HAL
open science

Contribution à l'étude du stress cellulaire potentiellement induit par les ondes millimétriques

Christophe Nicolas Nicolaz

To cite this version:

Christophe Nicolas Nicolaz. Contribution à l'étude du stress cellulaire potentiellement induit par les ondes millimétriques. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Rennes 1, 2009. Français. NNT : . tel-00450309

HAL Id: tel-00450309

https://theses.hal.science/tel-00450309

Submitted on 26 Jan 2010

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.

N° d'ordre : 3974 **ANNÉE 2009**

THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Traitement du signal et télécommunications

Ecole doctorale Matisse

présentée par

Christophe NICOLAS NICOLAZ

préparée dans les unités de recherche 6164 IETR et 6026 ICM
Institut d'Électronique et de Télécommunications de Rennes
Interactions Cellulaires et Moléculaires
Université de Rennes 1

Contribution à l'étude du stress cellulaire potentiellement induit par les ondes millimétriques

Thèse soutenue à Rennes le 26 novembre 2009

devant le jury composé de :

Alain VIAN
Professeur. Université d'Angers / *rapporteur*

Isabelle LAGROYE
Maître de conférences. IMS Bordeaux / *rapporteur*

Jean-Claude DEBOUZY
Professeur. CRSSA La Tronche / *examinateur*

Daniel THOUROUDE
Professeur. Université Rennes 1 / *directeur de thèse*

Denis MICHEL
Professeur. Université de Rennes 1 / *co-directeur de thèse*

Yves Le DRÉAN
Maître de conférences. Université de Rennes 1 / *co-directeur de thèse*

N° d'ordre : 3974 **ANNÉE 2009**

THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Traitement du signal et télécommunications

Ecole doctorale Matisse

présentée par

Christophe NICOLAS NICOLAZ

préparée dans les unités de recherche 6164 IETR et 6026 ICM
Institut d'Électronique et de Télécommunications de Rennes
Interactions Cellulaires et Moléculaires
Université de Rennes 1

Contribution à l'étude du stress cellulaire potentiellement induit par les ondes millimétriques

Thèse soutenue à Rennes le 26 novembre 2009

devant le jury composé de :

Alain VIAN
Professeur. Université d'Angers / *rapporteur*

Isabelle LAGROYE
Maître de conférences. IMS Bordeaux / *rapporteur*

Jean-Claude DEBOUZY
Professeur. CRSSA La Tronche / *examinateur*

Daniel THOUROUDE
Professeur. Université Rennes 1 / *directeur de thèse*

Denis MICHEL
Professeur. Université de Rennes 1 / *co-directeur de thèse*

Yves Le DRÉAN
Maître de conférences. Université de Rennes 1 / *co-directeur de thèse*

Remerciements

Je tiens avant tout à exprimer ma profonde reconnaissance aux membres du jury ayant accepté d'évaluer ce travail de thèse. Je remercie donc vivement le Professeur Alain Vian et le Docteur Isabelle Lagroye qui ont accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Je remercie également le Professeur Jean-Claude Debouzy pour avoir accepté le rôle d'examinateur.

Je n'aurais pas participé à cette longue et passionnante aventure sans Messieurs les Professeurs Denis Michel et Daniel Thouroude. Vous avez accepté de me faire confiance, de me confier ce projet, je vous en suis très reconnaissant.

Je tiens aussi particulièrement à remercier Yves Le Dréan et Ronan Sauleau. Yves, tu as fait preuve d'une patience exemplaire et tu t'es rendu disponible dès que le besoin se faisait sentir. Tu as aussi compris que chacun apprenait à un rythme différent et, en ce sens tu m'as permis de prendre en main ce travail et faire que je m'y épanouisse totalement. Ce fut un vrai plaisir de travailler avec toi. Ronan, tu t'es toujours montré disponible quand il le fallait. Tu as toujours suivi avec attention le projet et tu as su m'aider dans les moments difficiles.

Je tiens aussi à remercier chaleureusement Maxim Zhadobov. Dès le départ et malgré ton travail en parallèle, tu t'es impliqué dans ce projet. Même lorsque tu étais à Philadelphie je continuais à bénéficier de tes conseils. Je pense aussi à toutes les fins de journée où nous discutions dans ton bureau des résultats acquis, du travail restant à faire. Un grand merci pour ta patience, en particulier lorsque je venais te poser des questions sur l'électronique.

Ces remerciements sont aussi valables pour Fabienne Desmots et Catherine Le Quément. Fabienne, tu as été là au début de cette thèse, tu m'as permis de découvrir le laboratoire, les outils, et des nouvelles techniques de travail. Tu as su faire preuve de patience avec moi. J'ai beaucoup apprécié ces moments communs de travail mais aussi de discussions sur tout et n'importe quoi. Dommage que notre collaboration se soit terminée l'année dernière. Merci aussi à toi Catherine. Dès ton arrivée dans ce projet, tu m'as épaulé, apporté une approche et des compétences (nombreuses) complémentaires. Ce fut très agréable de travailler avec toi. Bon vent pour la suite.

Grand merci aussi à Sylvain Lecomte, collègue de bureau, de paillasse, de cantine, de tennis (grâce aux pannes de réseau ou de courant), ainsi que dans les moments difficiles. Au cours de cette thèse, nous avons pris conscience de toutes nos compétences cachées (déménageurs, experts en machines en pannes, en négociation avec des commerciaux, gardiens d'appareils de PCRq, agents d'entretien du sol (un vendredi soir), interviewers, monteurs de vidéos, etc…). Tu as contribué à la bonne ambiance au sein de ce laboratoire.

Je tiens aussi à remercier chaleureusement les membres présents de l'équipe HiP, Pascale Le Goff, Catherine Martin mais aussi ceux passés, Philippe Nizard et Laure Debure dont j'ai honteusement squatté le bureau (et l'ordinateur) en tout début de thèse. Sachez tous que votre accueil, dès le départ m'a permis de me sentir à l'aise. Cette ambiance de travail me manquera.

Au sein de l'IETR, j'aimerais aussi remercier particulièrement Laurent Le Coq, qui en l'absence de Maxim, a su se rendre disponible pour tous les montages techniques et pour

toutes les mesures nécessaires à ce travail. Merci aussi à Mme Lemoine pour son accueil et son aide au cours de cette thèse.

Au sein de l'UMR6026, j'aimerais aussi remercier les membres des différentes équipes avec lesquelles j'ai pu interagir. Il va être très difficile de tous vous citer (sans oublier personne en tout cas), et pour ne point susciter de polémique, je vais tenter une approche diplomatique.

Merci aux membres des équipes Sparte, Red, Nao. Ce fut un vrai plaisir de cohabiter avec vous tous (il y en a eu des déménagements !), de travailler, et d'échanger (scientifiquement ou non) avec vous.

Un merci à Karen Mouriec (ex-Nao) pour sa gentillesse, sa bonne humeur, ses crêpes, ses discussions sur tout et n'importe quoi. Bon vent à toi.

Un énorme merci aussi à « Chef » salle de culture, j'ai nommé Monsieur Frédéric Percevault. Tu as été disponible tout au long de ce travail et j'ai pu bénéficier de tes conseils (en particulier en travaillant avec les nouvelles lignées). En plus, tu mettais une sacrée ambiance en salle de culture et c'était (pour moi en tout cas) un vrai plaisir d'aller y travailler. Ne change rien.

J'ai eu l'occasion de solliciter de nombreuses personnes au cours de ce travail, je pense en particulier à Armelle Ansart qui a consacré beaucoup de temps à m'aider à prendre en main le logiciel de statistique. Tu as ensuite (beaucoup) pris sur ton temps pour m'aider à dompter mes données. Merci pour ta patience, tes conseils, tes coups de mains.

Une thèse est une grande aventure personnelle mais il ne faut pas oublier le soutien indéfectible de ses proches qui vivent eux aussi cette aventure par procuration. Anaïs, tu as toujours su être l'oreille attentive de ma vie quotidienne de doctorant. Présente dans les bons moments tout comme dans les moments difficiles, tu m'as toujours soutenu et j'ai pu bénéficier de tes points de vue. Merci beaucoup.

Je tiens enfin à remercier les membres de ma famille qui ont suivi mes pérégrinations, à savoir mes parents, ma grand-mère, mon frère, ainsi que tous mes amis proches et ma belle famille.

Résumé

Pour faire face à la saturation du spectre électromagnétique en matière de communications sans fil, les groupes industriels dominant le marché développent de nouveaux appareils de télécommunications sans fil, qui offriront un débit très élevé combiné à une meilleure confidentialité. Ces systèmes fonctionneront dans des bandes de fréquences autour de 60 GHz, naturellement absentes du spectre électromagnétique environnemental, ce qui suscite des interrogations légitimes quant à leur innocuité.

Ce travail de thèse porte sur l'analyse des effets potentiels des rayonnements millimétriques sur la physiologie de la cellule. Nous avons tout d'abord étudié les effets des ondes millimétriques par le biais d'études *in vitro*, en utilisant différents modèles de cultures de cellules humaines, exposés à différents temps et à différentes fréquences, notamment celles correspondantes à des résonances de groupement moléculaires, comprises entre 57 et 64 GHz. Nous avons étudié l'impact potentiel de ces ondes sur un organite cellulaire, le réticulum endoplasmique, connu pour être sensible à son environnement et impliqué dans de nombreuses pathologies. Nous avons ensuite étudié les effets de la variation de puissance sur des processus physiologiques concernant le réticulum endoplasmique mais aussi sur la synthèse de protéines spécifiques liées à la réponse inflammatoire. Enfin, par la technique de puces à ADN, nous avons réalisé une approche transcriptomique à haut débit, portant sur l'ensemble du génome, afin de déterminer l'existence de gènes cibles sensibles à des expositions aux ondes millimétriques. Plusieurs gènes candidats ont été sélectionnés et serviront de biomarqueurs.

Abstract

To cope with the saturation of the electromagnetic spectrum, telecommunications world leaders are developing new wireless devices, which provide very high data-rate transmission combined with greater confidentiality. These systems will operate in a frequency band around 60 GHz, naturally absent from environmental electromagnetic spectrum, which raises legitimate question about their safety.

This work focuses on the analysis of the potential effects of millimeter radiations on the cell physiology. We first studied the effects of millimeter waves through in vitro studies using different models of human cell cultures exposed during various times to different frequencies, including those corresponding to molecular groups resonances, ranging between 57 and 64 GHz. We studied the potential impact of these electromagnetic waves on a cellular organelle, the endoplasmic reticulum, known to be sensitive to its environment and involved in many diseases. We then studied the effects of power variation on physiological processes on the endoplasmic reticulum but also on the synthesis of specific proteins related to the inflammatory response. Finally, by using a DNA microarrays method, we performed a high throughput transcriptomic approach, covering the entire genome, to determine potential millimetre waves target genes. Several candidate genes were selected.

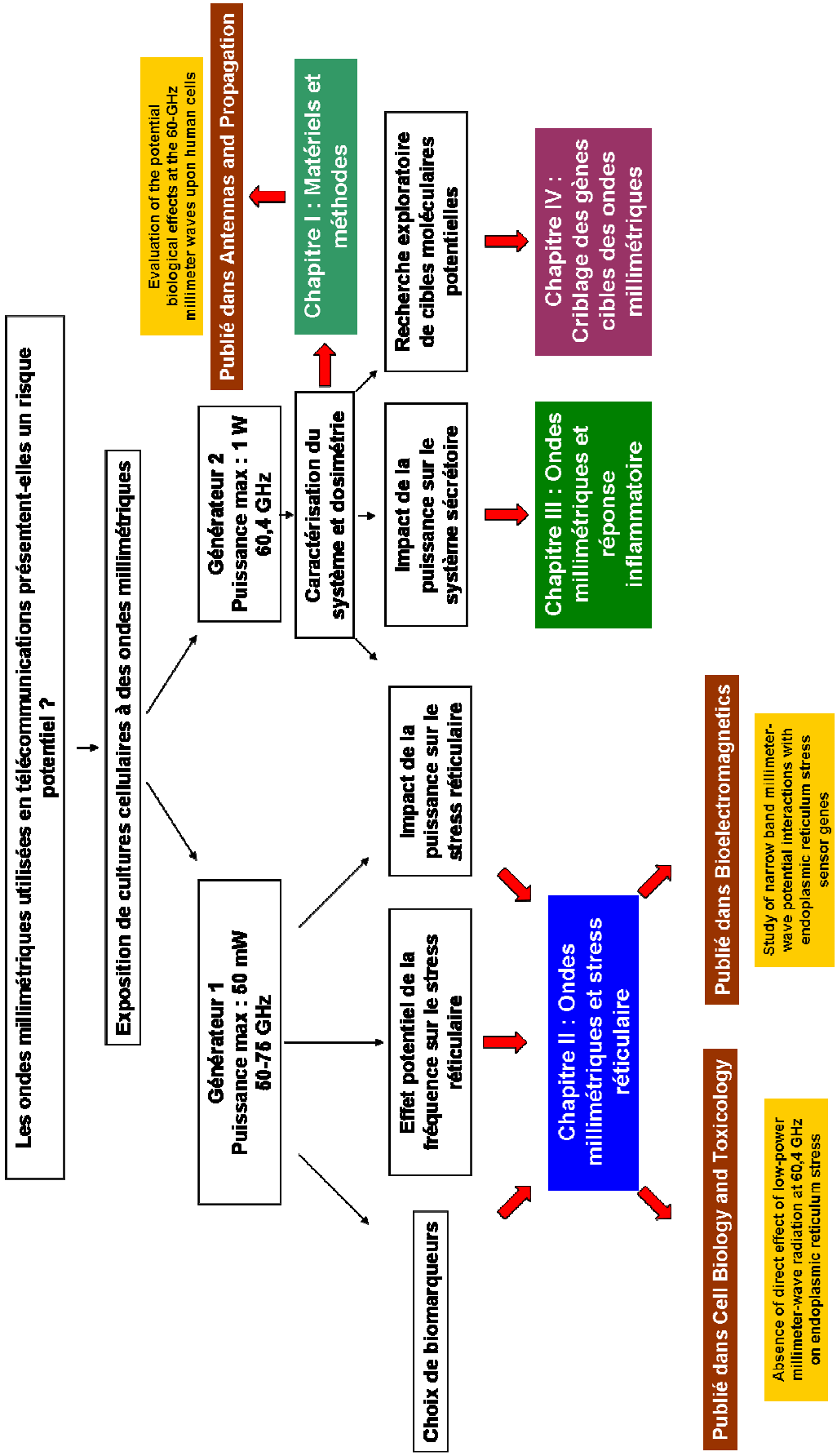
Les ondes millimétriques utilisées en télécommunications présentent-elles un risque potentiel ?
Exposition de cultures cellulaires à des ondes millimétriques
Générateur 1
Puissance max : 50 mW
50-75 GHz
Générateur 2
Puissance max : 1 W
60,4 GHz
Choix de biomarqueurs
Effet potentiel de la fréquence sur le stress réticulaire
Impact de la puissance sur le stress réticulaire
Caractérisation du système et dosimétrie
Impact de la puissance sur le système sécrétoire
Recherche exploratoire de cibles moléculaires potentielles
Chapitre I : Matériels et méthodes
Chapitre II : Ondes millimétriques et stress réticulaire
Chapitre III : Ondes millimétriques et réponse inflammatoire
Chapitre IV : Criblage des gènes cibles des ondes millimétriques
Publié dans Antennas and Propagation
Evaluation of the potential biological effects at the 60-GHz millimeter waves upon human cells
Publié dans Cell Biology and Toxicology
Absence of direct effect of low-power millimeter-wave radiation at 60,4 GHz on endoplasmic reticulum stress
Publié dans Bioelectromagnetics
Study of narrow band millimeter-wave potential interactions with endoplasmic reticulum stress sensor genes

Table des matières

Avant propos **4**

Introduction générale **7**

Première partie : Interactions des ondes avec le vivant **8**

1.1 Les ondes électromagnétiques 8

A. Caractéristiques des ondes électromagnétiques 8

- Définition 8
- Le spectre électromagnétique 9
- Sources d'exposition aux champs électromagnétiques 10

B. Interactions des ondes avec le vivant 11

- Pénétration et propagation des ondes électromagnétiques dans les tissus biologiques 12
- Valeurs limites d'exposition 13
- Les effets biologiques des ondes : exemple de la téléphonie mobile 14

1.2 Les ondes millimétriques 20

A. Les différentes applications des ondes millimétriques 20

- Systèmes de télécommunications sans fil dans la bande 57-64 GHz 20
- Les systèmes de dispersion de la foule 21
- Technologie du régulateur de vitesse adaptatif 22
- Systèmes d'imagerie par détection d'ondes millimétriques 22
- Applications thérapeutiques des ondes MM 25

B. Les effets biologiques des ondes millimétriques 25

- Utilisation de modèles de peau et dosimétrie 28
- Les effets des ondes millimétriques utilisées en thérapie 30
- Cultures de cellules *in vitro* et exposition de biomolécules 36

1.3 Conclusion 39

Deuxième partie : Le stress du réticulum endoplasmique **41**

2.1 Définition 41

2.2 Description de la voie UPR 44

A. La voie PERK 45

B. La voie IRE1 48

C. La voie ATF6 52

2.3 Perception du stress réticulaire 53

2.4 Le yin et le yang de la voie UPR 55

2.5 Conclusion 61

Chapitre I : Matériels et méthodes 62

I.1 Matériels et méthodes 64

A. Culture cellulaire 64

- Cultures de lignées cellulaires humaines 64

B. Systèmes d'expositions 66

- Système d'exposition 1 (50-75 GHz, Pmax : 50 mW) 67
- Système d'exposition 2 (60,4 GHz, Pmax : 1 W) 68

C. Transfection cellulaire 71

D. Extraction des ARN, dosage et contrôle qualité 73

E. PCR en temps réel 73

F. Evaluation de la croissance/viabilité cellulaire 76

G. Statistiques 77

H. Détermination de gènes candidats par une approche puces à ADN 77

I.2 Article publié dans *Antennas and propagation* 80

Chapitre II : Ondes millimétriques et stress réticulaire 90

II.1 Etude du stress réticulaire potentiellement induit par les ondes MM de faible puissance (0,14 mW/cm²) 91

A. Article publié dans *Cell Biology and Toxicology* 93

B. Article publié dans *Bioelectromagnetics* 102

II.2 Étude du stress réticulaire dans des cellules de la peau 112

A. Introduction 112

B. Résultats 113

- Exposition des cellules HaCaT à deux densités de puissances 113
- Exposition de cellules HaCaT à différents temps à 1,15 mW/cm² 114
- Exposition de cellules A375 à différents temps à 1,15 mW/cm² 115

C. Effets combinatoires entre les ondes millimétriques et le stress réticulaire 117

- Effets combinatoires dans les cellules U-251 MG 117
- Effets combinatoires dans les cellules HaCaT 118

Chapitre III : Ondes millimétriques et réponse inflammatoire 121

III.1 Etude des gènes de l'inflammation 122

A. Résultats 124

- Exposition de cellules HaCaT à deux densités de puissance 124
- Exposition de cellules A375 à différents temps à 1,15 mW/cm² 129

B. Discussion 130

Chapitre IV : Criblage des gènes cibles des ondes millimétriques 132

IV.1 Criblage des gènes cibles des ondes millimétriques 133

A. Introduction 133

B. Résultats 137

- Contrôle qualité de l'expérimentation 137
- Analyse sans filtre de correction 138

- Analyse avec un filtre de correction 141
- Annotation fonctionnelle 146
- Choix des gènes pour validation par RT-PCR en temps réel 146

Discussion/Perspectives 165

Bibliographie 175

Annexes 189

Annexe I : Rappels sur les propriétés des ondes électromagnétiques 190

1. Propriétés physiques des ondes électromagnétiques 190
2. Micro-ondes et ondes millimétriques à l'interface entre l'air et les tissus biologiques 191

Annexe II : La cellule animale 194

1. Description générale 194
2. La membrane plasmique 195
3. Le réticulum endoplasmique 196

Annexe III : Organisation structurale de la peau 201

Annexe IV : Le système immunitaire 203

1. Origine des cellules du système immunitaire 203
2. Mécanismes de défenses vis-à-vis des infections 205
   - A. La réponse immunitaire innée 205
   - B. La réponse immunitaire adaptative (ou acquise) 206
     - Réponse humorale 207
     - Réponse immune cellulaire 207

Avant propos

Les avancées technologiques en électronique et télécommunications ont révolutionné nos vies quotidiennes. Celles-ci sont ainsi en plein essor depuis plus de 60 ans et, pour répondre à une demande (et attente) sociétale, les principaux groupes industriels doivent proposer le plus rapidement possible des solutions toujours plus innovantes. Pour faire face à l'actuelle saturation de la partie basse du spectre micro-ondes, les fabricants se décalent vers de nouvelles bandes de fréquences, notamment celles situées dans le domaine des ondes dites millimétriques (MM), comprises entre 30 et 300 GHz (qui possèdent une longueur d'onde dans le vide comprise entre 1 et 10 mm). Pour développer de nouveaux systèmes de télécommunications sans fil, la bande de fréquence autour de 60 GHz a été retenue. Outre la possibilité d'offrir des débits élevés, ces appareils permettront aussi aux utilisateurs de bénéficier d'une confidentialité importante en raison d'une forte atténuation de ces ondes dans l'atmosphère, liée à l'absorption résonante par l'oxygène moléculaire et une faible interférence avec les systèmes voisins. Ces appareils provoqueront cependant des expositions permanentes à des ondes dont les fréquences sont totalement absentes du spectre électromagnétique (EM) environnemental. Derrière la notion de progrès majeur se pose donc une question fondamentale : ces ondes peuvent-elles provoquer des effets biologiques et sont-elles totalement sans danger pour l'homme ?

Les expositions artificielles à des champs EM suscitent en effet de plus en plus d'inquiétude, essentiellement du point de vue sociétal. Dans nos sociétés modernes, nos organismes sont en permanence soumis à de nombreuses sources, une des principales étant constituée par l'exposition aux champs EM de basse fréquence (50 ou 60 Hz suivant les pays), retrouvés essentiellement dans les réseaux de distributions d'électricité, ou lors de l'utilisation quotidienne d'appareils électriques. De même, depuis le milieu du XXème siècle et l'essor des télécommunications sans fil, la population est aussi soumise aux radiofréquences (RF) émises par les émetteurs radiotélévisés (80 MHz à 800 MHz environ) et les téléphones portables (900 MHz ou 1800 MHz) ainsi que les réseaux locaux sans fil (2,45 GHz essentiellement). Actuellement, de nombreuses études, mises en place au niveau national et international par de vastes programmes de recherche, sont en cours pour tenter de déterminer si certains types d'ondes électromagnétiques, notamment les ondes RF utilisées par les téléphones mobiles, peuvent avoir un effet biologique ou sanitaire.

Concernant les ondes MM, les études menées sont moins nombreuses et assez contradictoires. Leur utilisation en thérapie dans certains pays, seules ou en complément d'autres techniques, a suggéré que ces ondes seraient capables d'avoir des effets biologiques. Ceux-ci, probablement conjugués à l'arrivée prochaine de futurs systèmes de télécommunications sans fil provoquent, dans la communauté scientifique, un regain d'intérêt dans l'évaluation des effets potentiels de ces ondes.

L'objet de ce travail est de tenter de déterminer si les ondes MM, à des puissances voisines de celles qui seront produites par les futurs systèmes de télécommunications sans fil, peuvent avoir un effet potentiel sur différents types de cellules humaines. Pour cela, en utilisant des techniques de biologie moléculaire, nous nous sommes focalisés sur l'étude d'un organite cellulaire particulier, le réticulum endoplasmique (RE), connu pour être extrêmement sensible à son environnement, puis sur un impact éventuel de ces ondes sur certaines molécules pro-inflammatoires. Enfin, une approche transcriptomique à haut débit pour tenter de caractériser d'éventuels gènes cibles a été réalisée. Ces études ont été menées sur des cellules gliales du cerveau et sur des cellules de la peau, laquelle est la cible principale de ces ondes. Une partie des résultats obtenus, portant notamment sur l'étude du stress du réticulum endoplasmique dans les cellules gliales a été publiée. Les travaux supplémentaires présentés dans ce manuscrit, portant sur l'effet des ondes sur le RE et sur la réponse inflammatoire dans les cellules de la peau, ainsi que sur l'approche transcriptomique à haut débit, constituent des résultats préliminaires.

Ce mémoire de thèse s'organise en trois grandes parties :

- Une introduction qui comprendra dans un premier temps un état de l'art sur les interactions ondes/vivants pour les rayonnements non-ionisants compris entre 300 MHz et 300 GHz. Dans un deuxième temps, nous nous intéresserons au phénomène de stress réticulaire qui pourrait être déclenché à la suite d'une exposition à des ondes MM.

- Une présentation en quatre grands chapitres des résultats expérimentaux obtenus au cours de ce travail. Le premier chapitre de cette partie consistera en un matériels et méthodes, qui permettra d'avoir une vue d'ensemble des techniques utilisées. Celui-ci s'accompagnera de la caractérisation du système d'exposition aux ondes MM. Ensuite, suivra un chapitre dédié à l'étude des effets des ondes MM sur le stress réticulaire et enfin, les deux derniers chapitres porteront sur l'exploration de nouvelles cibles cellulaires et moléculaires, à la suite d'une exposition aux ondes MM. Dans le troisième chapitre, nous nous sommes intéressés à l'effet potentiel des ondes sur la transcription de protéines de la réponse

inflammatoire, tandis que dans le quatrième, nous avons réalisé une approche transcriptomique à haut débit, par la technique de puces à ADN, afin de déterminer l'existence de gènes cibles potentiels aux ondes MM.

- La dernière partie correspondra à la discussion générale de ces résultats, ainsi que les perspectives envisagées dans un futur proche.

Ce travail pluridisciplinaire se place dans la lignée des travaux menés depuis quelques années au sein du groupe Antenne et Hyperfréquences de l'Institut d'Electronique et de Télécommunications de Rennes (IETR), UMR CNRS 6164, en étroite collaboration avec l'équipe Homéostasie Intracellulaire des Protéines (HiP) du laboratoire Interactions Cellulaires et Moléculaires (ICM), UMR CNRS 6026.

Ce projet de recherche a bénéficié du soutien financier de la Fondation Santé et Radiofréquences.

Ce manuscrit de thèse a pour but de présenter les travaux de recherches menés, ainsi que les résultats obtenus au cours de ces trois années de travail au sein de ces deux équipes. Pour poursuivre dans cet état d'esprit de pluridisciplinarité, ce mémoire a été rédigé pour qu'un double public (électroniciens et biologistes) puisse l'utiliser dans le cadre du laboratoire. Dans ce but, des annexes pouvant servir de rappels des connaissances de bases en électromagnétisme et en biologie ont été rédigées et placées en fin de manuscrit.

Introduction générale

Première partie : Interactions des ondes avec le vivant

1.1 Les ondes électromagnétiques

A. Caractéristiques des ondes électromagnétiques

- **Définition**

Une onde électromagnétique (EM) **(figure 1)** peut être perçue comme une « vague » en mouvement, constituée de champs électrique et magnétique oscillants et perpendiculaires l'un à l'autre [1].

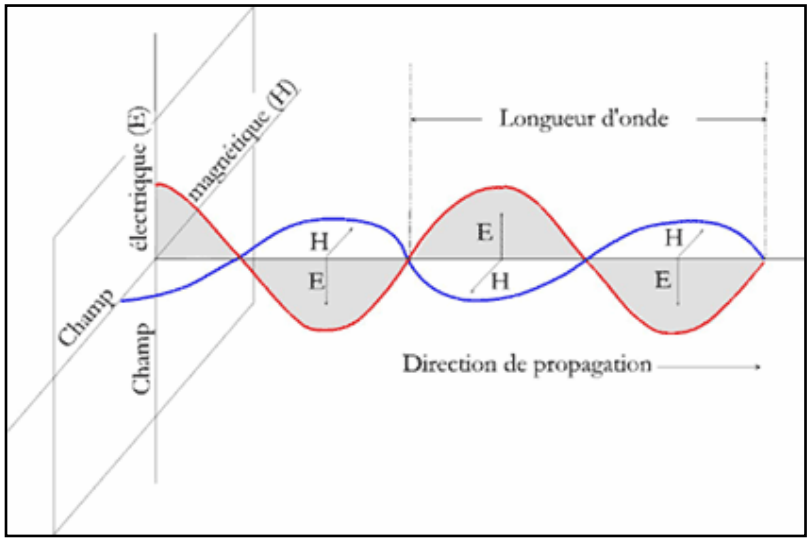

Figure 1 : Représentation d'une onde électromagnétique [1]

Une onde EM associe un champ électrique sinusoïdal, noté $\vec{E}$ exprimé en Volts par mètre (V/m) et un champ magnétique $\vec{H}$ de même période, exprimé en Ampères par mètre (A/m) [2]. Ce modèle ondulatoire est dû à Maxwell (1865).

Les principales caractéristiques d'une onde EM sont :

- Sa fréquence *f*, ou nombre d'oscillations par seconde, exprimée en Hz

- Sa période T = $\frac{1}{f}$ exprimée en secondes

- Sa longueur d'onde dans le vide $\lambda = cT = \frac{c}{f}$ exprimée en mètres (où $c = 3 \times 10^8$ m.s^{-1} est la vitesse de la lumière dans le vide).

- **Le spectre électromagnétique**

Différents types d'ondes existent sur notre planète ; l'ensemble de celles-ci forme le spectre EM **(figure 2)** [3]. Celui-ci s'étend des fréquences extrêmement basses (ELF) aux rayons γ.

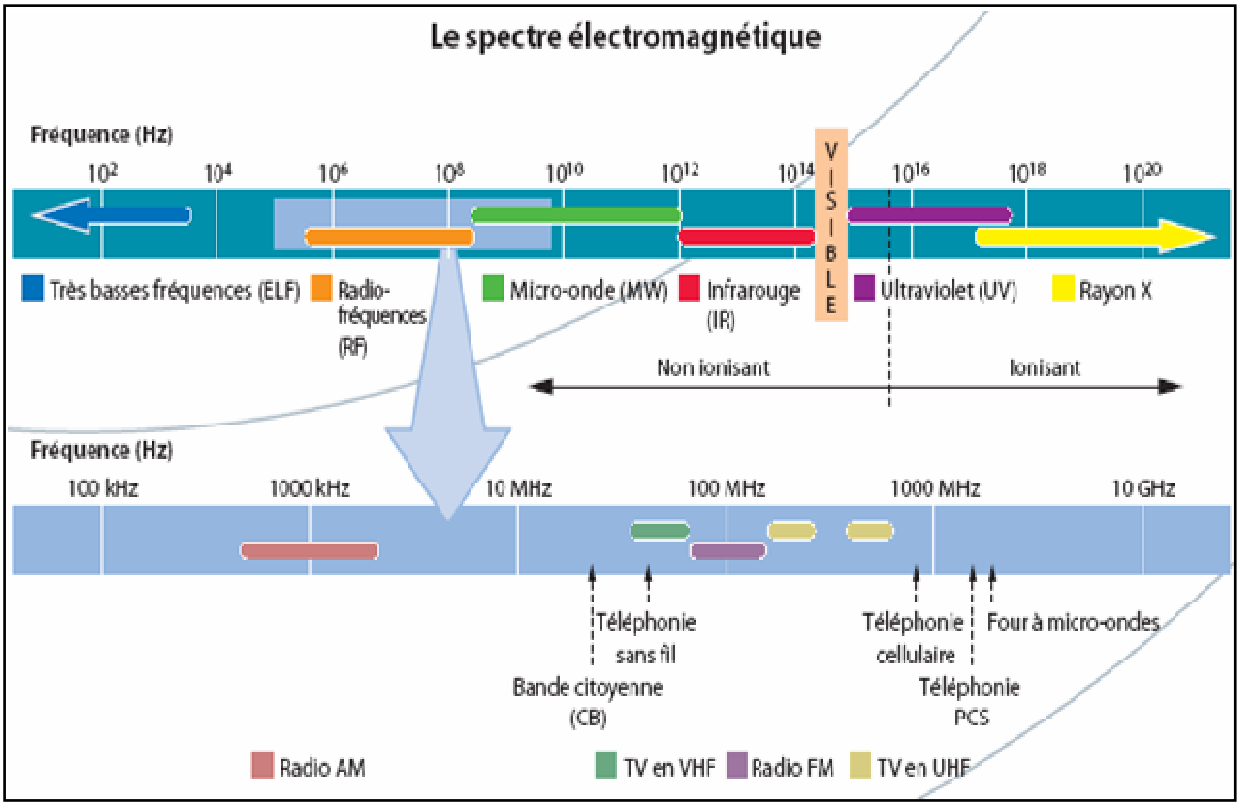

Figure 2 : Spectre électromagnétique
Sur la partie haute de cette figure, le spectre complet est visible. La partie basse représente les nombreuses applications utilisées au quotidien par l'homme, dans le domaine des radiofréquences [3].

Les champs de basses fréquences sont produits par les lignes électriques ainsi que les appareils électriques domestiques utilisés au quotidien (50 ou 60 Hz suivant les pays).

Sur le spectre EM, on distingue ensuite les radiofréquences (RF), comprises entre 30 kHz et 300 GHz, terme global regroupant les RF à proprement parler (30 kHz à 300 MHz) ainsi que les micro-ondes (comprises entre 300 MHz et 300 GHz). On considère en général que les RF (terme global) permettent de transmettre des informations à distance. Elles sont à la base des communications sans fil. Les RF regroupent la plupart des applications radiotélévisées (bande AM, FM), la téléphonie mobile (GSM 900 MHz ou 1,8 GHz), les fours à micro-ondes (2,45 GHz) dont la fréquence est partagée par le Wi-Fi mais pas à la même puissance. Toutes les RF dont la fréquence est supérieure à 300 MHz appartiennent à la famille des micro-ondes. Dans cette famille, les ondes sont rangées en catégories selon leurs longueurs d'ondes respectives. On évoque ainsi des ondes dites :

- Décimétriques entre 300 MHz (λ = 10 dm) et 3 GHz (λ = 1 dm)
- Centrimétriques entre 3 GHz (λ = 10 cm) et 30 GHz (λ = 1 cm)
- Millimétriques (MM) entre 30 GHz (λ = 10 mm) et 300 GHz (λ = 1 mm) [4].

À des fréquences plus élevées, on distingue les ondes infrarouges (IR), la lumière visible, puis les rayons ultraviolets (UV), X et γ (ces derniers ne sont pas représentés sur le spectre de la **figure 2**).

- **Sources d'exposition aux champs électromagnétiques**

Au quotidien, les êtres vivants sont soumis à des champs électromagnétiques, certains étant d'origine naturelle, d'autres non. Les êtres vivants évoluent en permanence sur un aimant géant, puisqu'il existe un champ magnétique terrestre statique et relativement constant, de l'ordre de 40 µT, qui sert notamment aux oiseaux et aux poissons pour s'orienter [5]. De manière plus ponctuelle, les éclairs produits lors des orages ainsi que les aurores boréales constituent une source d'exposition naturelle, mais sont relativement peu fréquents. En plus de ces sources dites « terrestres », il existe une source d'exposition environnementale à des champs « extra-terrestres », lesquels proviennent des activités solaire et lunaire [5]. Certaines bandes de fréquence, dont la lumière visible et les ondes radio, sont transmises à travers l'atmosphère **(figure 3)**, tandis que d'autres bandes sont totalement absentes, en raison d'un phénomène d'absorption des molécules de l'atmosphère à certaines fréquences.

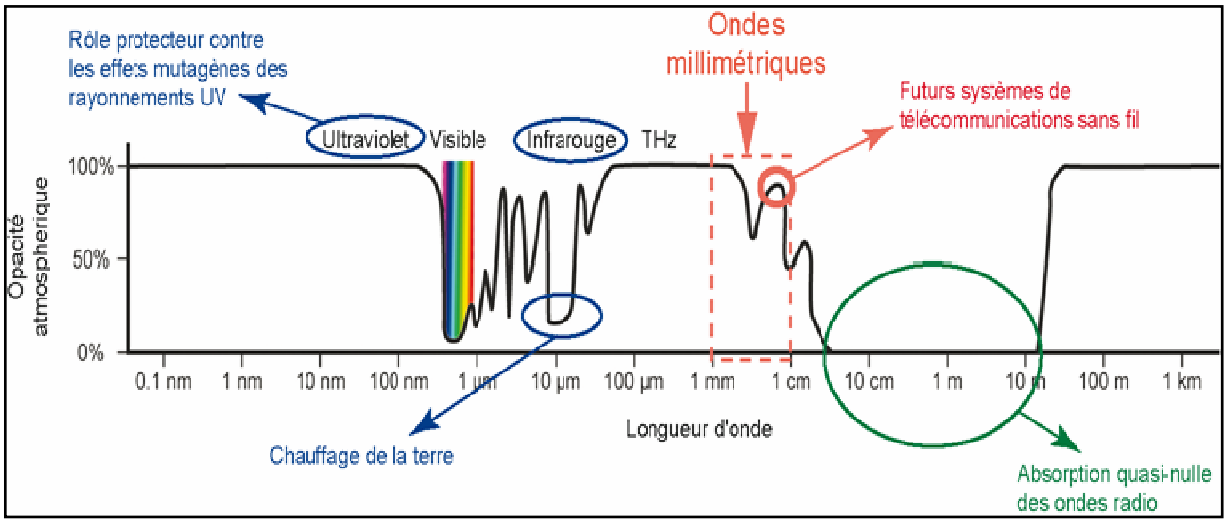

Figure 3 : Spectre de transmission de l'atmosphère de la terre

Les nombreuses découvertes et avancées technologiques du XXème siècle ont provoqué une multiplication des expositions à des sources artificielles. Elles sont retrouvées dans les circuits de distribution du courant (50 ou 60 Hz), les appareils électriques utilisés lors de la

vie quotidienne (grille pain, aspirateur, sèche-cheveux, réfrigérateurs, plaques de cuisson électriques, etc…), les ondes radiotélévisées (80-800 MHz), la téléphonie mobile (900 MHz et 1,8 GHz), les fours à micro-ondes (2,45 GHz), les communications sans fil (DECT : 1,8 GHz, Wi-Fi : 2,45 GHz, sans oublier le Bluetooth, le WiMax), les systèmes radar (fréquences supérieures à 10 GHz : applications militaires, systèmes de transport intelligent), ainsi que dans les dispositifs de localisation et de détection (technologie RadioFrequency Identification). Depuis une dizaine d'années environ, les réseaux locaux sans fil sont en pleine expansion. Ils offrent la possibilité à toute personne de pouvoir bénéficier d'un accès à l'information en étant mobile. De nombreuses entreprises, lieux publics (gares ferroviaires, bibliothèques, aéroports, universités) ont adopté ce type de réseaux. Aujourd'hui, la majorité des réseaux locaux sans fil proposés aux usagers fonctionne dans la bande de fréquence de 2,45 GHz (technologie Wi-Fi). Source de progrès, cette technologie atteint cependant ces limites, notamment en terme de débit proposé aux usagers. L'essor des technologies de l'information et de la communication entraîne des besoins en débit toujours plus importants (télévision par internet en haute définition) et les fréquences employées ne permettent plus de répondre aux besoins des consommateurs. Aussi, pour faire face à ce problème et répondre à une demande toujours plus importante, les industriels sont en train de développer des appareils sans fil fonctionnant dans de nouvelles bandes de fréquences, autour de 60 GHz.

L'interaction permanente avec différents types de rayonnnements EM peut-elle constituer une source de danger pour l'homme ? Dans la partie suivante, nous traiterons de l'interaction des ondes EM avec le vivant, puis de la mise en place de normes, afin de protéger les populations exposées.

B. Interactions des ondes avec le vivant

Au cours de cette partie, nous nous focaliserons volontairement sur les interactions entre les RF, les micro-ondes et le vivant. Les effets d'une interaction peuvent être considérés comme étant le résultat de trois phénomènes :

- La transmission des ondes EM dans les systèmes vivants, ainsi que leur propagation
- L'interaction primaire des ondes avec les tissus biologiques
- Les effets secondaires possibles, à la suite de cette première interaction.

Le mot interaction possède ici un sens très important. Il souligne le fait que le résultat final ne dépend pas que de l'action du champ EM mais est aussi influencé par la réaction du

système vivant. Les systèmes vivants possèdent une capacité à compenser les effets induits par les influences externes.

- **Pénétration et propagation des ondes électromagnétiques dans les tissus biologiques**

La réflexion, la transmission et la pénétration des rayonnements électromagnétiques dans les tissus mous des organismes vivants peuvent fortement varier en fonction de la fréquence (par exemple pour les micro-ondes, plus la fréquence est basse et plus l'onde pénétrera) et des caractéristiques des tissus (permittivité et conductivité électrique, voir annexe I) [6, 7]. Ainsi, les très hautes fréquences (ultraviolets lointains, rayons X, γ) sont capables de produire des lésions au niveau des tissus biologiques en abîmant les structures moléculaires. On parle alors de rayonnements ionisants, ces derniers étant capables, lors d'un contact avec la matière, d'arracher un ou plusieurs électrons à celle-ci. Les rayonnements dont l'énergie est insuffisante pour arracher un électron à la matière sont regroupés sous le terme de rayonnements non ionisants. Pour les micro-ondes, dont celles utilisées en télécommunications, une majeure partie de l'énergie absorbée est convertie en chaleur.

Les effets thermiques sont relativement bien étudiés et constituent, pour le moment, les seuls effets avérés connus [8]. Ils sont majoritairement interprétés comme le résultat de l'effet joule (dégagement d'énergie sous forme de chaleur), dû à l'agitation des charges ou des dipôles, comme l'eau par exemple, présents dans les tissus. En réaction, l'organisme va mettre en place des mécanismes de régulation pour tenter de compenser cette augmentation de température (thermorégulation). Si, malgré ces efforts de compensation, la température de l'organisme venait à augmenter par rapport à sa valeur normale, des effets biologiques se produiront alors, puisque cet échauffement peut avoir des effets chimiques ou biochimiques au même titre qu'un échauffement classique. Dans le domaine médical, de nombreuses thérapies reposent sur les effets thermiques des ondes lorsque des rayonnements non-ionisants sont employés **(figure 4)** [7].

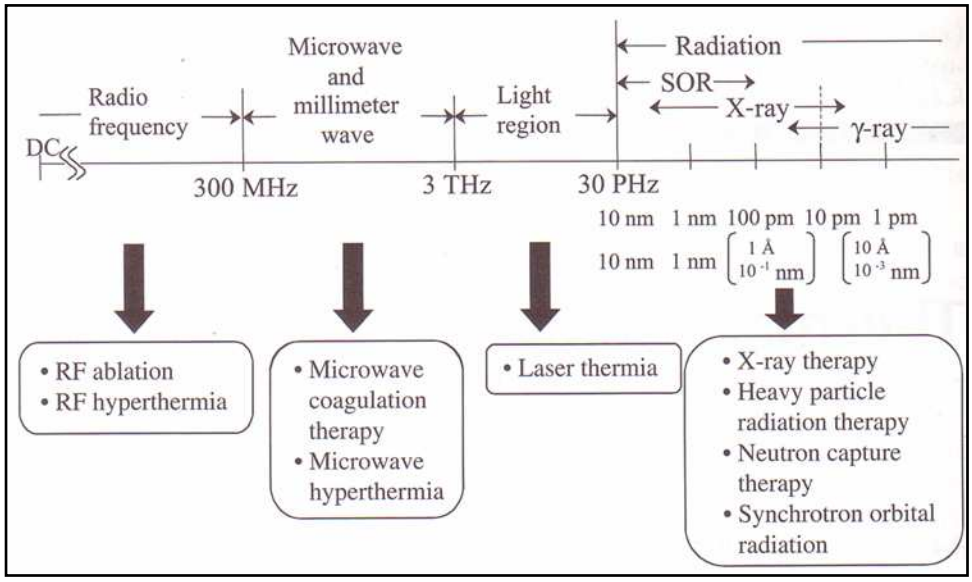

Figure 4 : Exemple de différents types de thérapies utilisées dans le domaine médical avec leurs fréquences et/ou longueurs d'ondes respectives [7]

- **Valeurs limites d'exposition**

L'établissement de limites d'exposition aux champs EM a pour but d'assurer la protection des personnes contre les effets nocifs connus de ces champs EM. Un effet nocif est défini comme une altération décelable de la santé des personnes exposées ou de leur descendance ; un effet biologique peut être ou non nocif. Il peut en effet avoir des conséquences néfastes sur la santé ou le bien être [9].

Les premières limites d'exposition furent fixées dans les années 50. Cette nécessité de fixer des standards apparut lorsque des personnes présentèrent de graves blessures thermiques, à la suite d'une exposition à des hauts niveaux de champs RF. Les USA et l'URSS ont été les premiers pays à définir des standards, même si ceux-ci variaient en fonction des preuves scientifiques respectives [8]. Par la suite, l'introduction d'équipements industriels a aussi nécessité l'élargissement de l'étude sur la gamme d'ondes EM.

Les normes et recommandations d'exposition sont établies au niveau international par la Commission Internationale pour la Protection contre les Rayonnements Non Ionisants (ICNIRP, en anglais). Les commissions se basent sur les résultats d'études scientifiques publiées dans des revues avec comité de lecture. A l'aide de cette importante base de données, elles vont fixer des valeurs limites d'exposition en se basant sur les effets considérés, qui apparaissent au plus bas niveau d'exposition testé et sont jugés pertinents d'un point de vue sanitaire [10]. La plupart des expérimentations ont cependant été menées sur le modèle animal ; compte tenu des incertitudes liées à l'extrapolation du modèle animal à l'homme, le

seuil (déterminé chez l'animal) sera réduit d'un facteur 10 pour les expositions en milieu professionnel. Cette population exposée correspond à des gens adultes, conscients de travailler en présence de champs EM et au courant des risques potentiels. Pour la population générale, qui regroupe le reste de la population, la restriction de base sera réduite d'un facteur 5 supplémentaire. Cette population est considérée comme non informée sur l'exposition qu'elle reçoit et est constituée de personnes de tous âges dont l'état de santé peut varier d'un individu à l'autre.

Les restrictions sont variables suivant les gammes de fréquences concernées :

- Dans la gamme des basses fréquences (entre 1 et 10 MHz), la restriction s'établit en densité de courant J (A/m^2), afin de prévenir les phénomènes de courant induit dans les tissus excitables (muscles et cellules nerveuses).
- Pour quantifier l'énergie de l'onde absorbée entre 100 kHz et 10 GHz, la grandeur physique utilisée est le débit d'absorption spécifique (DAS) [5] ou « specific absorption rate » (SAR) en anglais, lequel correspond à l'énergie absorbée ou dissipée par unité de temps et de masse. Il est évalué localement en moyenne sur 1 ou 10 g de tissu ou sur l'organisme entier et est exprimé en W/kg. Les valeurs de DAS sont extrêmement importantes afin de définir les limites d'exposition aux ondes. Les effets thermiques d'un niveau donné de DAS sur le corps humain sont aussi affectés par la température ambiante, l'humidité, le flux d'air. En téléphonie mobile, concernant l'exposition aux stations de base, le DAS pour les travailleurs est de 0,4 W/kg et de 0,08 W/kg pour le grand public. Pour le téléphone portable en lui-même, comme certaines parties du corps peuvent absorber localement des puissances jusqu'à 25 fois supérieures, un DAS local est établi. Il est de 2 W/kg pour la tête et le tronc et de 4 W/kg pour les membres [10].
- Entre 10 GHz et 300 GHz, la restriction de base est la densité superficielle de puissance (DSP), exprimée en W/m^2, en raison de la faible pénétration de ces ondes. Leur(s) effet(s) est (sont) essentiellement concentré(s) à la surface. Pour les ondes MM, les seuls effets connus sont des effets thermiques et les standards d'exposition sont, par conséquent, fixés par rapport à ces derniers. La limite d'exposition fixée pour les travailleurs est de 5 mW/cm², celle pour le grand public est de 1 mW/cm².

- **Les effets biologiques des ondes : exemple de la téléphonie mobile**

Les RF constituent l'une des sources principales d'exposition de la population au quotidien. Ces ondes, couvrant une bonne partie du spectre électromagnétique, sont comprises

entre 30 kHz et 300 GHz et ont commencé à intéresser réellement la communauté scientifique au moment de l'expansion fulgurante de la téléphonie mobile. Celle-ci est, sans conteste, le domaine où la recherche d'effets biologiques potentiels est la plus importante. Le standard le plus utilisé en téléphonie mobile est la technologie « Global System for Mobile Communications » (GSM), dont la majorité des réseaux fonctionne à 900 MHz et/ou 1800 MHz. Bien que le présent travail ne porte pas sur les effets potentiels de cette technologie, nous ne pouvons pas nous contenter d'évoquer les effets des interactions entre les ondes MM et le vivant, tout en passant sous silence les travaux concernant cette technologie.

La majorité des études portant sur la recherche d'effets biologiques des ondes EM concernent majoritairement la téléphonie mobile. Le choix de décrire, dans ce présent paragraphe, quelques études portant sur ce domaine n'avait pas pour but de les comparer avec celles des ondes MM ; ces deux types d'ondes ne possédant pas les mêmes propriétés physiques. Il paraissait cependant intéressant d'étudier quelques travaux dans ce domaine pour prendre en compte l'hétérogénéité possible que l'on peut trouver, tant au niveau du type de recherche menée qu'au niveau du modèle employé, lorsque l'on tente de répondre à une question biologique.

La téléphonie mobile a connu un plébiscite sans précédent dès son arrivée sur le marché et continue, depuis, de se répandre massivement dans le monde entier. Quelques années après son développement spectaculaire, des doutes concernant son innocuité ont commencé à être soulevés par des scientifiques mais aussi par les populations elles-mêmes. L'usage du téléphone portable a rapidement été suspecté d'être à l'origine de cancers, principalement ceux du cerveau, bien que d'autres types de tumeurs, telles que celles des glandes salivaires par exemple, aient aussi été évoquées [11, 12]. À l'heure actuelle, aucune preuve scientifique n'est pourtant venue démontrer clairement le lien entre la téléphonie mobile et les cas de cancers.

La corrélation entre l'utilisation du téléphone mobile et l'apparition de tumeurs reste assez ambiguë. Pour évaluer les effets potentiels de cette technologie, plusieurs méthodes d'étude sont ainsi possibles. Des études épidémiologiques peuvent démontrer le lien entre l'exposition aux ondes et le cancer, tandis que les études *in vivo* et *in vitro* s'avèrent indispensables pour comprendre au mieux les mécanismes d'interactions possibles.

Une étude épidémiologique a pour but d'estimer le risque qu'encourt une population (terme général), en fonction de l'exposition à un agent (ici le téléphone portable). Si la

question scientifique de départ semble facile à déterminer, la mise en œuvre de ce type d'expérience reste cependant complexe. Les protocoles expérimentaux peuvent ainsi être organisés de différentes manières (suivi d'une population pendant plusieurs années, interrogation directe des personnes atteintes de pathologies au niveau de la tête, etc…), lesquelles sont discutées dans la revue de Kundi [13]. Pour toutes ces études, le problème majeur réside cependant dans la quantification précise de l'exposition (dose reçue, temps d'exposition), ce qui est souvent source de nombreuses approximations [14].

Les études épidémiologiques offrent la possibilité d'établir un lien, mais ne permettent pas de comprendre pour autant les mécanismes moléculaires mis en jeu. Aussi, de nombreux laboratoires se sont penchés sur ce problème, en utilisant différents modèles d'études (animaux entiers, nématodes, drosophiles, cultures de cellules humaines et animales). Les RF, en raison de leurs propriétés physiques, n'ont pas d'effet génotoxique direct [15], bien que cet aspect soit l'objet de vifs débats entre auteurs (pour plus de détails, se reporter à l'étude de Vijayalaxmi et Prihoda [16]). De nombreux travaux portent sur d'éventuels effets génotoxiques indirects, qui pourraient notamment se traduire par une modification de la capacité des enzymes à réparer l'ADN, favorisant ainsi les phénomènes délétères [17]. En 2001, Maes et collègues ont ainsi étudié les effets synergiques entre une exposition de lymphocytes humains à des champs RF de 900 MHz (à différents DAS, compris entre 0 et 10 W/kg), combinée à une exposition à des agents chimiques ou physiques mutagènes (mitomycine C ou rayons X) et n'ont pas observé d'effet synergique entre les ondes et l'agent mutagène [17]. Plus récemment, l'équipe de Zhijian a montré que les signaux RF (1,8 GHz) avec un DAS de 2 W/kg, n'agissaient pas en synergie avec les rayons X pour induire des dommages à l'ADN. De même, aucun effet sur les systèmes de réparation de l'ADN n'a été observé [18]. L'existence d'effets synergiques reste cependant sujette à débats [19].

Il n'est pas non plus exclu que ces ondes puissent avoir des effets biologiques indirects, autres que génotoxiques, qui pourraient se traduire par une altération de mécanismes cellulaires ou des organisations structurales (prolifération, transcription, perméabilisation des membranes, etc…). Dans l'hypothèse où les ondes utilisées en téléphonie mobile pourraient être responsables de cancers, il est logique d'envisager que la prolifération cellulaire et l'apoptose seraient les mécanismes les plus susceptibles de présenter des anomalies à la suite d'une exposition. Dans ce but, des travaux menés par Sanchez et collègues ont démontré que différents types de cellules de peau exposés 48 heures à des ondes de type GSM–900 MHz, à un DAS de 2 W/kg ne présentaient pas d'anomalie au niveau de leur prolifération. De même,

cette exposition n'induit pas l'apoptose dans les cultures primaires de kératinocytes, ce qui est aussi observé dans les cultures primaires de fibroblastes. Enfin, au niveau du modèle reconstitué de l'épiderme, l'exposition n'induit pas de prolifération cellulaire et ne déclenche pas de réponse inflammatoire [20]. Plus récemment, les mêmes observations ont été faites chez des cellules de la peau exposées à un signal GSM-1800 MHz pendant 48 heures à un DAS de 2 W/kg [21].

Les ondes utilisées en téléphonie mobile pourraient constituer une source de stress environnemental pour les cellules. Pour s'y adapter, celles-ci possèdent un arsenal moléculaire extrêmement varié, caractérisé par la synthèse de protéines dites de « stress », lesquelles appartiennent à la grande famille des protéines de choc thermique, « Heat Shock Proteins » (HSP). Celles-ci, extrêmement sensibles à leur environnement, ont été étudiées en tant que marqueur biologique. La majorité des recherches portant sur les effets potentiels des RF concernent par ailleurs ces molécules. En 2000, De Pomerai et collègues ont démontré l'existence d'effets biologiques non thermiques chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), se caractérisant par l'induction de HSP16 à la suite d'une exposition à des RF [22]. En 2001, French et collègues ont émis l'hypothèse selon laquelle l'exposition répétée à des RF pouvait mener à une surexpression des HSP, favorisant à long terme l'apparition de tumeurs [23]. Il s'est avéré par la suite que certains travaux, menés à cette époque, furent réalisés dans des conditions expérimentales mal maîtrisées. Dawe et collègues ont ainsi découvert que leur système expérimental précédemment utilisé [22] provoquait une augmentation de température suffisante pour induire les protéines de stress chez *C. elegans* [24]. De même, dans leur récente revue portant sur les radiations RF et l'expression génique ou protéique, McNamee et Chauhan pensent que les résultats observés par Weisbrot et collègues en 2003 sont directement liés au système d'exposition [15]. Ces derniers observaient des niveaux d'expression de HSP70 plus élevés chez les drosophiles exposées à des signaux de type GSM-900 ou 1900 MHz [25]. Ces problèmes, rencontrés par certaines équipes, ont permis de souligner à quel point il est important de contrôler rigoureusement les conditions d'exposition. Depuis, un grand nombre d'études suggère que les expositions à des RF (de faible puissance) n'induisent pas de réponse cellulaire au stress, caractérisée par une altération de l'expression des HSP. Sanchez et collègues ont par exemple démontré que des expositions durant 48 heures à 900 MHz, à un DAS de 2 W/kg, n'entraînaient aucun changement détectable dans les niveaux d'expression de la protéine HSP27, ou encore de la forme inductible de HSP70 dans les kératinocytes [20]. De nouvelles expériences réalisées en

2007, caractérisées par des expositions de cultures primaires de peau (fibroblastes et kératinocytes) pendant 48 heures à un signal GSM-1800 avec un DAS de 2 W/kg, n'ont pas permis de mettre en évidence d'induction des formes constitutives ou inductibles de HSP70 ou encore de HSP27. Hirose et collègues ont aussi démontré l'absence d'effet des RF sur la phosphorylation de HSP27 ainsi que sur les niveaux d'ARN messagers (ARNm) et protéiques dans deux lignées cellulaires [26].

En dépit des larges études portant sur ce domaine, il n'est pas possible de conclure sur un éventuel effet potentiel des RF sur la modulation de certains gènes de stress. Comme pour les données épidémiologiques où les résultats sont parfois contradictoires, un nombre limité d'études tend cependant à démontrer l'existence d'effets. Bien que ces travaux récents semblent irréprochables, puisque ayant bien pris en compte les écueils du passé (système d'exposition bien caractérisé, bonne connaissance de la sensibilité de la lignée ou des organismes/animaux utilisés), les doutes subsistent et des études complémentaires s'avèrent indispensables afin de supprimer tout paramètre non maîtrisé. La recherche d'effets potentiels des RF ne s'arrête toutefois pas à ces seuls gènes de stress et d'autres cibles potentielles existent vraisemblablement. Dans ce sens, des expérimentations sont aussi possibles chez l'être humain ou chez l'animal et peuvent porter sur les effets subjectifs de ces expositions (apprentissage, impact sur le sommeil, psychomotricité) [27, 28]. En complément, une étude neurochimique peut aussi être associée. Crouzier et collègues ont ainsi réalisé une étude multiparamétrique (observations comportementales, électrophysiologiques et neurochimiques) chez des rats exposés pendant 24 heures à des ondes type GSM (1800 MHz), à des densités de puissance faibles (1,2 et 9 W/m²). Ces travaux n'ont pas montré de différence entre le groupe exposé et le groupe témoin [29]. Pour pallier aux contraintes posées par les expositions d'animaux (immobilisation qui peut être source de stress), le choix de plantes en tant que modèle d'étude peut s'avérer judicieux. Celles-ci ne nécessitent aucune immobilisation et sont, en outre, particulièrement sensibles aux modifications de leurs conditions environnementales. Dans ce domaine, des travaux ont montré que l'accumulation du transcrit du facteur de transcription *LebZIP1* (*Lycopersicon esculentum basic leucine zipper*), lié au stress, se faisait très rapidement après exposition de plants de tomates pendant 10 minutes à 900 MHz. Habituellement, il apparaît que ce gène est en général fortement induit lorsque l'intégrité de la plante est touchée. Les ondes pourraient donc avoir un effet proche de celui observé lorsqu'une plante est blessée, bien que les conditions d'exposition permettent d'exclure tout effet thermique potentiel [30]. Toujours dans cette idée, les travaux suivants ont

confirmé l'accumulation d'autres transcrits (calmoduline-N6, chloroplast mRNA-binding protein (cmbp) et proteinase inhibitor, (pin2)), connus pour être également induits lors d'une blessure [31]. Les réponses systémiques chez les tomates impliquent des hormones ou des signaux électriques ou hydrauliques. Étant donné le caractère extrêmement rapide de l'induction, il se pourrait qu'une réponse systémique soit causée par un signal électrique [32]. Plusieurs hypothèses sont actuellement à l'étude. L'interaction ondes/plants de tomates se ferait à l'interface entre la membrane et le cytosol et déclencherait un potentiel d'action. Une autre alternative étudiée est celle selon laquelle il y aurait une activation directe de la voie de signalisation. Enfin, les ondes pourraient moduler directement des canaux calciques puisque le calcium (Ca^{2+}) est directement impliqué dans la régulation de certains gènes de stress. Quoique les mécanismes exacts ne soient pas encore bien compris, l'hypothèse de la génération d'un signal électrique pourrait être corroborée avec l'observation, après exposition, de la diminution de l'état énergétique des cellules de tomates exposées. Cette modification de l'état métabolique pourrait être liée à une dépense énergétique pouvant servir à générer un signal électrique en réponse à une exposition [33]. Ces résultats, obtenus sur les plants de tomate, ne peuvent cependant en aucun cas être directement extrapolés sur les modèles animaux.

Enfin, pour déterminer d'autres gènes cibles, il est possible de réaliser une nouvelle approche expérimentale, dite à haut débit, par la technique de puces à ADN (acide désoxyribonucléique) qui offre la possibilité d'avoir un aperçu des niveaux d'expression de l'ensemble des transcrits du génome après exposition à des ondes. Cette partie sera spécifiquement détaillée dans le chapitre IV de ce présent manuscrit.

Au cours de la partie suivante, nous nous focaliserons désormais exclusivement sur les ondes MM. Ces dernières sont déjà employées pour quelques applications spécifiques et constitueront prochainement une source d'exposition permanente supplémentaire avec l'arrivée future des technologies de télécommunications sans fil.

1.2 Les ondes millimétriques

En ce qui concerne ce travail de thèse, nous nous sommes donc focalisés sur les effets biologiques potentiels des ondes MM autour de 60 GHz, qui seront utilisées par les systèmes de télécommunications sans fil. Au cours de cette partie, nous évoquerons dans un premier temps les applications déjà disponibles utilisant cette technologie puis, dans un second temps, nous nous intéresserons aux effets biologiques des ondes MM déjà décrits dans la littérature scientifique.

A. Les différentes applications des ondes millimétriques

- **Systèmes de télécommunications sans fil dans la bande 57-64 GHz**

Ces nouveaux appareils correspondront à une nouvelle norme (IEEE 802.15.3), permettant de développer des réseaux personnels sans fil (WPAN pour Wireless Personal Area Network) **(figure 5)** [34, 35].

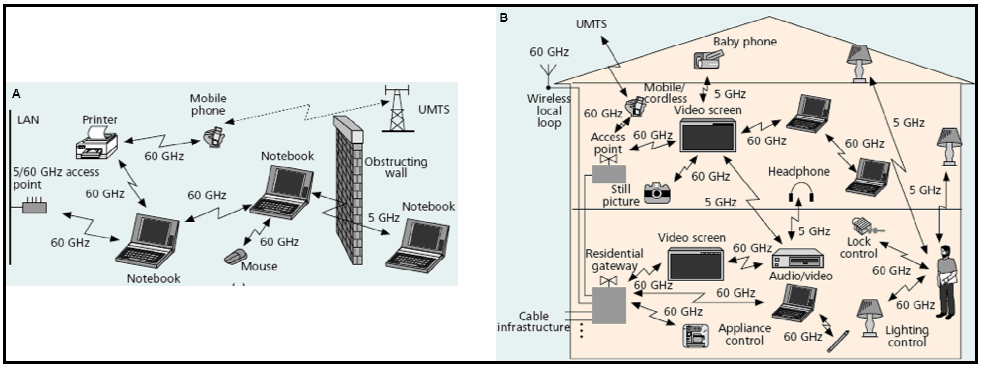

Figure 5 : Exemples de systèmes WPAN 5 GHz/60 GHz, dans l'environnement professionnel (A) ou dans l'environnement domestique (B)
Sur ces figures, deux fréquences sont employées. Celle à 5 GHz possède une longue portée et sera utilisée dans des communications inter-bâtiments, tandis que celle à 60 GHz, de portée réduite (limitée au sein d'un bâtiment) garantira aux utilisateurs une bonne confidentialité [34].

Ces futurs systèmes présentent de nombreux atouts. Une large bande de fréquence, comprise entre 57 et 66 GHz[1] est disponible. De plus, ces ondes ont une portée réduite, en raison des phénomènes d'absorption dus aux précipitations ou à la vapeur d'eau et à l'oxygène moléculaire (O_2) **(figure 6)**, garantissant ainsi une confidentialité importante aux utilisateurs.

[1] 57-64 GHz en Amérique du Nord ; 59-66 GHz au Japon ; 57-66 GHz en Europe.

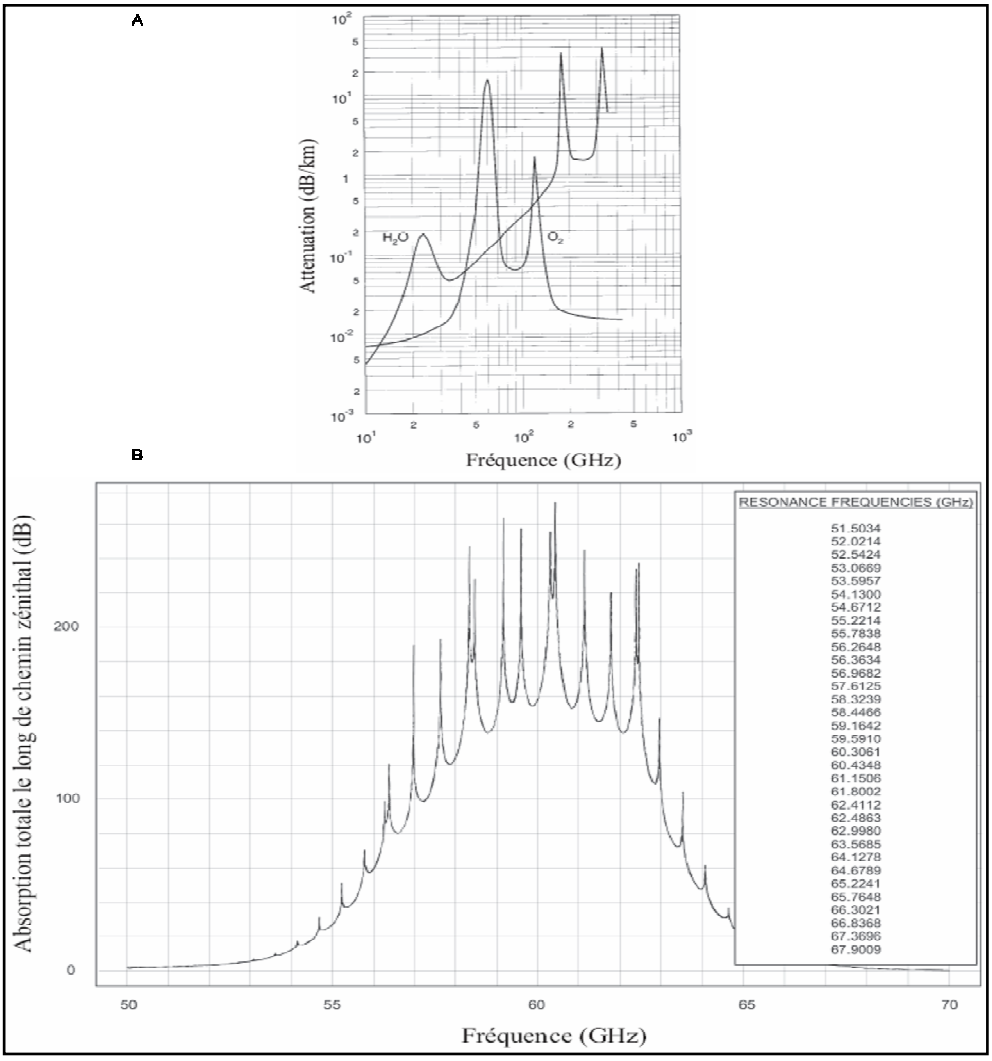

Figure 6 : Absorption moléculaire des ondes millimétriques
A) Spectre d'absorption des molécules d'oxygène et d'eau dans l'atmosphère [36].
B) Détail du spectre d'absorption autour de 60 GHz [37].

Ceci constitue un avantage commercial important pour une entreprise ou pour des industriels qui ne souhaitent pas voir leurs réseaux « pirates » [36, 37]. Enfin, les débits proposés par ce type de technologie seront très élevés (pour démarrer 2 Gb/s, peut-être jusqu'à 15 Gb/s) ; ils permettront de transmettre facilement des fichiers volumineux non compressés (tel qu'un film en haute définition par exemple) [38]. La densité de puissance du rayonnement émis par ces appareils n'est pas encore communiquée par les fabricants mais il est raisonnable d'envisager que ces appareils respecteront les normes d'exposition grand public établies par l'ICNIRP, à savoir une DSP inférieure à 1 mW/cm².

- **Les systèmes de dispersion de la foule**

Ces systèmes, constituant un nouveau type d'arme non létale, produisent des ondes MM autour de 94 GHz [39]. Développés par l'armée américaine sous le nom de Active Denial

System (ADS), ils sont montés sur des camions militaires **(figure 7)** et ont pour but de repousser un individu ou une foule agressive avant qu'une confrontation ne puisse dégénérer.

Figure 7 : Système de dispersion de la foule
Cet appareil, monté sur un camion de l'armée, est contrôlé par un opérateur situé dans le camion. Lors de la présence d'une foule au comportement agressif, l'opérateur dirige le faisceau sur les personnes virulentes. Ce faisceau est transmis via l'antenne [40].

Ces appareils émettent des ondes de forte puissance qui vont provoquer un effet thermique superficiel important chez les personnes exposées. Celles-ci ressentent une sensation de brûlure intense et s'écartent rapidement (réflexe de fuite) du faisceau de l'onde. Il est estimé que les individus situés à 750 mètres de l'appareil sont soumis à un rayonnement possédant une DSP de l'ordre de quelques dizaines de W/cm² [39]. Cet appareil ne provoque cependant aucune brûlure réelle pour des distances d'exposition de quelques centaines de mètres [40].

- **Technologie du régulateur de vitesse adaptatif**

Dans les transports automobiles, de nombreux accidents sont liés à un non-respect des distances de sécurité ou encore causés par des écarts de conduite. Pour remédier à ces problèmes liés au comportement des conducteurs, une technologie radar en cours de développement permettra d'adapter automatiquement la vitesse du véhicule ainsi que sa distance, par rapport au véhicule précédent [41, 42], tandis qu'un autre système utilisant un radar à haute résolution permettra de déterminer les limites de la route, ainsi que les éventuels obstacles se trouvant sur celle-ci [43]. Ces systèmes utiliseront la bande 77-79 GHz et la DSP du rayonnement émis par ces dispositifs sera de l'orde de quelques dixièmes de mW/cm².

- **Systèmes d'imagerie par détection d'ondes millimétriques**

Les systèmes d'imagerie par ondes MM ont été développés pour pouvoir être utilisés en complément de systèmes d'imagerie fonctionnant en lumière visible, en infrarouges (IR) ou en rayons X. En absence de lumière visible, il existe déjà des capteurs capables de détecter

l'émission d'objets en IR (techniques de vision nocturne). Ces techniques d'imagerie classiques peuvent cependant se révéler totalement inefficaces dans des conditions particulières naturelles (brouillard, neige) ou artificielles (fumée). Les technologies d'imagerie par ondes MM sont efficaces de jour comme de nuit par temps clair ainsi que dans des conditions de visibilité très limitées. De nombreux équipements militaires peuvent bénéficier de l'apport de cette technologie (détection, surveillance, détermination de cibles exactes), tout comme des équipements civils, en particulier dans le monde des transports (systèmes de vision en conditions de visibilité dégradée pour les avions (brouillard intense), lesquels leurs permettent de visualiser la piste) **(figure 8)** [44].

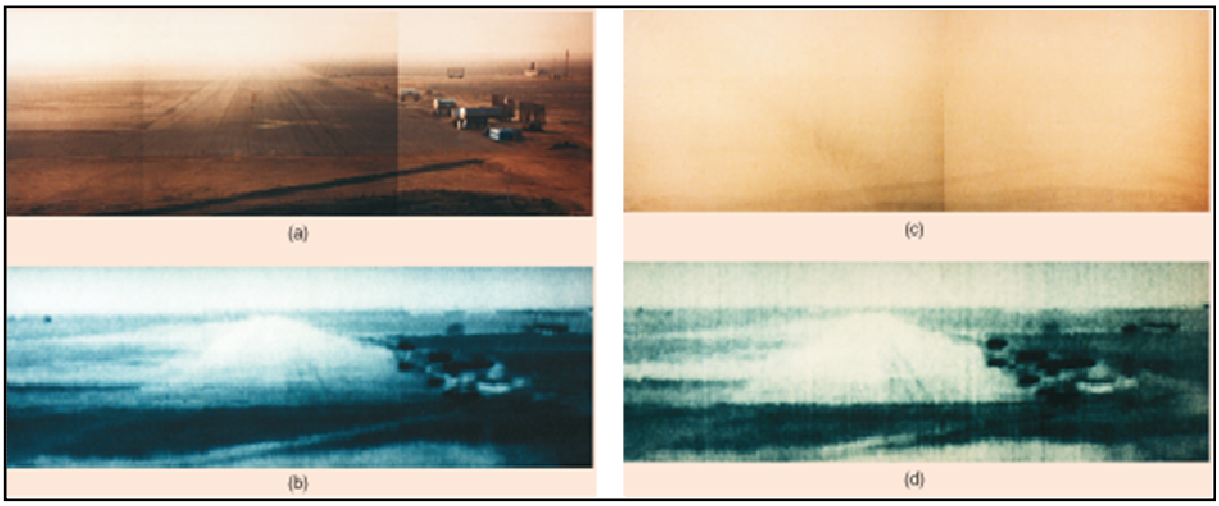

Figure 8 : Caméra placée sur un avion équipée d'un système de détection passif des ondes MM
(a) Piste observée en lumière visible par temps clair.
(b) Piste observée en ondes MM.
(c) Piste observée en lumière visible par temps de brouillard.
(d) Piste observée en ondes MM par temps de brouillard [44].

Il existe deux types de systèmes d'imageries par ondes MM :

- Les systèmes passifs (89 ou 94 GHz) forment des images par détection passive de radiations naturelles d'ondes MM en utilisant la différence entre la température et l'émissivité[1] d'un objet. Ces systèmes offrent, par exemple, la possibilité de découvrir des objets cachés sous des vêtements. Le corps humain et les métaux possédant des paramètres d'émissivité différents, il est facile de les discriminer par ondes MM **(figure 9A)**.

- Les systèmes actifs (27-33 GHz), irradient avec un rayon d'ondes MM les objets à étudier ; ceux-ci réfléchissent les ondes qui seront ensuite détectées par des capteurs qui permettront la reconstitution d'une image **(figure 9B)** [45].

[1] Ce terme est employé pour quantifier l'émission naturelle d'ondes millimétriques produite par un objet ou un organisme.

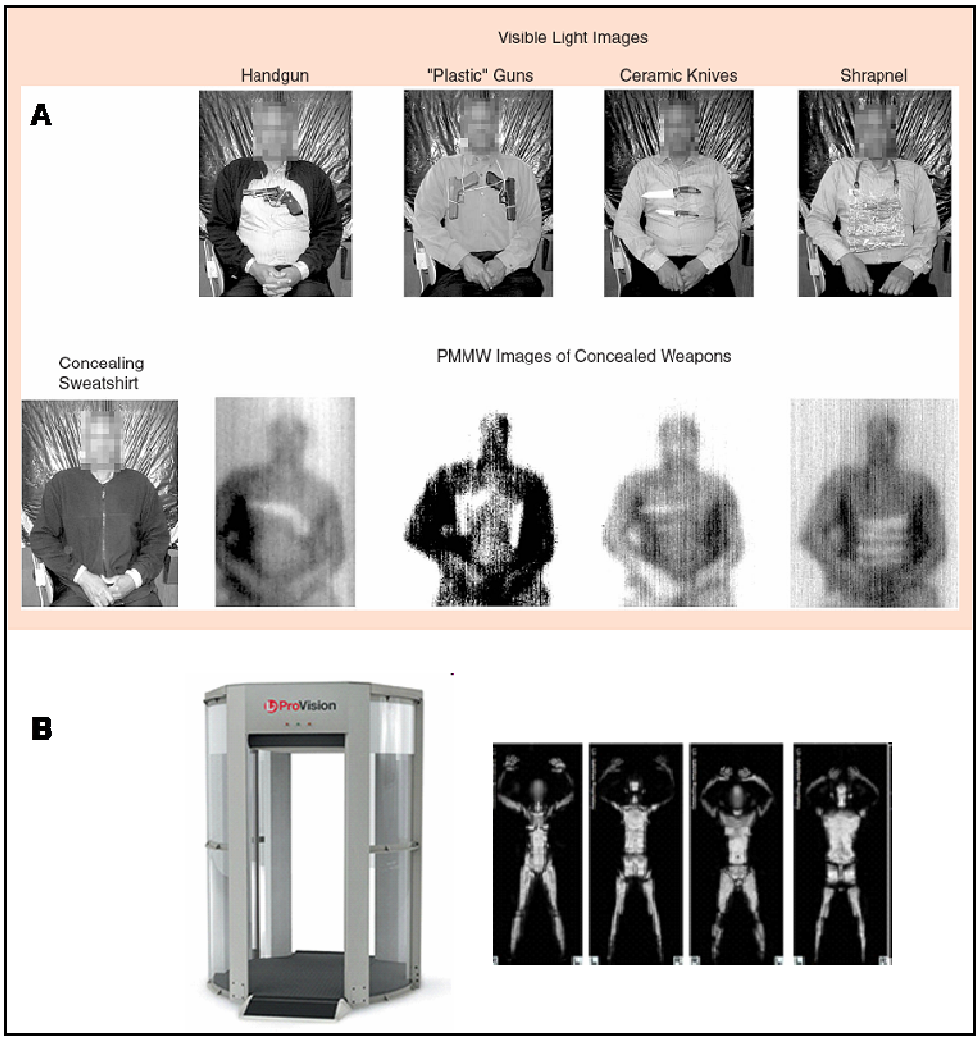

Figure 9 : Systèmes passifs (A) et actifs (B) de détection par ondes MM d'objets cachés sous les vêtements
A) Sur la partie supérieure de l'image, les différents types d'armes sont présentés en lumière visible, sans être cachés par des vêtements. La partie basse de cette figure montre les images obtenues par détection passive des ondes MM. Les différentes armes, qu'elles soient en métal, en plastique, en céramique ou sous la forme d'un explosif liquide, sont toutes détectables par-dessous les vêtements [44].
B) Système d'imagerie utilisé dans les aéroports et exemples d'images obtenues avec ces appareils [45].

Ces systèmes d'imagerie sont considérés comme non dangereux pour les personnes exposées ou pour le personnel technique, car ils se révèlent efficaces à très faible puissance, bien que celle-ci ne soit pas communiquée par les fabricants. Enfin, ils présentent une avancée majeure en terme de gestion de problèmes de sécurité dans les lieux sensibles (aéroports, palais de justice) car ils permettent de découvrir des objets non métalliques ou liquides cachés sous des vêtements. En outre, ces systèmes proposent aux usagers une alternative aux palpations de sécurité, souvent perçues comme une atteinte à l'intimité.

Cette technologie a été mise à l'essai en 2008 dans de nombreux aéroports (technologie Whole Body Imaging) [46], notamment aux États-Unis, Canada, Pays Bas, Russie.

