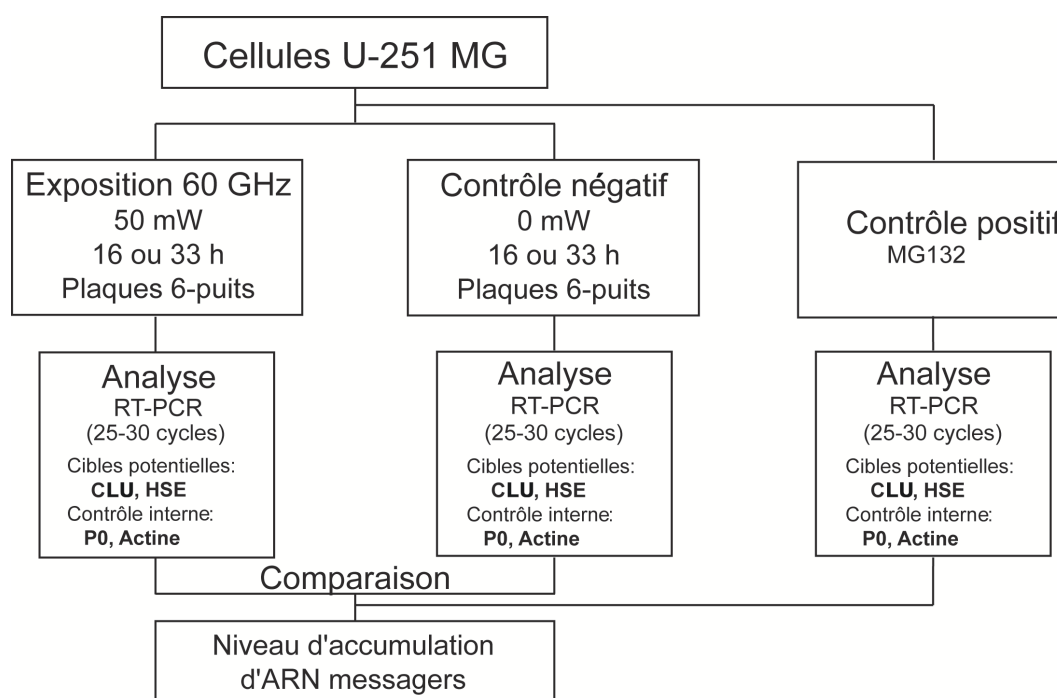
Pour le contrôle positif dans les conditions de stress, les cellules transfectées ont été exposées pendant 16 heures avec 5 μM d'un inhibiteur proteasomique le MG 132<sup>5</sup> (Sigma). Le MG 132 induit l'accumulation intracellulaire des protéines mal formées et correspond à un fort stress protéotoxique. Deux autres contrôles ont été effectués avec un choc thermique (30 min, 42°C) ou par l'exposition à une irradiation ionisante.

<sup>5</sup> MG 132 correspond à la molécule Z-Leu-Leu-Leu-al , où Z est benzyloxycarbonyle

La réponse transcriptionnelle à une irradiation ionisante a été analysée dans les cellules CHO-CH3S transfectées avec les vecteurs pCLU-1.3kb-Luc et pCMV- $\beta$ -galactosidase. Après transfection, les cellules ont été exposées avec une dose de 10 grays (Gy) des rayons gamma (5.46 min, 1.83 Gy/min) en utilisant un Theratron 780 disponible au “Centre Eugène Marquis” (“Centre Hospitalier Universitaire de Rennes”). Après exposition transitoire, les cellules ont été récoltées et analysées avec les tests luciférase et  $\beta$ -galactosidase pour déterminer l'induction de l'activité transcriptionnelle.

### 8.1.2 Accumulation de l'ARN messager

Pour vérifier si les OMs apportent les modifications sur la deuxième étape de l'expression génétique en modifiant la demi-vie des ARNm, les cellules ont été exposées ou non-exposées pendant 16 ou 33 heures et l'accumulation des ARN a été analysée par RT-PCR (Fig. 8.3).



**Fig. 8.3:** Modifications potentielles de l'accumulation de l'ARNm suite à l'exposition aux OMs à 60 GHz

#### 8.1.2.1 RT-PCR

PCR est l'abréviation de l'expression anglaise “Polymerase Chain Reaction” ou Réaction en Chaîne par Polymérase. À partir d'un échantillon complexe et peu abon-



dant, cette technique permet d'obtenir rapidement une quantité importante et exploitable d'un segment précis d'ADN. À chaque étape de PCR, le nombre de segments d'ADN cible présent est multiplié par deux. En quelques heures cette technique permet d'obtenir un million de copies d'un fragment d'ADN spécifique. RT-PCR (RT-PCR pour Reverse Transcription PCR) une technique associe une RT suivie d'une PCR. Elle permet de pouvoir mesurer un transcrit généralement très faiblement représenté. C'est la technique la plus sensible pour la détection et la quantification des ARNm.

Le protocole expérimental d'analyse des ARNm par RT-PCR est le suivant. Les ARN ont été préparées en utilisant le réactif TRIZOL (Gibco/Life Technologies) qui détruit les cellules et permet d'isoler l'ARN des autres constituants cellulaires tels que l'ADN et les protéines. 2  $\mu$ g d'ARN de chaque échantillon ont été transcrits en présence de 50  $\mu$ M des amorces [181]. Les ARNm d'actine et de phosphoprotéine ribosomale P0 ont été utilisés comme contrôle interne pour RT-PCR. Les messagers amplifiés de CLU et de HSP 70 ont été utilisés pour tester le niveau de stress cellulaire après exposition aux OMs. La réaction d'amplification a été arrêtée après 25-30 cycles d'amplification (amplification  $3 \times (10^7-10^9)$ ). Les amorces en amont et en aval ont été définies dans les différents exons comme il est décrit dans le Tableau 8.1.

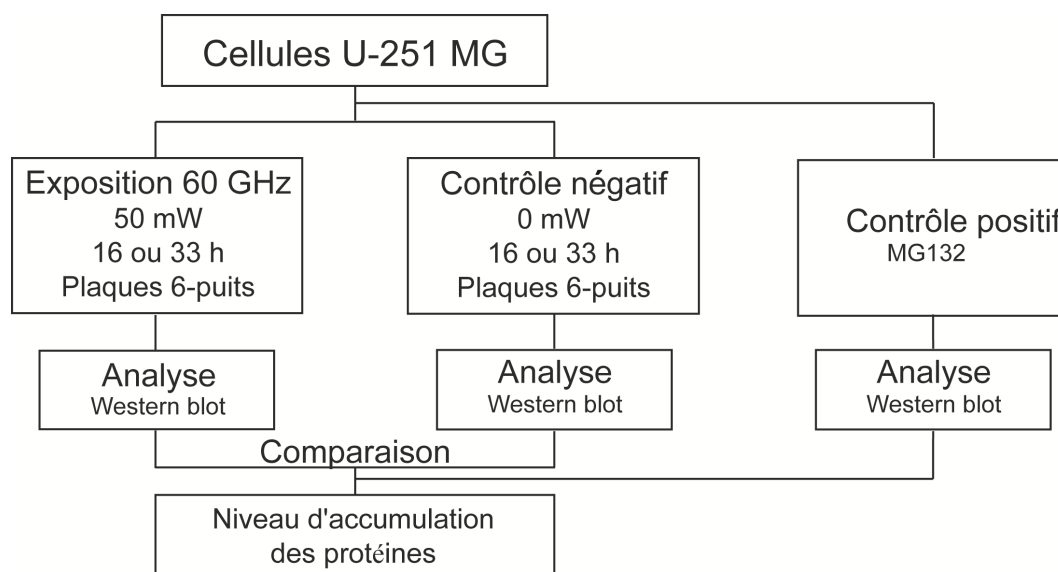
ARNm	En amont	En aval
CLU	5'-AATGTGGGCTCCAAGCAGATC-3'	5'-GAGATGTTTCAGCATGTTTCAGCAG-3'
P0	5'-AAYGTGGGCTCCAAGCAGATG-3'	5'-GAGATGTTTCAGCATGTTTCAGCAG-3'
Actin	5'-GACAGGATGCAGAAGGAGAT-3'	5'-TTGCTGATCCACATCTGCTG-3'
HSP70	5'-GGACATCAGCCAGAACAAGC-3'	5'-GTGTAGAAGTCGATGCCCTC-3'

**Tab. 8.1:** Les amorces en amont et en aval dans les différents exons.

Les produits de réaction RT-PCR ont été analysés par électrophorèse dans un gel d'agarose à 2.5% (tailles des fragments d'ADN : 185 bp, 132 bp, 146 bp et 442 bp pour CLU, HSP 70, actin et P0, respectivement) et quantifiés à l'aide de logiciel GeneQuant.

### 8.1.3 Niveau des protéines

En utilisant l'analyse par Western blot [180] nous avons vérifié si les OMs apportent des modifications à la troisième étape de l'expression génétique en modifiant la stabilité des protéines chaperons (Fig. 8.4).



**Fig. 8.4:** Modifications potentielles au niveau de la formation et de l'accumulation des protéines chaperons suite à l'exposition aux OMs à 60 GHz.

### 8.1.3.1 Western blot

Le Western blot est un test qui est utilisé pour détecter une protéine spécifique dans un échantillon à l'aide d'un anticorps reconnaissant exclusivement cette protéine. Le Western blot consiste en plusieurs étapes, dont la première étape consiste en une électrophorèse sur gel de polyacrylamide où les protéines de l'échantillon sont séparées selon leur taille. Le gel possède plusieurs puits, de sorte qu'il est possible d'analyser plusieurs échantillons simultanément.

Dans notre étude, l'extrait protéique a été obtenu comme suit. Après exposition, les cellules ont été récoltées et lysées dans un tampon dénaturant (60 mM Tris-HCl pH 6.8, 25% glycerol, 2% SDS, 0.01% bromophenol bleue, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol). Le lysat contenant la totalité des protéines cellulaires a été analysé par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide à 10%, en présence de SDS. Ensuite, les protéines présentes dans le gel ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham), par application d'un courant électrique. Les protéines vont se fixer à la membrane grâce à des interactions hydrophobes et ioniques. Les protéines ainsi transférées sur la membrane pourront ensuite être efficacement exposées à l'anticorps spécifique. Pour cela, un blocage préalable de la membrane permet de saturer les sites d'interactions non spécifiques entre la membrane et les anticorps et permet d'assurer la spécificité de la liaison anticorps-protéine d'intérêt. Les anticorps anti-CLU (sc-6420), anti-HSP 70 (MS-482-P0) et anti- $\alpha$ -actin (A2547) utilisés ont été achetés à Santa Cruz Biotechno-

logies, LabVision et Sigma, respectivement. Les bandes correspondant à la protéine étudiée apparaîtront sur le film développé (par des régions plus foncées). Des mesures de tailles relatives peuvent être faites en comparant les bandes obtenues à celle d'un marqueur de taille.

## 8.2 Dispositifs d'expérience

### 8.2.1 1<sup>ère</sup> étape. Transcription

Les cellules transfectées ont été placées dans des plaques 12-puits de dimensions  $100 \times 73$  mm, le diamètre d'un puits étant de 23 mm. Pour chaque expérience, deux plaques de cellules ont été préparées - une plaque exposée et une plaque contrôle. Quatre plasmides ont été distribués entre les 12 puits de chaque plaque, de façon à avoir la même densité superficielle de puissance moyenne pour chaque plasmide (Fig. 8.9 (a)). Ainsi chaque plaque contient trois puits de cellules transfectées avec la même construction génétique pour quatre plasmides différents. Pour étudier l'influence des différents temps d'exposition (1, 3, 6, 16 et 33 heures) et des différents niveaux de puissance de sortie (50 et 0.5 mW), 18 plaques ont été préparées (tableau 8.2). Une plaque contenant des cellules transfectées et traitées par des drogues (MG 132) est restée dans l'incubateur de l'UMR 6026 pour assurer le contrôle d'induction.

N° de plaque	1, 2 (c)	3, 4 (c)	5, 6 (c)	7, 8 (c)	9, 10 (c)	11, 12 (c)	13, 14 (c)	15, 16 (c)	17, 18 (c)
Durée d'exposition, heures	1	6	16	1	6	16	3	3 (1 h/1 h)	33
Puissance d'exposition, mW	50	50	50	0.5	0.5	0.5	50	50	50

**Tab. 8.2:** Temps et puissance d'exposition pour les différentes plaques.  
(c) désigne la plaque contrôle.

### 8.2.2 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> étapes. ARN messagers et niveaux des protéines

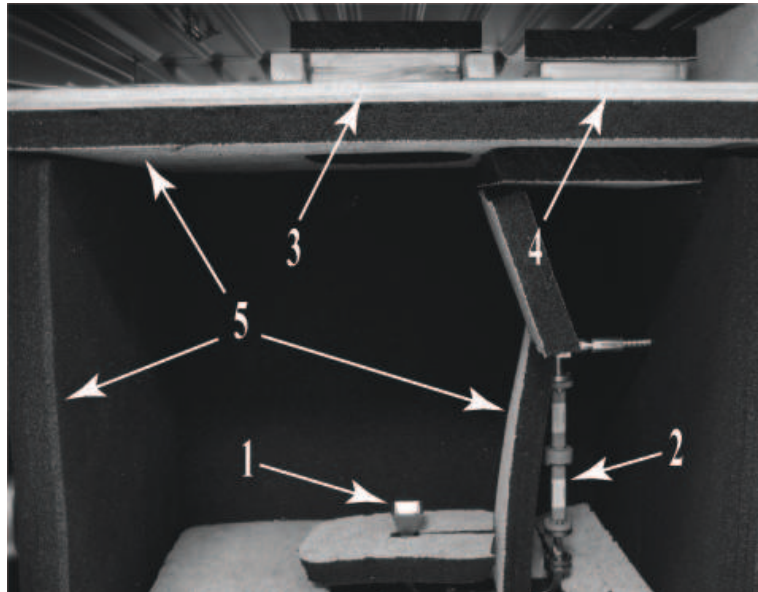
Dans la deuxième série d'expériences, les cellules ont été réparties dans des plaques 6 puits (dimensions : plaque -  $100 \text{ mm} \times 73 \text{ mm}$ , diamètre d'un puits - 36 mm). Ce

choix correspond à une surface de puits plus grande par rapport à la plaque 12-puits ce qui permet d'avoir plus de matériel cellulaire. Une plaque exposée et une plaque contrôle ont été préparées pour chaque expérience. Les cellules ont été exposées ou non-exposées avec la puissance maximale de générateur (50 mW) pendant des durées de 16 ou 33 heures.

## 8.3 Paramètres d'exposition et système d'exposition

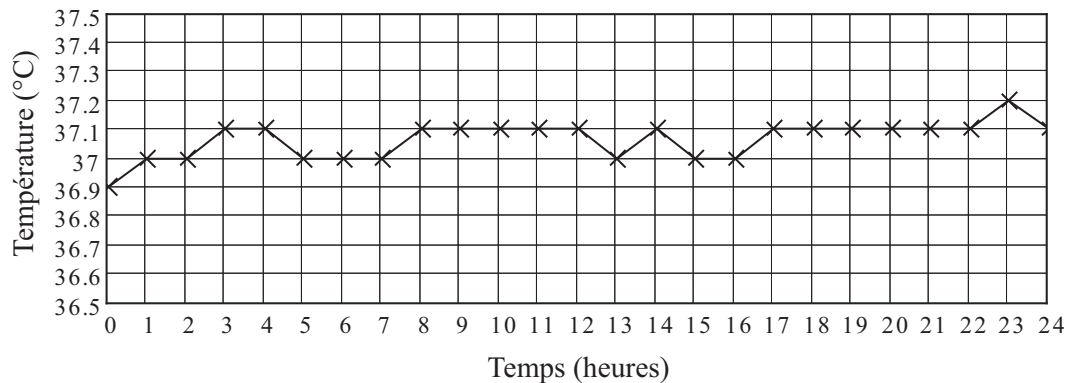
### 8.3.1 Conditions d'exposition

Après 24 heures d'exposition transitoire dans l'incubateur ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$ ) les deux plaques (exposée et contrôle) ont été placées dans l'étuve Memmert UE 400 ( $400\text{ mm} \times 400\text{ mm} \times 300\text{ mm}$ ) dont la température est maintenue à  $37 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  (Fig. 8.5). La température locale des plaques est contrôlée indépendamment par le thermocouple avec une précision de  $0.05^{\circ}\text{C}$ . La figure 8.6 représente la dynamique de la température pour 24 heures d'exposition.



**Fig. 8.5:** Dispositif d'expérience pour l'exposition *in vitro* dans la bande V : (1) antenne cornet pyramidal ; (2) guides WR-15 ; (3) plaque des cellules exposées ; (4) plaque des cellules non-exposées ; (5) absorbant millimétrique.

Une antenne cornet pyramidal est placée au-dessous de la plaque exposée à une distance 270 mm. Le centre de la plaque exposée se trouve sur l'axe principal de l'antenne.



**Fig. 8.6:** Dynamique de température locale des plaque mesurée à l'aide de thermocouple pour 24 heures d'exposition.

Le cornet est alimenté par un guide rectangulaire de dimensions  $3.75 \text{ mm} \times 1.88 \text{ mm}$  et fonctionnant en mode  $\text{TE}_{10}$ . Les parois de l'étuve sont couvertes d'absorbants millimétriques, qui permet d'éviter les réflexions multiples. Les cavités entre les puits dans la plaque exposée sont également remplies par l'absorbant pour assurer l'homogénéité de distribution de puissance et éviter les réflexions à l'intérieur d'une plaque.

Une ouverture dans l'absorbant sous la plaque permet l'exposition des cellules. Les mesures de coefficient de transmission pour le matériel des plaques utilisées (plastique d'épaisseur d'environ un millimètre) ont montré que les pertes totales causées par les réflexions et les absorptions par le fond d'une plaque à 60 GHz sont inférieures à 1 dB.

La deuxième plaque contrôle est isolée par trois couches d'absorbant (Fig. 8.5). Les niveaux de puissances mesurés aux centres des plaques exposée et contrôle sont présentés sur la figure 8.7. Le niveau de puissance et la fréquence centrale ont été contrôlés à l'aide d'analyseur de spectre avant et après chaque expérience.

La différence des niveaux (28.8 dB) donne l'atténuation de puissance pour la plaque contrôle par rapport à la plaque exposée. Cette valeur montre que la puissance transmise à travers l'absorbant est négligeable (la densité de puissance superficielle au niveau de plaque-contrôle est de  $3 \times 10^{-4} \text{ mW/cm}^2$  pour la puissance d'émission  $P=50 \text{ mW}$ ).

### 8.3.2 Système d'exposition

Le système d'exposition (Fig. 8.8) est essentiellement basé sur le système décrit dans la partie II (voir section II.5.1 Système d'exposition).

Dans les expériences, nous avons travaillé en polarisation linéaire à 60 GHz avec deux niveaux de puissances de sortie : puissance maximale de générateur 50 mW et

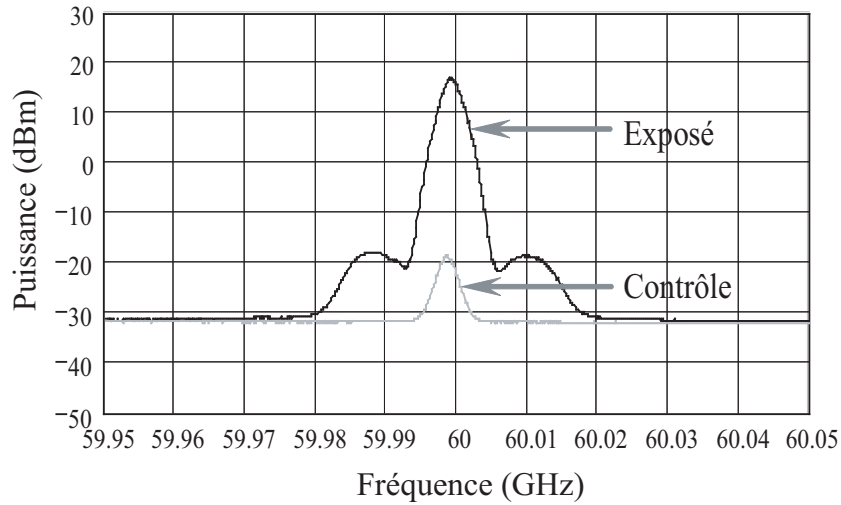


Fig. 8.7: Niveaux de puissance du signal pour les plaques exposée et contrôle.

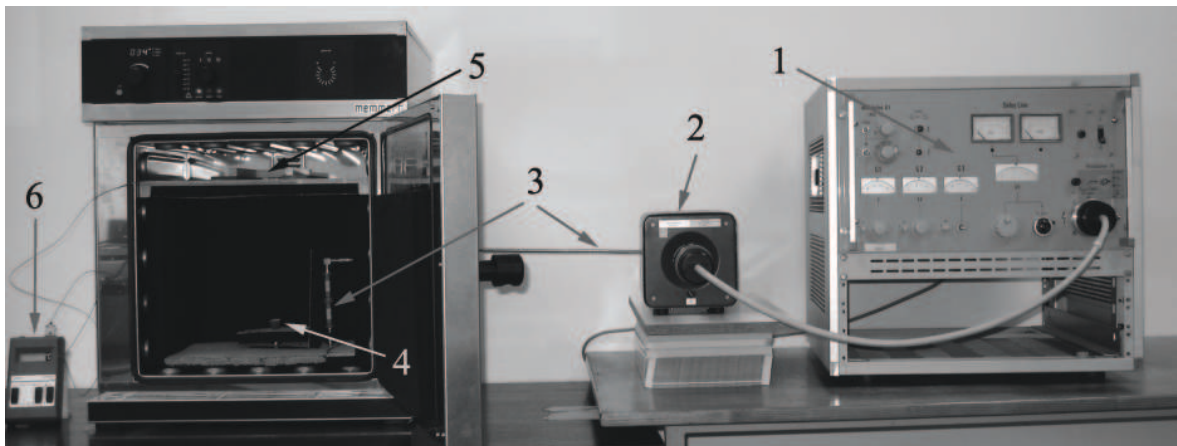


Fig. 8.8: Système d'exposition : (1) générateur haute tension Siemens RWON 14; (2) oscillateur à tube carinotron (Backward-Wave-Oscillator) Siemens RWO 75 (bande V) de puissance contrôlable ( $P_{max} = 50 \text{ mW}$  à 60 GHz), (3) guides WR 15 (50-75 GHz), (4) antenne cornet pyramidal d'ouverture de dimensions  $22.2 \times 16.7 \text{ mm}^2$ , (5) plaque avec les cellules, (6) thermocouple.

puissance atténuée de 20 dB (0.5 mW).

Dans les conditions des expériences, le choix de la distance entre l'antenne et la plaque contenant la culture cellulaire (270 mm) est limité par les dimensions de l'étuve. Ainsi les cellules se trouvent dans la zone de rayonnement intermédiaire (voir sous-section II.5.6.1 Cornet pyramidal).

La figure 5.15 (voir sous-section II.5.6.1.4 Diagrammes de rayonnement dans les plans E et H) montre les diagrammes de directivité de l'antenne dans les plans E et H. Les angles d'ouvertures à -3 dB dans le plan E et dans le plan H valent respectivement  $\alpha_1 = 17^\circ$  et  $\alpha_2 = 13^\circ$ ; ainsi la région de rayonnement au niveau -3 dB dans deux plans principaux à la distance 270 mm est de  $165 \text{ mm} \times 124.6 \text{ mm}$ . Les plaques ont

pour dimensions  $100 \text{ mm} \times 73 \text{ mm}$  et elles se trouvent dans la zone de diagrammes de rayonnement  $10.5^\circ$  (plan E) et  $7.6^\circ$  (plans H). Cela correspond à des variations de puissance de -2 dB dans le plan E et de -1 dB dans le plan H par rapport à la densité superficielle de puissance maximale au centre de la plaque.

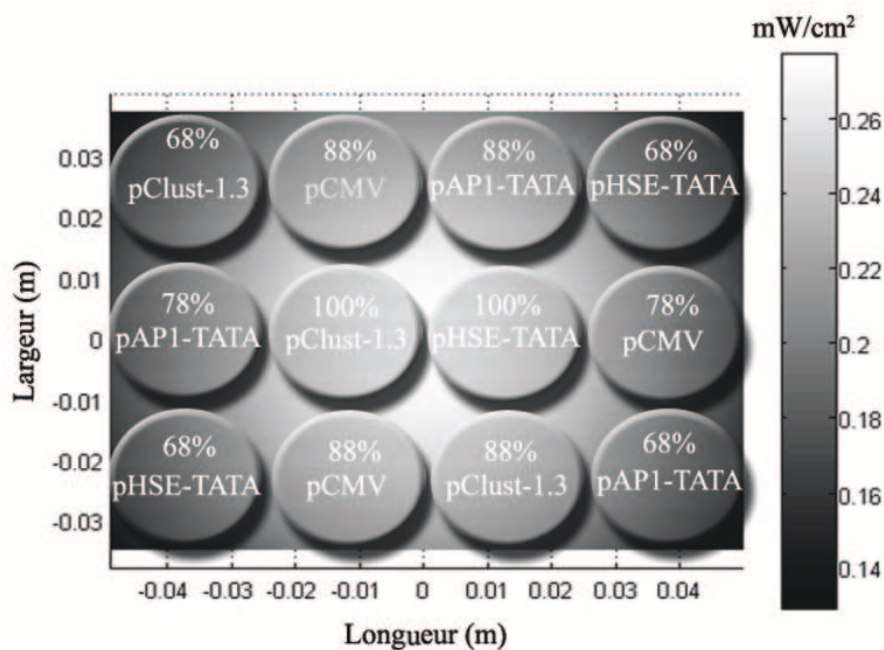
La figure 8.9 représente la distribution de densité de puissance de rayonnement au niveau des cellules pour les plaques 12-puits et 6-puits respectivement. Le niveau moyen de densité superficielle de puissance est calculé pour chaque puits relativement à la valeur maximale au centre de la plaque. Les variations maximales de densité de puissance calculées pour les plaques 12-puits et 6-puits sont égales à 32% et 20%, respectivement.

La densité superficielle de puissance maximale  $\Phi_M$ , les amplitudes des champs électrique  $|\vec{E}|$  et magnétique  $|\vec{H}|$  calculées à partir des formules 5.10 et 5.12 (voir sous-section II.5.6.1.6 Densité superficielle de puissance et valeur de champ) sont présentées dans le tableau 8.3.

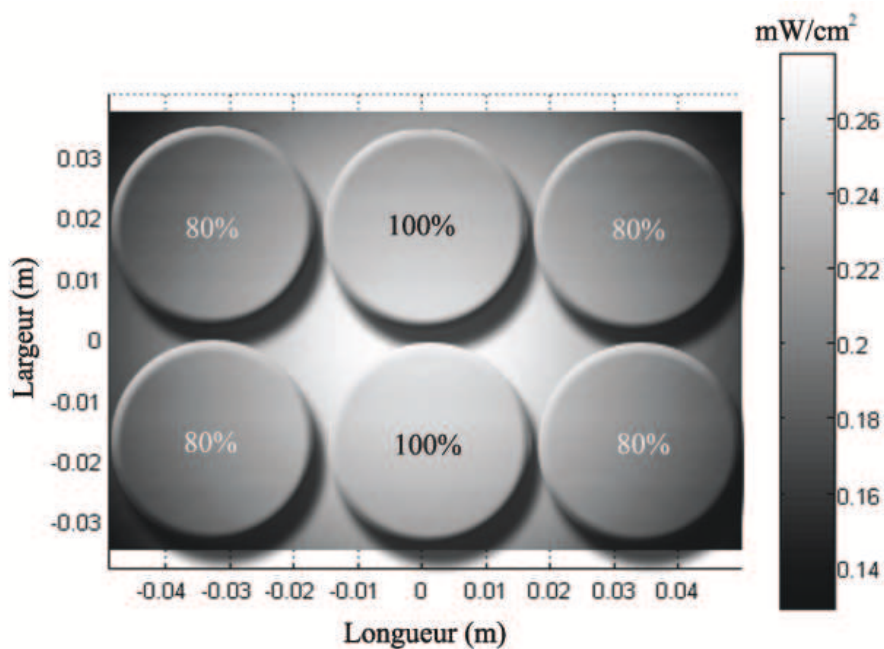
$P$ , mW	$\Phi_M \times 10^2$ , mW/cm <sup>2</sup>	$ \vec{E} $ , V/m	$ \vec{H}  \times 10^2$ , A/m
50	27.1	45.2	12
0.5	0.27	4.5	1.2

**Tab. 8.3:** Antenne cornet pyramidal. Valeurs de la densité superficielle de puissance maximale  $\Phi_M$  et des champs électrique  $|\vec{E}|$  et magnétique  $|\vec{H}|$  maximaux au niveau des cellules pour deux valeurs de puissance de rayonnement utilisées dans les expériences.

Ces valeurs satisfont aux normes et recommandations internationales pour les rayonnements non-ionisants (voir section I.2.1 Effets non-thermiques).



(a)



(b)

Fig. 8.9: Distribution de puissance pour chaque puits pour les plaques (a) 12-puits et (b) 6-puits.





# Chapitre 9

## Résultats

Dans ce chapitre nous regrouperons les résultats des études sur les modifications potentielles de l'expression génétique : transcription, expression transitoire de ARNm et traduction, après une exposition aux OMs de faible puissance. Nous étudierons également l'effet du rayonnement sur la mortalité et la croissance cellulaires.

### 9.1 Effet de l'exposition sur la mortalité et la croissance cellulaires

L'influence du rayonnement sur la mortalité et la croissance cellulaire a été étudiée. Après 1, 6 et 16 heures d'exposition au rayonnement millimétrique de densités superficielles de puissance de  $0.27 \text{ mW/cm}^2$  et de  $2.7 \mu\text{W/cm}^2$  (50 et 0.5 mW), les cellules ont été récoltées et lysées. La concentration protéique moyenne pour les cellules de chaque plaque a été analysée par la méthode de Bradford. Dans cette méthode, le bleu de Coomassie se lie aux protéines. Il a une forme anionique bleue qui absorbe spécifiquement la longueur d'onde de 595 nm. Les mesures de densité optique à 595 nm permettent ainsi de quantifier les protéines.