- **Applications thérapeutiques des ondes MM**

De nombreux pays de l'Europe de l'Est (Russie, ainsi que les pays de l'ex-bloc Soviétique), utilisent les ondes MM en thérapie, laquelle présente l'avantage d'être une technique non-invasive. Des appareils, dont les fréquences de fonctionnement les plus utilisées sont 42,2 GHz, 53,6 GHz, 61,2 GHz, ont été développés et commercialisés à partir des années 80 **(figure 10)** [47].

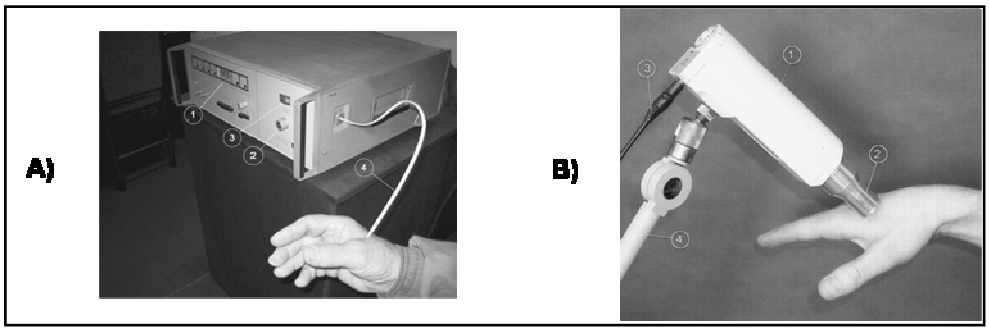

Figure 10 : Générateurs d'ondes électromagnétiques MM utilisés en thérapie (A) en Russie et (B) en Ukraine [47]**.**

Ces appareils émettent des rayonnements dont les DSP sont comprises en général autour de 10 mW/cm². Cette thérapie est utilisée seule ou en complément de techniques médicales « classiques » afin de traiter des personnes contre les douleurs articulaires (arthrose), les maladies cardiovasculaires ou encore le diabète. En réalité, l'éventail de maladies traitées par cette thérapie est extrêmement vaste [48], ce qui laisse pantois la plupart des scientifiques occidentaux. Les effets bénéfiques de ce type de thérapie sont basés sur des données empiriques, et il est très difficile de déterminer un modèle d'action précis des ondes MM de faible puissance. Bien que quelques hypothèses soient proposées, beaucoup d'interrogations subsistent : comment des ondes qui ne pénètrent que très peu dans la peau peuvent avoir un effet sur l'organisme complet ? Pourquoi les thérapies ne semblent être efficaces qu'à certaines fréquences et, par conséquent, y a t'il une fenêtre d'action précise ? Pour le moment et malgré de nombreux travaux menés là-dessus, ces questions restent sans réponse.

B. Les effets biologiques des ondes millimétriques

La peau est la principale cible des ondes MM. Celles-ci ne pénètrent donc pas dans tout l'organisme. Leur interaction avec la matière vivante correspond par ailleurs essentiellement à l'absorption par l'eau libre des tissus qui peut mener à deux types d'effets, ceux dits thermiques et ceux non thermiques.

L'existence d'effets non thermiques liés uniquement au rayonnement EM suscite de nombreuses controverses. Il est donc très difficile de les justifier, puisqu'une élévation de température locale au niveau d'un tissu peut toujours se produire et être difficilement détectable. Dès la fin des années 60, de nombreux travaux ont été menés sur les effets non thermiques des ondes, en particulier dans le domaine des ondes MM. Webb et Dodds ont tout d'abord montré que chez *Escherichia coli* (*E. coli*), la fréquence d'exposition pouvait avoir un impact sur les taux de croissance [8]. Cette hypothèse fut ensuite reprise par Fröhlich, qui établit la théorie selon laquelle les systèmes biologiques fonctionneraient comme des oscillateurs [49]. Ainsi, lors d'une exposition de ces systèmes aux ondes EM, l'énergie fournie ne serait pas dissipée sous forme de chaleur, et l'agitation des molécules pourrait déclencher des oscillations de macromolécules. Celles-ci pourraient jouer un rôle dans les systèmes biologiques actifs et ainsi provoquer des réactions biologiques [50]. Par exemple, lors d'une réaction enzymatique, il pourrait exister une force d'attraction entre deux partenaires (enzyme et substrat par exemple), si tous les deux sont dans un même état d'excitation à la même fréquence de résonance. Cette excitation pourrait provenir d'un relargage d'énergie métabolique qui pourrait déclencher l'activité enzymatique. Ces phénomènes de résonance de macromolécules seraient toutefois dépendants de la fréquence, et compris dans une gamme entre 100 et 1 THz [51, 52]. Cette hypothèse est cependant loin d'être partagée par les chimistes et les biochimistes.

Pour les ondes MM, les effets non thermiques sont mal connus et restent encore hypothétiques. Pour l'instant, les limites d'exposition sont donc fixées par rapport aux effets thermiques. Les ondes MM sont déjà utilisées en thérapie (autour de 10 mW/cm²) [47], dans le monde des transports (systèmes de détection, systèmes anti-collision et évitement d'obstacle) et, enfin, vont probablement se répandre avec la prochaine apparition des nouveaux systèmes de télécommunications sans fil, qui fonctionneront cependant à des puissances relativement basses. L'expansion d'un nouveau type d'ondes, de surcroît susceptibles d'avoir des effets biologiques (utilisation en thérapie) suscite un regain d'intérêt dans le domaine de la recherche. Dans un premier temps, l'essor important de la thérapie par ondes MM, ainsi que les études démontrant leur efficacité clinique, en tant que médecine complémentaire, pousse les scientifiques à tenter de comprendre et décrire les mécanismes biologiques résultant d'une interaction entre ces ondes et l'organisme. Il paraît en effet paradoxal que des ondes, souvent appliquées en un point précis et pénétrant aussi peu profondément dans la peau, puissent avoir un effet sur l'organisme entier. Dans un deuxième

temps, il devient indispensable d'évaluer si l'apparition prochaine de sources d'exposition permanente à des ondes absentes du spectre électromagnétique naturel peut avoir des conséquences pour la santé. Bien qu'ils soient l'objet de débats, de nombreux effets biologiques des ondes MM sont rapportés dans la littérature. Dans ce domaine, les résultats observés par certaines équipes n'ont pu être reproduits. Tout comme dans le domaine de la téléphonie mobile, il existe aussi, entre les équipes de recherche, des divergences importantes dans le choix des modèles d'études, dans les dispositifs expérimentaux utilisés, tout comme dans les choix de fréquence et de puissance.

La compréhension des interactions entre les ondes et les organismes vivants passe par une détermination précise des mécanismes physiques puis biologiques mis en jeu. De par leurs propriétés physiques (longueur d'onde notamment), ces ondes pénètrent très peu au sein de l'organisme. Leur principale cible est la peau, qui constitue la première barrière entre l'organisme et le monde extérieur et possède une organisation en plusieurs couches, chacune d'entre elles possédant des caractéristiques différentes tant au niveau de son organisation, qu'au niveau des cellules la constituant (pour plus de détails, voir la partie Structure de la peau, en annexe III). Les champs électromagnétiques ne vont pas pénétrer de manière homogène au niveau de ces différentes structures. Pour pouvoir comprendre pourquoi une exposition de la peau peut avoir un effet biologique tant sur l'organisme entier qu'au niveau cellulaire, il est avant tout nécessaire de maîtriser l'ensemble des paramètres d'exposition (distribution de DSP, répartition du DAS et de la température dans les échantillons biologiques), ce qui permettra d'assurer une meilleure reproductibilité des expérimentations, ainsi qu'une meilleure compréhension des mécanismes biologiques découlant de cette interaction. Pour cela, des expériences de dosimétrie sont indispensables et permettront d'identifier, pour une fréquence précise, les cibles biologiques potentielles. Dans le domaine des ondes MM, ces expériences sont relativement peu nombreuses ; toutefois la plupart de celles réalisées l'ont été sur des modèles de peau (principale cible des ondes MM) reconstitués numériquement ou encore sur des modèles reconstitués de cultures de cellules *in vitro*. Une fois cette étape franchie, des expériences *in vitro* et *in vivo* pourront ensuite être réalisées.

Dans cette revue de l'état de l'art, nous nous intéresserons dans une première partie aux modèles numériques de peau utilisés pour tenter de comprendre les interactions possibles au cours de traitement par ondes MM puis, tout en détaillant les effets thérapeutiques possibles de ces ondes, nous évoquerons les propositions de mécanismes d'actions. Dans une deuxième

partie nous nous focaliserons sur les travaux publiés sur l'effet potentiel des ondes MM sur différents types de cultures cellulaires. Enfin, dans une dernière partie, nous détaillerons les effets potentiels d'ondes MM sur des biomolécules.

- **Utilisation de modèles de peau et dosimétrie**

La peau est la cible principale des ondes MM. Cette dernière est constituée de trois couches, l'épiderme, le derme et l'hypoderme (pour plus de détails, voir l'annexe III). Suivant la partie du corps exposée (chez l'être humain par exemple), la constitution de l'épiderme peut changer ; l'épaisseur de la couche cornée pouvant être plus épaisse (paume des mains, talons) ou plus fine (peau de l'avant bras). En outre, les teneurs en eau des différentes couches de la peau sont variables. La permittivité des tissus biologiques aux ondes MM, dont la peau, proviendrait de la polarisation des molécules d'eau libres. La couche cornée contient la plus petite quantité d'eau (30-43%), celle-ci étant majoritairement liée, puisque associée à des biomolécules [53]. La quantité totale d'eau contenue dans la partie viable de l'épiderme (hormis la couche cornée) et du derme serait comprise entre 65 et 70%. L'eau serait cependant plus importante dans le derme papillaire que dans le derme réticulaire [54]. L'hypoderme serait caractérisé par une faible teneur en eau. En raison de ces variations, et du fait des compositions différentes de chaque couche de la peau, la distribution du champ EM ne sera donc pas uniforme [55, 56]. Tout ceci est donc à prendre en compte lors des expériences de dosimétrie et illustre bien la difficulté de la tâche. Les expériences de dosimétrie sont indispensables pour permettre de déterminer les paramètres d'interactions entre les ondes MM et la peau tels que :

- La densité de puissance (DSP)
- La profondeur de pénétration des ondes MM
- La réflexion des ondes
- L'augmentation locale de température.

Au cours de leurs expériences, Alekseev et collègues [55, 56, 57] ont tenté d'évaluer la profondeur de pénétration des ondes MM à des fréquences et des puissances proches de celles utilisées en thérapie (42 à 62 GHz, 10 mW/cm²). Pour cela, ils ont effectué des expériences de dosimétrie sur des modèles de peau humaine, et ont démontré que les ondes MM pouvaient pénétrer dans l'épiderme, dont l'épaisseur est de 0,1 mm (pouvant aller jusqu'à 0,7 mm sur certaines parties du corps (talon, paume des mains)) et le derme, dont l'épaisseur est comprise entre 1 et 2 mm. Les profondeurs de pénétration sont de 0,4 mm pour une fréquence de

62 GHz et 0,65 mm pour une fréquence de 42 GHz. Les ondes MM peuvent donc interagir avec les différents types de cellules rencontrées au sein de ces deux couches respectives. Les résultats obtenus pour deux fréquences (42 et 61 GHz) sont représentés dans la **figure 11**.

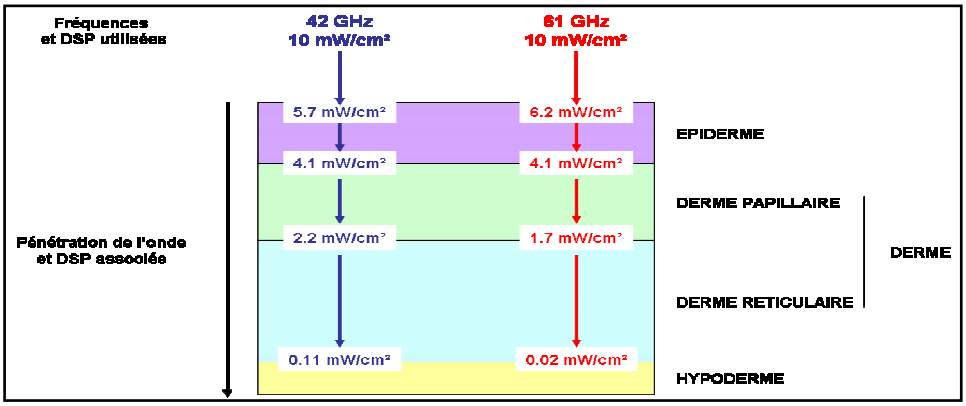

Figure 11 : Dosimétrie par utilisation de modèle numérique de peau
Dans ce modèle, la peau est subdivisée dans ses différentes couches habituelles, épiderme, derme (constitué de la couche de derme papillaire et de la couche de derme réticulaire) et hypoderme. Les DSP dans ces différentes couches ont été calculées pour deux fréquences, 42 et 61 GHz (proches de celles utilisées en thérapie) possédant la même DSP initiale (10 mW/cm²) [55, 56, 57].

Les couches de la peau où pénètrent ces ondes contiennent des types cellulaires différents. Au niveau de l'épiderme, les principales cellules cibles sont les kératinocytes (majoritaires dans cette structure), les mélanocytes, ainsi que les cellules de Langerhans. Le derme papillaire contient quant à lui de nombreuses fibres nerveuses, des capillaires sanguins, ainsi que des cellules de l'immunité, telles que les macrophages et les mastocytes. Enfin, le derme réticulé est très riche en fibroblastes. Ce modèle permet de mettre en avant la DSP associée à chaque couche de la peau, offrant ainsi la possibilité de déterminer la mise en place d'un éventuel mécanisme d'action à la suite d'une exposition.

Enfin, il est possible d'utiliser un modèle numérique de plaque de culture cellulaire pour pouvoir caractériser précisément la distribution du champ EM et du DAS. Cet outil est indispensable puisqu'il est impossible, en conditions expérimentales, d'employer des sondes pour déterminer respectivement les champs électriques et la température dans le milieu. Dans un récent article, Zhadobov et collègues ont déterminé des distributions de DAS local au niveau d'une monocouche de kératinocytes exposés à des ondes de fréquences comprises entre 42 et 64 GHz ; les cellules reposant dans une boîte de culture et étant exposées par en dessous à une DSP de 1 mW/cm². Ils ont ainsi utilisé une méthode numérique de dosimétrie et comparée celle-ci à une méthode de thermométrie IR (à l'aide d'une caméra thermique à haute résolution). A l'issue de cette étude, les auteurs ont confirmé par une approche expérimentale les résultats obtenus avec l'approche numérique [58].

La modélisation numérique est un pré-requis indispensable à toute expérimentation, puisqu'elle permet de caractériser précisément les conditions expérimentales et ainsi d'exclure tout risque d'effet thermique.

- **Les effets des ondes millimétriques utilisées en thérapie**

Cette technique médicale s'est développée en URSS dans les années 70 puis s'est largement répandue dans les pays satellites durant la décennie suivante avec la commercialisation d'appareils spécialement développés à cet effet **(figure 10)** [47]. Ces appareils fonctionnent à des densités de puissance comprises en général autour de 10 mW/cm²; la profondeur de pénétration des ondes dans la peau étant relativement réduite. En général, la thérapie par les ondes consiste en une exposition locale de la peau (2-3 cm de diamètre, **figure 10**) [59] et, curieusement, il semblerait que le site d'application de ces ondes ne soit pas dépendant de la pathologie traitée. En général, hormis les plaies ou pathologies de la peau, les tissus ou les organes affectés sont localisés dans une zone assez éloignée du point d'application de ces ondes. Des applications sont faites au niveau du sternum, des articulations de l'épaule, sur certaines zones du crâne ou encore au niveau des zones biologiques actives recensées par l'acupuncture [48]. Par ailleurs, le nombre d'expositions, ainsi que leur durée semblent variables. Enfin, en raison de la DSP utilisée, seule une légère augmentation de la température de la surface irradiée (de l'ordre de quelques dixièmes de degré) peut être observée, suggérant ainsi que ces ondes ne peuvent générer d'effet thermique important.

L'étude des effets thérapeutiques des ondes MM a connu un essor extrêmement important dans les ex-pays du bloc soviétique tandis que les autres laboratoires occidentaux ne manifestaient pas un réel intérêt. De nombreuses raisons peuvent en partie expliquer ce choix. Avant le développement de cette pratique, très peu d'essais cliniques ont été pratiqués et ceux-ci n'étaient pas aussi stricts que ceux menés dans d'autres pays. Les expériences étaient rarement menées en double aveugle et de nombreux paramètres d'exposition semblaient être choisis de manière arbitraire : DSP incidente, modulation et polarisation du signal, site d'exposition, durée et nombre d'expositions. Autre élément ajoutant des doutes sur cette technique, le choix des fréquences thérapeutiques n'était pas justifié scientifiquement. En ce sens, Pakhomov et collègues soulignent dans leur revue qu'ils n'ont pas retrouvé les publications à l'origine du choix de ces fréquences précises [60], ce qui est aussi souligné dans les travaux plus récents de Radzievsky et collègues [59]. Il est important de noter que

trois fréquences (42,25 GHz, 53,57 GHz et 61,22 GHz) ont pourtant été déclarées d'intérêt thérapeutique par le Ministère Russe de la Santé. Enfin, de nombreuses études ne correspondaient qu'à des cas cliniques impliquant souvent un seul patient, d'où une certaine difficulté à généraliser les résultats obtenus. Pour conclure, il n'a pas été avancé de théorie rationnelle qui permettrait d'expliquer les effets de ces ondes [59]. Malgré tout cela, plus de trois millions de personnes auraient bénéficié de ce type de thérapie. Il semblerait toutefois que les études menées depuis une dizaine d'années commencent à utiliser des protocoles ainsi que des critères d'évaluation d'effets cliniques beaucoup plus stricts et proches de ceux utilisés dans la plupart des autres laboratoires. Peut-être que de nouvelles avancées seront faites dans un avenir proche dans ce domaine.

Il apparaît que les ondes MM pourraient avoir un potentiel clinique intéressant. Cette technique, bien que la plupart du temps employée en complément de méthodes médicales plus conventionnelles, peut toutefois être employée seule. Une liste (non exhaustive) des pathologies traitées par ces ondes (seules ou en complément de traitements pharmacologiques) est résumée dans le **tableau 1** [48].

Pathology	Feature(s) studied	Patients treated	Efficacy	References
Malignant skin melanoma	Absence of metastases after surgery	59*	58.9% during 5-year follow-up versus 28.5% without MWT	(56)
Cancer of ear, nose and throat	Prevention of wound infection after surgery	50*	76% versus 35.3% without MWT	(56)
Atopic dermatitis	Prevention of relapses	112*	85% during 4-year follow-up versus 47% without MWT	(48)
Active lung tuberculosis	Cavities closing after 3 months of treatment	86*	59% versus 30% without MWT	78)
Peptic ulcer	1) Ulcer healing 2) Pain relief	2720*	1) 80.4% 2) 99.7%	(36)
Duodenal ulcer	1) Ulcer healing 2) Pain relief	20**	1) 95% in 2 weeks 2) 100% after 3–4 sessions	(96)
Peptic ulcer	Ulcer healing	148* and 50**	95%* in 17.2 ± 1.7 days 100%** in 11 ± 0.77 days	(62)
Peptic ulcer	Ulcer healing	50**	100% in 2 weeks	(54)
Unstable angina	Microcirculation, lipid peroxidation, immune activity	25* and 25**	Improvement of microcirculation, CD4+/CD8+ T-cells ratio normalization, SOD activity increased, serum complement activity decreased	(83)
Coronary artery disease	General conditions, in-hospital stay, blood tests	326*	Decreased duration of in-hospital stay, decreased stress reaction, improved blood counts	(64)
Acute heart attack	Pain relief	117**	Total pain relief in 97.3% patients	(98)
Hypertension	Cerebral blood flow	45*	Improvement of cerebral blood flow	(44)

* MWT was used together with an appropriate conventional drug therapy; ** MWT was used as a monotherapy.

Tableau 1 : Exemple des différentes pathologies traitées par une thérapie aux ondes MM et efficacités des traitements
Dans certains cas, cette thérapie était utilisée seule, dans d'autres, en complément de traitements médicamenteux [48].

Rojavin et Ziskin ont regroupé les effets thérapeutiques des ondes MM en trois grandes catégories :

- Effets sédatifs et analgésiques
- Effets anti-inflammatoires et stimulation des mécanismes de cicatrisation

- Stimulation du système immunitaire.

Au cours des paragraphes suivants, nous allons donner quelques exemples d'effets recensés pour chacune de ces catégories et détailler l'avancée de la recherche dans ces domaines respectifs.

Effets sédatifs et analgésiques

Dans le domaine de la lutte contre la douleur, cette application peut, par exemple, constituer une alternative aux traitements pharmaceutiques analgésiques classiquement prescrits, ceux-ci ayant un coût non négligeable et pouvant présenter un risque pour la santé des patients (effets secondaires, risque d'accoutumance) [47]. Ces effets sont les plus décrits dans la bibliographie mais de nombreuses publications scientifiques restent peu accessibles puisque rédigées en Russe. De même, de nombreux doutes subsistent sur les protocoles expérimentaux employés, ainsi que sur la reproductibilité possible des résultats obtenus [59]. À titre expérimental, deux laboratoires occidentaux étudient ces effets potentiels, à l'aide d'expériences sur des modèles animaux, ou sur des humains, dans des conditions rigoureusement contrôlées (répartition aléatoire des populations testées, expériences en double aveugle) et les résultats sont parfaitement reproductibles sur ces deux modèles. Le **tableau 2** présente quelques exemples d'emploi possible des ondes MM dans le traitement contre la douleur dans certaines pathologies.

Pain syndrome	Disease/underlying condition	*N*	MW frequency (GHz)	Power density (mW cm^{-2})	Site of MW application	Design	Oxford scale	Source/year
Experimental pain	Immersion in cold water	12	42.25	30	Lower third of sternum	RCT crossover	5	(21)/1999
Headache	Cerebral atherosclerosis	204	54–78	0.003	Carotid sinus, vertebral arteries	nRCT	0	(22)/1998
	Essential hypertension	56	60–63	Missed	AP	RCT	1	(23)/1992
Joint pain	Primary OA	114	55–62	0.01	AP	RCT	1	(25)/1998
	JRA	138	53.5		AP	RCT	1	(26)/1996
	DCTD	12	54–78	2.5	Periarticular tender points	Case series	0	(27)/2003
	RA	12	54–64	2.5	AP	RCT	5	(28)/2003
Postoperative pain	Brain lesions	42	42.25 & 53.5	10	Hands and feet	Case series	0	(29)/1998
	Abdominal surgery	141	37	1	Wound area	RCT	4	(31)/1995
Oral mucous pain	Lichen planus	30	42.25	10	Perioral area	RCT	3	(32)/2001
	'Burning mouth'	80	42.25	10	Perioral area	RCT	3	(33)/2003
Neuropathic pain	Trigeminal neuralgia	52	42.25	10	Branches of trigeminal nerve	RCT	2	(34)/1995

N, number of subjects in the study; MW, millimeter waves; nRCT, non-randomized controlled trial; AP, acupuncture points; JRA, juvenile rheumatoid arthritis; OA, osteoarthritis; DCTD, diffuse connective tissue disease; RA, rheumatoid arthritis.

Tableau 2 : Exemple d'études cliniques menées dans le traitement de la douleur par une thérapie par ondes millimétriques
Ce tableau a pour but de présenter l'emploi possible de la thérapie par ondes MM dans un certain nombre de pathologies, afin de lutter contre la douleur.
L'échelle d'Oxford permet d'évaluer la qualité méthodologique des tests cliniques effectués (au niveau de la répartition aléatoire ou non des patients et des traitements, avec 0 = test clinique qui ne remplit aucun des critères, 5 = tous les critères remplis) [47].

Dans un article récent, Radzievsky et collègues proposent un mécanisme d'action possible des ondes, en se basant sur des modèles expérimentaux de la douleur appliqués à des souris, ainsi que sur les données déjà présentes dans la littérature [59]. Selon leur hypothèse,

l'exposition de la peau à des ondes MM initierait une cascade d'évènements qui pourrait être divisée en 4 étapes :

- Une phase d'initiation
- La transmission du signal au système nerveux central (SNC)
- Une phase de modulation de la fonction du SNC
- Une phase de réponse systémique.

La pénétration des ondes MM au niveau de la peau est inférieure à 0,5 mm (selon la fréquence employée). Ceci limite par ailleurs le nombre de cibles possibles de ces ondes au sein de l'épiderme. Il existerait cependant des petites terminaisons nerveuses libres au niveau des couches superficielles de la peau. Cette interaction entre les ondes et les terminaisons nerveuses libres, qu'elle soit directe ou non, semble être une étape obligatoire à l'effet induit par les ondes. Pour étayer cette hypothèse, ils se basent sur des résultats obtenus lors de précédentes études menées sur des cultures *in vitro* de neurones et nerfs isolés, où il apparaissait que ceux-ci pouvaient modifier leurs caractéristiques fonctionnelles en réponse aux ondes [61]. Il semblerait donc que les ondes MM à certaines fréquences puissent influencer l'activation des neurones sensitifs, ceux-ci absorbant sélectivement l'énergie des ondes, en raison d'une teneur en eau plus importante que le reste de l'épiderme, ce qui pourrait provoquer l'apparition locale d'un gradient de température. De même, dans leurs travaux, Radzievsky et collègues ont montré que l'exposition aux ondes MM entraînait des modifications de la concentration en enképhaline, molécule appartenant à la famille des opioïdes endogènes, connue pour être impliquée dans la réponse aux stimuli de la douleur mais aussi dans la régulation de fonctions vitales (faim, soif, système immunitaire) [59]. Ceci pourrait donc expliquer les effets biologiques observés. Cette hypothèse de mécanisme d'action est extrêmement séduisante mais reste cependant à confirmer non seulement par des études cliniques, mais aussi par des études de biologie cellulaire.

Effets anti-inflammatoires

Il apparaît que les ondes MM puissent moduler la réponse inflammatoire. Lorsque l'on se réfère aux effets décrits dans le paragraphe précédent, on ne peut s'empêcher de penser, tout du moins dans certains cas pathologiques, à l'implication de cellules pro-inflammatoires. Szabo et collègues ont tenté de comprendre pourquoi de nombreuses pathologies (de la peau notamment) causées par des inflammations furent guéries par des thérapies aux ondes MM. Pour cela, ils se sont focalisés sur le rôle potentiel des kératinocytes et ont exposé la lignée

cellulaire HaCaT (issue de kératinocytes) à une fréquence thérapeutique (61,22 GHz). Ils ont observé une augmentation de la sécrétion de l'interleukine-1β (IL-1β), molécule pro-inflammatoire. Celle-ci pourrait expliquer l'effet thérapeutique des ondes, puisque par sa sécrétion dans la circulation sanguine elle servirait de messager moléculaire et activerait d'autres cellules [62]. Plus récemment Gapeyev et collègues ont étudié les effets anti-inflammatoires des ondes MM de faible puissance, en mettant en avant des effets fréquences et puissances dépendants dans un modèle d'inflammation aiguë chez des souris [63]. Selon ces auteurs, la dépendance d'une réponse biologique à une fréquence précise pourrait être causée par l'influence des ondes sur la dynamique structurale et les transitions physicochimiques dans les protéines. Concernant l'effet anti-inflammatoire observé expérimentalement, ils ont proposé le modèle suivant : lors d'un traitement aux ondes, les mastocytes[1] de la peau libèrent les substances qu'ils synthétisent, en raison d'une modification de la concentration en Ca^{2+} libre intracellulaire (provoquée par le traitement aux ondes). Les substances libérées dans le flux sanguin jouent un rôle clef dans les processus inflammatoires ou immunitaires. Une des molécules principalement relarguée, l'histamine, aurait un effet anti-inflammatoire et réduirait la migration ainsi que l'activité fonctionnelle des phagocytes et des lymphocytes T [2] [63].

Stimulation du système immunitaire

Les ondes MM peuvent accélérer les processus de cicatrisation et stimuler le système immunitaire. De nombreuses expériences ont été menées sur des animaux de laboratoire présentant des blessures. L'application des ondes MM directement sur une surface infectée pourrait réduire la contamination microbienne et augmenter la sensibilité des micro-organismes aux antibiotiques. De même, la thérapie par ondes MM pourrait accélérer la récupération chez des patients atteints de fractures ou souffrant de plaies (consécutives à des brûlures par exemple), infectées ou non. Cette thérapie est aussi beaucoup utilisée pour soigner les ulcères.

Les ondes MM pourraient aussi moduler le système immunitaire de manière non spécifique, puisque dans certains cas, il a été observé que l'activité phagocytaire des

[1] Les mastocytes sont des petites cellules hautement spécialisées jouant un rôle de protection des tissus épithéliaux (dont la peau), des muqueuses et des petits capillaires sanguins contre des agents pathogènes

[2] Les lymphocytes sont une classe de globules blancs (leucocytes) présentant des récepteurs de surface aux antigènes variables. Il existe deux classes principales de lymphocytes, les lymphocytes T, qui régissent l'immunité cellulaire, et les lymphocytes B, qui régissent l'immunité humorale, en sécrétant des protéines dénommées immunoglobulines ou anticorps. Pour plus de détails, se reporter à l'annexe IV.

macrophages a été accentuée, tandis que dans d'autres, il peut se produire une augmentation de la synthèse des lymphocytes T ainsi qu'un rééquilibrage du ratio des lymphocytes T CD4+/CD8+. Enfin, il a aussi été observé une plus grande quantité de lymphocytes B, ainsi qu'une sécrétion normalisée d'immunoglobulines. La plupart des revues scientifiques relatant ces effets ne sont malheureusement pas disponibles en anglais mais sont toutefois relevées par Rojavin et Ziskin, dans leur travail de synthèse effectué en 1998 [48].

Lors de traitements de cancers, la thérapie par ondes MM a été utilisée en complément de la chimiothérapie et de la radiothérapie afin de stimuler le système immunitaire mais aussi de réduire les effets toxiques de ces deux dernières. Une étude menée en 2006 par Makar et collègues a justement tenté de déterminer l'action conjuguée du cyclophosphamide (CPA), médicament anti-cancéreux, avec celle des ondes MM de 61,22 GHz sur les fonctions immunitaires de souris [64]. Le CPA, médicament largement utilisé en chimiothérapie, produit des effets secondaires importants puisqu'il abîme les tissus hématopoïétiques et lymphoïdes et entraîne par conséquent un affaiblissement important du système immunitaire. Dans ces travaux, Makar et collègues ont ainsi montré que l'exposition aux ondes MM permettait de restaurer la synthèse du facteur-alpha nécrosant de la tumeur (« tumor necrosis factor alpha », TNF-α) produit par les macrophages, alors que celle-ci avait disparu, suite au traitement au CPA. Cette substance, appelée cytokine[1], est produite par les macrophages activés et va orchestrer la différenciation, l'activation, la prolifération et la survie de la plupart des cellules immunocompétentes. En parallèle à cette reprise de synthèse, un taux de prolifération plus important des lymphocytes T est observé, accompagné d'une augmentation significative de la synthèse d'interféron γ (IFN-γ) (produit par ces mêmes lymphocytes). L'IFN-γ est la principale cytokine capable de stimuler l'activation des macrophages, afin que ceux-ci produisent le TNF-α. Dans cette étude, l'exposition aux ondes MM aurait activé les cellules impliquées dans l'immunité à médiation cellulaire (les lymphocytes T). Le mécanisme d'action proposé par les auteurs est identique à celui détaillé dans le traitement de la douleur (voir plus haut) puisque, en résumé, il semblerait que les opioïdes endogènes régulent le relargage de cytokines des lymphocytes T et des macrophages, résultant ainsi en une protection contre les effets secondaires induits par les médicaments anticancéreux tels que le CPA.

Des travaux, menés par la même équipe, dans la même lignée cellulaire, ont été entrepris afin de déterminer si les ondes MM à 42,2 GHz pouvaient avoir un effet sur les

[1] Cytokine : petite protéine soluble produite par une cellule (par exemple un macrophage) et capable de modifier le comportement ou les propriétés de cette même cellule ou bien d'autres cellules [32].

fonctions des cellules natural killer[1] (NK) chez des souris, à la suite d'un traitement au CPA. Ces cellules NK sont activées par le CPA de manière significative au bout de 7 jours de traitement. Cette activation se traduit par l'expression, au niveau de la membrane plasmique de ces cellules, d'une protéine nommée CD69, qui peut agir comme un co-stimulateur de la sécrétion de cytokines. Associée à cette activation, une augmentation significative de production de TNF-α est aussi observée mais, paradoxalement, le CPA provoque une inhibition de l'activité cytolytique des cellules NK. Lorsque les souris sont traitées au CPA et en parallèle soumises aux ondes MM, l'augmentation d'activation des cellules NK est encore plus prononcée. De même, celles-ci récupèrent leur capacité cytolytique. Les ondes MM pourraient moduler l'effet du CPA sur les cellules NK. Le mécanisme exact de protection du système immunitaire par les ondes MM est encore mal compris [65].

- **Cultures de cellules *in vitro* et exposition de biomolécules**

En 1998, Pakhomov et collègues ont réalisé un important travail de synthèse sur les travaux menés dans ce domaine [60].

Historiquement, les premiers travaux menés par Webb et Dodds à la fin des années 60 ont mis en évidence que les ondes MM à 136 GHz pouvaient ralentir la croissance de *E. coli*. Peu de temps après, l'équipe de Grundler détermina l'existence de fréquences particulières, comprises entre 41,8 et 42 GHz, qui pouvaient accélérer ou ralentir la croissance de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). A la suite de ces études, Fröhlich proposa le premier mécanisme d'action potentiel des ondes MM, qui reposait sur l'hypothèse de l'existence de vibrations électriques cohérentes. Cette théorie suggérait que l'énergie fournie par des ondes MM pourrait constituer une manière de réguler la croissance d'organismes biologiques [8]. Les résultats expérimentaux ainsi que la théorie découlant de ces résultats ne furent pas confirmés par d'autres équipes de recherche. Les études dans ce domaine ont par la suite cessé, pour reprendre vers la fin des années 80 où les résultats obtenus depuis présentent toujours des contradictions. Celles-ci peuvent, par exemple, être résumées par les travaux de l'équipe de Beneduci, qui mettent en avant le fait que des cellules exposées à des ondes MM, à une DSP inférieure à 10 mW/cm² ne se comportent pas de la même manière selon leur origine, cancéreuse ou normale. Outre le type cellulaire exposé, les effets biologiques

[1] Cellules NK : ces cellules, très proches morphologiquement des lymphocytes sont des représentantes majeures de l'immunité innée. Elles ne possèdent pas de récepteurs spécifiques aux antigènes et luttent contre les infections virales ou les cellules malignes par une activité cytotoxique. Elles produisent en outre un nombre important de cytokines.

semblent aussi dépendre de la fréquence d'irradiation et de la durée de celle-ci. Leurs expériences, réalisées entre 53,57 GHz et 78,33 GHz à une DSP de 1 µW/cm² ont mis en évidence une baisse de la prolifération cellulaire, sans pour autant constater d'augmentation de la mortalité [66]. Plus récemment, cette équipe n'a pas démontré d'effet antiprolifératif des ondes MM, à une DSP inférieure à 1 mW/cm², à des fréquences proches de celles utilisées en thérapie (42,20 et 53,57 GHz) sur des cellules issues de mélanomes [67].

Les études des effets des ondes MM ne se cantonnent pas simplement à leur impact sur la prolifération cellulaire. D'autres pistes ont aussi été explorées, portant par exemple sur l'interaction des ondes MM sur les membranes et les tissus excitables. Aussi, au cours de cette partie, nous essaierons de résumer les résultats des travaux les plus récents.

Pour décrire les effets biologiques sur les cultures de cellules *in vitro*, il faut distinguer les études à des doses dépassant les limites recommandées d'exposition de celles inférieures aux limites d'exposition. Dans le premier cas, les effets biologiques observés seront liés à un effet thermique. En général, l'hyperthermie conduit à un choc thermique, lequel entraînera l'induction des protéines de choc thermique. Suivant son intensité, ce choc thermique mènera à une mort cellulaire qui pourra prendre l'une ou l'autre forme (nécrose[1] cellulaire à des températures élevées, ou apoptose[2] à une température plus modérée) en fonction de la puissance reçue [68].

Dans leur étude, Zhadobov et collègues ont étudié l'expression de deux protéines chaperons, HSP70 et la clusterine, connues pour être particulièrement sensibles à une large variété de stress environnementaux. Les auteurs se sont penchés sur quelques phénomènes clefs allant de la transcription de ces gènes à la traduction des protéines correspondantes, à l'aide d'outils de biologie moléculaire, dans une lignée cellulaire gliale humaine, après exposition à des ondes MM, à deux DSP différentes (5,4 µW/cm² ou 0,54 mW/cm²), durant 16h ou 33h à 60 GHz. Les résultats obtenus ne démontrent pas d'activation de ces deux protéines chaperons, ce qui sous-entend que l'exposition ne provoque pas de dénaturation massive des protéines [69].

Beneduci et collègues ont, quant à eux, réalisé une observation-ultra structurale et ont constaté que, après des expositions comprises entre 53,57 et 78,33 GHz à une DSP de

[1] Nécrose : mort brutale accidentelle des cellules. Les cellules gonflent, éclatent et libèrent leur contenu dans le milieu, pouvant ainsi provoquer une réponse inflammatoire.
[2] Apoptose : mort cellulaire programmée, caractérisée par un changement morphologique de la cellule. Les cellules vont être fragmentées en petites vésicules entourées de membrane plasmique et être dégradées par les cellules environnantes et les macrophages, sans provoquer de réponse inflammatoire.

1 µW/cm², le nombre de mitochondries des cellules était beaucoup plus important, celles-ci se localisant préférentiellement au niveau des zones consommatrices d'énergie (RE, Golgi). Un nombre de vésicules cytoplasmiques plus important a aussi été observé dans ces cellules. Enfin, lors de mesures expérimentales, le métabolisme anaérobie des cellules exposées était plus réduit, tandis que le métabolisme aérobie était beaucoup plus marqué. Les auteurs n'excluent donc pas qu'une exposition aux ondes, qui constitue une modification des conditions environnementales, pourrait provoquer des perturbations physiologiques des cellules qui, pour s'adapter, produisent plus d'énergie [66].

Szabo et collègues ont constaté que des ondes MM d'une DSP de 1,23 W/cm² induisait des changements structuraux au niveau de la membrane plasmique de cellules issues de kératinocytes humains (HaCaT), ainsi que celles issues d'un mélanome murin (B16F10), se traduisant par des phénomènes d'externalisation de phosphatidylsérine (PS). En temps normal, ces phospholipides membranaires sont maintenus en permanence au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique par des processus actifs. Leur externalisation, normalement irréversible, constitue habituellement une étape précoce de l'apoptose. Pourtant, lors de l'exposition des cellules aux ondes MM, il apparaissait que cette externalisation était réversible et n'avait pas de conséquences [68]. Des expériences complémentaires ont démontré que l'inversion réversible des PS pouvait se produire à des puissances plus basses que celles utilisées, puisque dans un autre type cellulaire, avec une DSP de 34,5 mW/cm², les mêmes phénomènes ont pu être observés. Il semblerait donc que cette externalisation puisse provoquer une exposition à l'environnement extra-cellulaire de sites biologiquement actifs, pouvant ainsi mener à des phénomènes biologiques.

Dans cette logique, il est possible de recourir à l'utilisation d'un modèle d'étude simplifié, notamment les membranes biologiques artificielles (ou biomembranes) ou encore les vésicules lipidiques ou liposomes (voir annexe II pour plus d'informations). En 2006, Zhadobov et collègues ont étudié les effets des ondes MM à 60 GHz sur des membranes biologiques artificielles. Au cours de cette étude, et en prenant en compte différents paramètres (durée d'exposition, polarisation de la fréquence), il a été démontré qu'un faible niveau de DSP (9 µW/cm²) pouvait conduire à une augmentation visible de la pression latérale s'exerçant sur une monocouche phospholipidique, sans pour autant mener à des modifications ultrastructurales [70]. Plus récemment Ramundo-Orlando et collègues ont irradié des vésicules phospholipidiques géantes à des ondes MM à 0,1 mW/cm². La fréquence retenue était de 53,37 GHz, considérée comme une des fréquences thérapeutiques. Ils ont

observé, en temps réel et directement au microscope, si les ondes pouvaient déformer ces structures. Il semblerait que l'interaction entre les ondes électromagnétiques et les résidus dipolaires présents à l'interface entre la membrane et la solution aqueuse pourrait être à l'origine de la perturbation de ces structures. Ces perturbations se manifestaient par des modifications ultrastructurales (changement de forme), accompagnées d'une mobilité et d'une interaction entre vésicules plus importante. Il est intéressant de noter que, comme rapporté dans l'étude de Zhadobov et collègues, ces effets sont réversibles et ne semblent pas liés à un quelconque effet thermique [71].

1.3 Conclusion

L'utilisation massive des ondes MM dans les futurs systèmes de communication sans fil ne va pas sans poser de questions quant aux risques encourus par les utilisateurs potentiels. Leur utilisation dans le domaine médical, en complément des méthodes thérapeutiques « conventionnelles », tend à démontrer qu'un effet biologique serait possible et ce, à des puissances relativement réduites, puisque comprises autour de 10 mW/cm². Des hypothèses de mécanismes d'action de ces ondes sur l'organisme entier ont été formulées et impliqueraient la mise en route de phénomènes de sécrétions de différents types de facteurs (anti-inflammatoires, cytokines, neuromédiateurs), conduisant à un effet biologique [47, 48].

Les études portant sur les effets potentiels des ondes MM de faible puissance (≤ 1 mW/cm²) sont peu nombreuses. Il ne peut y avoir d'effets thermiques mais une exposition prolongée pourrait produire des effets biologiques potentiels. Aussi, il paraît intéressant de tenter de comprendre plus en détails les mécanismes exacts d'interaction de ces ondes avec le vivant. Pour cela, il est nécessaire de travailler, dans un premier temps, avec des modèles d'études simplifiés, notamment des cultures de cellules. Au cours de ce travail de thèse, nous avons donc tenté de déterminer si les ondes MM à des DSP proches de celles utilisées par les futurs systèmes de télécommunications pouvaient avoir des effets potentiels sur celles-ci. L'étude de la littérature montre que les ondes MM sont capables de modifier l'état structural des phospholipides dans les biomembranes [70, 71] ou d'induire des changements dans la structure des membranes cellulaires [68]. Elles pourraient par ailleurs perturber les phénomènes d'échanges ioniques [60, 72, 73]. Enfin, l'utilisation de ces ondes en thérapie démontre qu'il existe un effet biologique de ces ondes, qui provient à la suite d'une mobilisation du système sécrétoire (cytokines) [64, 65]. De ce fait, le RE pourrait constituer

une cible potentielle intéressante des ondes MM. Cet organite riche en membranes est impliqué dans la synthèse des lipides et des protéines membranaires et sécrétées, et consititue le lieu de stockage principal du Ca^{2+} cellulaire. Il présente la particularité d'être particulièrement sensible à son environnement (stress oxydant, carence en glucose, etc…) mais a développé une stratégie d'adaptation parfaitement efficace pour faire face aux conditions changeantes de celui-ci. Dans la partie suivante, nous allons expliquer en détails le phénomène de stress réticulaire, ainsi que les mécanismes d'action mis en jeu par la cellule pour s'y adapter.

Deuxième partie : Le stress du réticulum endoplasmique

2.1 Définition

Le RE est un organite membranaire où va transiter l'ensemble des protéines sécrétées et transmembranaires de la cellule. Elles y pénètrent sous la forme de chaînes polypeptidiques et sont rapidement prises en charge par différents types de facteurs résidants dans le RE pour subir de nombreuses modifications post-traductionnelles ; c'est l'étape de maturation des protéines. Les protéines naissantes vont ainsi acquérir leur structure tridimensionnelle, en étant prises en charge notamment par des protéines chaperons, dont la concentration est particulièrement élevée dans la lumière du RE. Le principal chaperon du RE est la protéine BiP/GRP78 (Immunoglobulin Heavy-Chain Binding Protein/78 kDa Glucose Regulated Protein), qui est impliquée dans l'aide au repliement des protéines néosynthétisées, tout en prévenant le phénomène d'agrégation lorsque celles-ci se retrouvent à l'état intermédiaire. BiP est considéré comme l'équivalent, dans le RE de la protéine cytosolique de choc thermique HSP70, ces deux protéines partageant 60% d'homologie au niveau de leur structure, dont le domaine ATPase[1] et le domaine de liaison au peptide. Au sein du RE, lors de la synthèse de nouvelles protéines, le chaperon BIP fonctionne en interaction au sein d'un complexe multiprotéique constitué entre autre d'autres protéines chaperons, telles que GRP94 et ORP150/GRP170 (pour Oxygen-Regulated Protein 150 ou 170 kDa Glucose Regulated Protein). ORP150 est une protéine chaperon multi-facettes, puisque outre sa fonction initiale (chaperon du RE), elle possède aussi un rôle protecteur vis-à-vis de la cellule, notamment en cas de stress oxydant par exemple, où cette protéine pourrait bloquer le relargage du Ca^{2+} du RE vers le cytosol, mécanisme généralement lié à l'apoptose [74]. Enfin, cette protéine peut aussi être surexprimée en réponse à une hypoxie[2] [75]. Pour pouvoir remplir leurs fonctions, les chaperons fonctionnent en synergie avec des co-chaperons spécifiques du RE, tel que SIL1 (facteur d'échange de nucléotide pour BiP) par exemple [76].

En plus d'êtres repliées, les protéines subiront aussi d'autres modifications, dont la formation de ponts disulfures entre les cystéines (sous l'action des protéines disulfures isomérases appelées PDI), du fait de l'environnement oxydant dans la lumière du RE [77], ainsi que des phénomènes de glycosylation via des glycosidases (annexe II). Le RE, dont les

[1] ATPase : enzyme qui catalyse l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP).
[2] Hypoxie : diminution de la quantité d'oxygène (O_2) utilisable par les tissus.

fonctions sont finement régulées, fait partie intégrante de la cellule et peut être directement victime des perturbations subies par celle-ci.

Au quotidien, les cellules doivent faire face à des variations de niveaux de métabolites et de flux ioniques, ainsi qu'à des afflux de protéines sécrétées ; autant de phénomènes nécessitant des petits ajustements au niveau physiologique. Ces derniers sont parfois beaucoup plus importants afin que les cellules puissent faire face à différents types de stress environnementaux (hypoxie, exposition à des radicaux libres, rayonnements ionisants, toxines ou produits chimiques) et se traduisent par la mise en route d'un programme d'adaptation ou sous la forme de modifications de l'état physiologique de la cellule, qui se traduisent par la synthèse de protéines spécialisées. La mise en route de ces mécanismes met ainsi à contribution le RE ; on parle alors de stress réticulaire ou stress du RE. Dans la **figure 12** [78] sont repris les différents facteurs capables de déclencher un stress du RE.

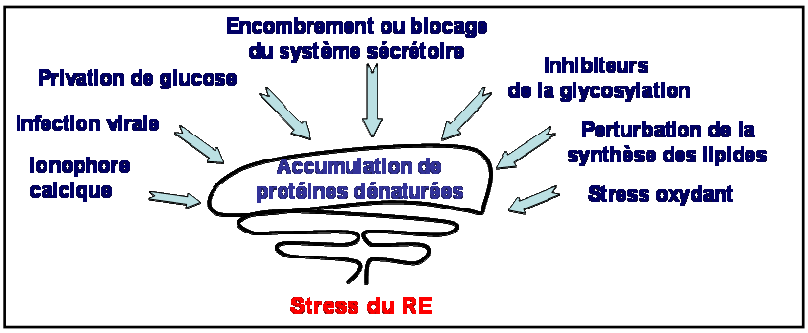

Figure 12 : Exemples d'évènements pouvant mener à un stress réticulaire
Les facteurs déclenchants peuvent être d'origine naturelle ou artificielle, adapté d'après [78].

Dans certains cas, le déséquilibre entre la charge en protéines à conformer et à maturer, et la capacité du RE à remplir cette tâche sera trop important. Concrètement, la quantité de protéines à replier sera trop importante et le RE ne pourra plus y faire face [79, 80, 81]. Ce phénomène peut se produire naturellement dans certaines cellules spécialisées ; c'est le cas notamment lors des réactions immunitaires où interviennent des plasmocytes, qui sécrètent des anticorps et présentent un RE extrêmement développé. Ce phénomène est aussi retrouvé dans les cellules β du pancréas (sécrétant l'insuline) ou les hépatocytes, qui sont des cellules à forte capacité sécrétrice.

En dehors de ces cas « physiologiques », où la cellule contrôle, jusqu'à un certain seuil, son état de stress réticulaire (les phénomènes décrits précédemment sont épisodiques), d'autres évènements peuvent aussi concourir à le déclencher. Une infection virale peut entraîner une synthèse massive de protéines dans le RE, le virus détournant la machinerie cellulaire pour pouvoir synthétiser ses propres protéines et proliférer [82]. Enfin, il existe

aussi des sources de stress dites endogènes, lesquelles sont causées par des maladies dites conformationelles **(tableau 3)** [82].

Type/disease	Affected protein
Cystic fibrosis	CFTR
Diabetes mellitus	Insulin receptor
Albinism/tyrosinase deficiency	Tyrosinase
α_1-Antitrypsin deficiency without liver disease	α_1-Antitrypsin
Cardiovascular diseases	Lipoprotein(a)
Congenital hypothyroidism	Thyroglobulin
	Thyroid peroxidase
	Thyroxine binding globulin
Familial hyperchylomicronemia	Lipoprotein lipase
Familial isolated hypoparathyroidism	Preproparathyroid hormone
Global polyendocrinopathy associated with obesity and infertility (*fat/fat* mouse)	Carboxypeptidase E
Hemophilia A	Factor VIII
Hypercholesterolemia	LDL receptor
Laron dwarfism	Growth hormone receptor
Diabetes insipidus	Arginine vasopressin (AVP)
	AVP receptor 2
	aquaporin-2
Obesity	Prohormone convertase 1
Osteogenesis imperfecta	Type I procollagen
	Decorin
Parkinsonism, autosomal recessive juvenile	Pae I receptor
Protein C deficiency	Protein C
Spondyloepiphyseal dysplasia due to hypochondrogenesis	Type II procollagen
von Willebrand disease	von Willebrand factor
Spondyloperipheral dysplasia	Type II collagen
β-Amyloid toxicity	β-Amyloid
α_1-Antitrypsin deficiency with liver disease	α_1-Antitrypsin
Charcot-Marie-Tooth disease	Peripheral myelin protein PMP22
Diabetes mellitus in the Akita mouse	Insulin 2
Pelizaeus-Merzbacher leukodystrophy	Proteolipid protein
Pre-senile dementia/myoclonus	Neuroserpin
Abetalipoproteinemia	Apolipoprotein B/microsomal triglyceride transfer protein
Combined coagulation factors V and VIII deficiency	Factor V, factor VIII/LMAN1
	Factor V, factor VIII/MCFD2
Bipolar disorder	XBP-1
Colitis (mouse model)	IRE1β
Diabetes mellitus (mouse model)	PERK
Hypoglycemia (mouse model)	eIF2α
Wollcott-Rallison syndrome	PERK
Polyglutamine diseases (dentatorubral-pallidoluysian atrophy, Huntington's disease, spinobulbar muscular atrophy, spinocerebellar ataxia)	Proteasome

Tableau 3 : Exemple de pathologies liées à un problème d'assemblage ou de repliement d'une protéine, entraînant un stress réticulaire
Adapté d'après Schröder, Kaufman [82].

Un stress réticulaire qui se prolonge peut mettre en péril la cellule. Dans un type de diabète, la mutation d'une cystéine au niveau du précurseur de l'insuline empêche la

maturation de celui-ci dans le RE et bloque la sécrétion, entraînant un stress réticulaire permanent qui conduira à la mort des cellules β du pancréas [83]. Il est important de souligner qu'une cellule ne meurt pas dès qu'un évènement, d'origine naturelle ou non, vient perturber ou menacer son homéostasie ; celle-ci est capable de s'adapter en mettant immédiatement en jeu des mécanismes pour tenter d'y faire face. Le RE ne déroge pas à cette règle puisque la cellule a développé un véritable contrôle de l'homéostasie du réticulum, lequel se traduit par la présence de différents capteurs au sein de la lumière de celui-ci, capables, en cas de problème, d'activer une voie de signalisation spécifique (par le biais d'effecteurs). Ceci permettra de véhiculer l'information dans d'autres compartiments cellulaires (notamment le noyau), afin qu'une réponse se mette en place. Cette voie de signalisation est appelée voie de réponse aux protéines mal repliées (en anglais UPR pour « Unfolded Protein Response ») [82].

2.2 Description de la voie UPR

Il s'agit d'une voie de signalisation intracellulaire qui permet de répondre de manière adaptative, (c'est-à-dire en plusieurs étapes) à la charge importante en protéines non conformées. Cette voie d'activation a initialement été découverte chez la levure *S. cerevisiae* et est présente chez tous les eucaryotes, même s'il peut exister quelques différences. Chez les mammifères, on retrouve, dans la membrane du RE, trois protéines transmembranaires servant de « capteurs » au stress réticulaire et capables de déclencher la réponse UPR via l'activation de voies de signalisation **(figure 13)**.

Parmi ces trois protéines transmembranaires, on distingue IRE1 (pour inositol-requiring enzyme-1), qui constitue la branche la plus conservée de la voie UPR, puisqu'elle est retrouvée chez tous les eucaryotes, de la levure aux mammifères, ainsi que ATF6 (activating transcription factor 6) et PERK (protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase), qui sont toutes deux absentes chez la levure [84]. Dans un premier temps, il y a une réduction de la charge en protéines entrant dans le réticulum, grâce à une diminution de la synthèse des protéines. En parallèle, le RE va accroître sa capacité à conformer et à replier ces protéines en augmentant considérablement l'activation transcriptionnelle de gènes cibles de la voie UPR ; plus particulièrement ceux codant des protéines résidantes du RE (chaperons, PDI). Ces efforts pour tenter de reconformer les protéines peuvent toutefois s'avérer vains.

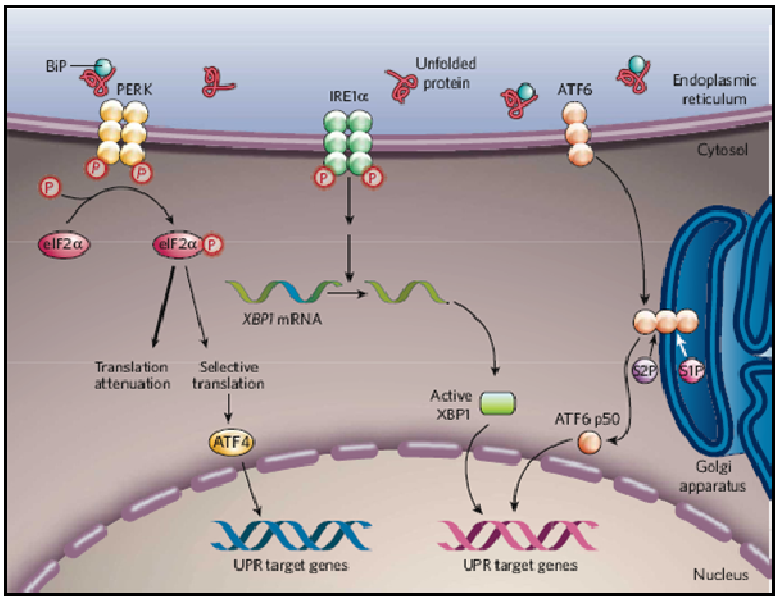

Figure 13 : Voie de signalisation UPR chez les mammifères
Dans des cellules non stressées, la protéine chaperon BiP est liée aux trois transducteurs transmembranaires ATF6 (activating transcription factor 6), IRE1 (inositol requiring enzyme 1) et PERK (protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase), les maintenant dans un état inactif. Lors d'un stress réticulaire, provoqué par l'accumulation de protéines mal conformées, BiP se lie préférentiellement à celles-ci, libérant les trois transducteurs transmembranaires, entraînant ainsi leur activation. Cette activation est séquentielle puisque dans un premier temps c'est PERK qui, par la phosphorylation de eIF2α, va diminuer la traduction des protéines et entraîner une transactivation des gènes cibles spécifiques de la voie UPR. BiP libère aussi IRE1 qui va activer un facteur de transcription spécifique appelé XBP1 (X-box binding protein 1), lequel active à son tour la synthèse de gènes cibles. Enfin, ATF6 constitue le dernier mécanisme, qui, lorsqu'il est activé par la libération de BiP, est transloqué dans l'appareil de Golgi où il est clivé par deux protéases spécifiques, S1P (site 1 protease) et S2P (site 2 protease), qui libèrent un fragment cytosolique (ATF6 p50) qui migre ensuite dans le noyau et active à son tour la synthèse de gènes cibles [79].

La voie UPR va aussi induire l'activation transcriptionnelle des protéines de la voie de dégradation associée au RE (voie ERAD pour « ER associated degradation ») qui ont pour but d'éliminer du RE les protéines mal conformées ; ces dernières étant sorties du RE, puis dégradées par le système ubiquitine/protéasome. Au cours cette réponse adaptative, un phénomène d'expansion du RE se produit également [81, 85, 86]. Celui-ci est particulièrement visible au niveau morphologique chez certaines cellules sécrétrices telles que les cellules β du pancréas ou encore les plasmocytes. Enfin, si tous ces mécanismes ne parviennent pas à rétablir l'homéostasie du RE, il y aura alors déclenchement de l'apoptose [79, 80].

A. La voie PERK

Cette branche de la voie UPR est la première à se mettre en place, et contribue à atténuer la traduction de protéines, réduisant ainsi la charge du RE en protéines néosynthétisées, évitant l'accumulation inutile des protéines mal conformées [87, 88]. Cette

voie est régulée par PERK, qui est une protéine transmembranaire du RE possédant un domaine transducteur dans la lumière du RE et un domaine kinase cytoplasmique. En cas de stress du RE, le chaperon BiP libère le domaine transducteur de PERK, laquelle va s'homodimériser et s'autophosphoryler **(figure 14)**.

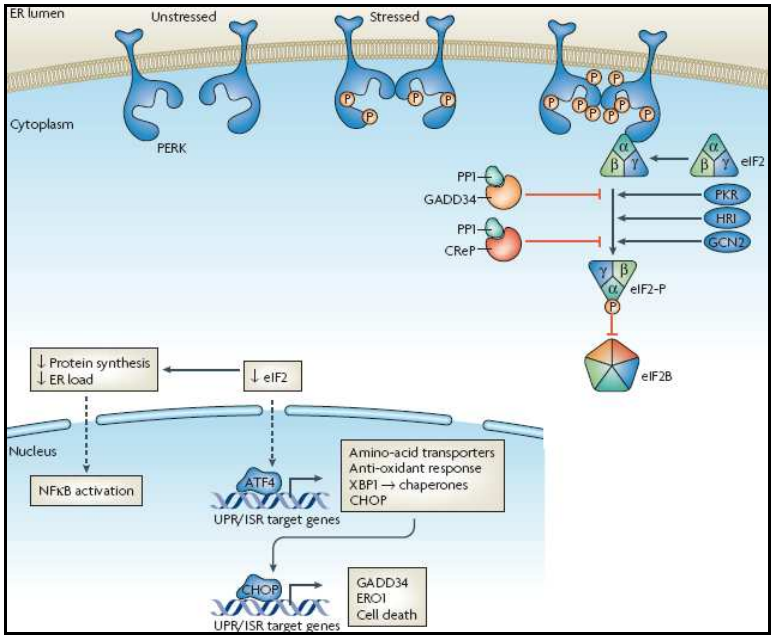

Figure 14 : Voie de signalisation PERK
En réponse à un stress réticulaire, PERK s'oligomérise dans le plan de la membrane du RE, et est activée par trans-autophosphorylation. Cette kinase va alors phosphoryler la sous-unité α du complexe eIF2 (eukaryotic translation initiation factor 2), inhibant le complexe eIF2B et résultant ainsi en une réduction de la synthèse protéique. En absence de stress du RE, cette voie des eIF2 kinases peut être activée par d'autres kinases (PKR (interferon inducible, double stranded RNA-activated kinase), HRI (haem-regulated inhibitor kinase) et GCN2 (general control non-derepressible gene 2)). Cette branche de la voie UPR est appelée réponse intégrée au stress.
En cas de stress du RE, il y aura une synthèse réduite de protéines, laquelle aura pour conséquence de diminuer la charge du RE. Paradoxalement, la diminution d'eIF2 va entraîner l'augmentation de la synthèse d'un facteur d'activation de la transcription, ATF4 (activating transcription factor 4), qui va activer des gènes de la voie UPR, notamment ceux impliqués dans la synthèse de transporteurs des acides aminés, dans la lutte contre le stress oxydant ou dans l'activation de la transcription de XBP1. Le facteur d'activation CHOP (C/EBP homologous protein) sera aussi transcrit et va induire la synthèse du gène GADD34, lequel conduira à une déphopshorylation de eIF2α, conduisant à la fin de la réponse UPR/ISR. En parallèle, le gène ERO1 (ER oxidase 1) sera aussi synthétisé (il a pour rôle d'aider à la formation des ponts disulfures des protéines en cours de repliement). Cette voie pourra enfin conduire à l'activation de la mort cellulaire. Il semblerait que la présence d'eIF2α phosphorylée conduise à l'activation de NFκB mais les mécanismes d'action précis sont encore mal compris [79].

En temps normal, le facteur eucaryote d'initiation de la traduction (eIF2, pour eukaryotic translation initiation factor 2) forme un complexe avec la guanosine triphosphate (GTP) et régule la liaison entre l'ARN de transfert initiateur[1] et la petite sous-unité ribosomique. Dans de nombreuses situations (infection virale, hypoxie, déprivation en nutriments) mais aussi lors d'un stress réticulaire, les cellules doivent diminuer leur synthèse en protéines et, pour cela, peuvent, par le biais de kinases spécifiques, phosphoryler la sous-

[1] ARNt initiateur : ARN de transfert spécifique, initiateur de la traduction, il porte toujours la méthionine.

unité α de eIF2, provoquant une séquestration par eIF2B et empêchant ainsi tout recyclage de eIF2-GDP. Ceci entraîne une réduction importante de la synthèse protéique [89].

En parallèle à ce mécanisme d'action principal, PERK peut aussi entraîner une diminution de la synthèse d'ARN ribosomaux (ARNr) en provoquant la dissociation entre un des facteurs de transcription spécifique (RRN3/TIF-IA) et l'ARN polymérase I du promoteur de l'ARNr [90]. Le mécanisme exact n'est pas encore identifié à ce jour, mais il semblerait que la phosphorylation de eIF2α y joue aussi un rôle. Enfin, cette phosphorylation pourrait aussi activer NFκB (nuclear factor κB), facteur de transcription jouant un rôle dans les réponses inflammatoires, lors d'infections virales ou lors de certains types de stress, par des mécanismes mal connus à ce jour [91, 92].

En dépit de cette atténuation de la traduction générale, la phosphorylation de eIF2α favoriserait aussi la traduction sélective de quelques ARN messagers (ARNm) qui contiendraient, dans leur partie 5' non traduite (5'-UTR pour « 5'-untranslated region ») des séquences en amont des cadres ouverts de lecture (uORF pour « upstream open reading frame »). C'est le cas notamment de l'ARNm codant le facteur de transcription ATF4 (activating transcription factor 4) [93]. Lors d'un stress réticulaire, ATF4 va ainsi activer non seulement la synthèse de gènes de la voie UPR (X-box binding protein 1 (XBP1), chaperons du RE) [79, 94], mais aussi celles de gènes codant des transporteurs d'acides aminés, ainsi que des enzymes de lutte contre le stress oxydant [95]. ATF4 va aussi activer la synthèse de CHOP (C-EBP Homologous Protein), facteur de transcription responsable à plus long terme du devenir de la cellule (les mécanismes seront décrits dans la partie mécanismes moléculaires de la voie UPR). CHOP régulerait la boucle de rétrocontrôle négatif de la voie PERK ; via l'induction de GADD34 (growth arrest and DNA damage inducible protein 34) impliquée, en partenariat avec une phosphatase nommée PP1, dans la déphosphorylation de eIF2α, permettant ainsi la reprise de la traduction protéique [96].

Par ailleurs, il est intéressant de noter que cette branche de la voie UPR peut être activée indépendamment d'un stress réticulaire ; on parle alors de réponse intégrée au stress [79, 94]. Ceci est directement lié au fait que plusieurs protéines eIF2α kinases (dont PERK fait partie), présentes au nombre de 4 chez les mammifères, sont capables de phosphoryler eIF2α, à la suite d'une induction par différents signaux. Il est ainsi possible de distinguer PKR (interferon inducible, double stranded RNa-activated kinase), activée lors d'une infection virale [96], GCN2 (general control non-derepressible 2), activée en cas de déprivation en acides aminés

[78], et HRI (haeme-regulated inhibitor) qui est activée en cas de déficit en hème, fer, ou lors d'un stress oxydatif [97].

B. La voie IRE1

Branche « historique » de la voie UPR (voir partie Réponse UPR), IRE1 est une protéine possédant une structure très proche de celle de PERK. Il s'agit d'une protéine transmembranaire de type I, dont l'extrémité N-terminale est localisée dans la lumière du RE, et l'extrémité C-terminale dans le cytosol. Sa partie luminale possède un domaine de dimérisation ainsi qu'un domaine de liaison à BiP. Cette partie détecte les niveaux élevés en protéines mal conformées et transmet un signal au noyau en épissant (coupant) l'ARNm de régulateurs majeurs de la transcription de la réponse UPR tels que Hac1p (homologous to ATF/CREB1) chez la levure, ou XBP1 chez les mammifères [98]. Pour ce faire, cette protéine possède une activité sérine/thréonine kinase, ainsi qu'une activité endoribonucléase (RNase). Bien que cette protéine soit conservée chez tous les eucaryotes, le mécanisme d'action en aval va différer, selon que l'on se place chez la levure ou que l'on soit chez l'homme.

Le stress réticulaire va provoquer l'homodimérisation de IRE1, puis une autophosphorylation, ce qui va mener à des changements conformationnels et activer le domaine RNase [99].

Chez la levure, IRE1 participera alors à l'épissage de son seul substrat connu, l'ARNm codant $Hac1^u$ (avec u signifiant uninduced, pour non induit) qui est un activateur transcriptionnel nécessaire à l'activation des gènes cibles de la voie UPR [100]. En absence de stress réticulaire, l'ARNm de $Hac1^u$ est transcrit mais pas traduit, en raison de la présence d'un intron non conventionnel qui s'apparie à la partie 5' de la région non traduite, créant une boucle et empêchant ainsi l'élongation de la traduction de la protéine, par un blocage du ribosome [101, 102] **(figure 15)**.

En cas de stress RE, l'activité RNase de IRE1 va exciser l'intron de 252 nucléotides. Les exons ainsi libérés seront ligués via la tRNA ligase [103], résultant ainsi en la formation d'un ARNm Hac^i (avec i pour induced, induit) qui va être traduit et produire le facteur de transcription actif Hac1, lequel va réguler les gènes cibles UPR [100, 101] en se fixant sur l'UPRE (unfolded protein responsive element) présent sur le promoteur de gènes de la voie UPR, tels que le chaperon BiP [84].

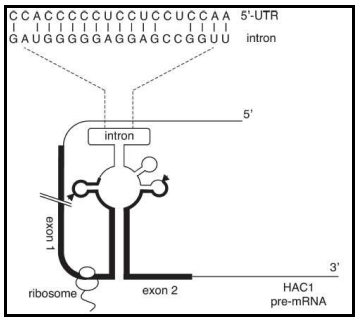

Figure 15 : Mécanisme moléculaire de blocage de la traduction chez le pré-ARNm de HAC1
La région non traduite 5'-UTR (unstranslated region) s'apparie avec les bases de l'intron, inhibant ainsi la traduction. L'épissage de cet intron par IRE1p lors de la réponse UPR permet la traduction de HAC1[i] induit (i pour induced). Les exons sont en gras et les sites de coupure sont représentés par les flèches [101].

Chez les mammifères, l'activation de IRE1 va entraîner l'activation de deux voies de signalisation, l'une liée au facteur de transcription XBP1, l'autre liée à TRAF2/JNK. La première de ces deux voies constitue la mise en place de mécanismes d'adaptation contre le stress RE, tandis que la seconde, qui mène à l'apoptose, se déclenchera plus tardivement, en cas d'incapacité de la cellule à rétablir l'homéostasie du RE **(figure 16)** [79].

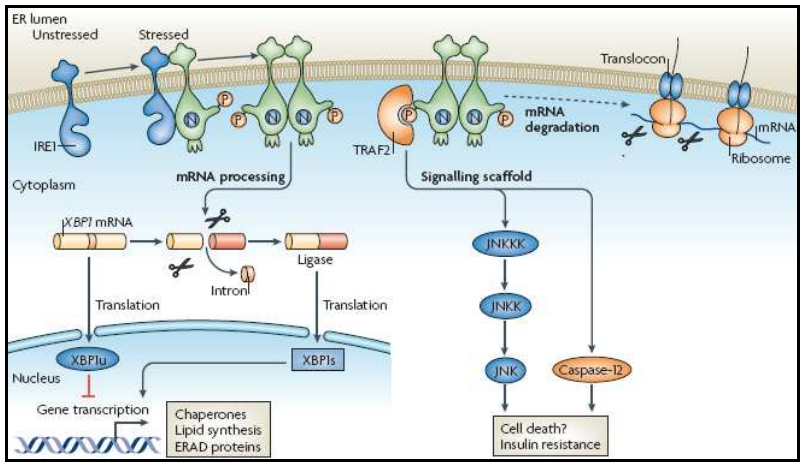

Figure 16 : Voie de signalisation IRE1
En cas de stress réticulaire, des protéines IRE1 vont s'homodimériser dans le plan de la membrane du RE. Les protéines vont ainsi se trans-autophosphoryler, ce qui aura pour conséquence d'activer le domaine endoribonucléase. IRE1 activée va exciser l'intron d'un fragment d'ARNm (26 nucléotides) d'un facteur de transcription appelé XBP1. Les deux extrémités de l'ARNm seront ensuite recollées ensemble via une ligase. Ceci aura pour conséquence de décaler le cadre de lecture de l'ARNm de XBP1 et permettra la traduction d'un facteur de transcription actif appelé XBP1 épissé (« spliced » en anglais, noté XBP1s), lequel régulera la transcription de gènes de la voie UPR et plus particulièrement ceux impliqués dans la synthèse des chaperons, dans la synthèse des lipides, ainsi que ceux impliqués dans la voie de dégradation associée au RE. À noter que la forme non épissée de l'ARNm de XBP1 (XBP1u, u pour « unspliced » en anglais) donne naissance à une protéine capable d'inhiber la voie UPR.
IRE 1 active peut aussi recruter la protéine TRAF2. Ceci déclenchera une cascade de signalisation conduisant au déclenchement de l'apoptose.
IRE1 activée possède une activité endoribonucléase. Elle pourrait ainsi dégrader des ARNm de protéines en cours de synthèse, directement au niveau des ribosomes fixés à la membrane et ainsi, contribuer à la réduction de la charge en protéines dans le RE [79].

En cas de stress RE, l'ARNm de XBP1 sera épissé dans le cytoplasme par la protéine IRE1 activée, laquelle va cliver un intron de 26 nucléotides. Une ligase « recollera » ensuite les deux extrémités de l'ARNm **(figure 17A)**.

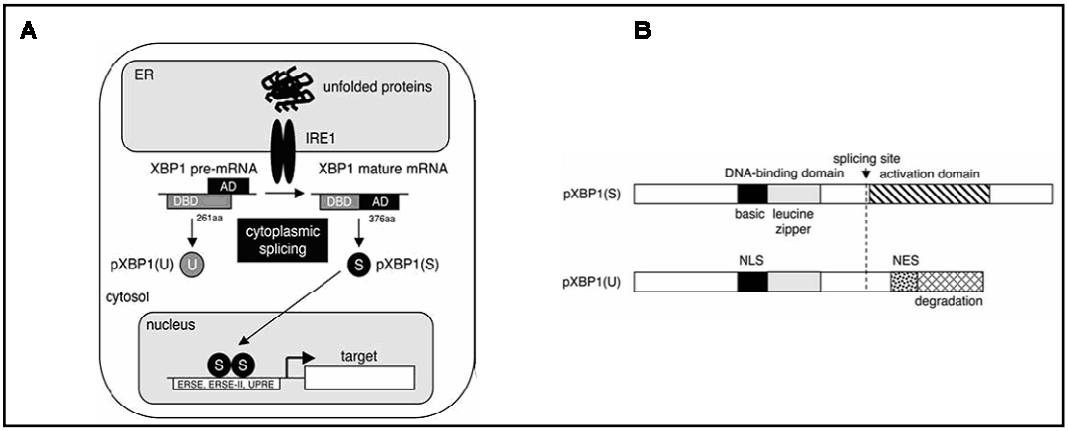

Figure 17 : Phénomène d'épissage alternatif lors (A) d'un stress RE et (B) structure des deux protéines XBP1
A) Épissage non conventionnel de l'ARNm de XBP1. En réponse au stress du RE, le pré ARNm de XBP1 est épissé de manière non conventionnelle par IRE1 (DBD : domaine de liaison à l'ADN (« DNA-binding domain ») et AD : domaine d'activation transcriptionnel (« activation domain »). Le fragment d'ARNm épissé (pXBP1(S) avec s pour spliced) est ensuite traduit en un ARNm mature et active la transcription de gènes cibles en se fixant sur des éléments ERSE, ERSE-II ou UPRE, contenus dans les promoteurs de gènes cibles.
B) Différences structurales entre les deux protéines XBP1. Le pré ARNm de XBP1 non épissé (pXBP1(U)) sera lui aussi traduit. Les deux protéines possèdent un domaine de liaison à l'ADN (« DNA-binding domain ») ainsi qu'une région fermeture éclair leucine basique (« basic leucine zipper ») qui sert aussi de signal de localisation nucléaire (NLS pour « nuclear localization signal »). La protéine issue de la forme épissée contient un domaine d'activation transcriptionnel, capable d'activer la synthèse des gènes cibles, tandis que la forme non épissée contient un domaine d'exclusion nucléaire (NES pour « nuclear exclusion signal »). La coexistence d'un signal de localisation et d'exclusion nucléaire provoque pour cette protéine une navette entre le noyau et le cytosol. Enfin cette protéine possède un domaine de dégradation, elle sera rapidement dégradée par le protéasome [101].

Cet épissage non conventionnel (aussi appelé épissage alternatif puisque se déroulant dans le cytoplasme) aura pour conséquence d'entraîner un décalage du cadre de lecture au moment de la traduction et donnera naissance à un facteur de transcription actif. Ce dernier possède un domaine de transactivation C-terminal (absent de la forme non épissée de XBP1) **(figure 17B)**, qui sera transloqué dans le noyau et activera la synthèse de gènes impliqués dans le repliement protéique et la dégradation des protéines mal conformées, afin de rétablir l'homéostasie du RE [101, 104].

Contrairement à la levure, la forme non épissée de l'ARNm de XBP1 sera aussi traduite. Cette protéine, peu active transcriptionnellement parlant, possède des propriétés différentes de celle issue de la forme épissée de XBP1. L'ARNm non épissé de XBP1 sera lui aussi traduit **(figure 17B)** mais cette protéine sera rapidement dégradée en cas de stress réticulaire [105]. En phase de récupération, cette protéine va progressivement s'accumuler et se fixer sur la

protéine XBP1 issue de l'ARNm épissé, formant avec elle un complexe qui sera dégradé par le protéasome [105, 106]. Il s'agit en fait d'une boucle de contrôle négative, qui permet immédiatement à la cellule d'arrêter la transcription des gènes cibles de XBP1, lorsque IRE1 n'est plus activée [101]. Cette molécule serait par ailleurs aussi capable de se fixer sur la forme active de ATF6 (ATF6N) et ainsi favoriser sa dégradation par le protéasome [106].

Lors d'une réponse UPR, la voie IRE1 serait plus spécifiquement impliquée dans l'induction de la voie ERAD ; des expériences ayant démontré que, chez des cellules déficientes en IRE1α ou en XBP1, l'induction transcriptionnelle de la voie ERAD ne se faisait plus [107, 108]. Enfin, l'épissage de XBP1 va induire les gènes des enzymes impliquées dans la voie de synthèse de la phosphatidylcholine (principal lipide membranaire, voir annexe II), ce qui va conduire à l'expansion du RE, ce phénomène étant principalement retrouvé dans les cellules sécrétrices (où il y est indispensable), telles que les cellules β du pancréas, les plasmocytes ou les hépatocytes [86, 109].

Enfin, chez l'homme, IRE1 existe sous deux isoformes codées par deux gènes différents. On distingue ainsi IRE1α et IRE1β et ces deux protéines possèdent un domaine RNase différent, expliquant leur divergence fonctionnelle dans la réponse UPR, puisque IRE1β contribuerait à l'atténuation de la traduction protéique en clivant l'ARNr 28S [110, 111]. Cette voie reste cependant peu décrite et des travaux montrent que chez l'homme, IRE1β est localisée uniquement dans l'épithélium intestinal [82, 94, 112].

Comme rencontré dans la voie de signalisation PERK, la branche IRE1 serait aussi impliquée dans la destinée de la cellule. Il s'agira de l'ultime mécanisme mis en place lors de la voie UPR. Les facteurs de transcription synthétisés, à la suite de l'activation de PERK ou de IRE1, joueront un rôle décisif dans le maintien de la survie ou le déclenchement de l'apoptose. Ainsi, IRE1 recruterait TRAF2, laquelle activerait la voie de signalisation JNK (c-Jun N-terminal kinase), ce qui, au final, pourrait contribuer au déclenchement de l'apoptose. [113, 114].

En résumé, IRE1 possèderait plusieurs rôles lors d'un stress réticulaire. Dans un premier temps, son activation entraînerait la synthèse de protéines permettant à la cellule de s'adapter au stress protéotoxique qu'elle subit, en induisant la synthèse des chaperons mais surtout des protéines impliquées dans la voie ERAD. Dans un second temps, si celui-ci se maintient, IRE1 pourrait participer au déclenchement de l'apoptose, évitant que cette accumulation de protéines mal conformées ne puisse dégénérer en un phénomène d'agrégation protéique pouvant avoir des répercussions sur les cellules environnantes.

C. La voie ATF6

La protéine ATF6 possède un segment transmembranaire au niveau de la membrane du RE, ainsi qu'un domaine transducteur, présent dans la partie luminale de celui-ci. Cette protéine transmembranaire est en quelque sorte un précurseur désigné sous le nom de ATF6(P) [115]. Le domaine transducteur est, en temps normal, occupé par BiP. En cas de stress réticulaire, il sera libéré par BiP, puis subira une réduction des ponts disulfures (les mécanismes exacts d'activation sont présentés dans la partie perception du stress réticulaire) et la protéine ATF6 sera transportée, au niveau de l'appareil de Golgi, où la partie N-terminale cytosolique sera clivée successivement au niveau de la membrane de celui-ci par deux protéases, dénommées S1P et S2P (site-1 protease et site-2 protease) formant un fragment appelé ATF6N [116, 117], capable de lier l'ADN. Le fragment migre ensuite au niveau du noyau et va activer la transcription de gènes impliqués dans la voie UPR **(figure 18)** [87,100].

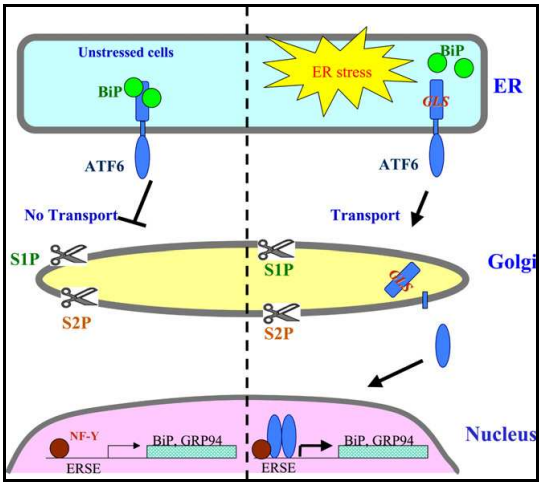

Figure 18 : Voie ATF6
ATF6 est une protéine transmembranaire du RE. En absence de stress réticulaire (« unstressed cells », à gauche), elle est liée à BiP. En cas de stress du RE (à droite), BiP libère la séquence de localisation dans le Golgi (GLS pour « Golgi-localization sequence ») présente sur ATF6, qui est transportée dans l'appareil de Golgi et clivée par deux protéases transmembranaires (S1P et S2P), qui libèrent la portion cytosolique effectrice d'ATF6 alors capable de lier les éléments de réponse au stress réticulaire (ERSE pour « ER stress response element ») dans le noyau (en interaction avec un autre facteur de transcription, NF-Y (« Nuclear Factor Y ») et d'activer la transcription de gènes liés à la réponse UPR (BiP, XBP1), adapté d'après [117].

Chez les mammifères, cette protéine existe sous deux isoformes, ATF6α et ATF6β, codées par deux gènes différents. Celles-ci possèdent le même domaine de liaison à l'ADN (« DNA-binding domain » (DBD)) mais un domaine de transactivation différent, ce qui pourrait expliquer leurs rôles différents lors de la réponse UPR, même si les mécanismes exacts ne sont pas encore bien compris [115, 117]. Il a été démontré que seul ATF6α était capable d'induire les gènes des chaperons majeurs du RE et de la voie ERAD (selon des

mécanismes décrits dans la partie mécanismes moléculaires de la voie UPR). De même, les deux isoformes d'ATF6 joueraient sur l'évolution dans le temps de cette branche de la voie UPR. En cas de stress RE, ATF6α serait activé très rapidement et aurait une forte activité transcriptionnelle, tandis que ATF6β serait activé plus tardivement et rentrerait en compétition avec ATF6α, provoquant progressivement une réduction de la réponse au stress réticulaire dans cette branche [118, 119]. À ce jour, cette hypothèse n'a pas encore été confirmée.

En résumé, ATF6α serait la branche de la voie UPR impliquée principalement dans la régulation du contrôle qualité des protéines. En clair, elle contrôlerait la transcription des chaperons du RE qui ont pour but de reconformer les protéines, tout en ayant un rôle dans la dégradation de celles dont la reconformation a échoué.

2.3 Perception du stress réticulaire

Le mécanisme exact de perception du stress réticulaire est encore beaucoup débattu par les scientifiques [79, 80, 82, 87, 120]. L'une des hypothèses les plus reprises [121] est celle selon laquelle les trois transducteurs seraient, en absence de stress réticulaire, maintenus à l'état inactif par un des chaperons du RE, la protéine BiP **(figures 13, 19B)**, présente en grande quantité dans le RE. En cas de stress réticulaire, BiP se lierait préférentiellement aux protéines non repliées ou mal conformées, libérant ces trois transducteurs et menant ainsi à leur activation [122, 123]. Il s'agirait cependant, selon certains auteurs d'une simplification des mécanismes conduisant à l'activation des transducteurs [80] et il est possible que d'autres évènements viennent se greffer à ce mécanisme **(figure 19)**.

Il existerait, selon certains auteurs, la possibilité selon laquelle BiP ne serait pas indispensable à la régulation de IRE1 **(figure 19A)** et que PERK et IRE1 puissent être activées directement par les protéines mal conformées [100, 124]. Enfin, ils évoquent un dernier mécanisme possible **(figure 19C)**, qui serait en fait une combinaison des deux premiers. La protéine BiP serait, en absence de stress, fixée sur le domaine luminal de PERK et de IRE1. En présence de protéines mal conformées, elle libérerait ce domaine, lequel nécessiterait ensuite la fixation d'une protéine mal conformée afin de pouvoir déclencher l'activation des transducteurs [79].

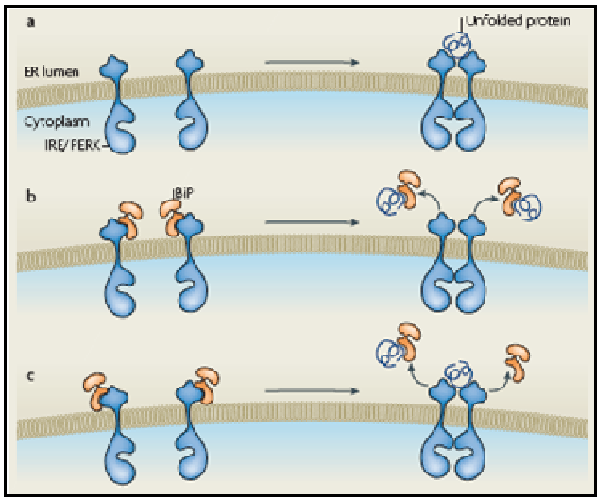

Figure 19 : Hypothèses de mécanismes de perception du stress RE par IRE1 et PERK
A) Selon ce modèle, les protéines non repliées ou mal conformées se fixeraient directement sur le domaine luminal de PERK ou IRE1, entraînant leur activation.
B) Ce modèle correspond à l'hypothèse la plus reprise dans les études. En absence de stress, le chaperon BiP serait fixé sur le domaine luminal de PERK ou IRE1. En cas d'accumulation de protéines mal repliées, BiP se fixerait préférentiellement dessus, libérant ainsi le domaine luminal de IRE1 et PERK, permettant ainsi leur activation.
C) Modèle alternatif reprenant les deux précédents. BiP est fixée sur le domaine luminal et le libère en cas d'accumulation de protéines mal conformées. Enfin, pour que l'activation de IRE1 ou PERK soit complète, il faut que la protéine mal conformée s'y fixe [79].

La perception du stress RE par ATF6 est, quant à elle, moins prise en compte par les spécialistes, qui s'accordent souvent à dire que l'activation de cette protéine suit le modèle généralement proposé **(figure 19B)**, à savoir qu'en absence de stress RE, BiP est fixé au domaine luminal de ATF6 et qu'en cas de stress RE, il libère ce domaine permettant ainsi sa transactivation [116]. Les mécanismes exacts d'activation de ATF6 restent encore peu connus. En 2005, Shen et collègues ont montré que la présence de protéines mal conformées (source de compétition) ne provoquerait pas directement de dissociation entre BiP et ATF6. Par ailleurs, ils ont montré que ce complexe était particulièrement stable en absence de stress, puisque « renforcé » par des co-facteurs, notamment des co-chaperones. L'activation de la voie ATF6 serait liée, selon ceux-ci, à la présence de protéines mal conformées qui se lieraient et dissocieraient les co-chaperons stabilisant le complexe ATF6/BiP, permettant à BiP de retourner à l'état « actif », à la suite d'un changement conformationnel (ATP-dépendant), libérant alors ATF6 [125]. Dans deux articles datant de 2006, puis de 2007, Nadanaka, Yoshida et Mori proposent un modèle alternatif qui n'exclut pas obligatoirement les modèles précédents **(figure 20)** [126, 127].

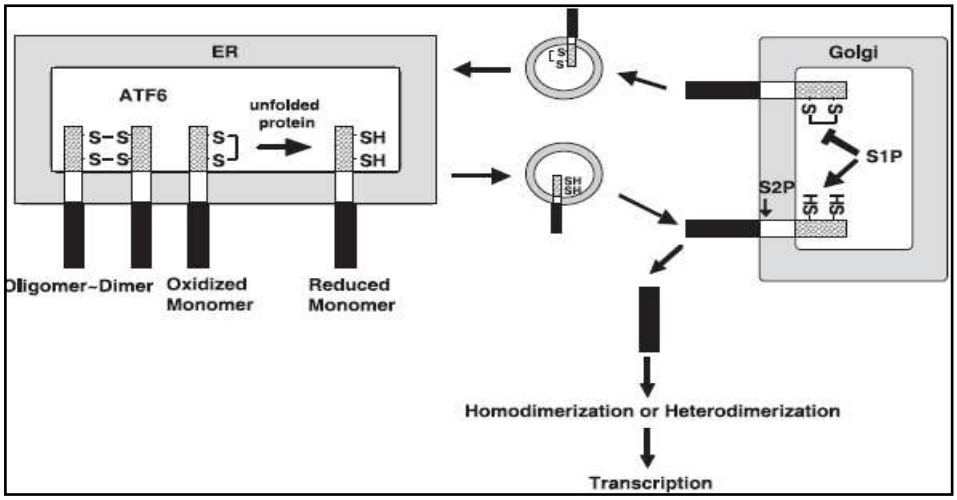

Figure 20 : Modèle de régulation de l'activation d'ATF6
En absence de stress du RE, ATF6 peut exister sous plusieurs formes oxydées (monomère, dimère, oligomère). Selon ce modèle, le stress RE provoque une réduction des ponts disulfures de ATF6, qui n'existe alors plus que sous la forme de monomère et est transporté dans l'appareil de Golgi où il est clivé par les protéases S1P et S2P. L'extrémité N-terminale de ce facteur de transcription est ainsi libérée puis transloquée dans le noyau où, sous la forme d'homodimère ou d'hétérodimère, elle active la transcription des gènes de chaperons du RE. En absence de stress du RE, la forme oxydée de ATF6 est renvoyée dans le RE, S1P étant incapable de cliver ATF6 sous cette forme oxydée [126, 127].

Selon leurs expériences, ATF6 est retrouvé sous trois formes (monomère, dimère ou oligomère) à l'état non stressé dans une cellule. Ces trois formes possèderaient de nombreux ponts disulfures intramoléculaires et intermoléculaires (pour les oligomères) et leur domaine luminal serait lié par le chaperon BiP. En cas de stress réticulaire, l'activation d'ATF6 résulterait de deux évènements avec, dans un premier temps, la dissociation de BiP du domaine luminal puis, dans un deuxième temps, la réduction de l'ensemble des ponts disulfures, qui entraînerait la formation de monomères réduits d'ATF6. Ceux-ci seraient ensuite transportés puis clivés dans l'appareil de Golgi. Cette réduction des ponts disulfures serait possible du fait de la présence de nombreuses oxydoréductases dans le RE [126]. Dans le Golgi, ATF6 subirait ensuite l'action des protéases S1P et S2P puis serait transloquée dans le noyau où elle activerait la synthèse des chaperons du RE. De nombreuses zones d'ombres persistent dans ce mécanisme, notamment quant à la réduction des ponts disulfures en cas de stress réticulaire. Il paraissait toutefois intéressant de proposer ici cette hypothèse de mécanisme d'action.

2.4 Le yin et le yang de la voie UPR

La réponse UPR va contribuer à la survie ou à la mort de la cellule. Les mécanismes mis en route varieront en fonction de l'intensité du stress subi mais évolueront également en

fonction de la durée du stress réticulaire **(figure 21)** [88]. Au cours de la partie suivante, nous allons détailler les mécanismes précis de régulation de cette voie.

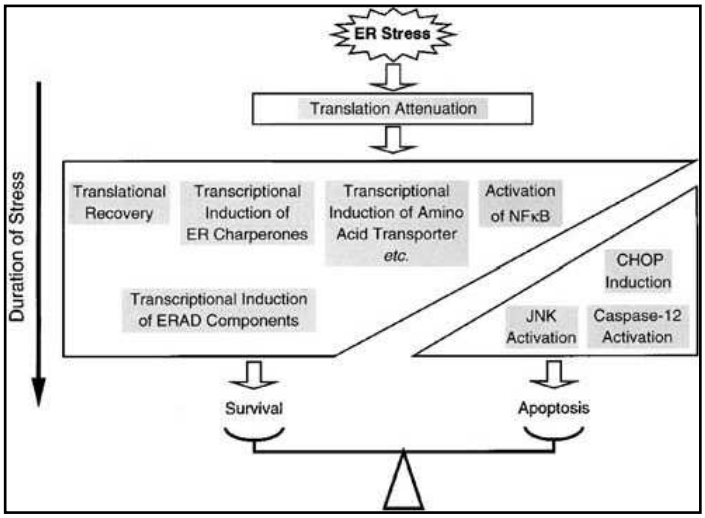

Figure 21 : Organisation de la réponse UPR chez les mammifères au cours du temps
Lors d'un stress réticulaire, il y aura de manière très précoce une atténuation de la traduction des protéines afin de réduire la charge du RE. Par la suite, de nombreux groupes de gènes vont être induits spécifiquement pour aider la cellule à s'adapter au stress du RE. Il s'agit, dans un premier temps de gènes de chaperons qui tenteront de replier les protéines. Si ces mécanismes ne parviennent pas à endiguer la charge en protéines mal conformées, les composants de la voie ERAD seront à leur tour synthétisés et dégraderont les protéines. Une variété d'autres gènes (transporteurs d'acides aminés, etc…) sera aussi synthétisée en parallèle pour tenter de remodeler le RE. NFκB pourra aussi être synthétisé (rôle anti-apoptotique). Enfin, si le stress réticulaire est trop important, les voies de signalisation de l'apoptose seront activées, par les activations respectives de JNK, CHOP et de la caspase 12 [88].

Dans un premier temps, la réponse UPR va se traduire chez les mammifères par une atténuation de la traduction des protéines. Celle-ci est générée par la voie PERK qui, par la phosphorylation de eIF2α, va entraîner une diminution immédiate de la traduction protéique, et donc conduire à une réduction de la charge du RE [88]. Au cours de la réponse UPR, la voie PERK agit très rapidement mais semble posséder un rôle très « solitaire » puisqu'elle interagit très peu (tout du moins au départ) avec les deux autres branches.

Dans un second temps, à un premier niveau, la deuxième branche de la voie UPR (ATF6) consiste en l'activation des gènes codant les chaperons du RE ainsi que les enzymes de repliement. En cas de persistance du stress RE, cette induction des enzymes de repliement sera ensuite soutenue par la dernière branche de la voie UPR (IRE1/XBP1) qui, si la cellule ne peut faire face à la quantité de protéines mal conformées, induira alors la synthèse de composants de la voie ERAD, afin de les éliminer du RE. Ces deux voies permettent à la cellule de mettre en place une réponse rapide qui favorisera la survie cellulaire.

L'organisation dans le temps de cette partie de la réponse UPR a longtemps fait débat puisqu'au départ, les auteurs considéraient qu'il existait un décalage dans les interventions de ATF6 et de XBP1. En cas de stress du RE, ATF6, existant déjà sous la forme d'un précurseur transmembranaire, pouvait être mobilisé beaucoup plus rapidement que XBP1, dont la transcription est initialement induite par ATF6, du fait de sa fixation sur un élément de réponse spécifique contenu dans le promoteur de XBP1. De plus, une fois transcrit, XBP1 doit ensuite subir un épissage alternatif, via la protéine IRE1 activée. Selon le mécanisme proposé, ATF6 provoquerait une induction transcriptionnelle des chaperons moléculaires mais aussi du facteur de transcription XBP1, lequel permet par la suite, grâce à sa propre auto-régulation, de venir soutenir l'induction de la synthèse des chaperons mais aussi, si le stress perdure, celle des éléments impliqués dans la voie ERAD [128, 129]. Toujours dans cette hypothèse où la voie IRE1/XBP1 ne semble pas vraiment indispensable à la régulation des chaperons du RE, des expériences menées dans des cellules déficientes en ATF6α ont permis de mettre en évidence que l'induction des chaperons du RE était très réduite en cas de stress réticulaire, suggérant le rôle clef de cette protéine [115, 130].

Le fonctionnement de la voie UPR a pu être progressivement détaillé, notamment grâce aux découvertes successives d'éléments de réponse au stress réticulaire dans les promoteurs de nombreux gènes impliqués dans cette voie. Chez les mammifères, les chaperons du RE possèdent un élément *cis* de réponse au stress réticulaire dénommé ERSE (« ER stress response element »), dont la séquence consensus est CCAAT-N9-CCACG, [131, 132]. Cette séquence fut initialement découverte dans les promoteurs de trois chaperons du RE, BiP, GRP94 et calréticuline où elle est présente en plusieurs exemplaires [131]. Depuis, elle a été trouvée dans les promoteurs de certains facteurs de transcription, notamment XBP1 et CHOP [133].

Les protéines capables de se lier sur ces séquences ont été identifiées, il s'agit notamment des facteurs de transcription, ATF6 et XBP1, appartenant à la famille des facteurs de transcription CREB/ATF (cAMP response-element binding protein/Activating transcription factor) et ayant une structure en forme de fermeture éclair à leucine. Chez les astrocytes, un troisième facteur de transcription capable de se lier à l'ERSE a été identifié lors d'un stress réticulaire. Il s'agit du facteur de transcription OASIS, appartenant lui aussi à la même famille que ATF6 et XBP1 [134]. Ce facteur étant toutefois limité à un seul type cellulaire, nous ne l'évoquerons plus par la suite. ERSE est un élément composite, capable de fixer plusieurs facteurs de transcription, certains d'entre-eux de manière constitutive, tel que

« Nuclear Factor Y » (NF-Y) sur la partie CCAAT par exemple. En cas de stress réticulaire, ATF6N ou XBP1 s'associeront sous forme de dimères (homodimères ou hétérodimères) et formeront un complexe avec d'autres protéines auxiliaires telles que YY1 (exprimée constitutivement) et TFII-I sur la partie CCACG [135, 136] **(figure 22)**.

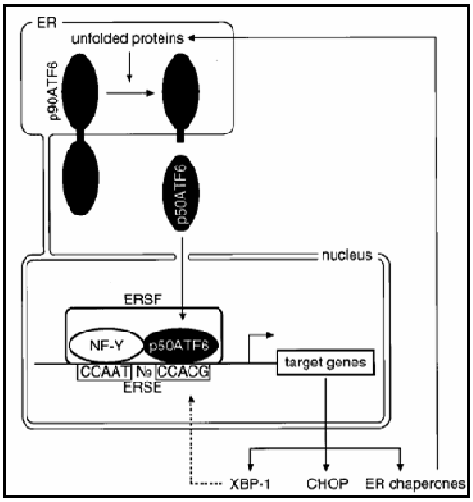

Figure 22 : Branche ATF6 de la voie UPR et fixation de p50ATF6 sur un ERSE
ATF6 sera activé en cas de stress du RE (selon les mécanismes précédemment décrits), sera transloqué sous sa forme active dans le noyau et se fixera sur la partie CCACG de la séquence ERSE de gènes cibles, lorsque la partie CCAAT sera liée par le facteur général de transcription NF-Y. Cette fixation conduira à induire la synthèse de gènes cibles tels que les chaperons du RE, XBP1 et CHOP [133].

Un autre élément de réponse au stress fut par la suite découvert ; il fut dénommé ERSE II et n'est retrouvé (pour le moment) que dans le promoteur du gène HERP (homocysteine-inducible ER stress protein) codant une protéine membranaire du RE, et possède la séquence suivante : ATTGG-N-CCACG. ATF6 ne s'y fixerait qu'en présence de NF-Y, tandis que XBP1 serait capable de s'y fixer seul [137].

Enfin, il existe un dernier élément de réponse, appelé UPRE possédant la séquence consensus TGACGTGG/A qui serait responsable de la transcription des gènes impliqués dans la voie ERAD [138]. Au départ, seul XBP1 semblait être capable de se lier à cet élément, de manière NF-Y indépendante mais des travaux ont démontré que l'hétérodimère XBP1/ATF6 pouvait induire plus fortement les gènes de la voie ERAD que XBP1 seul [130]. ATF6 joue par ailleurs un rôle dans l'expansion du RE, sans que la voie IRE1 ne soit activée [109], alors que jusqu'ici, seul XBP1 paraissait en être responsable. La coopération entre ces deux facteurs se poursuit aussi au niveau de leur élimination. En phase de récupération du stress réticulaire, le messager XBP1 non épissé est traduit et permet de mettre en place un basculement rapide du signal en se fixant sur la protéine XBP1 issue de l'ARNm épissé mais aussi sur la protéine ATF6N [105, 106].

Les deux premières voies sont en fait particulièrement liées et impliquées dans des phénomènes favorisant la survie cellulaire. Toutefois, si le stress RE perdure, celles-ci vont alors converger avec la troisième voie (PERK), au carrefour de la destinée cellulaire, qui peut être symbolisé par l'activation d'un nouveau facteur de transcription, CHOP **(figure 23)** [88].

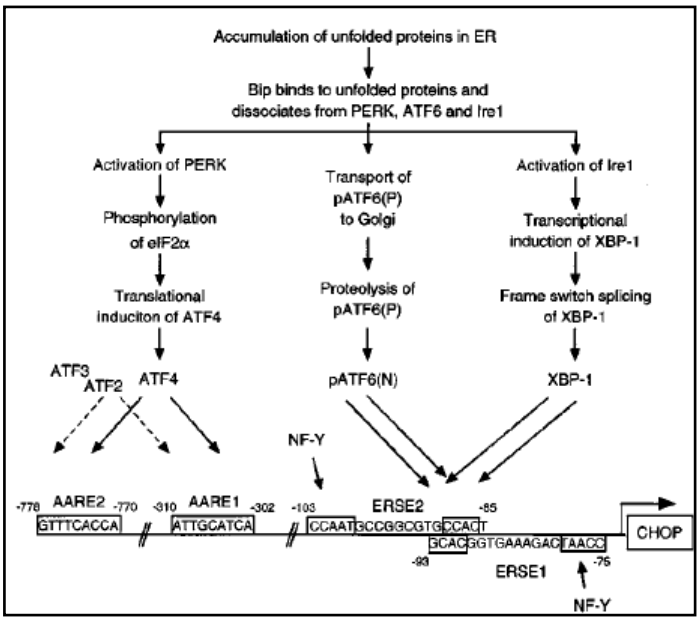

Figure 23 : Mécanisme de l'induction transcriptionnelle de CHOP
Durant le stress réticulaire, l'induction de CHOP est régulée par 4 éléments *cis*, AARE1, AARE2, ERSE 1, ERSE 2. ATF4 va se lier à AARE1 et AARE2, tandis que pATF6(N) et XBP-1 se lieront sur les éléments ERSE 1 et ERSE 2, plus précisément sur la partie CACG, tandis que NFY sera lié à la partie CCAAT [88].

Initialement, la voie PERK permet, via la phosphorylation de eIF2α, l'atténuation de la traduction générale des protéines au tout début de la voie UPR. Cette phosphorylation de eIF2α va paradoxalement induire la traduction spécifique de quelques ARNm, dont celui d'ATF4, qui va réguler la synthèse d'un facteur de transcription, CHOP, en se fixant sur les éléments de régulation des acides aminés (AARE pour amino-acid regulatory element). Si le stress du RE perdure et ce, malgré les mécanismes mis en jeu par les voies ATF6 et IRE1/XBP1, la vie de la cellule sera alors menacée. Les facteurs de transcription (XBP1 et ATF6), vont alors induire très fortement la synthèse de CHOP en se fixant sur les éléments de réponse au stress RE (ERSE I et ERSE II) présents dans le promoteur de celui-ci.

CHOP joue un rôle central dans la destinée de la cellule puisqu'il peut agir à deux niveaux. En cas de récupération d'un stress réticulaire, CHOP va, dans un premier temps, promouvoir la survie cellulaire, notamment en activant la synthèse de GADD34, protéine qui va réguler la déphosphorylation de eIF2α en présence d'une protéine phosphatase constitutive, CReP (constitutive repressor of eIF2α phosphorylation) et ainsi permettre de lever l'inhibition

de la synthèse générale des protéines constituant une boucle de rétrocontrôle négatif de la réponse UPR [88, 96].

Enfin, si le stress RE perdure et que la cellule ne peut y faire face, CHOP peut promouvoir l'apoptose **(figure 24)** [79] en diminuant par exemple la synthèse de la protéine Bcl-2 (inhibitrice de l'apoptose) et en induisant la synthèse d'autres protéines, telles que Bax par exemple [88].

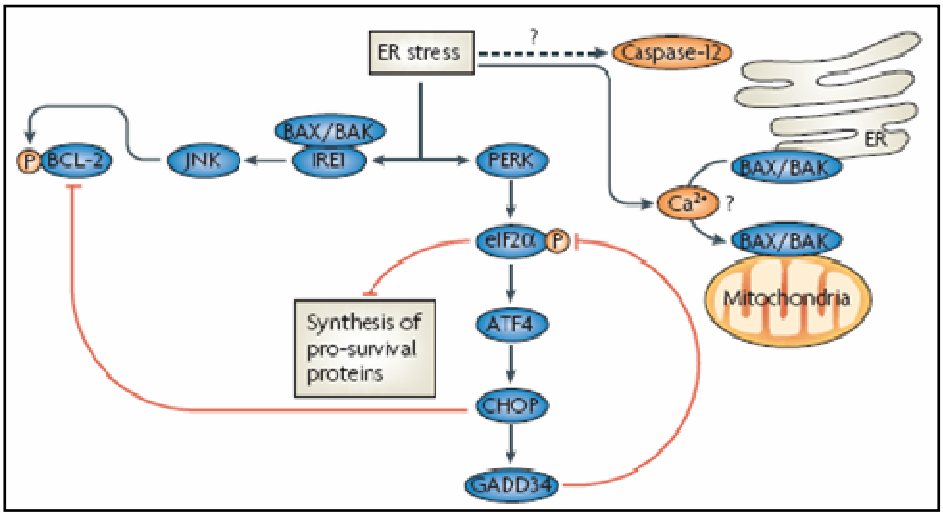

Figure 24 : Stress réticulaire et mort cellulaire
Le mécanisme exact de la mort cellulaire à la suite d'un stress RE n'est pas encore totalement compris. Une diminution de la concentration en Ca^{2+} pourrait entraîner la translocation de protéines effectrices de l'apoptose (Bax et Bak) dans la mitochondrie. La voie IRE1 va contribuer à l'activation de la protéine JNK, conduisant à une inactivation de la protéine BCL-2, facteur anti-apoptotique. L'activation de PERK va, de son côté, contribuer à la synthèse de CHOP, facteur à deux facettes qui peut contribuer à la survie de la cellule via GADD34, qui va déphosphoryler eIF2α entraînant la reprise de la synthèse protéique, ou contribuer à favoriser la mort de celle-ci, en réprimant notamment BCL2, protéine anti-apoptotique. Enfin, chez les rongeurs, la caspase 12 pourrait être activée en cas de stress RE. Le mécanisme exact n'a pas encore été identifié [79].

CHOP n'est toutefois pas le seul effecteur de l'apoptose à la suite d'un stress RE. Les mécanismes déclencheurs restent encore assez mal connus. La voie IRE1, du fait de son activité kinase déclenche une cascade de phosphorylations qui aboutissent à l'activation des protéines pro-apoptotiques, tout en inhibant la protéine BCL2 (connue pour son activité anti-apoptotique). Des perturbations dans la concentration en Ca^{2+} du RE pourraient aussi mener à l'apoptose. Les protéines de la famille BCL2 (qui possèdent des propriétés pro ou anti-apoptotiques) seraient impliquées dans la régulation de l'homéostasie calcique du RE. De plus, la mitochondrie semble aussi impliquée dans cette voie associée au Ca^{2+}, puisque les signaux apoptotiques sembleraient être relayés du RE à la mitochondrie via les molécules Bax et Bak, qui seraient libérées du RE en cas de stress réticulaire prolongé, et provoqueraient la libération du cytochrome C [77]. Toutefois, les mécanismes sont encore mal compris et à l'heure actuelle, il existe une douzaine d'hypothèses proposées pour lier la concentration en

Ca^{2+} du RE à l'apoptose (pour plus d'informations, voir la revue proposée par Kim et collègues [139]).

Enfin, le stress réticulaire déclencherait les mécanismes d'autophagie[1] du RE. Cette voie pourrait être activée par IRE1 [140]. Ce phénomène peut se déclencher dans plusieurs conditions. Il pourrait ainsi permettre à la cellule de dégrader les protéines mal conformées du RE en supplément de la voie ERAD qui peut se retrouver saturée. Il peut par ailleurs aussi être associé à l'apoptose. Les mécanismes d'action précis restent encore à déterminer.

2.5 Conclusion

La réponse UPR est une réponse adaptative, graduée dans le temps et les molécules qui y interviennent sont synthétisées dans un ordre bien précis. Lorsque des cellules sont soumises à des sources potentielles de stress environnemental, l'étude des molécules impliquées dans des mécanismes d'adaptation peut servir d'instantané de l'état de la cellule. Dans le cadre du stress réticulaire, les molécules qui seront le plus rapidement mobilisées sont les chaperons du RE (tout du moins dans un premier temps) et ces protéines peuvent servir de marqueurs biologiques. Ce choix n'est cependant pas totalement arbitraire, puisque l'utilisation de marqueurs provenant des voies de régulation plus tardives (dont l'apoptose) n'est pas vraiment appropriée. Ainsi, au cours de nos travaux, nous avons réalisé des expositions de culture de cellules aux ondes MM comprises entre 50 et 60 GHz. Nous avons voulu déterminer si les ondes pouvaient déclencher un stress réticulaire. Pour cela, nous nous sommes intéressés à différents biomarqueurs, qui sont rapidement mobilisés dans la mise en place de la réponse UPR. Nous avons étudié principalement le chaperon BiP, en déterminant les niveaux d'expression de son promoteur à la suite d'une exposition, puis en quantifiant les niveaux transcriptionnels du gène, ainsi que ceux de ORP150.

[1] Autophagie : processus cellulaire catabolique qui implique la dégradation lysosome-dépendante de macromolécules, d'organelle ou de composants cellulaires. Ce mécanisme peut permettre à la cellule de s'adapter et survivre dans des conditions délétères (hypoxie, déprivation en nutriments) mais peut aussi être associé à la mort cellulaire.

Chapitre I : Matériels et méthodes

Déterminer si des ondes électromagnétiques peuvent avoir un effet biologique potentiel n'est pas chose aisée. Il est important de faire une distinction entre les effets biologiques, physiologiques et ceux sur la santé. Un effet biologique se produit lorsqu'une exposition aux ondes entraîne des modifications physiologiques visibles ou détectables dans un système vivant. Ces modifications peuvent mener (mais pas forcément) à un effet délétère sur la santé, signifiant une modification physiologique un peu plus longue qu'habituellement. En général, l'organisme va compenser cette variation physiologique mais il peut parfois arriver qu'il y ait un effet sur la santé. Les effets sur la santé sont souvent le résultat d'effets biologiques qui s'accumulent en fonction du temps et de la dose d'exposition. De plus, dans le domaine expérimental, des effets observés sur une lignée cellulaire ne sont pas forcément transposables à l'organisme tout entier. Il est donc important de réaliser différentes approches afin de tenter de caractériser au mieux les effets biologiques des ondes sur la santé. Trois types d'approches peuvent être retenus :

1) Une première méthode consiste à réaliser des études épidémiologiques. Celles-ci sont de première importance dans la détermination des risques éventuels pour la santé liés à une exposition aux ondes. Ces études, souvent longues ont beaucoup été faites chez des populations à risque au cours des 30 dernières années (opérateurs radar, opérateurs de télécommunication). L'explosion plus récente des appareils de télécommunications sans fil a depuis entraîné une multiplication importante de ce nombre d'études, notamment dans le domaine de la téléphonie mobile. Bien que très utile, cette approche présente toutefois des limites. L'expérimentation n'est pas toujours simple à mettre en œuvre, les données recueillies peuvent souffrir d'un manque de robustesse, il peut aussi exister un biais dans les données et, parfois, il peut-être nécessaire de patienter de nombreuses années avant d'établir un lien entre une source d'exposition et un effet biologique. Enfin, de nombreuses recherches au niveau animal et cellulaires se révèlent indispensables, en parallèle, afin de mieux comprendre les mécanismes liés à cette interaction. Dans le domaine des ondes MM, cette approche devra toutefois encore attendre quelque temps avant d'être effectuée ; les appareils n'étant toujours pas commercialisés.

2) Une deuxième approche consiste à utiliser des modèles animaux. Ces modèles sont préconisés et indispensables quand il se révèle impossible de réaliser des expérimentations sur des humains. De plus, grâce aux modèles animaux, les conditions expérimentales peuvent être facilement établies et surtout contrôlées. Un modèle entier peut cependant poser problème au niveau expérimental, puisque en cas d'effet biologique localisé, l'organisme peut mettre en

place des mécanismes de compensations, rendant celui-ci invisible aux yeux des expérimentateurs. Ce phénomène est par exemple rencontré dans le cas d'une augmentation locale de température au niveau de la zone exposée, qui sera compensée, au niveau de l'organisme par la mise en place de mécanismes physiologiques.

3) Les études réalisées avec les systèmes de cultures cellulaires permettent d'évaluer précisément les éventuels mécanismes mis en jeu lors d'une interaction entre les ondes et les cellules. Le but de ces modèles est de tenter de déterminer si les cellules perçoivent précisément les ondes comme une agression. Si tel est le cas, celles-ci vont alors mettre en route des mécanismes d'adaptations qui, dans ce modèle d'étude simplifié, peuvent être quantifiables à l'aide d'outils de biologie moléculaire. Il est possible de faire des approches extrêmement larges permettant de déterminer très rapidement des gènes candidats (à l'échelle de tout le génome), en utilisant notamment des méthodes haut débit, telles que les puces à ADN. Enfin, avec ces modèles, il est aussi possible de déterminer les éventuels effets synergiques entre des ondes et des agents pouvant induire ou modifier une activité biologique connue.

Au sein du laboratoire, des systèmes de cultures de cellules *in vitro* sont employés, afin de tenter de déterminer un éventuel effet biologique des ondes MM autour de 60 GHz, à des puissances proches de celles qui seront utilisées dans les futurs systèmes de télécommunications sans fil.

I.1 Matériels et méthodes

A. Culture cellulaire

- **Cultures de lignées cellulaires humaines**

Au cours de nos expériences, nous avons utilisé différents modèles de cultures de cellules. Dans un premier temps, nous avons ainsi travaillé avec des cellules de la lignée gliale astrocytaire humaine U-251 MG. Ces cellules gliales, jouant un rôle de soutien et de protection des neurones, servent de sentinelles et sont particulièrement sensibles au stress cellulaire. Au sein du laboratoire, celles-ci ont par ailleurs bien été caractérisées dans leur réponse à différents types de stress, à la suite des travaux précédemment menés. Enfin, bien que n'étant pas directement ciblées par les ondes MM, en raison de la faible pénétration de

celles-ci dans le corps, ces cellules sont très sensibles au stress réticulaire. Ceci est illustré dans la **figure 25** avec la comparaison des niveaux d'expression du chaperon BiP dans les différentes lignées lors d'un stress réticulaire induit par un agent chimique, la thapsigargine (TG). Cette expérience a été menée en utilisant la technique de PCR en temps réel (voir plus loin dans ce chapitre).

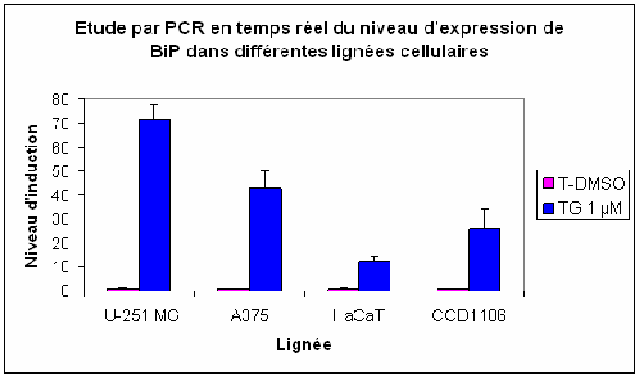

Figure 25 : Comparaison par PCR en temps réel des niveaux d'expression de BiP dans 4 lignées cellulaires différentes
Ces résultats représentent la moyenne +/- écart-type de 3 expériences indépendantes. Pour induire le stress du RE, les cellules ont été traitées durant 16 heures à la thapsigargine (TG), agent chimique bloquant la pompe Ca^{2+}-ATPase du RE. Les cellules U-251 MG et A375 répondent très fortement à ce type de stress.

Par la suite, nous avons employé comme modèle d'étude des cellules issues de la peau, qui est la principale cible des ondes MM. Nous avons donc exposé des cellules de la lignée épithéliale HaCaT, dérivées de kératinocytes issus d'un épiderme humain [141], ainsi que celles de la lignée épithéliale CCD1106 KERTr (CRL-2309™), issues de kératinocytes transformés par un Papillomavirus humain, mais aussi des cellules de la lignée épithéliale A375 (CRL-1619™), issues d'un mélanome humain. Ces deux dernières ont été achetées auprès d'une banque cellulaire, l'ATCC (« American Type Culture Collection »).

Trois de ces lignées (U-251 MG, HaCaT et A375) ont été cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco/Invitrogen)) complémenté de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Biowest), 1 mM de Glutamine, 100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine et 0,25 µg/mL d'amphotericine (Gibco/Invitrogen), dans une atmosphère contrôlée avec 95% d'air et 5% de CO_2, à la température de 37°C.

Les cellules de la lignée CCD 1106 KERTr ont, quant à elles, été cultivées dans un laboratoire L2 (en raison de leur transformation avec un Papillomavirus humain), dans du milieu Defined Keratinocyte Serum Free Media (Gibco/Invitrogen), dans une atmosphère contrôlée avec 95% d'air et 5% de CO_2. Ces cellules n'ont pas été conservées pour la suite de

nos expériences, en raison de plusieurs paramètres (croissance lente, milieu de culture prohibitif et niveaux de réponses au stress faibles).

Pour tenter de déterminer si les ondes MM pouvaient entraîner des variations de niveaux d'expression sur le génome entier (technique de puces à ADN), des cultures primaires de kératinocytes humains ont été employées. Deux lots de cultures primaires de kératinocytes ont ainsi été achetés. Ces cultures primaires (Pooled primary human foreskin keratinocytes, Gibco), issues de prépuces de nouveaux nés, sont constituées d'un mélange de cellules issues de trois individus. Les cellules sont cultivées sur des boîtes de culture recouvertes de collagène de type IV (Becton Dickinson) dans du milieu Defined Keratinocyte Serum Free Media (Gibco/Invitrogen).

B. Systèmes d'expositions

Les expositions de culture de cellules aux ondes MM ont été réalisées avec deux types de générateurs différents qui n'ont pas été acquis en même temps et possèdent, chacun, leurs caractéristiques propres. Le premier et plus ancien d'entre eux (Siemens RWON 14) fonctionne dans la bande de fréquence comprise entre 50 et 75 GHz mais à puissance relativement faible (Puissance maximale (Pmax = 50 mW), tandis que le deuxième appareil utilisé (QuinStar Technology) permet quant à lui de travailler à la fréquence précise de 60,4 GHz, (fréquence de résonance maximale de l'oxygène moléculaire) [37] mais avec une puissance 20 fois plus forte (jusqu'à 1 W) **(figure 26)**.

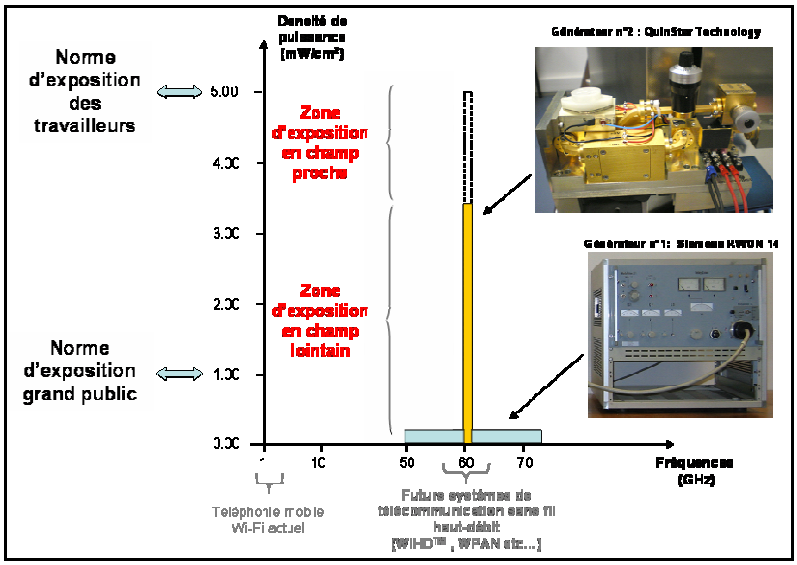

Figure 26 : Caractéristiques des deux systèmes d'exposition utilisés
Le générateur n°1 est le plus ancien, il permet de travailler dans une large bande de fréquence. Le générateur n°2 fonctionne dans une bande de fréquence plus étroite mais offre la possibilité de travailler à plus forte puissance.

- **Système d'exposition 1 (50-75 GHz, Pmax : 50 mW)**

Ce système a déjà été décrit précédemment [69]. Succinctement, il est constitué d'un générateur (Siemens RWON 14), qui va fournir en courant électrique l'oscillateur à carcinotron (Siemens RWO75), lequel produira alors des ondes MM, qui seront transmises jusqu'à l'antenne, localisée dans l'incubateur (Memmert UE400) via des guides d'ondes **(figure 27)**.

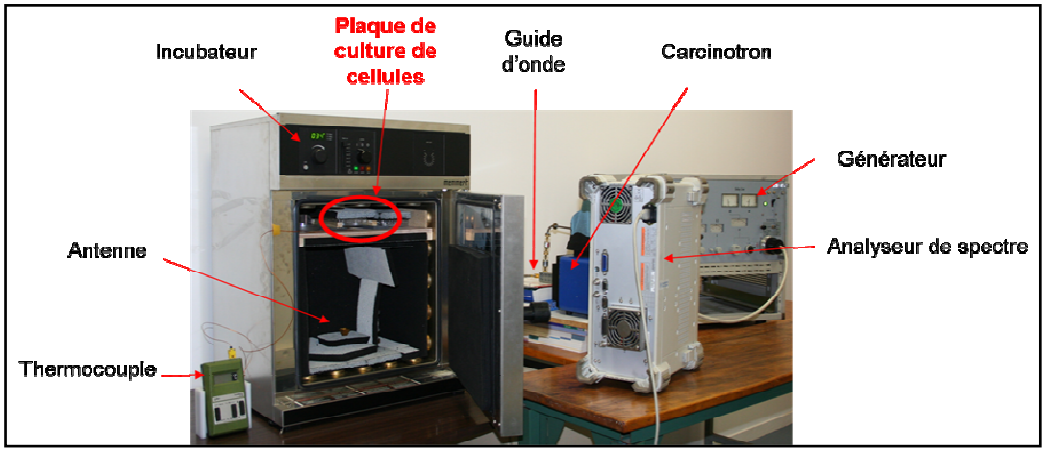

Figure 27 : Dispositif expérimental développé pour exposer des cultures de cellules à des fréquences comprises entre 50 et 75 GHz

Les expositions sont toutes effectuées en champ lointain. La plaque de culture sera alors placée dans l'incubateur au dessus de l'antenne (21 cm). Pour éviter les phénomènes de réflexion sur les parois de l'incubateur, de l'absorbant (ECCOSORB AN, Emerson & Coming) a été placé dans ses parois. L'analyseur de spectre (Advantest R3182) permet de régler précisément la fréquence, puis de contrôler sa stabilité (± 1,5 MHz), tandis que le thermocouple permet de contrôler la stabilité de la température (37 ± 0,3°C) à proximité de la plaque de culture. Le générateur est capable de fournir une puissance de 25 mW à la sortie de l'antenne. Cette puissance est mesurée à l'aide d'un power meter (Agilent V8486A). La DSP reçue par les cellules est de l'ordre de 0,14 mW/cm².

Les cellules U-251 MG ont été exposées pendant 24, 48 ou 72h à 60,4 GHz, à la DSP de 0,14 mW/cm² ou pendant 24h à différentes fréquences (voir **tableau 4**), à cette même DSP.

A

Fréquence (GHz)	Groupes moléculaires	Nom
59,008	CH	Radical Méthylidène
59,261	SO_2	Dioxyde de soufre
59,411	NO_2	Dioxyde d'Azote
59,626	SO	Monoxyde de Soufre
59,846	C_4H_2	Butadiène
60,047	C_4H_6	1-Butyne
60,530	OCS	Sulfure de Carbonyle
60,862	HCN	Cyanure d'Hydrogène

B

Fréquence (GHz)
Pic d'absorption de l'oxygène
59,164
60,435
61,151
Fréquence correspondant à une faible atténuation atmosphérique
59,870
60,830

Tableau 4 : Fréquences d'exposition correspondant A) aux raies spectrales de groupements moléculaires di ou triatomiques comprises dans la sous bande 59-61 GHz, B) au spectre d'absorption de l'oxygène moléculaire

Enfin, l'étude de l'effet combinatoire entre un stress réticulaire et une exposition aux ondes a été menée sur des cellules de la lignée gliale astrocytaire humaine U-251 MG, transfectées avec le promoteur de BiP, traitées à la TG et exposées pendant 16 heures à 60,4 GHz à 0,14 mW/cm².

- **Système d'exposition 2 (60,4 GHz, Pmax : 1 W)**

Dans ce dispositif **(figure 28A)**, un nouveau type de générateur est employé. Il s'agit d'un oscillateur de type Gunn (QuinStar Technology), permettant l'exposition de cellules à 60,4 GHz, avec possibilité de régler la puissance (jusqu'à 1 W) **(figure 28B)**.

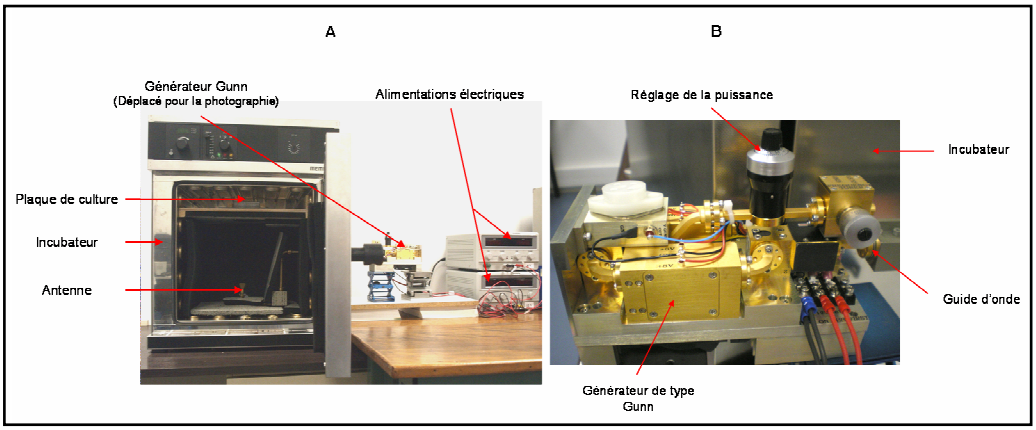

Figure 28 : Dispositif expérimental développé pour exposer des cellules à la fréquence de 60.4 GHz, avec des puissances variables
A) Vue d'ensemble du système.
B) Agrandissement du générateur de type Gunn.

Avec ce générateur, des expositions seront réalisées en champ lointain ainsi qu'en champ proche. Les caractéristiques de ce système sont décrites plus en détails dans la deuxième partie de ce chapitre.

Au cours de nos expérimentations, nous avons pris en compte les normes d'exposition établies par l'ICNIRP pour les ondes MM. Nous avons respecté les recommandations d'exposition (entre 1 et 5 mW/cm²). À partir de ces valeurs, nous avons ensuite calculé le DAS dans la couche cellulaire. Ce générateur a été utilisé à différentes puissances. Celles-ci, ainsi que la DSP correspondante reçue par les cellules et le DAS, sont regroupées dans le **tableau 5**.

Puissance (mW)	DSP incidente max. au niveau de la plaque (mW/cm²)	DSP incidente moyenne (mW/cm²)	DAS moyen (W/kg)	DSP max. reçue par les cellules (mW/cm²)
180	**1**	**0.8**	**18.45**	**0,5**
275	**1,15**	**0.91**	**21.21**	**0,75**
425	**2,3**	**1.82**	**42.43**	**1,15**

Tableau 5 : Puissances utilisées et densités superficielles estimées en sortie d'antenne et au niveau des cellules (pour une plaque 6 puits)

Les données de puissance ont été obtenues à la place de l'antenne, à l'aide du power meter. Les DSP ont ensuite pu être calculées à partir de la formule suivante :

$$\Phi_M = \frac{P.G}{4\pi r^2}$$

Où P est la puissance totale rayonnée dans l'espace libre par l'antenne, G est le gain isotropique maximal de l'antenne et r la distance entre l'antenne et la boîte de culture.

À partir de ces valeurs de DSP, le DAS a pu être calculé. Il est relativement élevé par rapport aux valeurs de DAS observées en micro-ondes par exemple, mais il faut cependant bien prendre en compte que pour les ondes MM, l'énergie absorbée localement par la couche cellulaire est beaucoup importante que pour les fréquences GSM ou WI-FI par exemple. Des expérimentations ont été effectuées afin d'évaluer si une exposition à des DAS aussi élevés (**tableau 5**) pouvait ou non déclencher un effet thermique. La température dans le milieu de culture des cellules a été mesurée à l'aide d'un thermomètre enregistreur (HI141JH, HANNA Instruments) en exposant ou non (sham) les cellules HaCaT aux ondes durant 24 heures à la DSP de 1.15 mW/cm², pour un DAS de 42-43 W/kg **(figure 29)**.

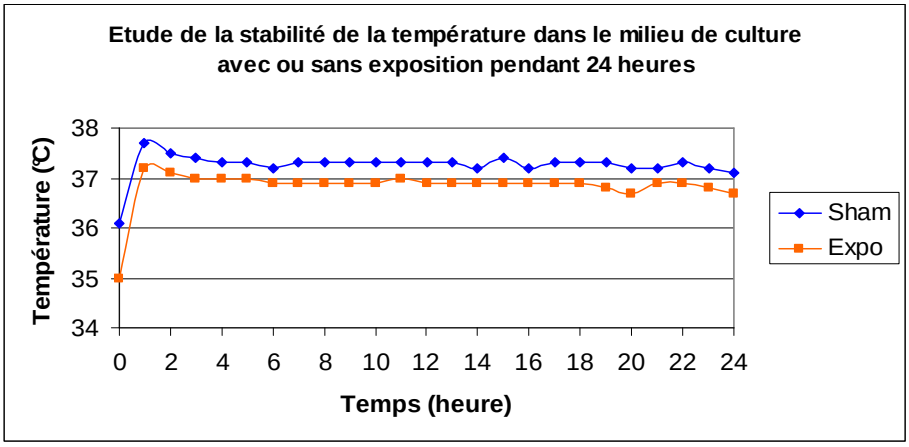

Figure 29 : Évaluation et comparaison de la variation de la température dans le milieu de culture de cellules HaCaT lorsque celles-ci sont exposées ou non aux ondes MM à une DSP de 1,15 mW/cm²
Ces résultats ont été obtenus à partir du thermomètre enregistreur Hanna HI141JH (Hanna Instruments).

La température moyenne dans le milieu pour le sham est de l'ordre de 37,2 ± 0,2°C, tandis que dans les cellules exposées, elle est de 36,8 ± 0,4°C. Au sein de l'étuve, la température des milieux de cultures est relativement stable. Bien qu'informative, cette valeur ne reflète cependant pas la température exacte au niveau des cellules, puisque des variations locales de température peuvent se produire. La récente acquisition d'une caméra thermique IR à haute résolution (Flir), nous permettra prochainement de déterminer l'existence ou non de phénomènes locaux d'augmentation de la température.

Dans le cadre de l'impact potentiel des ondes MM sur le stress réticulaire, les cellules HaCaT ont été, dans un premier temps, exposées pendant 24 heures à 60,4 GHz, à la DSP de 0,75 mW/cm² ou 1,15 mW/cm². Ensuite, ces cellules ont de nouveau été exposées à 60,4 GHz, à 1,15 mW/cm² pendant 1 heure ou 6 heures. Enfin, l'étude de l'effet combinatoire entre un stress réticulaire et une exposition aux ondes a été menée sur ces cellules, transfectées avec le promoteur de BiP, traitées à la TG et exposées à 60,4 GHz, (voir chapitre II).

Toujours dans le cadre de l'étude du stress réticulaire, les cellules A375 ont été exposées pendant 1 heure, 6 heures ou 24 heures à 60,4 GHz, à la DSP de 1,15 mW/cm².

L'étude de l'effet potentiel des ondes MM sur la transcription de molécules de la réponse inflammatoire (chapitre III) a aussi été menée sur ces mêmes lignées. Dans un premier temps, un effet puissance a été réalisé. Pour cela, les cellules HaCaT ont été exposées pendant 24 heures à une fréquence de 60,4 GHz, à deux DSP, soit 0,75 mW/cm², soit 1,15 mW/cm². Dans un deuxième temps, les niveaux des gènes de l'inflammation ont été

mesurés dans les cellules HaCaT et A375 après exposition à 60,4 GHz, à une DSP de 1,15 mW/cm² pendant trois temps : 1 heure, 6 heures, 24 heures.

Enfin, les cultures primaires de kératinocytes ont été exposées à différents temps à 60,4 GHz, à une DSP de 1,15 mW/cm². Les conditions d'exposition sont détaillées dans la partie « Détermination de gènes candidats par une approche puces à ADN » de ce présent chapitre.

Plusieurs types d'études sont possibles pour tenter de déterminer si l'exposition de cellules aux ondes MM peut déclencher un stress réticulaire. De nombreuses techniques de biologie moléculaire ont ainsi été employées au laboratoire afin de tenter de déterminer les rapporteurs idéaux. Des essais ont été menés (en utilisant la technique de Western Blot) pour tenter d'évaluer la maturation de deux facteurs de transcription, ATF6 et XBP1, pivots de la réponse UPR. Les résultats obtenus étaient assez mitigés, les anticorps utilisés semblant en être la cause principale (3 lots d'anticorps différents utilisés jusqu'à présent). Bien que n'ayant pas d'indication exacte au niveau protéique de cette maturation, il reste cependant possible d'observer les niveaux de transcription. Ainsi, à l'aide d'une technique de réaction de polymérisation en chaîne (« Polymerase Chain Reaction » (PCR)) classique (semi-quantitative) suivie d'une migration des fragments amplifiés sur gel d'agarose, nous avons pu avoir un aperçu rapide de l'état des cellules (subissant ou non un stress RE) en déterminant la présence de la forme épissée de XBP1. Dans une cellule stressée, les deux formes existent (ARNm épissé et ARNm non épissé) et n'ont pas la même taille (adapté d'après [142]). De même, des transfections ont été réalisées, celles-ci sont détaillées dans la partie suivante.

C. Transfection cellulaire

Suivant les expériences, les cellules U-251 MG ont été tranfectées au Fugène (Roche), tandis que les cellules des lignées HaCaT et A375 l'ont été au jetPEI (Polyplus transfection).

Les plasmides rapporteurs utilisés, contiennent des séquences de promoteurs de gènes connus pour être sensibles au stress réticulaire. Nous avons ainsi eu l'occasion de caractériser l'induction transcriptionnelle d'une portion du promoteur du chaperon BiP, dans des cellules traitées à la thapsigargine (TG, Sigma), molécule capable de bloquer la pompe Ca^{2+} ATP_{ase} du RE, et donc d'induire un stress RE. Ce promoteur est hautement inductible en cas de stress réticulaire, en raison de la présence d'éléments ERSE dans celui-ci (voir introduction). Parmi les différents gènes rapporteurs testés au laboratoire, nous avons choisi de conserver celui-ci.

Les premières expériences furent menées dans les cellules U-251 MG co-transfectées avec le plasmide rapporteur pBiP-luciférase et le plasmide *β*-galactosidase (*β*-gal). Celles-ci ont été traitées à différents temps **(figure 30)**.

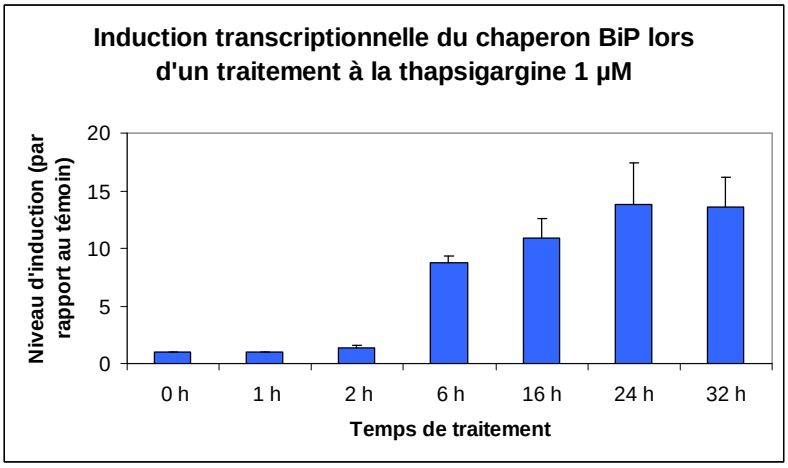

Figure 30 : Etude en fonction du temps de l'induction transcriptionnelle du promoteur du chaperon BiP, après traitement des cellules U-251 MG à la thapsigargine 1 µM, qui induit un stress réticulaire
Ces résultats représentent la moyenne +/- écart-type de 3 expériences indépendantes. L'induction démarre après 6 heures de traitement mais atteint son niveau le plus élevé au bout de 24 heures de traitement.

D'après les données obtenues, la réponse au stress réticulaire est pleinement induite après 24 heures de traitement. A la suite de ce résultat, nous avons conservé ce temps d'exposition pour nos cellules qui sont soumises aux ondes MM. Ceci nous permet en outre de réaliser plusieurs expositions par semaine.

Le plasmide rapporteur contenant le promoteur du gène humain BiP/GRP78 (pBiP$_{-132/+7}$-luc) a été transfecté dans les lignées cellulaires. Après expression transitoire, les cellules seront lysées et l'activité luciférase sera mesurée et normalisée avec le dosage de l'activité *β*-gal par une méthode fluorimétrique [143]. L'activité luciférase est mesurée avec le kit luciferase assay system kit (Promega).

L'étude de l'effet combinatoire d'un stress réticulaire et d'une exposition aux ondes MM a été menée dans les cellules U-251 MG et HaCaT, transfectées avec le promoteur du chaperon BiP (voir chapitre II).

Toujours dans l'étude du stress réticulaire, une autre alternative repose dans l'utilisation du système SEAP (secreted alkaline phosphatase), laquelle est une enzyme sécrétée dont l'activité peut-être dosée. En cas de stress réticulaire, le repliement de cette protéine ne peut se faire au sein du réticulum, empêchant celle-ci de poursuivre son cheminement dans la voie de sécrétion [144]. Les cellules vont être transfectées avec le vecteur d'expression de la SEAP (acheté chez Clontech laboratories). L'activité SEAP sera dosée à l'aide du kit Great EscAPe

SEAP fluorescence detection kit (Clontech laboratories) et normalisée avec le dosage de l'activité β-gal [143].

D. Extraction des ARN, dosage et contrôle qualité

Pour toutes les expériences réalisées avec des lignées cellulaires (U-251 MG, HaCaT, A375 et CCD1106), les ARN sont extraits à l'aide de TRIzol (Gibco), puis vont être rétro-transcrits (Invitrogen), avant de subir une PCR de contrôle (avec le gène de référence GAPDH).

Pour chaque expérience concernant les cultures primaires de kératinocytes, les cellules ont été placées en boîte de culture 6 puits et, après exposition, les ARN ont immédiatement été extraits à l'aide du kit RNeasy mini kit (Qiagen). Pour chaque condition, deux préparations ont été faites en regroupant le contenu de 3 puits pour chaque ligne **(figure 31)**.

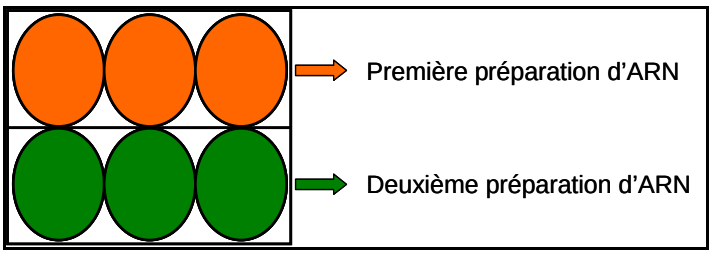

Figure 31 : Préparation des lots d'ARN
Après chaque exposition, les ARN sont extraits à l'aide du kit RNeasy mini kit. Les ARN des trois puits supérieurs sont regroupés ensemble, tout comme ceux des puits inférieurs. Ce regroupement a ainsi pour but d'obtenir deux préparations d'ARN, l'une pouvant servir pour les puces, l'autre pour la vérification d'éventuels gènes marqueurs par RT-PCR en temps réel.

Les ARN de chacune des deux préparations pour chacune des conditions sont ensuite dosés au Nanodrop (Agilent) et soumis à un contrôle qualité, mené à l'aide de l'appareil Agilent 2100 Bioanalyzer, qui permet de vérifier l'intégrité des ARN ribosomiques. Chacun de nos échantillons a satisfait au contrôle qualité. De même, pour chaque condition, les préparations d'ARN se sont montrées similaires (tant en quantité d'ARN, qu'en qualité), l'une d'entre-elle sera utilisée pour effectuer les puces à ADN, tandis que l'autre servira par la suite pour l'étape de validation avec la technique de PCR en temps réel. Ces ARN ont été stockés à -80°C.

E. PCR en temps réel

Par la suite, des études de niveaux d'expression de gènes impliqués dans la réponse UPR ont été effectuées en utilisant pour cela la technique de PCR en temps-réel. Ces

expériences ont été menées sur trois ans avec deux appareils différents. Le premier d'entre eux était le MiniOpticon Real-Time PCR detection system (Bio-Rad), qui a ensuite été remplacé par l'appareil MyiQ Single-Color Real Time PCR Detection System (Bio-Rad). Les résultats ont été analysés avec les logiciels dédiés (Opticon Monitor 3, puis Bio-Rad iQ5). Sur chacune de ces deux machines et préalablement à toute expérience, les conditions de PCR en temps réel ont été optimisées pour chacun des couples d'amorces utilisés. La qualité de ceux-ci a par ailleurs été rigoureusement contrôlée, puisqu'une courbe standard **(figure 32)** a ainsi été obtenue à partir de dilutions en série de chacun de ces lots d'amorces. À partir de cette courbe sera déterminé un coefficient de détermination (R^2) qui, pour attester de la bonne qualité de l'amplification doit être supérieur ou égal à 0,980. De même, à partir du coefficient directeur obtenu pour chacune de ces courbes, l'efficacité de l'amplification des amorces peut être calculée. Elle doit être comprise entre 90 et 105%. Les lots d'amorces utilisés au cours de nos expériences satisfont ces conditions préalables.

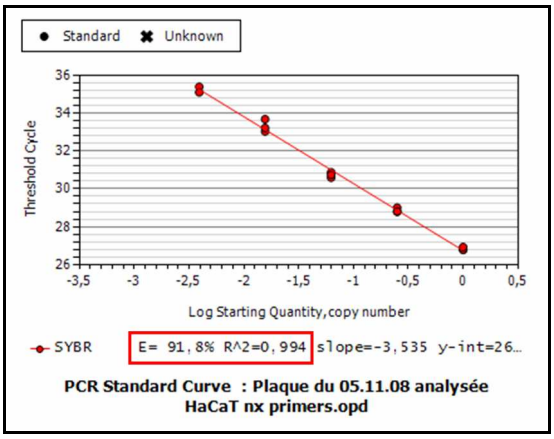

Figure 32 : Exemple de courbe standard obtenue après une dilution en série des primers
Les paramètres de la droite de régression sont détaillés en dessous, dont le coefficient de détermination (R^2= 0,994) et l'efficacité du primer (E = 91,8%) qui sont encadrés en rouge.

L'étude des niveaux d'expression des ARNm de certains biomarqueurs peut-être facilement réalisée par la technique de PCR en temps réel, qui allie une bonne sensibilité (y compris pour les échantilllons d'ARN présents en faible quantité) et une très bonne reproductibilité. Cette technique nécessite cependant de disposer de bons contrôles internes, utilisés pour normaliser la fraction d'ARNm. Ces contrôles internes sont appelés gènes de ménage, gènes de référence ou encore gènes invariants et leurs niveaux ne doivent pas varier au cours des expérimentations dans les cellules témoins ou traitées. Pour éviter d'obtenir des résultats incorrects, en raison de la variation d'expression d'un gène de référence, il est recommandé d'en utiliser plusieurs [145]. Toutes nos expérimentations ont été effectuées dans cet état d'esprit puisque 3 gènes de références ont été utilisés au minimum. Pour analyser

les résultats obtenus en PCR en temps réel, nous utilisons le logiciel Bio-Rad iQ5. Il permet de calculer les coefficients d'induction pour chaque gène cible, en intégrant plusieurs gènes de référence et leur efficacité. Ce logiciel utilise les algorithmes de calculs développés dans le logiciel libre Qbase [146, 147].

Les niveaux d'expression des gènes marqueurs de stress réticulaire, vont être mesurés par la technique de PCR en temps réel. Ces biomarqueurs ont été sélectionnés après une étude préalable, où les niveaux d'expression de différents gènes jouant un rôle dans le RE ont été évalués par PCR en temps réel dans des cellules U-251 MG traitées à la thapsigargine. Au cours de cette expérience, BiP et ORP150, deux chaperons du RE, ainsi que HERP sont très induits **(figure 33)**.

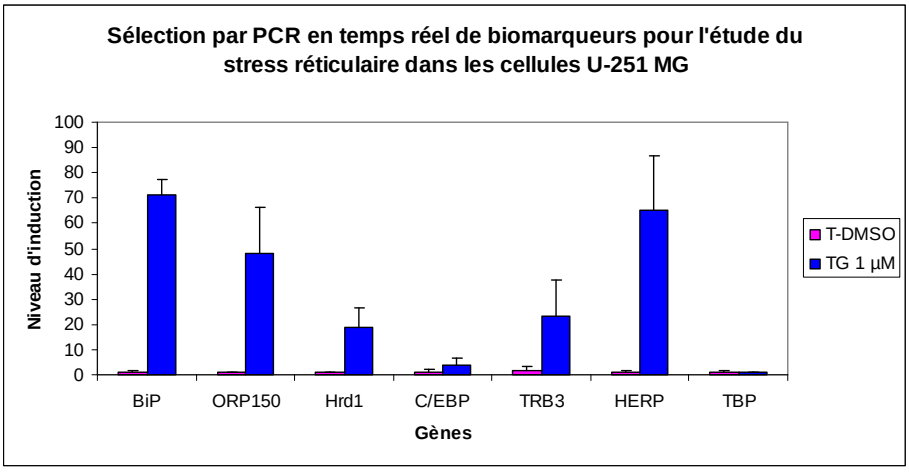

Figure 33 : Comparaison par PCR en temps réel des niveaux d'expression de différents gènes du RE dans des cellules U-251 MG traitées ou non à la thapsigargine durant 16 heures
Ces résultats correspondent à la moyenne +/- écart type de 3 expériences indépendantes. Les gènes des chaperons BiP et ORP150 présentent des niveaux d'induction élevés, tout comme HERP, protéine du RE liée à la membrane impliquée dans la stabilisation de l'homéostasie calcique du RE. À titre d'exemple, le gène TBP a été placé sur cette figure et est stable quelle que soit la condition. Il peut donc être utilisé comme gène de référence.

HERP, protéine du RE liée à la membrane et impliquée dans la stabilisation de l'homéostasie calcique [148] n'a cependant pas été conservé en tant que biomarqueur. BiP est l'un des gènes répondant le mieux au stress réticulaire. Il est, en outre, l'élément central de la réponse UPR. Il est intéressant de conserver ORP150, autre chaperon du RE, comme biomarqueur. Ce dernier répond bien au stress du RE mais peut aussi être induit en cas d'hypoxie ou de stress oxydant. De plus, sa surexpression permet également de jouer un rôle protecteur (antiapoptotique), en empêchant le relargage de Ca^{2+} du RE. Les séquences des amorces des gènes retenus sont présentées dans le **tableau 6**.

Nom	Séquence sens	Séquence antisens
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
TBP	TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA	CACATCACAGCTCCCCACCA
HPRT1	TGACACTGGCAAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
BIP	CTCGAATTCCAAAGATTCAGCAACT	CTCCACAGTTTCAATACCAAGTG
ORP150	TGCAGTGATCACCGT	TCTTTCCGGCGGAAGACACC

Tableau 6 : Séquences des différentes amorces utilisées en PCR en temps réel

Les niveaux d'expression de gènes marqueurs de la réponse inflammatoire (voir chapitre III) seront étudiés par la technique de PCR en temps réel dans les cellules HaCaT et A375. Les séquences des amorces utilisées sont présentées dans le **tableau 7**.

Nom	Séquence sens	Séquence antisens
CXCL1	AGGGAATTCACCCCAAGAAC	ACTATGGGGGATGCAGGATT
CXCL8	GACAAGAGCCAGGAAGAAACC	AGCTGCAGAAATCAGGAAGG
CCL2	AGCAAGTGTCCCAAAGAAGC	CTGAACCCAVTTCTGCTTGG
TIMP1	CTTCTGGCATCCTGTTGTTG	AGAAGGCCGTCTGGGT
c-Jun	GGAGACAAGTGGCAGAGTCC	GCACGTCCTTCTTCTCTTGC
HSP27	CAGGACGAGCATGGCTACATCT	GGGATGGTGATCTCGTTGGAC
HSP70	AGGCCGACAAGAAGGTGCT	TGGTACAGTCCGCTTTGTACTT

Tableau 7 : Séquences des différentes amorces utilisées en PCR en temps réel

F. Evaluation de la croissance/viabilité cellulaire

La croissance ainsi que la viabilité cellulaire sont mesurées à l'aide du test MTT. Cette méthode est basée sur la mesure de l'activité métabolique cellulaire et plus précisément sur la capacité qu'ont les déshydrogénases mitochondriales à cliver le 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Sigma). Ce clivage entraîne la formation de cristaux bleus-violets de formazan, qui seront dissous et la quantité de cristaux formés sera évaluée par une méthode spectrophotométrique [149]. Avant de réaliser des expositions, nous avons voulu déterminer si l'exposition 24h de deux lignées cellulaires à la DSP de 1,15 mW/cm² (au dessus de la norme d'exposition grand public) pouvait avoir un effet biologique **(figure 34)**.

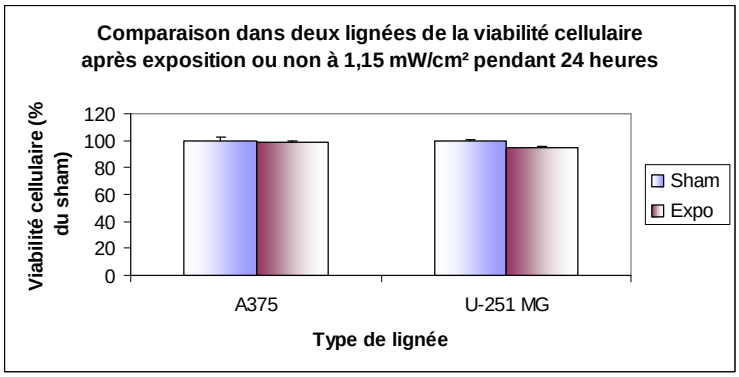

Figure 34 : Test de viabilité cellulaire (test MTT)
Des cellules issues de deux lignés cellulaires différentes (A375 et U-251 MG) ont été exposées ou non à 60,4 GHz durant 24 heures, à une DSP de 1,15 mW/cm². À cette DSP, il n'y a pas d'altération de la viabilité cellulaire.

G. Statistiques

Pour l'ensemble des expériences décrites ci-après (à l'exception des puces à ADN), les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Minitab (Minitab Incorporation).

H. Détermination de gènes candidats par une approche puces à ADN

Pour chaque lot de cellules, deux séries d'expériences indépendantes ont été réalisées ; ces expositions ont toutes été réalisées sur des cellules comprises entre 3 et 5 passages, afin d'exclure un phénomène de sénescence ou de dérive de la population cellulaire. Les expositions ont été réalisées à la fréquence de 60,4 GHz, à une DSP de 1,15 mW/cm² à des durées précisées dans la **figure 35**.

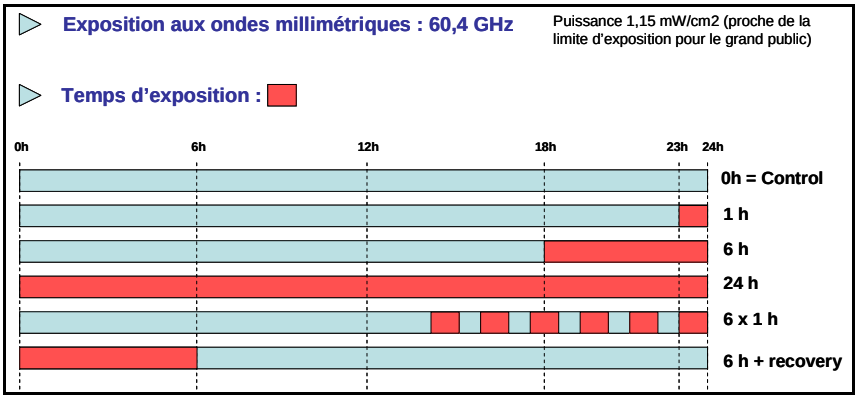

Figure 35 : Méthodologie adoptée pour réaliser les expositions de cultures de cellules primaires aux ondes millimétriques
Toutes les cellules sont placées dans l'incubateur pendant 24 heures. Les expositions peuvent être réalisées sur la dernière heure, sur les 6 dernières heures, ou sur la totalité des 24 heures.
En parallèle, des expositions séquentielles ont aussi été effectuées (1 heure d'exposition, puis une demi-heure de récupération). Enfin, une exposition faite durant les 6 premières heures et suivie par 18 heures de récupération. Pour chaque lot, la répartition des expériences s'est faite aléatoirement.

Pour toutes les expériences (exposition, sham), les cellules ont été placées pendant 24h dans l'incubateur. Les expositions ont été réalisées durant différents temps (1h, 6h, 24h), afin de déterminer si les effets potentiels provoqués par les ondes pouvaient être de nature précoce (1h), intermédiaire (6h) ou tardive (24h). Il est important de préciser que pour les temps courts (1h et 6h), les expositions ont été réalisées respectivement lors de la dernière ou lors des 6 dernières heures, afin d'éviter l'éventuelle mise en place de phénomènes de retour à la normale. Enfin, étant limités par le nombre de lames utilisées pour les puces à ADN, un sham a été réalisé à partir de cellules placées durant 24h (sans exposition) dans l'incubateur pour chaque série de chaque lot de cellules. En parallèle, des cellules ont subi par intermittence 6 expositions de 1h coupées de phase de récupération de 1h. Le but de cette expérience consistant à déterminer si une succession d'exposition peut provoquer ou non un effet biologique. Enfin, à titre purement expérimental, l'étude d'une éventuelle réversion de l'effet biologique a été réalisée, après exposition des cellules durant les 6 premières heures dans l'incubateur, suivies de 18h sans exposition. Cette expérience avait pour but de vérifier si les modifications potentiellement engendrées par l'exposition aux ondes étaient réversibles.

Pour chaque lot de cellule, et pour chacune des deux séries indépendantes d'expérimentations, la répartition des conditions d'exposition n'a pas été faite suivant le même ordre, de façon à répartir les paramètres (nombre de passages et types d'exposition) aléatoirement.

Les expérimentations ont été menées sur des puces à ADN (Whole Human Genome Kit 4*44K, Agilent) (One color microarray-based gene expression analysis). Chaque puce possède sur sa lame de verre 4 pistes, chacune comportant 532 lignes et 85 colonnes, soit un total de 45220 points ou « spots ». Sur ces pistes, l'ensemble des gènes codants avec leurs différents transcrits possibles (en raison de l'existence de variants d'épissage), retrouvés chez l'être humain sont représentés, sous la forme de points ou « spots », soit 41000 points, constitués d'oligonucléotides d'une taille de 60-mer, imprimés sur la surface de la lame. 3000 points supplémentaires sont présents et serviront de contrôle interne.

La préparation des échantillons a été faite selon le protocole fourni par le fabricant. À nos échantillons d'ARN, sont ajoutés des petits ARN fournis par le fabricant, appelés Spike, (One-color RNA Spike-In Kit, Agilent), qui serviront de contrôle positif, permettant de localiser et d'identifier les spots sur la lame, et de réaliser un contrôle quantitatif par l'établissement de la relation entre l'intensité de la fluorescence et la quantité d'ARN. Ces deux groupes d'ARNs ont été rétrotranscrits (MMLV–RT (Invitrogen)) et les ADNc obtenus

ont ensuite été transcrits et amplifiés en ARNc via la T7 RNA polymerase, subissant en parallèle un marquage à la cyanine 3 (Quick Amp Labeling Kit, one color, Agilent). Ces ARNc ont ensuite été purifiés et l'incorporation des cyanines a été contrôlée. Chaque lame de puce contient 4 pistes et, au total pour nos conditions, 5 lames ont été utilisées. Les échantillons marqués ont ensuite été répartis comme indiqué dans la **figure 36**.

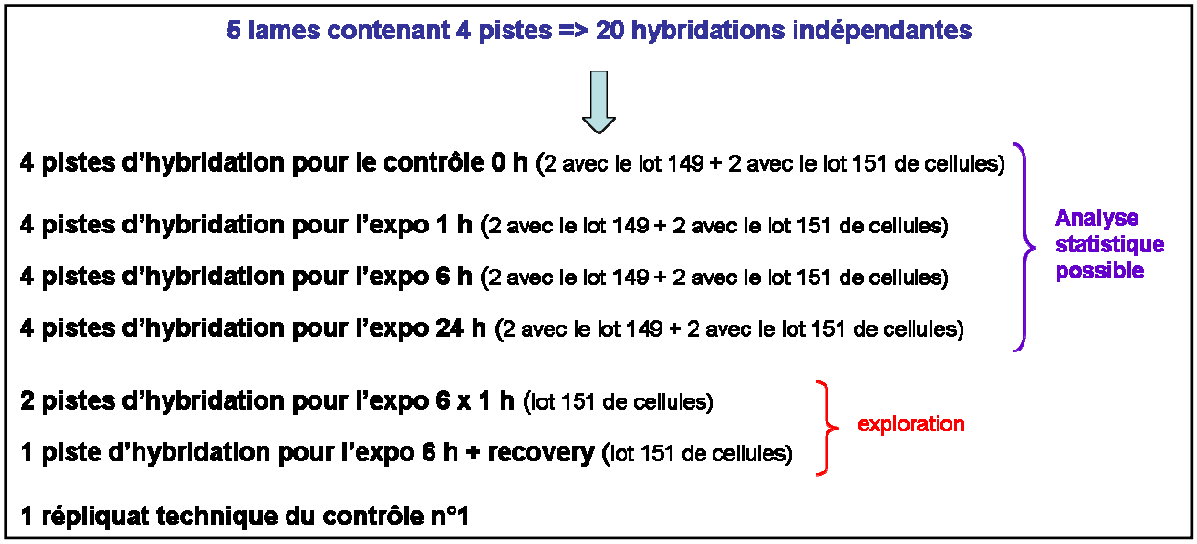

Figure 36 : Répartition des échantillons marqués sur les lames
Celle-ci est faite de manière aléatoire de façon à éviter tout biais technique.