La concentration protéique est directement proportionnelle à la quantité des cellules. Ainsi la concentration des protéines est, dans une certaine mesure, le reflet de la mortalité ou de la croissance cellulaire. La figure 9.1 représente la concentration protéique moyenne pour les plaques exposées à 60 GHz et non-exposées. Les données sont présentées comme les valeurs moyennes et leur écart type.

Les niveaux d'accumulation des protéines montrent l'absence de différences signi-

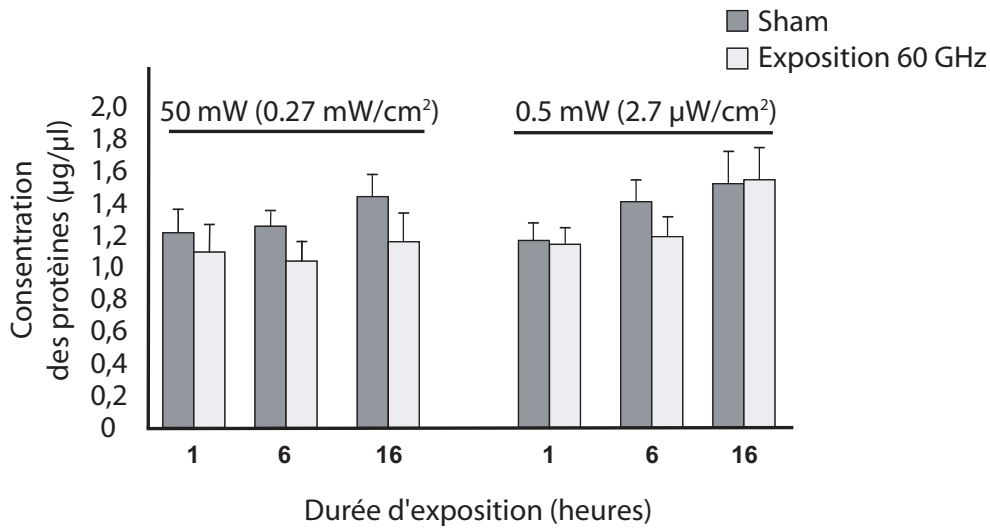


Fig. 9.1: Effet du rayonnement millimétrique sur la mortalité et la croissance cellulaire.

ficatives entre les cellules exposées et non-exposées.

## 9.2 Effet sur la transcription génétique

Dans cette section nous étudierons l'effet potentiel des OMs sur la première étape de l'expression génétique - la transcription. Pour déterminer si les OMs à 60 GHz peuvent induire l'expression génétique, nous avons examiné l'activité de trois gènes rapporteurs spécifiques qui sont sensibles à une large gamme de stress environnementaux.

Deux séries d'expériences ont été réalisées. Dans la *première série*, l'effet potentiel d'un rayonnement millimétrique a été analysé et comparé pour deux niveaux de puissances et pour quatre durées d'exposition différentes (1, 6, 16 et 33 heures). L'influence du rayonnement sur l'activité transcriptionnelle a été étudiée. La stabilité du contrôle interne par rapport aux OMs a été confirmée expérimentalement.

Dans la *deuxième série* d'expériences, nous avons étudié l'effet de l'exposition de durée de 3 h et d'exposition intermittente (1h d'exposition / 1h sans exposition) pour une densité superficielle de puissance valant 0.27 mW/cm<sup>2</sup>.

### 9.2.1 Contrôle interne CMV- $\beta$ -galactosidase

Il est connu que le plasmide CMV- $\beta$ -gal ne réagit pas à une grande diversité de stress environnementaux. En analysant l'effet des expositions à 60 GHz de différentes durées (1, 6 ou 16 heures) et de différents niveaux de puissance (50 ou 0.5 mW), nous avons montré expérimentalement que le contrôle interne CMV- $\beta$ -gal n'est pas sensible aux OMs de faible puissance. En même temps, le CMV- $\beta$ -gal a montré une efficacité de transfection constante pour les groupes de cellules des différentes plaques.

### 9.2.2 Activité transcriptionnelle

Pour comparer les activités transcriptionnelles de trois gènes promoteurs, nous avons calculé le coefficient d'induction transcriptionnelle (les données d'activité luciférase normalisées sur l'activité  $\beta$ -galactosidase). La quantité d'enzymes synthétisées dans les cellules exposées a été divisée sur la quantité du même type d'enzyme présente dans les cellules non-exposées.

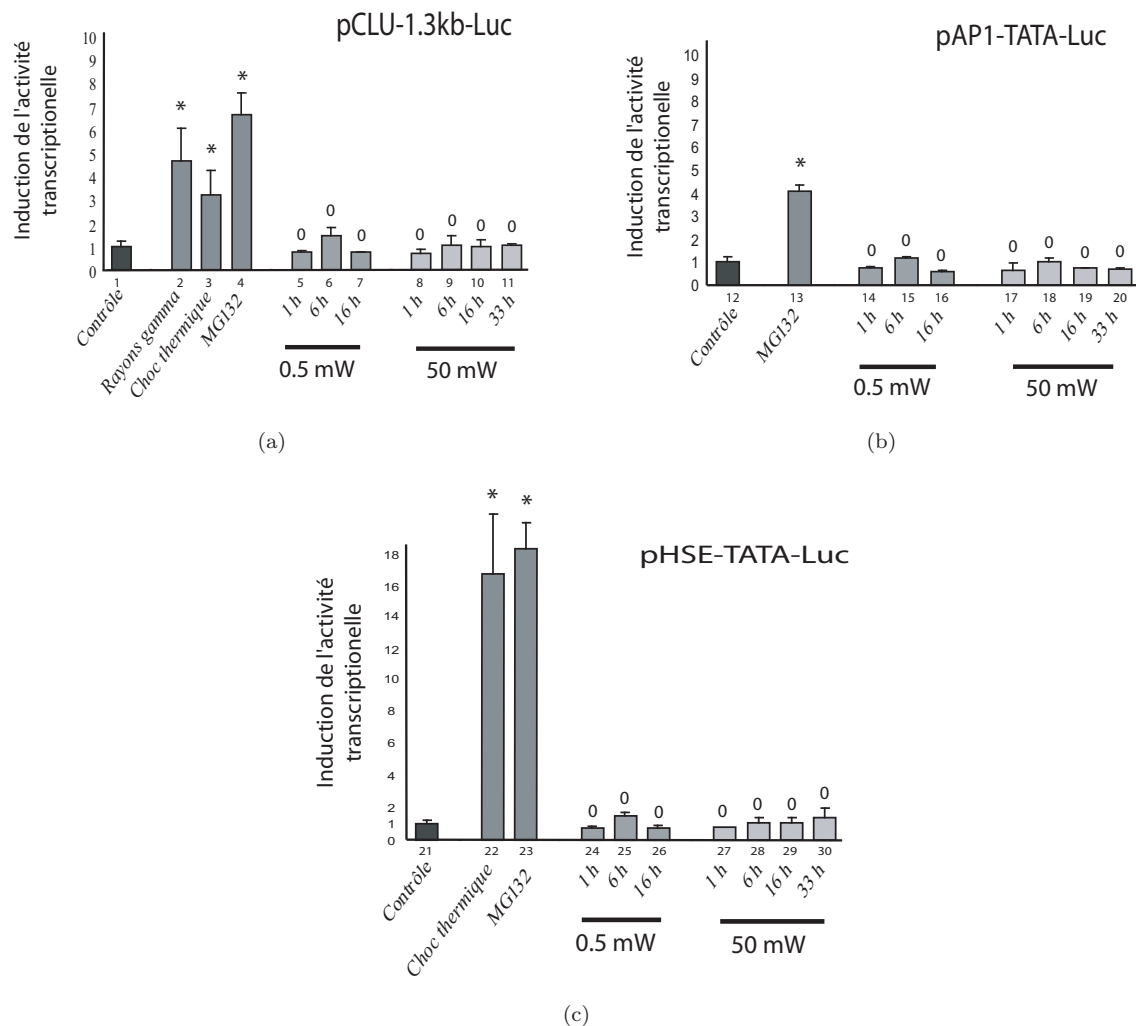
La figure 9.2 (a) montre l'induction de l'activité transcriptionnelle pour pCLU-1.3kb-Luc. L'activité de pCLU-1.3kb-Luc a été augmentée par les stress protéotoxiques (choc thermique et MG132 - histogrammes 3 et 4) et génotoxique (rayons gamma - histogramme 2) par des facteurs allant de 4 à 8. Ces contrôles positifs ont validé l'utilisation de pCLU-1.3kb-Luc comme un gène rapporteur sensible à différents stress.

La figure 9.2 (b) représente l'induction de l'activité transcriptionnelle pour le gène rapporteur pAP1-TATA-Luc. L'activité de pAP1-TATA-Luc a été augmenté d'un facteur 4 (histogramme 13) suite à un stress proteotoxique induit par MG 132.

L'activation de transcription a été montrée pour pHSE-TATA-Luc après un traitement protéotoxique (Fig. 9.2 (c)). La reconnaissance des HSEs par les HSFs induit l'induction de ce gène rapporteur par un facteur 17 (histogramme 22 et 23).

Pour ces trois gènes rapporteurs étudiés, le rayonnement millimétrique à 60 GHz de faibles niveaux de puissance ( $0.27 \text{ mW/cm}^2$  ou  $2.7 \mu\text{W/cm}^2$ ) n'induit pas de stress susceptible d'activer l'expression génétique des protéines chaperons.

Ces résultats ont été confirmés pour les différentes durées d'exposition. Dans la série d'expériences suivante, nous avons testé les durées d'exposition de 3, 16 ou 33 heures ainsi que le régime d'exposition intermittent (1 h d'exposition / 1 h sans exposition) pour une densité superficielle de puissance de  $0.27 \text{ mW/cm}^2$  (Fig. 9.3).

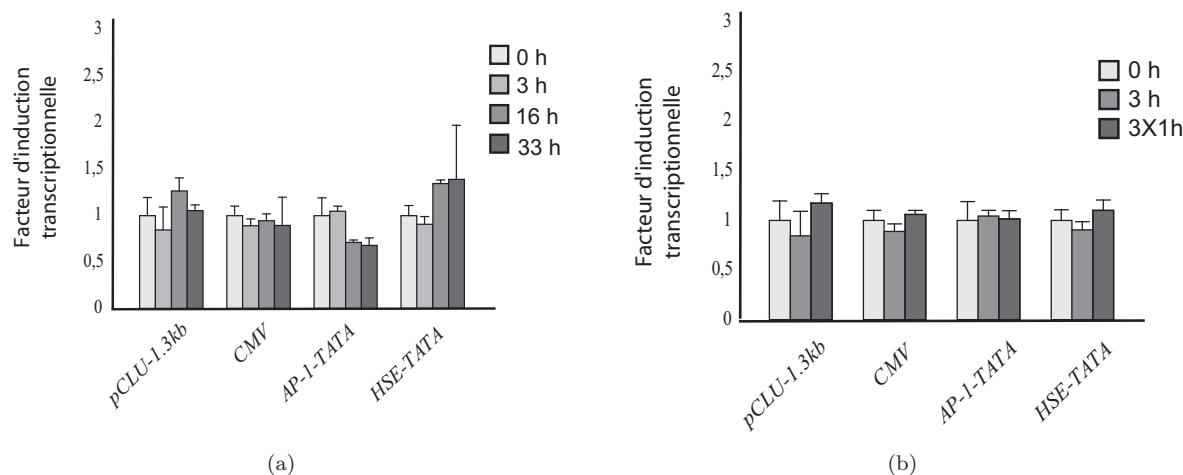


**Fig. 9.2:** Induction de l'activité transcriptionnelle par les OMs. Test Student comparé au contrôle : \* significatif ( $P < 0.001$ ) ; 0 ne pas significatif ( $P > 0.05$ ).

Puisque l'expression génétique est un processus complexe à multiples étapes, l'absence d'activation transcriptionnelle suggère que les OMs de faible puissance n'ont pas d'effet sur la première étape de l'expression génétique ; mais ceci ne prouve pas qu'elles n'ont pas d'effet sur les étapes suivantes. Pour examiner d'autres voies potentielles de modifications de l'expression génétique par les OMs nous avons complété nos résultats par une étude aux niveaux des ARNm et des protéines.

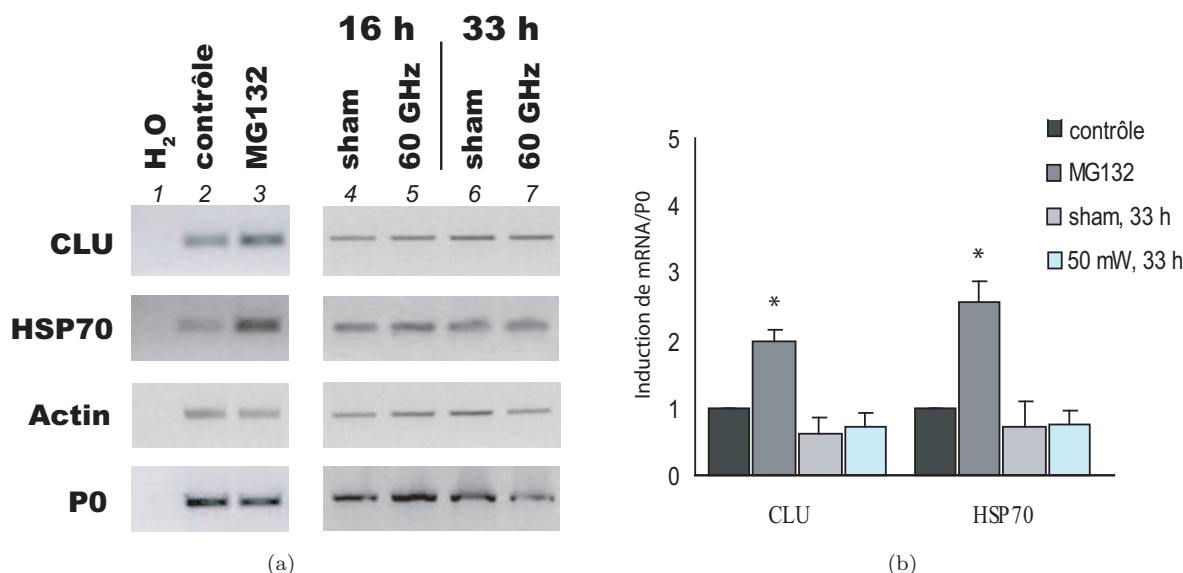
### 9.3 Accumulation de l'ARN messenger

Nous avons regardé par RT-PCR semi-quantitative les niveaux des ARNm correspondant à l'expression de deux protéines chaperons CLU et HSP70. Ces deux gènes



**Fig. 9.3:** Induction de l'activité transcriptionnelle par les OMs pour les différents régimes temporels de l'exposition.

sont considérés comme des marqueurs fiables des stress cellulaires. Actine et P0 ont été utilisés comme contrôles internes. La figure 9.4 (a) montre une amplification représentative d'ARN obtenue par RT-PCR à partir de cellules U251 MG. Les niveaux relatifs de CLU et de HSP70 ont été normalisés par l'intensité de la bande de la phosphoprotéine P0 (Fig. 9.4 (b)).



**Fig. 9.4:** Effet de rayonnement millimétrique à 60 GHz sur le niveau d'accumulation d'ARNm.  
\* correspond à  $P < 0.05$  dans le test Student.

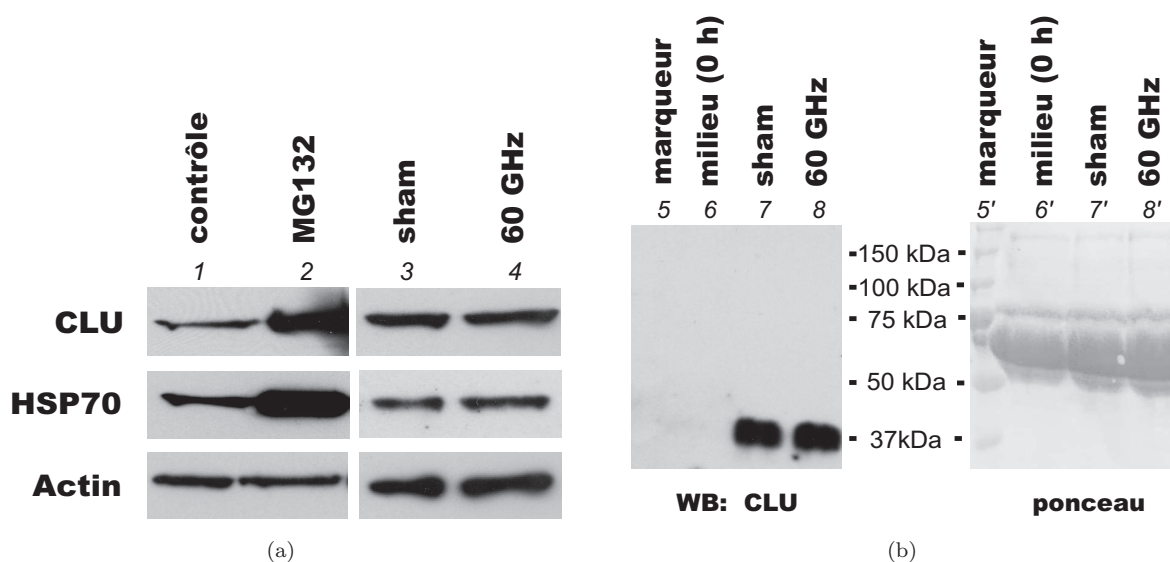
Le MG 132 a été utilisé comme le contrôle positif car il génère un fort stress protéotoxique dans la cellule. Comme le montre la figure 9.4, ce produit induit l'augmentation des niveaux d'ARNm de CLU et de HSP 70 (colonne 3 sur la figure 9.4 (a)).

Le MG 132 n'étant pas soluble dans l'eau il a été dissout dans du DMSO (DiMethyl SulfOxide), et l'action du MG 132 sur les cellules a donc été comparée à l'action du solvant seul (contrôle = DMSO seul).

Pour les différentes durées d'exposition (16 ou 33 heures) et pour une densité superficiel de puissance de  $0.27 \text{ mW/cm}^2$  nous n'avons pas observé d'effet statistiquement significatif sur la stabilité des ARNm pour les cellules exposées comparées aux cellules contrôles.

## 9.4 Accumulation des protéines

Le niveau d'accumulation des protéines a été analysé par le test Western blot pour déterminer l'expression de CLU et de HSP 70 après une exposition aux OMs. La figure 9.5 (a) montre la forme précurseur de CLU, qui correspond à une protéine de 64 kDa fraîchement synthétisée, localisée dans le réticulum et qui n'a pas encore subit de maturation en vue de sa sécrétion. En accord avec les résultats reportés dans la littérature [182], le MG 132 induit une augmentation des niveaux de CLU et de HSP 70 après 16 heures de traitement (colonnes 2 sur la figure 9.5 (a)) comparé au contrôle DMSO (colonnes 1 sur la figure 9.5 (a)).



**Fig. 9.5:** Effet du rayonnement millimétrique à 60 GHz sur le niveau d'accumulation des protéines chaperons. (a) Niveau de protéines intracellulaires ; (b) CLU sécrétée dans le milieu.

Le niveau des protéines intracellulaires n'a pas été augmenté après 33 heures d'exposition aux OMs ( $0.27 \text{ mW/cm}^2$ ) par rapport au contrôle négatif (colonnes 3 et 4 sur

la figure 9.5 (a)).

La CLU est une protéine chaperon sécrétée. Nous avons donc analysé la présence de cette protéine dans le milieu de culture des cellules, avant et après l'exposition. Avant d'être sécrétée, la CLU requiert une série de modifications qui consiste en des glycosylations suivies d'une coupure qui générera deux sous-unités appelées sous-unités  $\alpha$  et sous-unités  $\beta$ . Les anticorps spécifiques de CLU que nous utilisons ne reconnaissent que la sous-unité  $\beta$  qui correspond à une protéine de 40 kDa. La CLU n'est pas présente dans le milieu frais (colonne 6 sur la figure 9.5 (b)) mais elle a été synthétisée et sécrétée par les cellules et elle est devenue détectable après 33 heures de culture (colonne 7 et 8 sur la figure 9.5 (b)). Sur la figure 9.5 (b), la partie gauche correspond à Western blot et la partie droite correspond à la membrane colorée au rouge ponceau qui représente le contrôle de distribution homogène.

Aucune différence significative n'a été observée entre les niveaux de CLU sécrété pour les cellules exposées et non-exposées (colonne 7 et 8 sur la figure 9.5 (b)). Cela confirme les résultats obtenus auparavant qui montrent l'absence d'effet des OMs de faible puissance sur l'expression génétique de CLU et de HSP 70.





# Discussion et conclusions

Les cellules répondent à des conditions physiologiques anormales par l'induction de l'expression génétique des protéines chaperons cytoprotectrices, par exemple HSP 70 et CLU. Ces dernières années, un nombre grandissant d'études expérimentales a été consacré à l'induction de l'expression génétique par les ondes EMs. Certains de ces travaux se sont focalisés sur les mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels les ondes EMs, principalement les rayonnements BF, peuvent modifier l'expression génétique.

Malgré le grand nombre de publications, la polémique sur l'interprétation des effets observés et sur la reproductibilité des résultats reste ouverte. Dans ce contexte, une attention particulière doit être accordée, non seulement à la diversité des variables biologiques des expériences, mais aussi à la comparaison des données obtenues pour les différents paramètres d'exposition. Les fréquences autour de 60 GHz attirent un intérêt tout particulier à cause du nombre important de résonances moléculaires disponibles dans cette sous-bande fréquentielle.

Dans cette partie du travail, nous avons étudié les modifications potentielles de l'expression génétique dans les cellules gliales du cerveau humain après exposition aux OMs à 60 GHz de faible puissance. Puisque l'expression génétique est un mécanisme complexe de reproduction de l'information génétique, nous avons analysé les différentes étapes de l'induction des protéines chaperons.

Dans un premier temps, en utilisant trois gènes rapporteurs sensibles aux stress, nous avons vérifié si le rayonnement millimétrique à 60 GHz à des niveaux de puissance et des durées d'exposition différents peut interférer avec l'activation de facteur de transcription et donc avec l'activité génétique. Dans un deuxième temps, nous avons analysé par RT-PCR et Western blot si les OMs ont un effet sur l'accumulation des ARN messagers, la traduction ou la stabilité des protéines chaperons.

Le promoteur du gène CLU contient plusieurs sites d'ADN associés aux stress, par

exemple un élément HSE, un élément p53 ou un élément putatif de réponse aux rayonnements BF [183]. Pour compléter ce travail, nous avons également étudié l'activité de deux autres gènes rapporteurs, notamment AP-1 et HSF.

En utilisant trois systèmes rapporteurs sensibles aux stress et différents paramètres d'exposition nous n'avons pas détecté de modifications significatives sur la première étape de l'expression génétique - transcription [184–186]. Seul le plasmide pHSE-TATA-Luc montre une légère tendance à l'activation quand la durée d'exposition augmente (Fig. 9.2). Les tests statistiques de type *Student* montrent que cette légère hausse n'est pas significative, mais il serait intéressant de tester l'activité de ce gène rapporteur pour des temps d'exposition plus long (48 ou 72 h). De même, l'analyse des ARNm et des protéines a démontré que les OMs à 60 GHz n'ont pas d'effet sur l'expression génétique de CLU et de HSP70, qui correspondent à deux protéines exprimées après l'exposition aux divers stress environnementaux [186, 187].

Nos résultats ainsi que les résultats publiés dans la littérature auparavant [71] présumant que le rayonnement millimétrique à 60 GHz de faible puissance ne représente pas un stress protéotoxique massif qui en retour induirait une synthèse des protéines chaperons au niveau cellulaire.

# Perspectives

Les perspectives majeures de ce travail consistent à poursuivre l'exploration des effets biologiques que pourraient présenter les OMs et d'identifier des mécanismes de leur action au niveau cellulaire.

Les conséquences éventuelles de l'exposition aux ondes EMs dépendent de l'interaction primaire des rayonnements avec leurs cibles moléculaires, mais également des effets secondaires potentiels induits par l'interaction primaire. Les systèmes vivants ont une grande aptitude à compenser les effets dus à des agents externes. Nous nous intéresserons aux effets biologiques qui sont déterminés par le changement d'ordre biochimique ou physiologique induit en réponse à une faible stimulation extérieure. Les effets biologiques sont habituellement réversibles et se situent souvent dans les limites des réponses "adaptatives" normales de la cellule. C'est l'induction de cette réponse adaptative aux agressions que nous utiliserons comme marqueur pour analyser les effets éventuels des OMs sur les cellules humaines. Plusieurs voies seront explorées en parallèle car les types de réponses cellulaires dépendent des molécules cibles touchées.

Nous proposons d'analyser les modifications potentielles de l'expression génétique induites par l'exposition aux rayonnements millimétriques de cultures de cellules gliales du cerveau humain et/ou de cellules épidermiques. Ces effets seront évalués à travers la réponse à des stress cellulaires récemment identifiés comme extrêmement sensibles aux conditions environnementales et fortement impliqués en pathologie humaine.

Nos études précédentes ont montré que les OMs de faible puissance à 60 GHz n'induisaient pas la surexpression de protéines chaperons telles que HSP70 ou la CLU. Les effets des ondes sur les protéines semblent donc plus sélectifs et il est possible qu'ils dépendent des propriétés physiques et des caractéristiques d'exposition. L'étude du rôle des différents paramètres d'exposition sera essentiellement déterminée par le choix de la fréquence qui sera non seulement dicté par les normes internationales,

mais aussi par les données issues de spectroscopie micro-ondes. Les travaux seront concentrés dans la bande 57-64 GHz en privilégiant les fréquences pour lesquelles les données spectroscopiques suggèrent une résonance des groupes biomoléculaires.

Malgré l'existence d'un grand nombre de données expérimentales, les molécules ou les organites cellulaires qui pourraient être affectés par les rayonnements non ionisants demeurent encore totalement inconnus. Récemment, les membranes plasmiques ont été suspectées comme étant une cible potentielle. L'analyse de nos propres résultats confirme cette hypothèse, puisque nous avons démontré une augmentation de pression superficielle dans des membranes biologiques artificielles exposées pendant 5 heures à 60 GHz. Dans la cellule, des modifications membranaires pourraient expliquer les effets des OMs sur les flux calciques intracellulaires [188], et suggèrent que des compartiments cellulaires tels que le *réticulum endoplasmique* pourrait être un organite cible important pour les OMs. Par exemple, un stress réticulaire peut expérimentalement être déclenché en employant des drogues qui altèrent la perméabilité des membranes du RE.

## Types de stress cellulaires étudiés

### Stress réticulaire

Les effets biologiques des ondes EMs ont pour l'instant été classiquement évalués à travers l'expression des HSPs. En effet, la surexpression chronique des HSPs est bien connue pour favoriser l'apparition des cancers en empêchant l'autodestruction (apoptose) des cellules endommagées. Les HSPs sont essentiellement impliquées dans les stress cytosoliques.

Nous proposons d'étendre l'étude à d'autres protéines de stress, impliquées notamment dans le stress du réticulum endoplasmique (RE). Par définition, le stress réticulaire correspond à la réponse génétique globale due à la présence de protéines mal conformées dans le RE. Les protéines de stress du RE, dont le pouvoir anti-apoptotique est puissant, sont induites par des stress environnementaux variés et sont impliquées dans de nombreuses maladies (par exemple dans les maladies neurodégénératives). Le RE est un compartiment cellulaire qui a développé un système spécifique de réponse aux agressions physico-chimiques et il est vulnérable à plusieurs perturbations : flux ionique, modifications de membrane, variations de pression locale

en oxygène ou déséquilibres redox; autant de paramètres potentiellement influencés par les OMs. De plus, l'implication de ce système dans la mort neuronale associée aux maladies neurodégénératives a récemment été démontrée [189]. Outre leur importance physiopathologique, les protéines de stress RE sont donc des cibles cellulaires pertinentes.

## Effets synergétiques

Il est possible que les ondes EMs en elles-mêmes aient peu d'effets spectaculaires sur les cellules. Cependant, elles pourraient inhiber ou amplifier les systèmes de réponse cellulaire dédiés aux autres stress environnementaux. Ainsi, nous proposons d'étudier les effets synergétiques potentiels entre OMs et stress cellulaire au niveau de l'homéostasie cellulaire.

## Signalisation cellulaire

Des études décrites dans la littérature ont montré que les ondes EMs peuvent influencer considérablement les caractéristiques d'activation de certains canaux calciques [58,60]. Les variations de concentration intracellulaire en calcium sont connues pour déclencher des cascades de phosphorylation de protéines. Par ailleurs, plusieurs études ont clairement démontrées que les ondes EMs de faible puissance peuvent stimuler la phosphorylation de certaines protéines [190,191]. Ainsi, nous proposons d'étudier l'influence des OMs sur les voies de signalisation cellulaire : *(i)* changement éventuel du statut global de phosphorylation dans la cellule, et *(ii)* activation transcriptionnelle des groupes de gènes cibles identifiés.

## Méthodologie

### Stress cellulaires

#### RT-PCR quantitative

Nous avons défini un groupe de gènes cibles potentiels reliés à différents compartiments cellulaires et à différents stress cellulaires, tels que le stress protéotoxique cytosolique, le stress réticulaire ou le stress oxydatif. Les variations d'expression génétique

seront mesurées par RT-PCR quantitative. Pour cela, différentes lignées cellulaires humaines (cellules gliales du cerveau ou cellules de l'épiderme) seront exposées aux OMs. Leurs ARNs seront ensuite purifiés. Enfin, les niveaux des ARNm des gènes candidats seront comparés aux niveaux de gènes témoins invariables.