La répartition a été faite de manière aléatoire sur chacune des lames. En clair, une lame ne contient pas uniquement la même condition. Après dépôt sur lame, celles-ci sont hybridées (Hybridization Kit, GE Protocole V4, Hybridization Backing Kit, 4*44k format, Agilent) pendant 17h (four d'hybridation de puces à ADN Agilent), puis sont scannées à l'aide de l'appareil DNA microarray scanner (Agilent). A la suite de cette étape, deux pistes présentaient un niveau de distribution non homogène du bruit de fond (1 échantillon exposition 1h et 1 échantillon exposition 6 fois 1h). Ces lames ont alors subi un lavage pendant 15 secondes à l'acétonitrile, puis ont été scannées une seconde fois.

I.2 Article publié dans *Antennas and propagation*

Cette partie est constituée du papier soumis et accepté dans la revue Antenna and Propagation. Les expériences réalisées dans la partie suivante ont été mises en place à l'IETR pour caractériser notre système d'exposition acquis en avril 2008.

Le principal but de ce travail consistait à déterminer les effets biologiques potentiels des ondes MM de faible puissance sur la viabilité cellulaire, ainsi que sur l'homéostasie intracellulaire des protéines. Un système d'exposition spécifique, permettant de réaliser des expositions en champ lointain, avec des densités de puissance proches de celles qui seront produites par les futurs systèmes de télécommunications sans fil fonctionnant dans la bande de fréquence de 60 GHz a été développé et caractérisé. Les valeurs de DAS ont été déterminées pour des bioéchantillons en utilisant la méthode FDTD. Les ondes MM à 60,4 GHz avec une densité de puissance incidente maximale de 1 mW/cm² n'altèrent pas la viabilité cellulaire, l'expression génique ou la conformation des protéines.

Publication

Evaluation of the potential biological effects of the 60-GHz millimeter waves upon human cells

Maxim Zhadobov, Christophe Nicolas Nicolaz, Ronan Sauleau, Fabienne Desmots, Daniel Thouroude, Denis Michel and Yves Le Dréan

IEEE Transactions on antennas and propagation 2009

IEEE TRANSACTIONS ON ANTENNAS AND PROPAGATION, VOL. 57, NO. 10, OCTOBER 2009 2949

Evaluation of the Potential Biological Effects of the 60-GHz Millimeter Waves Upon Human Cells

Maxim Zhadobov, *Member, IEEE*, Christophe Nicolas Nicolaz, Ronan Sauleau, *Senior Member, IEEE*, Fabienne Desmots, Daniel Thouroude, Denis Michel, and Yves Le Dréan

***Abstract*—We investigate potential biological effects of low-power millimeter-wave radiation on human cell viability and intracellular protein homeostasis. A specific exposure system allowing to perform far-field exposures with power densities close to those expected from the future wireless communications in the 60-GHz band has been developed and characterized. Specific absorption rate (SAR) values were determined for the biosamples under test using the FDTD method. It was shown that millimeter-wave radiation at 60.42 GHz and with a maximum incident power density of 1 mW/cm^2 does not alter cell viability, gene expression, and protein conformation.**

***Index Terms*—Bioelectromagnetics, biological effects, millimeter waves, numerical dosimetry, wireless communications.**

I. Introduction

IN THE LAST decade, progress in computational and experimental millimeter-wave electronics has allowed to identify the millimeter-wave frequency band as highly promising for a number of high-resolution and high-speed wireless systems [1]–[6]. If we restrict our attention to the interactions with biological tissues, current and near-future applications of millimeter waves can be divided into two subgroups depending on the radiated power: 1) high-power systems inducing a significant heating of the human body surface, like nonlethal weapons (e.g., active denial systems at 94–95 GHz) and therapeutic applications at 42.25, 53.57, and 61.22 GHz [7]; 2) low-power communications, imaging, and radar systems in V- and W-bands that do not induce any substantial temperature increase (typically less than 0.5°C) of human tissues, but may possibly produce biological and health effects due to prolonged exposure of the users.

In particular, the unlicensed 57–64 GHz subband is of strong interest today for high data rate (> 1 Gb/s) short-range point-to-point and point-to-multipoint communications (e.g., wireless USB2.0, wireless video, streaming data, telecom backhauls) [8]–[12]. From the bioelectromagnetic point of view, the human body has never been exposed in natural conditions to radiations in the 60-GHz band since these frequencies, which correspond to the peak of molecular oxygen absorption, are strongly attenuated in the atmosphere [13]. Furthermore, a large number of spectral lines of molecular groups containing carbon or oxygen molecules are located around 60 GHz. Moreover, these frequencies have also been used in several countries for biomedical purposes [14], thereby suggesting that molecular interactions between the millimeter waves and the human body are possible.

A few theories were proposed to explain potential biological effects of millimeter waves [15]. A number of experimental efforts have been also undertaken and have shown that millimeter-wave radiations may interfere with several cellular processes under certain exposure conditions. For instance, it was demonstrated that these radiations can induce changes in gene expression [16]. Additionally, millimeter waves were found to reduce tumor metastasis [17] and protect cells from toxicity of anticancer medicines [18]. It was also reported that cellular metabolism and cell proliferation can be affected by exposure to low-power millimeter waves [19]. Furthermore, it was recently demonstrated that these radiations can modify the structural state of phospholipids within biomembranes [20], [21]. However, there remains a crucial lack in identification of exact cellular targets of millimeter waves, and today there is no well-established scientific interpretation for the observed effects. Within this context, from the general public safety viewpoint, it is important to investigate the possible biological effects of low-power communication systems in the 60-GHz band before their wide, near-future deployment within domestic and professional environments.

Various environmental factors can cause significant changes in the organization and conformation of biological macromolecules. DNA and proteins are the cellular components most affected by variations of physical and chemical conditions. DNA damages are induced by high-energy treatments (e.g., ionizing radiations), whereas proteins are particularly fragile and affected by relatively weak disruptive treatments, such as heat. Millimeter waves are nonionizing radiations and, as expected, it was shown that they are not genotoxic [22]. Nevertheless, physical principles do not exclude that these radiations might alter the protein conformations or cause a proteotoxic stress. Denaturation of proteins due to environmental insults may have many biological consequences. It may lead to various cellular dysregulations, such as defects in enzymatic activities, signal transduction, cellular organization, or cell growth. Finally, prolonged stress conditions may also affect the cellular

Manuscript received August 29, 2008; revised January 29, 2009. First published August 04, 2009; current version published October 07, 2009. This work was supported in part by the Agence Nationale de la Recherche (ANR), France, under Grant 2006 SEST 19 02 (HIMWR project), by the Health and Radiofrequencies Foundation, France (StressOM project), and in part by the NIH NCCAM, USA, under Grant P01-AT002025.

M. Zhadobov, R. Sauleau, and D. Thouroude are with the Institute of Electronics and Telecommunications of Rennes, UMR CNRS 6164, University of Rennes 1, 35042 Rennes, France (e-mail: maxim.zhadobov@univ-rennes1.fr).

C. Nicolas Nicolaz, F. Desmots, D. Michel, and Y. Le Dréan are with the Intracellular Protein Homeostasis Laboratory, UMR CNRS 6026, University of Rennes 1, 35042 Rennes, France (e-mail: yves.le-drean@univ-rennes1.fr).

Digital Object Identifier 10.1109/TAP.2009.2029308

0018-926X/$26.00 © 2009 IEEE

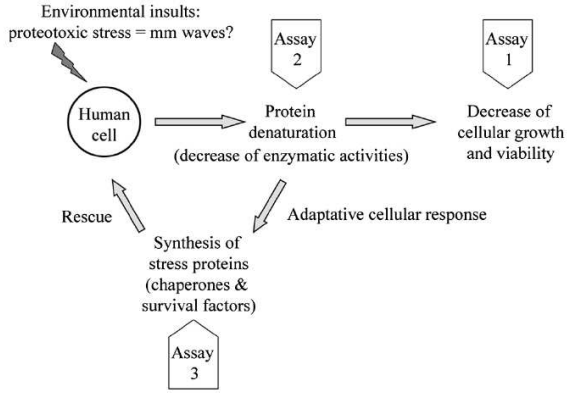

Fig. 1. Methodology implemented to investigate potential in vitro biological effects of millimeter waves. Assay 1: Cell growth measurement. Assay 2: Luciferase assay on purified proteins. This reflects the possibility of direct protein denaturation after exposure to millimeter waves. Assay 3: Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). This technique enables one to measure gene expression of stress-inducible factors in order to verify if millimeter waves could trigger cellular adaptive response.

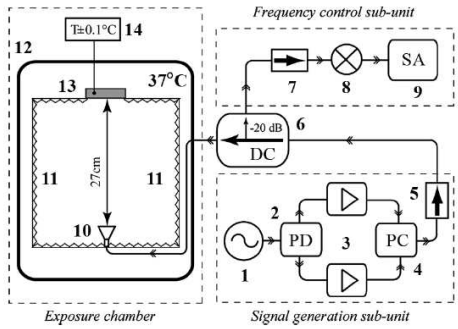

Fig. 2. Experimental setup and exposure system. *Signal generation subunit (QuinStar Technology Inc., CA)*: 1—60.42 GHz Gunn oscillator. 2— −3 dB power divider (58–62 GHz). 3—V-band power amplifiers (25-dB gain). 4—Power combiner (58–62 GHz). 5—Isolator (20-dB isolation). *Frequency control subunit*: 6— −20-dB directional coupler HP V752D. 7—Isolator HP V365A (30-dB isolation). 8—Mixer M15HWD. 9—Spectrum analyzer R3182. *Exposure chamber*: 10—17-dB-gain pyramidal horn antenna. 11—Absorbing materials. 12—Incubator MEMMERT UE400. 13—6-well or 96-well tissue culture plate. 14—Thermocouple.

viability and trigger apoptosis, a form of programmed cell death that can lead to severe diseases when deregulated. Consistently, cells have developed sophisticated molecular systems to sense and respond rapidly to changes in their environment [23]. In the presence of stress conditions, cells express specific chaperones and stress factors to cope with the accumulation of misfolded proteins. These factors also have protective functions that allow cells to survive.

Consequently, a relevant and accurate way for the investigation of biological effects of millimeter waves at the cellular level consists of studying and quantifying the most sensitive cellular responses to stress as indicators (biomarkers) of cellular homeostasis. As cellular stress is a multistep process, we developed and applied several assay systems to assess potential stress induction after exposure. Our methodology is summarized in Fig. 1. Several complementary aspects of the cell physiology have been considered in this work, starting with relatively general characterization of cellular viability (assay 1) and then investigating potential subcellular modifications at the level of protein conformation (assay 2) and gene expression (assay 3).

As human skin is the primary target for the millimeter waves, we used the immortalized keratinocytes HaCaT cells derived from human epidermis [24]. Additionally, to validate and compare the results obtained using keratinocyte cells, the human astrocytoma glial cell line U-251 MG was used as a relevant and well-characterized biological model to investigate cellular stress.

This paper is organized as follows. We describe in Section II the structure and characteristics of our exposure system and provide numerical dosimetry data for the exposed biosamples. Some details about the biological protocols are also provided at the end of this section. The experimental results of the biological tests after exposure of human cells at 60.42 GHz are described in Section III. Finally, discussions and conclusions are given in Section IV.

II. Experimental Systems and Numerical Dosimetry

In our experiments, the biological samples were placed in standard 6-well or 96-well tissue culture dishes and were exposed or sham-exposed to low-power millimeter waves. In this section, the exposure system and experimental setup are described. Then, numerical dosimetry data on the specific absorption rate (SAR) within the exposed biological samples are provided. Finally, some specific characteristics of the considered cells and bioassays used to quantify potential bioeffects are given.

A. Experimental Setup

A narrowband exposure system for in vitro studies has been specifically developed for human cells exposure under far-field conditions. Fig. 2 schematically represents the three main subunits of this system, namely the signal generation subunit, the frequency control subunit, and the exposure chamber.

A low-power CW signal is generated by a Gunn oscillator at the center frequency $f_c = 60.42$ GHz. This frequency value coincides with the maximal oxygen-induced absorption peak in V-band. A mechanical tuning system enables one to shift the resonant frequency by ± 150 MHz around f_c. This signal is amplified and transmitted toward a 17-dB-gain pyramidal horn antenna with aperture dimensions 22.2 mm $\times$ 16.7 mm through a set of WR-15 rectangular waveguides and a directional coupler. In this work, the output power P equals 180 mW; this corresponds to a maximum incident power density (IPD) of 1 mW/cm^2 at the center of the tissue culture plate. This value coincides with the general public exposure limit established by international guidelines and recommendations [25].

The radiated power was carefully checked before and after each exposure. The use of a Gunn oscillator guarantees a very satisfactory frequency stability of the output signal as highlighted in Fig. 3, ($\Delta f_c = \pm 0.006$ GHz). This also ensures its location within the peak region of oxygen absorption.

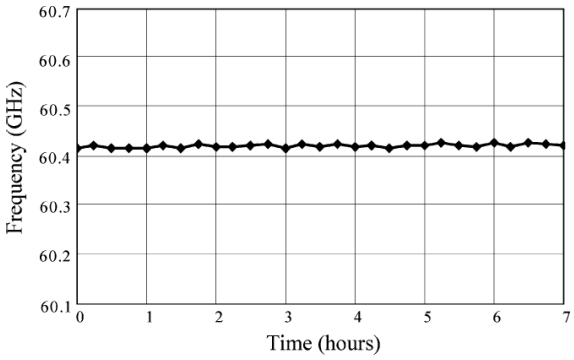

Fig. 3. Frequency stability of the output signal versus exposure duration. The center frequency is equal to 60.42 GHz.

The tissue culture plates (8.5 cm × 12.7 cm) with cells were exposed or sham-exposed under far-field conditions in two different moments in the incubator at 37°C and then compared later. Sham-exposures were performed under the same experimental conditions as exposures, but with the generator switched off.

B. Numerical Dosimetry

The exposure levels of biological samples at millimeter waves are typically characterized by two parameters, namely the IPD and the SAR values. IPD data have been previously reported for 6-well and 24-well tissue culture plates illuminated by a pyramidal horn antenna [26]. Here, we mainly focus on determination of the average SAR for the two exposure scenarios corresponding to the three assays defined in Fig. 1: 1) exposure of cell monolayers located in 6-well or 96-well culture plates (assays 1 and 3); 2) exposure of purified protein solutions in a 96-well tissue culture plate (assay 2).

1) Average SAR in Cell Monolayers: The analysis of gene expression modifications after exposure at 60.42 GHz (Section III-C) was performed using standard 6-well culture plates made of polystyrene. In the experiments, each plate was illuminated under far-field conditions by a pyramidal horn antenna 27 cm apart, as illustrated in Fig. 2. The cell monolayer is located at the bottom of each well and is covered by a culture medium whose height is equal to 1 cm. In the modeling, the thickness of the monolayer was assumed to be 30 μm. Previously, it was shown that the SAR within the cell layers in the tissue culture plates is not critical to the thickness variations of the monolayer ranging from 10 to 30 μm [27]. The wells and culture plates are schematically represented in Fig. 4.

The dielectric properties of the cell monolayer and culture medium were determined applying Maxwell's mixture equation to the free-water permittivity data. The corresponding data are available in [27] from 30 to 100 GHz. They are given at 60.42 GHz in Table I.

The distribution of the electromagnetic field within each of the six wells was computed using the FDTD method (XFDTD software from REMCOM Inc.) that proved to be very well adapted for biomedical electromagnetic dosimetry [28]–[30].

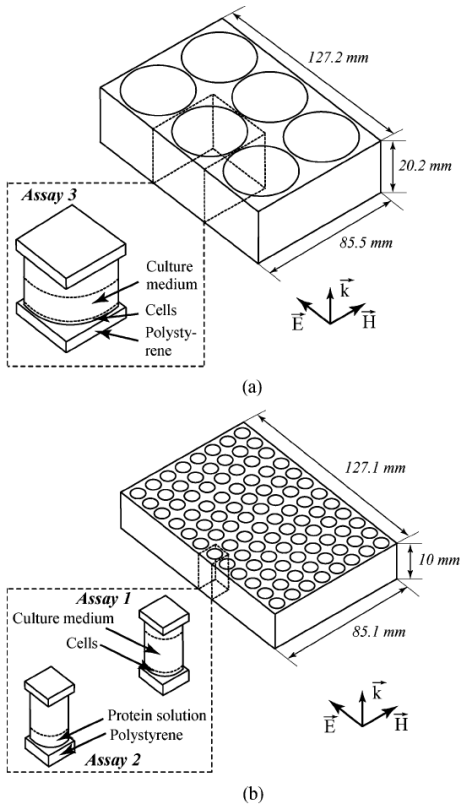

Fig. 4. Dimensions of 6-well and 96-well tissue culture plates, and schematic representation of individual wells. (a) 6-well tissue culture plate. (b) 96-well tissue culture plate.

TABLE I
PROPERTIES OF THE MATERIALS USED IN THE MODELING AT 60.42 GHz

Material	Relative permittivity	Electric conductivity (S/m)
Air	1	0
Polystyrene	2.3-0.003j	0.01
Culture medium	15.2-22.4j	77.1
Cells	10.9-14.5j	50.4
Protein solution	14.7-21.7j	47.1

All simulations were performed using adaptive rectangular mesh with a cell size d ranging from $l/10$ (3 μm) up to $\lambda/20$ (250 μm in free space), where λ and l are the wavelength in the considered substructure and the smallest dimension of this substructure, respectively. We assumed the incident field to be a normally incident, linearly-polarized plane wave. Each computation was performed for single-well applying boundary conditions as defined in Fig. 5.

The average SAR over the cell monolayer volume was determined from the electric field values, electric conductivity, and average mass density of the cells $\rho = 1.11$ g/cm^3 (Fig. 5). This modeling strategy has already been validated experimentally using infrared thermometry for 24-well plates [27]. As the

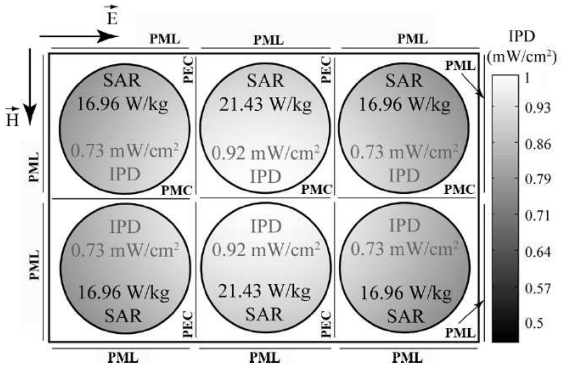

Fig. 5. IPD distribution (grayscale), average IPD, and average SAR in each well of the 6-well tissue culture plate. PML, PEC, and PMC denote the perfectly matched layer, the perfect electric conductor, and the perfect magnetic conductor boundary conditions, respectively.

four corner wells and two central wells are symmetrical from the electromagnetic point of view, their average SAR is the same.

The SAR was also computed for monolayers located in 96-well tissue culture plates. Such plates have been employed to study cell viability (Section III-A). Here, taking into account the large number of wells, periodic boundary conditions were applied at four lateral sides of a well. For a peak IPD of 1 mW/cm^2, the average SAR ranges from 26.2 (center well) down to 13.7 W/kg (corner wells).

2) Average SAR in Purified Protein Solutions: The direct effect on possible protein conformation changes after exposure to the millimeter waves was studied using a purified protein solution located in a 96-well tissue culture plate (Section III-B). Each well was filled with 50 μL of protein solution forming a cylinder whose height and diameter equal 1.8 and 6 mm, respectively. The volume of the solution was carefully chosen to get enough material for the biological tests and, at the same time, to ensure a maximum variation of the average SAR at different heights of the solution smaller than ± 5 dB with respect to the averaged SAR over the total volume of the solution.

The relative permittivity and electric conductivity of our solution were determined as explained in Section II-B1; they are given in Table I. It is important to note that due to the diffraction, multiple reflections, and mutual coupling between neighboring wells, the protein solution was also partly exposed from the lateral sides and from the top that increases the averaged over the solution volume SAR. It is also worthwhile to mention that due to the Brownian motion and convection, the protein solution is constantly mixed, which ensures more homogeneous exposure conditions.

The electromagnetic problem was solved using the FDTD method by applying periodic boundary conditions on opposite lateral sides of a single well. Depending on the well location in the culture plate, the averaged SAR over the solution volume was found to be in the range 4.3 ± 1.3 W/kg. The resulting averaged SAR values are much smaller than for cell monolayers (Fig. 5) since the penetration depth of millimeter waves is smaller than the protein solution height [27].

C. Cell Culture and Bioassays

1) Cell Culture: Immortalized HaCaT cells [24], derived from human epidermis, were kindly provided by Dr. M-D. Galibert-Anne (University of Rennes 1, Rennes, France), and they were grown in Dubelcco's modified Eagle medium (Gibco/Life Technologies), supplemented with 10% of Fœtal Calf Serum, 100 units/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin, and 0.25 μg/ml amphotericin (Gibco/Life Technologies).

We also used human astrocytoma cell line U-251 MG [31], as they are highly sensitive and respond with great efficiency to environmental perturbations. Cell culture of U-251 MG was performed as described previously [32], using the same culture medium as for the HaCaT cells.

Both cell lines were maintained at 37°C under 5% CO_2 in the air. The cell cycle durations for HaCaT and U-251 MG cells are 20 and 24 h, respectively. Cells were spread in order to have around 60%–70% of confluence at the end of the exposure experiments.

2) Bioassays: As summarized in Fig. 1, three series of biological assays were carried out after exposure to millimeter waves: 1) study of cell growth and viability; 2) analysis of direct protein denaturation; 3) determination of possible modifications of gene expression. In each case, multiple exposures were performed to ensure appropriate statistics. The corresponding experimental results are given in Section III.

Cell growth and viability (assay 1 in Fig. 1) were measured using the "cell growth determination kit" from Sigma-Aldrich. Cell viability was determined by measurements of cellular metabolic activity, which is proportional to the number of viable cells in the culture dish. This method is based on the cleavage of the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (also known as MTT) by the mitochondrial dehydrogenases of viable cells. Cells spread in a 96-well plate were sham-exposed or exposed to 60.42 GHz radiation for 24 h. The cells were incubated with the MTT reagent for the last 3 h of the culture. Cleavage by metabolically active cells leads to the formation of purple formazan crystals. The latter were solubilized and measured by a spectrophotometric method, according to the manufacturer's recommendations.

The direct protein denaturation was studied using in vitro luciferase (Luc) assay (assay 2 in Fig. 1). The cDNA encoding the luciferase enzyme from firefly (*Photinus pyralis*) was inserted into the pGEX-3X plasmid (GE Heathcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden), which corresponds to a Glutathione S-Transferase (GST) expression vector. The presence and the orientation of the insert within the recombinant plasmid were verified by restriction enzyme analysis. *E. coli* BL21 bacteria cells were transformed with the resulting pGEX-Luc expression vector and selected colonies were tested for protein production. Recombinant GST-Luc fusion protein was expressed and purified as described in GE Healthcare Life Sciences protocols [33]. Briefly, whole cell lysates were obtained from transformed bacteria grown at 32°C and induced with 0.5 mM IPTG for 5 h. Soluble proteins were separated from insoluble materials by centrifugation. Then, the GST-Luc fusion protein was purified by affinity chromatography using glutathione-agarose beads. The purified GST-Luc (50 ng/μL,

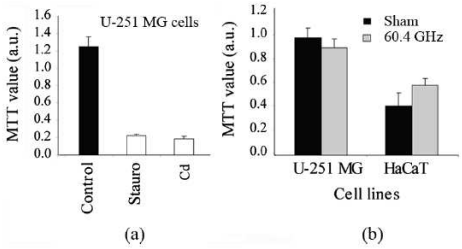

Fig. 6. Cell viability test results. (a) Positive control in presence of cell death inductors. (b) Cell viability for cells exposed or sham-exposed to millimeter waves. Data is shown for 12 samples as mean value and standard deviation.

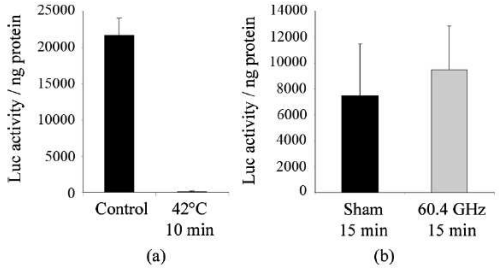

Fig. 7. Protein luciferase activity after exposure or sham-exposure to 60.42-GHz radiation. (a) To demonstrate how sensitive the luciferase enzyme to denaturing conditions is, a heat shock treatment (42°C, 10 min) was performed and compared to control (4°C, 10 min). (b) Activity of exposed at 60.42 GHz and sham-exposed samples (37°C, 15 min). Data provided for four samples.

580 nM) was incubated in 50 μL of phosphate buffered saline (PBS) in a 96-well plate. The purified GST-Luc was exposed or sham-exposed to millimeter waves for 15 min at 37°C. Its enzymatic activity was then determined in a luminometer using a luciferase assay system kit (Promega). As a positive control, thermal denaturation of luciferase (10 min at 42°C) was performed under the same conditions.

Finally, to assess potential modifications of gene expression (assay 3 in Fig. 1), we used reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis. Total RNA from U-251 MG or HaCaT cells, exposed or sham-exposed for 24 h, were prepared and reverse-transcribed as previously described [32]. The mRNA expression levels of stress-induced survival factors (HSP70, BiP) were measured by real-time PCR and normalized as explained in [34].

Statistical significance of the performed essays was evaluated by using Student's t test within the Minitab 15.1.1 software. $P > 0.05$ was considered as a criterion of nonsignificance.

III. Results

In this section, we present the experimental results on the potential modifications induced at cellular (viability of cells) and subcellular (protein conformation and gene expression) levels after cell exposure to low-power millimeter-waves.

A. Viability of Cells

To address the potential cytotoxicity of millimeter-wave radiation, the MTT assay was performed after 24 h of exposure to 60.42 GHz (Fig. 6).

As a positive control demonstrating the decrease of cell viability as a reaction to stress, the MTT test was performed for U-251 MG cells in the presence of cell death inductors, namely 10 μM staurosporine (Stauro: a potential anticancer drug that provokes apoptosis) or 8 μM cadmium (Cd: a highly toxic heavy metal). Under these conditions, the cell viability was decreased by a factor larger than 6 [Fig. 6(a)].

Then, the cell viability was compared for the exposed ($P = 180$ mW, $\mathrm{IPD}_{\max} = 1$ mW/cm^2, $\mathrm{SAR}_{\mathrm{av}} = 13.7 - 26.2$ W/kg) or sham-exposed cells ($P = 0$ mW). Our results are given in Fig. 6(b). They clearly show that, in contrast to the positive controls, millimeter-wave radiation does not decrease cell viability or cellular proliferation for the cell lines used in our study.

B. Effects on Protein Conformation

Purified protein luciferase dissolved in saline solution was exposed to 60.42 GHz or sham-exposed. The choice of the biological system under test was determined by its extremely high sensitivity to various physical and chemical conditions.

As a positive control, an in vitro denaturation experiment was performed, demonstrating that a short incubation at 42°C is sufficient to entirely denature the luciferase [Fig. 7(a)].

The protein solution was exposed or sham-exposed for 15 min at 37°C ($P = 180$ mW, $\mathrm{IPD}_{\max} = 1$ mW/cm^2, $\mathrm{SAR}_{\mathrm{av}} = 3-5.6$ W/kg). This experiment was restricted to very short-term exposure time as purified luciferase is extremely fragile and its prolonged incubation may rapidly abolish its enzymatic activity. Our experimental results [Fig. 7(b)] show that millimeter waves do not significantly change luciferase activity under the considered exposure conditions. Taking into account relatively nonhomogeneous distribution of the SAR in the protein solution, further complementary investigations in this direction might be useful.

C. Effects on Gene Expression

Finally, we studied whether prolonged exposure to millimeter-wave radiation has a proteotoxic effect strong enough to trigger cellular adaptive response and overexpression of stress factors. To address this issue, we selected two stress-biomarker genes, namely the heat shock protein 70 (HSP70) and the immunoglobulin heavy-chain binding protein (BiP). These two genes are highly inducible by cellular stresses and can be used as perfect indicators of cellular aggression [35], [36]. To monitor the cellular stress level, cells were exposed to 60.42 GHz ($P = 180$ mW, $\mathrm{IPD}_{\max} = 1$ mW/cm^2, $\mathrm{SAR}_{\mathrm{av}} = 21.43$ W/kg for central well, $\mathrm{SAR}_{\mathrm{av}} = 16.96$ W/kg for corner well) or sham-exposed for 24 h. Then, total RNA was purified for quantitative real-time PCR analysis. This technique is considered nowadays as the most sensitive and accurate one for gene expression measurement.

For the positive control, cells were incubated for 3 h 30 min at 42°C. The expression of HSP70 and BiP increased 2.2- and 9.2-fold, respectively, after heat shock treatment [Fig. 8(a)].

Our experimental results have shown that the mRNA levels of HSP70 and BiP do not increase after exposure of the cells to

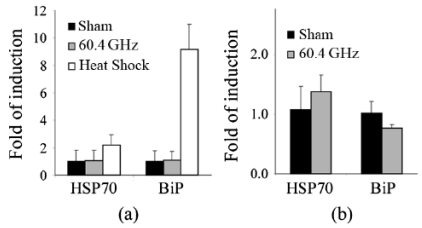

Fig. 8. Gene expression of stress-related proteins after exposure to 60.42 GHz or sham-exposure. (a) Human astrocytoma glial cell line U-251 MG. (b) Human epidermis cells HaCaT. Each test was performed at least in triplicate.

millimeter waves for two human cell lines, namely the glial cells U-251 MG [Fig. 8(a)] and the keratinocytes HaCaT [Fig. 8(b)].

IV. Discussions and Conclusion

In this study, we investigated potential biological effects of millimeter waves at 60.42 GHz upon human cells (skin cells and glial cells). A specific exposure system for in vitro studies was developed and characterized. The output power level was selected to achieve superficial power densities on biological samples close to those typically expected from the future wireless communication systems in the 60-GHz band.

First, the average SAR values within cell monolayers or protein solutions used in our bioelectromagnetic experiments were computed with the FDTD method. The numerical results demonstrated that, for the maximum IPD of 1 mW/cm^2 (exposure limit for general population), the average SAR values range between 17 and 21.4 W/kg and between 13.7 and 26.2 W/kg for 6-well and 96-well tissue culture plates, respectively. The average SAR $(4.3 \pm 1.3$ W/kg) for purified protein solutions in 96-well plates is 4.7 times lower than for cell monolayers due to the shallow penetration of millimeter waves in the solution.

Then, various biological assays were defined and implemented to assess the effects of low-power millimeter wave at the cellular, subcellular, and molecular levels. Our experimental results demonstrated that, for the IPD lower than 1 mW/cm^2, exposure to millimeter waves does not modify cell growth and viability. Furthermore, the experiments did not show any statistically significant effect on protein conformation and adaptive gene expression. These data confirm recent studies showing that, if care is taken to avoid thermal effects, exposures to low-power millimeter-wave have no proteotoxic effects and do not induce protein chaperones expression [26], [34], [37].

In conclusion, our results indicate that exposure to low-power radiations around 60 GHz does not cause any significant effect. However, they do not exclude a possibility of existence of local subcellular effects or effects potentially induced by prolonged exposures. Moreover, we cannot neglect possible synergistic effects and eliminate the possibility that other exposure parameters, like frequency, exposure time, or field polarization may have effects on biosystems. Therefore, additional gene markers and radiation parameters should be further analyzed for an extensive investigation of the potential biological effects of millimeter waves.

Acknowledgment

The authors acknowledge Dr. M.-D. Galibert-Anne, University of Rennes 1, Rennes, France, for providing HaCaT cells, and Dr. M. C. Ziskin and Dr. S. I. Alekseev, Center for Biomedical Physics, Temple University, Philadelphia, PA, for their useful suggestions regarding dosimetry.

References

[1] N. Celik, M. F. Iskander, R. Emrick, S. J. Franson, and J. Holmes, "Implementation and experimental verification of a smart antenna system operating at 60 GHz band," *IEEE Trans. Antennas Propag.*, vol. 56, no. 9, pp. 2790–2800, Sep. 2008.

[2] A. Lamminen, J. Säily, and A. R. Vimpari, "60-GHz patch antennas and arrays on LTCC with embedded-cavity substrates," *IEEE Trans. Antennas Propag.*, vol. 56, no. 9, pp. 2865–2874, Sep. 2008.

[3] K.-Ch. Huang and Zh. Wang, "Millimeter-wave circular polarized beam-steering antenna array for gigabit wireless communications," *IEEE Trans. Antennas Propag.*, vol. 54, no. 2, pt. 2, pp. 743–746, Feb. 2006.

[4] B. Chantraine-Barès and R. Sauleau, "Electrically-small shaped integrated lens antennas: A study of feasibility in Q-band," *IEEE Trans. Antennas Propag.*, vol. 55, no. 4, pp. 1038–1044, Apr. 2007.

[5] G. Godi, R. Sauleau, and D. Thouroude, "Performance of reduced size substrate lens antennas for millimeter-wave communications," *IEEE Trans. Antennas Propag.*, vol. 53, no. 4, pp. 1278–1286, Apr. 2005.

[6] R. Sauleau, Ph. Coquet, T. Matsui, and J.-P. Daniel, "A new concept of focusing antennas using plane-parallel fabry-perot cavities with nonuniform mirrors," *IEEE Trans. Antennas Propag.*, vol. 51, no. 11, pp. 3171–3175, Nov. 2003.

[7] M. A. Rojavin and M. C. Ziskin, "Medical applications of millimeter waves," *Int. J. Med*, vol. 91, no. 1, pp. 57–66, Jan. 1998.

[8] P. Smulders, "Exploiting the 60 GHz band for local wireless multimedia access: Prospects and future directions," *IEEE Commun. Mag.*, vol. 40, no. 1, pp. 140–147, Jan. 2002.

[9] A. Hammoudeh, D. A. Scammell, and M. G. Sánchez, "Measurements and analysis of the indoor wideband millimeter wave wireless radio channel and frequency diversity characterization," *IEEE Trans. Antennas Propag.*, vol. 51, no. 10, pt. 2, pp. 2974–2986, Oct. 2003.

[10] C. Liu, E. Skafidas, and R. J. Evans, "Characterization of the 60 GHz wireless desktop channel," *IEEE Trans. Antennas Propag.*, vol. 55, no. 7, pp. 2129–2133, Jul. 2007.

[11] N. Moraitis and Ph. Constantinou, "Indoor channel measurements and characterization at 60 GHz for wireless local area network applications," *IEEE Trans. Antennas Propag.*, vol. 52, no. 12, pp. 3180–3189, Dec. 2004.

[12] "About WirelessHD," 2009 [Online]. Available: http://www.wirelesshd.org/company/about.html

[13] H. Liebe, P. Rosenkranz, and G. Hufford, "Atmospheric 60-GHz oxygen spectrum: New laboratory measurements and line parameters," *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer*, vol. 48, no. 5/6, pp. 629–643, 1992.

[14] 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," *Bioelectromagn.*, vol. 19, no. 7, pp. 393–413, Jan. 1998.

[15] H. Fröhlich, "Coherent electric vibrations in biological systems and the cancer problem," *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.*, vol. MTT-26, no. 8, pp. 613–618, Aug. 1978.

[16] N. J. Millenbaugh, C. Roth, R. Sypniewska, V. Chan, J. S. Eggers, J. L. Kiel, R. V. Blystone, and P. A. Mason, "Gene expression changes in the skin of rats induced by prolonged 35 GHz millimeter-wave exposure," *Radiation Res.*, vol. 169, no. 3, pp. 288–300, 2008.

[17] M. K. Logani, I. Szabo, V. Makar, A. Bhanushali, S. Alekseev, and M. C. Ziskin, "Effect of millimeter wave irradiation on tumor metastasis," *Bioelectromagn.*, vol. 27, no. 4, pp. 258–264, 2006.

[18] V. Makar, M. Logani, I. Szabo, and M. Ziskin, "Effect of millimeter waves on cyclophosphamide induced suppression of T cell functions," *Bioelectromagn.*, vol. 24, no. 5, pp. 356–365, 2003.

[19] A. Beneduci, G. Chidichimo, S. Tripepi, E. Perrotta, and F. Cufone, "Antiproliferative effect of millimeter radiation on human erythromyeloid leukemia cell line K562 in culture: Ultra-structural- and metabolic-induced changes," *Bioelectrochem.*, vol. 70, no. 2, pp. 214–220, 2007.

[20] I. Szabo, J. Kappelmayer, S. I. Alekseev, and M. C. Ziskin, "Millimeter wave induced reversible externalization of phosphatidylserine molecules in cells exposed in vitro," *Bioelectromagn.*, vol. 27, no. 3, pp. 233–244, 2006.

[21] 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. Microw. Theory Tech.*, vol. 54, no. 6, pp. 2534–2542, Jun. 2006.

[22] 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," *Radiation Res.*, vol. 161, no. 3, pp. 341–345, 2004.

[23] M. Gacto, T. Soto, J. Vicente-Soler, T. G. Villa, and J. Cansado, "Learning from yeasts: Intracellular sensing of stress conditions," *Int. Microbiol.*, vol. 6, no. 3, pp. 211–219, 2003.

[24] P. Boukamp, R. T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham, and N. E. Fusenig, "Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line," *J. Cell. Biol.*, vol. 106, no. 3, pp. 761–771, 1988.

[25] "Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic, and electromagnetic fields (up to 300 Ghz)," *Health Phys.*, vol. 74, no. 4, pp. 494–522, 1998.

[26] M. Zhadobov, R. Sauleau, L. Le Coq, L. Debure, D. Thouroude, D. Michel, and Y. Le Dréan, "Low-power millimeter wave radiations fo not alter stress-sensitive gene expression of chapertone proteins," *Bioelectromagn.*, vol. 528, no. 3, pp. 188–196, Jan. 2007.

[27] M. Zhadobov, R. Sauleau, Y. Le Dréan, S. I. Alekseev, and M. C. Ziskin, "Numerical and experimental millimeter-wave dosimetry for in vitro experiments," *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.*, vol. 56, no. 12, pt. 1, pp. 2998–3007, Dec. 2008.

[28] H. M. Jafari, M. J. Deen, S. Hranilovic, and N. K. Nikolova, "A study of ultrawideband antennas for near-field imaging," *IEEE Trans. Antennas Propag.*, vol. 55, no. 4, pp. 1184–1188, Apr. 2007.

[29] G. Lazzi, Sh. S. Pattnaik, C. M. Furse, and O. P. Gandhi, "Comparison of FDTD computed and measured radiation patterns of commercial mobile telephones in presence of the human head," *IEEE Trans. Antennas Propag.*, vol. 46, no. 6, pp. 943–944, Jun. 1998.

[30] A. D. Tinniswood, C. M. Furse, and O. P. Gandhi, "Computations of SAR distributions for two anatomically based models of the human head using CAD files of commercial telephones and the parallelized FDTD code," *IEEE Trans. Antennas Propag.*, vol. 46, no. 6, pp. 829–833, Jun. 1998.

[31] D. D. Bigner, S. H. Bigner, J. Ponten, B. Westermark, M. S. Mahaley, E. Ruoslahti, H. Herschman, L. F. Eng, and C. J. Wikstrand, "Heterogeneity of genotypic and phenotypic characteristics of fifteen permanent cell lines derived from human gliomas," *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, vol. 40, pp. 201–229, 1981.

[32] F. Loison, L. Debure, P. Nizard, P. Le Goff, D. Michel, and Y. Le Dréan, "Up-regulation of the clusterin gene after proteotoxic stress: implication of HSF1–HSF2 heterocomplexes," *Biochem. J.*, vol. 395, pp. 223–231, 2006.

[33] *"Handbooks from Amersham Biosciences,"* GST Gene Fusion System, (Product Code: 18-1157-58).

[34] Ch. Nicolas Nicolaz, M. Zhadobov, F. Desmots, R. Sauleau, D. Thouroude, D. Michel, and Y. Le Dréan, "Absence of direct effect of low-power millimeter-wave radiation at 60.4 GHz on endoplasmic reticulum stress," *Cell Biol. Toxicol.* vol. 25, no. 5, pp. 471–478, 2009.

[35] S. Rajdev and F. R. Sharp, "Stress proteins as molecular markers of neurotoxicity," *Toxicol. Pathol.*, vol. 28, no. 1, pp. 105–112, 2000.

[36] A. S. Lee, "The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress," *Methods*, vol. 35, no. 4, pp. 373–381, 2005.

[37] I. Szabo, M. R. Manning, A. A. Radzievsky, M. A. Wetzel, T. J. Rogers, and M. C. Ziskin, "Low power millimeter wave irradiation exerts no harmful effect on human keratinocytes in vitro," *Bioelectromagn.*, vol. 23, no. 3, pp. 165–173, 2003.

Maxim Zhadobov (S'05–M'07) was born in Gorky, Russia, in 1980. He received the M.S. degree in radiophysics from Nizhni Novgorod State University, Nizhni Novgorod, Russia, in 2003, and the Ph.D. degree in bioelectromagnetics from the Institute of Electronics and Telecommunications of Rennes (IETR), University of Rennes 1, Rennes, France, in 2006.

He accomplished postdoctoral training at the Center of Biomedical Physics, Temple University, Philadelphia, PA, in 2008 and recently rejoined IETR as an Associate Scientist CNRS (Centre National de la Recherch Scientifique). He has authored or coauthored more than 40 scientific contributions. His main scientific interests are in the field of biological effects of EM waves, including interactions of low-power millimeter waves and pulsed radiations at the cellular level, therapeutic applications of EM fields, and experimental and numerical EM dosimetry.

Dr. Zhadobov was the recipient of the 2006 Best Scientific Paper Award from the Bioelectromegnetics Society (BEMS) and the 2005 Best Poster Presentation Award from the International School of Bioelectromagnetics.

Christophe Nicolas Nicolaz was born in Brest, France, in 1982. He received the M.S. degree in "Génomique fonctionnelle et santé" from the University of Rennes 1, Rennes, France, in 2006.

He is currently a Ph.D. student at the Institute of Electronics and Telecommunications of Rennes (IETR), University of Rennes 1, and his main scientific interest consists in studying biological effects of millimeter waves at the cellular level.

Ronan Sauleau (M'04–SM'06) received the Electronic Engineering and Radiocommunications degree and the French DEA degree in electronics from the Institut National des Sciences Appliquées (INSA), Rennes, France, in 1995, the Aggregation degree from Ecole Normale Supérieure (ENS) de Cachan, France, in 1996, and the Ph.D. degree in signal processing and telecommunications and "Habilitation à Diriger des Recherche" degree from the University of Rennes 1, Rennes, France, in 1999 and 2005, respectively.

He was an Assistant Professor at the University of Rennes 1 from 2000 to 2005 and has been an Associate Professor since 2005. He has received three patents and is the author or coauthor of 53 journal papers and more than 110 contributions to conferences and workshops. His current fields of interest are numerical modeling, millimeter-wave printed and reconfigurable (MEMS) antennas, lens-based focusing devices, periodic structures (electromagnetic bandgap materials and metamaterials), and biological effects of millimeter waves.

Dr. Sauleau received the 2004 ISAP Conference Young Researcher Scientist Fellowship (Japan) and the first Young Researcher Prize in Britany, France, in 2001 for his research work on gain-enhanced Fabry–Perot antennas. In 2007, he was elevated as a Junior Member of the Institut Universitaire de France. He was also awarded the CNRS Bronze Medal in 2008.

Fabienne Desmots was born in Saint-Nazaire, France, in 1971. She received the Ph.D. degree in cellular and molecular biology from the University of Rennes 1, Rennes, France, in 2000.

She obtained a one-year teaching position in Biochemistry and Molecular Biology at the University of Rennes 1 in 2001. Then, in 2002, she joined the Department of Genetics at St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, as a Postdoctoral Fellow for three years. Since 2005, she has been a Postdoctoral Fellow with Prof. Michel's team ("Homéostasie Intracellulaire des Protéines (HIP)") in the UMR CNRS 6026 Laboratory, University of Rennes 1. Her main subject of interest was the understanding of cellular responses to alteration of protein homeostasis and the biological roles of chaperones and co-chaperones proteins. She is now a Supervisor of a core facility named "Molecular Genetics of Cancer" at the Pontchaillou Hospital, Rennes, France. She is the author and coauthor of two articles in research news journals, 11 scientific publications, and 14 communications in national and international conferences.

2956 IEEE TRANSACTIONS ON ANTENNAS AND PROPAGATION, VOL. 57, NO. 10, OCTOBER 2009

Daniel Thouroude received the Ph.D. degree from the University of Rennes 1, Rennes, France, in 1987.

Before 1989, his work was primarily focused on beam dynamics in particle accelerators. Since 1989, his research interests include the analysis and synthesis of microstrip antenna, the modeling of ferrite substrate antenna and Fabry-Perot cavities using the FDTD method. He is currently Professor at the University of Rennes 1 and Director of the Institute of Electronics and Telecommunications of Rennes (IETR), Rennes, France. With around 230 people, the unit is linked to the French National Center for Scientific Research (CNRS) and places the emphasis on developing the skills needed to explore a wide range of emerging applications, including smart antennas, radiomobile communications, system on chip (SoC), UWB technology, radar polarimetry, silicon-based microsystems, etc.

Yves Le Dréan was born in 1964. He received the Ph.D. degree and "Habilitation à Diriger des Recherches" in biology from the University of Rennes 1, Rennes, France in 1993 and 2007, respectively.

He joined the Hospital for Sick Children, Toronto, ON, Canada, as a Post-Doctoral Fellow in 1994. Since 1997, he has been an Associate Professor at the University of Rennes 1, where he teaches molecular biology and biochemistry. His main subject of interest is the control of genetic expression. His current research activities are related to the investigations of cell responses to proteotoxic stress. Since 2004, he has been also actively involved in the field of biological effects of electromagnetic waves.

Dr. Le Dréan is the author or coauthor of two book chapters, 21 journal publications, and 25 communications in national and international conferences.

Denis Michel was born in Saint Lô, France, in 1957. He received the Aggregation degree in biology from the Ecole Normale Supérieure (ENS) de Saint-Cloud, Saint-Cloud, France, in 1981, and the Ph.D. degree in cellular biology from the University Paris 6, Paris, France, in 1984.

He was a Postdoctoral Fellow the University Laval, Quebec, Canada, from 1982 to 1983. Then, he was an Assistant Professor at the ENS de Saint-Cloud from 1984 to 1987 and at the ENS de Lyon, Lyon, France, from 1987 to 1996. Since 1997, he has been a Professor in molecular biology at the University of Rennes 1. His main research activities are in the fields of neuro-endocrinology, genetic expression in cancers, and responses of eukaryotic cells to stresses, including exposures to electromagnetic radiations.

Chapitre II : Ondes millimétriques et stress réticulaire

Ce chapitre est organisé en deux grandes parties. La première est composée des deux articles publiés respectivement en 2008 et 2009 dans les revues Cell Biology and Toxicology et Bioelectromagnetics. Dans le premier article, une analyse en profondeur de différents mécanismes impliqués dans la réponse UPR est réalisée, en utilisant une seule fréquence d'exposition, 60,4 GHz, pour laquelle la DSP reçue par les cellules est de l'ordre de 0,14 mW/cm². Le second article porte sur l'effet de la variation de la fréquence, à cette même DSP. Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous avons poursuivi ce travail sur le stress du RE, cette fois-ci dans des lignées cellulaires de peau. Nous avons voulu déterminer si la variation de la puissance pouvait avoir un impact sur l'homéostasie du RE. Enfin, nous avons complémenté ce travail avec une nouvelle approche expérimentale consistant à mettre en évidence l'existence d'un potentiel effet synergique entre les ondes MM et le stress réticulaire.

II.1 Etude du stress réticulaire potentiellement induit par les ondes MM de faible puissance (0,14 mW/cm²)

Le principal but de ce travail a consisté à étudier les effets biologiques potentiels des ondes MM de faible puissance sur le RE, qui, comme nous l'avons vu précédemment, est un organite sensible à une large variété de stress environnementaux. Nous avons considéré les expositions à des fréquences autour de 60 GHz, en raison de leur utilisation, dans un futur proche, dans les systèmes de télécommunications sans fil. À travers différents tests biologiques, nous avons montré que l'exposition à 60,4 GHz ne modifiait pas le repliement des protéines du RE ou encore leur sécrétion. De même, cette exposition n'induisait pas non plus l'activation des facteurs de transcription ATF6 et XBP1, ni celle des messagers des protéines de survie spécifiques de la réponse UPR. En parallèle, cette étude nous a également permis de sélectionner la technique de PCR en temps réel comme outil le plus robuste pour une caractérisation d'éventuels effets biologiques de ces ondes.

À la suite de ce travail et manquant de données démontrant précisément l'existence de molécules ou d'organes cibles de ces ondes, nous avons sélectionné des fréquences d'exposition à partir des bases de données de spectroscopie chimique. À certaines fréquences correspondent des raies spectrales de molécules ou de groupement moléculaires, notamment l'oxygène, pour lequel il existe trois pics d'absorption à 59,164 ; 60,4 et 61,15 GHz et deux fréquences (59,87 et 60,83 GHz) pour lesquelles l'atténuation atmosphérique est plus faible

(voir introduction**, figure 6**). En parallèle, nous avons également retenu certaines fréquences, comprises entre 59 et 61 GHz, qui correspondent aux raies spectrales de groupements moléculaires di ou triatomiques **(tableau 4)**.

Bien que ces molécules ne soient pas directement présentes au sein de l'organisme, elles contiennent cependant des atomes de carbone, d'hydrogène ou d'oxygène qui sont les principaux constituants de la matière vivante. L'exposition de cellules de la lignée gliale humaine U-251 MG à ces différentes fréquences n'a cependant pas permis de mettre en avant de modification des niveaux d'expression des ARNm de deux marqueurs du stress réticulaire, les chaperons BiP/GRP78 et ORP150/GRP170. Les résultats de ces deux études démontrent que, quelles que soient les fréquences d'exposition retenues, à une DSP de 0,14 mW/cm², les ondes MM ne sont pas capables de perturber l'homéostasie du RE (dans notre modèle d'étude).

A. Article publié dans *Cell Biology and Toxicology*

Publication

Absence of direct effect of low-power millimeter-wave radiation at 60.4 GHz on endoplasmic reticulum stress

Christophe Nicolas Nicolaz, Maxim Zhadobov, Fabienne Desmots, Ronan Sauleau, Daniel Thouroude, Denis Michel and Yves Le Dréan

Cell Biol Toxicol 2009

Cell Biol Toxicol (2009) 25:471–478
DOI 10.1007/s10565-008-9101-y

Absence of direct effect of low-power millimeter-wave radiation at 60.4 GHz on endoplasmic reticulum stress

Christophe Nicolas Nicolaz · Maxim Zhadobov · Fabienne Desmots · Ronan Sauleau · Daniel Thouroude · Denis Michel · Yves Le Drean

Received: 31 March 2008 / Accepted: 17 July 2008 / Published online: 7 August 2008
© Springer Science + Business Media B.V. 2008

Abstract Millimeter waves (MMW) at frequencies around 60 GHz will be used in the very near future in the emerging local wireless communication systems and the potential health hazards of artificially induced environmental exposures represent a major public concern. The main aim of this study was to investigate the potential effects of low-power MMW radiations on cellular physiology. To this end, the human glial cell line, U-251 MG, was exposed to 60.4 GHz radiation at a power density of 0.14 mW/cm^2 and potential effect of MMW radiations on endoplasmic reticulum (ER) stress was investigated. ER is very sensitive to environmental insults and its homeostasis is altered in various pathologies. Through several assay systems, we found that exposure to 60.4 GHz does not modify ER protein folding and secretion, nor induces XBP1 or ATF6 transcription factors maturation. Moreover, expression of ER-stress sensor, BiP/GRP78 was examined by real-time PCR, in exposed or non-exposed cells to MMW radiations. Our data demonstrated the absence of significant changes in mRNA levels for BiP/GRP78. Our results showed that ER homeostasis does not undergo any modification at molecular level after exposure to low-power MMW radiation at 60.4 GHz. This report is the first study of ER-stress induction by MMW radiations.

Keywords 60 GHz · BiP/GRP78 · Biological effects · Cellular stress · Non-ionizing radiation

Abbreviations

ATF6	activating transcription factor 6
BiP	immunoglobulin heavy-chain binding protein, also known as GRP78: 78 kDa glucose-regulated protein
EMF	electromagnetic field
ER	endoplasmic reticulum
IEEE	Institute of Electrical and Electronics Engineers
IRE1	inositol-requiring enzyme 1

C. Nicolas Nicolaz · F. Desmots · D. Michel · Y. Le Drean
Intracellular Protein Homeostasis, IFR 140, UMR CNRS 6026, University of Rennes 1,
Rennes, France

C. Nicolas Nicolaz · M. Zhadobov · R. Sauleau · D. Thouroude
Institute of Electronics and Telecommunications of Rennes, UMR CNRS 6164, University of Rennes 1,
Rennes, France

Y. Le Drean (✉)
Équipe "Homéostasie intracellulaire des protéines" (Hip), UMR CNRS 6026, Université de Rennes 1,
Bat. 13, campus de Beaulieu,
263 avenue du Général Leclerc.,
35 042 Rennes Cedex, France
e-mail: yves.le-drean@univ-rennes1.fr

M. Zhadobov
Center for Biomedical Physics,
Temple University Medical School,
Philadelphia, PA, USA

MMW	millimeter wave
SEAP	secreted alkaline phosphatase
PCR	polymerase chain reaction
UPR	unfolded protein response
WLAN	wireless local area network
XBP1	X-box binding protein 1

Introduction

Possible health hazards due to utilization of electromagnetic field (EMF) in telecommunication technologies represent, nowadays, a major public concern. World leading telecommunication companies are developing new local wireless communication systems (e.g. wireless local area networks—WLAN), operating in the 57–64 GHz frequency band. These radiations belong to the so-called millimeter-wave (MMW) frequency band which spreads from 30 GHz to 300 GHz in terms of frequency, and from 1 mm to 10 mm in terms of the wavelength in the free space (Marcus and Pattan 2005). They have been recently adopted by the IEEE 802.15.3c Standardization Committee, since they perfectly suit to confidential high data rate communications. Because of atmospheric attenuation caused by strong oxygen-induced absorption (Liebe et al. 1992), 60 GHz radiations are naturally absent from the environmental EMF spectrum. Therefore, biological organisms have never been exposed to these radiations in their natural environment and little is known about their potential biological effects on human health. It is noteworthy that MMW therapy (42.25 GHz, 53.57 GHz, and 61.22 GHz; 10 mW/cm^2) has been already used in a few East-European countries as an effective therapeutic method (Pakhomov et al. 1998; Rojavin and Ziskin 1998), which suggests that molecular interactions between MMW and human body is possible. Compared to the EMF exposures used for example in the mobile phone communications, MMW are very locally absorbed by the biological tissues, which means that MMW with low power densities could result in significant biological effects. Therefore, the determination of the potential biological effects of MMW is essential to provide an insight into the safety on utilization of new wireless communication systems.

Previous studies have reported that low-power microwaves and MMW radiations may interfere with various cellular processes. For instance, proteins expression and stability were found to be affected by microwaves. It was proposed that exposures at frequencies around 1 GHz can alter protein conformation, which causes in turn the synthesis of heat shock proteins (French et al. 2001; de Pomerai et al. 2003). However, the proteotoxic effect of EMF is still controversial, and recent studies have shown that, if care is taken to avoid thermal effects, low-power microwaves (1.8 GHz, 1.8 W/kg) and MMW exposures (60 GHz, 0.54 mW/cm^2) have no proteotoxic effects and no notable change in heat shock protein expression can be detected (Dawe et al. 2007; Zhadobov et al. 2007). Moreover, higher-power MMW radiations were found to reduce tumor metastasis (42.2 GHz, 36.5±5 mW/cm^2; Logani et al. 2006), or to protect cells from the toxicity of commonly used anticancer drugs (42.2 GHz, 31±5 mW/cm^2; Makar et al. 2003). More recently, it was observed that the proliferation of cells exposed to MMW (52–78 GHz, 0.07 μW/cm^2) was changed, as well as their energetic metabolism (Beneduci et al. 2005). Furthermore, some recent studies showed that structural modifications in the biomembranes may occur during the exposure to the MMW (42.25 GHz, 34.5 mW/cm^2 and 60 GHz, 0.9 mW/cm^2; Szabo et al. 2006; Zhadobov et al. 2006). These data suggest that membrane-rich cellular organelles, such as endoplasmic reticulum (ER), are potential targets of MMW. This hypothesis was recently strengthened by a transmission electron microscopy study, showing that MMW-irradiated (53.57–78.33 GHz, 1 μW/cm^2) cells presented ultrastructural modification of their ER compartment (Beneduci et al. 2007).

ER is the site of synthesis and folding of secreted proteins. This organelle, where proteins are extremely concentrated, is very sensitive to environmental insults and has been shown to be involved in various pathologies such as cancers, diabetes, or neurodegenerative diseases (Zhao and Ackerman 2006; Ni and Lee 2007; Yoshida 2007). Perturbation of ER functions causes what is collectively termed the ER stress, and leads to the activation of signalling pathways known as the unfolded protein response (UPR). UPR pathway involves ER transmembrane proteins, like the inositol-requiring enzyme 1 (IRE1) and the activating transcription factor 6 (ATF6), which act as stress sensors/transducers (Ron and Walter 2007). Upon ER stress, ATF6 is translocated to the Golgi apparatus, where it is cleaved by specific proteases. The cleaved form corresponds to an active transcription factor that can

activate its target genes, particularly the specific ER chaperone BiP/GRP78 (Yoshida et al. 2000). At the same time, IRE1 is dimerized and activated. The endoribonuclease domain of this protein allows the XBP1 mRNA to be spliced in an unconventional manner (Yoshida et al. 2001). The spliced XBP1 messenger encodes a full length active transcription factor that also induces ER chaperone synthesis and ER-associated degradation factors. After all, UPR consists in heightening ER capacity by inducing ER chaperone and secretion or degradation enzyme synthesis, which permits the cell to restore its homeostasis. The purpose of this study was to investigate the potential effect of low-power MMW on ER cellular homeostasis perturbation.

Materials and methods

Plasmid constructs

The ATF6 expression vector and the reporter plasmid containing the human BiP/GRP78 gene promoter (pBiP$_{-132/+7}$-luc) were kindly provided by Dr K. Mori (Department of Biophysics, Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto, Japan), and were described previously (Yoshida et al. 1998). The secreted alkaline phosphatase expression vector (pSEAP) was purchased from Clontech (Mountain View, CA, USA).

Cell culture and transfection

Since brain is one of the potential target organs for bioelectromagnetic interactions, and astrocytes one of the predominant glial cell types in the adult central nervous system, functioning as both protective and nutritive cells for neurons (Takuma et al. 2004), a human astrocytoma cell line, U-251 MG was used. These cells were grown and transfected as described previously (Loison et al. 2006). For each experiment, two 24-well tissue culture plates were exposed to MMW at 60.4 GHz during 24, 48, or 72 h. Using separated transfection complexes, three independent transfections were performed per reporter plasmid. As ER-stress positive control, cells were treated for 16 h with 1 μM thapsigargin (TG). After transient expression, cells were harvested and the luciferase and SEAP activity levels were then measured and normalized with β-galactosidase activity. The luciferase activity was determined with a luciferase assay system kit (Promega, Madison, Wi, USA), whereas the SEAP activity was assayed using the Great EscAPe SEAP fluorescence detection kit (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA). β-galactosidase activity was determined using a fluorimetric method, as described previously (McGuire et al. 2002).

RT-PCR analysis

A total of three six-well tissue culture plates were independently exposed to 60.4 GHz for 24 h. For each tissue culture plates, RNA from three wells were pooled together, constituting one RNA sample which was separately reverse-transcribed (RT) as previously described (Loison et al. 2006). Then, four to eight quantitative real-time PCR were performed per messenger for each RT. PCRs were normalized using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as internal control. In order to determine whether the exposure to MMW at 60.4 GHz could cause XBP1 maturation, a RT-PCR analysis of XBP1 mRNA splicing was performed as described previously (Shang 2005). The expression levels of ER-stress sensor BiP, cytosolic-stress sensor (HSP70) mRNAs were measured by real-time PCR. Primer sequences used in this study are indicated in Table 1. Reactions were performed in a total volume of 12 μL, containing 133 nM of each sense and antisense primers, 0.5 μL of RT, and 6 μL of iQ SYBR Green supermix (Bio-Rad, Hercule, CA, USA). The PCR reaction was performed as follows: 98°C 30 s, then 40 cycles 95°C 30 s, 54°C 30 s. PCR products were measured continuously with MiniOpticon device (Bio-Rad, Hercule, CA, USA).

Statistical analysis

Prior to statistical analysis, we assessed normality and homoscedasticity of the error terms of our data. Box–Cox transformation was applied to the data for which observed deviations for group means lack normality. Effects of low-power MMW were evaluated by performing Student's t test. All models were implemented in Minitab 15.1.1 software and a P value >0.05 was considered as not statistically significant. The experiments were not performed in a blinded manner.

Table 1 Primer sequences

Name and symbol	Forward primers	Reverse primers
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
X-box binding protein 1	CCTTGTAGTTGAGAACACG	GGGGCTTGGTATATATGTGTGG
Immunoglobulin heavy-chain binding protein (BiP)	CTCGAATTCCAAAGATTCAGCAACT	CTCCACAGTTTCAATACCAAGTG
Heat shock protein 70 (HSP70)	CTCAGGATTTGCCCTATCCAGATC	TCCTGGTCCACTTGCATCTTC

Experimental set-up and exposure system

In this study we used a MMW exposure system operating in the 50–75 GHz frequency range specifically developed for in vitro bioelectromagnetic experiments (Fig. 1). The main structural units and the detailed characteristics of the experimental set-up were described previously (Zhadobov et al. 2007). In each experiment, the tissue culture plates containing the cells were exposed or non-exposed to the linearly polarized continuous wave radiation at 60.43 GHz. The central frequency was monitored during the exposure using an Advantest R3182 spectrum analyzer. The frequency was checked and adjusted, providing a frequency stability of ±0.0015 GHz. The output power was measured each time before and after the experiment using an Agilent V8486A power sensor. The maximal power density at the cell level was equal to 0.14 mW/cm^2. Additional data on the numerical and experimental MMW dosimetry for in vitro experiments are available in previous study (Zhadobov et al. 2008). To monitor the temperature inside the MMW exposure system, we used a temperature data logger (HI141JH, HANNA Instruments, Lingolsheim, France) with two independent temperature sensors. Logging interval was set every 15 min during the exposure time, attesting a temperature stability of 37±0.3°C

Results

Exposure to 60.4 GHz does not alter ER protein folding and secretion

We wanted to determine if MMW could induce ER stress or disrupt the ER secretory pathway. It has previously been shown that a secreted form of the human placental alkaline phosphatase, whose enzymatic activity is very fragile, can serve as an effective marker for ER stress (Hiramatsu et al. 2006). This reporter enzyme is folded into its active conformation inside the ER, and only the correctly folded proteins are secreted into the medium. Cells were transfected with pSEAP reporter plasmid, and exposed for 24, 48, or 72 h to 60.4 GHz radiation. Culture cell media were then collected and subjected to the SEAP assay. The results show that SEAP activity is not altered in

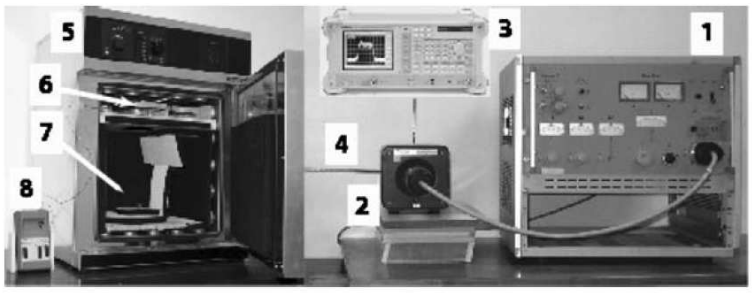

Fig. 1 Experimental set-up for in vitro cell exposure to millimetre-wave radiations. High-voltage power supply Siemens RWON14 (*1*) feeds backward-wave oscillator Siemens RWO75 (*2*), which generates millimeter-wave radiations in the 50–75 GHz frequency range. Then, MMW propagate through rectangular waveguides and coaxial cables (*4*) to pyramidal horn antenna (*7*) located inside the incubator Memmert UE400 (*5*). Frequency stability during the experience was monitored using a spectrum analyzer (*3*). Exposed or non-exposed tissue culture plates (*6*) were set up in the upper part of the incubator above the antenna. Local temperature of the exposed tissue culture plate was controlled using a thermocouple (*8*)

cells exposed to MMW, compared to non-exposed cells (Fig. 2). As control, cells were treated with strong ER-stress inducers such as thapsigargin (TG) or brefeldin A (BFA), which disturb luminal calcium concentration, or inhibits the transport between the ER and the Golgi apparatus, respectively (Fig. 2). As expected, a significant reduction in SEAP activity was observed in these cells, demonstrating that this assay was functional.

Exposure to 60.4 GHz does not activate UPR-related transcription factors

In mammals, response to ER stress involves mainly two transcription factors: XBP-1 and ATF6. Activation of XBP-1 requires unconventional cytoplasmic splicing of the XBP-1 mRNA and this event can be used as a biomarker of ER stress (Hirota et al. 2006). To determine whether MMW could induce XBP-1 splicing, cells were exposed to 60.4 GHz for 24 h. Total RNA were analyzed by RT-PCR. As shown in Fig. 3A, MMW exposure did not induce XBP-1 splicing whereas cells treated with 1 μM TG clearly expressed the two forms of XBP-1 (spliced and unspliced). Another step in UPR involves ATF6 maturation. The active cleaved form of ATF6 binds to the *cis*-acting ER-stress response element (ERSE) within ER-stress-sensitive gene promoters. Cells were transfected with luciferase reporter construct, driven by human BiP promoter which contains three consecutive ERSE (Yoshida et al. 1998). This promoter is very sensitive and quickly induced by TG treatment, or ATF6 overexpression, as shown in Fig. 3B (right side of the

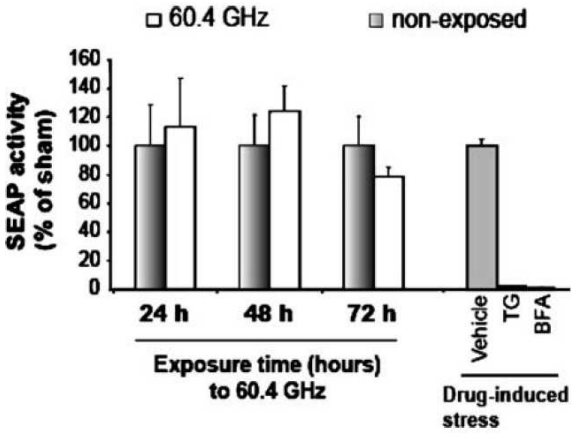

Fig. 2 Exposure to 60.4 GHz does not instigate protein misfolding inside endoplasmic reticulum. U-251 MG cells were transfected with a reporter vector coding the secreted form of the human placental alkaline phosphatase (*SEAP*) as endoplasmic reticulum stress marker. As indicated, cells were exposed or non-exposed to millimeter-wave radiations at 60.4 GHz, or were treated with dimethyl sulfoxide (*vehicle*), 1 μM thapsigargin (*TG*) or 1 μM brefeldin A (*BFA*), as positive controls. After exposure or treatment, culture medium was collected and SEAP activity was assessed as described in "Materials and Methods". The values represent the percentage of relative SEAP activity measured in exposed or treated cells, divided by the SEAP activity obtained for the non-exposed or non-treated cells. Data are expressed as means (±standard deviation) of six independent transfections distributed within two sets of exposure experiments

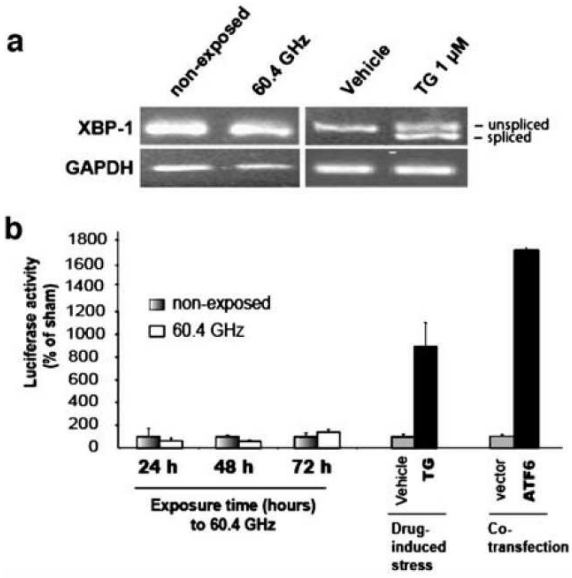

Fig. 3 Exposure to 60.4 GHz does not generate XBP-1 splicing, nor induced human BiP/GRP 78 promoter transcriptional activity. **a** Cells were exposed or non-exposed to 60.4 GHz for 24 h. As a positive control, cells were treated with 1 μM thapsigargin (*TG*) or dimethyl sulfoxide (*vehicle*). After exposure, total RNA was extracted, and then RT-PCR were performed using XBP1 and GAPDH primers. **b** Cells were transfected with $pBiP_{-132/+7}$-luc reporter gene and exposed to 60.4 GHz MMW radiations, for 24, 48, or 72 h. As positive controls, transfected cells were treated with 1 μM thapsigargin (*TG*) or dimethyl sulfoxide (*vehicle*) or were co-transfected with activating transcription factor 6 (*ATF6*) expression vector. The luciferase activity was normalized to β-galactosidase activity and the values represent the percentage of relative transcriptional activity measured in exposed or treated cells, divided by transcriptional activity measured in control cells. Data are expressed as means (±standard deviation) of six independent transfections distributed within two sets of exposure experiments

histogram). Cells were transfected with this BiP promoter–reporter plasmid, exposed to MMW for 24, 48, or 72 h, and compared to non-exposed cells (Fig. 3B, left side of the histogram). Exposition of these cells to 60.4 GHz did not modify the transcriptional activity of the human BiP promoter.

Exposure to 60.4 GHz does not modify the expression of BiP, an ER-stress-specific sensor gene

To further investigate whether MMW could trigger ER stress, we studied mRNA levels of BiP/GRP78, an ER-resident chaperone known to be overexpressed by ER stress (Kozutsumi et al. 1988). In Fig. 4, the relative amount of BiP transcript was calculated by normalizing to the quantity of GAPDH. Experiments have been performed using other housekeeping genes as reference (HPRT1: hypoxanthine phosphoribosyl-transferase 1, or TBP: TATA-box binding protein) and the same results were obtained (data not shown). Despite the observation of a slight increase, statistical analysis showed that 60.4 GHz exposure did not significantly enhance the cellular levels of BiP mRNA (Fig. 4A), whereas the level of this messenger is dramatically induced by 65-fold after TG treatment (Fig. 4B). HSP70 mRNA levels were also evaluated upon MMW exposure, and we found no difference between exposed and non-exposed cell. This result confirms that our exposure conditions did not produce thermal effects (Fig. 4C).

Discussion and conclusion

Development of new wireless communication systems will artificially cause exposure to environmental MMW radiations. The energy of MMW is not strong enough to break chemical bonds or severely damage macromolecules. However, a number of environmental factors (e.g. heat shock) may interfere with cell functioning via more subtle mechanisms without induction of any chemical modifications. Therefore, potential biological effects of MMW radiations should be carefully considered. In this paper, using the U-251 MG human astrocytoma cell line, we proved that the expression of the major components of the UPR system is not affected by MMW radiations. As ER stress is a multi-step phenomenon, including ER-resident protein misfolding, transcription factors maturation and overexpression of specific ER chaperons, we applied several assay systems to measure ER-stress induction. Expression of the endogenous biomarker BiP/GRP78 is the most commonly used test for monitoring ER stress (Lee 2005). We completed our analysis using the splicing of XBP-1 mRNA as biomarker (Hirota et al. 2006). We also used alternative systems, such as the ER-stress sensitive enzyme SEAP (Hiramatsu et al. 2006), or the luciferase reporter enzyme under control of promoter containing ER-stress response element (Yoshida et al. 1998). We found that low-power MMW exposure had no significant effect compared to non-exposed sample, whatever the assay system used. Similarly, we ana-

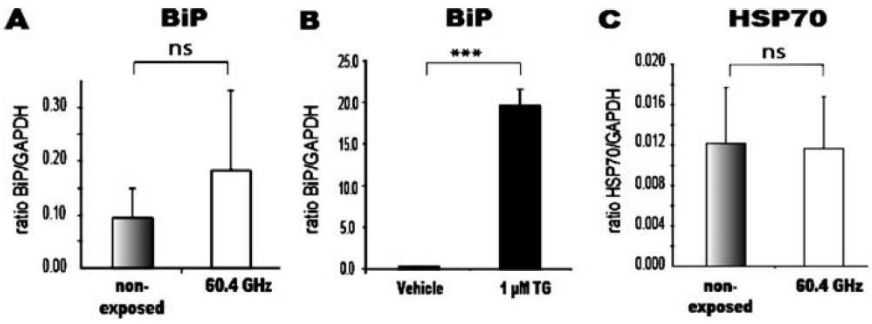

Fig. 4 Exposure to 60.4 GHz does not modify the mRNA level of BiP, an ER-stress-related gene. Cells were exposed or non-exposed to 60.4 GHz, for 24 h, and total RNA was extracted. Analysis of BiP (**a**), and HSP70 (**c**) mRNA expression was performed by quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction. As a positive control, mRNA levels of BiP were measured in cells treated with 1 µM thapsigargin (*TG*) or dimethyl sulfoxide (*vehicle*; **b**). The values±standard deviation represents the ratio of transcriptional levels of BiP, or HSP70, relative to GAPDH used as a reference gene. Data are expressed as means (±standard deviation) of six to 17 quantitative PCR distributed within three sets of independent exposure experiments. Student's test: *ns* not significant ($p>0.05$); ***$p<0.001$

lyzed the ER-stress induction after various time of exposure (24, 48, and 72 h), in order to investigate possible indirect or cumulative effects. In spite of the different protocols used, we failed again to demonstrate any effects of MMW on ER functions. Moreover, using systematic positive controls, we directly ruled out the possibility that absence of positive data was due to technical problems or to a poor responsiveness of U-251 MG cells to ER stress.

All together, our results suggest that MMW around 60 GHz, with power levels close to those typically expected from wireless communication systems, do not have acute effect on ER stress. However, we cannot rule out the possibility that different exposure parameters, namely the frequency, radiating power, polarization, or time regime of exposure (intermittent or continuous), may have an effect on cells. Therefore, additional cellular models and stress markers should be analyzed for an exhaustive investigation of the potential effects of MMW on cellular stress.

Acknowledgements This research was supported by the French "Agence Nationale de la Recherche" ANR 2006 under project "HIMWR" and the Health and Radiofrequencies Foundation (Fondation Santé et Radiofréquences, France) under project "StressOM", CNN was supported by fellowship from the French ministry of higher education and research (MENRT), and FD by fellowship from the "Association pour la Recherche sur le Cancer" (ARC).

References

Beneduci A, Chidichimo G, Tripepi S, Perrotta E. Transmission electron microscopy study of the effects produced by wide-band low-power millimeter waves on MCF-7 human breast cancer cells in culture. Anticancer Res 2005;25:1009–13.

Beneduci A, Chidichimo G, Tripepi S, Perrotta E, Cufone F. Antiproliferative effect of millimeter radiation on human erythromyeloid leukemia cell line K562 in culture: ultrastructural- and metabolic-induced changes. Bioelectrochemistry 2007;7:214–20. doi:10.1016/j.bioelechem.2006.07.008.

Dawe AS, Nylund R, Leszczynski D, Kuster N, Reader T, De Pomerai DI. Continuous wave and simulated GSM exposure at 1.8 W/kg and 1.8 GHz do not induce hsp16-1 heat-shock gene expression in *Caenorhabditis elegans*. Bioelectromagnetics 2007;2:92–9.

de Pomerai DI, Smith B, Dawe A, North K, Smith T, Archer DB, et al. Microwave radiation can alter protein conformation without bulk heating. FEBS Lett 2003;543:93–7. doi:10.1016/S0014-5793(03)00413-7.

French PW, Penny R, Laurence JA, McKenzie DR. Mobile phones, heat shock proteins and cancer. Differentiation 2001;67:93–7. doi:10.1046/j.1432-0436.2001.670401.x.

Hiramatsu N, Kasai A, Hayakawa K, Yao J, Kitamura M. Real-time detection and continuous monitoring of ER stress in vitro and in vivo by ES-TRAP: evidence for systemic, transient ER stress during endotoxemia. Nucleic Acids Res 2006;34:e93. doi:10.1093/nar/gkl515.

Hirota M, Kitagaki M, Itagaki H, Aiba S. Quantitative measurement of spliced XBP1 mRNA as an indicator of endoplasmic reticulum stress. J Toxicol Sci 2006;31:149–56. doi:10.2131/jts.31.149.

Kozutsumi Y, Segal M, Normington K, Gething MJ, Sambrook J. The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. Nature 1988;332:462–4. doi:10.1038/332462a0.

Lee AS. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. Methods 2005;35:373–81. doi:10.1016/j.ymeth.2004.10.010.

Liebe HJ, Rosenkranz PW, Hufford GA. Atmospheric 60-GHz oxygen spectrum: new laboratory measurements and line parameters. J Quant Spectrosc Radiat Transf 1992;48:629–43. doi:10.1016/0022-4073(92)90127-P.

Logani MK, Szabo I, Makar V, Bhanushali A, Alekseev S, Ziskin MC. Effect of millimeter wave irradiation on tumor metastasis. Bioelectromagnetics 2006;27:258–64. doi:10.1002/bem.20208.