### **Puces à ADN**

Pour comparer les profils d'expression des ARNs des cellules exposées et des cellules contrôles à plus grande échelle, nous proposons d'utiliser la technologie des puces à ADN (analyse simultanée de plusieurs centaines de gènes). Ces derniers peuvent être choisis en fonction de leur lien avec les stress environnementaux, l'homéostasie cellulaire, le cycle cellulaire ou l'apoptose.

Cette approche permet d'effectuer un criblage très large et donc augmente la probabilité d'identifier de nouveaux gènes cibles sensibles aux OMs. La sélection des gènes candidats sera effectuée après une étude bibliographique stricte et une recherche bio-informatique dans les banques de gènes. De nombreux gènes contrôles invariants seront également sélectionnés afin d'introduire des standards internes qui permettront une analyse statistique fiable des résultats.

### **Validation des résultats**

Les gènes candidats ayant démontré une expression différentielle claire seront étudiés par RT-PCR quantitative pour confirmation. Le niveau en protéines de certains d'entre eux sera également examiné par Western-blot. Les résultats obtenus seront analysés de façon à mettre en évidence des groupes de gènes qui s'expriment de façon identique.

### **Effets synergétiques**

#### **RT-PCR quantitative**

Pour déterminer les effets synergétiques des OMs avec d'autres stress nous proposons d'étudier les effets des rayonnements dans des conditions expérimentales induisant des perturbations au niveau de l'homéostasie cellulaire (altération du flux calcique, stress oxydatif ou encore stress protéotoxique induits chimiquement par le

MG132 ou la thapsigargine). La sensibilité des cellules aux drogues sera mesurée par RT-PCR quantitative.

### **Puces à ADN**

Les puces à ADN seront de nouveau utilisées pour étudier l'effet synergique potentiel des OMs sur d'autres stress cellulaires. Ceci permettra de vérifier si ces rayonnements peuvent, à grande échelle, modifier la réponse génétique des cellules aux agressions environnementales. Dans ce cas, l'exposition chronique aux OMs serait, à long terme, un facteur favorisant l'apparition de pathologies liées à ces stress.

### **Validation des résultats**

Les résultats obtenus avec les puces à ADN peuvent être validés par des méthodes classiques de biologie moléculaire (RT-PCR quantitative et Western-blot).

## **Signalisation cellulaire**

### **Phosphorylation**

Pour cette étude, l'utilisation d'une approche protéomique est nécessaire. Les lignées cellulaires seront exposées ou non aux OMs suivant les paramètres déjà définis auparavant. Puis les protéines phosphorylées seront purifiées par chromatographie d'affinité en employant des anticorps spécifiques dirigés contre des acides aminés phosphorylés. Les protéines purifiées seront marquées par des fluorochromes spécifiques. Enfin, le phosphoprotéome sera analysé en employant la technique bi-dimensionnelle d'électrophorèse 2-D DIGE. La comparaison directe entre les échantillons issus de cellules exposées ou non, permettra de ne sélectionner pour identification que les spots qui présentent une phosphorylation différentielle.

### **Activation transcriptionnelle**

Si l'expression des gènes cibles identifiés par les puces à ADN est affectée par l'exposition aux OMs, c'est que leur promoteur contient des éléments de réponse sur lesquelles des facteurs de transcription activés peuvent s'y fixer. Il conviendra alors



d'identifier ces facteurs et leurs voies d'activation respectives. Ainsi, l'étude protéomique devrait permettre l'identification de kinases et de facteurs de transcription impliqués dans la réponse aux OMs. Cette analyse nous renseignera sur les voies de signalisation cellulaire qui peuvent être affectées par l'exposition aux OMs. Ces résultats, croisés avec ceux obtenus par les puces, devraient faciliter les analyses bio-informatiques pour la recherche d'éléments d'ADN responsables de la sensibilité aux OMs. Le rôle de ces éléments réponses dans la sensibilité aux OMs sera étudié par transfection.

## Différents paramètres d'exposition

Afin de comprendre les mécanismes physiques d'action des OMs au niveau cellulaires, il est important d'identifier les paramètres optimaux du rayonnement qui induisent des changements dans le fonctionnement des systèmes biologiques. De tels changements doivent être déterminés premièrement par les actions ou les interactions "informationnelles" car les intensités de champ étudiées se situent au-dessous de seuil thermique. Nous proposons deux approches complémentaires d'optimisation des paramètres d'exposition pour le but d'atteindre une réponse cellulaire maximale.

## Mesure spectroscopiques pour des solutions biologiques

Cette direction consiste en la conception des systèmes de mesure spectroscopiques pour des solutions biologiques dans la bande V (50-75 GHz). Les données disponibles dans la littérature pour les propriétés diélectriques des solutions biologiques et des différents tissus biologiques ne sont disponibles que jusqu'à 20 GHz. Les spectres d'absorption des solutions biologiques telles que les solutions d'ADN, d'ARN, glucides, lipides, acides aminés, *etc.* permettront de sélectionner les fréquences les plus perturbatrices pour les molécules et les cellules biologiques. En outre, les valeurs de permittivité et de conductivité diélectrique peuvent être déduites à partir de telles mesures, ce qui contribuera au développement des modèles quantitatifs des interactions bioélectromagnétiques au niveau cellulaire pour les fréquences autour de 60 GHz.

Fréquence, GHz	Groupe moléculaire
59,0081	CH
59,2610	SO <sub>2</sub>
59,4115	NO <sub>2</sub>
59,6150	H <sub>2</sub> O
59,6265	SO
59,8463	HCCCCH
60,0473	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CCH
60,5302	OCS
60,8616	HCN

**Tab. 9.1:** Données de spectroscopie micro-onde pour certaines groupes moléculaires dans la bande 59-61 GHz.

## Résonances moléculaires

Les données de spectroscopie micro-ondes sur les spectres rotationnels des molécules diatomiques, triatomiques et hydrocarboniques suggèrent plusieurs résonances des groupes moléculaires au voisinage de 60 GHz (voir section I.1.2.2 Données de spectroscopie micro-ondes). Nous avons choisi des fréquences qui correspondent aux groupes moléculaires proches de ceux rencontrés dans les biomolécules et qui ont des résonances dans la bande 59-61 GHz (tableau 9.1). Le système d'exposition utilisé dans ce travail de thèse possède une stabilité de fréquence nécessaire pour réaliser les expériences. Par conséquent, ces fréquences doivent être étudiées en détail afin de déterminer les classes et les groupes moléculaires les plus sensibles aux OMs autour de 60 GHz.

Les données des spectres rotationnels sont disponibles pour toute la bande millimétrique et elles peuvent être adoptées pour les études bioélectromagnétique. A notre connaissance, une telle approche n'a pas encore été explorée pour les études ondes-vivant.



# Bibliographie

- [1] TEC&DOC, editor. *Mobile phones. Biological effects. Proc. of Int. Symp.*, Paris, 19-20 Apr. 2000.
- [2] P. Stavrolakis. *Biological effects of electromagnetic fields*. Springer - Verlag, Berlin, 2003.
- [3] J. C. Lin. Is there a brain tumor risk from cell phone use? *IEEE Microwave Magazine*, 6(3) :28–30, Sept. 2005.
- [4] T. T. Chau and K. R. Foster. Should children use mobile phones? *IEEE Microwave Magazine*, 6(4) :18–30, 2005.
- [5] J. D. Weiland and M. S. Humayun. A biomimetic retinal stimulating array. *IEEE Eng. Med. Biol.*, 24(5) :14–21, Sept.- Oct. 2005.
- [6] K. D. Wise. Silicon microsystems for neurosciences and neural prostheses. *IEEE Eng. Med. Biol.*, 24(5) :22–29, Sept. - Oct. 2005.
- [7] P. Xiao-Feng and Z. Anying. Mechanism of thermally biological effects of the millimeter waves and its properties. *Int. J. Infrar. Millim. Waves*, 24 :1899–1912, Nov. 2003.
- [8] A. Rosen, M. A. Stuchly, and A. Vander Vorst. Applications of RF/microwaves in medicine. *Int. J. Infrar. Millim. Waves*, 50 :963–974, Mar. 2002.
- [9] K. Saito, H. Yoshimura, K. Ito, Y. Aoyagi, and H. Horita. Clinical trials of interstitial microwave hyperthermia by use of coaxial-slot antenna with two slots. *IEEE Trans. Microwave Theory Tech.*, 52 :1987–1991, Aug. 2004.
- [10] A. Coptý, M. Golosovsky, D. Davidov, and A. Frenkel. Localized heating of biological media using a 1-W microwave near-field probe. *IEEE Trans. Microwave Theory Tech.*, 52 :1957–1963, Aug. 2004.
- [11] B. Rajeev. Battling cancer : the latest on microwave hyperthermia. *IEEE Microwave Magazine*, 6(3) :32–34, Sept. 2005.
- [12] K. Saito, Y. Hayashi, H. Yoshimura, and K. Ito. Heating characteristics of array applicator composed of two coaxial-slot antennas for microwave coagulation therapy. *IEEE Trans. Microwave Theory Tech.*, 48 :1800–1806, Nov. 2000.
- [13] R. D. Nevels, G. D. Arndt, G. W. Raffoul, J. R. Carl, and A. Pacifico. Microwave catheter design. *IEEE Trans. Biomed Eng.*, 45 :885–890, Jul. 1998.
- [14] D. A. Nelson, M. T. Nelson, T. J. Walters, and P. A. Mason. Skin heating effects of millimeter-wave irradiation – thermal modeling results. *IEEE Trans. Microwave Theory Tech.*, 48 :2111–2120, Nov. 2000.
- [15] C. Blackman, J. Elder, C. Weil, S. Benane, D. Eichinger, and D. House. Induction of calcium-ion efflux from brain tissue by radio-frequency radiation : effects of modulation frequency and field strength. *Radio Sci.*, 11 :93–98, Nov.-Dec. 1979.

- [16] W. Grundler. Intensity- and frequency-dependent effects of microwaves on cell growth rates. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 27 :361–365, Jun. 1992.
- [17] A. G. Pakhomov, H. K. Prol, S. P. Mathur, Y. Akiel, and C. B. Campbell. Role of field intensity in the biological effectiveness of millimeter waves at a resonance frequency. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 43 :27–33, Jan. 1997.
- [18] I. Y. Belyaev, V. S. Shcheglov, E. D. Alipov, and V. D. Ushakov. Nonthermal effects of extremely high-frequency microwaves on chromatin conformation in cells *in vitro* – dependence on physical, physiological, and genetic factors. *IEEE Trans. Microwave Theory Tech.*, 48 :2172–2179, Nov. 2000.
- [19] ICNIRP. Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic, and electromagnetic fields (up to 300 GHz). *Health Physics*, 74(4) :494–522, 1998.
- [20] N. Deparis, A. Bendjabballah, A. Boe, M. Fryziel, C. Loyez, L. Clavier, N. Rolland, and P.-A. Rolland. Transposition of a baseband UWB signal at 60 GHz for high data rate indoor WLAN. *IEEE Microwave and Wireless Components Letters*, 15(10) :609–611, Oct. 2005.
- [21] N. Moraitis and P. Constantinou. Indoor channel measurements and characterization at 60 GHz for wireless local area network applications. *IEEE Trans. Antennas Propagation*, 52(12) :3180–3189, Dec. 2004.
- [22] P. Mahonen, T. Saarinen, and Z. Shelby. Wireless internet over LMDS : architecture and experimental implementation. *IEEE Communications Magazine*, 39(5) :126–132, May 2001.
- [23] E. Giannetti, M. Luise, and R. Reggiannini. Mobile and personal communications in the 60 GHz band : A survey. *IEEE Commun. Mag.*, 10 :207–243, 1999.
- [24] M. Klein and A. J. Gasiewski. The sensitivity of millimeter and sub-millimeter frequencies to atmospheric temperature and water vapor variations. *J. Geophys. Res.-Atmospheres*, 13 :17481–17511, Jul. 2000.
- [25] M. Marcus and B. Pattan. Millimeter wave propagation. *Microwave Mag.*, 6(2) :54–63, 2005.
- [26] H. Liebe, P. Rosenkranz, and G. Hufford. New laboratory measurements and parameters. *J. Quant. Spectr. and Radiative Transfer*, 48(5/6) :629–643, 1992.
- [27] <http://physics.nist.gov/PhysRefData/MolSpec/>.
- [28] P. Smulders. Exploiting the 60 GHz band for local wireless multimedia access : Prospects and future directions. *IEEE Commun. Mag.*, 40(1) :3180–3189, Jan. 2002.
- [29] A. Siamarou. Wideband propagation measurements and channel implications for indoor broadband wireless local area networks at the 60 GHz band. *Wireless Personal Communications*, 27 :89–98, 2003.
- [30] C. H. Doan, S. Emami, D. A. Sobel, A. M. Niknejad, and R. W. Brodersen. Design considerations for 60 GHz CMOS radios. *IEEE Communications Magazine*, 42(12) :132–140, Dec. 2004.
- [31] <http://www.ieee802.org/15/>.
- [32] R. Fisher. 60 GHz WPAN standardization activity within IEEE 802.15. *Millimeter-wave wireless journal*, 1(1) :6–8, Feb. 2005.
- [33] K. H. Schoenbach, R. Nuccitelli, and S. J. Beebe. Extreme voltage could be a surprisingly delicate tool in the fight against cancer. *IEEE Spectrum*, 6(3) :28–30, Aug. 2006.