Loison F, Debure L, Nizard P, le Goff P, Michel D, Le Drean Y. Up-regulation of the clusterin gene after proteotoxic stress: implication of HSF1–HSF2 heterocomplexes. Biochem J 2006;395:223–31. doi:10.1042/BJ20051190.

Makar V, Logani M, Szabo I, Ziskin M. Effect of millimeter waves on cyclophosphamide induced suppression of T cell functions. Bioelectromagnetics 2003;24:356–65. doi:10.1002/bem.10106.

Marcus M, Pattan B. Millimeter wave propagation. IEEE Microw Mag 2005;6:54–63. doi:10.1109/MMW.2005.1491267.

McGuire JB, James TJ, Imber CJ, St Peter SD, Friend PJ, Taylor RP. Optimisation of an enzymatic method for beta-galactosidase. Clin Chim Acta 2002;326:123–9. doi:10.1016/S0009-8981(02)00332-7.

Ni M, Lee AS. ER chaperones in mammalian development and human diseases. FEBS Lett 2007;581:3641–51. doi:10.1016/j.febslet.2007.04.045.

Pakhomov AG, Akyel Y, Pakhomova ON, Stuck BE, Murphy MR. Current state and implications of research on biological effects of millimeter waves: a review of the literature. Bioelectromagnetics 1998;19:393–413. doi:10.1002/(SICI)1521-186X(1998)19:7<393::AID-BEM1>3.0.CO;2-X.

Rojavin MA, Ziskin MC. Medical application of millimetre waves. QJM 1998;91:57–66. doi:10.1093/qjmed/91.1.57.

Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. Nat Rev Mol Cell Biol 2007;8:519–29. doi:10.1038/nrm2199.

Shang J. Quantitative measurement of events in the mammalian unfolded protein response. Methods 2005;35:390–4. doi:10.1016/j.ymeth.2004.10.012.

Szabo I, Kappelmayer J, Alekseev SI, Ziskin MC. Millimeter wave induced reversible externalization of phosphatidylserine molecules in cells exposed in vitro. Bioelectromagnetics 2006;27:233–44. doi:10.1002/bem.20202.

Takuma K, Baba A, Matsuda T. Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. Prog Neurobiol 2004;72:111–27. doi:10.1016/j.pneurobio.2004.02.001.

Yoshida H. ER stress and diseases. FEBS J 2007;274:630–58. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05639.x.

Yoshida H, Haze K, Yanagi H, Yura T, Mori K. Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. J Biol Chem 1998;273:33741–9. doi:10.1074/jbc.273.50.33741.

Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M, et al. ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. Mol Cell Biol 2000;20:6755–67. doi:10.1128/MCB.20.18.6755-6767.2000.

Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. Cell 2001;107:881–91. doi:10.1016/S0092-8674(01)00611-0.

Zhadobov M, Sauleau R, Vie V, Himdi M, Le Coq L, Thouroude D. Interactions between 60 GHz millimeter waves and artificial biological membranes: dependence on radiation parameters. IEEE Trans Microw Theory Tech 2006;54:2534–42. doi:10.1109/TMTT.2006.875811.

Zhadobov M, Sauleau R, Le Coq L, Debure L, Thouroude D, Michel D, et al. Low-power millimeter wave radiations do not alter stress-sensitive gene expression of chaperone proteins. Bioelectromagnetics 2007;28:188–96. doi:10.1002/bem.20285.

Zhadobov M, Sauleau R, Le Dréan Y, Alekseev S I, Ziskin M C. Numerical and experimental millimeter-wave dosimetry for in vitro experiments. IEEE Microw Theory Tech. 2008 (in press).

Zhao L, Ackerman SL. Endoplasmic reticulum stress in health and disease. Curr Opin Cell Biol 2006;18:444–52. doi:10.1016/j.ceb.2006.06.005.

B. Article publié dans *Bioelectromagnetics*

Publication

Study of narrow band millimeter-wave potential interactions with endoplasmic reticulum stress sensor genes

Christophe Nicolas Nicolaz, Maxim Zhadobov, Fabienne Desmots, Armelle Ansart, Ronan Sauleau, Daniel Thouroude, Denis Michel and Yves Le Dréan

Bioelectromagnetics 2009

Bioelectromagnetics 30:365 – 373 (2009)

Study of Narrow Band Millimeter-Wave Potential Interactions With Endoplasmic Reticulum Stress Sensor Genes

Christophe Nicolas Nicolaz,[1,2] Maxim Zhadobov,[2,3] Fabienne Desmots,[1] Armelle Ansart,[4] Ronan Sauleau,[2] Daniel Thouroude,[2] Denis Michel,[1] and Yves Le Drean,[1]***

[1]*Intracellular Protein Homeostasis, IFR 140, UMR CNRS 6026, University of Rennes 1, Rennes, France*

[2]*Institute of Electronics and Telecommunications of Rennes (IETR), UMR CNRS 6164, University of Rennes 1, Rennes, France*

[3]*Center for Biomedical Physics, Temple University Medical School, Philadelphia, Pennsylvania*

[4]*Ecobio SCA, UMR CNRS 6553, University of Rennes 1, Rennes, France*

The main purpose of this article is to study potential biological effects of low-power millimeter waves (MMWs) on endoplasmic reticulum (ER), an organelle sensitive to a wide variety of environmental insults and involved in a number of pathologies. We considered exposure frequencies around 60 GHz in the context of their near-future applications in wireless communication systems. Radiations within this frequency range are strongly absorbed by oxygen molecules, and biological species have never been exposed to such radiations in natural environmental conditions. A set of five discrete frequencies has been selected; three of them coincide with oxygen spectral lines (59.16, 60.43, and 61.15 GHz) and two frequencies correspond to the spectral line overlap regions (59.87 and 60.83 GHz). Moreover, we used a microwave spectroscopy approach to select eight frequencies corresponding to the spectral lines of various molecular groups within 59–61 GHz frequency range. The human glial cell line, U-251 MG, was exposed or sham-exposed for 24 h with a peak incident power density of 0.14 mW/cm^2. The average specific absorption rate (SAR) within the cell monolayer ranges from 2.64 ± 0.08 to 3.3 ± 0.1 W/kg depending on the location of the exposed well. We analyzed by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) the level of expression of two endogenous ER-stress biomarkers, namely, the chaperones BiP/GRP78 and ORP150/GRP170. It was found that exposure to low-power MMW does not significantly modify the mRNA levels of these stress-sensitive genes suggesting that ER homeostasis is not altered by low-power MMW at the considered frequencies. Bioelectromagnetics 30:365–373, 2009. © 2009 Wiley-Liss, Inc.

Key words: 60 GHz; BiP/GRP78; ORP150/GRP170; biological effects; cellular stress; frequency dependence; oxygen-induced absorption

Christophe Nicolas Nicolaz and Maxim Zhadobov contributed equally to this work.

Grant sponsor: National Research Agency (ANR), France; Grant number: 2006 SEST 19 02 (HIMWR project); Grant sponsor: Health and Radiofrequencies Foundation, France (''StressOM'' project); Grant sponsor: NIH NCCAM, USA; Grant number: P01-AT002025.

*Correspondence to: (biologists) Yves Le Drean, Équipe Homéostasie intracellulaire des protéines (Hip), UMR CNRS 6026, Université de Rennes 1, Bât. 13, campus de Beaulieu, 35 042 Rennes Cedex, France. E-mail: yves.le-drean@univ-rennes1.fr

**Correspondence to: (physicists) Maxim Zhadobov, Institute of Electronics and Telecommunications of Rennes, University of Rennes 1, Campus de Beaulieu, Bât. 11D, 263 ave. du G. Leclerc, 35042 Rennes Cedex, France. E-mail: maxim.zhadobov@univ-rennes1.fr

Received for review 20 March 2008; Final revision received 22 December 2008

DOI 10.1002/bem.20481
Published online 9 March 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

© 2009 Wiley-Liss, Inc.

INTRODUCTION

In the last decade, wide deployment of wireless communication systems has increasingly raised questions regarding electromagnetic (EM) pollution and environmental safety. Whereas the majority of these systems (GSM, UMTS, WiMAX, Bluetooth, GPS, etc.) operate below 5 GHz, their operating frequencies correspond to frequencies already existing in our natural EM environment. The actual increasing need in wireless mobility and higher data transmission rates leads to a shift of operating frequencies towards the millimeter-wave (MMW) frequencies (30 GHz $\leq f \leq$ 300 GHz), including particular frequency ranges that are originally absent from the natural EM spectrum [Marcus and Pattan, 2005]. The broadband wireless communication systems operating around 60 GHz are currently under development in order to enable high-definition multimedia streaming and high-speed multimedia transmissions (e.g., WiHD™). Radiations within the 57–64 GHz frequency sub-band are selectively absorbed by the oxygen molecules in the atmosphere [Giannetti et al., 1999], and biological species have never interacted with such EM radiations in natural conditions. Therefore, determining the potential biological effects versus the exact frequency of exposure is essential to provide an insight into the physical mechanisms and biological issues of bioelectromagnetic interactions at MMW frequencies.

It is worthwhile to note that MMWs are used in some Eastern European countries in the treatment of a number of diseases [Rojavin and Ziskin, 1998]. However, the exact mechanisms of their action on biological systems remain unknown in spite of reported experimental data showing that low-power MMW radiations may interfere with several cellular processes. For example, it was found recently that MMW can inhibit cell proliferation [Beneduci et al., 2007] or reduce tumor metastasis [Logani et al., 2006]. Taking into account the non-ionizing nature of MMW, it is logical to presume that they are not genotoxic [Vijayalaxmi et al., 2003], but potentially proteotoxic. However, experimental evidence of proteotoxic effects of MMW is still controversial, and recent studies showed that avoiding significant thermal effects, low-power MMW radiations do not trigger the heat shock protein response [Zhadobov et al., 2007]. In the meantime, recent results indicated that exposure to low-power MMW can interact with phospholipids and modify the structural state of biomembranes [Szabo et al., 2006; Zhadobov et al., 2006]. These data suggest that cellular organelles containing membranes as, for example, endoplasmic reticulum (ER), could be potential targets for MMW.

It is now emerging from the literature that the ER is highly sensitive to environmental conditions and is likely involved in many diseases, including cancers, diabetes, cerebral ischemia, or Alzheimer disease [Moenner et al., 2007; Yoshida, 2007]. Perturbation of the ER function activates signaling pathways, which induce the specific expression of particular proteins, called ER chaperones, such as the glucose-regulated proteins (GRPs). The immunoglobulin heavy-chain binding protein (BiP/GRP78) is the best characterized GRP. This essential ER-resident chaperone is involved in protein folding and in the ER-stress response. BiP/GRP78 is highly overexpressed upon disturbance of ER homeostasis [Kozutsumi et al., 1988], and it protects cells against the deleterious effect of ER stress. Furthermore, a sustained upregulation of BiP/GRP78 is believed to favor cancer by inhibiting the achievement of apoptosis. The 150 kDa oxygen-regulated protein (ORP150/GRP170) is also a stress-inducible ER chaperone with cytoprotective properties [Tamatani et al., 2001]. This protein is particularly induced by hypoxia stress [Kuwabara et al., 1996] and has been shown to play a key role in the defense of neurons against environmental insults [Kitao et al., 2004].

The main aim of this work is to estimate the potential impact of low-power MMW upon cellular processes related to ER stress. Recently, we used several assay systems to evaluate ER-stress induction after exposure to low-power 60.4 GHz MMWs. We found that exposure did not modify ER protein expression, folding and secretion, nor induce ER-stress specific transcription factor maturation [Nicolas Nicolaz et al., in press]. However, we cannot exclude the possibility that our exposure conditions were not well adapted to induce an effect at the cell level. In this study, we focused on the potential frequency-dependent biological effect, as response of biological cells could depend on the exposure parameters. In this perspective, we have selected two sets of frequencies. First, five frequencies corresponding to oxygen spectral lines and spectral line overlap regions were chosen. Second, we used eight frequencies corresponding to the spectral lines of some diatomic and triatomic molecular groups containing carbon and/or oxygen atoms. These frequencies were selected based upon available experimental microwave spectroscopy data from the National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, MD). For monitoring the ER-stress level after cellular exposure to these MMW frequencies, we used quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR), which can be considered as the most sensitive of the currently available methods for gene expression measurement and assessment of expression of endogenous biomarkers such as BiP/GRP78 and ORP150/GRP170.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

Cell culture of human astrocytoma cell line U-251 MG was performed as previously described [Zhadobov et al., 2007]. Although they are not subject to direct MMW exposure in the body, astrocyte cells constitute an appropriate model to study cellular stresses since they are considered as particularly sensitive to deleterious environmental conditions, allowing them to protect neurons in the so-called astrocytic reaction [Takuma et al., 2004]. We used the U-251 MG cell line, which is particularly sensitive to ER stress and presents a strong induction of BiP/GRP78 messenger (4 times higher than the HaCaT keratinocytes—data not shown). One day before exposure, cells were plated at 1.6×10^5 cells per well into a six-well tissue culture plate. Since the upcoming wireless communication system will induce a permanent exposure, we directly selected a long and continuous time exposure. Previous time course study showed no difference in unfolded protein response when cells were exposed for 1, 2, or 3 days to MMW [Nicolas Nicolaz et al., in press]. Accordingly, cells were exposed or sham-exposed for 24 h to frequencies shown in Tables 1 and 2. For each frequency, three or four 6-well tissue culture plates were exposed. As positive control for stress induction, cells cultured under the same conditions were treated for 16 h with 1 μM of thapsigargin (TG, Sigma, Steinheim, Germany) or 5 μM of proteasome inhibitor MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al, Sigma) or subjected to heat shock (3 h at 42 °C).

Quantitative Real-Time PCR

After exposure, RNAs were prepared using TRIzol (Gibco/Life Technologies, Paisley, UK), according to the manufacturer's recommendations. For each exposed six-well tissue culture plate, RNAs from three wells were pooled together, constituting one RNA sample. A total of two independent reverse transcriptions was carried out for each exposure. Two micrograms of total RNA from each sample were reverse transcribed in the presence of 50 μM of random hexamer primers and 200 U of reverse transcriptase (M-MLV; Invitrogen, Paisley, UK). Expression levels of ER-stress sensors (BiP/GRP78 and ORP150/GRP170), cytosolic-stress sensor (HSP70), or referent genes (GAPDH, HPRT1, TBP, UBC) were then measured by real-time PCR. PCR reactions were performed using the following primers: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, housekeeping gene) forward primer: 5′-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3′; reverse primer: 5′-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3′; hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1, housekeeping gene) forward primer: 5′-TGACACTGG CAAAACAATGCA-3′; reverse primer: 5′-GGTCCT TTTCACCAGCAAGCT-3′; TATA-box binding protein (TBP, housekeeping gene) forward primer: 5′-TGCAC AGGAGCCAAGAGTGAA-3′; reverse primer: 5′-CA CATCACAGCTCCCCACCA-3′; ubiquitin C (UBC, housekeeping gene) forward primer: 5′-ATTTGGGT CGCGGTTCTTG-3′; reverse primer: 5′-TGCCTT GACATTCTCGATGGT-3′; immunoglobulin heavy chain-binding protein (BiP/GRP78) forward primer: 5′-CTCGAATTCCAAAGATTCAGCAACT-3′; reverse primer: 5′-CTCCACAGTTTCAATACCAA GTG-3′; oxygen-regulated protein 150 (ORP150/GRP170) forward primer: 5′-TGCAGTGATCACCGT GCCAG-3′; reverse primer: 5′-TCTTTCCGGCGGAA GACACC-3′; heat shock protein 70 (HSP70) forward primer: 5′-CTCAGGATTTGCCCTATCCAGATC-3′; reverse primer: 5′-TCCTGGTCCACTTGCATCTTC-3′. PCR reaction was performed in a total volume of 12 μl, containing 133 nM of each sense and antisense primers, 0.5 μl of RT, and 6 μl of iQ SYBR Green supermix (Bio-Rad, Hercules, CA). The PCR reaction was performed

TABLE 1. Exposure Frequencies Corresponding to the Spectral Lines of Molecular Oxygen and to the Spectral Lines Overlap Regions Within the 59–61.2 GHz Frequency Range [Liebe et al., 1992]

Frequency (GHz)	Atmospheric attenuation (dB/km)
Peaks of absorption	
$f_1 = 59.164$	2.2
$f_2 = 60.435$	3.1
$f_3 = 61.151$ (therapeutic applications)	2.4
Frequencies corresponding to the weak atmospheric attenuation	
$f_4 = 59.870$	0.58
$f_5 = 60.830$	0.57

Data are given for dry air at a temperature of 6 °C and pressure of 7.6 kPa.

TABLE 2. Exposure Frequencies Corresponding to the Spectral Lines of Some Diatomic and Triatomic Molecular Groups Within the 59–61 GHz Frequency Sub-Band.

Frequency (GHz)	Molecular groups	Name
$f_6 = 59.008$	CH	Methylidyne
$f_7 = 59.261$	SO_2	Sulfur dioxide
$f_8 = 59.411$	NO_2	Nitrogen dioxide
$f_9 = 59.626$	SO	Sulfur monoxide
$f_{10} = 59.846$	C_4H_2 (HCCCCH)	Butadiene
$f_{11} = 60.047$	C_4H_6 (CH_3CH_2CCH)	1-Butyne
$f_{12} = 60.530$	OCS	Carbonyl sulfide
$f_{13} = 60.862$	HCN	Hydrogen cyanide

Data are obtained from microwave spectroscopy database (NIST).

as follows: 98 °C 30 s, then 40 cycles 95 °C 30 s, 54 °C 30 s. PCR products were measured continuously with MiniOpticon Real-Time PCR detection system (Bio-Rad) and results were analyzed with the dedicated software Opticon Monitor 3 (Bio-Rad). Relative changes in gene expression were analyzed using the delta C_t method [Winer et al., 1999].

Radiation Parameters

Thirteen frequency points between 59.1 and 61.2 GHz were selected in order to evaluate the role of the exact exposure frequency. First, five frequencies within the peak of strong oxygen-induced absorption centered around 60 GHz were chosen (Table 1): (i) three O_2 lines of strong absorption resulting from magnetic-dipole electron transitions (f_1–f_3); (ii) two frequencies (f_4,f_5) located between the resonances corresponding to the weak absorption due to the line overlap interference. Second, eight additional frequencies (Table 2) corresponding to the spectral lines of diatomic, triatomic, and hydrocarbon molecular groups were chosen according to the molecular spectral database of the NIST. These molecular groups being not always directly present in the living systems, show similar fundamental physico-chemical properties and are characteristic of atomic association found in some biomolecules. It is worthwhile to note that molecular complexes involved in cellular processing and functioning are not always well investigated from the physico-chemical point of view, and the spectral data of a majority of biomolecules are still not available. As a consequence, frequencies selected in Table 2 can be considered as an appropriate model supported by the scientifically based data that can be applied to study potential frequency-dependent bioelectromagnetic interactions.

Exposure System and Dosimetry

The exposure system developed for in vitro bioelectromagnetic investigations in the 50–75 GHz frequency range is schematically shown in Figure 1. The experimental set-up is divided into three main subunits: (1) signal generation devices, (2) spectrum and power control unit, and (3) far-field exposure chamber. A part of the system was already described in previous publications of our research group [Zhadobov et al., 2006, 2007]. We used linearly polarized CW radiation with a total radiated power $P_{max} = 25$ mW. The corresponding maximum incident power density for the exposed six-well tissue culture plate was calculated analytically and was equal to 0.14 mW/cm^2. The values of electric and magnetic fields were equal to 22.6 V/m and 0.06 A/m, respectively. The exposure frequency was measured using a MMW spectrum analyzer and adjusted regularly to achieve frequency stability higher than

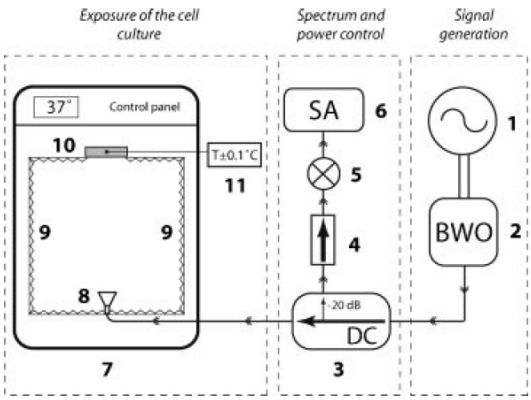

Fig. 1. Experimental set-up for the exposure of cell cultures in 50–75 GHz frequency range. Signal generation: (1) high-voltage generator SIEMENS RWON14, (2) 50–75 GHz backward-wave oscillator SIEMENS RWO75 with controllable output power ($P_{max} = 25$ mW at 60 GHz). Spectrum and power control: (3) −20 dB directional coupler HP V752D. (4) Signal isolator HP V365A (30 dB broadband isolation). (5) Mixer M15HWD. (6) Spectrum analyzer R3182. Exposure of the cell culture: (7) incubator MEMMERT UE400. (8) 20 dB gain pyramidal standard horn antenna. (9) Absorbing materials. (10) Six-well tissue culture plate at 21 cm from the antenna. (11) Thermocouple.

±1.5 MHz. This value compared with the half-power bandwidth equal to 2.8 MHz guarantees the exposure frequency to be located within the signal half-power bandwidth.

The location of the tissue culture plate relative to the free-space radiation pattern of the pyramidal horn antenna is schematized in Figure 2. The fields radiated at 60 GHz were computed with the finite element method using the High Frequency Structure Simulation software (HFSS™, Ansoft, Voisins le Bretonneux, France, http://www.ansoft.com/products/hf/hfss). The computational results for the pyramidal horn antenna were in good agreement with measurements performed in E- and H-planes in an anechoic test chamber. The six-well tissue culture plate was located in the angular range $|\theta| < 12.5°$ in E-plane ($\varphi = 0°$) and $|\theta| < 8.4°$ in H-plane ($\varphi = 90°$). The maximum power density variations were equal to −2.1 dB in E-plane and −1.2 dB in H-plane relative to the maximum value in the z direction ($\theta = 0°$). These variations correspond to a decrease of the power density towards the edges of the six-well tissue culture plate from 0.14 mW/cm^2 down to 0.09 mW/cm^2 and 0.1 mW/cm^2 in E- and H-planes, respectively. The average specific absorption rate (SAR) within the cell monolayer was computed at 59–61.15 GHz for the middle wells of the six-well tissue culture plate using FDTD method (XFDTD® software, Remcom, State College, PA) and it was equal to 3.3 ± 0.1 W/kg. The average incident power density

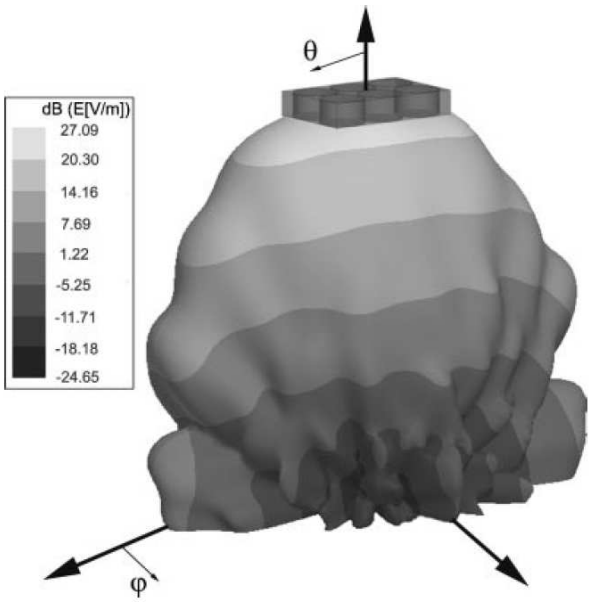

Fig. 2. Discretized 3D polar plot representing the free-space radiation pattern of the pyramidal horn antenna at 60 GHz. Location of the six-well tissue culture plate (120 mm × 80 mm × 20 mm) in the figure corresponds to its position in the experiments.

for the corner wells is roughly equal to 80% of the incident power density for the middle wells [Zhadobov et al., 2007]; therefore, the average SAR for the corner wells is equal to 2.64 ± 0.08 W/kg. Dielectric properties and conductivity data for the cells, culture medium, and polystyrene were taken from a previous study [Zhadobov et al., 2008]. Possible thermal effects were avoided by using relatively low-power densities. The stability of the temperature inside the incubator close to the location of the tissue culture plate (37 ± 0.3 °C) was regularly checked, using a temperature data logger with two independent temperature sensors (HI141JH, HANNA Instruments, Lingolsheim, France).

Statistical Analysis

Prior to statistical analysis, we checked for normality and homocedasticity of the error terms of our data. Box-Cox transformation was applied to the data for which observed deviations for group means lacked normality (frequencies within the 59.0–60.8 GHz frequency range, Table 2). Because of unbalanced repartition of data, effects of low-power MMW at different frequencies on stress sensor gene level were evaluated by performing general linear model (GLM), followed by multiple comparison test (Tukey test). All models were implemented in MINITAB 15.1.1 software.

RESULTS

We measured the mRNA levels of two ER-resident chaperones known to be overexpressed by ER stress. BiP/GRP78 is the most commonly used biomarker for ER-stress analysis [Lee, 2005], since its mRNA synthesis is highly induced by the presence of misfolded proteins in the ER [Kozutsumi et al., 1988]. Cells treated with TG, a drug which triggers ER stress by selectively inhibiting the ER Ca(2+)-ATPase pump, showed a 65-fold increase of their cellular BiP/GRP78 mRNA (Fig. 3A). Additionally, cytosolic proteotoxic stresses induced by heat shock or by MG132 treatments increased the BiP/GRP78 level by 7.8- and 5.1-fold, respectively. We also measured the mRNA level of the 150 kDa oxygen-regulated protein (ORP150/GRP170), another ER-resident chaperone known to be induced by numerous cellular insults [Arrington and Schnellmann, 2008]. The corresponding messengers were highly increased by TG treatment (27-fold increase), compared to MG132 or heat shock treatment (1.8- and 2.9-fold increase, respectively, Fig. 3B). Together, these data validate the utilization of BiP/GRP78 and ORP150/GRP170 as sensitive biosensors for monitoring the level of ER stress.

Then, we used quantitative RT-PCR to verify whether or not exposure to MMW induces the mRNA synthesis of these two ER chaperones. Relative quantities of the transcripts were calculated by normalizing to the quantity of GAPDH transcript. Calculations were also performed with three other housekeeping genes (HPRT1, TBP, and UBC) in order to avoid possible misinterpretation due to some intrinsic variation of GAPDH used as a unique reference gene. The mRNA expressions of these housekeeping genes were assessed and found similar in all samples (data not shown). C_t values obtained by RT-PCR were alike for all the messengers, except for ORP150. This could reflect intrinsic variability in the basal expression of this gene, or subtle change in our culture conditions between experiments related to oxygen spectral lines frequencies and experiments concerning spectral lines of molecular groups. However, for each set of exposures, the values were homogeneous and we can be confident about the relative comparison with the corresponding sham control. First, cell cultures were exposed at frequencies f_1–f_5 determined by oxygen-induced absorption (Table 1). A slight increase in the BiP/GRP78 was observed after MMW exposure, especially at 59.87 GHz (f_4 in Fig. 4A), but this increase is not statistically significant [GLM, $F_{(5.29)} = 1.26$, $P = 0.314$]. Similarly, no statistically significant changes were observed for ORP150/GRP170 (Fig. 4B) between exposed and sham-exposed samples [GLM, $F_{(5.29)} = 0.67$,

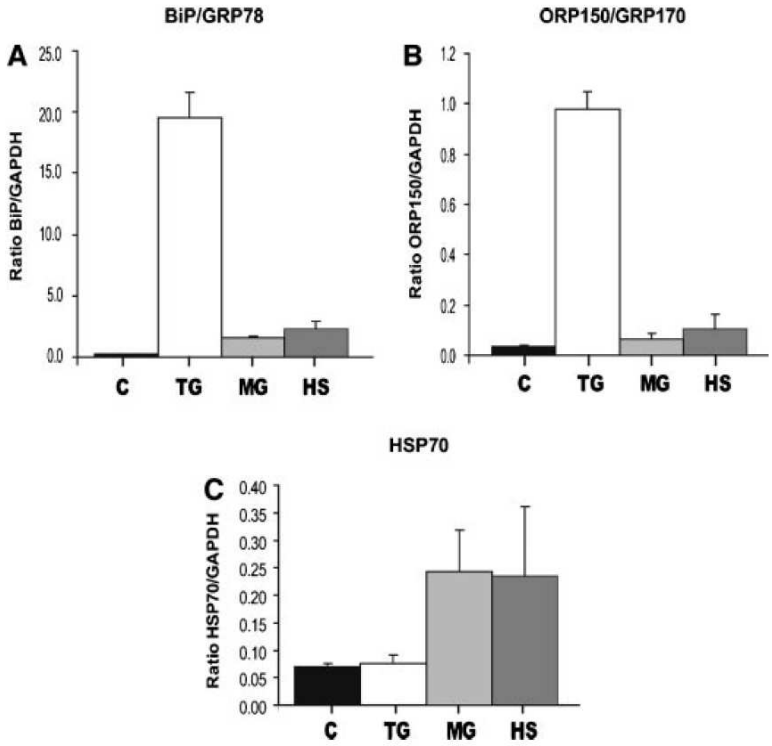

Fig. 3. Transcriptional induction of stress sensor genes by chemical treatments. U-251 MG cells were subjected to heat shock (HS) for 3 h, or treated with 1 μM thapsigargin (TG) or 5 μM MG132 (MG) or the vehicle, DMSO as control (C), for 16 h. Messenger levels of BiP/GRP78 (**A**), ORP150/GRP170 (**B**), and HSP70 (**C**) were then analyzed by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR). The values ± SD represent the ratio of transcriptional levels of BiP/GRP78, ORP150/GRP170, or HSP70 relative to GAPDH, used as a reference gene. Experiments were performed at least in triplicate.

$P = 0.651$]. Second, cell cultures were exposed to eight frequencies corresponding to the spectral lines of molecular groups containing carbon or oxygen atoms (f_6–f_{13}, Table 2). As shown in Figure 5, stress-sensor genes (BiP/GRP78, ORP150/GRP170) expression was not changed in exposed cells. Small variations in chaperone expression observed between exposed or sham-exposed cells were not statistically significant [BiP/GRP78: GLM, $F_{(8.189)} = 1.59$, $P = 0.130$; ORP150/GRP170, GLM, $F_{(8.135)} = 0.28$, $P = 0.972$]. These results demonstrate that under considered exposure conditions, none of the 13 frequencies have any effects on ER-chaperone synthesis.

Moreover, we considered induction of HSP70 (Figs. 4C and 5C), a member of the cytosolic HSP family, after exposure to low-power MMW. This messenger is synthesized in response to heat shock or other proteotoxic stress as shown in Figure 3C. Significant 3.3- or 3.5-fold increases, respectively, were observed with heat shock treatment or with MG132, a proteasome inhibitor known to induce the heat shock response [Bush et al., 1997]. The absence of significant changes in the expression of HSP70 after MMW exposure [Fig. 4: GLM, $F_{(5.29)} = 1.82$, $P = 0.146$; Fig. 5: GLM, $F_{(8.137)} = 1.41$, $P = 0.198$] confirmed that the radiating power was low enough to avoid any thermal effect in cellular sample. Nevertheless, we cannot exclude the possibility of local temperature rise, but in that case, heating is very slight and has no impact on HSP70 expression, which is considered a major factor involved in hyperthermia tolerance [Haveman et al., 2005].

DISCUSSION AND CONCLUSION

Currently, a large number of studies focus on the potential effects of microwaves resulting from cell phone exposure [Otto and von Muhlendahl, 2007], but only few studies were performed at higher frequencies. MMW around 60 GHz will be soon used for new local wireless communication applications. According to the

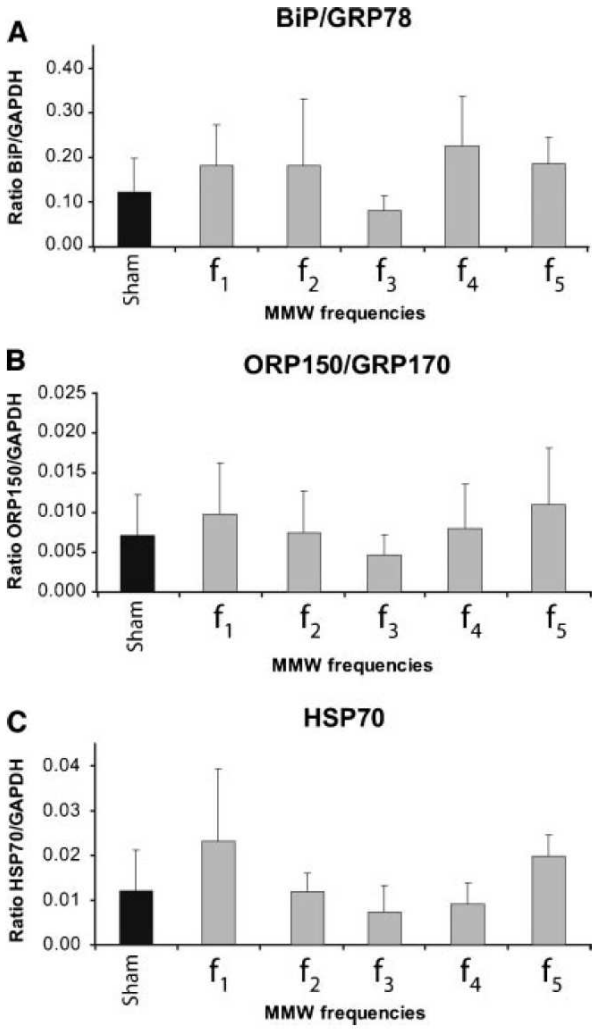

Fig. 4. MMW radiations do not modify the mRNA level of ER-stress-related genes. Cells were exposed or sham-exposed during 24 h to five discrete frequencies located within the region of strong oxygen-induced absorption near 60 GHz (Table 1). Quantitative RT-PCR analysis of BiP/GRP78 (**A**), ORP150/GRP170 (**B**), and HSP70 (**C**) mRNA were performed. The values ± SD represent the ratio of transcriptional levels of tested messengers relative to GAPDH, used as a reference gene. They correspond to the means of 15–20 quantitative PCR distributed within 3–4 sets of independent exposure experiments, depending on the frequency tested.

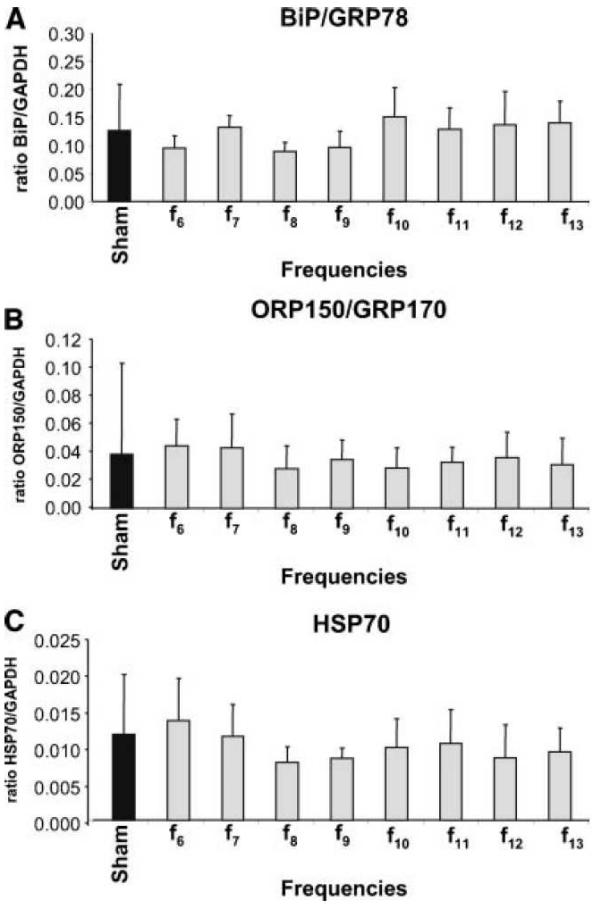

Fig. 5. Cellular exposure to f_6–f_{13} frequencies does not modify the mRNA level of ER-stress-related genes. Cells were exposed or sham-exposed for 24 h to eight frequencies corresponding to the spectral lines of various molecular groups (Table 2). Quantitative RT-PCR analysis of BiP/GRP78 (**A**), ORP150/GRP170 (**B**), and HSP70 (**C**) mRNA was performed. The values ± SD represent the ratio of transcriptional levels of tested messengers relative to GAPDH used as a reference gene. Depending on the considered frequency, values correspond to the means of 16–18 quantitative PCR distributed within three sets of independent exposure experiments.

precautionary principle, the question about potential health risks should be addressed before the wide deployment and/or commercialization of wireless communication systems. MMW are already used as a therapeutic method suggesting the existence of possible interactions between MMW and the human body. While thermal effects are relatively well known at high intensities, possible direct EM effects, unrelated to those caused by temperature increase, are more controversial. In spite of the existence of a few theories regarding non-thermal bioelectromagnetic interactions at MMW, their exact mechanisms and cellular targets remain unknown. Recently, some observations suggested that membrane-rich organelles, such as ER, might be potential targets of MMW [Szabo et al., 2006; Zhadobov et al., 2006]. In the meantime, we found that exposure to low-power MMW at the unique 60.4 GHz frequency does not modify ER homeostasis [Nicolas Nicolaz et al., in press]. To determine whether or not variation of frequency may trigger ER stress, we assessed the

levels of two specific ER-resident chaperones after narrow-band MMW exposure.

Perturbation of ER function leads to ER stress that can trigger apoptosis if it is not relieved. Upon ER stress, various signaling pathways are activated, which upregulate the synthesis of ER chaperones such as BiP/GRP78, GRP94, ORP150/GRP170, calnexin, calreticulin, or EDEM [Ni and Lee, 2007]. These proteins facilitate the correct folding and prevent the aggregation of malfolded ER proteins. Furthermore, some specific chaperones, like BiP/GRP78 and ORP150/GRP170, are also involved in cell survival because of active anti-apoptotic properties [Ozawa et al., 1999; Rao et al., 2002]. Transcriptional activation of these GRP genes after ER stress is extremely high and rapid. Their transcript levels reach a plateau that is sustained up to 1 day [Li et al., 1993]. This induction makes these genes ideal ER-stress sensors.

In this study, we measured the expression of BiP/GRP78 and ORP150/GRP170 in order to determine if MMW could trigger ER stress. Great care was taken to avoid possible artifactual thermal effects, and expression of the heat-inducible HSP70 was monitored as control. We used a quantitative RT-PCR approach, which nowadays is one of the most sensitive and accurate methods for gene expression measurement. Using this technique, we have shown that the expression of BiP/GRP78 and ORP150/GRP170 in the U-251 MG human astrocytoma cell line is unchanged after exposure to MMW at frequencies around 60 GHz. We used a set of frequencies corresponding to the peak of absorption of molecular oxygen as it is one of the key molecules playing a great role in all living systems. It is interesting to note that frequency f_3 coincides with a frequency used for therapeutic purposes [Pakhomov and Murphy, 2000] that was selected based on the empirical clinical data. Moreover, as the molecular targets of EM waves are still poorly known, we used a microwave spectroscopy approach to select another group of eight frequencies, corresponding to the spectral lines of carbon- and oxygen-rich molecules. Whereas these resonant peaks of absorption are well appearing in the gases (NIST, 2009), they are much less pronounced in liquids and biological mediums and might be shifted in frequency depending on the surrounding environment. However, potential resonant interactions cannot be excluded from consideration before appropriate experimental validation. After 24 h of cell culture exposure to MMW, no frequency-selective effect on ER-chaperones synthesis was evidenced. Our results showed that low-power MMW within 59–61.2 GHz frequency range does not affect the ER homeostasis of U-251 MG cells. Additional studies using primary cell culture will be required to determine if this observation can be expanded to normal human astrocyte cells. However, we cannot exclude that other cell types might be affected, or that other exposure parameters, such as intensity, polarization, modulation, or exposure duration may have an impact on cells. Additional investigations should be conducted to acquire deeper knowledge on interactions between MMW and biological systems.

ACKNOWLEDGMENTS

C.N.N. was supported by fellowship from the French ministry of higher education and research (MENRT), and F.D. by fellowship from the ''Association pour la Recherche sur le Cancer'' (ARC).

REFERENCES

Arrington DD, Schnellmann RG. 2008. Targeting of the molecular chaperone oxygen-regulated protein 150 (ORP150) to mitochondria and its induction by cellular stress. Am J Physiol Cell Physiol 294:C641–C650.

Beneduci A, Chidichimo G, Tripepi S, Perrotta E, Cufone F. 2007. Antiproliferative effect of millimeter radiation on human erythromyeloid leukemia cell line K562 in culture: Ultrastructural- and metabolic-induced changes. Bioelectrochemistry 70: 214–220.

Bush KT, Goldberg AL, Nigam SK. 1997. Proteasome inhibition leads to a heat-shock response, induction of endoplasmic reticulum chaperones, and thermotolerance. J Biol Chem 272: 9086–9092.

Giannetti E, Luise M, Reggiannini R. 1999. Mobile and personal communications in the 60GHz band: A survey. IEEE Commun Mag 10:207–243.

Haveman J, Sminia P, Wondergem J, van der Zee J, Hulshof M. 2005. Effects of hyperthermia on the central nervous system: What was learnt from animal studies? Int J Hyperthermia 21:473–487.

Kitao Y, Hashimoto K, Matsuyama T, Iso H, Tamatani T, Hori O, Stern DM, Kano M, Ozawa K, Ogawa S. 2004. ORP150/HSP12A regulates Purkinje cell survival: A role for endoplasmic reticulum stress in cerebellar development. J Neurosci 24:1486–1496.

Kozutsumi Y, Segal M, Normington K, Gething MJ, Sambrook J. 1988. The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. Nature 332: 462–464.

Kuwabara K, Matsumoto M, Ikeda J, Hori O, Ogawa S, Maeda Y, Kitagawa K, Imuta N, Kinoshita T, Stern DM, Yanagi H, Kamada T. 1996. Purification and characterization of a novel stress protein, the 150-kDa oxygen-regulated protein (ORP150), from cultured rat astrocytes and its expression in ischemic mouse brain. J Biol Chem 271:5025–5032.

Lee AS. 2005. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. Methods 35:373–381.

Li WW, Alexandre S, Cao X, Lee AS. 1993. Transactivation of the grp78 promoter by Ca2+ depletion. A comparative analysis with A23187 and the endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase inhibitor thapsigargin. J Biol Chem 268:12003–12009.

Liebe H, Rosenkranz P, Hufford G. 1992. Atmospheric 60-GHz oxygen spectrum: New laboratory measurements and line parameters. J Quant Spectrosc Radiat Transf 48:629–643.

Logani MK, Szabo I, Makar V, Bhanushali A, Alekseev S, Ziskin MC. 2006. Effect of millimeter wave irradiation on tumor metastasis. Bioelectromagnetics 27:258–264.

Marcus M, Pattan B. 2005. Millimeter wave propagation. IEEE Microw Mag 6:54–63.

Moenner M, Pluquet O, Bouchecareilh M, Chevet E. 2007. Integrated endoplasmic reticulum stress responses in cancer. Cancer Res 67:10631–10634.

Ni M, Lee AS. 2007. ER chaperones in mammalian development and human diseases. FEBS Lett 581:3641–3651.

Nicolas Nicolaz C, Zhadobov M, Desmots F, Sauleau R, Thouroude D, Michel D, Le Dréan Y. in press. Effect of electromagnetic millimeter wave radiations on endoplasmic reticulum stress. Cell Biol Toxicol.

National Institute of Standards and Technology (NIST). 2009 Molecular spectral database available from: http://physics.nist.gov/PhysRefData/MolSpec/index.html.

Otto M, von Muhlendahl KE. 2007. Electromagnetic fields (EMF): Do they play a role in children's environmental health (CEH)? Int J Hyg Environ Health 210:635–644.

Ozawa K, Kuwabara K, Tamatani M, Takatsuji K, Tsukamoto Y, Kaneda S, Yanagi H, Stern DM, Eguchi Y, Tsujimoto Y, Ogawa S, Tohyama M. 1999. 150-kDa oxygen-regulated protein (ORP150) suppresses hypoxia-induced apoptotic cell death. J Biol Chem 274:6397–6404.

Pakhomov AG, Murphy MR. 2000. Low-intensity millimeter waves as a novel therapeutic modality. IEEE Trans Plasma Sci 28:34–40.

Rao RV, Peel A, Logvinova A, del Rio G, Hermel E, Yokota T, Goldsmith PC, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE. 2002. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: Role of the ER chaperone GRP78. FEBS Lett 514:122–128.

Rojavin MA, Ziskin MC. 1998. Medical application of millimetre waves. Q J Med 91:57–66.

Szabo I, Kappelmayer J, Alekseev SI, Ziskin MC. 2006. Millimeter wave induced reversible externalization of phosphatidylserine molecules in cells exposed in vitro. Bioelectromagnetics 27:233–244.

Takuma K, Baba A, Matsuda T. 2004. Astrocyte apoptosis: Implications for neuroprotection. Prog Neurobiol 72:111–127.

Tamatani M, Matsuyama T, Yamaguchi A, Mitsuda N, Tsukamoto Y, Taniguchi M, Che YH, Ozawa K, Hori O, Nishimura H, Yamashita A, Okabe M, Yanagi H, Stern DM, Ogawa S, Tohyama M. 2001. ORP150 protects against hypoxia/ischemia-induced neuronal death. Nat Med 7:317–323.

Vijayalaxmi, Logani MK, Bhanushali A, Ziskin MC, Prihoda TJ. 2003. Micronuclei in peripheral blood and bone marrow cells of mice exposed to 42 GHz electromagnetic millimeter waves. Radiat Res 161:341–345.

Winer J, Jung CK, Shackel I, Williams PM. 1999. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. Anal Biochem 270:41–49.

Yoshida H. 2007. ER stress and diseases. FEBS J 274:630–658.

Zhadobov M, Sauleau R, Vie V, Himdi M, Le Coq L, Thouroude D. 2006. Interactions between 60 GHz millimeter waves and artificial biological membranes: Dependence on radiation parameters. IEEE Trans Microw Theory Tech 54:2534–2542.

Zhadobov M, Sauleau R, Le Coq L, Debure L, Thouroude D, Michel D, Le Drean Y. 2007. Low-power millimeter wave radiations do not alter stress-sensitive gene expression of chaperone proteins. Bioelectromagnetics 28:188–196.

Zhadobov M, Sauleau R, Le Dréan Y, Alekseev S, Ziskin MC. 2008. Numerical and experimental millimeter-wave dosimetry for in vitro experiments. IEEE Microw Theory Tech 56:2998–3007.

II.2 Étude du stress réticulaire dans des cellules de la peau

A. Introduction

Dans cette partie sont présentés les derniers résultats obtenus. À l'heure actuelle, certaines expériences sont encore en cours et viendront s'intégrer à celles présentées ici, afin de constituer prochainement une publication portant sur l'exploration des effets de la puissance, ainsi que sur l'association entre une exposition aux ondes et le stress réticulaire. Cette publication, qui proposera un travail complémentaire aux deux articles précédents, a été rendue possible grâce à l'acquisition d'un nouveau générateur, fonctionnant à une fréquence fixe (60,4 GHz) mais dont la puissance est réglable. La démarche expérimentale que nous suivons est illustrée dans la **figure 37**.

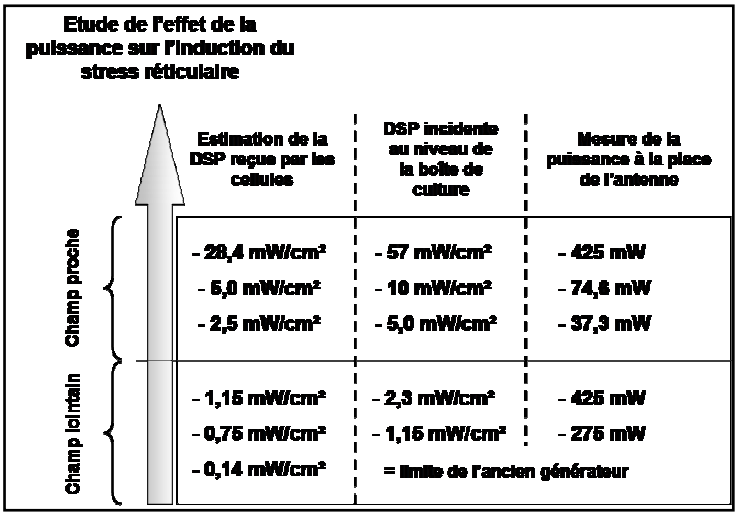

Figure 37 : Démarche expérimentale suivie
Des expositions sont réalisées en champ lointain, où les DSP peuvent être calculées. Dans ce cas, la DSP reçue par les cellules est sensiblement proche de la norme d'exposition grand public. Les expositions en champ proche offrent la possibilité de dépasser ces normes. Les données en champ proche sont obtenues pour une antenne placée à 2,5 cm de la boîte de culture.

Dans les articles précédemment publiés, la DSP reçue par les cellules était estimée à 0,14 mW/cm². Celle-ci correspondait à la limite maximale de puissance que pouvait fournir l'ancien générateur en champ lointain. Avec le nouveau système, il est possible de travailler à des puissances nettement plus élevées. Ainsi, en champ lointain, des expositions ont pu être réalisées à deux puissances différentes, 275 mW ou 425 mW, avec des DSP reçues par les cellules estimées à 0,75 mW/cm² et 1,15 mW/cm², soit respectivement environ 5 et 8 fois plus que ce qui était obtenu avec l'ancien générateur. Pour rappel, ces deux DSP correspondent à une estimation de ce que peuvent recevoir les cellules localisées de l'autre côté du plexiglas

de la boîte de culture par rapport à l'antenne (pour plus de détails, revoir le **tableau 5** du chapitre I : Matériels et méthodes). Ces DSP rentrent par ailleurs dans la gamme de la norme d'exposition grand public, qui est de 1 mW/cm². Dans un futur proche, nous souhaitons toutefois dépasser les normes d'exposition et nous placer à la norme d'exposition des travailleurs (5 mW/cm²), voire atteindre les DSP utilisées en thérapie (jusqu'à 10 mW/cm²). Pour cela, nous nous placerons en champ proche. Le principal problème rencontré repose dans le risque d'avoir un effet biologique lié à l'augmentation de la température mais ce paramètre sera contrôlé en parallèle grâce à une caméra IR.

Enfin, nous nous sommes penchés sur l'étude des effets synergiques potentiels entre les ondes MM et le stress réticulaire. Si les ondes MM ne sont pas capables de casser des liaisons chimiques, il est davantage possible d'envisager qu'elles puissent interagir avec une autre source de stress et accélérer les dommages induits par des agents chimiques ou physiques. Quelques travaux ont été menés là-dessus, concernant l'association entre la téléphonie mobile et les systèmes de réparation de l'ADN. Nous avons donc voulu déterminer si les ondes MM pouvaient potentialiser le stress réticulaire, en exposant deux lignées cellulaires à des DSP différentes.

B. Résultats

- **Exposition des cellules HaCaT à deux densités de puissances**

Dans un premier temps, nous avons travaillé avec les cellules de la lignée épithéliale humaine HaCaT qui ont été exposées pendant 24h à 0,75 mW/cm² et 1,15 mW/cm². Les résultats présentés dans la **figure 38** représentent le bilan de trois expériences indépendantes.

Au préalable, nous avons voulu caractériser les niveaux de réponse de ces cellules à un stress réticulaire aigu. Les cellules ont ainsi été traitées pendant 16h à la TG. Les niveaux d'expression des ARNm des chaperons BIP et ORP150 ont été mesurés par la technique de PCR en temps réel et les résultats présentés ici correspondent à la moyenne ± écart-type de trois expériences indépendantes.

L'exposition des cellules HaCaT à deux DSP différentes n'induit pas le stress réticulaire **(figure 38A)**, contrairement à ce qui est observé lorsque ces dernières sont traitées à la TG **(figure 38B)**.

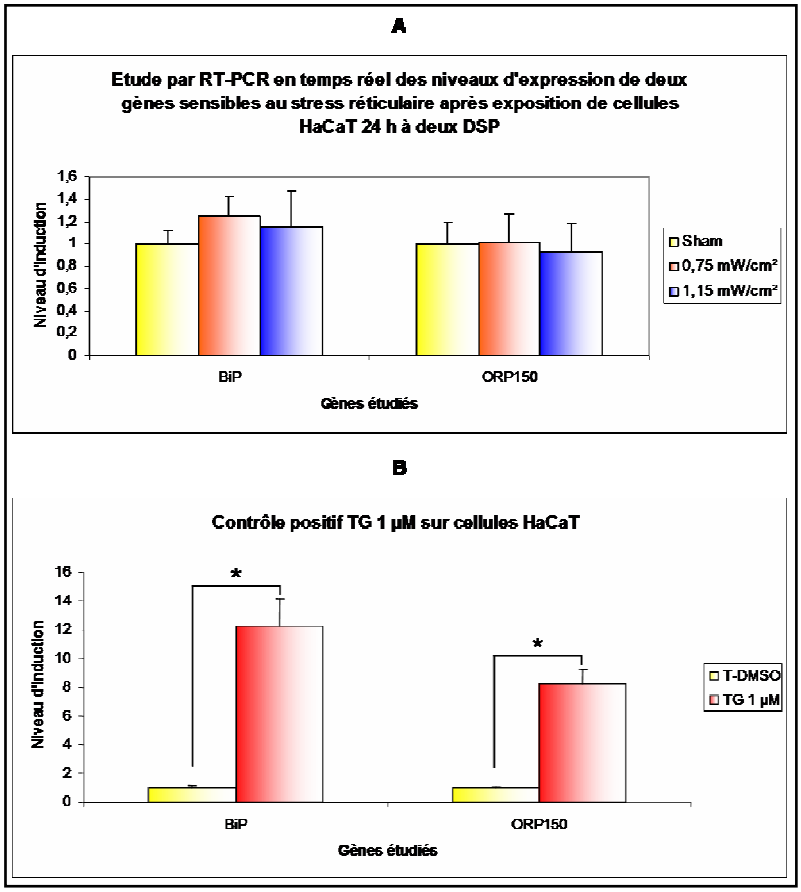

Figure 38 : Etude par RT-PCR en temps réel des niveaux d'expression de deux gènes sensibles au stress du RE, après 24 heures d'exposition de cellules HaCaT à 0,75 ou 1,15 mW/cm² (A) ou après 16 heures de traitement à la thapsigargine (B)
Ces résultats représentent la moyenne +/- écart-type de 3 expositions indépendantes. Après vérification de la normalité et de l'homoscédasticité des variances, le test t de Student a été effectué pour chaque type d'expérience.
A) L'exposition des cellules HaCaT pendant 24 heures n'entraîne pas de variation significative du niveau d'expression de BiP et ORP150.
B) Le traitement à la TG 1 µM pendant 16 heures provoque un stress réticulaire, lequel se traduit par une induction significative (*=0,01 et *=0,07) des niveaux d'expression des ARNm des chaperons BiP et ORP150.

Nos premières observations ont été réalisées après 24h d'exposition mais nous ne pouvons pas exclure que les ondes MM puissent également induire précocément un stress réticulaire dans notre modèle. Il est en effet tout à fait concevable que des mécanismes de régulation aient pu se mettre en place, expliquant l'absence d'effet visible après 24h d'exposition. Aussi, pour vérifier si un phénomène transitoire s'est produit, nous avons donc réalisé des expositions à des durées intermédiaires, 1h et 6h.

- **Exposition de cellules HaCaT à différents temps à 1,15 mW/cm²**

Les cellules ont été exposées à une DSP de 1,15 mW/cm² pendant 1h et 6h. Pour compléter cette figure, nous avons ajouté les résultats obtenus après 24h d'exposition

(figure 39). Nous avons étudié les niveaux d'expression des ARNm de deux chaperons du RE (BiP et ORP150) par la technique de PCR en temps réel. Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± écart-type de trois expériences indépendantes.

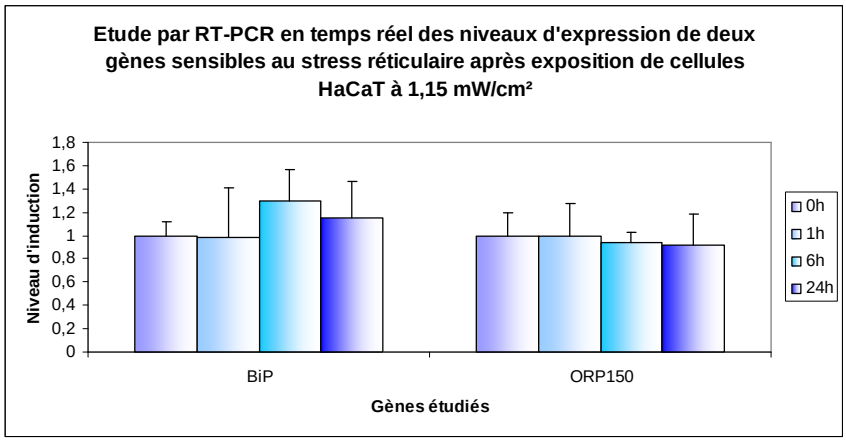

Figure 39 : Etude par RT-PCR en temps réel des niveaux d'expression de deux chaperons du RE, BiP et ORP150, sensibles au stress réticulaire, dans des cellules HaCaT, après exposition à 60,4 GHz à une DSP de 1,15 mW/cm² pendant des durées différentes
Ces résultats correspondent à la moyenne ± écart-type de 3 expériences indépendantes. Les ondes MM n'ont aucun effet sur les niveaux d'expression de ces gènes.

L'exposition à des temps plus courts ne provoque pas de perturbation de l'homéostasie du RE. L'absence d'induction des niveaux d'expression des ARNm des chaperons, quel que soit le temps d'exposition, souligne que les ondes MM ne sont pas capables de provoquer de perturbations massives du RE. Notre lignée cellulaire, en raison de son origine (peau) constitue un bon modèle d'étude qui peut toutefois avoir un gros défaut. En raison de leur interaction permanente avec l'environnement, ces cellules peuvent présenter une certaine résistance aux stress, laquelle se traduit par une sensibilité moindre dans le cadre d'expérimentations. À ce titre, lorsque l'on compare les niveaux de réponse des marqueurs de stress du RE au sein des cellules HaCaT par rapport à ceux de la lignée U-251 MG, on constate que les cellules HaCaT répondent 4 fois moins bien que les cellules U-251 MG. De même, une étude générale de la bibliographie concernant les effets des RF démontre l'existence de variabilité entre les lignées cellulaires. Pour exclure toute possibilité, nous avons décidé de confirmer nos résultats avec les cellules de la lignée humaine A375, également issues de la peau mais dérivées d'un autre type cellulaire, les mélanocytes.

- **Exposition de cellules A375 à différents temps à 1,15 mW/cm²**

Afin de cibler au mieux l'existence d'un effet potentiel sur la réponse UPR, les cellules A375 ont été exposées à trois temps différents à une DSP forte de 1,15 mW/cm². Les niveaux

d'expression des ARNm de deux chaperons du RE ont été mesurés par PCR en temps réel. Les résultats présentés dans la **figure 40A** correspondent à la moyenne ± écart-type de trois expériences indépendantes. Une caractérisation de la réponse de ces cellules au stress réticulaire a aussi été réalisée en parallèle, en traitant les cellules durant 16h à la TG 1 µM **(figure 40B)**.

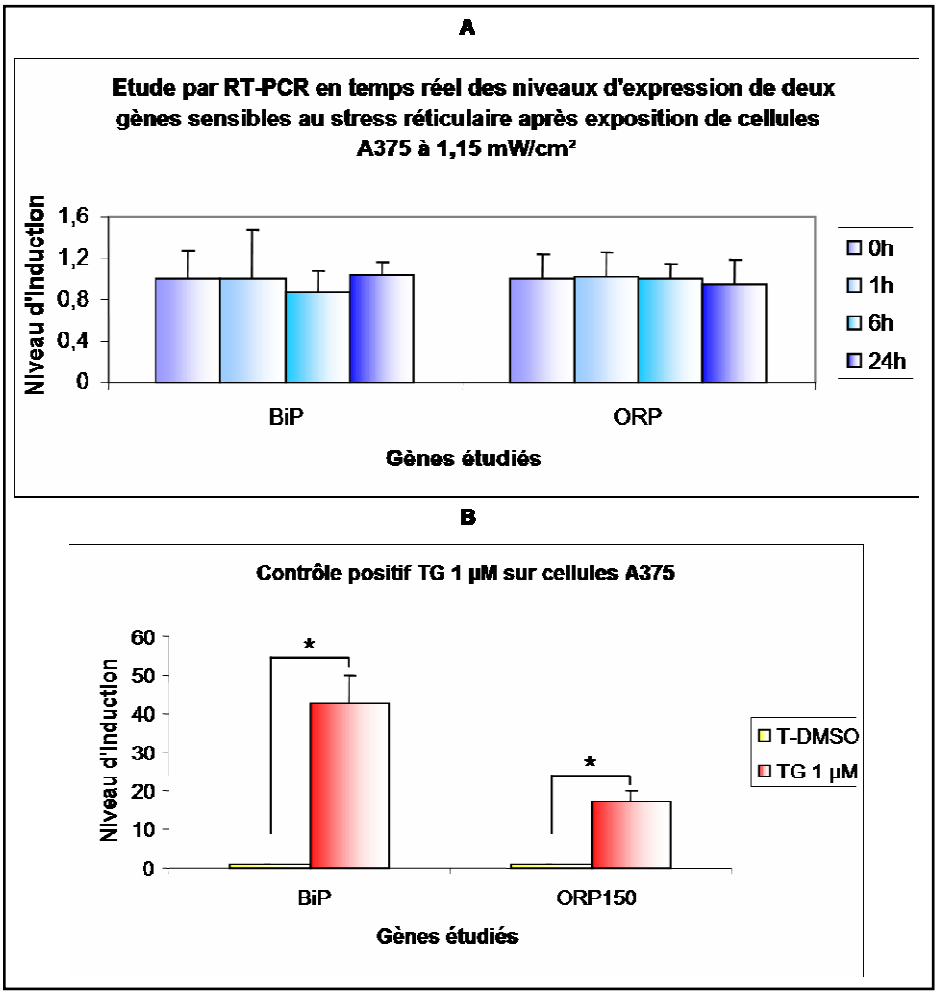

Figure 40 : Etude par RT-PCR en temps réel des niveaux d'expression de BiP et ORP150, gènes sensibles au stress du RE, après exposition de cellules A375 à différents temps, à la DSP de 1,15 mW/cm² (A) ou après 16 heures de traitement à la thapsigargine (B)
Ces résultats représentent la moyenne +/- écart-type de 3 expositions indépendantes. Après vérification de la normalité et de l'homoscédasticité des variances, le test t de Student a été effectué pour chaque type d'expérience.
A) L'exposition des cellules A375 n'entraîne pas de variation significative du niveau d'expression de BiP et ORP150, quels que soient les temps d'exposition.
B) Le traitement à la TG 1 µM pendant 16 heures provoque un stress réticulaire, lequel se traduit par une induction significative (*=0,01 et *=0,01) des niveaux d'expression des ARNm des chaperons BiP et ORP150.

Encore une fois, nous observons que les ondes MM à 1,15 mW/cm² n'induisent pas les niveaux d'expression des deux chaperons étudiés, quelle que soit la durée d'exposition. L'étude préliminaire démontre que les cellules A375 traitées pendant 16h à la TG présentent

une très forte induction de deux chaperons du réticulum. Cette induction est par ailleurs beaucoup plus marquée que celle observée dans les cellules HaCaT **(figure 40B)**, ce qui fait que ces cellules constituent, tout comme les cellules U-251 MG, un modèle d'étude intéressant du stress RE.

Les travaux menés dans deux lignées différentes de la peau montrent que, pour nos conditions expérimentales, les ondes MM à différentes DSP ne provoquent pas, quelle que soit la durée, de perturbation de l'homéostasie du RE pouvant mener à un stress réticulaire. Toutefois, si ces ondes ne sont pas capables de déclencher directement des phénomènes biologiques, elles pourraient cependant posséder un rôle potentialisateur. Au quotidien et en conjugaison avec d'autres sources potentielles de stress, elles pourraient accélérer ou ralentir les phénomènes de stress. Nous avons décidé d'étudier ce phénomène. Il s'agit, à notre connaissance, du premier travail portant sur les effets combinatoires entre les ondes MM et le stress réticulaire.

C. Effets combinatoires entre les ondes millimétriques et le stress réticulaire

Initialement, nos premières expériences furent réalisées sur les cellules de la lignée gliale humaine U-251 MG. Les expositions ont été réalisées à 60,4 GHz, à une DSP de 0,14 mW/cm² (ancien système d'exposition). Ces expériences ont ensuite été reprises, après l'acquisition du nouveau générateur, mais le modèle cellulaire a été changé, puisque nous avons utilisé les cellules de la lignée épithéliale humaine HaCaT. Dans un futur proche, nous envisageons de réaliser des expositions de cellules A375 mais aussi de recommencer, à une DSP plus importante, les travaux intialement menés sur les cellules U-251 MG.

Le but de ce travail consiste à déterminer, à travers l'étude de l'activité transcriptionnelle du promoteur de BiP, si les ondes MM peuvent, en interaction avec un traitement à la TG, molécule inductrice du stress réticulaire, accélérer et/ou ralentir l'apparition du stress réticulaire.

- **Effets combinatoires dans les cellules U-251 MG**

Les cellules U-251 MG ont été transfectées avec le promoteur du plasmide BiP. Ce promoteur est extrêmement sensible à un stress réticulaire puisque nous avons déjà caractérisé son niveau de réponse, en traitant les cellules à différentes doses de TG (voir Chapitre I). Les

cellules ont été traitées à différentes doses de TG (0 ; 0,5 ; 1 ; 2,5 ; 5 ; 20 nM) et exposées ou non à 60,4 GHz à une DSP de 0,14 mW/cm² pendant 16h. Les résultats correspondent à la moyenne ± erreur standard[1] de quatre ou de six expériences indépendantes (quatre sham et six expositions) et sont présentés dans la **figure 41.**

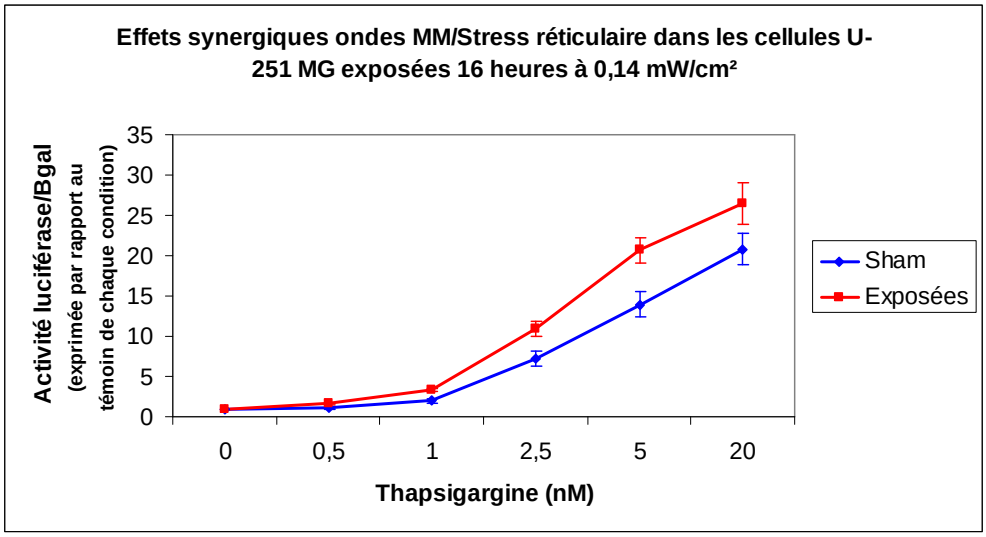

Figure 41 : Effets synergiques ondes MM/Stress réticulaire dans les cellules U-251 MG
Les cellules ont été exposées 16 heures aux ondes MM de 60,4 GHz, à une DSP de 0,14 mW/cm². Les résultats correspondent à la moyenne ± erreur standard de 4 ou 6 expériences indépendantes (4 sham et 6 expositions). Après avoir vérifié que les données suivaient une loi normale, ainsi que l'homoscedasticité de leurs variances, nous avons réalisé un modèle linéaire général (en raison d'un déséquilibre des effectifs), afin de comparer les niveaux d'activité transcriptionnelle des cellules exposées par rapport à celles qui ne l'étaient pas. Le décalage observé au niveau de l'induction de l'activité transcriptionnelle est significatif uniquement à la dose de 5 nM (p=0,006).

Il existe une légère différence d'activité transcriptionnelle entre les cellules traitées exposées et les cellules traitées non exposées. Cette différence est par ailleurs statistiquement significative pour la dose de 5 nM (p=0,006) et pourrait s'expliquer par la forte variabilité de réponse que le promoteur de BiP peut présenter lors d'un traitement à la TG, tout comme par le déséquilibre de notre taille d'effectif ; cette dernière étant plus importante pour les cellules traitées exposées par rapport aux cellules traitées sham.

- **Effets combinatoires dans les cellules HaCaT**

Pour en savoir plus sur cet effet potentiel, nous avons reproduit ces expériences sur les cellules de la peau (pour le moment, principalement avec les cellules HaCaT) mais à une DSP de 1,15 mW/cm². Ces cellules diffèrent de celles de la lignée U-251 MG aussi, les traitements à la TG ont été adaptés. Le même protocole expérimental a été suivi pour ces cellules, à savoir

[1] L'erreur standard est directement proportionnelle à l'écart-type de la population et inversement proportionnelle à la racine carrée de l'effectif.

transfection avec le promoteur du chaperon BiP. Les traitements ont été effectués à différentes doses, 0 ; 2 ; 4 ; 6 ; 8 nM. Les résultats présentés sur la **figure 42** correspondent à la moyenne ± erreur standard de 5 expériences indépendantes.

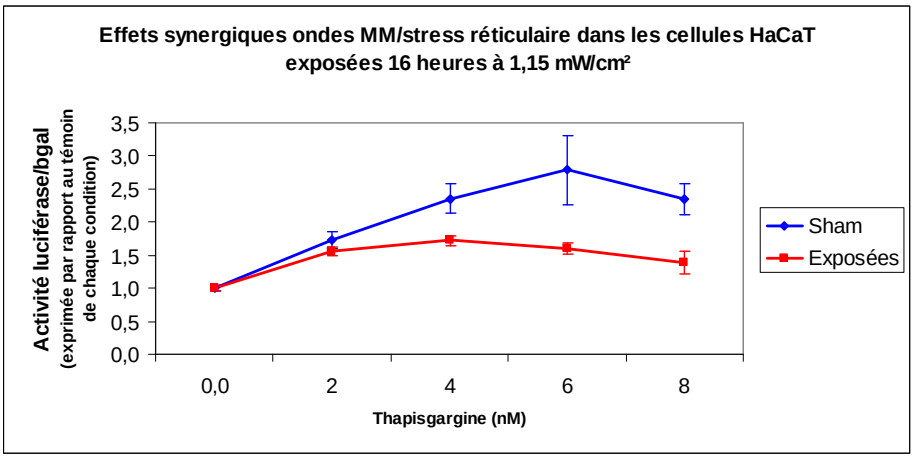

Figure 42 : Effets synergiques ondes MM/stress réticulaire dans les cellules HaCaT
Les cellules ont été exposées 16 heures aux ondes MM de 60,4 GHz, à une DSP de 1,15 mW/cm². Les résultats sont la moyenne ± erreur standard de 5 expériences indépendantes. Nos données ne suivant pas une loi normale, nous avons réalisé un test non paramétrique de Kruskal et Wallis. Le décalage observé des activités transcriptionnelles est significatif aux doses de 4 et 8 nM (respectivement p=0,007 et p=0,02).

Dans les cellules HaCaT, nous observons une différence d'activité transcriptionnelle au sein des cellules traitées exposées par rapport aux cellules traitées non exposées, qui se traduit cette fois-ci par une diminution de l'activité transcriptionnelle dans les cellules traitées exposées, contrairement à ce qui est observé avec les cellules U-251 MG. Ces résultats sont cependant à nuancer. Au cours de ces expériences, nous avons constaté que le traitement à la TG n'induisait pas aussi fortement les cellules HaCaT que ce que nous avions pu observer précédemment au laboratoire lors des expériences de mise au point expérimentale. Ce type cellulaire répond moins bien à un stress réticulaire que les cellules U-251 MG. Cette différence dans la réponse est-elle le reflet d'une spécificité propre à chaque lignée, à savoir au niveau de leur sensibilité au stress ? Des expériences complémentaires vont donc être réalisées prochainement au laboratoire afin d'étudier en détail les effets combinés des ondes MM et du stress RE sur les cellules. Ces derniers semblent constituer une piste très prometteuse. Pour tenter de comprendre plus en détails les mécanismes impliqués, nous allons mener en parallèle une étude sur trois modèles différents, avec les cellules U-251 MG et les cellules A375 qui répondent bien au stress réticulaire et les cellules HaCaT qui sont moins sensibles. Ces deux dernières sont issues de la peau, première cible des ondes MM. Au cours de ces futures expérimentations nous envisageons également de déterminer le rôle précis que la puissance peut jouer dans l'effet combiné, puisque les études préliminaires suggèrent

l'existence d'une induction du stress RE (à une faible DSP) dans les cellules U-251 MG, tandis que les travaux menés dans les cellules HaCaT (à une DSP plus importante) démontrent l'existence d'une répression. Ces futures expérimentations permettront en outre de démontrer ou non l'existence d'une variabilité en fonction des modèles cellulaires employés.

Chapitre III : Ondes millimétriques et réponse inflammatoire

Dans la continuité de l'étude du stress réticulaire, nous nous sommes par la suite intéressés à la modification de l'expression des messagers de protéines sécrétées, des études démontrant l'influence des ondes MM, plus particulièrement chez les cellules spécifiquement impliquées dans les réponses immunitaires et inflammatoires.

III.1 Etude des gènes de l'inflammation

L'ensemble des protéines sécrétées au sein d'une cellule transitera obligatoirement par le RE, où elles acquerront leur conformation finale. Pour ce faire, les cellules sécrétrices professionnelles s'adapteront à cette charge transitoire en protéines, en « déclenchant » alors une réponse UPR adaptée. Lors de nos précédentes expériences, nous avons montré que l'exposition aux ondes MM, n'induisait pas la mise en place d'une réponse UPR globale au sein des cellules et que les ondes n'étaient pas capables de perturber par exemple en bloquant la maturation ou la sécrétion, des protéines telle que la SEAP (voir chapitre I). Ce résultat reste cependant très difficile à généraliser pour l'ensemble des protéines du RE et de la voie sécrétoire. En se basant sur les données bibliographiques existantes, il semblerait que les ondes MM puissent moduler la synthèse et/ou la sécrétion de certaines catégories de protéines, notamment celles impliquées dans la réponse immunitaire ou inflammatoire. Ces effets, observés sur différents types de modèles expérimentaux (homme ou animal entier) pourraient ainsi offrir une explication scientifique à ceux constatés chez des patients exposés (en guise de thérapie) à des ondes MM, en complément ou non d'un traitement « classique ». Parmi les effets souvent recensés au niveau de la bibliographie, on retrouve fréquemment l'action anti-inflammatoire, l'aide à la cicatrisation, ainsi qu'une modulation du système immunitaire [47, 63, 64, 65]. Un point commun à ces effets réside dans l'intervention de molécules directement impliquées dans la régulation du système immunitaire. L'une des hypothèses actuellement formulées repose sur un mécanisme, appelé réponse systémique, organisée en plusieurs phases. L'exposition d'une partie du corps du patient aux ondes MM provoquerait la stimulation des extrémités nerveuses libres présentes au niveau de la peau, qui induirait la synthèse des opioïdes endogènes au niveau du cerveau. En réponse à cette synthèse, il y aurait une sécrétion de molécules impliquées dans la réponse immunitaire ou inflammatoire. Cette hypothèse n'a pas été confirmée à ce jour [59]. Une autre hypothèse évoque la possibilité selon laquelle les cellules pourraient modifier directement leurs propres caractéristiques fonctionnelles en réponse aux ondes MM [61]. Il a ainsi été démontré que des

cellules de la lignée épithéliale HaCaT étaient capables de synthétiser de l'IL-1β, médiatrice importante de la réponse inflammatoire, après exposition à des ondes MM [62].

Parmi les molécules sécrétées pouvant induire la mise en place de mécanismes de réponse, on retrouve notamment les cytokines. Celles-ci peuvent en effet moduler la réponse immunitaire en cas de problème (infection virale, bactérienne) et la production de ces molécules n'est pas l'apanage de cellules spécialisées du système immunitaire (tels que les macrophages, les granulocytes par exemple), puisque des cellules épithéliales, dont celles de la peau, peuvent aussi les sécréter.

Dans l'organisme, une réponse inflammatoire se produit en réaction à une agression (infection ou une blessure) et a pour but de protéger l'organisme contre celle-ci. Pour ce faire, il y a, via des signaux spécifiques, une induction d'une catégorie de molécules (appartenant à la famille des cytokines), appelées chimiokines, qui jouent un rôle extrêmement important dans la réponse inflammatoire. Elles régulent en effet le trafic de cellules inflammatoires et immunitaires vers les organes cibles, par un phénomène de migration des cellules spécialisées vers le lieu de l'infection par exemple. Les chimiokines exercent ainsi des fonctions de communication inter-cellulaire et possèdent des propriétés chimio-attractantes. Elles peuvent cependant aussi réguler la prolifération cellulaire, l'apoptose et l'angiogénèse. Un dérèglement de celles-ci (lors d'une réponse inflammatoire inappropriée ou excessive ou chronique) peut être la cause, à long terme, de l'apparition de tumeurs [150, 151].

La littérature évoque de nombreux effets de ces ondes MM sur la réponse inflammatoire [62, 63, 64], obtenus sur différents modèles (animaux ou culture de cellules), après exposition à des fréquences et des puissances dites thérapeutiques (voir introduction). Au cours de nos travaux, nous avons voulu déterminer si les ondes utilisées dans les futurs systèmes de télécommunications, à une fréquence proche de celle utilisée en thérapie mais à une puissance plus faible, pouvaient ou non avoir un impact sur l'expression des messagers de ces molécules impliquées dans la réponse inflammatoire.

Nous avons donc étudié, par la technique de PCR en temps réel, les niveaux d'expression de différentes chimiokines, CXCL1, CCL2, CXCL8, des travaux précédents ayant montré que les deux premières étaient induites après une exposition à 35 GHz [152]. CCL2 (chemokine (c-c motif) ligand 2), aussi appelée MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein 1), joue un rôle chimioattractif avec les macrophages et les basophiles mais pas avec les neutrophiles et les éosinophiles. Cette molécule est par ailleurs impliquée dans de nombreuses pathologies, telles que l'athérosclérose, l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis [153].