- [34] A. G. Pakhomov, , Y. Akyel, O. N. Pakhomova, B. E. Stuck, and M. R. Murphy. Current state and implications of research on biological effects of millimeter waves : A review of the literature. *Bioelectromagnetics*, 19(7) :393–413, Jan. 1998.
- [35] K. R. Foster. Thermal and nonthermal mechanisms of interaction of radio-frequency energy with biological systems. *IEEE Trans. on Plasma Science*, 28(1) :15–23, Feb. 2000.
- [36] E. Adair, K. Mylacraine, and B. Cobb. Human exposure to 2450 MHz CW energy at levels outside the IEEE C 95.1 standard does not increase core temperature. *Bioelectromagnetics*, 22(6) :429–439, 2001.
- [37] E. Adair, K. Mylacraine, and B. Cobb. Partial-body exposure of human volunteers to 2450 MHz pulsed or CW fields provokes similar thermoregulatory responses. *Bioelectromagnetics*, 22(4) :246–259, 2001.
- [38] E. R. Adair and D. R. Black. Biophysical limits on athermal effects of RF and microwave radiation. *Bioelectromagnetics*, 24(S6) :S17–S38, Nov. 2003.
- [39] D. Blick, E. Adair, W. Hurt, C. Sherry, T. Walters, and J. Merritt. Thresholds of microwave-evoked warmth sensations in human skin. *Bioelectromagnetics*, 18(6) :403–409, 1998.
- [40] T. Walters, D. Blick, L. Johnson, E. Adair, and K. Foster. Heating and pain sensation produced in human skin by millimeter waves : comparison to a simple thermal model. *Health Physics*, 78(3) :259–267, 2000.
- [41] S. Alekseev, A. Radzievsky, M. Ziskin, and R. Fox. Effect of blood flow on heating of human skin by millimeter waves. In *25<sup>th</sup> Annual Meeting of the BEMS*, page 275, Maui, USA, 22-27 Jun. 2003.
- [42] S. I. Alekseev, A. A. Radzievsky, I. Szabo, and M. C. Ziskin. Local heating of human skin by millimeter waves : Effect of blood flow. *Bioelectromagnetics*, 26(6) :489 – 501, 2005.
- [43] S. I. Alekseev and M. C. Ziskin. Local heating of human skin by millimeter waves : A kinetics study. *Bioelectromagnetics*, 24(8) :571–581, 2003.
- [44] P. Riu, K. Foster, E. Blick, and E. Adair. A thermal model for human thresholds of microwave-evoked warmth sensations. *Bioelectromagnetics*, 18(8) :578–583, 1997.
- [45] K. R. Foster. Electrimagnetic field effects and mechanisms. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine*, 15(4) :50–56, 1996.
- [46] L. J. Challis. Mechanisms for interaction between RF fields and biological tissue. *Bioelectromagnetics*, 26(S7) :S98–S107, 2005.
- [47] B. G. Yemets and M. B. Yemets. About the mechanism of influence of low-intense millimeter waves on biological membranes. In *IEEE MSMW'2001 Symp. Proc.*, volume 2, pages 946–948, Kharkov, Ukraine, 4-9 Jun. 2001.
- [48] F. S. Barnes and C. J. Hu. Model for some nonthermal effects of radio and microwave fields on biological membranes. *IEEE Trans. Microwave Theory Tech.*, 25(9) :742–746, 1977.
- [49] C. A. Cain. A theoretical basis for microwave and RF field effects on excitable cellular membranes. *IEEE Trans. Microwave Theory Tech.*, 28(2) :142–147, Feb. 1980.
- [50] N. S. Stoykov, J. W. Jerome, L. C. Pierce, and A. Teflove. Computational modeling evidence of nonthermal electromagnetic interaction mechanism with living cells : microwave nonlinearity in the cellular sodium ion channel. *IEEE Trans. Microwave Theory Tech.*, 52(8) :2040–2045, Aug. 2004.

- [51] T. Kotnik and D. Miklavcic. Theoretical evaluation of the distributed power dissipation in biological cells exposed to electric fields. *Bioelectromagnetics*, 21(5) :385–394, Aug. 2000.
- [52] D. Wachner, M. Simeonova, and J. Gimsa. Estimating the subcellular absorption of electric field energy : equations for an ellipsoidal single shell model. *Bioelectrochemistry*, 56(1/2) :211–213, May 2000.
- [53] M. Simeonova, D. Wachner, and J. Gimsa. Cellular absorption of electric field energy : influence of molecular properties of the cytoplasm. *Bioelectrochemistry*, 56(1/2) :215–218, May 2000.
- [54] W. F. Pickard and E. G. Moros. Energy deposition processes in biological tissue : Nonthermal biohazards seem unlikely in the ultra-high frequency range. *Bioelectromagnetics*, 22(2) :97–105, 2001.
- [55] R. K. Adair. Biophysical limits on athermal effects of RF and microwave radiation. *Bioelectromagnetics*, 24(1) :39–48, Jan. 2003.
- [56] G. Dubost and A. Bellossi. Artificial and natural near-infrared radiation effects upon the cell motility. Biological hypothese. In *4th International Workshop on Biological Effects of Electromagnetic Fields*, pages 720–729, Crete, Greece, 16-20 Oct. 2006.
- [57] E. E. Feseko and A. Ya. Gluvstein. Changes in the state of water induced by radio-frequency electromagnetic fields. *FEBS Letters*, 367 :53–55, 1995.
- [58] E. E. Feseko, A. Ya. Gluvstein, V. N. Kazachenko, and N.K. Chemeris. Preliminary microwave irradiation of water solutions changes their channel modifying activity. *FEBS Letters*, 366 :49–52, 1995.
- [59] K.M. Joshi and P.V. Kamat. Effect of magnetic field on the physical properties of water. *J. Ind. Chem. Soc.*, 43 :620–622, 1966.
- [60] V. I. Geletyuk, V. N. Kazachenko, N. K. Chemeris, and E. E. Fesenko. Dual effects of microwaves on single  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels in cultured kidney cells Vero. *FEBS Letters*, 359 :85–88, 1995.
- [61] F. Schönborn, K. Pokovi, A.M. Wobus, and N. Kuster. Design, optimization, realization, and analysis of an *in vitro* system for the exposure of embryonic stem cells at 1.71 GHz. *Bioelectromagnetics*, 21(5) :372–384, 2000.
- [62] T. Iyama, H. Ebara, Y. Tarusawa, S. Uebayshi, M. Sekijama, T. Nojima, and J. Miakoshi. Large scale *in vitro* experimental system for 2 GHz exposure. *Bioelectromagnetics*, 25(8) :599–606, Dec. 2004.
- [63] M. Burkhardt, K. Pokovi, M. Gnos, T. Schmid, and N. Kuster. Numerical and experimental dosimetry of Petri dish exposure setups. *Bioelectromagnetics*, 17(6) :483–493, 1996.
- [64] L. Laval, P. H. Leveque, and B. Jecko. A new *in vitro* exposure device for the mobile frequency of 900 MHz. *Bioelectromagnetics*, 21(4) :255–263, May 2000.
- [65] G. B. Gajda, J. P. McNamee, A. Thansandote, S. Boonpanyarak, E. Lemay, and P. V Bellier. Cylindrical waveguide applicator for *in vitro* exposure of cell culture samples to 1.9 GHz radiofrequency fields. *Bioelectromagnetics*, 23(8) :592–598, Dec. 2002.
- [66] S. Wolke, U. Neibig, R. Elsner, F. Gollnick, and R. Meyer. Calcium homeostasis of isolated heart muscle cells exposed to pulsed high-frequency electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics*, 17(2) :144–153, 1996.

- [67] Q. Chen, Q. Zeng, D. Lu, and H. Chiang. Millimeter wave exposure reverses TPA suppression of gap junction intercellular communications in HaCaT human keratinocytes. *Bioelectromagnetics*, 25(1) :2–4, Jan. 2004.
- [68] V. G. Safronova, A. G. Gabdoulkhakova, and B. F. Santalov. Immunomodulating action of low intensity millimeter waves on primed neutrophils. *Bioelectromagnetics*, 23(8) :599–606, Dec. 2002.
- [69] B. G. Yemets. About the potential reasons of “resonance” action of micro-wave radiation upon biological objects. *Vesnik KDU, Biophysicheski vesnik*, 410(1) :133–137, 1998. (en russe).
- [70] I. Szabo, M. A. Rojavin, T. J. Rojers, and M. C. Ziskin. Reaction of keratinocytes to *in vitro* millimeter wave exposure. *Bioelectromagnetics*, 22(5) :358–364, Jul. 2001.
- [71] I. Szabo, M. R. Manning, A. A. Radzievsky, M. A. Wetzel, T. J. Rojers, and M. C. Ziskin. Low power millimeter wave irradiation exerts no harmful effect on human keratinocytes *in vitro*. *Bioelectromagnetics*, 24(3) :165–173, Apr. 2003.
- [72] G. Yu, E. A. Coln, K. H. Schoenbach, M. Gellerman, P. Fox, L. Rec, S. J. Beebe, and S. Liu. A study on biological effects of low-intensity millimeter waves. *IEEE Trans. Plasma Science*, 30(4) :1489–1496, Aug. 2002.
- [73] Y. A. Kim, B. S. Fomenko, T. A. Agafonova, and I. G. Akoev. Effects of microwave radiation (340 and 900 MHz) on different structural levels of erythrocyte membranes. *Bioelectromagnetics*, 6(3) :305–312, 1985.
- [74] D. Rotkovska, A. Bartonickova, and J. Kautska. Effects of microwaves on membranes of hematopoietic cellos in their structural and functional organization. *Bioelectromagnetics*, 14(1) :79–85, 1993.
- [75] V. M. Ioffe, S. A. Khanina, E. S. Zhilkova, Ye. A. Domanov, A. F. Lyakhovsky, and G. P. Gorbenko. Effect of radio frequency electromagnetic field on the structural state of model membranes. In *IEEE MSMW’04 Symp. Proc.*, volume 2, pages 830–831, Kharkov, Ukraine, 21-26 Jun. 2004.
- [76] M. H. Gaber, N. Abd El Halim, and W. A. Khalil. Effect of microwave radiation on the biophysical properties of liposomes. *Bioelectromagnetics*, 26(3) :194–200, 2005.
- [77] I. Y. Petrov. Membrane potential changes in a plant cell induced by low intensity MM-microwave. In *IEEE Int. Symp. Electromagnetic compatibility*, pages 562–566, Washington, DC, USA, Aug. 1990.
- [78] S.I. Alekseev and M. C. Ziskin. Millimeter microwave effect on ion transport across lipid bilayer membranes. *Bioelectromagnetics*, 16(2) :124–131, 1995.
- [79] G. Dovbeshko, L. B. Berezinski, R. Bilevicz, K. Woznjak, R. Kubacki, and N. Gridina. The experimental evidence of the effect of microwaves upon biological system : data of spectroscopy, holography and Langmuir-Blodgett technique. In *IEEE MSMW’2001 Symp. Proc.*, volume 2, pages 914–916, Kharkov, Ukraine, 4-9 Jun. 2001.
- [80] I. Szabo, J. Kappelmayer, S. I. Alekseev, and M. C. Ziskin. Millimeter wave induced reversible externalization of phosphatidylserine molecules in cells exposed *in vitro*. *Bioelectromagnetics*, 27(3) :233 – 244, 2006.
- [81] A. Goltsov. Electromagnetic-field-induced oscillations of the lipid domain structures in the mixed membranes. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 48 :311–316, 1999.
- [82] H. Lin, L. Han, M. Blank, M. Head, and R. Goodman. Magnetic field activation of protein-DNA binding. *Journal of Cellular Biochemistry*, 70(3) :297–303, 1998.



- [83] H. Lin, M. Blank, and R. Goodman. A magnetic field-responsive domain in the human HSP 70 promoter. *Journal of Cellular Biochemistry*, 75(1) :170–176, 1999.
- [84] J. Zhou, G. Yao, J. Zhang, and Z. Chang. CREB DNA binding activation by a 50 Hz magnetic field in HL60 cells is dependent on extra- and intracellular Ca(2+) but not PKA, PKC, ERK, or p38 MAPK. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 296(4) :1013–1018, 2002.
- [85] T. Olivares-Banuelos, L. Navarro, A. Gonzalez, and R. Drucker-Colin. Differentiation of chromaffin cells elicited by ELF MF modifies gene expression pattern. *Cell Biol. Int.*, 28(4) :273–279, 2004.
- [86] M. Blank and R. Goodman. Electromagnetic fields may act directly on DNA. *Journal Cell Biochem.*, 75(3) :369–374, 1999.
- [87] M. Blank and R. Goodman. Electromagnetic initiation of transcription at specific DNA sites. *Journal Cell Biochem.*, 81(4) :689–692, 2001.
- [88] J. M. Aran, J. C. Bolomey, P. Buser, René de Seze, M. Hours, I. Lagroye, and B. Veyret. Rapport à l'AFSSSE : Téléphonie mobile et santé, 2003.
- [89] C. Jolly and R. I. Morimoto. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J. Natl. Cancer. Inst.*, 92 :1564–1572, 2000.
- [90] P. French, R. Penny, J. Laurence, and D. McKenzie. Mobile phones, heat shock proteins and cancer. *Differentiation*, 67(4/5) :93–97, 2001.
- [91] S. Cleary, G. Cao, L. Liu, E. Pasty, and S. Keith. Stress proteins are not undused in mammalian cells exposed to radiofrequency or microwave radiation. *Bioelectromagnetics*, 18(7) :165–173, 1997.
- [92] S. Kwee, P. Raskmark, and P. Velizarov. Changes in cellular proteins due to environmental non-ionising radiation. I. Heat-shock proteins. *Electro- and Magnetobiology*, 20 :141–152, 2001.
- [93] D. Leszczynski, S. Joenväärä, J. Reivinen, and R. Kuokka. Non-thermal activation of HSP 27/p38MAPK stress pathway by mobile phone radiation in human endothelial cells molecular mechanism for cancer- and blood-brain barrier-related effects. *Differentiation*, 70 :120–129, 2002.
- [94] F. Tian, T. Nakahara, K. Wake, M. Taki, and J. Miyakoshi. Exposure to 2.45 GHz electromagnetic fields induces HSP 70 at a high SAR of more than 20 W/kg but not at 5 W/kg in human glioma MO 54 cells. *Int. J. Radiation. Biol.*, 78(5) :433–440, 2002.
- [95] R. Nylund and D. Leszczynski. Proteomics analysis of human endothelial cell line EA.hy926 after exposure to GSM 900 radiation. *Proteomics*, 4 :1359–1365, 2004.
- [96] S. Sanchez. Evaluation des effets biologiques des radiofréquences de la téléphonie mobile sur la peau : exemple du GSM-900. Mémoire, PIOM, France.
- [97] F. Poullétier de Gannes, S. Sanchez, I. Lagroye, E. Haro, P. Dulou, B. Billaudeland, and B. Veyret. *In vitro* and *in vivo* studies of the effects of GSM-900 microwave exposure on heat shock proteins in the brain and skin. In *25<sup>th</sup> Annual Meeting of the BEMS*, page 18, Maui, USA, 22-27 Jun. 2003.
- [98] D. Pomerai, C. Daniells, H. David, J. Allan, I. Duce, M. Mutwakil, M. Thomas, P. Sewell, J. Tattersall, D. Jones, and P. Candido. Non-thermal heat-shock response to microwave. *Nature*, 405 :417–418, 2000.
- [99] D. Pomerai, A. Dawe, L. Djerbib, J. Allan, G. Brunt, and C. Daniells. Growth and maturation of the nematode *Caenorhabditis elegans* following exposure to weak microwave fields. *Enzyme and Microbial Technology*, 30 :73–79, 2002.

- [100] A. S. Dawe, B. Smith, D. W. Thomas, S. Greedy, N. Vasic, A. Gregory, B. Loader, and D. I. de Pomerai. A small temperature rise may contribute towards the apparent induction by microwaves of heat-shock gene expression in the nematode *Caenorhabditis Elegans*. *Bioelectromagnetics*, 27(2) :88–97, 2006.
- [101] R. Sypniewska, J. Kalns, P. Mason, N. Millenbaugh, L. Soza, W. Lawrence, R. Blystone, J. Eggers, and J. Kiel. Exposure to 35 GHz millimeter wave energy (MMW) causes changes in expression of heat-shock protein 27 (HSP-27). In *25<sup>th</sup> Annual Meeting of the BEMS*, page 184, Maui, USA, 22-27 Jun. 2003.
- [102] M. Bes, M. Hotte, J.M. Edeline, and T. Jay. Absence d’expression des protéines de choc thermique HSP 70 dans plusieurs régions du néocortex chez le rat après une exposition tête-seule aux ondes 900 MHz GSM. Effets biologiques et sanitaires des rayonnements non ionisants, SFRP, Bordeaux, France, Apr. 2002.
- [103] I. Y. Belyaev, C. B. Koch, O. Terenius, K. Roxström-Lindquist, L. O. G. Malmgren, W. H. Sommer, L. G. Salford, and B. R. R. Persson. Exposure of rat brain to 915 MHz GSM microwaves induces changes in gene expression but not double stranded DNA breaks or effects on chromatin conformation. *Bioelectromagnetics*, 27(4) :295 – 306, Mar. 2006.
- [104] M. Meltz. Radiofrequency exposure and mammalian cell toxicity, genotoxicity, and transformation. *Bioelectromagnetics*, 24(S6) :S196–S213, Nov. 2003.
- [105] A. Bellossi, G. Dubost, J. Moulinoux, M. Himdi, M. Ruelloux, and C. Rocher. Biological effects of millimeter-wave irradiation on mice – preliminary results. *IEEE Trans. Microwave Theory Tech.*, 48(11) :2104–2110, Nov. 2000.
- [106] A. Bellossi, M. Ruelloux, C. Rocher, J. Moulinoux, G. Dubost, and M. Himdi. Préventions des effets biologiques des ondes millimétriques aux fréquences 28, 38, 60, 77 et 100 GHz. *RSTD*, 50 :45–55, 2000.
- [107] M. Logani, T. Ha, A. Agelan, M. Ziskin, and J. Richard. Millimeter-wave irradiation has no cyclophosphamide-induced leukopenia in experimental animals. In *22<sup>nd</sup> Annual Meeting of the BEMS*, page 95, München, Germany, 9-16 Jun. 2000.
- [108] Vijayalaxmi, M. K. Logani, A. Bhanushali, M. C. Ziskin, and T. J. Prihoda. Micro-nuclei in peripheral blood and bone marrow cells of mice exposed to 42 GHz electromagnetic millimeter waves. *Radiat. Res.*, 161(3) :341–345, 2004.
- [109] A. Beneduci, G. Chidichimo, R. De Rose, L. Filippelli, S. V. Straface, and S. Venuta. Frequency and irradiation time-dependant antiproliferative effect of low-power millimeter waves on RPMI 7932 human melanoma cell line. *Anticancer Res.*, 25(2A) :1023–1028, Mar.-Apr. 2005.
- [110] M. K. Logani, I. Szabo, V. Makar, A. Bhanushali, S. Alekseev, and M. C. Ziskin. Effect of millimeter wave irradiation on tumor metastasis. *Bioelectromagnetics*, 27(4) :258–264, 2006.
- [111] S. I. Alekseev and M. S. Ziskin. Effects of millimeter waves on ionic currents of lymnaea neurons. *Bioelectromagnetics*, 20(1) :24–33, Mar. 1999.
- [112] H. Kues, S. D’Anna, R. Osiander, W. Green, and J. Monahan. Absence of ocular effects after either single or repeated exposure to 10 mW/cm<sup>2</sup> from 60 GHz CW source. *Bioelectromagnetics*, 20(8) :463–473, 1999.
- [113] S. Lu, S. Mathur, B. Stuck, H. Zwick, J. D’Andrea, M. Ziriaux, J. Merritt, G. Luty, D. McLeod, and M. Johnson. Effects of high peak power microwaves on the retina of the Rhesus monkey. *Bioelectromagnetics*, 21(6) :439–454, 2000.

- [114] U. Gulaev and E. Godic. L'homme de point de vue de radiophysique. *Radiotechnique*, 8, 1991. (en russe).
- [115] E. Adair, B. Cobb, K. Myracraïne, and S. Kelleher. Human exposure at two radio frequencies (450 and 2450 MHz) : similarities and differences in physiological response. *Bioelectromagnetics*, S4 :12–20, 1999.
- [116] K. Ryan, J. D'Andrea, J. Jauchem, and P. Mason. Radiofrequency radiation of millimeter wave length : potential occupational safety issues relating to surface heating. *Health Physics*, 78(2) :170–181, 2000.
- [117] T. Kotnik and D. Miklavcic. Analytical description of transmembrane voltage induced by electric fields on spheroidal cells. *Biophys Journal*, 79(2) :670–679, 2000.
- [118] I. Lagroye, E. Haro, F. Poulettier de Gannes, R. Anane, P. Dulou, B. Billaudel, S. Sanchez, M. Taxile, M. Le Diraison, and B. Veyret. Effets biologiques des ondes radiofréquences GSM-900 : études cellulaires et animales réalisées au laboratoire PIOM. In *17<sup>ème</sup> Coll. Int. "Optique Hertzienne et Diélectriques"*, Calais, 2003.
- [119] S. Sanchez, I. Lagroye, F. Poulettier de Gannes, E. Haro, B. Billaudel, P. Dulou, and B. Veyret. Apoptosis in human skin cells after exposure to GSM-900. In *25<sup>th</sup> Annual Meeting of the BEMS*, page 347, Maui, USA, 22-27 Jun. 2003.
- [120] H. Masuda, S. Sanchez, P. Dulou, E. Haro, R. Anane, B. Billaudel, and B. Veyret. Effects of 12-week chronic exposure to GSM-900 or -1800 microwaves on the skin of "hairless" rats. In *25<sup>th</sup> Annual Meeting of the BEMS*, page 178, Maui, USA, 22-27 Jun. 2003.
- [121] H. Masuda, S. Sanchez, P. Dulou, E. Haro, R. Anane, B. Billaudel, and B. Veyret. Effects of 2-hour acute exposure to GSM-900 or -1800 microwaves on the skin of "hairless" rats. In *25<sup>th</sup> Annual Meeting of the BEMS*, page 115, Maui, USA, 22-27 Jun. 2003.
- [122] I. Lagroye, F. Bersani, B. Billaudel, M. Capri, J. Cziz, P. Dulou, K. Guan, E. Haro, S. Joenvâara, R. Kuokka, N. Kuster, D. Leszczynski, A. Meister, F. Poulettier de Gannes, J. Reivinen, J. Schuderer, and B. Veyret. Effects of ELF- and RF-EMF on the apoptotic process. In *25<sup>th</sup> Annual Meeting of the BEMS*, page 134, Maui, USA, 22-27 Jun. 2003.
- [123] A. N. Bacherikov and V. N. Derkach. Method of EHF-therapy at treatment of endogene mental diseases. In *IEEE MSMW'98 Symp. Proc.*, volume 2, pages 774–775, Kharkov, Ukraine, 15-17 Sept. 1998.
- [124] O. V. Pilipenko, A. G. Yatsunenko, V. A. Grinyuk, and P. I. Zabolotny. At-to-date approaches to the development of therapeutic and diagnostic systems using millimetre-wave electromagnetic radiation. In *IEEE MSMW'04 Symp. Proc.*, volume 2, pages 946–948, Kharkov, Ukraine, 21-26 Jun. 2004.
- [125] N. N. Lebedeva and O. V. Betskii. Application of low intensity millimeter waves in medicine. In *17<sup>th</sup> Annual Meeting of the BEMS*, page 14, Boston, 1995.
- [126] V. N. Skresanov, O. G. Nechaev, and A. I. Shubny. A simple noise generation method for millimetre-wave therapy apparatus. In *IEEE MSMW'2001 Symp. Proc.*, volume 2, pages 917–919, Kharkov, Ukraine, 4-9 Jun. 2001.
- [127] V. N. Skresanov, I. V. Kas, E. A. Okhryamkina, V. P. Palamarchuk, and L. D. Tondy. Complex treatment cardiovascular disease with a low power millimeter-wave radiation. In *IEEE MSMW'2001 Symp. Proc.*, volume 2, pages 939–940, Kharkov, Ukraine, 4-9 Jun. 2001.

- [128] M. K. Logani, A. Bhanushali, A. Anga, A. Majmudar, I. Szabo, and M. C. Ziskin. Combined millimeter wave and cyclophosphamide therapy of an experimental murine melanoma. *Bioelectromagnetics*, 25(7) :516–523, 2004.
- [129] S. D. Pletnev. The use of millimeter band electromagnetic waves in clinical oncology. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 28(3/4) :573–587, 2000.
- [130] M. A. Rojavin and M. C. Ziskin. Medical applications of millimetre waves. *QJM*, 941 :57–66, 1998.
- [131] A. G. Pakhomov and M. R. Murphy. Low-intensity millimeter waves as a novel therapeutic modality. *IEEE Trans. Plasma Sci.*, 28(1) :34–40, 2000.
- [132] E. Shechter. *Biochimie et biophysique des membranes. Aspects structuraux et fonctionnels*. Masson, Paris, 1997.
- [133] <http://www.noblenet.org/merrimack/guides/BI115.htm>.
- [134] S. Singer and G. Nicolson. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175 :720–731, 1972.
- [135] J. Callen. *Biologie cellulaire. Des molécules aux organismes*. DUNOD, Paris, 1999.
- [136] B. Lodish, B. Berk, and D. Matsudaira. *Biologie moléculaire de la cellule*. De Boeck Université, 1997.
- [137] M. Ponec, A. Weerheim, J. Kempenaar, A. M. Mommaas, and D. H. Nugteren. Lipid composition of cultured human keratinocytes in relation to their differentiation. *J. Lipid Res.*, 29(7) :949–961, 1988.
- [138] F. Zhou and K. Schulten. Molecular dynamics study of a membrane-water interface. *J. Phys. Chem.*, 99 :2194–2207, 1999.
- [139] S. Diaz, F. Amalfa, A. Biondi de Lopez, and E. Disalvo. Effect of water polarized at the carbonyl groups of phosphatidylcholines on the dipole potential of lipid bilayers. *Langmuir*, 15 :5179–5182, 1999.
- [140] L. Becucci, M. Moncelli, R. Herrero, and R. Guidelli. Dipole potentials of monolayers of phosphatidylcholine, phosphatidylserine, and phosphatidic acid on mercury. *Langmuir*, 16 :7694–7700, 2000.
- [141] R. Clarke. Effect of lipid structure on the dipole potential of phosphatidylcholine bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1327 :269–278, 1997.
- [142] R. Clarke. The dipole potential of phospholipid membranes and methods for its detection. *Advances in Colloid and Interface Science*, 89-90 :263–281, 2001.
- [143] R. Demel, W. Geurtsvankessel, R. Zwaal, and B. Roelofsen and L. Vandeenen. Relation between various phospholipase actions on human red-cell membranes and interfacial phospholipid pressure in monolayers. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes*, 406 :97–107, 1975.
- [144] M. Petty. *Langmuir-Blodgett films : An introduction*. Cambridge University Press, Cambridge, 1996.
- [145] A. Barraud. Langmuir-blodgett films. In *Proc. of 5th Int. Conf. on Langmuir-Blodgett Films*, pages 320–323, France, 1991.
- [146] H. Brockman. Lipid monolayers : why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions? *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 9(4) :438–443, Aug. 1999.
- [147] G. L. Gaines. *Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces*. Wiley, Interscience publishers, 1966.

- [148] V. Vié. Étude des microdomaines membranaires par microscopie de champ proche. Thèse de doctorat, Université Montpellier II, 1999.
- [149] G. Binnig, C. Qute, and C. Gerber. Atomic force microscope. *Physical Review Letters*, 56 :930–933, 1986.
- [150] G. Godi. Conception et optimisation d’antennes lentilles multicouches et de dômes diélectriques - applications en ondes millimétriques. Thèse de doctorat (Chapitre 2), IETR, Université de Rennes 1, Rennes, France, 24 Nov. 2006.
- [151] C. Balanis. *Antenna theory Analysis and Design*. 2nd Ed., Wiley, 1997.
- [152] R. Johnson and H. Jasik. *Antenna engineering handbook*. MacGraw-Hill, New York, USA, 1984.
- [153] P. Combes. *Micro-ondes.2.Circuits passifs, propagation, antennes*. Dunod, Paris, 1997.
- [154] C. A. Helm, H. Mohwald, K. Kjaer, and J. Als-Nielsen. Phospholipid monolayers between fluid and solid states. *Biophys. J.*, 52 :381–390, 1987.
- [155] R. Welti and M. Glaser. Lipid domains in model and biological membranes. *Biophys. J.*, 73 :121–137, 1994.
- [156] Y. F. Dufrene and G. U. Lee. Advances in the characterization of supported lipid films with the atomic force microscope. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1509 :14–41, 2000.
- [157] C. Steinem, A. Janshoff and M. S. Vollmer, and M. R. Ghadiri. Reversible photoisomerization of self-organized cylindrical peptide assemblies at air-water and solid interfaces. *Langmuir*, 15 :3956–3964, 1999.
- [158] M. Zhadobov, R. Sauleau, D. Thouroude, V. Vie, and I. Orlov. Do millimeter waves alter biomembranes non-thermally? In *European Conference on Antennas and Propagation (EuCAP 2006)*, Nice, France, 6-10 Nov. 2006. accepté.
- [159] M. Zhadobov, R. Sauleau, V. Vie, and D. Thouroude. Biophysical modifications in structural state of artificial membranes under millimeter wave exposure at 60 GHz. In *28th Annual Meeting of BEMS*, pages 539–541, Cancun, Mexico, Jun. 2006.
- [160] M. Zhadobov, V. Vié, R. Sauleau, M. Himdi, F. Artzner, and D. Thouroude. Effets non-thermiques du rayonnement millimétrique sur les membranes biologiques artificielles. In *Journées Nationales Microondes (JNM)*, Nantes, France, May 2005.
- [161] M. Edidin. Lipid microdomains in cell surface membranes. *Current Opinion in Structural Biology*, 7 :528–532, 1997.
- [162] M. Zhadobov, R. Sauleau, V. Vié, M. Himdi, L. Le Coq, and D. Thouroude. Interactions between 60 GHz millimeter waves and artificial biological membranes : Dependence on radiation parameters. *IEEE Trans. Microwave Theory Tech.*, 54(6) :2534–2542, 2006.
- [163] M. Zhadobov, V. Vié, R. Sauleau, M. Himdi, F. Artzner, and D. Thouroude. Interactions bioélectromagnétiques entre les ondes millimétriques et membranes biologiques artificielles. In *MajecSTIC 2005*, pages 363–368, Rennes, France, Nov. 2005.
- [164] M. Zhadobov, V. Vié, R. Sauleau, M. Himdi, L. Le Coq, F. Artzner, I. Orlov, and D. Thouroude. Interactions between millimeter waves and artificial biological membranes. In *Antenna Technology and Applied Electromagnetics (ANTEM) 2005*, pages 148–150, Saint-Malo, France, Jun. 2005.