CXCL1 (chemokine (c-x-c motif) ligand 1), aussi appelée : Growth-related oncogene-α (GRO-α), est sécrétée entre autre par les cellules épithéliales. Elle possède un pouvoir chimioattractant pour les neutrophiles et les monocytes et joue aussi un rôle majeur dans l'angiogénèse, la tumorigénèse et la réparation des blessures [154]. CXCL8 (chemokine (c-x-c motif) ligand 8), est synthétisée par un nombre variable de cellules, dont les cellules épithéliales, les macrophages, les neutrophiles ou lors de stimulations avec différents agents. Cette molécule est un chimioattractant potentiel des neutrophiles [155].

Le messager d'une autre protéine sécrétée n'appartenant pas à la famille des cytokines a aussi été étudié. Il s'agit de TIMP-1 (Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase 1), protéine inhibitrice naturelle des protéases de la matrice extracellulaire, qui peut être libérée en cas de modification des conditions environnementales. Le messager d'un autre gène, c-Jun, un des constituants du facteur de transcription AP-1, dont l'activité peut-être induite par les cytokines a aussi été étudié. Ce facteur de transcription est impliqué dans la destinée de la cellule mais peut aussi être impliqué dans la tumorigénèse [156, 157]. Ces deux messagers nous serviront de contrôle, puisque par le passé, des travaux portant sur l'exposition d'animaux à des ondes MM de très fortes puissances (produisant des effets thermiques) ont permis de mettre en évidence l'induction des niveaux d'expression de ces deux gènes [152]. Enfin, afin de contrôler l'absence d'effet thermique, les niveaux d'expression des ARNm de HSP27 et HSP70, protéines chaperons du cytoplasme, inductibles (entre autre) par choc thermique, ont aussi été étudiés. Ces deux chaperons sont les archétypes de la réponse au choc thermique dans les cellules, qui sont capables de supporter des variations de température. Ces protéines servent à protéger la cellule en cas de variation brutale des conditions environnementales. L'emploi de ces marqueurs lors des expériences décrites dans la prochaine partie a pour but d'écarter un effet aigu (choc thermique important), directement lié à nos conditions d'exposition. Un effet aigu nécessite en effet la mise en place d'une réponse biologique. Il est cependant indispensable de garder à l'esprit que ces marqueurs ne possèdent pas de sensibilité suffisante pour permettre de détecter de faibles variations de température (de l'ordre de quelques dixièmes de degré).

A. Résultats

- **Exposition de cellules HaCaT à deux densités de puissance**

Les cellules de la lignée épithéliale HaCaT ont été exposées pendant 24h à deux DSP, respectivement 0,75 et 1,15 mW/cm². Nous avons étudié, par la technique de RT-PCR en temps

réel, les niveaux d'expression de CCL2, CXCL1 et CXCL8 **(figure 43A)**. En parallèle, nous avons étudié les niveaux de réponse de ces gènes en présence d'un signal pro-inflammatoire, à la suite du traitement des cellules HaCaT à l'IL-1β (R&Dsystems), **(figure 43B)**. Enfin, comme contrôle, nous avons étudié les niveaux de réponse de TIMP-1 et c-Jun et de HSP70 (afin d'exclure tout effet thermique) **(figure 43C)**. Les résultats représentés dans chacune de ces figures correspondent à la moyenne ± écart-type de trois expériences indépendantes.

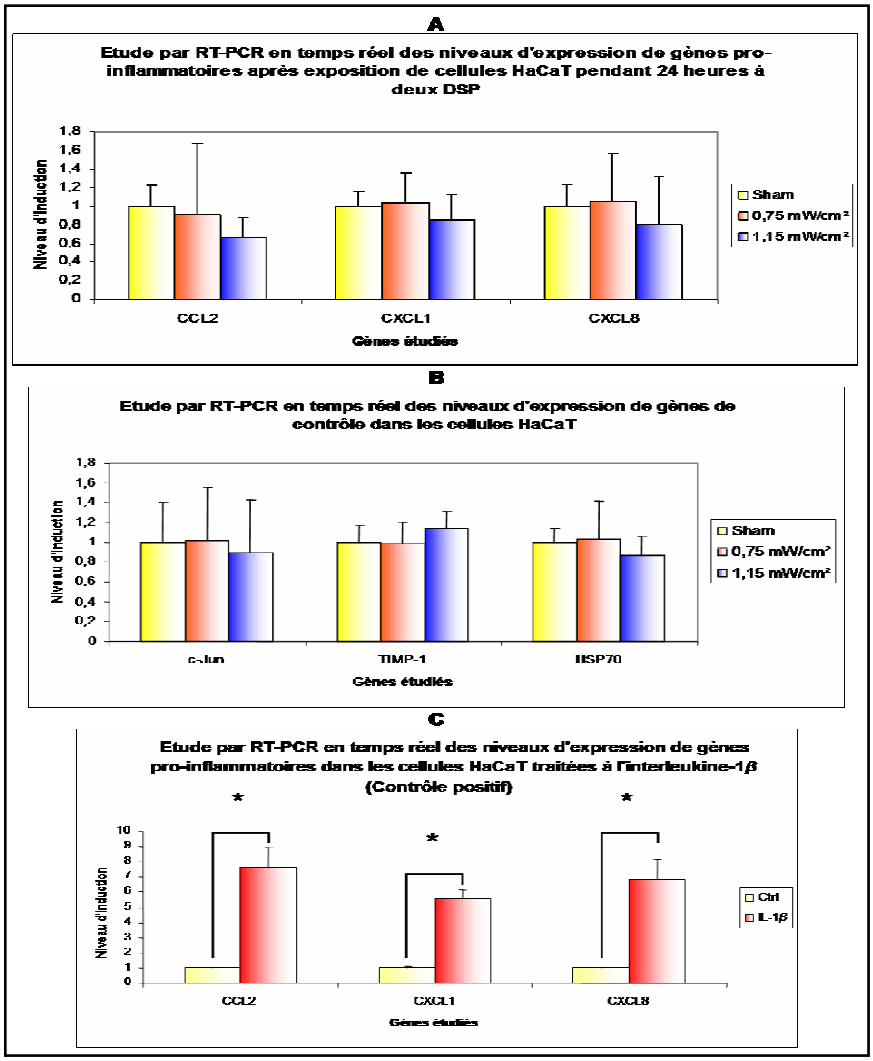

Figure 43 : Étude par RT-PCR en temps réel des niveaux d'expression de trois gènes pro-inflammatoires (A) ou de gènes de contrôle (B), après exposition de cellules HaCaT pendant 24 heures à deux DSP. En parallèle, les niveaux d'expression des trois gènes pro-inflammatoires ont été étudiés après traitement des cellules à l'IL-1β (C)

Pour chaque exposition, les résultats correspondent à la moyenne ± écart-type de 3 expériences indépendantes. Les résultats sont exprimés par rapport au niveau de trois gènes de référence, GAPDH, TBP, HPRT1. Ils sont représentés en niveau d'induction par rapport au sham, dont la valeur est fixée arbitrairement à 1. Après vérification de la normalité des données et de l'homoscédasticité des variances, le test t de Student a été effectué pour chaque type d'expérience.

A) L'exposition pendant 24 heures des cellules HaCaT n'entraîne pas de variation significative du niveau d'expression de CCL2, CXCL1, CXCL8.

B) L'expression des gènes de contrôle C-jun, TIMP-1 et HSP70 ne varie pas après 24 heures d'exposition, quelle que soit la DSP employée.

C) Le traitement des cellules à l'IL-1β induit significativement CCL2, CXCL1, CXCL8 (*=0,013 ; 0,017 et 0,005 respectivement).

Le contrôle positif démontre qu'en présence d'un signal pro-inflammatoire (traitement des cellules à l'IL-1β), une induction importante des niveaux d'expression des gènes CCL2, CXCL1 et CXCL8 se produit **(figure 43C)**, ce qui laisse penser que les cellules HaCaT répondent bien à ce type de signal. L'exposition des cellules HaCaT à deux DSP différentes pendant 24h n'induit pas de modification de l'expression des gènes CCL2, CXCL1 et CXCL8. Il n'y a pas non plus de variation des niveaux d'expression des gènes c-Jun et TIMP-1, pourtant connus pour être sensibles aux ondes MM [152]. Enfin, HSP70 ne varie pas non plus **(figure 43B)**. L'exposition des cellules HaCaT pendant 24h autour de la norme d'exposition grand public n'entraîne donc pas de modulation de l'expression de facteurs de sécrétion impliqués dans la réponse inflammatoire.

Les cytokines sont toutefois sécrétées très rapidement au cours de la réponse inflammatoire, puisqu'elles possèdent des propriétés chimiotactiques pour attirer le plus rapidement possible les cellules concernées. Aussi, en étudiant les niveaux des messagers après 24h d'exposition nous risquons éventuellement de dépasser le moment de cette réponse. L'étude de l'effet potentiel de ces ondes à des temps plus courts pourrait offrir la possibilité de mettre en évidence une éventuelle modulation de la transcription des messagers de ces protéines. Toujours dans cette lignée cellulaire, les niveaux d'ARNm de CCL2, CXCL1 et CXCL8 ont de nouveaux été quantifiés (par la technique de RT-PCR en temps réel) après exposition des cellules à une DSP de 1,15 mW/cm², pendant 1h, et 6h. Ces résultats sont comparés à ceux obtenus précédemment qui sont, pour l'occasion ajoutés sur la **figure 44**. En parallèle les niveaux d'expression de c-Jun, TIMP-1, HSP27 et HSP70 ont aussi été quantifiés. Les résultats présentés dans la **figure 44** correspondent à la moyenne ± écart type de trois expériences indépendantes.

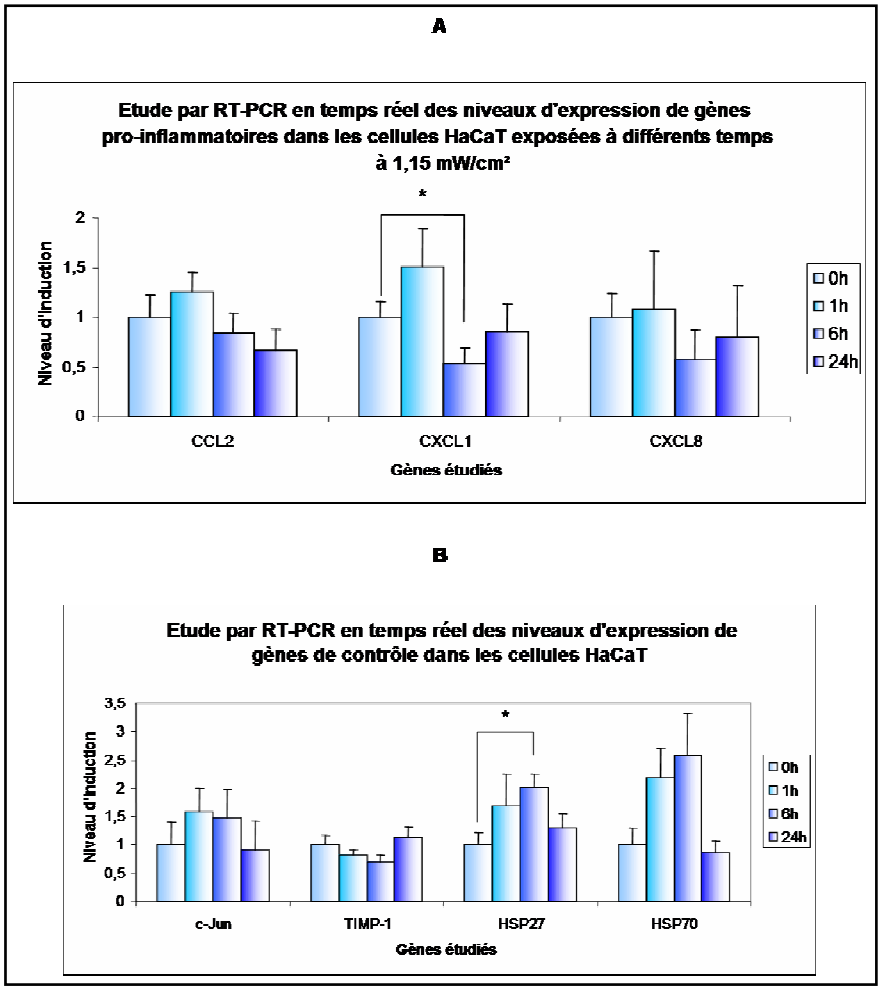

Figure 44 : Etude par RT-PCR en temps réel des niveaux d'expression de gènes pro-inflammatoires (A) et de contrôle (B) après exposition de cellules HaCaT à 60,4 GHz à une DSP de 1,15 mW/cm² pendant des durées différentes

Pour chaque exposition, les résultats correspondent à la moyenne ± écart-type de 3 expériences indépendantes. Après vérification de la normalité des données et de l'homoscédasticité des variances, le test t de Student a été effectué pour chaque type d'expérience.

A) La répression de CXCL1 est statistiquement significative (*=0,05) après 6 heures d'exposition.

B) HSP27 présente une induction significative (*=0,016) après 6 heures d'exposition.

L'exposition des cellules HaCaT à différents temps permet de mettre en évidence un léger phénomène de répression du niveau d'expression de l'ARNm d'un gène pro-inflammatoire, CXCL1, après 6h d'exposition. CXCL8 semble aussi être réprimé, mais cette diminution n'est pas statistiquement significative. Ce phénomène n'est pas observé après 1h ou 24h d'exposition. Une étude en parallèle de nos gènes de contrôle démontre l'absence d'induction des gènes c-Jun et TIMP-1, sensés être sensibles aux ondes MM. Par contre, il existe une induction significative du niveau d'expression de l'ARNm de HSP27. Une hausse du messager de HSP70 est par ailleurs aussi observée, bien que celle-ci ne soit cependant pas statistiquement significative. Les hausses de nos deux gènes rapporteurs de stress thermique sont marquées après 1h et 6h d'expositions. Après 24h d'exposition, la situation semble être

revenue à la normale. Il se pourrait donc que nos conditions d'exposition soient susceptibles (à une DSP de 1,15 mW/cm²) de produire un début d'effet thermique. Cet effet peut-il être responsable de la baisse du niveau d'expression de l'ARNm de certaines chimiokines, telle que CXCL1 par exemple ? Lors de travaux préliminaires, pour caractériser les cellules HaCaT, nous avions réalisé une comparaison des niveaux d'expression génique de HSP70 mais aussi de CCL2 et CXCL8, dans des cellules soumises à un choc thermique (43°C) à deux durées différentes, soit 1h, soit 24h **(figure 45)**.

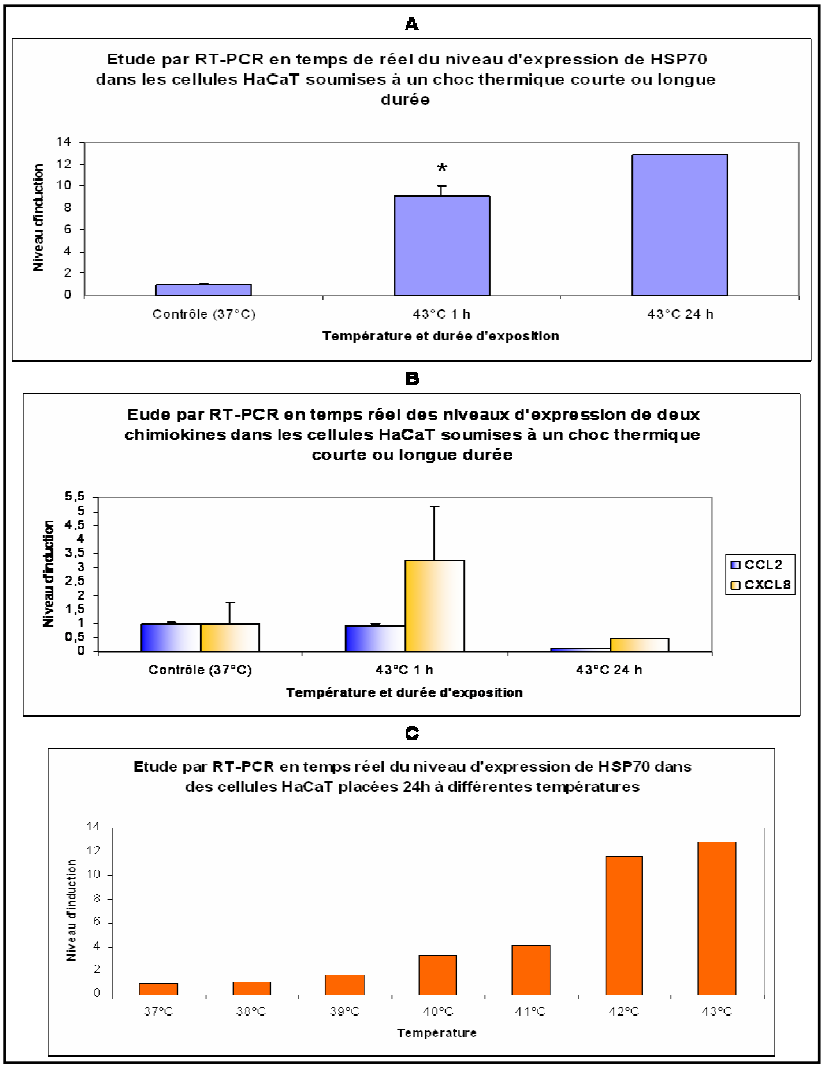

Figure 45 : Etude par RT-PCR en temps réel des niveaux d'expression de HSP70 (A, C) et de deux chimiokines, CCL2 et CXCL8 (B), dans des cellules HaCaT soumises à un choc thermique (43°C) de courte durée (1h) ou de longue durée (24h) ou à une augmentation progressive de la température
Pour les expositions de courte durée, les résultats correspondent à la moyenne +/- écart-type de trois expériences indépendantes. Un test t de Student fut réalisé, après avoir vérifié la normalité des données et l'homoscedasticité des variances. Les données obtenues pour 24 heures sont issues d'une seule expérience.
A) L'exposition 1 heure à 43°C induit significativement HSP70 dans les cellules HaCaT (*=0,004).
B) Une tendance à la hausse est observée pour CXCL8 (non significative statistiquement parlant). Après 24 heures d'exposition, les niveaux d'expression de CCL2 et CXCL8 baissent très fortement.
C) L'exposition à 40°C pendant 24 heures marque le début de l'induction de HSP70 dans les cellules HaCaT.

Pour le choc thermique de courte durée, 3 expériences indépendantes furent menées. Concernant le choc thermique longue durée, en raison du caractère purement exploratoire, une seule expérience fut menée. En accord avec la bibliographie, les résultats représentés dans la figure montrent qu'un choc thermique entraîne une induction des niveaux de messager de HSP70 et que cette induction commence réellement lorsque la température d'exposition atteint 40°C **(figure 45C)**. Concernant les chimiokines, il existe une tendance à l'induction des niveaux de messager de CXCL8 après un choc thermique court de 1h. Par contre, il semblerait que les niveaux d'expression des chimiokines s'effondrent après 24h à 43°C **(figure 45B)**. Ces données restent néanmoins à confirmer mais elles vont dans le sens d'un effet thermique produit par nos conditions d'exposition à la DSP de 1,15 mW/cm². Quoiqu'il en soit, des expériences complémentaires restent à mener, notamment avec la caméra IR, qui nous permettra précisément de mesurer l'éventuelle existence de phénomènes locaux d'augmentation de température.

Enfin, il n'est pas exclu que le phénomène observé soit directement lié au type cellulaire que nous utilisons. Des travaux menés dans le domaine des RF ont déjà évoqué l'existence d'une variabilité au niveau des réponses biologiques, entre les lignées cellulaires utilisées [158]. Aussi, afin d'approfondir nos recherches et d'écarter le risque de biais, nous avons réalisé la même expérience sur les cellules de la lignée mélanocytaire A375, selon le même protocole **(figure 46)**.

- **Exposition de cellules A375 à différents temps à 1,15 mW/cm²**

Le traitement des cellules A375 à l'aide d'une substance pro-inflammatoire induit significativement CCL2 et provoque une élévation des niveaux d'expression de CXCL1 et de CXCL8, même si ces dernières ne sont pas statistiquement significatives **(figure 46C)**. Ces cellules répondent donc à un signal pro-inflammatoire mais de manière moins importante que ce qui est observé dans les cellules HaCaT. L'exposition des cellules A375 aux ondes MM, à une DSP de 1,15 mW/cm² entraîne une diminution statistiquement significative des niveaux d'expression des chimiokines après 24h d'exposition **(figure 46A)**. Cependant, une hausse sensible des niveaux d'expression des gènes sensibles au choc thermique est observée dès 1h d'exposition pour les gènes HSP27 et HSP70. Elle se poursuit après 6h et semble même se maintenir, tout du moins pour HSP70, après 24h. En parallèle, les gènes c-Jun et TIMP-1, déjà décrits pour leur sensibilité aux ondes MM, ne subissent pas de modification de leur niveau d'expression (**figure 46B**).

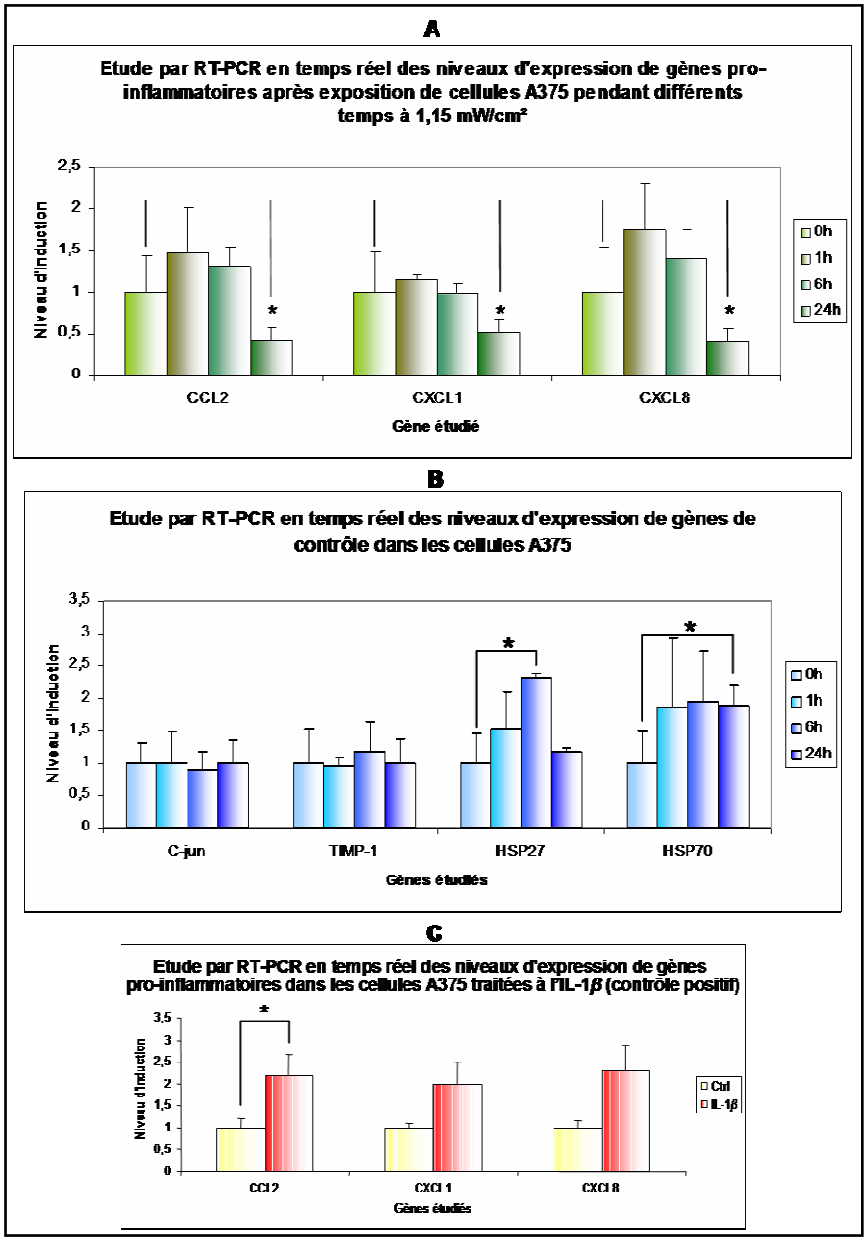

Figure 46 : Etude par RT-PCR en temps réel des niveaux d'expression de gènes pro-inflammatoires (A) et de contrôle (B) après exposition de cellules A375 à 60,4 GHz à une DSP de 1,15 mW/cm² pendant des durées différentes. En parallèle, les niveaux d'expression des trois gènes ont été étudiés après traitement à l'IL-1*β* (C)

Pour chaque exposition, les résultats correspondent à la moyenne ± écart-type de 3 expériences indépendantes. Après vérification de la normalité des données et de l'homoscédasticité des variances, le test t de Student a été effectué pour chaque type d'expérience.

A) L'exposition pendant 24 heures induit une répression significative des niveaux d'expression des trois gènes pro-inflammatoires (*=0,024 ; 0,028 ; 0,031).

B) HSP27 est induit significativement après 6 heures d'exposition (*=0,001) et HSP70 est significativement induit après 24 heures d'exposition (*=0,03)

C) Le traitement des cellules à l'IL-1*β* induit seulement CCL2 significativement (*=0,049).

B. Discussion

Au sein des deux lignées cellulaires exposées, le même phénomène de répression de l'expression des gènes de chimiokines est observé, même s'il ne se produit pas à des temps

similaires ; ce décalage peut cependant être expliqué par la variabilité intrinsèque propre à chacune des lignées cellulaires. Cette étude a aussi démontré l'existence d'une modification de l'expression des gènes liés à la réponse au choc thermique dans les deux lignées. Nos expositions à la DSP de 1,15 mW/cm² pourraient donc être susceptibles de générer un effet thermique léger et la diminution des niveaux d'expression des chimiokines pourrait être liée à une augmentation de température. Des travaux de caractérisation de la lignée cellulaire HaCaT, soumise à un choc thermique (43°C) pendant de courtes ou de longues durées ont permis de mettre en évidence une régulation complexe et notamment un phénomène possible de répression des niveaux d'expression des chimiokines. Au vu de l'ensemble de ces données, nous ne pouvons donc pas exclure, pour le moment, que l'exposition aux ondes MM à une DSP de 1,15 mW/cm² génère une variation locale de la température. Celle-ci pourrait être relativement élevée en certaines zones du puits de culture, notamment au niveau du tapis cellulaire par exemple, sans qu'il n'y ait forcément de transfert au reste du milieu, rendant ce phénomène non mesurable (concrètement) par les outils dont nous disposons actuellement. Cette augmentation pourrait se traduire par une diminution de l'expression des messagers de chimiokines. À ce titre, et pour lever toute ambiguïté possible, une caractérisation précise des paramètres d'exposition devra être obtenue, notamment au niveau des élévations locales de température, par des mesures réalisées dans ces mêmes conditions d'exposition (DSP de 1,15 mW/cm²), à l'aide d'une caméra thermique IR.

La diminution des niveaux d'expression pourrait aussi être un phénomène directement dépendant de la puissance. Nous allons donc devoir envisager des expositions à une puissance moindre (par exemple 0,75 mW/cm²) et à des temps différents dans les deux lignées cellulaires. Enfin, il faut garder à l'esprit que la répression d'un gène n'est pas forcément associée à une diminution de la quantité de protéines. Concernant nos conditions expérimentales, nous ne pouvons affirmer que notre diminution des niveaux d'expression de messagers de chimiokines se traduise aussi par une diminution de la sécrétion des protéines. Nous allons donc doser les niveaux protéiques de ces chimiokines par la méthode ELISA (« enzyme-linked immunosorbent assay », tant au niveau cellulaire, qu'au niveau du milieu de culture.

Ces futurs travaux nous permettront alors de conclure le travail entrepris, dans le but de réaliser prochainement une publication.

Chapitre IV : Criblage des gènes cibles des ondes millimétriques

IV.1 Criblage des gènes cibles des ondes millimétriques

A. Introduction

Nous avons mené une approche à haut débit portant sur la détermination de gènes cibles potentiels à l'échelle du génome entier. Cette approche, réalisée dans le domaine des interactions ondes électromagnétiques/êtres vivants, devrait permettre de déterminer des effets biologiques nouveaux.

Il existe plusieurs techniques disponibles pour réaliser un criblage à haut débit. Ces approches sont réalisées dans le domaine génomique ou protéomique et il arrive même qu'elles soient parfois couplées [159, 160]. Les méthodes basées sur la technique de puces à ADN présentent une grande sensibilité et permettent de réaliser un crible large, voire exhaustif du transcriptome (étude de l'expression des gènes). Cette technique permet en outre d'identifier précisément les gènes différentiellement exprimés. En regard des difficultés inhérentes aux variations d'expression génétique, combinées aux techniques d'hybridation, il est préférable de répéter une expérience plusieurs fois et d'analyser ensuite la moyenne d'expression différentielle entre les deux conditions. Les résultats seront alors plus robustes, les moyennes souffrant de moins de variabilité que les expressions individuelles, et il sera alors possible de déterminer si un gène est ou n'est pas différentiellement exprimé en utilisant les tests statistiques. La bibliographie portant sur l'utilisation de cette technique (criblages de gènes cibles potentiels), dans le cadre du bioélectromagnétisme démontre l'existence d'une quinzaine d'études, comprises sur une période s'étalant de 1999 à 2009. Sans surprise, celles portant sur les effets des signaux RF sont majoritaires, puisqu'une seule étude porte sur les ondes MM [152]. Dans le **tableau 8** sont résumées les différentes expériences menées à l'aide de techniques à haut débit (représentées majoritairement par l'emploi de puces à ADN), les modèles expérimentaux utilisés, ainsi que les caractéristiques d'expositions. Ce tableau regroupe les fréquences utilisées en plusieurs catégories : 847-900 MHz ; 1800-1900 MHz ; 2,1425-2,45 GHz et 35 GHz et a pour but d'illustrer la variabilité de modèles expérimentaux utilisés : animaux entiers, le plus souvent des rats ou des souris, cultures de cellules animales ou humaines [152, 158, 160-171]. Dans la plupart des études, le choix du modèle d'étude est justifié par une caractérisation menée antérieurement [164, 165], ou par l'origine des cellules telles que celles du cerveau par exemple, cibles potentielles des RF [166] ou a pour but de comparer les niveaux de réponse de différents types de cellules [161]. Cette variabilité se poursuit avec le choix des paramètres d'exposition, fréquences employées, durées d'expositions, DAS, etc…

Auteurs et année de publication	Modèle expérimental utilisé	Exposition		
		Fréquence	SAR ou DSP	Durée
Whitehead *et al.*, 2006 [171]	Cellules de souris C3H 10T1/2	847,74 MHz	5 W/kg	24 heures
	Cellules de souris C3H 10T1/2	853,62 MHz	5 W/kg	24 heures
Harvey, French, 1999 [166]	Lignée cellulaire humaine HMC-1 issue de mastocytes	864,3 MHz	7,3 W/kg	3 expos de 20 min/7 jours
Gurisik *et al.*, 2006 [162]	Lignée cellulaire humaine SK-N-SH issue d'un neuroblastome	900 MHz	0,2 W/kg	2 heures, suivie de 2 heures de récupération
Remondini *et al.*, 2006 [158]	Cellules de lymphoblastome humain U937	900 MHz	2 W/kg	1 heure
	Cellules de microglie humaine CHME5	900 MHz	2 W/kg	1 heure
	Lignée cellulaire humaine EA.hy926 issue d'un endothélium	900 MHz	1,8-2,5 W/kg	1 heure
Nylund and Leszczynski, 2006 [160]	Lignée cellulaire humaine endothéliale EA.hy926v.1	900 MHz	2,8 W/kg	1 heure
	Lignée cellulaire humaine endothéliale EA.hy926v.1	900 MHz	2,8 W/kg	1 heure
Belyaev *et al.*, 2006 [168]	Rats, puis analyse du cerveau	915 MHz,	0,4 mW/kg	2 heures
Paparini *et al.*, 2008 [164]	Souris, puis analyse du cerveau entier	1800 MHz	0,2 W/kg (dans le cerveau)	1 heure
Remondini et al., 2006 [158]	Lignée cellulaire humaine EA.hy926 issue d'un endothélium	1800 MHZ	1,8-2,5 W/kg	1 heure
	Lignée cellulaire humaine NB69 issue d'un neuroblastome	1800 MHZ	2 W/kg	5 min d'expo/10 min d'arrêt/24 heures
	Lymphocytes T humains	1800 MHZ	1,4 W/kg	10 min d'expo/20 min d'arrêt/44 heures
	Lignée cellulaire humaine HL-60 issue de cellules leucémiques	1800 MHz	1 W/kg	5 min d'expo/5min d'arrêt/24 heures
	Lignée cellulaire humaine HL-60	1800 MHZ	1,3 W/kg	24 heures
	Lignée cellulaire humaine HL-60	1800 MHZ	1,3 W/kg	5 min d'expo/5min d'arrêt/24 heures
Zhao *et al.*, 2007 [165]	Cultures de neurones issus de l'hippocampe de cerveaux de rats	1800 MHz	2 W/kg	5 min d'expo/10 min d'arrêt/24 heures
	Cultures de neurones issus de la partie corticale de cerveaux de rats	1800 MHz	2 W/kg	5 min d'expo/10 min d'arrêt/24 heures
Zhao *et al.*, 2007 [170]	Cultures primaires de neurones de souris	1900 MHz	Non mesuré	2 heures
Qutob *et al.*, 2006 [163]	Lignée cellulaire humaine U87 MG issue d'un glioblastome	1900 MHz	0,1, 1, 10 W/kg	4 heures, suivie de 2 heures de récupération
Chauhan *et al.*, 2007 [161]	Lignée cellulaire humaine U87 MG issue d'un glioblastome	1900 MHz	0,1, 1, 10 W/kg	24 heures
	Lignée cellulaire humaine MM6 issue de monocytes	1900 MHz	1, 10 W/kg	5 min d'expo/10 min d'arrêt/6 heures
	Lignée cellulaire humaine issue de monocytes MM6	1900 MHz	0,1-10 W/kg	5 min d'expo/10 min d'arrêt/6 heures, suivie de 18 heures de récupération
Hirose *et al.*, 2006 [167]	Lignée cellulaire humaine A172 issue d'un glioblastome	2,1425 GHz	80, 250 ou 800 mW/kg	24 heures ou 48 heures
	Lignée cellulaire humaine IMR-90 issue de fibroblaste	2,1425 GHz	80 mW/kg	28 heures
Lee *et al.*, 2005 [169]	Lignée cellulaire humaine HL-60	2,45 GHz	10 W/kg	2 heures ou 6 heures
Millenbaugh *et al.*, 2008 [152]	Rats, puis analyse de la peau	35 GHz	75 mW/cm²	6 heures ou 24 heures

Tableau 8 : Caractéristiques des expériences ayant déterminé des gènes cibles potentiels des ondes électromagnétiques (RF et MM) par une approche méthodologique à haut débit

Dans ce tableau, sont recensés l'auteur principal, l'année de l'étude, le type de modèle expérimental utilisé, les caractéristiques d'exposition.

Les résultats de ces expériences peuvent être très facilement classés en deux catégories : expériences qui mènent à des effets biologiques (expressions différentielles de certains gènes) et celles qui n'en n'ont pas. De même, dans les travaux où un effet possible sur la transcription génique a été démontré, le nombre de gènes différentiellement exprimés reste relativement réduit. Il est très difficile de retrouver des gènes en commun dans deux études distinctes, même si les modèles expérimentaux et/ou le type d'ondes utilisées sont proches, voire similaires.

La **figure 47** illustre par ailleurs la difficulté à trouver des biomarqueurs sensibles spécifiquement aux radiations RF.

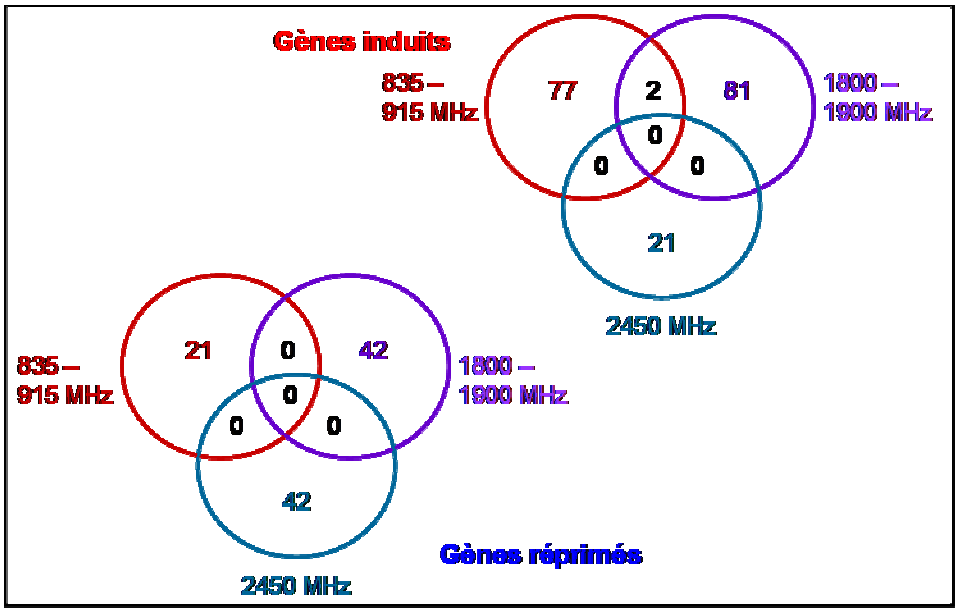

Figure 47 : Répartition des gènes différentiellement exprimés dans les études portant sur les effets des radiofréquences
Le nombre de gènes peut varier suivant la fréquence utilisée. Le regroupement démontre l'absence ou le nombre réduit de gènes communs.

Dans cette figure, les gènes différentiellement exprimés ont été regroupés en fonction des catégories de fréquences employées et des listes croisées de gènes, afin d'identifier des gènes communs aux différentes études, pouvant être considérés comme des gènes marqueurs sensibles à l'exposition aux ondes électromagnétiques. Seuls 2 gènes sont induits conjointement à 900 MHz et 1800 MHz (euk. Trans Elong Factor 1 alpha et Parathyroid Hormone-like peptide). Ceci pourrait s'expliquer par les différences multiples retrouvées au sein des protocoles expérimentaux (illustrées dans le **tableau 8**) mais aussi être le reflet du manque de biomarqueur universel, sensible aux ondes, puisqu'une perturbation de la transcription pourrait être très spécifique des types cellulaires et/ou d'ondes employés. Enfin, pour la majorité des études où l'approche transcriptomique à haut-débit détermine une

expression différentielle de gènes, l'étape de validation des résultats obtenus par la technique de PCR en temps réel est souvent fatale, en raison d'une probabilité importante de faux positifs. Une analyse par puces à ADN est en effet ponctuée de nombreuses étapes expérimentales, dont l'amplification des ARNm avant marquage. L'intensité du signal peut aussi dépendre de la qualité d'hybridation et de lavage de la puce, susceptibles d'entraîner des différences d'une piste à l'autre. Enfin, l'analyse statistique des données transcriptomiques est potentiellement source d'erreurs, au sein d'une seule étude, plusieurs hypothèses sont testées simultanément, et ainsi, certains gènes peuvent être, à tort, déterminés comme étant différentiellement exprimés. Il est donc indispensable de valider les différences d'expression obtenues par cette approche à haut débit, en utilisant des méthodes plus fiables, notamment la PCR en temps réel. Dans une revue récente, McNamee et Chauhan soulignent que la plupart des études citées dans le **tableau 8** présentent des défauts méthodologiques (absence de réplicats biologiques, conditions expérimentales peu contrôlées, etc…) [15]. Il est toutefois intéressant de souligner que celles d'entre-elles présentant un plan expérimental de qualité ne parviennent pas à démontrer d'effet important.

La seule étude menée sur les ondes MM parvient à mettre en avant des effets biologiques et apporte des précisions sur les mécanismes mis en place lorsqu'un animal est exposé à 35 GHz, à de fortes DSP (75 mW/cm²). Au cours de ce travail, les rats ont été exposés jusqu'à ce que leur température, mesurée au niveau du côlon, atteigne 41-42°C. Les échantillons de peau ont ensuite été prélevés respectivement 6h et 24h après la fin de l'exposition. L'approche par la technique de puces à ADN a permis de mettre en évidence, six heures après exposition, des modifications de gènes impliqués dans la régulation de la transcription, le repliement des protéines, le stress oxydant ainsi que le renouvellement de la matrice extracellulaire. Vingt quatre heures après l'exposition, les gènes impliqués dans la structure de la matrice extracellulaire et la sécrétion des chimiokines sont ceux dont l'expression est la plus touchée. Il faut toutefois souligner que l'expression différentielle ne peut être due à un effet électromagnétique pur, car l'exposition réalisée par les auteurs a également généré un effet thermique. Les HSP font d'ailleurs partie des gènes trouvés comme étant surexprimés. Ce travail permet néanmoins d'obtenir des indications quant à l'activité transcriptionnelle de certaines catégories de gènes, dans de conditions d'exposition à de fortes puissances [152].

Au cours de nos travaux, nous avons décidé de réaliser une approche à haut débit sur tout le génome, en travaillant sur des cultures primaires de kératinocytes humains. Il s'agira

donc, à ce jour, de la deuxième étude portant sur les effets des ondes MM, mais la première menée sur des cellules humaines à 60 GHz. Toutefois, à la différence du travail réalisé par Millenbaugh et collègues, nos expériences seront cependant menées à une DSP n'induisant pas ou peu d'effet thermique.

B. Résultats

- **Contrôle qualité de l'expérimentation**

L'analyse des données obtenues est effectuée à l'aide du logiciel GeneSpring. Celui-ci prend soin, dans un premier temps, de normaliser l'intensité de fluorescence, qui peut-être variable d'une piste à l'autre. En cela, il ramène les moyennes des intensités de fluorescence au même niveau car il est en général estimé que la majorité des gènes ne verront pas leur niveau d'expression varier d'une condition à l'autre. Ce logiciel permet en outre de comparer les niveaux des intensités de fluorescence des « spots » correspondant à un gène donné, piste par piste, sans risque de biais liés à des différences d'efficacité d'hybridation ou de lavage par exemple.

L'analyse de l'expression différentielle doit se faire uniquement sur les gènes exprimés dans la cellule. Il faut donc éviter de prendre en compte, lors de cette analyse, les gènes ne s'exprimant pas, ces derniers possédant en général une fluorescence qui correspond au bruit de fond. Les contrôles négatifs effectués sur les puces ont permis de déterminer l'intensité de fluorescence correspondante au bruit de fond, laquelle est de l'ordre de 34,9 +/- 2,4 en moyenne sur les points de contrôle négatifs. Nous avons donc considéré que nous pouvions déterminer une intensité de fluorescence supérieure à 50, comme valeur seuil correspondante à un niveau d'expression significatif par rapport au bruit de fond.

Lors d'un premier tri parmi les 41000 entités présentes sur les puces, nous avons fait le choix de retenir celles présentant une intensité de fluorescence supérieure ou égale à 50 sur au minimum deux des vingt pistes. Pour nos conditions, ceci consiste en 28711 « spots positifs » obtenus avec le scanner avant lavage et 26301 « spots » positifs après lavage à l'acétonitrile. Sur cette première série de données, nous avons réalisé, à l'aide du logiciel GeneSpring, un diagramme de dispersion (« scatter plot ») **(figure 48)** pour vérifier la qualité technique de notre expérimentation. La **figure 48**, compare l'intensité de fluorescence de deux mêmes « spots » présents sur deux lames différentes. Si l'intensité de fluorescence est au même niveau, un point est présent sur la diagonale, tandis que si l'intensité n'est pas similaire, un

décalage vers le haut ou le bas sera alors observé. Sur cette même figure, on peut par ailleurs constater que les répliquats techniques et biologiques montrent peu de variabilité, dès lors que les niveaux de fluorescence sont suffisamment élevés (les spots dont le niveau est supérieur au bruit de fond apparaissent en jaune, orange, rouge). Les conditions expérimentales sont de bonne qualité et ne devraient donc pas apporter de biais particulier lors de l'analyse.

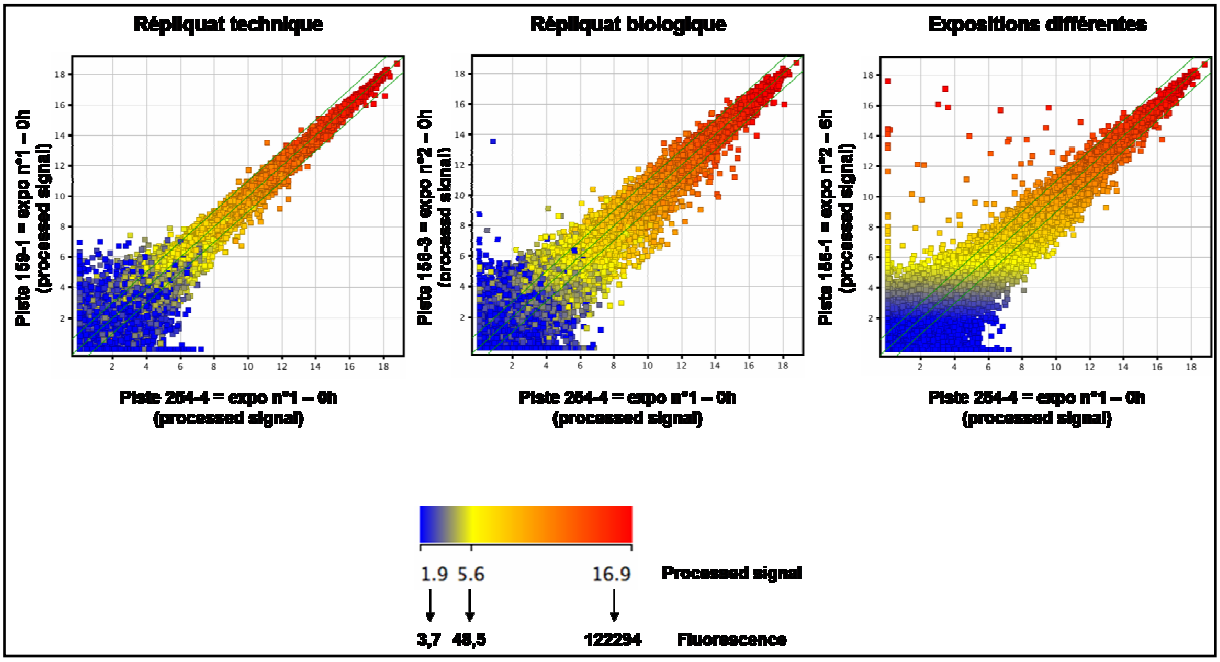

Figure 48 : Diagramme de dispersion (« Scatter plot »)
Le répliquat technique est une comparaison d'intensité de la fluorescence entre deux hybridations et préparations d'ARNc marqués issus de la même purification d'ARN.
Le répliquat biologique est une comparaison d'intensité de fluorescence entre deux échantillons d'ARN différents issus de deux expositions cellulaires indépendantes mais réalisées dans les mêmes conditions.
Le dernier exemple représente une comparaison entre deux échantillons différents de cellules exposées différentes.
L'échelle représente les intensités de fluorescence.

- **Analyse sans filtre de correction**

Plusieurs types d'analyses ont été effectuées, notamment en étudiant les conditions d'exposition (0h vs 1h ; 0h vs 6h ou 0h vs 24h). Une comparaison a par ailleurs été réalisée avant et après lavage. Les gènes retrouvés comme différentiellement exprimés dans les deux cas ont alors été retenus. À l'aide du logiciel Genespring, nous avons déterminé les gènes différentiellement exprimés en réalisant pour cela un « Volcano Plot » **(figure 49)**. Le « Volcano Plot » est une représentation graphique obtenue pour la comparaison de deux conditions, à partir de la variation du niveau d'expression d'un gène (« fold change ») en fonction de sa significativité statistique (« pvalue »). Dans notre analyse, nous avons choisi les seuils de sélection suivants : les gènes considérés comme différentiellement exprimés présentent une variation du niveau d'expression (« fold change ») supérieure à 2 (en valeur

absolue) et une significativité statistique (« pvalue ») inférieure à 0,05. Le choix d'un seuil statistique bas (< 0,05), combiné à une différence d'expression supérieure à 2 garantit une bonne fiabilité de nos résultats et offre la possibilité de pouvoir confirmer ces résultats par une autre analyse quantitative. Notre expérience en matière d'expression génique nous permet en effet de penser qu'il sera très difficile de le faire pour des gènes présentant des variations d'expression inférieures à 2.

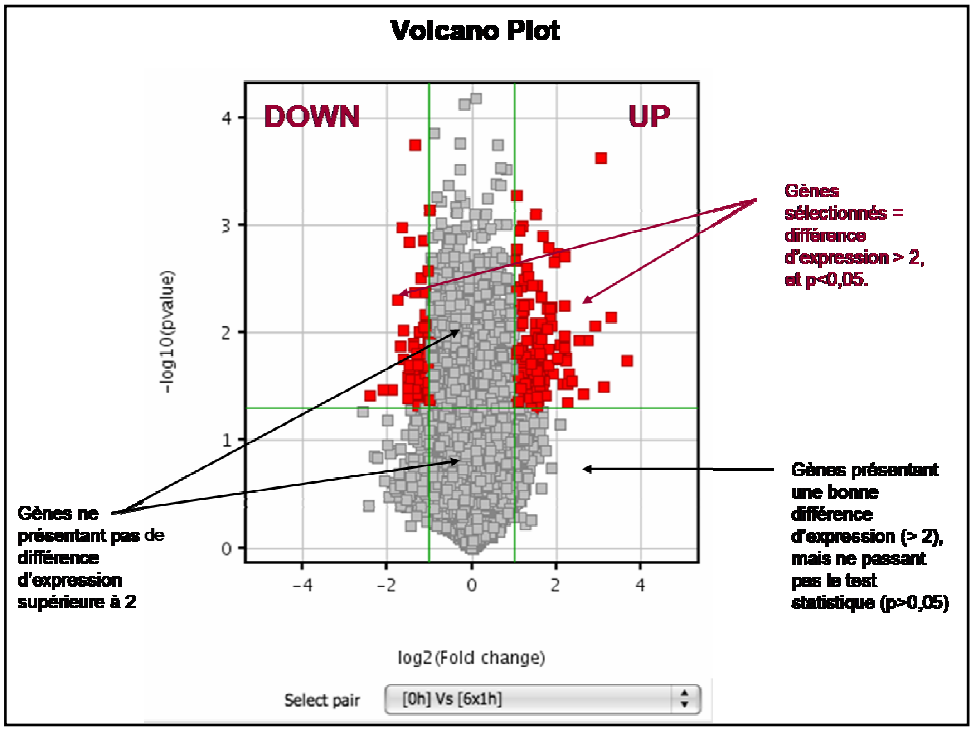

Figure 49 : Exemple de détermination de gènes différentiellement exprimés à l'aide de la représentation Volcano Plot
Ici, l'analyse porte sur la comparaison entre le sham et l'exposition 6 fois 1 heure. Cette représentation graphique correspond au niveau de changement d'expression (fold change) d'un gène en fonction de sa significativité statistique (pvalue). Les gènes exprimés différentiellement, dont le changement de niveau d'expression est supérieur à deux (en valeur absolue) et de manière significative (pvalue< 0,05) sont sélectionnés (en rouge dans les cadrans supérieurs gauche et droit).

Deux analyses indépendantes ont été réalisées avec les intensités de fluorescence obtenues avant puis après lavage des lames. Ceci permettait de vérifier que l'étape supplémentaire de lavage n'apporte pas un biais statistique. Dans les conditions statistiques les plus stringentes (test t avec les corrections de Bonferroni, Wetsfall-Young et enfin avec celle de Benjamini-Hochberg), aucun gène n'est trouvé différentiellement exprimé. Ce n'est qu'en absence de correction statistique que des gènes différentiellement exprimés apparaissent. Le problème repose cependant dans le fait que plus on abaisse la stringence du test statistique et plus on augmente le risque de sélectionner des faux positifs, c'est-à-dire le fait de déterminer un gène comme différentiellement exprimé alors qu'il ne l'est pas. Pour estimer le nombre de faux positifs que l'on pourrait potentiellement rencontrer au cours de

nos expérimentations, nous nous sommes basés sur la méthode des permutations, proposée lors d'une étude précédente réalisée par Whitehead et collègues, en 2006 [171]. Cette méthode consiste en une comparaison 2 à 2 des résultats issus d'une même condition d'exposition. Pour nos échantillons, toutes les combinaisons ont été testées, soit 12 possibilités. La différence observée n'est pas due à l'exposition en elle-même mais aux lots cellulaires utilisés (deux lots cellulaires indépendants, d'où source de variabilité biologique) et à la variabilité apportée par les techniques de purification, marquage et hybridation. Lorsque cette analyse est effectuée, le nombre de faux positifs est de l'ordre de 0,2 +/- 0,4 gène avec une correction de Benjamini-Hochberg, et de 148 +/- 105 gènes en absence de correction. Les gènes sélectionnés en absence de correction statistique présentent donc un risque élevé d'être retenus à tort comme étant différentiellement exprimés et ne constituent donc pas forcément le reflet de l'effet lié à une exposition aux ondes MM. Ce phénomène est particulièrement rencontré dans les expositions 1h et 24h, où les nombres respectifs de gènes sélectionnés sont inférieurs aux nombres possibles de faux positifs. Cette non-spécificité est par ailleurs renforcée par le faible recouvrement retrouvé lorsque l'on croise les résultats obtenus avant et après lavage **(tableau 9)**.

Test statistique : T Test unpaired						
Expo 60,4 GHz		Fiabilité du test				
		Bonferroni	Westfall Young	Benjamini Hochberg	No correction	Entités communes
1 h	Analyse des lames avant lavage	0	0	0	37	4 (10 à 12%)
	Analyse des lames après lavage	0	0	0	34	
6 h	Analyse des lames avant lavage	0	0	0	353	214 (60 à 75%)
	Analyse des lames après lavage	0	0	0	286	
24 h	Analyse des lames avant lavage	0	0	0	150	46 (30 à 40%)
	Analyse des lames après lavage	0	0	0	114	
6 x 1 h	Analyse des lames avant lavage	0	0	0	563	382 (68 à 80%)
	Analyse des lames après lavage	0	0	0	474	

Tableau 9 : Liste des gènes différentiellement exprimés pour chacune de nos conditions
Les lots de cellules ont été regroupés pour pouvoir réaliser les analyses. Les résultats sont obtenus après qu'un test t ait été effectué, avec ou sans correction statistique. Ces analyses ont été menées à partir des données recueillies avant et après lavage des lames et représentent les entités communes retrouvées lors de ces deux analyses.

Les analyses des expositions 6h et 6 fois 1h mettent en avant des nombres de gènes exprimés différentiellement plus élevés que ceux de faux positifs. Dans ces cas, nous sommes peut-être plus proches d'une réalité biologique. Nous pouvons d'ailleurs constater que le taux de recouvrement (lorsque l'on croise les listes avant et après lavage) est plus important pour ces échantillons.

- **Analyse avec un filtre de correction**

La deuxième analyse est effectuée avec un filtre pour éliminer les valeurs de fluorescence trop faibles, qui peuvent être une source importante de faux positifs. Lors de la comparaison des valeurs, nous n'avons conservé que les gènes possédant une fluorescence minimale de 50 dans 75% des pistes pour au moins une condition. Le filtre permet d'éliminer 30% de gènes supplémentaires avant lavage et 23% après lavage. Il s'agit de gènes dont l'expression différentielle est proche du bruit de fond **(tableau 10)**.

Expo 60,4 GHz		T Test unpaired No correction + Filtre d'expression (>50 à 75% dans au moins l'un des cas)	Entités communes
1 h	Analyse des lames avant lavage	2	1
	Analyse des lames après lavage	1	
6 h	Analyse des lames avant lavage	142	120
	Analyse des lames après lavage	149	
24 h	Analyse des lames avant lavage	25	21
	Analyse des lames après lavage	32	
6 x 1 h	Analyse des lames avant lavage	339	297
	Analyse des lames après lavage	333	

Tableau 10 : Liste des gènes différentiellement exprimés pour chacune de nos conditions après utilisation d'un filtre d'analyse
Les lots de cellules ont été regroupés pour pouvoir réaliser les analyses. Les résultats sont obtenus après qu'un test t ait été effectué sans correction statistique, après application d'un filtre d'expression. Ces analyses ont été menées à partir des données recueillies avant et après lavage des lames.

Une nouvelle fois, lorsque cette analyse est effectuée, l'utilisation des corrections statistiques les plus stringentes ne permet pas de faire ressortir de gènes différentiellement exprimés. Sans appliquer de correction statistique, on peut toutefois sélectionner un certain nombre de gènes en commun. L'utilisation du filtre permet de conserver les gènes possédant un plus fort niveau d'expression. Il permet en outre d'éliminer les gènes sujets à caution et de réduire le nombre de faux positifs, ce qui est confirmé par la méthode des permutations, puisque le nombre de faux positifs est de l'ordre de 80 environ. Lorsque l'on étudie les entités communes **(tableau 10)**, on constate que le nombre de gènes différentiellement exprimés est bien moindre que lors de l'analyse statistique menée sans l'utilisation de filtre. Le taux de recouvrement entre l'analyse des lames avant et après lavage est bien meilleur (80% en moyenne) que précédemment et on peut penser que les résultats sont plus fiables.

Le diagramme de Venn **(figure 50)** représente les nombres de gènes différentiellement exprimés après exposition 1h, 6h ou 24h par rapport au contrôle.

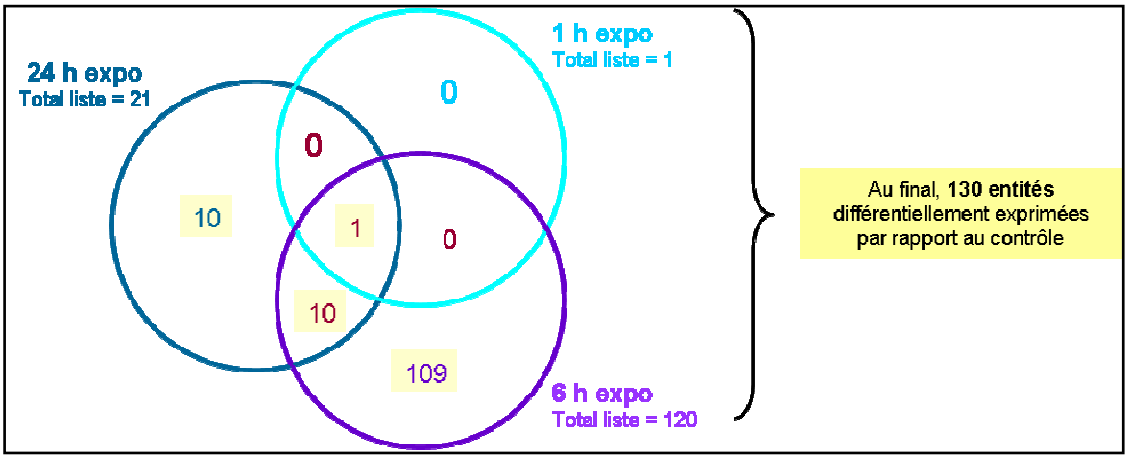

Figure 50 : Répartition des gènes différentiellement exprimés après exposition aux ondes MM
Un seul gène est retrouvé en commun dans les 3 conditions. L'exposition 6 heures provoque l'effet biologique le plus marqué.

Au total, 130 entités sont déterminées. Il existe un gène en commun entre 1h, 6h et 24h. Pour le reste, 109 gènes sont spécifiquement affectés après exposition 6h, tandis que 10 le sont après exposition 24h. Ce diagramme pourrait être le reflet d'une expression contrôlée dans laquelle aucun phénomène ne se produit après 1h d'exposition. Ensuite, des mécanismes se mettent progressivement en place et se traduisent par une modification importante de l'expression génétique après 6h. Après 24h d'exposition il y a une diminution très importante du nombre de gènes exprimés. Une question demeure cependant. Après 24h d'exposition, le nombre de gènes différentiellement exprimés est relativement faible. De plus, seuls 10 gènes sont retrouvés en commun avec la condition d'exposition continue 6 heures. Ce faible taux de recouvrement est-il le reflet de la sélection de faux positifs ou est-il le reflet d'une expression

génique différentielle ? En toute logique, on peut émettre l'hypothèse selon laquelle il se produit un retour à la normale après 24h d'exposition.

Un argument pouvant confirmer l'hypothèse d'une modification transitoire de l'expression génique se retrouve à la suite de notre analyse exploratoire menée sur des cellules exposées 6h, puis laissées 18h sans exposition (phase de récupération). Dans cette expérience, plus de 80% des gènes sélectionnés après 6h d'exposition voient leur expression revenir au niveau du contrôle, tandis que 15% d'entre-eux subissent un retour partiel à la normale (résultats non représentés). La comparaison des données obtenues entre l'exposition 6h en continu et celles d'expositions intermittentes 6 fois 1h viendrait également confirmer cette hypothèse, puisque de nombreux gènes sont retrouvés en commun **(figure 51)**.

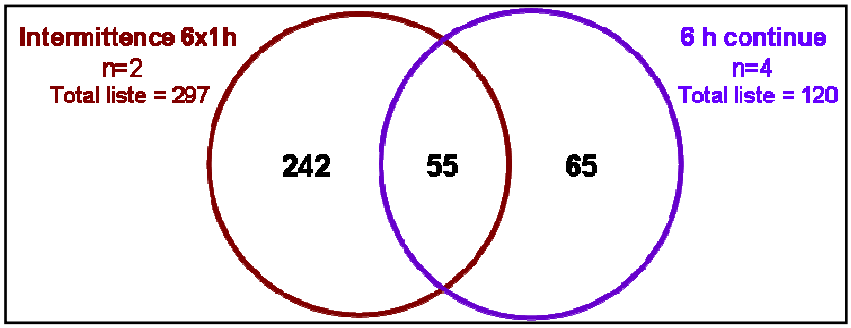

Figure 51 : Comparaison des gènes différentiellement exprimés entre les conditions d'exposition intermittentes 6 fois 1 heure et 6 heures en continu
55 gènes sont retrouvés en commun lorsque l'on compare ces deux conditions.

Il est intéressant de constater que l'analyse de la condition 6 fois 1h permet de retrouver plus de gènes différentiellement exprimés. Nous ne savons pas s'il s'agit d'une réalité biologique ou si c'est lié au fait que l'expérience ait été menée sur un nombre plus faible d'échantillons (n=2) ? Des expériences complémentaires seront nécessaires dans le futur pour apporter une réponse à cette question.

La liste des gènes différentiellement exprimés est présentée dans le **tableau 11**, placé exceptionnellement à la fin de ce chapitre, en raison de sa taille importante. Une chose que l'on peut remarquer dans cette liste est l'absence des protéines HSP. Les conditions d'exposition n'ont pas généré d'effets thermiques suffisants pour induire leur expression **(figure 52)**.

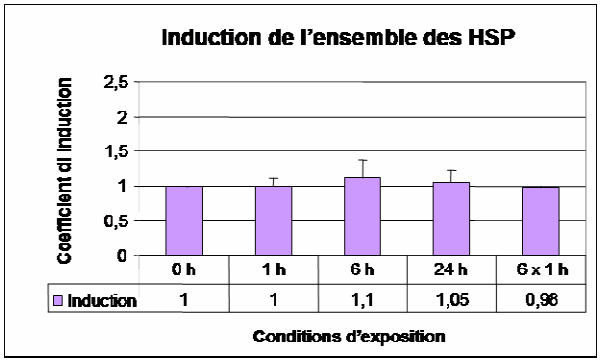

Figure 52 : Etude des niveaux d'induction de l'ensemble des HSP pour chaque condition
Ces données sont extraites de nos résultats et concernent les gènes codant les HSP, en y présentant une analyse de leur niveau d'induction pour chaque condition.

De même, on peut aussi constater l'absence de gènes impliqués dans la réponse UPR (ce qui confirme nos résultats précédemment obtenus) mais aussi liés à la réponse inflammatoire. Il existe donc des différences de résultats suivant que l'on expose des cultures primaires ou des lignées cellulaires (HaCaT et A375) aux ondes MM. Curieusement, on peut aussi remarquer que les expositions aux ondes MM semblent être marquées majoritairement par des phénomènes de répression de niveaux d'expression des gènes. Celle-ci concerne 85% d'entre-eux **(figure 53)**.

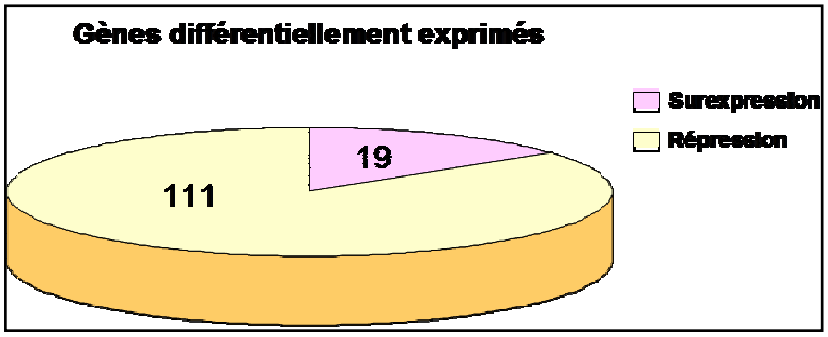

Figure 53 : Représentation des niveaux d'expression des gènes
Il existe environ 6 fois plus de gènes réprimés que de gènes induits après exposition aux ondes MM.

Un classement/regroupement hiérarchique (« clustering ») des gènes différentiellement exprimés par rapport aux niveaux d'expression montre l'existence de 7 grands groupes **(figure 54,** page suivante**)** et confirme la tendance générale à la baisse de l'expression, si l'on se réfère au code couleur employé (passage du rouge au jaune ou du jaune au bleu, signifiant une baisse de l'expression). Cette représentation vient en outre confirmer que la condition d'exposition 6h est celle générant les résultats les plus éloignés du contrôle 0h. Dans le **tableau 12** (placé en fin de chapitre), sont représentés les classements des gènes sélectionnés en fonction du coefficient d'induction ou de répression (« Fold change » ou FC dans le tableau, exprimé en valeur absolue). À l'étude du **tableau 12**, on peut constater en moyenne

que le coefficient d'induction ou de répression (FC) est faible (3,6 +/- 3,94). L'effet observé (induction ou répression) est donc peu spectaculaire au niveau de l'expression des gènes sélectionnés (les $^{3}/_{4}$ ont un coefficient d'induction ou de répression compris entre 2 et 3).

Certaines entités dans ce tableau présentent parfois un très fort FC. Il peut s'agir du reflet d'un biais expérimental comme c'est le cas par exemple avec le gène PDLIM3. Ce dernier présente la plus grande différence d'expression (FC = 30,9), avec une expression basale (dans le contrôle) proche de 150 environ qui chute après 6h d'exposition à une valeur de 5 environ, ce qui représente 7 fois moins que la valeur du bruit de fond moyen. Ceci a donc causé une amplification artificielle d'un facteur 30.

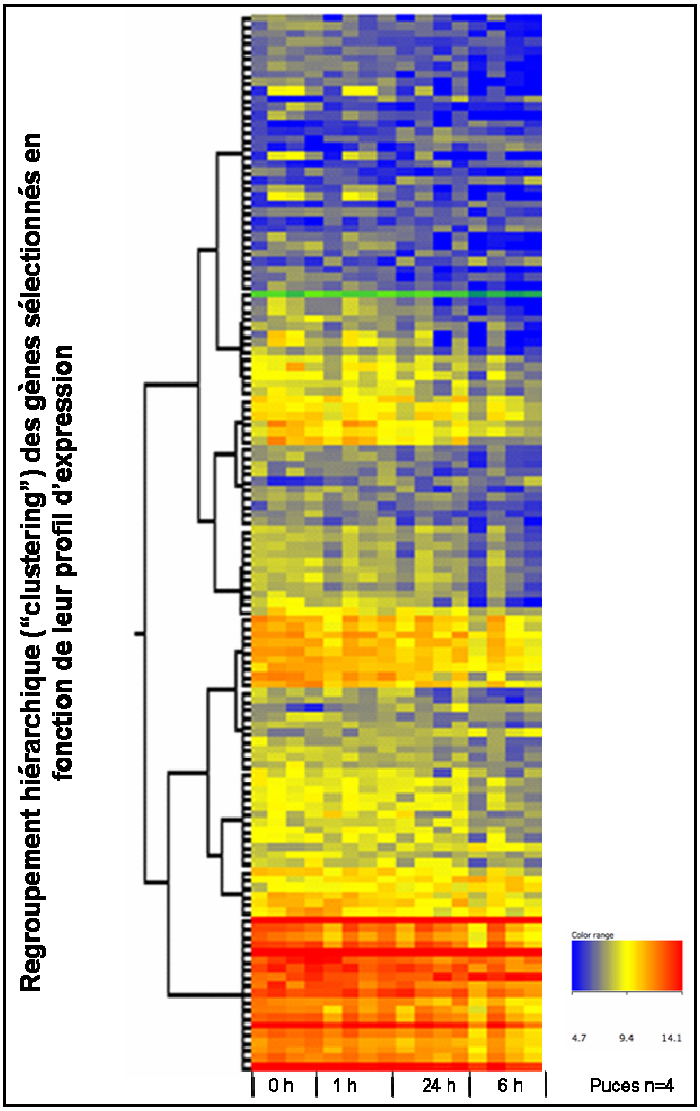

Figure 54 : Regroupement hiérarchique (« clustering ») des gènes sélectionnés en fonction de leur profil d'expression
Chaque ligne correspond à un gène sélectionné dans la liste des 130 entités (**tableau 12**), et chaque colonne correspond à la valeur de fluorescence pour chaque piste des puces. La code couleur présenté dans la légende est le suivant : rouge, le gène est surexprimé, bleu il est réprimé.

Lorsque les gènes sont classés en fonction de la « pvalue » (**tableau 13**, placé en fin de chapitre), on remarque exactement le même phénomène. On constate que certaines de ces valeurs sont artificiellement diminuées, du fait que certains niveaux d'expression soient en deçà du niveau du bruit de fond.

Il nous faudra donc tenir compte de ce biais lorsque l'on effectuera une sélection de gènes pour réaliser une étape de validation par PCR en temps réel.

- **Annotation fonctionnelle**

L'annotation fonctionnelle des gènes a été réalisée à l'aide du logiciel Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) [172, 173, 174]. Sur la liste des 130 entités sélectionnées, 107 sont reconnues par le logiciel DAVID, qui établit la correspondance entre les noms des gènes sélectionnés et leur annotation fonctionnelle. Cette dernière correspond à la description des produits géniques du point de vue de leur fonction moléculaire, de leur rôle biologique mais aussi de leur localisation cellulaire. C'est l'ontologie génique, « Gene Ontology » en anglais (GO). La liste est regroupée dans le **tableau 14**, placé également en fin de chapitre.

Le logiciel DAVID réalise en fait une analyse statistique très poussée pour rechercher des termes GO qui sont sur ou sous-représentés dans notre liste, par rapport à ce que l'on pourrait trouver dans une répartition au hasard. Il associe alors à chacun de ces gènes un coefficient d'enrichissement. Lorsque l'on analyse les fonctions biologiques des gènes sélectionnés, représentés dans le **tableau 14**, on remarque que les gènes possédant un terme GO relatif au cycle cellulaire et à la mitose arrivent en premier. Viennent ensuite ceux en rapport avec les chromosomes. Là encore, on retrouve un rapport évident avec la mitose. Toujours lors de cette analyse, on peut aussi souligner la présence de plusieurs facteurs de transcription, qui forment un groupe fonctionnel également détecté par le logiciel.

- **Choix des gènes pour validation par RT-PCR en temps réel**

A la suite de l'analyse menée avec le logiciel DAVID, nous avons retenu 24 des 107 gènes classés pour les tester par la technique de PCR en temps réel **(tableau 15)**. Nous avons sélectionné les gènes présentant la meilleure combinaison par rapport à l'expression différentielle enregistrée par les puces à ADN. Ces gènes possèdent une bonne « pvalue », un bon coefficient FC, ainsi qu'un niveau d'expression supérieur au bruit de fond, afin d'éviter toute source de faux positif. TRPV2, EMILIN1, PLXND1, SERPINF1 constituent de bons

exemples. De même, nous avons également pris des gènes représentatifs des groupes fonctionnels établis par le logiciel DAVID. Ces gènes ressortent comme étant liés au cycle cellulaire (CDKN2C, MAD2L1, NUSAP1) ou en relation avec la régulation de l'expression génique (E2F1, HES5, LEF1).

Agilent probe ID	Symbol	Description
A_23_P157299	**AEBP1**	Homo sapiens AE binding protein 1
A_23_P85460	**CDKN2C**	Homo sapiens cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4), transcript variant 1
A_23_P48669	**CDKN3**	Homo sapiens cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDK2-associated dual specificity phosphatase)
A_23_P115872	**CEP55**	Homo sapiens centrosomal protein 55kDa
A_23_P420551	**CIT**	Homo sapiens citron (rho-interacting, serine/threonine kinase 21)
A_23_P112798	**CRIP2**	Homo sapiens cysteine-rich protein 2
A_23_P28953	**DNMT3B**	Homo sapiens DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta, transcript variant 6
A_23_P80032	**E2F1**	Homo sapiens E2F transcription factor 1
A_23_P165848	**EMILIN1**	Homo sapiens elastin microfibril interfacer 1
A_32_P234184	**HES5**	Homo sapiens hairy and enhancer of split 5 (Drosophila), (cDNA clone MGC:102848 IMAGE:6204648), complete cds.
A_23_P155765	**HMGB2**	Homo sapiens high-mobility group box 2
A_24_P20630	**LEF1**	Homo sapiens lymphoid enhancer-binding factor 1
A_32_P101031	**LYPD1**	Homo sapiens LY6/PLAUR domain containing 1, transcript variant 1
A_23_P92441	**MAD2L1**	Homo sapiens MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)
A_23_P82929	**NOV**	Homo sapiens nephroblastoma overexpressed gene
A_23_P74349	**NUF2**	Homo sapiens NUF2, NDC80 kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae), transcript variant 1
A_24_P416079	**NUSAP1**	Homo sapiens nucleolar and spindle associated protein 1, transcript variant 1
A_24_P376391	**PLXND1**	Homo sapiens plexin D1
A_23_P121064	**PTX3**	Homo sapiens pentraxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta
A_23_P14193	**RFC3**	Homo sapiens replication factor C (activator 1) 3, 38kDa, transcript variant 1
A_23_P100660	**SERPINF1**	Homo sapiens serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1
A_23_P325040	**TMPO**	Homo sapiens thymopoietin, transcript variant 1
A_23_P207911	**TRPV2**	Homo sapiens transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 2
A_23_P208880	**UHRF1**	Homo sapiens ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1, transcript variant 2,

Tableau 15 : Gènes retenus pour l'étape de validation par PCR en temps réel

Enfin, lorsque l'on réalise un croisement de nos données avec les listes de gènes sorties à la suite d'études à haut débit des effets des RF, on peut constater que seuls les gènes RFC3 et TMPO sont retrouvés en commun. Dans le cas des RF ces gènes étaient surexprimés, tandis que dans notre cas, ils sont réprimés. Nous les avons néanmoins sélectionnés pour confirmer

nos observations. Le croisement de notre liste avec les gènes ressortis par l'analyse à 35 GHz ne permet pas de ressortir de gènes en commun.

Les expériences de PCR en temps réel auront pour but de valider les résultats obtenus avec la technique de puces à ADN. Les amorces sont d'ores et déjà en cours de conception.

Tableau 11 : Entités sélectionnées après 1h, 6h ou 24h d'exposition

Entités sélectionnées après 1h ; 6h & 24h d'exposition.			
ProbeName	GeneSymbol	Description	GenbankAccession
A_23_P408025	KIAA0367	KIAA0367	NM_015225
Entités sélectionnées spécifiquement après 6h d'exposition.			
ProbeName	GeneSymbol	Description	GenbankAccession
A_23_P156609	A_23_P156609		
A_24_P152793	A_24_P152793		
A_24_P161655	A_24_P161655		
A_32_P140501	A_32_P140501		
A_23_P360754	ADAMTS4	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 4	NM_005099
A_23_P33326	ADRA1B	Adrenergic, alpha-1B-, receptor	NM_000679
A_23_P157299	AEBP1	AE binding protein 1	NM_001129
A_23_P145916	AEBP1	AE binding protein 1	NM_001129
A_23_P357504	AL834280		AL834280
A_23_P356684	ANLN	Anillin, actin binding protein	NM_018685
A_23_P143713	APOBEC3G	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G	NM_021822
A_32_P188921	BC007606	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:3351130, complete cds.	BC007606
A_23_P212050	BCHE	Butyrylcholinesterase	NM_000055
A_32_P119154	BE138567	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2766163 3'	BE138567
A_24_P920730	BU608568	Homo sapiens cDNA clone UI-CF-FN0-aep-h-11-0-UI 3',	BU608568
A_23_P14302	C14orf139	Homo sapiens chromosome 14 open reading frame 139, mRNA (cDNA clone MGC:14946 IMAGE:3532035), complete cds. [BC008299]	BC008299
A_32_P129010	C1orf190	Homo sapiens chromosome 1 open reading frame 190	NM_001013615
A_23_P40453	CBR3	Carbonyl reductase 3	NM_001236
A_23_P52697	CD248	CD248 molecule, endosialin	NM_020404
A_23_P98898	CDK2	Cyclin-dependent kinase 2 (CDK2), transcript variant 1,	NM_001798
A_23_P48669	CDKN3	Cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDK2-associated dual specificity phosphatase)	NM_005192
A_24_P392109	CENPN	Centromere protein N	NM_018455
A_23_P115872	CEP55	Centrosomal protein 55kDa	NM_018131

Tableau 11 (suite)

Entités sélectionnées spécifiquement après 6h d'exposition.