- [165] M. Zhadobov, V. Vié, and R. Sauleau D. Thouroude. Effect of low-power millimeter wave radiation on model biological membranes : data of AFM and Langmuir-Blodgett techniques. In *Poster session of International School of Bioelectromagnetics*, Erice, Italy, Oct. 3-9 2005.
- [166] J. M. Aran, A. Azoulay, P. Buser, F. Couturier, J.-C. Debouzy, I. Lagroye, M. Terre, P. Vecchia, and B. Veyret. Rapport à l'AFSSE sur téléphonie mobile et santé, 2005.
- [167] B. Caughey and P. T. Lansbury. Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration : separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci.*, 26 :267–298, 2003.
- [168] A. S. Sreedhar and P. Csermely. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis : new strategies in tumor therapy : a comprehensive review. *Pharmacol Ther.*, 101(3) :227–257, 2004.
- [169] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J. D. Watson. *Biologie moléculaire de la cellule*. Médecine-Sciences, Flammarion, troisième édition, 1997.
- [170] J. D. Watson and F. H. Crick. Molecular structure of nucleic acids. A structure for desoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171 :737–738, 1953.
- [171] [http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human\\_Genome/education/images.shtml](http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/education/images.shtml) (The Human Genome Project Image Gallery).
- [172] <http://www.geneticengineering.org/chemis/Chemis-NucleicAcid/ARN.htm> (Les Acides RiboNucléiques).
- [173] <http://www.hybridmedicalanimation.com/>.
- [174] D. T. Humphreys, J. A. Carver, S. B. Easterbrook-Smith, and M. R. Wilson. Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins. *J. Biol. Chem.*, 274 :6875 – 6881, 1999.
- [175] D. Michel, G. Chatelain, S. North, and G. Brun. Stress-induced transcription of the clusterin/apoJ gene. *Biochem. Journal*, 328(1) :45–50, 1997.
- [176] I. Viard, P. Wehrli, L. Jornot, R. Bullani, J. Vechietti, J. Schifferli, and L. French J. Tschopp. Clusterin gene expression mediates resistance to apoptotic cell death induced by heat shock and oxidative stress. *Journal of Investigative Dermatology*, 112(3) :290–296, 1999.
- [177] C. Yang, K. Leskov, K. Hosley-Eberlein, T. Criswell, J. Pink, T. Kinsella, and D. Boothman. Nuclear clusterin/XIP8, an x-ray-induced Ku70-binding protein that signals cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(11) :5907–5912, 2000.
- [178] P. Le Goff, Y. Le Drean, C. Le Peron, C. Le Jossic-Corcos, A. Ainouche, and D. Michel. Intracellular trafficking of heat shock factor 2. *Experimental Cell Research*, 294(2) :480–493, 2004.
- [179] H. Miki, M. Ohmori, E. Hirakawa, and W. Winters. Effects of environmental level magnetic field exposures on transcription of CMV immediate early promoter DNA in a cell-free in vitro transcription system. *Bioelectromagnetics*, 20(8) :519–521, 1999.
- [180] Y. Le Drean, N. Mincheneau, P. Le Goff, and D. Michel. Potentiation of glucocorticoid receptor transcriptional activity by sumoylation. *Endocrinology*, 143(9) :3482–3489, 2002.
- [181] T. Sourisseau, C. Desbois, L. Debure, D. D. Bowtell, A. C. Cato, J. Schneikert, E. Moysé, and D. Michel. Alteration of the stability of Bag-1 protein in the control of olfactory neuronal apoptosis. *J Cell Sci*, 114(7) :1409–1416, 2001.

- [182] F. Loison, P. Nizard, T. Sourisseau, P. Le Goff, L. Debure, Y. Le Drean, and D. Michel. A ubiquitin-based assay for the cytosolic uptake of protein transduction domains. *Mol. Ther.*, 11(2) :205–214, 2005.
- [183] H. Lin, M. Head, M. Blank, L. Han, M. Jin, and R. Goodman. Myc-mediated transactivation of HSP 70 expression following exposure to magnetic fields. *J Cell Biochem*, 69(2) :181–188, 1998.
- [184] M. Zhadobov, R. Sauleau, L. Le Coq, D. Thouroude, I. Orlov, and D. Michel and Y. Le Drean. 60 GHz electromagnetic fields do not activate stress-sensitive gene expression. In *Antenna Technology and Applied Electromagnetics (ANTEM) 2005*, pages 150–152, Saint-Malo, France, Jun. 2005.
- [185] M. Zhadobov, R. Sauleau, D. Thouroude, D. Michel, and Y. Le Drean. Millimeter waves do not activate gene transcription of AP1, Clusterin and HSE. In *Poster session of International School of Bioelectromagnetics*, Erice, Italy, Oct. 3-9 2005.
- [186] M. Zhadobov, L. Debure, R. Sauleau, L. Le Coq, D. Thouroude, D. Michel, and Y. Le Drean. Millimeter wave radiation at 60 GHz do not modify stress-sensitive gene expression of chaperon proteins. *Bioelectromagnetics*. (accepté).
- [187] M. Zhadobov, R. Sauleau, D. Thouroude, D. Michel, and Y. Le Drean. Exposures at a frequency of WLAN 4-G do not alter gene expression of chaperone proteins. In *28th Annual Meeting of BEMS*, pages 307–308, Cancun, Mexico, Jun. 2006.
- [188] V. M. Brovkovich, N. B. Kurilo, and V. L. Barishpol'ts. Action of millimeter-range electromagnetic radiation on the Ca pump of sarcoplasmic reticulum. *Radiobiologia*, 31(2) :268–271, 1991.
- [189] D. J. DeGracia and H. L. Montie. Cerebral ischemia and the unfolded protein response. *J Neurochem*, 91(1) :1–8, 2004.
- [190] F. M. Uckun, T. Kurosaki, J. Jin, X. Jun and A. Morgan, M. Takata, J. Bolen, and R. Luben. Exposure of B-lineage lymphoid cells to low energy electromagnetic fields stimulates Lyn kinase. *J Biol Chem*, 270(46) :27666–27670, 1995.
- [191] M. Jin, M. Blank, and R. Goodman. ERK1/2 phosphorylation, induced by electromagnetic fields, diminishes during neoplastic transformation. *J Cell Biochem.*, 78(3) :371–379, 2000.

# Acronymes & Abréviations

<b>ADN</b> – Acide Désoxyribonucléique	Telecommunication
<b>AFM</b> – Atomic Force Microscopy	<b>IEEE</b> – Institute of Electrical and Electronics Engineers
<b>AP-1</b> – Activator Protein 1	<b>IL</b> – Interleukine
<b>ARN</b> – Acide Ribonucléique	<b>ICNIRP</b> – International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection
<b>ARNnh</b> – ARN nucléaires hétérogènes	<b>IR</b> – Infrarouge
<b>ARNm</b> – ARN messenger	<b>LC</b> – Liquide Condensé
<b>ARNr</b> – ARN ribosomique	<b>LE</b> – Liquide Expansé
<b>ARNt</b> – ARN de transfert	<b>LMDS</b> – Local Multipoint Distribution Service
<b>ATP</b> – Adénosine-Triphosphate	<b>LST</b> – Light Scattering Technique
<b>BFs</b> – Basses Fréquences	<b>Luc</b> – Luciferase
<b>BWO</b> – Backward-Wave Oscillator	<b>NK</b> – Natural Killer
<b><math>\beta</math>-gal</b> – $\beta$ -galactosidase	<b>OMs</b> – Ondes Millimétriques
<b>CHO</b> – Chinese Hamster Ovary	<b>PGE</b> – Prostaglandine
<b>CLU</b> – Clusterine	<b>RT-PCR</b> – Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
<b>CMV</b> – CytomégaloVirus	<b>S</b> – Solide
<b>CW</b> – Continuous Wave	<b>SAR</b> – Specific Absorption Rate
<b>DCS</b> – Digital Communication System	<b>TF</b> – Transcription factor
<b>DMSO</b> – Dimethyl Sulfoxyde	<b>TNF</b> – Tumor Necrosis Factor
<b>DOPC</b> – DiOléoyl PhosphatidylCholine	<b>TOM</b> – Thérapie aux Ondes Millimétriques
<b>DPPC</b> – DiPalmitoyl PhosphatidylCholine	<b>UMTS</b> – Universal Mobile Telecommunication System
<b>DPPG</b> – DiPalmitoyl PhosphatidylGlycérol	<b>UV</b> – Ultraviolet
<b>ELISA</b> – Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay	<b>WiFi</b> – Wireless Fidelity
<b>EM</b> – Electromagnétique	<b>WiMAX</b> – Worldwide Interoperability for Microwave Access
<b>ER</b> – Epidermes Reconstitués	<b>WLAN</b> – Wireless Local Area Network
<b>FDTD</b> – Finite-Difference Time-Domain	<b>WPAN</b> – Wireless Personal Area Network
<b>G</b> – Gaz	
<b>GSM</b> – Global System Mobile	
<b>HSE</b> – Heat Shock Element	
<b>HSF</b> – Heat Shock Factor	
<b>HSP</b> – Heat Shock Protein	
<b>IMT</b> – International Mobile	





# Désignations

$f$ – fréquence	$M_x(x, y)$ – courant magnétique équivalent sur l'ouverture rectangulaire
$\lambda$ – longueur d'onde	$\rho_1$ – distances entre le centre de phase du cornet et le centre de son ouverture dans le plan H
$\lambda_0$ – longueur d'onde dans le vide	$\rho_2$ – distances entre le centre de phase du cornet et le centre de son ouverture dans le plan E
$l$ – longueur	$\delta$ – fraction de la puissance totale incidente sur la membrane
$w$ – largeur	$P$ – puissance moyenne totale rayonnée en espace libre par l'antenne
$t$ – épaisseur	$\Phi_m$ – densité de puissance moyenne au niveau de l'échantillon
$h$ – profondeur	$\Phi_M$ – densité de puissance maximale au niveau de l'échantillon
$m$ – masse	$S$ – aire de l'échantillon
$F$ – force totale exercée sur la lame plongée dans l'eau	$G$ – gain isotropique maximal de l'antenne
$\rho_l$ – densité du liquide	$L_e$ et $L_h$ – facteurs qui tiennent compte de la réduction du gain due à la variation de phase
$\gamma$ – tension superficielle de l'eau	$\epsilon_0$ – permittivité du vide ( $8,854187 \times 10^{-12} F/m$ )
$\gamma'$ – tension superficielle d'une couche monomoléculaire	$\mu_0$ – perméabilité du vide ( $4\pi \times 10^{-7} H/m$ )
$\theta_0$ – angle de contact lame-liquide	$ \vec{E} $ – amplitude du champ électrique
$g$ – accélération de la gravité	$ \vec{H} $ – amplitude du champ magnétique
$\pi$ – pression superficielle	$F_g$ – facteur tenant compte de la réduction de gain due à la variation de phase sur l'ouverture
$\Delta\pi$ – variation de pression superficielle	$f_g$ – facteur de gain qui dépend de la loi d'éclairement de l'ouverture circulaire
$\Delta F$ – force mesurée expérimentalement par la microbalance de Wilhelmy	$t_{exp}$ – durée d'exposition
$P_{AS}$ – puissance mesurée par l'analyseur de spectre	$v$ – vitesse de changement de la pression superficielle
$P_{AR}$ – puissance de sortie d'analyseur de réseau	
$a$ – longueur d'ouverture de l'antenne cornet pyramidal (plan E)	
$b$ – largeur d'ouverture de l'antenne cornet pyramidal (plan H)	
$D$ – diamètre d'ouverture de l'antenne cornet conique	
$R$ – distance de l'antenne	
$r$ – distance entre l'antenne et l'échantillon	
$k$ – constante de propagation	
$J_y(x, y)$ – courant électrique équivalent sur l'ouverture rectangulaire	



# Liste des publications

## Publications dans des revues internationales

1. **M. Zhadobov**, R. Sauleau, V. Vié, M. Himdi, L. Le Coq, and D. Thouroude.  
Interactions between 60 GHz millimeter waves and artificial biological membranes :  
Dependence on radiation parameters.  
*IEEE Trans. Microwave Theory Tech.*, 54(6) : 2534–2542, 2006.
2. **M. Zhadobov**, L. Debure, R. Sauleau, L. Le Coq, D. Thouroude, D. Michel, and Y.  
Le Dréan.  
Millimeter wave radiation at 60 GHz do not modify stress-sensitive gene expression of  
chaperon proteins.  
*Bioelectromagnetics*. (On line, early view)

## Publications dans les travaux des congrès internationaux à comité de lecture

3. **M. Zhadobov**, R. Sauleau, D. Thouroude, V. Vie, and I. Orlov.  
Do millimeter waves alter biomembranes non-thermally ?  
*European Conference on Antennas and Propagation (EuCAP 2006)*, Nice, France, 6-  
10 Nov. 2006.
4. **M. Zhadobov**, R. Sauleau, V. Vie, and D. Thouroude.  
Biophysical modifications in structural state of artificial membranes under millimeter  
wave exposure at 60 GHz.  
*28th Annual Meeting of BEMS*, pp. 539–541, Cancun, Mexico, Jun. 2006.
5. **M. Zhadobov**, R. Sauleau, D. Thouroude, D. Michel, and Y. Le Drean.  
Exposures at a frequency of WLAN 4-G do not alter gene expression of chaperone  
proteins.  
*28th Annual Meeting of BEMS*, pp. 307–308, Cancun, Mexico, Jun. 2006.  
(*Diplôme pour le meilleur papier scientifique, 3ème place*)
6. **M. Zhadobov**, V. Vié, R. Sauleau, M. Himdi, L. Le Coq, F. Artzner, I. Orlov, and  
D. Thouroude.  
Interactions between millimeter waves and artificial biological membranes.

*Antenna Technology and Applied Electromagnetics (ANTEM) 2005*, pp. 148–150, Saint-Malo, France, Jun. 2005.

7. **M. Zhadobov**, R. Sauleau, L. Le Coq, D. Thouroude, I. Orlov, and D. Michel and Y. Le Drean.  
60 GHz electromagnetic fields do not activate stress-sensitive gene expression.  
*Antenna Technology and Applied Electromagnetics (ANTEM) 2005*, pp. 150–152, Saint-Malo, France, Jun. 2005.

### Communications dans des symposiums internationaux

8. **M. Zhadobov**, V. Vié, R. Sauleau, and D. Thouroude.  
Effect of low-power millimeter wave radiation on model biological membranes : data of AFM and Langmuir-Blodgett techniques.  
*Poster session of 2<sup>nd</sup> Course of International School of Bioelectromagnetics*, Erice, Italy, Oct. 3-9, 2005.  
(*Diplôme pour la meilleure présentation poster*)
9. **M. Zhadobov**, R. Sauleau, D. Thouroude, D. Michel, and Y. Le Drean.  
Millimeter waves do not activate gene transcription of AP1, Clusterin and HSE.  
*Poster session of 2<sup>nd</sup> Course of International School of Bioelectromagnetics*, Erice, Italy, Oct. 3-9, 2005.
10. **M. Zhadobov**, R. Sauleau, and D. Thouroude.  
Biophysical mechanisms of action of millimeter waves at the level of biological membranes.  
*Poster session of 3<sup>rd</sup> Course of International School of Bioelectromagnetics*, Erice, Italy, Nov. 19-25, 2006.

### Communications orales dans des congrès nationaux à comité de lecture

11. **M. Zhadobov**, V. Vié, R. Sauleau, M. Himdi, F. Artzner, and D. Thouroude.  
Effets non-thermiques du rayonnement millimétrique sur les membranes biologiques artificielles.  
*Journées Nationales Microondes (JNM)*, Nantes, France, mai 2005.
12. **M. Zhadobov**, V. Vié, R. Sauleau, M. Himdi, F. Artzner, D. Thouroude.  
Interactions bioélectromagnétiques entre les ondes millimétriques et membranes biologiques artificielles.  
*MajecSTIC 2005*, Rennes, France, pp. 363-368, nov. 2005.