ProbeName	GeneSymbol	Description	GenbankAccession
A_23_P420551	CIT	Citron (rho-interacting, serine/threonine kinase 21)	NM_007174
A_23_P44674	CRIP1	Cysteine-rich protein 1 (intestinal)	NM_001311
A_23_P112798	CRIP2	Cysteine-rich protein 2	NM_001312
A_23_P21976	CSPG4	Chondroitin sulfate proteoglycan 4	NM_001897
A_23_P28963	DNMT3B	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta, transcript variant 6,	NM_175850
A_23_P80032	E2F1	E2F transcription factor 1	NM_005225
A_23_P35871	E2F8	E2F transcription factor 8	NM_024680
A_32_P202502	EFHA2	EF-hand domain family, member A2	NM_181723
A_23_P165648	EMILIN1	Elastin microfibril interfacer 1	NM_007046
A_24_P83758	ENST00000202 728	Homo sapiens mRNA for KIAA1653 protein, partial cds.	
A_23_P136721	ENST00000355 748	Endogenous retrovirus H D1 leader region/integrase-derived ORF1, ORF2, and putative envelope protein (Endogenous retrovirus H protease/integrase-derived ORF1, ORF2, and putative envelope protein).	.
A_24_P160413	ENST00000360 514	Homo sapiens cDNA FLJ38790 fis, clone LIVER2002842.	
A_24_P166613	EPDR1	Ependymin related protein 1	NM_017549
A_24_P62783	FABP3	Fatty acid binding protein 3, muscle and heart (mammary-derived growth inhibitor)	NM_004102
A_23_P49878	FAM64A	Homo sapiens family with sequence similarity 64, member A	NM_019013
A_32_P24165	FANCD2	Fanconi anemia, complementation group D2, transcript variant 2,	NM_001018115
A_23_P211631	FBLN1	Fibulin 1, transcript variant D,	NM_006486
A_23_P111701	GNG11	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 11	NM_004126
A_23_P43278	GPR124	G protein-coupled receptor 124	NM_032777
A_23_P105442	GRASP	GRP1 (general receptor for phosphoinositides 1)-associated scaffold protein	NM_181711
A_23_P66454	GSDML	Gasdermin-like, transcript variant 2,	NM_018530
A_24_P139901	GYPC	Glycophorin C (Gerbich blood group), transcript variant 1,	NM_002101
A_23_P29257	H1F0	H1 histone family, member 0	NM_005318
A_32_P234184	HES5	Hairy and enhancer of split 5, mRNA (cDNA clone MGC:102848 IMAGE:6204848), complete cds. [BC087840]	BC087840
A_23_P430655	HEYL	Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif-like	NM_014571
A_24_P168443	HLA-DPB1	Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1	NM_002121
A_23_P258769	HLA-DPB1	Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1	NM_002121
A_23_P155765	HMGB2	High-mobility group box 2	NM_002129

Tableau 11 (suite)

Entités sélectionnées spécifiquement après 6h d'exposition.

ProbeName	GeneSymbol	Description	GenbankAccession
A_23_P66682	HOXB6	Homeobox B6	NM_018952
A_23_P392575	KCNE4	Potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 4	NM_080671
A_24_P117410	KLHDC7B	Kelch domain containing 7B	NM_138433
A_24_P20830	LEF1	Lymphoid enhancer-binding factor 1	NM_016269
A_24_P187407	LOC643744	PREDICTED: Homo sapiens similar to D-PCa-2 protein isoform c	XR_017206
A_23_P111995	LOXL2	Lysyl oxidase-like 2	NM_002318
A_24_P88763	LOXL3	Lysyl oxidase-like 3	NM_032603
A_32_P101031	LYPD1	LY6/PLAUR domain containing 1, transcript variant 1,	NM_144586
A_23_P20443	LZTS1	Leucine zipper, putative tumor suppressor 1	NM_021020
A_23_P92441	MAD2L1	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1	NM_002358
A_23_P201988	MASTL	Microtubule associated serine/threonine kinase-like	NM_032844
A_23_P31064	MOXD1	Monooxygenase, DBH-like 1, transcript variant 2,	NM_015529
A_23_P143817	MYLK	Myosin, light chain kinase, transcript variant 1,	NM_053025
A_24_P319813	NEK2	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 2	NM_002497
A_23_P35219	NEK2	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 2	NM_002497
A_23_P103672	NES	Nestin (NES),	NM_006617
A_23_P389997	NGFR	Nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)	NM_002507
A_23_P82929	NOV	Nephroblastoma overexpressed gene	NM_002514
A_23_P74349	NUF2	NUF2, NDC80 kinetochore complex component, homolog, transcript variant 1,	NM_145697
A_24_P416079	NUSAP1	Nucleolar and spindle associated protein 1, transcript variant 1,	NM_016359
A_24_P220485	OLFML2A	Olfactomedin-like 2A	NM_182487
A_23_P214281	PAQR8	Progestin and adipoQ receptor family member VIII	NM_133367
A_23_P110403	PDLIM3	PDZ and LIM domain 3	NM_014476
A_24_P408047	PLEKHA4	Pleckstrin homology domain containing, family A (phoephoinositide binding specific) member 4	NM_020904
A_23_P52410	PLEKHK1	Pleckstrin homology domain containing, family K member 1	NM_145307
A_24_P376391	PLXND1	Plexin D1	NM_015103
A_23_P163099	POLE2	Polymerase (DNA directed), epsilon 2 (p59 subunit)	NM_002692
A_23_P313938	PPIF	Homo sapiens clone DNA142995 PPIF (UNQ6502) mRNA, complete cds.	AY358954

Tableau 11 (suite)

Entités sélectionnées spécifiquement après 6h d'exposition.

ProbeName	GeneSymbol	Description	GenbankAccession
A_23_P201079	PRDM2	PR domain containing 2, with ZNF domain, transcript variant 1,	NM_012231
A_23_P256384	PSIP1	PC4 and SFRS1 interacting protein 1, transcript variant 1,	NM_021144
A_24_P88371	PSIP1	PC4 and SFRS1 interacting protein 1, transcript variant 2,	NM_033222
A_32_P22702	PSIP1	PC4 and SFRS1 interacting protein 1, transcript variant 2,	NM_033222
A_24_P403417	PTGES	Prostaglandin E synthase	NM_004878
A_23_P121064	PTX3	Pentraxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta	NM_002852
A_23_P147025	RAB33A	RAB33A, member RAS oncogene family	NM_004794
A_23_P99292	RAD51AP1	RAD51 associated protein 1	NM_006479
A_23_P14193	RFC3	Replication factor C (activator 1) 3, 38kDa, transcript variant 1,	NM_002915
A_23_P112341	RMI1	RMI1, RecQ mediated genome instability 1, homolog	NM_024945
A_23_P51231	RUNX3	Runt-related transcription factor 3, transcript variant 2,	NM_004350
A_23_P143526	S100B	S100 calcium binding protein B	NM_006272
A_23_P100660	SERPINF1	Serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1	NM_002615
A_24_P150466	SMOC1	SPARC related modular calcium binding 1, transcript variant 1,	NM_001034852
A_32_P181297	ST7OT1	ST7 overlapping transcript 1 (antisense non-coding RNA) (ST7OT1) on chromosome 7	NR_002330
A_24_P100535	SYT15	Synaptotagmin XV, transcript variant b,	NM_181519
A_23_P164461	TBX2	T-box 2	NM_005994
A_23_P125788	TCEAL7	Transcription elongation factor A (SII)-like 7	NM_152278
A_24_P925565	THC2633747	ALU2_HUMAN (P39189) Alu subfamily SB sequence contamination warning entry, partial (3%)	.
A_23_P107421	TK1	Thymidine kinase 1, soluble	NM_003258
A_23_P325040	TMPO	Thymopoietin (TMPO), transcript variant 1,	NM_003276
A_23_P137173	TMSL8	Thymosin-like 8 (TMSL8), mRNA	NM_021992
A_24_P277576	TRIP13	Thyroid hormone receptor interactor 13 (TRIP13),	NM_004237
A_23_P417951	TSPYL5	TSPY-like 5	NM_033512
A_32_P101235	UHRF1	Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1, transcript variant 2,	NM_013282
A_23_P208880	UHRF1	Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1, transcript variant 2,	NM_013282
A_23_P64044	URP2	UNC-112 related protein 2, transcript variant URP2LF,	NM_178443
A_23_P108617	WFDC1	WAP four-disulfide core domain 1	NM_021197
A_23_P307328	WHSC1	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1, transcript variant 8,	NM_007331
A_23_P93032	ZBED3	Zinc finger, BED-type containing 3	NM_032367

Tableau 11 (suite et fin)

Entités sélectionnées après 6h & 24 h d'exposition.			
ProbeName	GeneSymbol	Description	GenbankAccession
A_24_P200852	C6orf62	Homo sapiens chromosome 6 open reading frame 62	NM_030939
A_23_P85460	CDKN2C	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4), transcript variant 1,	NM_001262
A_23_P4536	EPB41L3	Erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3	NM_012307
A_23_P70547	HSPA1L	Heat shock 70kDa protein 1-like	NM_005527
A_23_P329261	KCNJ2	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 2	NM_000891
A_24_P216968	NUCKS1	Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinases substrate (P1).	
A_24_P741378	THC2531058	Q47K95_THEFY (Q47K95) Single-strand binding protein, partial (8%)	
A_24_P732565	THC2550367		
A_23_P207911	TRPV2	Transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 2	NM_016113
A_24_P272561	ZDHHC13	Zinc finger, DHHC-type containing 13, transcript variant 1,	NM_019028

Entités sélectionnées spécifiquement après 24h d'exposition.			
ProbeName	GeneSymbol	Description	GenbankAccession
A_32_P115515	AK026131	Homo sapiens cDNA: FLJ22478 fis, clone HRC10818.	AK026131
A_24_P333357	AK090463	Homo sapiens mRNA for FLJ00384 protein.	AK090463
A_32_P191895	BC045716	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:5261156.	BC045716
A_24_P570930	BF364571	BF364571 PM1-NN1084-240900-005-g05 NN1084 Homo sapiens cDNA,	BF364571
A_24_P418717	BMPR1A	Bone morphogenetic protein receptor, type IA	NM_004329
A_24_P171873	FBXO4	F-box protein 4, transcript variant 1,	NM_012176
A_23_P435833	FUBP3	Far upstream element (FUSE) binding protein 3	NM_003934
A_24_P101261	LOC402216	PREDICTED: Homo sapiens similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H (hnRNP H)	XR_018905
A_23_P21457	NMD3	NMD3 homolog	NM_015936
A_23_P164607	YES1	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1	NM_005433

Tableau 12 : Classement des gènes en fonction du coefficient d'induction ou de répression (« fold change » (FC), exprimé en valeur absolu

ProbeName	GeneSymbol	Fluo 0h	Régulation	FCAbsolute	Fluo expo
A_23_P110403	**PDLIM3**	148,9	Répression	**30,958**	4,8
A_23_P20443	**LZTS1**	169,8	Répression	**21,023**	8,1
A_23_P143526	**S100B**	170,1	Répression	**20,737**	8,2
A_23_P106617	**WFDC1**	259,8	Répression	**18,366**	14,1
A_23_P389897	**NGFR**	89,9	Répression	**17,430**	5,2
A_23_P137173	**TMSL8**	76,1	Répression	**13,376**	5,7
A_23_P147025	**RAB33A**	276,2	Répression	**10,458**	26,4
A_24_P166613	**EPDR1**	68,2	Répression	**10,051**	6,8
A_23_P207911	**TRPV2**	1113,3	Répression	**9,686**	114,9
A_32_P101031	**LYPD1**	672,0	Répression	**7,123**	94,3
A_24_P376391	**PLXND1**	214,0	Répression	**7,103**	30,1
A_23_P392575	**KCNE4**	87,3	Répression	**6,152**	14,2
A_23_P164451	**TBX2**	118,0	Répression	**5,899**	20,0
A_23_P51231	**RUNX3**	80,3	Répression	**4,887**	16,4
A_23_P103672	**NES**	114,5	Répression	**4,852**	23,6
A_23_P66682	**HOXB6**	84,4	Répression	**4,788**	17,6
A_23_P4536	**EPB41L3**	71,1	Répression	**4,054**	17,5
A_23_P82929	**NOV**	650,8	Répression	**3,969**	164,0
A_24_P319613	**NEK2**	90,6	Répression	**3,835**	23,6
A_23_P406025	**KIAA0367**	86,8	Répression	**3,751**	23,1
A_23_P430658	**HEYL**	93,8	Répression	**3,737**	25,1
A_24_P220485	**OLFML2A**	370,1	Répression	**3,632**	101,9
A_23_P43276	**GPR124**	78,6	Répression	**3,370**	23,3
A_23_P85460	**CDKN2C**	618,1	Répression	**3,299**	187,3
A_23_P35871	**E2F8**	67,5	Répression	**3,298**	20,5
A_23_P35219	**NEK2**	290,4	Répression	**3,274**	88,7
A_23_P420551	**CIT**	807,9	Répression	**3,243**	249,1
A_23_P329261	**KCNJ2**	70,4	Répression	**3,201**	22,0
A_23_P258769	**HLA-DPB1**	120,4	Répression	**3,185**	37,8
A_23_P33326	**ADRA1B**	120,7	Répression	**3,158**	38,2
A_24_P20630	**LEF1**	653,5	Répression	**3,098**	210,9
A_24_P416079	**NUSAP1**	292,8	Répression	**3,058**	95,8
A_24_P139901	**GYPC**	211,8	Répression	**3,054**	69,3
A_32_P119154	**BE138567**	121,4	Répression	**3,046**	39,8
A_23_P48669	**CDKN3**	928,1	Répression	**2,991**	310,3
A_23_P155765	**HMGB2**	6895,2	Répression	**2,986**	2309,0
A_23_P208880	**UHRF1**	953,5	Répression	**2,982**	319,8
A_23_P115872	**CEP55**	2658,9	Répression	**2,981**	891,9
A_32_P188921	**BC007606**	1449,1	Répression	**2,976**	487,0
A_23_P99292	**RAD51AP1**	298,0	Répression	**2,915**	102,2
A_23_P121064	**PTX3**	423,6	Répression	**2,904**	145,9
A_24_P166443	**HLA-DPB1**	127,9	Répression	**2,867**	44,6
A_23_P49878	**FAM64A**	2099,2	Répression	**2,842**	738,8
A_24_P161655	**A_24_P161655**	26,6	Induction	**2,836**	75,5
A_24_P62783	**FABP3**	127,2	Répression	**2,834**	44,9

Tableau 12 (suite)

ProbeName	GeneSymbol	Fluo 0h	Régulation	FCAbsolute	Fluo expo
A_23_P74349	**NUF2**	1296,7	Répression	**2,833**	457,7
A_23_P163099	**POLE2**	155,6	Répression	**2,808**	55,4
A_32_P115515	**AK026131**	25,9	Induction	**2,735**	70,8
A_23_P356684	**ANLN**	539,4	Répression	**2,729**	197,7
A_23_P44674	**CRIP1**	263,0	Répression	**2,714**	96,9
A_23_P14193	**RFC3**	235,8	Répression	**2,709**	87,0
A_24_P741378	**THC2531058**	54,9	Induction	**2,665**	146,4
A_23_P357504	**AL834280**	113,8	Induction	**2,643**	300,9
A_24_P100535	**SYT15**	66,8	Répression	**2,623**	25,5
A_24_P98371	**PSIP1**	1671,9	Répression	**2,622**	637,7
A_23_P105442	**GRASP**	458,6	Répression	**2,601**	176,3
A_32_P101235	**UHRF1**	179,9	Répression	**2,550**	70,5
A_23_P52410	**PLEKHK1**	236,2	Répression	**2,544**	92,9
A_24_P333357	**AK090463**	34,2	Induction	**2,542**	87,0
A_23_P360754	**ADAMTS4**	178,9	Répression	**2,541**	70,4
A_23_P70547	**HSPA1L**	31,6	Induction	**2,540**	80,4
A_24_P272561	**ZDHHC13**	158,8	Répression	**2,534**	62,6
A_24_P216968	**NUCKS1**	183,2	Répression	**2,533**	72,3
A_32_P22702	**PSIP1**	147,1	Répression	**2,519**	58,4
A_23_P28953	**DNMT3B**	145,9	Répression	**2,472**	59,0
A_23_P52697	**CD248**	90,2	Répression	**2,470**	36,5
A_23_P212050	**BCHE**	325,4	Répression	**2,469**	131,8
A_23_P112798	**CRIP2**	129,4	Répression	**2,464**	52,5
A_32_P191895	**BC045716**	723,9	Répression	**2,460**	294,3
A_23_P307328	**WHSC1**	134,5	Répression	**2,457**	54,7
A_23_P211631	**FBLN1**	3157,8	Répression	**2,455**	1286,1
A_24_P277576	**TRIP13**	134,2	Répression	**2,450**	54,8
A_23_P31064	**MOXD1**	172,1	Répression	**2,435**	70,7
A_23_P100660	**SERPINF1**	1188,0	Répression	**2,431**	488,7
A_23_P111701	**GNG11**	930,3	Répression	**2,430**	382,8
A_23_P40453	**CBR3**	141,4	Répression	**2,417**	58,5
A_23_P111995	**LOXL2**	254,1	Répression	**2,416**	105,2
A_23_P256384	**PSIP1**	69,3	Répression	**2,410**	28,8
A_23_P92441	**MAD2L1**	1975,1	Répression	**2,395**	824,8
A_23_P165848	**EMILIN1**	194,5	Répression	**2,384**	81,6
A_23_P136721	**ENST00000355748**	84,9	Induction	**2,377**	201,8
A_23_P214281	**PAQR8**	103,9	Répression	**2,375**	43,8
A_23_P21976	**CSPG4**	150,2	Répression	**2,341**	64,2
A_32_P24165	**FANCD2**	827,6	Répression	**2,334**	354,6
A_32_P129010	**C1orf190**	275,2	Répression	**2,325**	118,4
A_24_P408047	**PLEKHA4**	259,9	Répression	**2,305**	112,7
A_23_P157299	**AEBP1**	921,9	Répression	**2,296**	401,6
A_24_P418717	**BMPR1A**	74,0	Répression	**2,284**	32,4
A_23_P313938	**PPIF**	24,4	Induction	**2,280**	55,6
A_32_P181297	**ST7OT1**	88,3	Répression	**2,264**	39,0
A_24_P117410	**KLHDC7B**	192,0	Répression	**2,263**	84,8

Tableau 12 (suite et fin)

ProbeName	GeneSymbol	Fluo 0h	Régulation	FCAbsolute	Fluo expo
A_23_P80032	**E2F1**	409,0	Répression	**2,262**	180,8
A_24_P732565	**THC2650367**	38,5	Induction	**2,257**	86,9
A_24_P200652	**C6orf62**	3537,5	Répression	**2,243**	1577,1
A_23_P145916	**AEBP1**	252,1	Répression	**2,240**	112,6
A_24_P88763	**LOXL3**	142,4	Répression	**2,236**	63,7
A_23_P107421	**TK1**	66792,9	Répression	**2,223**	30042,4
A_23_P156609	**A_23_P156609**	36,6	Induction	**2,222**	81,3
A_24_P392109	**CENPN**	1216,7	Répression	**2,217**	548,7
A_23_P125788	**TCEAL7**	80,1	Répression	**2,203**	36,4
A_24_P152793	**A_24_P152793**	7146,1	Induction	**2,189**	15639,4
A_23_P14302	**C14orf139**	612,2	Répression	**2,186**	280,1
A_23_P21457	**NMD3**	154,6	Répression	**2,153**	71,8
A_24_P101261	**LOC402216**	97,2	Répression	**2,147**	45,3
A_24_P171873	**FBXO4**	110,7	Répression	**2,145**	51,6
A_24_P920730	**BU608568**	25,4	Induction	**2,134**	54,1
A_24_P187407	**LOC643744**	7169,0	Répression	**2,123**	3377,2
A_32_P234184	**HES5**	2253,2	Induction	**2,119**	4774,6
A_24_P925565	**THC2633747**	30,7	Induction	**2,114**	64,9
A_32_P202502	**EFHA2**	178,7	Répression	**2,107**	84,8
A_23_P98898	**CDK2**	101,4	Répression	**2,106**	48,1
A_23_P201988	**MASTL**	81,2	Répression	**2,102**	38,6
A_23_P417951	**TSPYL5**	798,7	Répression	**2,098**	380,7
A_23_P143713	**APOBEC3G**	90,8	Répression	**2,098**	43,3
A_23_P112341	**RMI1**	1298,8	Répression	**2,092**	620,9
A_24_P570930	**BF364571**	30,7	Induction	**2,091**	64,2
A_23_P164507	**YES1**	79,0	Répression	**2,087**	37,8
A_23_P325040	**TMPO**	123,3	Répression	**2,082**	59,2
A_23_P435833	**FUBP3**	241,6	Répression	**2,078**	116,2
A_23_P29257	**H1F0**	2153,1	Répression	**2,078**	1036,0
A_24_P160413	**ENST00000360514**	75,9	Répression	**2,078**	36,5
A_23_P201079	**PRDM2**	28,6	Induction	**2,078**	59,3
A_24_P403417	**PTGES**	35,9	Induction	**2,073**	74,4
A_23_P64044	**URP2**	61,1	Répression	**2,072**	29,5
A_24_P150466	**SMOC1**	2425,1	Répression	**2,066**	1173,8
A_23_P66454	**GSDML**	281,3	Induction	**2,035**	572,7
A_23_P143817	**MYLK**	192,7	Répression	**2,028**	95,0
A_24_P83758	**ENST00000292728**	254,5	Induction	**2,025**	515,3
A_32_P140501	**A_32_P140501**	850,4	Répression	**2,023**	420,3
A_23_P93032	**ZBED3**	1463,9	Répression	**2,022**	724,1

Tableau 13 : Classement en fonction de la pvalue

ProbeName	GeneSymbol	Fluo 0h	Fluo expo	p-value
A_23_P66682	**HOXB6**	84,4	17,6	**0,00031**
A_24_P216968	**NUCKS1**	183,2	72,3	**0,00061**
A_23_P207911	**TRPV2**	1113,3	114,9	**0,00063**
A_23_P165848	**EMILIN1**	194,5	81,6	**0,00087**
A_23_P430658	**HEYL**	93,8	25,1	**0,00088**
A_23_P44674	**CRIP1**	263,0	96,9	**0,00116**
A_23_P4536	**EPB41L3**	71,1	17,5	**0,00158**
A_23_P112798	**CRIP2**	129,4	52,5	**0,00195**
A_23_P43276	**GPR124**	78,6	23,3	**0,00200**
A_23_P40453	**CBR3**	141,4	58,5	**0,00209**
A_23_P201079	**PRDM2**	28,6	59,3	**0,00218**
A_23_P329261	**KCNJ2**	70,4	22,0	**0,00231**
A_24_P62783	**FABP3**	127,2	44,9	**0,00244**
A_23_P100660	**SERPINF1**	1188,0	488,7	**0,00250**
A_23_P103672	**NES**	114,5	23,6	**0,00259**
A_23_P357504	**AL834280**	113,8	300,9	**0,00318**
A_24_P376391	**PLXND1**	214,0	30,1	**0,00348**
A_23_P31064	**MOXD1**	172,1	70,7	**0,00409**
A_24_P166443	**HLA-DPB1**	127,9	44,6	**0,00452**
A_23_P164507	**YES1**	79,0	37,8	**0,00457**
A_23_P51231	**RUNX3**	80,3	16,4	**0,00478**
A_23_P258769	**HLA-DPB1**	120,4	37,8	**0,00483**
A_23_P389897	**NGFR**	89,9	5,2	**0,00483**
A_24_P166613	**EPDR1**	68,2	6,8	**0,00513**
A_23_P64044	**URP2**	61,1	29,5	**0,00519**
A_32_P140501	**A_32_P140501**	850,4	420,3	**0,00542**
A_23_P164451	**TBX2**	118,0	20,0	**0,00569**
A_24_P152793	**A_24_P152793**	7146,1	15639,4	**0,00613**
A_32_P101031	**LYPD1**	672,0	94,3	**0,00625**
A_24_P100535	**SYT15**	66,8	25,5	**0,00662**
A_23_P392575	**KCNE4**	87,3	14,2	**0,00671**
A_24_P187407	**LOC643744**	7169,0	3377,2	**0,00735**
A_23_P121064	**PTX3**	423,6	145,9	**0,00766**
A_23_P325040	**TMPO**	123,3	59,2	**0,00773**
A_23_P33326	**ADRA1B**	120,7	38,2	**0,00817**
A_23_P70547	**HSPA1L**	31,6	80,4	**0,00827**
A_23_P211631	**FBLN1**	3157,8	1286,1	**0,00943**
A_24_P150466	**SMOC1**	2425,1	1173,8	**0,00961**
A_23_P28953	**DNMT3B**	145,9	59,0	**0,00980**
A_24_P139901	**GYPC**	211,8	69,3	**0,00999**
A_24_P403417	**PTGES**	35,9	74,4	**0,01024**
A_23_P143817	**MYLK**	192,7	95,0	**0,01078**
A_24_P160413	**ENST00000360514**	75,9	36,5	**0,01133**
A_23_P98898	**CDK2**	101,4	48,1	**0,01161**
A_24_P88763	**LOXL3**	142,4	63,7	**0,01186**
A_23_P85460	**CDKN2C**	618,1	187,3	**0,01225**
A_23_P147025	**RAB33A**	276,2	26,4	**0,01230**
A_23_P52697	**CD248**	90,2	36,5	**0,01290**

Tableau 13 (suite)

ProbeName	GeneSymbol	Fluo 0h	Fluo expo	p-value
A_23_P214281	**PAQR8**	103,9	43,8	**0,01290**
A_23_P156609	**A_23_P156609**	36,6	81,3	**0,01318**
A_24_P101261	**LOC402216**	97,2	45,3	**0,01323**
A_24_P161655	**A_24_P161655**	26,6	75,5	**0,01330**
A_23_P112341	**RMI1**	1298,8	620,9	**0,01402**
A_23_P406025	**KIAA0367**	86,8	23,1	**0,01436**
A_23_P136721	**ENST00000355748**	84,9	201,8	**0,01441**
A_24_P98371	**PSIP1**	1671,9	637,7	**0,01451**
A_23_P417951	**TSPYL5**	798,7	380,7	**0,01493**
A_23_P208880	**UHRF1**	953,5	319,8	**0,01522**
A_32_P234184	**HES5**	2253,2	4774,6	**0,01626**
A_23_P360754	**ADAMTS4**	178,9	70,4	**0,01630**
A_24_P418717	**BMPR1A**	74,0	32,4	**0,01658**
A_24_P20630	**LEF1**	653,5	210,9	**0,01670**
A_23_P99292	**RAD51AP1**	298,0	102,2	**0,01677**
A_24_P220485	**OLFML2A**	370,1	101,9	**0,01831**
A_23_P157299	**AEBP1**	921,9	401,6	**0,01842**
A_23_P110403	**PDLIM3**	148,9	4,8	**0,01923**
A_23_P125788	**TCEAL7**	80,1	36,4	**0,01997**
A_23_P105442	**GRASP**	458,6	176,3	**0,02144**
A_32_P191895	**BC045716**	723,9	294,3	**0,02178**
A_24_P925565	**THC2633747**	30,7	64,9	**0,02220**
A_23_P20443	**LZTS1**	169,8	8,1	**0,02221**
A_23_P137173	**TMSL8**	76,1	5,7	**0,02235**
A_23_P106617	**WFDC1**	259,8	14,1	**0,02276**
A_32_P181297	**ST7OT1**	88,3	39,0	**0,02284**
A_23_P256384	**PSIP1**	69,3	28,8	**0,02351**
A_24_P408047	**PLEKHA4**	259,9	112,7	**0,02443**
A_23_P435833	**FUBP3**	241,6	116,2	**0,02452**
A_23_P82929	**NOV**	650,8	164,0	**0,02470**
A_23_P21457	**NMD3**	154,6	71,8	**0,02496**
A_23_P52410	**PLEKHK1**	236,2	92,9	**0,02509**
A_24_P570930	**BF364571**	30,7	64,2	**0,02549**
A_24_P200652	**C6orf62**	3537,5	1577,1	**0,02574**
A_23_P14302	**C14orf139**	612,2	280,1	**0,02575**
A_23_P66454	**GSDML**	281,3	572,7	**0,02605**
A_23_P21976	**CSPG4**	150,2	64,2	**0,02627**
A_32_P101235	**UHRF1**	179,9	70,5	**0,02684**
A_24_P83758	**ENST00000292728**	254,5	515,3	**0,02687**
A_23_P143526	**S100B**	170,1	8,2	**0,02753**
A_23_P14193	**RFC3**	235,8	87,0	**0,02781**
A_24_P920730	**BU608568**	25,4	54,1	**0,02847**
A_24_P319613	**NEK2**	90,6	23,6	**0,02893**
A_24_P392109	**CENPN**	1216,7	548,7	**0,02900**
A_24_P416079	**NUSAP1**	292,8	95,8	**0,02927**
A_32_P22702	**PSIP1**	147,1	58,4	**0,02938**
A_23_P145916	**AEBP1**	252,1	112,6	**0,03089**
A_23_P80032	**E2F1**	409,0	180,8	**0,03099**

Tableau 13 (suite et fin)

ProbeName	GeneSymbol	Fluo 0h	Fluo expo	p-value
A_24_P333357	**AK090463**	34,2	87,0	**0,03116**
A_23_P111701	**GNG11**	930,3	382,8	**0,03126**
A_23_P155765	**HMGB2**	6895,2	2309,0	**0,03142**
A_23_P92441	**MAD2L1**	1975,1	824,8	**0,03195**
A_23_P35871	**E2F8**	67,5	20,5	**0,03253**
A_32_P129010	**C1orf190**	275,2	118,4	**0,03306**
A_23_P356684	**ANLN**	539,4	197,7	**0,03387**
A_23_P313938	**PPIF**	24,4	55,6	**0,03390**
A_23_P307328	**WHSC1**	134,5	54,7	**0,03430**
A_24_P741378	**THC2531058**	54,9	146,4	**0,03462**
A_23_P212050	**BCHE**	325,4	131,8	**0,03502**
A_24_P272561	**ZDHHC13**	158,8	62,6	**0,03654**
A_32_P24165	**FANCD2**	827,6	354,6	**0,03660**
A_23_P420551	**CIT**	807,9	249,1	**0,03777**
A_23_P111995	**LOXL2**	254,1	105,2	**0,03782**
A_24_P117410	**KLHDC7B**	192,0	84,8	**0,03808**
A_23_P93032	**ZBED3**	1463,9	724,1	**0,03857**
A_24_P732565	**THC2650367**	38,5	86,9	**0,03910**
A_32_P202502	**EFHA2**	178,7	84,8	**0,03949**
A_23_P29257	**H1F0**	2153,1	1036,0	**0,03979**
A_23_P163099	**POLE2**	155,6	55,4	**0,04004**
A_23_P115872	**CEP55**	2658,9	891,9	**0,04084**
A_24_P277576	**TRIP13**	134,2	54,8	**0,04102**
A_23_P143713	**APOBEC3G**	90,8	43,3	**0,04283**
A_23_P35219	**NEK2**	290,4	88,7	**0,04284**
A_32_P115515	**AK026131**	25,9	70,8	**0,04309**
A_32_P119154	**BE138567**	121,4	39,8	**0,04429**
A_23_P201988	**MASTL**	81,2	38,6	**0,04441**
A_23_P107421	**TK1**	66792,9	30042,4	**0,04588**
A_23_P48669	**CDKN3**	928,1	310,3	**0,04658**
A_32_P188921	**BC007606**	1449,1	487,0	**0,04686**
A_24_P171873	**FBXO4**	110,7	51,6	**0,04765**
A_23_P74349	**NUF2**	1296,7	457,7	**0,04825**
A_23_P49878	**FAM64A**	2099,2	738,8	**0,04878**

Tableau 14 : Annotation fonctionnelle des gènes sélectionnés par le logiciel DAVID

GOTERM_Biological Process						
Term	Nombre de gènes dans la liste	%	Fold Enrichment	PValue	Benjamini	Genes (GenbankAccession number)
GO:0022403~cell cycle phase	13	12,15%	6,45	0,000001	0,003430	BC007606, NM_001798, NM_015225, NM_002358, NM_018131, NM_018695, NM_145697, NM_005225, NM_007174, NM_001262, NM_002497, NM_005192, NM_016358,
GO:0000278~mitotic cell cycle	12	11,21%	6,66	0,000002	0,004057	BC007606, NM_005225, NM_007174, NM_001798, NM_002358, NM_018131, NM_001262, NM_018695, NM_002497, NM_016358, NM_005192, NM_145697,
GO:0007049~cell cycle	18	16,82%	3,55	0,000008	0,013396	BC007606, NM_001018115, NM_001798, NM_015225, NM_013282, NM_002358, NM_018131, NM_018695, NM_024890, NM_145697, NM_005225, NM_007174, NM_004350, NM_001262, NM_002497, NM_016358, NM_005192, NM_021020,
GO:0007067~mitosis	9	8,41%	7,00	0,000040	0,050727	BC007606, NM_007174, NM_001798, NM_002358, NM_018131, NM_018695, NM_002497, NM_016358, NM_145697,
GO:0000087~M phase of mitotic cell cycle	9	8,41%	6,94	0,000042	0,043353	BC007606, NM_007174, NM_001798, NM_002358, NM_018131, NM_018695, NM_002497, NM_016358, NM_145697,
GO:0022402~cell cycle process	15	14,02%	3,54	0,000066	0,056074	BC007606, NM_001798, NM_015225, NM_002358, NM_018131, NM_018695, NM_145697, NM_005225, NM_007174, NM_004350, NM_001262, NM_002497, NM_005192, NM_016358, NM_021020,
GO:0051301~cell division	9	8,41%	6,48	0,000088	0,049686	BC007606, NM_007174, NM_001798, NM_002358, NM_018131, NM_018695, NM_002497, NM_016358, NM_145697,
GO:0000279~M phase	9	8,41%	5,54	0,000203	0,124569	BC007606, NM_007174, NM_001798, NM_002358, NM_018131, NM_018695, NM_002497, NM_016358, NM_145697,
GO:0051325~interphase	6	5,61%	10,81	0,000221	0,120956	BC007606, NM_005225, NM_015225, NM_001798, NM_001262, NM_005192,
GO:0051325~interphase	6	5,61%	10,81	0,000221	0,120956	BC007606, NM_005225, NM_015225, NM_001798, NM_001262, NM_005192,
GO:0048518~positive regulation of biological process	17	15,89%	2,71	0,000374	0,178567	BC007606, NM_019028, NM_001798, NM_015225, NM_016288, NM_000679, NM_001312, NM_005994, NM_002615, NM_004329, NM_005225, NM_006272, NM_004350, NM_002507, NM_002852, NM_001262, NM_016358,
GO:0048522~positive regulation of cellular process	16	14,95%	2,84	0,000383	0,187334	BC007606, NM_019028, NM_001798, NM_015225, NM_016288, NM_000679, NM_001312, NM_005994, NM_004329, NM_005225, NM_006272, NM_004350, NM_002507, NM_002852, NM_001262, NM_016358,
GO:0008283~cell proliferation	14	13,08%	3,11	0,000460	0,182397	NM_001798, NM_013282, NM_000679, NM_001312, NM_005994, NM_002615, NM_004329, NM_001311, NM_006272, NM_004102, NM_005225, NM_004350, NM_001262, NM_005192,
GO:0007088~regulation of mitosis	5	4,67%	12,61	0,000634	0,226063	BC007606, NM_002358, NM_018695, NM_002497, NM_016358,
GO:0051329~interphase of mitotic cell cycle	5	4,67%	9,60	0,001760	0,483657	BC007606, NM_005225, NM_001798, NM_001262, NM_005192,
GO:0000074~regulation of progression through cell cycle	10	9,35%	3,36	0,002677	0,609015	BC007606, NM_004350, NM_001798, NM_002358, NM_001262, NM_018695, NM_002497, NM_016358, NM_005192, NM_021020,
GO:0051726~regulation of cell cycle	10	9,35%	3,34	0,002781	0,599298	BC007606, NM_004350, NM_001798, NM_002358, NM_001262, NM_018695, NM_002497, NM_016358, NM_005192, NM_021020,
GO:0006259~DNA metabolic process	13	12,15%	2,67	0,002938	0,597155	NM_001018115, NM_001798, NM_013282, NM_006318, NM_006527, NM_003259, NM_002129, NM_175850, NM_002915, NM_007331, NM_033512, NM_002692, NM_006479,

Tableau 14 (suite)

GOTERM_Biological Process						
Term	Nombre de gènes dans la liste	%	Fold Enrichment	PValue	Benjamini	Genes (GenbankAccession number)
GO:0048856~anatomical structure development	23	21,60%	1,89	0,003134	0,599946	NM_016269, NM_000679, NM_001312, NM_005099, NM_005994, NM_002615, NM_014476, NM_002514, NM_004329, NM_001897, NM_006617, NM_015103, NM_005225, NM_006272, NM_007174, NM_002507, BC087840, NM_001262, NM_002101, NM_007331, NM_021197, NM_001129, NM_014571,
GO:0048731~system development	20	18,69%	2,01	0,003483	0,618975	NM_016269, NM_000679, NM_001312, NM_005099, NM_005994, NM_002615, NM_014476, NM_004329, NM_006617, NM_001897, NM_015103, NM_005225, NM_006272, NM_007174, NM_002507, BC087840, NM_001262, NM_002101, NM_001129, NM_014571,
GO:0006281~DNA repair	7	6,54%	4,63	0,003841	0,636165	NM_001018116, NM_013282, NM_002129, NM_002915, NM_005527, NM_002692, NM_006479,
GO:0007059~chromosome segregation	4	3,74%	11,21	0,005283	0,734269	NM_002358, NM_002497, NM_016359, NM_145697,
GO:0051276~chromosome organization and biogenesis	8	7,48%	3,58	0,006552	0,791951	NM_002358, NM_002129, NM_007331, NM_005318, NM_002497, NM_005527, NM_016359, NM_033512,
GO:0051276~chromosome organization and biogenesis	8	7,48%	3,58	0,006552	0,791951	NM_002358, NM_002129, NM_007331, NM_005318, NM_002497, NM_005527, NM_016359, NM_033512,
GO:0050789~regulation of biological process	39	36,45%	1,45	0,006631	0,781237	NM_152278, NM_015225, NM_033222, NM_021144, NM_012231, NM_002514, NM_004329, NM_005225, NM_004102, NM_004350, NM_002129, NM_002507, NM_002852, NM_002497, NM_021197, NM_016359, NM_005192, NM_014571, NM_021020, NM_021622, NM_003276, BC007606, NM_019028, NM_001798, NM_016269, NM_013282, NM_002358, NM_000679, BE138567, NM_001312, NM_018685, NM_005994, NM_002615, NM_024680, NM_006272, NM_175850, BC087840, NM_007331, NM_001262, NM_018952,
GO:0006974~response to DNA damage stimulus	7	6,54%	3,81	0,009636	0,869318	NM_001018116, NM_013282, NM_002129, NM_002915, NM_005527, NM_002692, NM_006479,
GO:0048513~organ development	15	14,02%	2,07	0,011439	0,902197	NM_016269, NM_000679, NM_001312, NM_005099, NM_005994, NM_002615, NM_014476, NM_004329, NM_001897, NM_015103, NM_005225, NM_002507, BC087840, NM_002101, NM_001129,
GO:0050794~regulation of cellular process	36	33,64%	1,44	0,011666	0,898070	NM_152278, NM_015225, NM_033222, NM_021144, NM_012231, NM_002514, NM_004329, NM_005225, NM_004102, NM_004350, NM_002129, NM_002507, NM_002852, NM_002497, NM_021197, NM_016359, NM_005192, NM_014571, NM_021020, NM_003276, BC007606, NM_019028, NM_001798, NM_013282, NM_002358, NM_016269, NM_000679, BE138567, NM_001312, NM_018685, NM_005994, NM_024680, NM_006272, BC087840, NM_007331, NM_001262, NM_018952,
GO:0000070~mitotic sister chromatid segregation	3	2,80%	17,09	0,012968	0,913644	NM_002358, NM_002497, NM_016359,
GO:0000819~sister chromatid segregation	3	2,80%	16,55	0,013783	0,919091	NM_002358, NM_002497, NM_016359,
GO:0000910~cytokinesis	3	2,80%	16,05	0,014619	0,910900	BC007606, NM_018685, NM_016359,
GO:0007417~central nervous system development	6	5,61%	4,07	0,015331	0,914541	NM_005225, NM_006272, NM_016269, NM_002507, NM_001262, NM_006617,

Tableau 14 (suite)

GOTERM_Biological Process						
Term	Nombre de gènes dans la liste	%	Fold Enrichment	PValue	Benjamini	Genes (GenbankAccession number)
GO:0032502~developmental process	28	26,17%	1,52	0,017767	0,937349	NM_015225, NM_002318, NM_002514, NM_004329, NM_006617, NM_015103, NM_005225, NM_004350, NM_002507, NM_001129, NM_021197, NM_014571, BC007606, NM_016269, NM_000679, NM_005099, NM_001312, NM_005994, NM_002615, NM_014476, NM_001897, NM_006272, NM_007174, BC087840, NM_007331, NM_002101, NM_001262, NM_018952,
GO:0009653~anatomical structure morphogenesis	13	12,15%	2,03	0,023599	0,969361	NM_016269, NM_000679, NM_002615, NM_002514, NM_004329, NM_001897, NM_015103, NM_006272, NM_002507, NM_001262, NM_002101, NM_007331, NM_021197,
GO:0009719~response to endogenous stimulus	7	6,54%	3,07	0,025469	0,974355	NM_001018115, NM_013282, NM_002129, NM_002915, NM_005527, NM_002662, NM_006479,
GO:0009887~organ morphogenesis	7	6,54%	2,98	0,028852	0,982539	NM_015103, NM_016269, NM_002507, NM_000679, NM_002101, NM_002615, NM_001897,
GO:0007399~nervous system development	10	9,35%	2,26	0,030155	0,983836	NM_005225, NM_006272, NM_007174, NM_016269, NM_002507, BC087840, NM_001262, NM_002615, NM_014571, NM_006617,
GO:0022008~neurogenesis	6	5,61%	3,40	0,030716	0,983391	NM_006272, NM_007174, NM_002507, BC087840, NM_001262, NM_002615,
GO:0022008~neurogenesis	6	5,61%	3,40	0,030716	0,983391	NM_006272, NM_007174, NM_002507, BC087840, NM_001262, NM_002615,
GO:0022008~neurogenesis	6	5,61%	3,40	0,030716	0,983391	NM_006272, NM_007174, NM_002507, BC087840, NM_001262, NM_002615,
GO:0022008~neurogenesis	6	5,61%	3,40	0,030716	0,983391	NM_006272, NM_007174, NM_002507, BC087840, NM_001262, NM_002615,
GO:0006917~induction of apoptosis	5	4,67%	4,14	0,031619	0,983712	NM_006272, NM_004350, NM_015225, NM_002507, NM_001262,
GO:0012502~induction of programmed cell death	5	4,67%	4,13	0,032088	0,983091	NM_006272, NM_004350, NM_015225, NM_002507, NM_001262,
GO:0065007~biological regulation	39	36,45%	1,31	0,032851	0,981474	NM_152278, NM_015225, NM_033222, NM_021144, NM_012231, NM_002514, NM_004329, NM_005225, NM_004102, NM_004350, NM_002129, NM_002507, NM_002852, NM_002497, NM_021197, NM_016369, NM_005192, NM_014571, NM_021020, NM_021822, NM_003276, BC007606, NM_019028, NM_001798, NM_016269, NM_013282, NM_002358, NM_000679, BE138567, NM_001312, NM_018685, NM_005994, NM_002615, NM_024660, NM_006272, NM_175850, BC087840, NM_007331, NM_001262, NM_018952,
GO:0007275~multicellular organismal development	21	19,63%	1,58	0,033253	0,980716	NM_016269, NM_000679, NM_001312, NM_005099, NM_005994, NM_002615, NM_014476, NM_004329, NM_006617, NM_001897, NM_015103, NM_005225, NM_006272, NM_007174, NM_002507, BC087840, NM_001262, NM_002101, NM_001129, NM_018952, NM_014571,

Tableau 14 (suite)

GOTERM_Biological Process						
Term	Nombre de gènes dans la liste	%	Fold Enrichment	PValue	Benjamini	Genes (GenbankAccession number)
GO:0043283~biopolymer metabolic process	39	36,45%	1,28	0,046425	0,995615	NM_152279, NM_001018115, NM_012176, NM_032844, NM_012231, NM_033222, NM_021144, NM_002318, NM_004329, NM_005225, NM_004237, NM_004350, NM_003258, NM_002129, NM_002915, NM_002497, NM_005192, NM_014571, NM_021020, NM_021822, NM_033512, NM_001013815, NM_006479, NM_001798, NM_005433, NM_013282, NM_016269, NM_000679, NM_005318, NM_005994, NM_005527, NM_024680, NM_007174, NM_175950, BC097940, NM_007331, NM_002101, NM_018952, NM_002692, NM_053025,
GO:0032502~developmental process	28	26,17%	1,52	0,017767	0,937349	NM_015225, NM_002318, NM_002514, NM_004329, NM_006617, NM_015103, NM_005225, NM_004350, NM_002507, NM_001129, NM_021197, NM_014571, BC007606, NM_016269, NM_000679, NM_005099, NM_001312, NM_005994, NM_002615, NM_014476, NM_001897, NM_006272, NM_007174, BC067840, NM_007331, NM_002101, NM_001262, NM_018952,
GO:0009653~anatomical structure morphogenesis	13	12,15%	2,03	0,023599	0,989361	NM_016269, NM_000679, NM_002615, NM_002514, NM_004329, NM_001897, NM_015103, NM_006272, NM_002507, NM_001262, NM_002101, NM_007331, NM_021197,
GO:0009719~response to endogenous stimulus	7	6,54%	3,07	0,025469	0,974355	NM_001018115, NM_013282, NM_002129, NM_002915, NM_005527, NM_002692, NM_006479,
GO:0009887~organ morphogenesis	7	6,54%	2,98	0,028852	0,982539	NM_015103, NM_016269, NM_002507, NM_000679, NM_002101, NM_002615, NM_001897,

Tableau 14 (suite et fin)

GOTERM_Cellular Component						
Term	Nombre de gènes dans la liste	%	Fold Enrichment	PValue	Benjamini	Genes (GenbankAccession number)
GO:0005694~chromosome	10	9,36%	4,48	0,000362	0,269623	NM_001018115, BC007606, NM_018455, NM_002358, NM_002129, NM_002915, NM_005318, NM_002497, NM_145697, NM_003276,
GO:0044427~chromosomal part	8	7,48%	4,23	0,002694	0,669830	BC007606, NM_018455, NM_002358, NM_002129, NM_002915, NM_005318, NM_145697, NM_003276,
GO:0005634~nucleus	40	37,38%	1,48	0,004260	0.709180	NM_162278, NM_018465, NM_001018115, NM_181711, NM_012231, NM_033222, NM_021144, NM_005225, NM_004237, NM_004350, NM_002129, NM_002507, NM_002915, NM_002497, NM_016359, NM_014571, NM_021020, NM_021922, NM_033512, NM_003276, NM_006479, NM_000055, BC007606, NM_001798, NM_016269, NM_013282, NM_002358, NM_024945, NM_005318, NM_018665, NM_005994, NM_024680, NM_145697, NM_006272, NM_175850, BC087840, NM_004878, NM_007331, NM_001262, NM_018952, NM_002692,
GO:0000775~chromosome, pericentric region	4	3,74%	9,44	0,008513	0,843573	BC007606, NM_018455, NM_002358, NM_145697,
GO:0005576~extracellular region	15	14,02%	1,92	0,021362	0,976449	NM_000055, NM_007046, NM_005099, NM_002318, NM_002615, NM_032603, NM_002514, NM_001897, NM_006272, NM_020404, NM_002852, NM_001034852, NM_021197, NM_006486, NM_017549,
GO:0005667~transcription factor complex	5	4,67%	4,42	0,025882	0,977484	NM_005225, NM_001798, NM_016269, NM_005994, NM_024680,
GO:0005578~proteinaceous extracellular matrix	6	5,61%	3,01	0,047893	0,995132	NM_020404, NM_007046, NM_005099, NM_001034852, NM_006486, NM_001897,
GOTERM_Molecular Function						
Term	Nombre de gènes dans la liste	%	Fold Enrichment	PValue	Benjamini	Genes (GenbankAccession number)
GO:0003677~DNA binding	23	21,50%	1,69	0,011870	1,000000	NM_013282, NM_016269, NM_032367, NM_033222, NM_021144, NM_012231, NM_005318, NM_005994, NM_024680, NM_005225, NM_004350, NM_175850, NM_002129, NM_002915, BC087840, NM_007331, NM_001128, NM_016359, NM_018952, NM_014571, NM_021020, NM_002692, NM_003276, NM_006479,
GO:0016772~transferase activity, transferring phosphorus-containing groups	14	13,08%	2,12	0,013031	0,999997	NM_001798, NM_005433, NM_032844, NM_012231, BE138567, NM_004329, NM_007174, NM_003269, NM_002915, NM_001262, NM_002497, NM_005192, NM_002692, NM_053025,
GO:0003700~transcription factor activity	12	11,21%	2,09	0,025697	1,000000	NM_005225, NM_004350, NM_016269, NM_013282, NM_002129, NM_012231, NM_005994, NM_001128, NM_018952, NM_024680, NM_014571, NM_021020,

Discussion/Perspectives

L'exposition à des champs électromagnétiques artificiels, partie intégrante de notre vie moderne, ne cesse de croître avec l'utilisation des nouvelles technologies. Depuis quelques années, des questions commencent à être soulevées quant à l'innocuité de ces ondes et l'inquiétude sociétale ne cesse de grandir. L'accumulation d'expositions à des ondes de faible puissance peut-elle être néfaste à long terme ? L'appréhension se cristallise essentiellement, tout du moins pour le moment, sur la dangerosité potentielle des lignes à haute tension et des communications sans fil. Au cours de cette discussion, nous n'évoquerons pas les problèmes posés par les basses fréquences. Concernant le domaine des communications sans fil, les recherches sur les éventuels effets de la téléphonie mobile tiennent le haut du pavé, bien que d'autres technologies ne soient pas en reste (Wi-fi, Bluetooth). Pour ces dernières, les études scientifiques demeurent néanmoins, en comparaison, relativement confidentielles. Le problème des ondes et de la société est relativement paradoxal. La population désire bénéficier d'avancées technologiques majeures le plus rapidement possible, sans avoir toutefois à en supporter les contraintes matérielles, qui consistent notamment en l'implantation d'antennes relais par exemple. Il n'est plus rare, depuis quelques années, d'assister, à des manifestations de riverains mécontents de l'installation future d'une ligne à haute tension ou d'une implantation d'antenne relais de téléphonie mobile. En 2008-2009, des décisions de justice ont par exemple contraint certains opérateurs à démonter leurs antennes relais au nom du principe de précaution.

Les autorités politiques ont très rapidement compris que ces technologies suscitaient un malaise grandissant. En France, dès 2002, un rapport sénatorial de santé publique concernant « l'incidence éventuelle de la téléphonie mobile sur la santé » a été rédigé [175]. Basé sur les dernières études portant sur l'effet possible des ondes, ce rapport soulignait que les signaux de téléphonie mobile n'induisaient pas le cancer ou ne favorisaient pas la prolifération des tumeurs. Les travaux à cette époque étaient cependant majoritairement menés sur l'exposition de la tête à un téléphone mobile et prenaient très peu en compte les antennes relais. En parallèle, cette étude laissait apparaître que les populations n'étaient pas forcément bien informées sur les risques potentiels de ces types d'ondes. Des efforts ont donc été menés non seulement pour tenter d'apaiser les craintes de la population mais aussi pour mieux les informer. Dans ce but, l'agence Nationale des Fréquences (ANFR) a proposé un site internet, sur lequel il est possible de connaître les différents types d'antennes implantées dans sa commune, ainsi que leurs puissances d'émissions respectives [176]. Dans le même esprit, la

Fondation Santé et Radiofréquences a été créée en 2005 sous l'impulsion du ministère chargé de la recherche et a pour mission de définir, promouvoir et financer :

1) des programmes de recherche épidémiologique, expérimentale et sociologique sur les effets de l'exposition des personnes aux ondes radio
2) des programmes de diffusion des connaissances sur ce sujet auprès du public et des professionnels [177].

C'est donc dans ce contexte actuel, et préalablement à toute commercialisation massive, que nous avons décidé d'étudier les effets potentiels des ondes MM employées dans les futurs systèmes de communications sans fil.

Les applications utilisant les ondes MM ne constituent pas, pour le moment, d'inquiétude particulière. L'emploi grand public de ce type de technologie restant en effet relativement restreint. Les systèmes de dispersion de la foule (94 GHz), dont le but consiste clairement à provoquer un effet thermique pour repousser des manifestants [39] ne sont pas encore connus du grand public ou pas du tout utilisés en France par exemple.

De même, l'usage des ondes MM dans le domaine médical est uniquement répandu dans de nombreux pays d'Europe de l'Est. Il résulte néanmoins de cette dernière application qu'un effet biologique de ces ondes est possible, mais les travaux menés dans ce domaine ne permettent pas d'exclure la possibilité selon laquelle ces effets biologiques seraient indépendants d'un effet lié à une augmentation de température. Les mécanismes d'actions précis restent encore à déterminer. Aussi, l'usage prochain de ces mêmes ondes à des fins de télécommunications suscite des interrogations quant à leur innocuité.

Les appareils utilisant les ondes MM autour de 60 GHz vont, selon toute vraisemblance, progressivement s'imposer dans les foyers des consommateurs ou encore dans leur environnement de travail (tout du moins dans les bureaux). Ils induiront inévitablement des expositions fréquentes voire permanentes à un nouveau type d'ondes, qui sont naturellement absentes du spectre électromagnétique environnemental. L'importance du contexte sociétal, en matière d'inquiétude sur les ondes nous pousse, au nom du principe de précaution à tenter de déterminer, avant une commercialisation massive, si des ondes d'un type nouveau, employées dans des systèmes de télécommunications sans fil, peuvent ou non présenter un risque pour la santé.

En nous basant sur les données bibliographiques, il nous est apparu que de nombreuses études démontraient l'existence d'effets biologiques potentiels de ces ondes MM, notamment

sur les organites riches en membranes ou encore sur les échanges ioniques [61, 71, 72]. De même, les résultats obtenus par certaines études amènent à penser que la synthèse et la sécrétion de protéines pourraient être altérées et/ou favorisées [62]. À l'étude de ces faits, le RE paraît constituer une cible potentielle idéale. Cet organite est par ailleurs connu pour être particulièrement sensible à son environnement, puisque certaines variations brutales peuvent provoquer une perturbation de son homéostasie, laissant alors le RE dans une situation de stress réticulaire. Pour retrouver le plus rapidement possible une situation « normale », les cellules vont alors déclencher une réponse graduée, en plusieurs étapes, appelée réponse UPR, se traduisant notamment par la réduction de synthèse des protéines sécrétées et transmembranaires, une maturation des facteurs de transcription spécifiques de cette voie et une synthèse spécifique de chaperons du réticulum.

Ayant en tête ce mécanisme, nous avons voulu voir si les ondes MM à une fréquence de 60,4 GHz (proche de celles prochainement utilisées en télécommunications) et à une DSP de 0,14 mW/cm², pouvaient induire un stress réticulaire. Pour réaliser cette analyse, nous avons effectué l'approche la plus communément répandue dans la littérature, qui consiste à étudier les niveaux d'expression des ARNm des chaperons du RE, tel que BiP par exemple [178], que nous avons ensuite complémentée par le contrôle de la maturation du messager du facteur de transcription XBP-1, ce dernier subissant, en cas de stress réticulaire, un épissage alternatif. Enfin, nous avons employé un test alternatif basé sur la sécrétion d'une enzyme sensible au stress réticulaire, la SEAP [144]. Au cours de ce travail, des analyses ont été réalisées à différents niveaux afin de déterminer le test biologique le plus adapté (le plus fiable mais aussi le plus sensible) à l'étude du stress réticulaire. De plus, grâce à cette approche en plusieurs étapes, nous voulions assurer que nous ne passions pas à côté d'un évènement biologique lié à la réponse du RE. Ces expériences ont démontré que l'exposition de cellules U-251 MG à des ondes MM de très faible puissance n'ont aucun effet sur ce modèle d'étude, quelle que soit la durée d'exposition (24, 48 ou 72h) ou encore le test biologique employé. Elles nous ont cependant permis de conserver l'étude des niveaux d'expression des messagers des chaperons du RE comme test biologique le plus approprié pour la suite de nos expériences.

À la suite de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'existence possible d'effets pouvant dépendre spécifiquement de la fréquence. Nous avons sélectionné des groupes de fréquences correspondant aux raies spectrales de molécules ou de groupement moléculaires qui n'existent certes pas directement au sein de l'organisme mais qui contiennent toutefois

des atomes qui constituent les éléments clefs du vivant. Les études se sont une nouvelle fois portées sur le stress réticulaire. Après 24h d'exposition, toujours à la DSP de 0,14 mW/cm², nous n'avons pas mis en évidence d'effet sur la synthèse des chaperons du RE.

La limite principale de notre ancien système d'exposition reposait dans sa DSP. Si celle-ci correspondait à ce que pouvait recevoir un usager dans des conditions normales d'utilisation, à quelques mètres de l'antenne, elle ne nous permettait pas, en revanche, d'atteindre, tout du moins en champ lointain, les seuils d'exposition grand public et/ou travailleurs. L'acquisition d'un nouveau générateur nous a permis d'atteindre et même de dépasser légèrement ce seuil d'exposition grand public (toujours en champ lointain). Avec ce nouveau dispositif, nous avons tenté de déterminer si les ondes MM à des DSP proches des seuils d'exposition grand public pouvaient induire un stress réticulaire. La mesure des niveaux d'expression des ARNm des chaperons du RE, BIP et ORP150, n'a pas permis de montrer l'existence d'un stress réticulaire après 24h d'exposition à deux DSP (0,75 mW/cm² et 1,15 mW/cm²) ou après des expositions à une seule DSP mais à des temps plus courts (1h et 6h) dans deux lignées cellulaires différentes issues de la peau. Afin de vérifier que l'absence de résultats au sein de nos deux lignées ne soit pas liée à un problème technique, expérimental ou à un défaut de réponse de notre modèle biologique, nous avons mené en parallèle tous les contrôles nécessaires. Ainsi, nos travaux montrent que le RE ne semble donc pas constituer une cible potentielle des ondes MM, à des fréquences et des DSP proches de celles utilisées en télécommunications.

Nous nous sommes par la suite penchés sur l'existence d'effets synergiques potentiels. L'idée repose sur l'hypothèse suivante : puisque les ondes MM sont incapables d'induire le stress réticulaire, elles pourraient cependant avoir des effets indirects, pouvant se traduire par des altérations/accélérations de processus physiologiques, liés à cette réponse UPR, engendrée par d'autres sources de stress (chimiques), à la suite d'un traitement médical ou à une exposition à des polluants par exemple.

L'étude de la littérature suggère que les ondes MM sont capables d'avoir des effets synergiques, ces derniers étant notamment retrouvés lors de l'utilisation combinée d'un médicament anticancéreux avec la thérapie par ondes MM. Par exemple, Makar et collègues ont entrepris des expérimentations sur des souris traitées avec un médicament anticancéreux, le CPA, responsable de nombreux effets adverses, et démontré que les ondes MM pouvaient restaurer les propriétés de certaines cellules clefs du système immunitaire, tels que les

lymphocytes T, les cellules NK ou les macrophages, dont les fonctions étaient souvent altérées en raison du traitement à ce médicament [64, 65, 179].

À notre connaissance, peu d'études portant sur les effets conjoints des ondes, à des fréquences utilisées en télécommunications, et de différents types de stress cellulaires sont menées. Il est pourtant important de chercher à comprendre si, dans notre environnement quotidien, où nous sommes déjà soumis en permanence à de nombreuses sources de pollutions, les ondes électromagnétiques MM sont capables d'accélérer un mécanisme de stress. Ce type d'étude pourrait s'inscrire dans le cadre d'une recherche d'effets possibles des ondes à long terme.

Au cours d'une étude que nous avons débutée au sein de notre laboratoire, nous avons observé les effets combinés d'une exposition aux ondes à 60,4 GHz associée à un traitement à la TG, agent inducteur du stress RE. Ces travaux laissent apparaître une variation des activités transcriptionnelles entre les cellules exposées et les cellules sham. Toutefois, ces résultats sont pour le moment préliminaires et nécessitent d'être confirmés. S'ils soulèvent une piste intéressante de recherche, nous devons avant tout vérifier que le phénomène observé est dépendant de la puissance à laquelle nous travaillons ou encore du modèle biologique employé. Pour l'instant, il ne serait pas rigoureux de notre part de comparer les deux expériences que nous avons menées, sachant que ces résultats ont été obtenus à partir de deux systèmes d'exposition différents, sur deux lignées cellulaires différentes. Il est important de garder à l'esprit que parmi les quelques expériences de synergie réalisées dans le domaine de la téléphonie mobile, certaines d'entre-elles ont d'abord conclu que l'exposition aux ondes pouvait altérer l'ADN, avant de se rétracter par la suite en raison de conditions expérimentales mal contrôlées [17]. Des expériences supplémentaires restent donc à mener, notamment en réalisant des comparaisons exactes entre deux voire trois lignées cellulaires différentes (cultivées, transfectées, exposées et traitées dans les mêmes conditions).

L'étape suivante de nos travaux s'est une nouvelle fois basée sur des données bibliographiques. Des expositions aux ondes MM à des fréquences thérapeutiques ont provoqué une modification de la sécrétion de protéines impliquées dans la réponse inflammatoire dans des cellules de la peau [62]. De même, les travaux menés par Millenbaugh en 2006 ont démontré que les ondes MM pouvaient moduler les niveaux d'expression des messagers de protéines impliquées dans la réponse inflammatoire [152]. Ces observations viendraient donc étayer l'hypothèse selon laquelle les mécanismes d'action des ondes (au niveau thérapeutique) pourraient provenir de leur capacité à stimuler spécifiquement certaines

cellules, qui en réponse synthétiseraient des molécules à fort pouvoir biologique, notamment des protéines sécrétées impliquées dans la signalisation de la réponse inflammatoire [61].

Un léger effet biologique a été observé lorsque les cellules étaient exposées à la DSP de 1,15 mW/cm². Celui-ci consiste en une répression des niveaux d'expression des messagers des chimiokines et ce phénomène est retrouvé au sein des deux lignées cellulaires employées, même s'il existe une variation quant à l'apparition de cette répression, qui peut néanmoins s'expliquer par la spécificité intrinsèque propre à chaque lignée cellulaire. Toutefois, en parallèle à ces répressions, nous devons déplorer l'existence possible d'effets thermiques caractérisés par une légère hausse d'expression des messagers des gènes de réponse au choc thermique. Ce phénomène est assez troublant, puisque lorsque l'on s'attarde sur la littérature, on se rend compte qu'habituellement c'est plutôt le phénomène inverse (l'élévation de température est responsable d'une induction importante de la synthèse de messagers des chimiokines) qui est observé. De même, Millenbaugh et collègues ont démontré le même phénomène après analyse de la peau prélevée 6 heures ou 24 heures après exposition à des ondes MM à des DSP provoquant des effets thermiques [152]. Quelle est alors la nature exacte du phénomène observé au niveau de nos lignées cellulaires ? S'agit-il d'une augmentation locale de température ne concernant que quelques cellules, sachant que les ARN des cellules utilisés en PCR en temps réel sont issus de trois puits regroupés ensemble ? Y a-t-il à proprement parler un effet des ondes MM ? Des travaux ont démontré que les ondes MM (à des fréquences correspondantes à celles utilisées en thérapie) étaient capables de réduire significativement la taille des œdèmes, dans des modèles d'inflammation aiguë chez la souris [180] et ce, à des DSP relativement basses, puisque comprises entre 0,1 et 0,7 mW/cm². Des expériences complémentaires restent donc à mener afin de comprendre les mécanismes exacts mis en jeu. L'acquisition de la caméra IR nous permettra par ailleurs, dans un futur proche, de pouvoir caractériser plus précisément nos conditions d'exposition et notamment de confirmer ou non l'existence d'une élévation locale de température, afin de déterminer si les effets biologiques observés y sont corrélés. Si tel est le cas, il sera alors possible de considérer que les techniques de dosimétrie et de modélisation numériques sont suffisantes pour établir une norme (comme c'est le cas actuellement), cette dernière pouvant alors être extrapolée à tous les types d'ondes. Dans le cas contraire, nous serions alors en présence d'un effet lié au rayonnement électromagnétique seul. Ce phénomène, jamais rencontré jusqu'alors nécessiterait de réaliser ce genre d'études en fonction de la fréquence,

d'autant que certaines études suggèrent que l'effet biologique des ondes, notamment en thérapie, pourrait être dépendant de la fréquence utilisée.

Les prochaines expériences que nous envisageons de mener consistent à placer les cellules en champ proche. À ce niveau, nous pourrons exposer les cellules à de très fortes DSP sans pour autant avoir à changer de générateur. Les travaux de modélisation ont permis d'estimer que nous pourrions soumettre les cellules à plusieurs dizaines, voire des centaines de mW/cm², franchissant ainsi allègrement les normes d'exposition. Nous serons sans aucun doute confrontés au risque d'observer un effet thermique. Les ondes MM sont capables de se concentrer sur une très faible épaisseur. Aussi, le DAS est souvent beaucoup plus important dans ce domaine que dans celui de la téléphonie mobile par exemple. Ceci entraîne donc un risque accru d'élévation de température. Pour éviter cet écueil, des expériences de modélisation de l'élévation de la température, ainsi que des mesures expérimentales sont encore à réaliser.

L'ensemble des travaux menés précédemment au cours de ce travail nous a permis de répondre aux hypothèses émises à la suite d'une étude attentive de la bibliographie. Les recherches ont permis de conclure à l'absence d'effet sur le RE (pas de variation des niveaux d'expression des chaperons majeurs du RE), ont démontré un possible effet synergique ondes/stress réticulaire, lequel reste à caractériser expérimentalement, ou ont peut-être permis de dégager un effet biologique (répression des niveaux d'expression des messagers de chimiokines) qui peut cependant être lié à une augmentation locale de température.

Nous avons cessé de nous restreindre à un organite particulier ou à un mécanisme sécrétoire spécifique, et attaqué l'étude de l'effet des ondes sur l'ensemble du génome par une approche transcriptomique à haut débit, avec la technique de puces à ADN. Par le passé, cette approche a essentiellement été réalisée dans le domaine des RF, portant plus particulièrement sur la téléphonie mobile. Une quinzaine d'études a été menée et, récemment, McNamee et Chauhan ont effectué une revue de ces dernières, en mettant en avant les points forts et les faiblesses de chacune d'entre-elles [15]. Nous sommes donc (pour le moment) les premiers à utiliser une telle approche pour les ondes MM à une fréquence de 60,4 GHz.

Selon les premières données expérimentales, en utilisant les tests statistiques les plus stringents, il n'y a pas de gène exprimé de manière différentielle à la suite d'une exposition aux ondes. Ce résultat, bien qu'étonnant de prime abord, a aussi été rencontré dans d'autres travaux menés dans le domaine des RF et confirme que quelle que soit la fréquence et la

puissance utilisées en télécommunications, l'effet sur les cellules exposées reste relativement discret et ne modifie pas l'expression génétique. Les ondes MM n'entraîneraient donc pas de perturbation majeure de l'équilibre des réseaux de gènes. L'utilisation de tests statistiques moins robustes permet de ressortir un certain nombre de gènes, bien que le risque qu'ils soient caractérisés comme différentiellement exprimés à tort (faux positifs) demeure non négligeable. Ainsi, lorsque certaines équipes réussissaient à trouver des gènes différentiellement exprimés, les expériences de PCR en temps réel ne confirmaient pas les résultats obtenus.

Plusieurs enseignements peuvent être retirés de cette approche transcriptomique menée sur l'ensemble du génome. Le premier est que l'exposition aux ondes à différents temps ne provoque pas de modification majeure des niveaux d'expression des gènes. Les gènes déterminés comme différentiellement exprimés rentrent dans la proportion estimée de faux positifs. Pour valider ces gènes comme étant différentiellement exprimés, nous réaliserons une approche quantitative par PCR en temps réel. Dans un second temps, il apparaît que si les ondes MM ont un effet sur la transcription, celui-ci est plutôt marqué après 6h d'exposition. Cet effet est-il transitoire ? L'absence d'effet après 24h peut-il se traduire par un retour « à la normale » dans les cellules ou est-elle le reflet du déclenchement d'une seconde cascade de signalisation ? S'il s'agit d'un effet réellement transitoire (activation, puis retour à la normale), on peut penser qu'il n'y a pas vraiment lieu de s'inquiéter, étant donné que ce phénomène est caractérisé par une réaction de faible amplitude. Peu de gènes apparaissent comme différentiellement exprimés après analyse sans correction statistique. De plus, les légères modifications observées ne perdurent pas. L'exposition aux ondes ne serait pas suffisante pour changer les équilibres des réseaux d'expression. Les données expérimentales obtenues avec l'approche exploratoire d'exposition intermittente pourraient soulever plus de problèmes. Les données obtenues avec cette dernière démontrent que le nombre de gènes différentiellement exprimés est plus important après des expositions intermittentes menées 6 fois une heure, par rapport à l'exposition 6h. Il sera cependant nécessaire de confirmer ces résultats en réalisant des expériences complémentaires, puisque pour le moment, ces données sont préliminaires (n = 2 au niveau des puces). Quels sont alors les risques à long terme, pour des personnes subissant des expositions entrecoupées de périodes sans exposition, comme cela pourrait par exemple être le cas sur un lieu de travail ? Quelles sont les conséquences à long terme d'inductions transcriptionnelles répétées ? Cela ne pourrait-il pas provoquer des perturbations de la physiologie des cellules ?

En conclusion, les données obtenues au cours de ce travail lèvent les doutes éventuels concernant l'utilisation des ondes MM en télécommunications. Les ondes MM ne sont pas capables d'avoir des effets directs (le RE est un très bon biomarqueur). Il est tout de même nécessaire d'affirmer que des travaux de recherches supplémentaires restent cependant à envisager concernant ces ondes, notamment sur leurs effets potentiels à long terme.

Bibliographie

[1] http://pagesperso-orange.fr/tpe-physique-cuisine/fiche-ondes-electromagnetiques.html

[2] A. Duchêne, J. Joussot-Dubien. Les effets biologiques des rayonnements non ionisants. Médecine-Sciences Flammarion, 2001.

[3] http://ec.europa.eu/research/rtdinfo/46/01/article_2941_fr.html

[4] P.F. Combes. Micro-ondes, lignes, guides et cavités. Dunod, 1997.

[5] A. Kato. Electromagnetics in biology. Springer, 2006.

[6] R.W.Y. Habash. Bioeffects and therapeutic applications of electromagnetic energy. CRC Press, Taylor and Francis Group, 2008.

[7] A. Vander Vorst, A. Rosen, Y. Kotsuka. RF/Microwave interaction with biological tissues. Wiley series in microwave and optical engineering. Wiley interscience, 2006.

[8] C. Polk, E. Postow, handbook of biological effects of electromagnetic fields, Second edition, CRC Press.

[9] Guide pour l'établissement de limites d'exposition aux champs électriques, magnétiques et électromagnétiques. INRS, 182(17-47), 2001.

[10] ICNIRP. Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic and electromagnetic fields (up to 300 GHz). Health physics, 74(4):494-522, 1998.

[11] H.C. Christensen, J. Schüz, M. Kosteljanetz, H. Skovgaard Poulsen, J. Thomsen, and C. Johansen. Cellular telephone use and risk of acoustic neuroma. American journal of epidemiology, 159(3):277-283, 2004.

[12] S. Lönn, A. Ahlbom, H.C. Christensen, C. Johansen, J. Schüz, S. Edström, G. Henriksson, J. Lundgren, J. Wennerberg, and M. Feychting. Mobile phone use and risk of parotid gland tumor. American journal of epidemiology, 164(7):637-643, 2006.

[13] M. Kundi. The controversy about a possible relationship between mobile phone use and cancer. Environmental health perspectives, 117(3):316-324, 2009.

[14] K. Tokola, P. Kurttio, T. Salminen, and A. Auvinen. Reducing overestimation in reported mobile phone use associated with epidemiological studies. Bioelectromagnetics, 29(7):559-563, 2008.

[15] J.P. McNamee and V. Chauhan. Radiofrequency radiation and gene/protein expression. Radiation research, 172(3):265-287, 2009.

[16] Vijayalaxmi and T.J. Prihoda. Genetic damage in mammalian somatic cells exposed to radiofrequency radiation: A meta-analysis of data from 63 publications (1990-2005). Radiation research, 169(5):561-574, 2008.

[17] A. Maes, M. Collier, and L. Verschaeve. Cytogenetic effects of 900 MHz (GSM) microwaves on human lymphocytes. Bioelectromagnetics, 22(2):91-96, 2001.

[18] C. Zhijian, L. Xaoxue, L. Yezhen, L. Deqiang, C. Shijie, J. Lifen, L. Jianlin, H. Jiliang. Influence of 1.8-GHz (GSM) radiofrequency radiation (RFR) on DNA damage and repair induced by X-rays in human leukocytes *in vitro*. Mutation research/genetic toxicology and environmental mutagenesis, 677(1-2):100-104, 2009.

[19] L. Verschaeve. Genetic effects of radiofrequency radiation (RFR). Toxicology and applied pharmacology, 207(2 suppl):336-341, 2005.

[20] S. Sanchez, A. Milochau, G. Ruffie, F. Poulletier de Gannes, I. Lagroye, E. Haro, J.E. Surleve-Bazeille, B. Billaudel, M. Lassegue and B. Veyret. Human skin cell stress response to GSM-900 mobile phone signals. *In vitro* study on isolated primary cells and reconstructed epidermis. Febs journal, 273(24):5491-5507, 2006.

[21] S. Sanchez, E. Haro, G. Ruffié, B. Veyret and I. Lagroye. *In vitro* study of the stress response of human skin cells to GSM-1800 mobile phone signals compared to UVB and heat shock. Radiation research, 167(5):572-580, 2007.

[22] D.I. de Pomerai, C. Daniells, H. David, J. Allan, I. Duce, M. Mutwakil, D. Thomas, P. Sewell, J. Tattersall, D. Jones, and P. Candido. Non thermal heat-shock response to microwaves. Nature, 405(6785):417-418, 2000.

[23] P.W. French, R. Penny, J.A. Laurence, D.R. McKenzie. Mobile phones, heat shock proteins and cancer. Differentiation, 67(4-5):93-97, 2001.

[24] A.S. Dawe, B. Smith, D.W.P. 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.

[25] D. Weisbrot, H. Lin, M. Blank, and R. Goodman. Effects of mobile phone radiation on reproduction and development in *Drosophila melanogaster*. Journal of cellular biochemistry, 89(1):48-55, 2003.

[26] H. Hirose, N. Sakuma, N. Kaji, K. Nakayama, K. Inoue, M. Sekijima, T. Nojima, and J. Miyakoshi. Mobile phone base station-emitted radiation does not induce phosphorylation of hsp27. Bioelectromagnetics, 28(2):99-108, 2007.

[27] R. Luria, I. Eliyahu, R. Hareuveny, M. Margaliot, and N. Meiran. Cognitive effects of radiation emitted by cellular phones: the influence of exposure side and time. Bioelectromagnetics, 30(3):198-204, 1999.

[28] K. Mann, J. Röschke. Sleep under exposure to high-frequency electromagnetic field. Sleep medicine reviews, 8(2):95-107, 2004.

[29] D. Crouzier, J.C. Debouzy, F. Bourbon, A. Collin, A. Perrin, G. Testylier. Neurophysiologic effects at low level 1.8 GHz radiofrequency field exposure : a multiparametric approach on freely moving rats. Pathologie biologie, 55(3-4):134-142, 2007.

[30] A. Vian, D. Roux, S. Girard, P. Bonnet, F. Paladian, E. Davies, G. Ledoigt. Microwave irradiation affects gene expression in plants. Plant signaling and behavior, 1(2):67-70, 2006.

[31] D. Roux, A. Vian, S. Girard, P. Bonnet, F. Paladian, E. Davies, and G. Ledoigt. Electromagnetic fields (900 MHz) evoke consistent molecular responses in tomato plants. Physiologia plantarum, 128(2):283-288, 2006.

[32] E. Beaubois, S. Girard, S. Lallechere, E. Davies, F. Paladian, P. Bonnet, G. Ledoigt and A. Vian. Intercellular communication in plants: evidence for two rapidly transmitted systemic signals generated in response to electomagnetic field stimulation in tomato. Plant cell and environment, 30(7):834-844, 2007.

[33] D. Roux, A. Vian, S. Girard, P. Bonnet, F. Paladian, E. Davies, G. Ledoigt. High frequency (900 MHz) low amplitude (5 Vm^{-1}) electromagnetic field: a genuine environmental stimulus that affects transcription, translation, calcium and energy charge in tomato. Planta, 227(4):883-891, 2008.

[34] R. Fisher. 60 GHz WPAN standardization activity within IEEE 802.15. Millimeter-wave wireless journal, 1(1):6-8, 2005.

[35] P. Smulders. Exploiting the 60 GHz band for local wireless multimedia access: Prospects and future directions, IEEE communications magazine, 40(1):140-147, 2002.

[36] F. Giannetti, M. Luise and R. Reggiannini. Mobile and personal communications in the 60 GHz band: A survey. Wireless personal communication: an international journal, 10(2):207-243, 1999.

[37] H. Liebe, P. Rosenkranz and G. Hufford. Atmospheric 60 GHz oxygen spectrum: New laboratory measurements and parameters. Journal of quantitative spectroscopy and radiative transfer, 48(5-6):629-643, 1992.

[38] http://www.wirelesshd.com

[39] J.C. Debouzy, D. Crouzier, V. Dabouis, R. Malabiau, C. Bachelet, A. Perrin. Effets biologiques des rayonnements MM (94 GHz). Quelles conséquences à long terme ? Pathologie biologie, 55(5):246-255, 2007.

[40] http://defense-update.com/products/a/ads.htm

[41] J. Robinson, D. K. Paul, J. Bird, D. Dawson, T. Brown, D. Spencer, B. Prime. A millimetric car radar front end for automotive cruise control. IEEE colloquium on automotive radar and navigation techniques. 1998.

[42] http://ec.europa.eu/information_society/activities/intelligentcar/technologies.htm

[43] A. Polychronopoulos, A. Amditis, N. Floudas and H. Lind. Integrated object and road border tracking using 77 GHz automotive radars. IEEE proc.-radar sonar navig., 151 (6), 375-381, 2004.

[44] L. Yujiri, M. Shoucri, P. Moffa. Passive millimeter-wave imaging. IEEE microwave magazine, 4(3):39-50, 2003.

[45] http://www.tsa.gov/approach/tech/body_imaging.shtm

[46] http://www.tsa.dhs.gov/approach/tech/mwave.shtm

[47] T.I. Usichenko, H. Edinger, V.V. Gizhko, C.Lehmann, M. Wendt and F. Feyerherd. Low-intensity electromagnetic waves for pain therapy. Evidence-based complementary and alternative medicine 3(2):201-207, 2006.

[48] M.A. Rojavin and M.C. Ziskin. Medical application of millimetre wave. QJ Med, 91(1):57-66, 1998.

[49] W. Grundler, F. Keilmann, H. Fröhlich. Resonant growth rate response of yeast cells irradiated by weak microwaves. Physics letters, 62A(6):463-466, 1977.

[50] F. Jelinek, J. Saroch, V. Trkal, J. Pokorny. Measurement system for experimental verification of Fröhlich electromagnetic field. Bioelectrochemistry and bioenergetics, 41(1):35-38, 1996.

[51] W. Grundler, F. Keilmann. Nonthermal effects of millimeter microwaves on yeast growth. Z. Naturforsch, 33c:15-22, 1978.

[52] W. Grundler, F. Keilmann. Sharp resonances in yeast growth prove nonthermal sensitivity to microwaves. Physical review letters, 51(13):1214-1216, 1983.

[53] G.B. Kasting, N.D. Barai. Equilibrium water sorption in human stratum corneum. Journal of pharmaceutical science, 92(8):1624-1631, 2003.

[54] F. Mirrashed, J.C. Sharp. In vivo morphological characterization of skin by MRI micro-imaging methods. Skin research and technology, 10(3):149-160, 2004.

[55] S.I. Alekssev and M.C. Ziskin. Human skin permittivity determined by millimeter wave reflection measurements. Bioelectromagnetics, 28(5):331-339, 2007.

[56] S.I. Alekseev, A.A. Radzievsky, M.K. Logani, and M.C. Ziskin. Millimeter wave dosimetry of human skin. Bioelectromagnetics, 29(1):65-70, 2008.

[57] S.I. Alekseev and M.C. Ziskin. Influence of blood flow and millimetre wave exposure on skin temperature in different thermal models. Bioelectromagnetics, 30(1):52-58, 2009.

[58] M. Zhadobov, R. Sauleau, Y. Le Dréan, S.I. Alekseev, and M.C. Ziskin. Numerical and experimental millimeter-wave dosimetry for *in vitro* experiments. IEEE transactions on microwave theory and techniques, 56(12):2998-3007, 2008.

[59] A.A. Radzievsky, O.V. Gordiienko, S. Alekseev, I. Szabo, A. Cowan, and M.C. Ziskin. Electromagnetic millimeter wave induced hypoalgesia: frequency dependence and involvement of endogenous opioids. Bioelectromagnetics, 29(4):284-295, 2008.

[60] 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, 1998.

[61] S.I. Alekseev, M.C. Ziskin. Effects of millimeter waves on ionic currents of lymnea neurons. Bioelectromagnetics, 20(1):24-33, 1999.

[62] I. Szabo, M.A. Rojavin, T.J. Rogers, and M.C. Ziskin. Reactions of keratinocytes to in vitro millimeter wave exposure. Bioelectromagnetics, 22(5):358-364, 2001.

[63] A.B. Gapeyev, E.N. Mikhailik, and N. K. Chemeris. Anti-inflammatory effects of low-intensity extremely high-frequency electromagnetic radiation: Frequency and power dependence. Bioelectromagnetics, 29(3):197-206, 2008.

[64] V.R. Makar, M.K. Logani, A. Bhanushali, S.I. Alekseev and M.C. Ziskin. Effect of cyclophosphamide and 61.22 GHz millimeter waves on T-cell, B-cell and macrophages functions. Bioelectromagnetics 27(6):458-466, 2006.

[65] V.R. Makar, M.K. Logani, A. Bhanushali, M. Kataoka, and M.C. Ziskin. Effect of millimeter waves on natural killer cell activation. Bioelectromagnetics 26(1):10-19, 2005.

[66] A. Beneduci, G. Chidichimo, S. Tripepi, E. Perrotta, F. Cufone. Antiproliferative effect of millimeter radiation on human erythromyeloid leukaemia cell line K562 in culture: ultrastructural and metabolic induced changes. Bioelectrochemistry 70(2):214-220, 2007.

[67] A. Beneduci. Evaluation of the potential in vitro antiproliferative effects of millimiter waves at some therapeutic frequencies on RPMI 7932 human skin malignant melanoma cells. Cell biochemistry and biophysics, 55(1): 25-32, 2009.

[68] 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):233-234, 2006.

[69] M. Zhadobov, R. Sauleau, L. Le Coq, L. Debure, D. Thouroude, D. Michel, and Y. Le Dréan. Low-power millimeter wave radiations do not alter stress-sensitive gene expression of chaperone proteins. Bioelectromagnetics, 28(3):188-196, 2007.

[70] M. Zhadobov, R. Sauleau, V. Vié, M. Himdi, L. Le Coq, D. Thouroude. Interactions between 60-GHz millimeter waves and artificial biological membranes : Dependence on radiation parameters. IEEE transactions on microwave theory and technique, 54(6): 2534-2542, 2006.

[71] A. Ramundo-Orlando, G. Longo, M. Cappelli, M. Girasole, L. Tarricone, A. Beneduci, R. Massa. The response of giant phospholipid vesicles to millimeter waves radiation. Biochimica et Biophysica acta, 1788(7):1497-1507, 2009.

[72] V.I. Geletyuk, V.N. Kazachenko, N.K. Chemeris, E.E. Fesenko. Dual effects of microwaves on single Ca^{2+}-activated channels in cultured kidney cells Vero. Febs letters, 359(1):85-88, 1995.

[73] E.E. Fesenko, V.I. Geletyuk, V.N. Kazachenko, N.K. Chemeris. Preliminary microwave irradiation of water solutions changes their channel-modifying activity. Febs letter, 366(1):49-52, 1995.

[74] M. Sanson, C. Ingueneau, C. Vindis, J-C. Thiers, H. Rousseau, Y. Sawa, Y. Bando, Z. Mallat, R. Salvayre and A. Nègre-Salvayre. Oxygen-regulated protein-150 prevents calcium homeostasis deregulation and apoptosis induced by oxidized LDL in vascular cells. Cell death and differentiation, 15(8):1255-1265, 2008.

[75] K. Ozawa, Y. Tsukamoto, O. Hori, Y. Kitao, D.M. Stern, and S. Ogawa. Regulation of tumor angiogenesis by Oxygen-regulated protein 150, an inducible endoplasmic reticulum chaperone. Cancer research, 61(10):4206-4213, 2001.

[76] M. Ni, A.S. Lee. ER chaperones in mammalian development and human diseases. Febs letters, 581(19):3641-3651, 2007.

[77] E. Szegedi, S.E. Logue, A.M. Gorman, and A. Samali. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. Embo reports, 7(9):880-885, 2006.

[78] F. Foufelle, P. Ferré. La réponse UPR. Son rôle physiologique et pathologique. Médecine/Sciences 23(3):291-296, 2007.

[79] D. Ron and P. Walter. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. Nature reviews. Molecular cell biology, 8(7):519-529, 2007.

[80] K. Zhang and R.J. Kaufman. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. Nature, 454(7203):455-461, 2008.

[81] J. Li, M. Ni, B. Lee, E. Barron, D.H. Hinton and A.S. Lee. The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress-induced autophagy in mammalian cells. Cell death and differenciation, 15(9):1460-1471, 2008.

[82] M. Schröder, R.J. Kaufman. The mammalian unfolded protein response. Current molecular medicine, 6(1):5-36, 2006.

[83] E. Araki, S. Oyadomari, and M. Mori. Impact of endoplasmic reticulum stress pathway on pancreatic β-cells and diabetes mellitus. Experimental biology and medicine (Maywood), 228(10):1213-1217, 2003.

[84] M. Bouchecareilh, E. Chevet. Stress du réticulum endoplasmique, une réponse pour éviter le pIRE. Médecine/sciences, 25(3):281-287, 2009.

[85] A.H. Lee, G.C. Chu, N.N. Iwakoshi, and L.H. Glimcher. XBP1 is required for biogenesis of cellular secretory machinery of exocrine glands. The embo journal, 24(24):4368-4380, 2005.

[86] R. Sriburi, S. Jackowski, K. Mori, and J.W. Brewer. XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis and biogenesis of the endoplasmic reticulum. The journal of cell biology, 167(1):35-41, 2004.

[87] D.J. Todd, A.H. Lee, L.H. Glimcher. The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. Nature reviews immunology, 8(9):663-674, 2008.

[88] S. Oyadomari, M. Mori. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. Cell death and differentiation, 11(4):381-389, 2004.

[89] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. Endoplasmic reticulum, in Molecular biology of the cell, fourth edition. Garland science, 2002.

[90] J.B. DuRose, D. Scheuner, R.J. Kaufman, L.I. Rothblum, M. Niwa. Phosphorylation of eIF2α coordinates ribosomal RNA transcription and translation inhibition during ER stress. Molecular cell biology, 29(15):4295-4307, 2009.

[91] H.Y. Jiang, S.A. Wek, B.C. McGrath, D. Scheuner, R.J. Kaufman, D.R. Cavener, R.C. Wek. Phosphorylation of the α subunit of eukaryotic initiation factor 2 is required for activation of NF-κB in response to diverse cellular stresses. Molecular and cellular biology, 23(16):5651-5663, 1999.

[92] J. Deng, P.D. Lu, Y. Zhang, D. Scheuner, R.J. Kaufman, N. Sonenberg, H.P. Harding, D. Ron. Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2. Molecular and cellular biology, 24(23):10161-10168, 2004.

[93] H.P. Harding, I. Novoa, Y. Zhang, H. Zeng, R. Wek, M. Schapira, and D. Ron. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. Molecular cell, 6(5):1099-1108, 2000.

[94] S.J. Marciniak, D. Ron. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. Physiological reviews, 86(4):1133-1149, 2006.

[95] K. Ameri, A.L. Harris. Molecules in focus. Activating transcription factor 4. The international journal of biochemistry and cell biology, 40(1):14-21, 2008.

[96] I. Novoa, H. Zeng, H.P. Harding, and D. Ron. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2α. The journal of cell biology, 153(5):1011-1021, 2001.

[97] Q. Su, S. Wang, H.Q. Gao, S. Kazemi, H.P. Harding, D. Ron, and A.E. Koromilas. Modulation of the eukaryotic initiation factor 2 α-subunit kinase PERK by tyrosine phosphorylation. The journal of biological chemistry, 293(1):469-475, 2008.

[98] K.P.K. Lee, M. Dey, D. Neculai, C. Cao, T.E. Dever, and F. Sicheri. Structure of the dual enzyme IRE1 reveals the basis for catalysis and regulation in nonconventional RNA splicing. Cell, 132(1):89-100, 2008.

[99] D. Oikawa, Y. Kimata, and K. Kohno. Self-association and BiP dissociation are not sufficient for activation of the ER stress sensor IRE1. Journal of cell science, 1(120):1681-1688, 2007.

[100] J.J. Credle, J.S. Finer-Moore, F.R. Papa, R.M. Stroud, and P. Walter. On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. PNAS, 102(52):18773-18784, 2005.

[101] H. Yoshida. Unconventional splicing of XBP1 mRNA in the unfolded protein response. Antioxidants and redox signalling, 9(12):2323-2333, 2007.

[102] U. Rüegsegger, J.H. Leber, and P. Walter. Block of HAC1 mRNA translation by long-range base pairing is released by cytoplasmic splicing upon induction of the unfolded protein response. Cell, 107(1):103-114, 2001.

[103] T.N. Gonzalez, C. Sidrauski, S. Dörfler and P. Walter. Mechanism of non-spliceosomal mRNA splicing in the unfolded protein response pathway. The embo journal, 18(11):3119-3132, 1999.

[104] H. Sha, Y. He, H. Chen, C. Wang, A. Zenno, H. Shi, X. Yang, X. Zhang, and L. Qi. The IRE1α-XBP1 pathway of the unfolded protein response is required for adipogenosis. Cell metabolism, 9(6):556-564, 2009.

[105] H. Yoshida, M. Oku, M. Suzuki, and K. Mori. pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. The journal of cell biology, 172(4):565-575, 2006.

[106] H. Yoshida, A. Uemura, and K. Mori. pXBP1(U), a negative regulator of the unfolded protein response activator pXBP1(S), targets ATF6 but not ATF4 in proteasome-mediated degradation. Cell structure and function, 34(1):1-10, 2009.

[107] A.H Lee, N.N. Iwakoshi, and L.H. Glimcher. XBP1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. Molecular and cellular biology, 23(21):7448-7459, 2003.

[108] Y. Oda, T. Okada, H. Yoshida, R.J. Kaufman, K. Nagata, and K. Mori. Derlin-2 and Derlin-3 are regulated by the mammalian unfolded protein response and required for ER-associated degradation. The journal of cell biology, 172(3):383-393, 2006.

[109] H. Bommiasamy, S.H. Back, P. Fagone, K. Lee, S. Meshinshi, E. Vink, R. Sriburi, M. Frank, S. Jackowski, R.J. Kaufman, J.W. Brewer. ATF6 alpha induces XBP1-independent expansion of the endoplasmic reticulum. Journal of cell science, 122(10):1626-1636, 2009.

[110] T. Iwawaki, A. Hosoda, T. Okada, Y. Kamigori, C. Namura-Furuwatari, Y. Kimata, A. Tsuru, K. Kohno. Translational control by the ER transmembrane kinase/ribonuclease IRE1 under ER stress. Nature cell biology, 3(2):158-164, 2001.

[111] Y. Imagawa, A. Hosoda, S. Sasaka, A. Tsuru, K. Kohno. RNase domains determine the functional difference between IRE1 alpha and IRE1 beta. Febs letter, 582(5):656-660, 2008.

[112] K. Yamamoto, N. Suzuki, T. Wada, T. Okada, H. Yoshida, R.J. Kaufman and K. Mori. Human HRD1 promoter carries a functional unfolded protein response element to which XBP1 but not ATF6 directly binds. Journal of biochemistry, 144(4):477-486, 2008.

[113] J. Li, B. Lee, and A.S. Lee. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. Multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (puma) and noxa by p53. The journal of biological chemistry, 281(11):7260-7270, 2006.

[114] J.H Lin, H. Li, D. Yasumura, H.R. Cohen, C. Zhang, B. Panning, K.M. Shokat, M.M. LaVail, P. Walter. IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. Cell, 318(5852): 944-949, 2007.

[115] Y. Adachi, K. Yamamoto, T. Okada, H. Yoshida, A. Harada, and K. Mori. ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum. Cell structure and function, 33(1):75-89, 2008.

[116] J. Shen, X. Chen, L. Hendershot, and R. Prywes. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. Developmental cell, 3(1):99-111, 2002.

[117] J. Shen, R. Prywes. ER stress signalling by regulated proteolysis of ATF6. Methods, 35(4):382-385, 2005.

[118] D.J. Thuerauf, M. Marcinko, P. Belmont, and C.C. Glembotski. Effects of the isoform-specific characteristics of ATF6α and ATF6β on endoplasmic reticulum stress response gene expression and cell viability. The journal of biological chemistry, 282(31):22865-22878, 2007.

[119] D.J. Thuerauf, L. Morrison, and C. Glembotski. Opposing roles for ATF6α and ATF6β in endoplasmic reticulum stress response gene induction. The journal of biological chemistry, 279(20):21078-21084, 2004.

[120] A. Yamaguchi, O. Hori, D.M. Sterr, E. Hartmann, S. Ogawa, M. Tohyama. Stress-associated endoplasmic reticulum protein 1 (SERP1)/ribosome-associated membrane protein 4 (RAMP4) stabilizes membrane protein during stress and facilitates subsequent glycosylation. The journal of cell biology, 147(6):1195-1204, 1999.

[121] S.B. Cullinan, J.A. Diehl. Coordination of ER and oxidative stress signaling: the PERK/Nrf2 signaling pathway. The international journal of biochemistry and cell biology, 38(3):317-332, 2006.

[122] A. Bertolotti, Y. Zhang, L.M. Hendershot; H.P. Harding, and D.Ron. Dynamic interaction of BiP and er stress transducers in the unfolded protein response. Nature cell biology, 2(6):326-332, 2000.

[123] K. Okamura, Y. Kimata, H. Higashio, A. Tsuru, and K. Kohno. Dissociation of Kar2p/BiP from an er stress molecule ire1p, triggers the unfolded protein response in yeast. Biochemical and biophysical research communications, 279(2):445-450, 2000.

[124] Y. Kimata, D. Oikawa, Y. Shimizu, Y. Ishiwata-Kimata, and K. Kohno. A role for BiP as an adjustor for the endoplasmic reticulum stress-sensing protein ire1. The journal of cell biology, 167(3):445-456, 2004.

[125] J. Shen, E.L. Snapp, J. Lippincott-Schwartz, and R. Prywes. Stable binding of ATF6 to BiP in the endoplasmic reticulum stress response. Molecular and cellular biology, 25(3):921-932, 2005.

[126] S. Nadanaka, H. Yoshida, and K. Mori. Reduction of disulfide bridges in the lumenal domain of ATF6 in response to glucose starvation. Cell structure and function, 31(2):127-134, 2006.

[127] S. Nadanaka, T. Okada, H. Yoshida, and K. Mori. Role of disulfide bridges formed in the luminal domain of ATF6 in sensing endoplasmic reticulum stress. Molecular and cellular biology, 27(3):1027-1043, 2007.

[128] H. Yoshida, T. Matsui, A. Yamamoto, T. Okada, and K. Mori. XBP1 mRNA is induced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. Cell, 107(7):881-891, 2001.

[129] H. Yoshida, T. Matsui, N. Hosokawa, R.J. Kaufman, K. Nagata, and K. Mori. A time-dependant phase shift in the mammalian unfolded protein response. Developmental cell, 4(2):265-271, 2003.

[130] K. Yamamoto, T. Sato, T. Matsui, M. Sato, T. Okada, H. Yoshida, A. Harada, and K. Mori. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6α and XBP1. Developmental cell, 13(3):365-376, 2007.

[131] H. Yoshida, K. Haze, H. Yanagi, T. Yura, and K. Mori. Identification of the *cis* acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. The journal of biological chemistry, 273(50):33741-33749, 1998.

[132] B. Roy and A.S. Lee. The mammalian endoplasmic reticulum stress response element consists of an evolutionarily conserved tripartite structure and interacts with a novel stress-inducible complex. Nucleic acid research, 27(6):1437-1443, 1999.

[133] H. Yoshida, T. Okada, K. Haze, H. Yanagi, T. Yura, M. Negishi, and K.Mori. ATF6 activated proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the *cis*-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. Molecular and cellular biology, 20(18):6755-6767, 2000.

[134] S. Kondo, T. Murakami, K. Tatsumi, M. Ogata, S. Kanemoto, K. Otori, K. Iseki, A. Wanaka, and A. Imaizumi. OASIS, a CREB/ATF-family member, modulates UPR signalling in astrocytes. Nature cell biology, 7(2):186-194, 2005.

[135] P. Baumeister, S. Luo, W.C. Skarnes, G. Sui, E. Seto, Y. Shi, and A.S. Lee. Endoplasmic reticulum stress induction of the grp78/BiP promoter: Activating mechanisms mediated by YY1 and its interactive chromatine modifiers. Molecular and cellular biology, 25(11):4529-4540, 2005.

[136] M. Hong, M.Y. Lin, J.M. Huang, P. Baumeister, S. Hakre, A.L. Roy, and A.S. Lee. Transcriptional regulation of the GRP78 promoter by endoplasmic reticulum stress. The journal of biochemistry, 280(17):16821-16828, 2005.

[137] K. Kokame, H. Kato, and T. Miyata. Identification of ERSE-II, a new *cis*-acting element responsible for the ATF6 dependant mammalian unfolded protein response. The journal of biological chemistry, 276(12):9199-9205, 2001.

[138] K. Yamamoto, N. Suzuki, T. Wada, T. Okada, K. Yoshida, R.J. Kaufman, K. Mori. Human HRD1 promoter carries a functional unfolded protein response element to which XBP1 and not ATF6 directly binds. Journal of biochemistry, 114(4):477-486, 2008.

[139] I. Kim, W. Xu, and J.C. Reed. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. Nature reviews drug discovery, 7(12):1013-1030, 2008.

[140] M. Ogata, S.I. Hino, A. Saito, K. Morikawa, S. Kondo, S. Kamemoto, T. Murakimi, M. Taniguchi, I. Tanii, K. Yoshinaga, S. Shiosaka, J.A. Hamarbach, F. Urano, and K. Imaizumi. Autophagy is activated for cell survival after ER stress. Molecular and cellular biology, 26(24):9220-9231, 2006.

[141] P. Boukamp, R.T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham, and N.E. Fusenig. Normal keratinisation in a spontaneously immortalized aneuploid human kératinocytes cell line. The journal of cell biology, 160(3):761-771, 1988.

[142] M. Hirota, M. Kitagaki, H. Itagaki, S. Aiba. Quantitative measurement of spliced XBP1 mRNA as an indicator of ER stress. The journal of toxicological sciences, 31(2):149-156, 2006.

[143] J.B. McGuire, T.J. James, C.J. Imber, S.D. St Peter, P.J. Friend, R.P. Taylor. Optimisation of an enzymatic method for beta-galactosidase. Clinical chimica acta, 326(1-2):123-129, 2002.

[144] N. Hiramatsu, A. Kasai, K. Hayakawa, J. Yao, M. Kitamura. Real-time detection and continuous monitoring of ER stress in vitro and in vivo by ES-TRAP: evidence for systemic transient ER stress during endotoxemia. Nucleic acids research, 34(13):e93, 2006.

[145] J. Vandesompele, K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe and F. Speleman. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome biology, 3(7):0034.1-0034.11, 2002.

[146] J. Hellemans, G. Mortier, A. De Paepe, F. Speleman and J. Vandesompele. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. Genome biology, 8(2):R19, 2007.

[147] http://medgen.ugent.be/qbase/

[148] S. Chigurupati, Z. Wei, C. Belal, M. Vandermey, G.A. Kyriazis, T.V. Arumugam, and S.L. Chan. The homocysteine-inducible endoplasmic reticulum stress protein counteracts calcium store depletion and induction of CCAAT enhancer-binding protein homologous protein in a neurotoxin model of Parkinson disease. The journal of biological chemistry, 284(27):18323-18333, 2009.

[149] T. Mossman. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. Application to proliferation and cytotoxicity assay. Journal of immunological methods, 65:55-63, 1983.

[150] C.E. Green, T. Liu, V. Montel, G. Hsiao, R.D. Lester, S. Subramaniam, S.L. Gonias, R.L. Klemke. Chemoattractant signalling between tumor cells and macrophages regulates cancer cell migration, metastasis and neovascularization. Plos one, 4(8):e6713, 2009.

[151] F. Colotta, P. Allavena, A. Sica, C. Garlanda, and A. Mantovani. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. Carcinogenesis, 30(7):1073-1081, 2001.

[152] N.J. Millenbaugh, C. Roth, R. Sypniewska, V. Chan, J.L. Kiel, R.V. Blystone, P.A. Mason. Gene expression changes in the skin of rats induced by prolonged 35 GHz millimeter-wave exposure. Radiation research, 169(3):288-300, 2008.

[153] T. Tanaka, Y. Srinoulprasert, B.G. Yang, H. Hayasaka and M. Miyasaka. Chemokines in tumor progression and metastasis. Cancer science, 96(6):317-322, 2005.

[154] P.J. Barnes. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. Pharmacological reviews, 56(4):515-548, 2004.

[155] N. Mukaida. Pathophysiological roles of interleukine-8/CXCL8 in pulmonary diseases. American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology, 284(4):L566-577, 2003.

[156] E. Shaulian, and Michael Karin. AP-1 as a regulator of cell life and death. Nature cell biology, 4(5):E131-136, 2002.

[157] R. Eferl and E.F. Wagner. AP-1: A double-edged sword in tumorigenesis. Nature reviews. Cancer, 3(11):859-867, 2003.

[158] D. Remondini, R. Nylund, J. Reivinen, F. Poulletier de Gannes, B. Veyret, I. Lagroye, E. Haro, M. Capri, C. Franceschi, K. Schlatterer, R. Gminski, R. Fitzner, R. Tauber, J. Schuderer, N. Kuster, D. Leszczynski, F.Bersani and C. Maercker. Gene expression changes in human cells after exposure to mobile phone microwaves. Proteomics, 6(17):4745-4754, 2006.

[159] Q. Zeng, G. Chen, Y. Weng, L. Wang, H. Chiang, D. Lu, and Z. Xu. Effects of global system for mobile communications 1800 MHz radiofrequency electromagnetic field on gene and protein expression in MCF-7 cells. Proteomics, 6(17):4732-4738, 2006.

[160] R. Nylund and D. Leszczynski. Mobile phone radiation causes changes in gene and protein expression in human endothelial cell lines and the response seems to be genome- and proteome-dependent. Proteomics, 6(17):4769-4780, 2006.

[161] V. Chauhan, S.S. Qutob, S. Lui, A. Mariampillai, P.V. Bellier, C.L. Yauk, G.R Douglas, A. Williams and J.P. McNamee. Analysis of gene expression in two human-derived cell lines exposed *in vitro* to a 1.9 GHz pulse-modulated radiofrequency field. Proteomics, 7(21):3896-3905, 2007.

[162] E. Gurisik, K. Warton, D.K. Martin, S.M. Valenzula. An *in vitro* study of the effects of exposure to a GSM signal in two human cell lines: Monocytic U937 and neuroblastoma SK-N-SH. Cell biology international, 30(10):793-799, 2006.

[163] S.S. Qutob, V. Chauhan, P.V. Bellier, C.L. Yauk, G.R. Douglas, L; Berndt, A. Williams, G.B. Gajda, E. Lemay, A. Thansandote, and J.P. MacNamee. Microaaray gene expression profiling of a human glioblastoma cell line exposed *in vitro* to 1.9 GHz pulse-modulated radiofrequency field. Radiation research, 165(6):636-644, 2006.

[164] A. Paparini, P. Rossi, G. Gianfranceschi, V. Brugaleta, R. Falsaperla, P. de Luca, and V. Romano Spica. No evidence of major transcriptional changes in the brain of mice exposed to 1800 MHz GSM signal. Biolectromagnetics, 29(4):312-323, 2008.

[165] T-Y. Zhao, S-P. Zou, P.E. Knapp. Exposure to cell phone radiation up-regulates apoptosis genes in primary cultures of neurons and astrocytes. Neuroscience letters, 412(1):34-38, 2007.

[166] C. Harvey, and P.W. French. Effects on protein kinase c and gene expression in a human mast cell line, HMC-1, following microwave exposure. Cell biology international, 23(11):739-748, 1999.

[167] H. Hirose, N. Sakuma, N. Kaji, T. Suhara, M. Sekijima, T. Nojima, and J. Miyakoshi. Phosphorylation and gene expression of p53 are not affected in human cells exposed to 2.1425 GHz band CW or W-CDMA modulated radiation allocated to mobile radio base stations. Bioelectromagnetics, 27(6):494-504, 2006.

[168] I.Y. Belyaev, C. Baureus 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, 2006.

[169] S. Lee, D. Johnson, K. Dunbar, H. Dong, X. Ge, Y.C. Kim, C. Wing, N. Jayathilaka, N. Emmanuel, C.Q. Zhou, H.L. Gerber, C.C. Tseng, S. Ming Wang. 2.45 GHz radiofrequency fields alter gene expression in cultured human cells. Febs letters, 579(21):4829-4836, 2005.

[170] R. Zhao, S. Zhang, Z. Xu, L. Ju, D. Lu, G. Yao. Studying gene expression profile of rat neuron exposed to 1800 MHz radiofrequency electromagnetic fields with cDNA microassay. Toxicology, 235(3):167-175, 2007.

[171] T.D. Whitehead, E.G. Moros, B.H. Brownstein, and J.L. Roti Roti. Gene expression does not change significantly in C3H 10T1/2 cells after exposure to 847.74 CDMA and 835.62 FDMA radiofrequency radiation. Radiation research, 165(6):626-635, 2006.

[172] http://david.abcc.ncifcrf.gov/

[173] D.W. Huang, B.T. Sherman, R.A. Lempicki. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nature protocols, 4(1):44-57, 2009.

[174] G.J. Dennis, B.T. Sherman, D.A. Hosack, J. Yang, W. Gao, H.C. Lane, R.A Lempicki. DAVID : Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. Genome biology, 4(5):P3, 2003.

[175] http://www.senat.fr/rap/r02-052/r02-0521.html

[176] http://www.cartoradio.fr/netenmap.php?cmd=zoomfull

[177] http://www.sante-radiofrequences.org/

[178] A.S. Lee. The ER chaperone and signalling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. Methods, 35(4):73-381, 2005.

[179] V. Makar, M. Logani, I. Szabo, and M. Ziskin. Effect of millimeter waves on cyclophophamide induced suppression of T cell functions. Bioelectromagnetics, 24(5):356-365, 2003.

[180] A.B. Gapeyev, E.N. Mihailik, N.K. Chemeris. Features of anti-inflammatory effects of modulated extremely high-frequency electromagnetic radiation. Bioelectromagnetics, 30(6):454-461, 2009.

[181] J. Koolman, K.H. Röhm, Atlas de poche de biochimie, deuxième édition, 122-123. Medecine-sciences, Flammarion, 1999.

[182] http://www.emfdosimetry.org/dielectric/Appendix.A/AppendixA.html

[183] F. S. Barnes, B. Greenbaum. Handbook of biological effects of electromagnetic fields, Third edition, CRC Press.

[184] http://www.ccdmd.qc.ca/ri/cellule/?nh=27

[185] S. Luo, P. Baumeister, S. Yang, S.F. Abcouwer, and A.S. Lee. Induction of GRP78/BiP by translational block. The journal of biological chemistry, 278(39):37375-37385, 2003.

[186] A. Görlach, P. Klappa, and T. Kietzmann. The endoplasmic reticulum: folding, calcium homeostasis, signaling and redox control. Antioxidants and redox signaling 8 (9-10):1391-1410, 2006.

[187] http://www.nutrastem.fr/wp-content/uploads/2008/10/les-cellules-souches-dans-la-moelle-osseuse-et-le-sang.png

[188] G.R. Burgmester, A. Pezzotto. Atlas de poche d'immunologie, deuxième edition, Médecine-sciences, Flammarion, 2002.

Annexes

Annexe I : Rappels sur les propriétés des ondes électromagnétiques

Cette annexe consiste en un bref rappel sur les propriétés des ondes électromagnétiques, notamment dans le contexte des interactions ondes/vivant.

1. Propriétés physiques des ondes électromagnétiques

Contrairement aux ondes acoustiques, une onde EM constitue une forme de transport d'énergie sans support. Les ondes EM se déplacent dans le vide à la vitesse de la lumière. Dans un milieu, cette vitesse, ainsi que la longueur d'onde sont toutefois plus réduites. En fonction de leur type d'interaction avec la matière, les radiations EM peuvent être classées en deux catégories :

- Les radiations ionisantes, localisées au-delà de 3.10^{15} Hz (UV lointains, rayons X, rayons γ)
- Les radiations non ionisantes (très basses fréquences, RF et micro-ondes, IR, lumière visible, UV proches).

Les radiations ionisantes peuvent briser des liaisons chimiques ou ioniser les atomes, ce qui crée des radicaux libres extrêmement dangereux pour les organismes vivants. À l'inverse, les radiations non ionisantes ne sont pas suffisamment énergétiques pour casser des liaisons chimiques ou ioniser des atomes. Les ondes non ionisantes peuvent cependant provoquer des réactions photochimiques, l'exemple le plus connu étant la photosynthèse ; les végétaux et les algues recueillant l'énergie lumineuse et utilisant celle-ci pour former des substances organiques à partir d'eau et de dioxyde de carbone (CO_2) [181]. Les réactions photochimiques restent restreintes aux propriétés de la lumière ; cependant, les rayonnements non ionisants peuvent interagir avec la matière, entraîner des vibrations moléculaires importantes, provoquant un dégagement de chaleur (cette propriété étant notamment utilisée par les fours à micro-ondes) [2]. Cette production de chaleur serait associée à l'absorption de l'énergie électromagnétique, laquelle résulte de la conductivité des matériaux. Cette conductivité électrique dépendrait ainsi du mouvement translationnel de particules chargées (les ions) mais aussi du travail effectué par le champ électrique pour entraîner des rotations de dipôles, tels que l'eau par exemple. Celle-ci possède un moment dipolaire permanent qui s'oriente de manière aléatoire en absence de champ électrique appliqué. Le champ électrique va orienter le

moment dipolaire dans sa direction mais, en raison de la viscosité de l'eau, devra fournir un travail pour entraîner la rotation des dipôles, lequel se traduira par un transfert d'énergie dans le liquide, conduisant ainsi au dégagement de chaleur [6].

Pour les ondes EM, le terme de densité de puissance (S) est employé. Il est exprimé en W/m², avec S = $\frac{1}{2}$E*H où E est le champ électrique et H le champ magnétique. La puissance correspond au taux de production ou de consommation de l'énergie, mesurée en watts (W). Un watt équivaut à un joule par secondes (J/s). La densité de puissance correspond à l'énergie qui passe par unité de surface par unité de temps. Cette caractéristique est largement utilisée en ondes MM comme grandeur dosimétrique, à cause de la faible pénétration de ces ondes dans les tissus biologiques.

Pour quantifier l'énergie absorbée dans les tissus, le terme de débit d'absorption spécifique (DAS) est utilisé. Cette grandeur caractérise l'énergie absorbée par unité de masse par unité de temps. Le DAS est exprimé en W/kg. En relation avec l'intensité du champ électrique (notée *E*), au sein d'un tissu, cette formule devient alors :

DAS = $\frac{\sigma E^2}{\rho}$ où σ est la conductivité spécifique du tissu (en S/m) et ρ la densité du tissu, (en kg/m^3).

Cette grandeur est généralement utilisée pour quantifier les niveaux d'exposition pour les fréquences inférieures à 10 GHz. Les différentes approches de détermination de DAS en ondes MM sont décrites en détail dans l'article de Zhadobov et collègues [58].

Naturellement, les ondes utilisées dans les systèmes de télécommunication font partie de la catégorie des rayonnements non ionisants et ne sont pas capables d'induire de réactions de type photochimique.

2. Micro-ondes et ondes millimétriques à l'interface entre l'air et les tissus biologiques

L'interaction entre une onde incidente et le corps humain peut être caractérisé par trois phénomènes :

1. Réflexion de l'onde à la surface du corps.
2. Transmission d'une partie de l'énergie dans le corps.

3. Atténuation de l'onde dans les tissus.

Ces trois phénomènes sont principalement déterminés par la fréquence et les propriétés diélectriques des tissus biologiques. Les propriétés diélectriques sont caractérisées par deux grandeurs physiques : (1) permittivité diélectrique et (2) conductivité.

La permittivité est une propriété qui décrit la réponse d'un milieu à un champ électrique appliqué et se traduit par la capacité de la matière à se polariser en réponse à l'exposition au champ électrique.

La conductivité caractérise les pertes électriques. On distingue la conductivité ionique qui est liée à la présence des charges libres et la conductivité électrique qui caractérise les pertes diélectriques. Plus la conductivité d'un tissu est grande et plus ce tissu est capable d'absorber de l'énergie électromagnétique. Il est important de préciser que la permittivité et la conductivité pour un tissu donné dépendent de la fréquence **(figure A1)** [182].

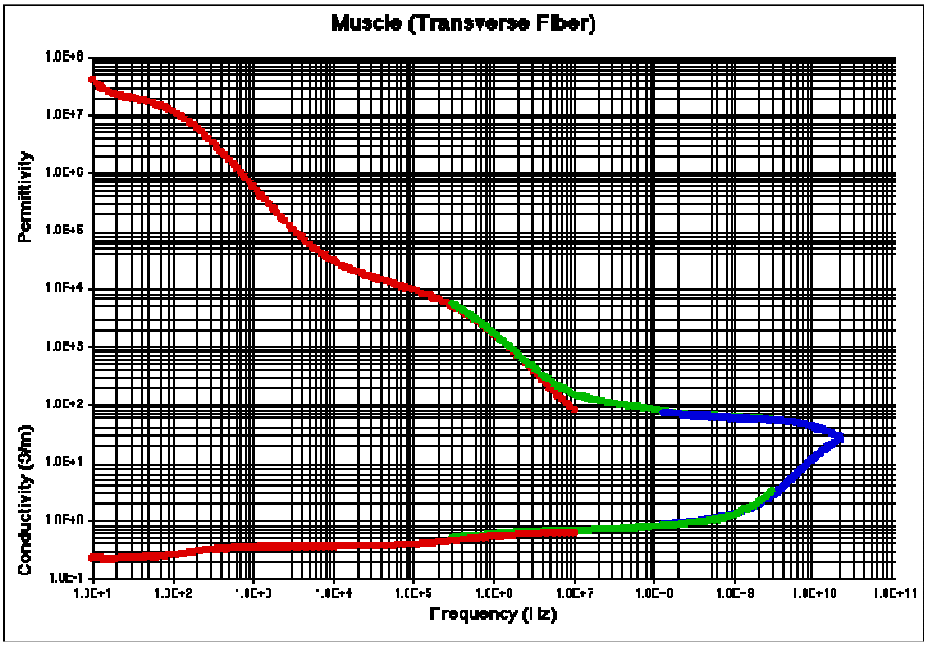

Figure A1 : Permittivité et conductivité d'un tissu biologique (ici fibre transverse de muscle) en fonction de la fréquence [182]

La **figure A2** illustre quant à elle que la partie transmise de la puissance augmente avec la fréquence.

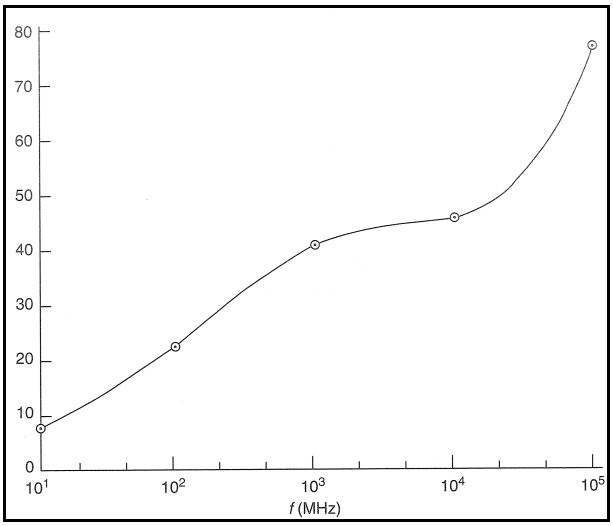

Figure A2 : Représentation graphique de la correspondance entre le ratio de la puissance transmise et de la puissance incidente (exprimé en %, axe des ordonnées), en fonction de la fréquence [183]

L'énergie transmise dans les tissus est partiellement absorbée par ces derniers. Le paramètre qui caractérise cette atténuation est dénommé profondeur de pénétration. La **figure A3** montre la profondeur de pénétration d'une onde plane en fonction de la fréquence.

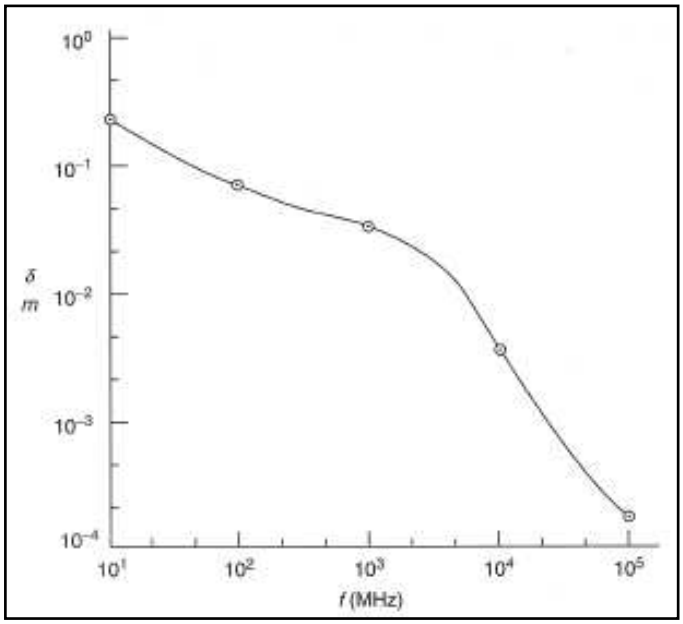

Figure A3 : Profondeur de pénétration d'une onde électromagnétique dans un muscle [183]

On peut par ailleurs constater sur cette figure que les hautes fréquences du spectre micro-ondes pénètrent moins dans les tissus que les basses fréquences [183].

Annexe II : La cellule animale

1. Description générale

La cellule est l'unité de base de tout être vivant **(figure A4)** [184].

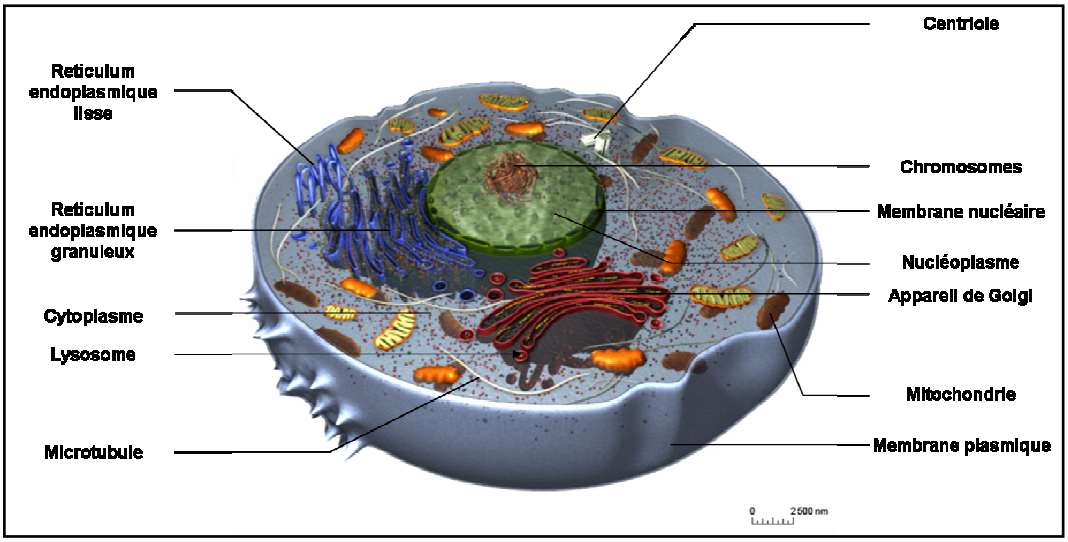

Figure A4 : Représentation schématique d'une coupe de cellule animale et des différents organites la constituant [184]

Il s'agit du plus petit élément capable de manifester les propriétés du vivant. Elle entretient différentes relations avec son milieu externe, dont elle est délimitée par une membrane plasmique. La cellule prélève les éléments nutritifs contenus dans le milieu externe et les transforme en fonction de ses besoins et de son code génétique. Il en résulte ainsi la production de substances qui peuvent à leur tour modifier l'environnement interne ou externe de la cellule.

Les activités cellulaires sont rendues possibles par certaines structures présentes à l'intérieur des cellules : ce sont les organites, qui renferment des composants essentiels pour assurer le fonctionnement cellulaire : les ribosomes, les mitochondries, le réticulum endoplasmique (RE), l'appareil de Golgi, les lysosomes.

La cellule eucaryote contient un noyau, organite limité par une enveloppe, renfermant le matériel génétique sous forme d'acide désoxyribonucléique (ADN), qui sera présent sous la forme de chromosome ou de chromatine en fonction de l'état biologique de la cellule.

Au cours de la partie suivante nous décrirons plus en détail la membrane plasmique, ainsi que le RE.

2. La membrane plasmique

Toutes les cellules vivantes sont délimitées de leur environnement par une fine membrane, appelée membrane plasmique. Au sein d'une cellule, il peut aussi exister différents types de membranes (membrane du RE, nucléaire, de l'appareil de Golgi), lesquelles ne possèdent pas les mêmes fonctions mais partagent néanmoins une structure d'organisation commune. Les membranes sont constituées de phospholipides et de protéines qui sont maintenues les unes aux autres par des liaisons non covalentes. Les membranes cellulaires sont des structures fluides, dynamiques, dans lesquelles les lipides s'organisent en une double couche continue appelée bicouche lipidique, **figure A5** [89], et constituent ainsi la structure de base de la membrane.

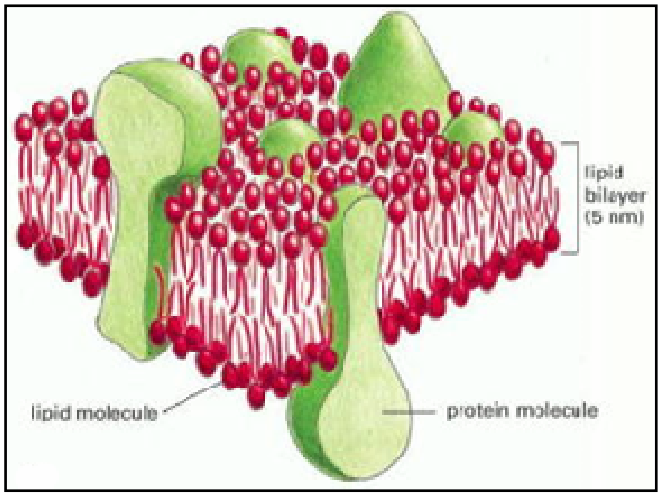

Figure A5 : Organisation de la membrane plasmique en bicouche lipidique
Les lipides sont en rouge, les protéines membranaires en vert [89].

Les protéines imbriquées dans cette bicouche confèrent plusieurs fonctions possibles (transporteurs spécifiques de molécules, récepteurs cellulaires) [89].

Les membranes plasmiques constituent donc une barrière entre les cellules et leur environnement et sont, enfin, responsables de nombreux mécanismes électrophysiologiques. Il existe de nombreux canaux ioniques au niveau des membranes. Ces dernières seront les premières à percevoir, dans un premier temps, les expositions aux ondes MM. Du fait de leur organisation et de la présence de protéines fonctionnelles, l'exposition peut provoquer des perturbations structurales ou physiologiques (perturbations des flux ioniques par exemple) ou indiquer à la cellule qu'un phénomène particulier est en train de se produire.

Les membranes biologiques artificielles (ou biomembranes) constituent un très bon modèle d'étude, afin de tenter de déterminer si les champs électromagnétiques peuvent avoir

une incidence sur les membranes biologiques. Plusieurs méthodes de « fabrications » de biomembranes existent, elles ne seront pas détaillées ici. Il existe un autre modèle d'étude. Celui-ci repose sur l'utilisation de vésicules lipidiques ou liposomes **(figure A6)**.

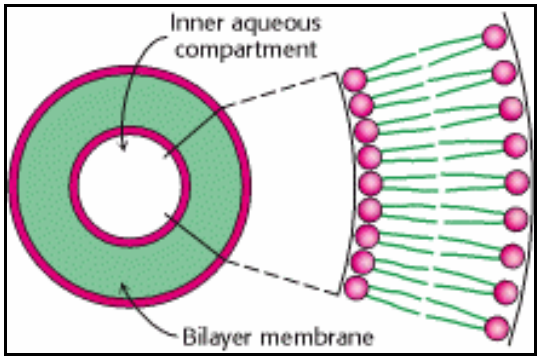

Figure A6 : Détail de la structure d'un liposome
Il s'agit d'un compartiment aqueux entouré d'une bicouche lipidique [89].

Brièvement, ces vésicules, tout comme pour les membranes artificielles, sont « créées » à partir de phospholipides (en général à partir de phosphatidylcholine) mis en suspension dans un milieu aqueux. Les phospholipides sont des molécules possédant une tête polaire (hydrophile) et une queue riche en groupements carbonés (hydrophobe). Ces molécules vont rapidement s'organiser en solution aqueuse, en formant une bicouche lipidique, les groupements polaires se plaçant au contact du milieu aqueux, tandis que les groupements apolaires interagissent entre eux. Ces structures sont très utilisées pour étudier la perméabilité de la membrane ou pour délivrer des molécules chimiques aux cellules (en pharmacologie par exemple). Elles présentent l'avantage de pouvoir être observées directement au microscope.

3. Le réticulum endoplasmique

Le RE est le plus grand organite retrouvé dans les cellules eucaryotes, dont il occupe environ 10% du volume total. Le RE est un système membranaire fermé organisé en un réseau de tubules et de sacs clos interconnectés, qui s'étend du feuillet externe de la membrane nucléaire à travers le cytoplasme **(figure A7)**.

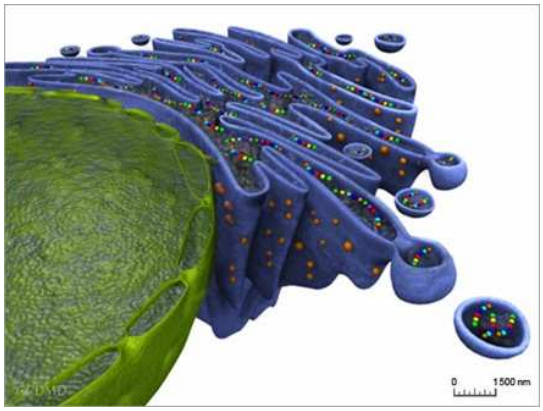

Figure A7 : Schéma représentatif du réticulum endoplasmique (en bleu)
Celui-ci est en continuité directe avec la membrane nucléaire (en vert). Des ribosomes (orange) sont localisés sur la surface du réticulum [184].

La membrane du RE correspond à elle seule à 50% de l'ensemble des membranes retrouvées au sein d'une cellule. Elle délimite ainsi le cytosol de la lumière du RE (cavité intérieure), aussi appelée citerne, et régule le transfert sélectif de molécules entre ces deux compartiments.

Le RE possède un rôle central dans la biosynthèse des protéines et des lipides. Sa membrane est le site de production des protéines transmembranaires et des lipides de la plupart des organelles de la cellule (RE, appareil de Golgi, lysosomes, endosomes, protéines sécrétées et membrane plasmique). Toutes les protéines sécrétées dans le milieu extracellulaire, ainsi que celles destinées à d'autres organelles transiteront par le RE [89]. De même, il est aussi responsable de la synthèse de la majorité des lipides des membranes mitochondriales et peroxysomales.

Le RE est l'organite principal de stockage du calcium (Ca^{2+}) de la cellule [185]. Il assure le maintien d'une concentration basse de Ca^{2+} au niveau du cytoplasme par le biais d'une pompe Ca^{2+}-ATP_{ase}, laquelle pompe le Ca^{2+} dans le RE. Le stockage du Ca^{2+} dans le RE est facilité par la forte concentration de protéines capables de lier le Ca^{2+}, notamment des protéines résidentes telles que les chaperons [186].

Pour en revenir aux rôles principaux du RE, il existe, au sein d'une même cellule, deux types distincts de RE appelés réticulum endoplasmique granuleux ou rugueux (RER ou REG) et réticulum endoplasmique lisse (REL), lesquels ne possèdent ni la même morphologie, ni les mêmes fonctions **(figure A8)**.

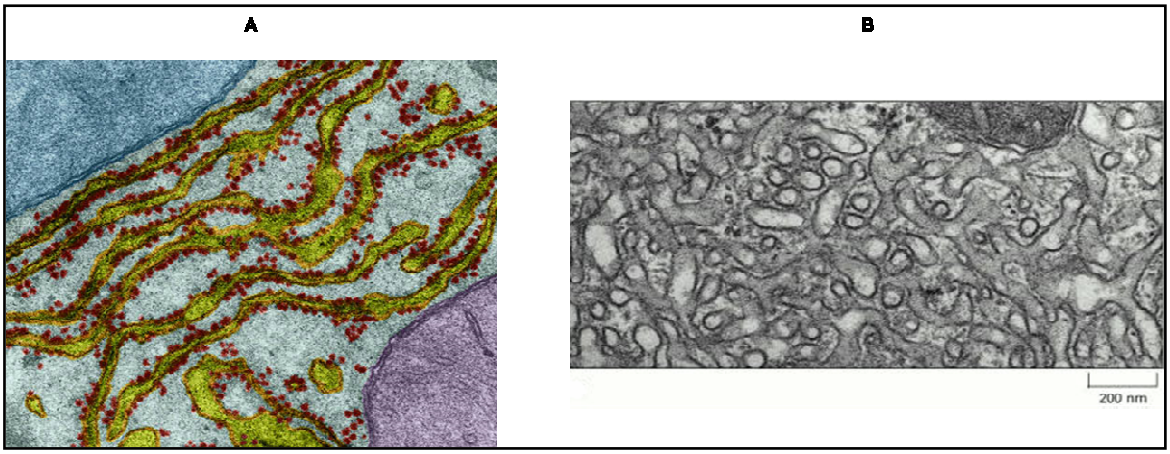

Figure A8 : Les deux types de réticulum endoplasmique
A) Réticulum endoplasmique granuleux (REG) coloré en jaune. Les ribosomes fixés à la membrane du REG sont en rouge.
B) Réticulum endoplasmique lisse (REL) d'une cellule sécrétant des hormones stéroïdes [184].

LE REG **(figure A8A)** est dénommé ainsi en raison de sa morphologie, puisqu'il est recouvert de ribosomes qui sont liés à sa membrane. Il est responsable de la synthèse des protéines membranaires (pour lui-même et pour d'autres organelles) et des protéines destinées à l'exportation en dehors de la cellule (protéines sécrétées). La synthèse de l'ensemble des protéines de la cellule démarre toujours dans le cytoplasme. Concernant les futures protéines membranaires, sécrétées ou spécifiques des organelles, la présence d'une séquence particulière d'acides aminés, appelée peptide signal, va entraîner, par la fixation du ribosome sur la membrane du REG, la poursuite de la traduction de l'ARNm au niveau du REG.

La synthèse des protéines dans le REG n'est qu'une première étape. Une fois synthétisée, une protéine n'est encore qu'une chaîne polypeptidique non repliée et bien incapable de remplir une fonction. Au sein du REG, elle va subir de nombreuses modifications, appelées modifications post-traductionnelles ; on parle alors de maturation des protéines. Celle-ci lui permettra d'acquérir sa structure finale et d'être fonctionnelle. La plupart des protéines présentes dans le REG sont en transit ; toutefois, il existe aussi des protéines résidantes permanentes ; celles-ci possédant une séquence signal spécifique. Elles sont retrouvées en très forte concentration dans le REG et ont pour rôle d'aider à l'assemblage et au repliement correct des protéines. Parmi elles, on peut distinguer les protéines de la famille des protéines disulfures isomérases, plus connues sous l'acronyme de PDI, qui vont catalyser l'oxydation des chaînes latérales -SH des cystéines (un acide aminé) en ponts disulfures S-S.

Une autre protéine résidante extrêmement importante du RE est le chaperon BiP (Immunoglobulin Heavy-Chain Binding Protein), aussi dénommé « glucose regulated

protein » (GRP78). Ce chaperon reconnaît les protéines mal repliées ou mal assemblées, celles-ci présentant la particularité d'exposer, au sein du réticulum, un groupe de résidus hydrophobes, qui normalement doivent se retrouver au cœur de la protéine, entraînant un risque d'agrégation protéique, et mettant ainsi en danger l'équilibre du réticulum (en général, une protéine se retrouve dans un milieu aqueux et sa structure est organisée de telle manière que les résidus hydrophobes des acides aminés la constituant ne soient pas exposés au milieu extérieur. Le même phénomène est observé au niveau des membranes lipidiques). BiP se fixe donc sur la partie hydrophobe et tente, en présence d'adénosine triphosphate (ATP), de replier correctement cette protéine. En cas d'échec pour replier une protéine mal conformée, les protéines chaperons du RE accompagneront celles-ci vers une voie de dégradation. Enfin, par contraste avec les protéines cytoplasmiques, la plupart des protéines membranaires ou sécrétées seront glycosylées. Cette glycosylation a pour but de modifier la solubilité, la stabilité et la charge des protéines et se produit spécifiquement sur un résidu asparagine (ASN ou N d'après la nomenclature des acides aminés) du peptide, De nombreuses glycosidases, présentes dans le REG pourront modifier ce groupement.

Une fois la maturation de la protéine terminée et à condition que celle-ci soit correctement repliée, elle pourra alors quitter le RE. Il peut cependant arriver que, malgré tous les mécanismes mis en place dans le RE, des protéines ne parviennent pas à se replier correctement. Dans ce cas, elles seront exportées dans le cytosol où elles seront dans un premier temps déglycosylées, puis ubiquitinées par des enzymes ubiquitine-conjugase liées au RE et enfin dégradées dans le protéasome **(figure A9)** [89].

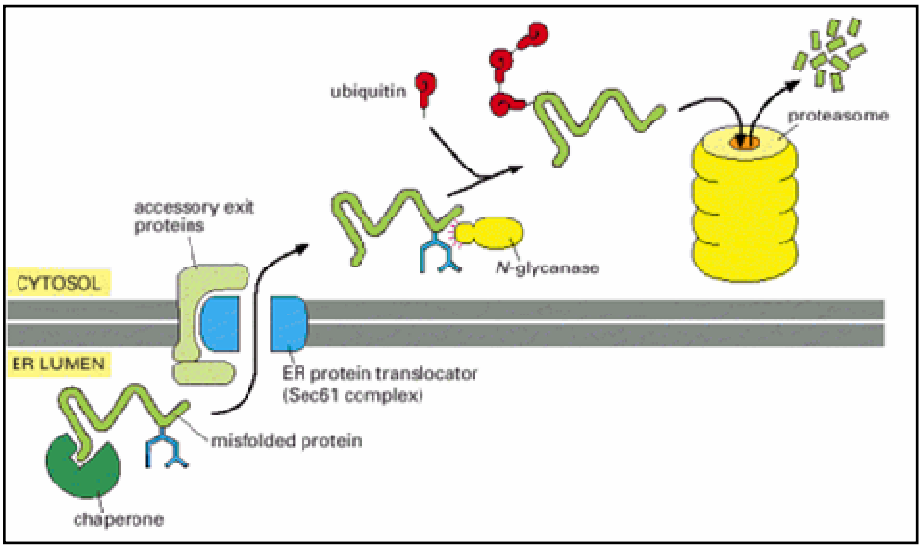

Figure A9 : Exportation et dégradation des protéines mal conformées
Dans le RE, le chaperon n'est pas parvenu à replier correctement la protéine. Celle-ci sera alors exportée dans le cytosol, via un pore dans la membrane du RE, puis sera déglycosylée et liée par des ubiquitines qui seront reconnues par le protéasome, lequel dégradera alors la protéine [89].

Les régions du RE dépourvues de ribosomes sont désignées sous le terme de réticulum endoplasmique lisse (REL) **(figure A8B)**.

Dans la majorité des cellules, ces régions sont très étroites et, souvent cohabitent avec des régions granuleuses. Toutefois, il existe certains types de cellules où le REL sera particulièrement développé, en particulier au niveau de cellules spécialisées dans le métabolisme des lipides, la détoxification des médicament ou la synthèse des hormones stéroïdes.

Les membranes du REL de certaines cellules (les hépatocytes notamment) peuvent posséder des enzymes de la famille des cytochromes P450, spécialisées dans la détoxification de composés, tels que les médicaments notamment, pouvant présenter un risque pour les cellules biologiques. Enfin, certaines cellules endocrines (cellules de Leydig du testicule) responsables de la synthèse des hormones stéroïdes possèdent elles aussi un REL bien développé.

La membrane du RE est responsable de la synthèse des principales familles de lipides, dont les phopholipides et le cholestérol, retrouvées dans les cellules. De manière générale, les membranes plasmiques, l'appareil de Golgi, les lysosomes communiquent avec le RE par des vésicules de transport qui transfèrent ainsi les protéines et les lipides nouvellement synthétisés.

Annexe III : Organisation structurale de la peau

La peau est un organe constitué par l'assemblage de différents tissus et possédant de nombreuses fonctions spécialisées. Elle est constituée de trois couches, l'épiderme, le derme et l'hypoderme **(figure A10)** [89].

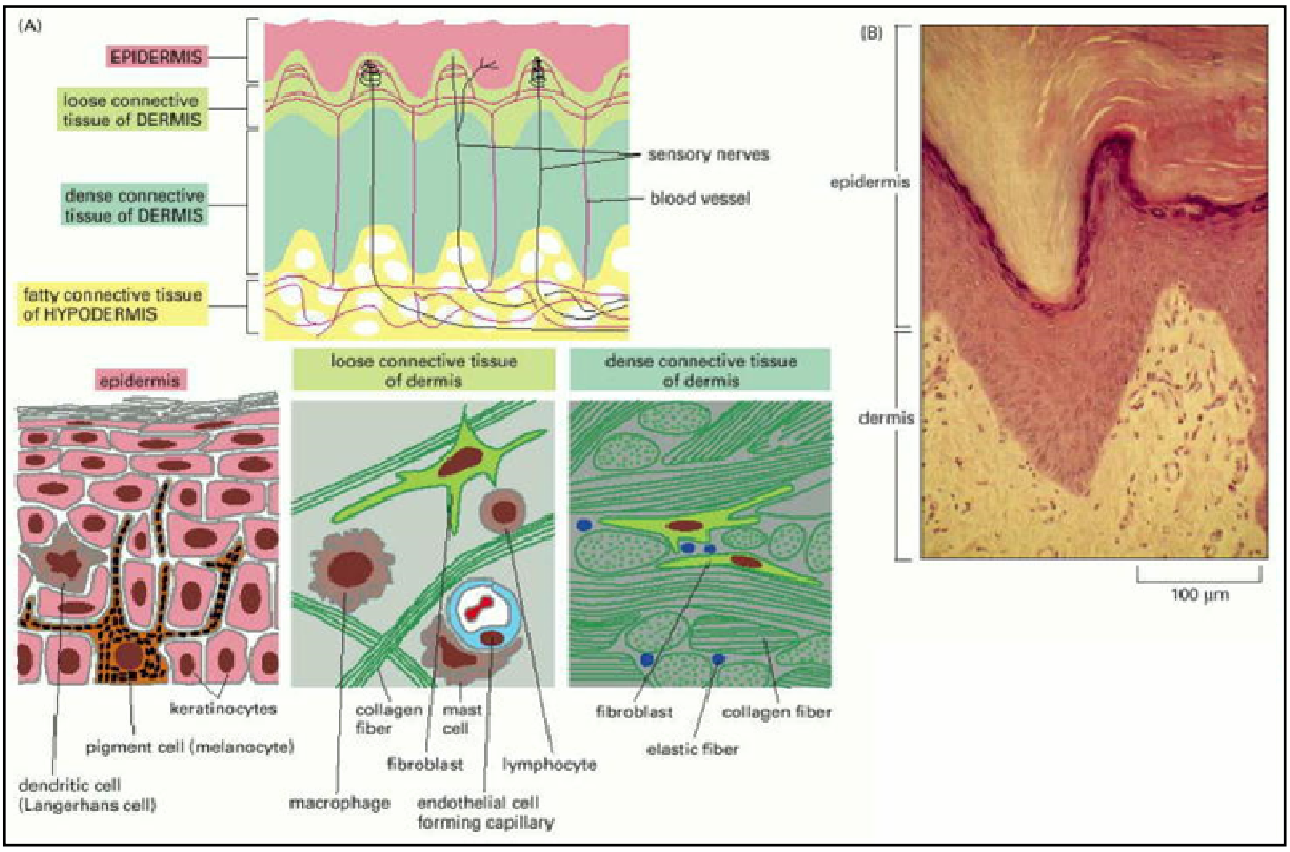

Figure A10 : Organisation structurale de la peau
[A] Représentation schématique des trois couches composant l'architecture de la peau, avec en dessous un détail des différents types cellulaires constituant les différentes couches de ce tissu.
[B] Coupe de peau humaine observée au microscope [89].

L'épiderme constitue la frontière entre l'organisme et l'environnement. Il est beaucoup plus exposé que la plupart des autres tissus de l'organisme et, par conséquent, doit faire face à un renouvellement fréquent. Il s'agit donc d'une structure dynamique. L'épiderme est un épithélium pluristratifié constitué majoritairement de kératinocytes. Les cellules changent de forme d'une couche à l'autre. Par exemple, sa couche supérieure est appelée couche cornée et est constituée de kératinocytes morts, tandis que sa couche inférieure est appelée couche basale, où sont localisées les cellules souches de l'épiderme. D'autres cellules y sont aussi retrouvées, notamment les cellules dendritiques et les mélanocytes (cellules pigmentaires). Enfin, quelques terminaisons nerveuses peuvent être retrouvées au niveau de l'épiderme.

Le derme est un tissu de support de l'épiderme. Il est très riche en fibroblastes, cellules qui sécrètent la matrice extra-cellulaire (MEC), riche en collagène, qui fait de la peau un tissu particulièrement résistant aux contraintes. De par son organisation structurale, le derme est organisé en deux régions. La partie supérieure du derme est appelée région papillaire. Des vaisseaux sanguins ainsi que des cellules du système immunitaire (macrophages, mastocytes) y sont retrouvés. Cette région est constituée de tissu connectif mais celui-ci n'est pas très dense, contrairement à la partie inférieure du derme, appelée derme réticulé et dans laquelle le tissu connectif est très abondant et particulièrement organisé **(figure A10)**. Le derme contient aussi de nombreuses fibres sensorielles, lesquelles permettent d'envoyer des informations au système nerveux central (SNC) ou de relayer des informations provenant de celui-ci (sécrétion glandulaire, contraction de muscles lisses), ainsi que des vaisseaux sanguins qui permettent d'apporter les nutriments aux cellules de la peau, d'éliminer les déchets et enfin de fournir une voie d'accès aux cellules de l'immunité.

L'hypoderme est composé principalement de cellules graisseuses et connecte le derme aux muscles et tissus sous-jacents. Il est parcouru par les vaisseaux sanguins et les fibres nerveuses sensorielles [89].

Annexe IV : Le système immunitaire

Le système immunitaire est un appareil de défense hautement différencié et adaptable, qui possède un rôle protecteur contre des virus, bactéries, champignons et parasites, mais aussi contres certaines cellules appartenant à l'organisme lui-même. Ces micro-organismes, tout comme les cellules tumorales, peuvent être reconnus comme étrangers et détruits par le système immunitaire.

1. Origine des cellules du système immunitaire

Les agents principaux du système immunitaires sont les leucocytes, connus généralement sous le terme générique de globules blancs. Ces cellules proviennent de cellules souches hématopoïétiques pluripotentes et sont produites par la mœlle osseuse. En tant que précurseurs indifférenciés, ces cellules souches, peuvent se transformer, sous l'influence de médiateurs solubles (cytokines) et/ou de signaux de contact émis par d'autres cellules, en différentes cellules du sang **(figure A11)** [187].

Les précurseurs myéloïdes peuvent se différencier en chacun des types cellulaires suivants :

- Les mégacaryocytes, grandes cellules multinucléées qui se décomposent en petits fragments correspondant aux plaquettes.
- Les érythroblastes, qui se transformeront en érythrocytes circulants (aussi appelés hématies).
- Les myéloblastes, qui peuvent se différencier en neutrophiles, éosinophiles et basophiles (en raison de leur noyau plurilobé, ces cellules ont aussi été appelées polynucléaires) ; ou en monoblastes (précurseurs des monocytes), ou encore en cellules dendritiques. Ces trois derniers types de cellules, issus des myéloblastes sont capables d'engloutir des particules, des micro-organismes et des liquides ; on parle alors de phagocytes.

En réponse aux médiateurs solubles, telles que les chimiokines par exemple, les leucocytes migrent du sang vers les tissus où ils réparent des lésions et éliminent les bactéries, parasites et cellules mortes à l'origine d'une inflammation. Après leur migration dans les tissus, les monocytes se différencient en macrophages.

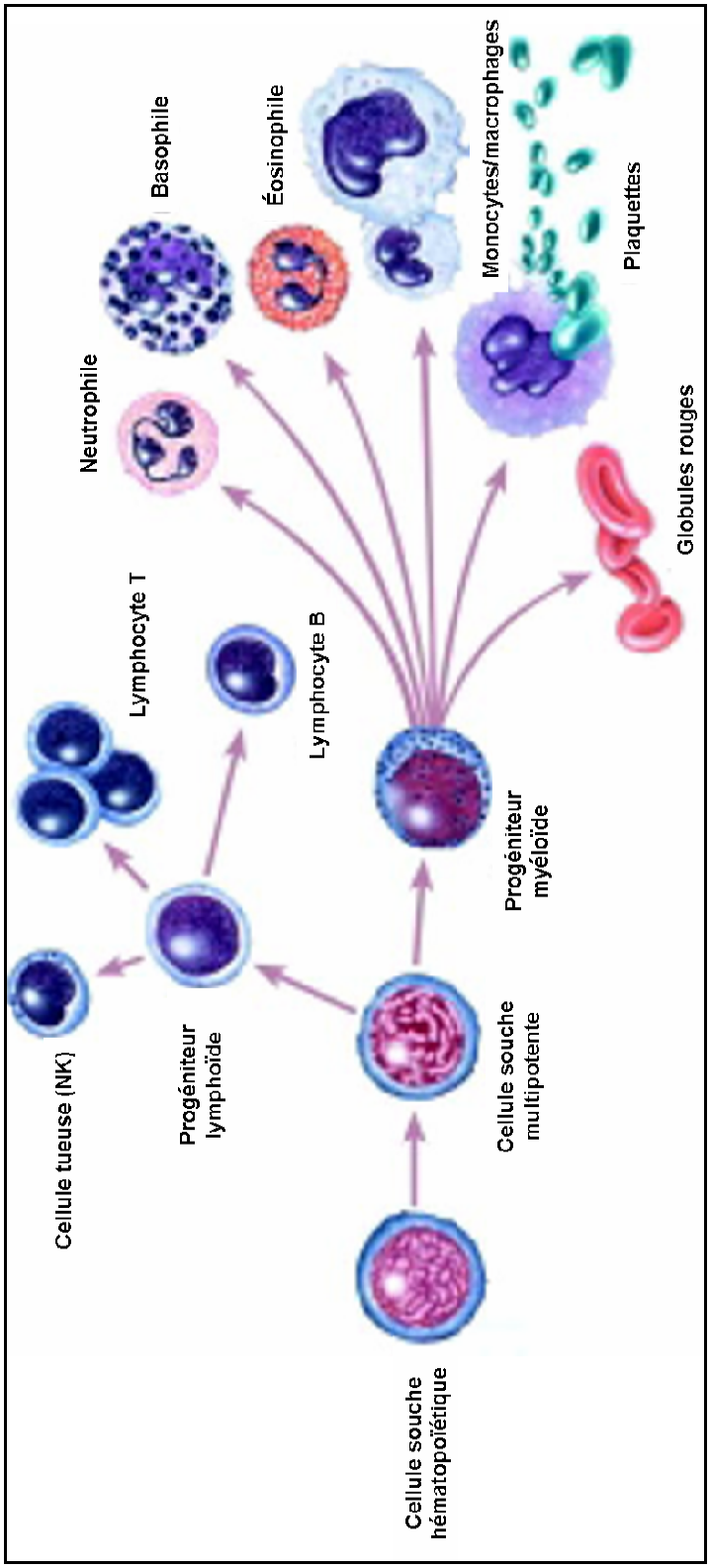

Figure A11 : Origine des cellules du système immunitaire [187]

La moelle osseuse produit aussi un autre précurseur commun, appelé précurseur lymphoïde, qui sera à l'origine des cellules lymphocytaires. On distingue les lymphocytes T, responsables de la réponse immune cellulaire, et les lymphocytes B, responsables de la production d'anticorps (aussi appelée réponse humorale). D'autres cellules, très proches morphologiquement des lymphocytes T sont aussi issues de ce précurseur lymphoïde ; ce sont les cellules Natural Killer (NK).

2. Mécanismes de défenses vis-à-vis des infections

Pour résister aux infections causées par des pathogènes, les organismes pluricellulaires ont développé des mécanismes de réponse. Ceux-ci sont de deux types ; on distingue la réponse immunitaire innée de la réponse adaptative. Au cours de la partie suivante, nous allons décrire les caractéristiques de chacune d'entre elles.

A. La réponse immunitaire innée

L'immunité innée est une très ancienne ligne de défense qui est hautement conservée parmi les différentes espèces. Elle se déclenche immédiatement après le début d'une infection et est basée sur la reconnaissance de structures typiques communes à un grand nombre de pathogènes (molécules de surface, ou ARN double brins des virus par exemple). Parmi les principales cellules impliquées dans cette réponse innée, on peut distinguer :

- Les cellules NK, capables de reconnaître sélectivement les cellules infectées par un virus ou les cellules tumorales et de les détruire en les « forçant » à se suicider (par le déclenchement de l'apoptose)
- Les cellules phagocytaires (neutrophiles, éosinophiles, basophiles, monocytes) qui utiliseront une combinaison d'enzymes de dégradation (lytiques), de peptides anti-microbiens et d'espèces activées de l'oxygènes pour détruire les micro-organismes
- Des protéines sanguines, regroupées sous le nom de molécules du complément, capables de rompre les membranes des micro-organismes, ou de signaler ceux-ci aux cellules phagocytaires, qui les détruiront alors.

Cette voie, bien que plus ancienne constitue une première ligne de défense contre les agents pathogènes. Elle peut néanmoins, par la libération de molécules spécifiques, provoquer le déclenchement de la réponse adaptative, les deux voies fonctionnant alors de concert pour éliminer les pathogènes.

B. La réponse immunitaire adaptative (ou acquise)

Cette réponse propose des mécanismes de défense nettement plus sophistiqués que ceux de la précédente, et les principaux effecteurs impliqués sont spécifiquement induits par des pathogènes particuliers. En outre, cette réponse offre aussi une protection de longue durée. La principale fonction de la réponse immunitaire adaptative est basée sur la présence de récepteurs possédant une haute spécificité pour certaines régions du pathogène. Toute substance capable d'induire la réponse immunitaire adaptative est appelée antigène. Le système immunitaire adaptatif est capable de percevoir spécifiquement des antigènes, même si ceux-ci présentent des différences infimes. La réponse immunitaire adaptative existe sous deux formes :

- La réponse immunitaire par sécrétion d'anticorps, aussi appelée réponse humorale
- La réponse immune cellulaire.

Ces réponses sont régulées par deux classes différentes de lymphocytes, respectivement les lymphocytes B et les lymphocytes T **(figure A12)**.

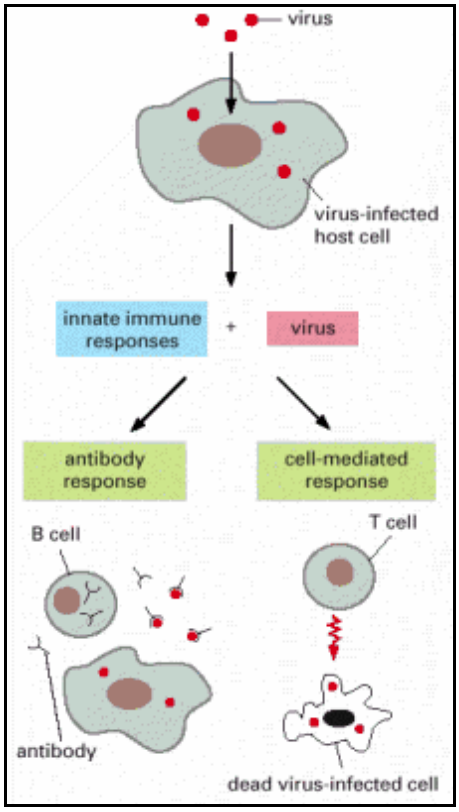

Figure A12 : Les deux types de réponses immunitaires adaptatives possibles
Lorsqu'une cellule est infectée par un virus, elle va dans un premier temps déclencher une réponse immunitaire innée, qui ne sera pas suffisante pour juguler cette infection. Une réaction immunitaire adaptative va alors se mettre en place. Les lymphocytes B (B cells) vont sécréter des anticorps qui reconnaîtront spécifiquement le virus et le neutraliseront, tandis que les lymphocytes T (T cells) vont tuer les cellules infectées [89].

- **Réponse humorale**

Lors de la réponse humorale, les lymphocytes B sont activés pour sécréter des anticorps, appelés également immunoglobulines. Les anticorps circulent dans le flux sanguin et peuvent atteindre rapidement les zones d'agression, où ils se fixent spécifiquement à l'antigène localisé sur le pathogène qui a stimulé leur production. Cette liaison peut inactiver les virus et les toxines bactériennes, les empêchant de se fixer aux récepteurs des cellules hôtes. Cette fixation sur un pathogène permet par ailleurs de les marquer et de les rendre plus facilement ingérables par les cellules phagocytaires de l'immunité innée [188].

- **Réponse immune cellulaire**

Les lymphocytes T réagissent directement contre les antigènes étrangers qui sont présentés à la surface des cellules hôtes. Par exemple lors d'une infection virale, les cellules infectées par le virus présentent à leur surface des antigènes viraux. Les lymphocytes T vont alors détruire ces cellules avant que le virus ne puisse proliférer. Les lymphocytes T sont aussi appelés lymphocytes T cytotoxiques, puisqu'ils peuvent « tuer » des cellules infectées en provoquant leur apopotose, ou en dégradant leurs membranes par la sécrétion de protéines lytiques. Les débris restants seront alors dégradés par des cellules phagocytaires et notamment les macrophages, qui seront activés à la suite de la sécrétion, par les lymphocytes T, de molécules (interféron-γ par exemple) de signalisation [89].

Résumé

Pour faire face à la saturation du spectre électromagnétique en matière de communications sans fil, les groupes industriels dominant le marché développent de nouveaux appareils de télécommunications sans fil, qui offriront un débit très élevé combiné à une meilleure confidentialité. Ces systèmes fonctionneront dans des bandes de fréquences autour de 60 GHz, naturellement absentes du spectre électromagnétique environnemental, ce qui suscite des interrogations légitimes quant à leur innocuité.

Ce travail de thèse porte sur l'analyse des effets potentiels des rayonnements millimétriques sur la physiologie de la cellule. Nous avons tout d'abord étudié les effets des ondes millimétriques par le biais d'études *in vitro*, en utilisant différents modèles de cultures de cellules humaines, exposés à différents temps et à différentes fréquences, notamment celles correspondantes à des résonances de groupement moléculaires, comprises entre 57 et 64 GHz. Nous avons étudié l'impact potentiel de ces ondes sur un organite cellulaire, le réticulum endoplasmique, connu pour être sensible à son environnement et impliqué dans de nombreuses pathologies. Nous avons ensuite étudié les effets de la variation de puissance sur des processus physiologiques concernant le réticulum endoplasmique mais aussi sur la synthèse de protéines spécifiques liées à la réponse inflammatoire. Enfin, par la technique de puces à ADN, nous avons réalisé une approche transcriptomique à haut débit, portant sur l'ensemble du génome, afin de déterminer l'existence de gènes cibles sensibles à des expositions aux ondes millimétriques. Plusieurs gènes candidats ont été sélectionnés et serviront de biomarqueurs.

Abstract

To cope with the saturation of the electromagnetic spectrum, telecommunications world leaders are developing new wireless devices, which provide very high data-rate transmission combined with greater confidentiality. These systems will operate in a frequency band around 60 GHz, naturally absent from environmental electromagnetic spectrum, which raises legitimate question about their safety.

This work focuses on the analysis of the potential effects of millimeter radiations on the cell physiology. We first studied the effects of millimeter waves through in vitro studies using different models of human cell cultures exposed during various times to different frequencies, including those corresponding to molecular groups resonances, ranging between 57 and 64 GHz. We studied the potential impact of these electromagnetic waves on a cellular organelle, the endoplasmic reticulum, known to be sensitive to its environment and involved in many diseases. We then studied the effects of power variation on physiological processes on the endoplasmic reticulum but also on the synthesis of specific proteins related to the inflammatory response. Finally, by using a DNA microarrays method, we performed a high throughput transcriptomic approach, covering the entire genome, to determine potential millimetre waves target genes. Several candidate genes were selected.