



HAL
open science

Etude du dispositif médical "Remedee one" utilisant les ondes millimétriques dans la réponse analgésique : mécanisme et innocuité in vitro

Morgane Lebosq

► To cite this version:

Morgane Lebosq. Etude du dispositif médical "Remedee one" utilisant les ondes millimétriques dans la réponse analgésique : mécanisme et innocuité in vitro. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Rennes, 2021. Français. NNT : 2021REN1B043 . tel-04194176

HAL Id: tel-04194176

<https://theses.hal.science/tel-04194176>

Submitted on 2 Sep 2023

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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : « Biologie moléculaire et cellulaire, Biochimie »

Par

LEBOSQ Morgane

Etude du dispositif médical « Remedee one » utilisant les ondes millimétriques dans la réponse analgésique

Mécanisme et innocuité *in vitro*

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 30 Novembre 2021

Unité de recherche : IRSET-Inserm UMR_S 1085

Rapporteurs avant soutenance :

Brahim SELMAOUI Directeur de Recherche-INNERIS
Sabine FRANCOIS Chef de projet - IRBA

Composition du Jury :

Brahim SELMAOUI Directeur de Recherche-INNERIS
Sabine FRANCOIS Chef de projet - IRBA
Isabelle LAGROYE Directrice d'études – IMS
David CROUZIER Co-founder & CEO – REMEDEE labs
Sophie LANGOUET DR Inserm – UR1 **Présidente**
Yves LE DREAN PR UR1 – **Directeur de thèse**

Remerciements

L'heure est venue pour moi de tourner la page de cette thèse après 3 années de montagnes russes d'émotion. Je ne saurais envisager cette conclusion sans prendre le temps nécessaire de remercier ceux qui ont fait de ce défi une expérience humaine et professionnelle élevatrice. Je voudrais tout d'abord remercier grandement **Yves Le Drean**, mon directeur de thèse, pour toute son aide. Ses conseils et son expertise ont été le pilier de mes recherches. J'ai énormément appris durant ce projet. À toute l'équipe TREC, je vous dis merci pour le chemin parcouru ensemble, merci pour le climat de respect, de confiance et de labeur que nous avons réussi à instaurer, merci pour votre disponibilité, votre engagement, votre esprit d'entraide ! Merci particulièrement à **Catherine, François** et **Thierry** qui ont apposé leur patte à ce manuscrit. Merci pour toutes les pauses café dans la « tisanière » qui m'ont permis de me vider la tête et repartir sur de bonnes bases.

Évidemment, ce projet n'aurait pas vu le jour sans la société **Remeedee labs** et les collaborateurs qui m'ont acceptée dans leur rang. Mes séjours à Grenoble furent brefs, mais riches en échanges. Merci à toute l'équipe (qui grandit au fur et à mesure des années !! encore félicitation) pour votre accueil chaleureux. Je tiens particulièrement à remercier **David Crouzier** qui a su me motiver dans les moments les plus sombres. Merci également à **Jean-Claude** pour tous ses conseils et sa gentillesse.

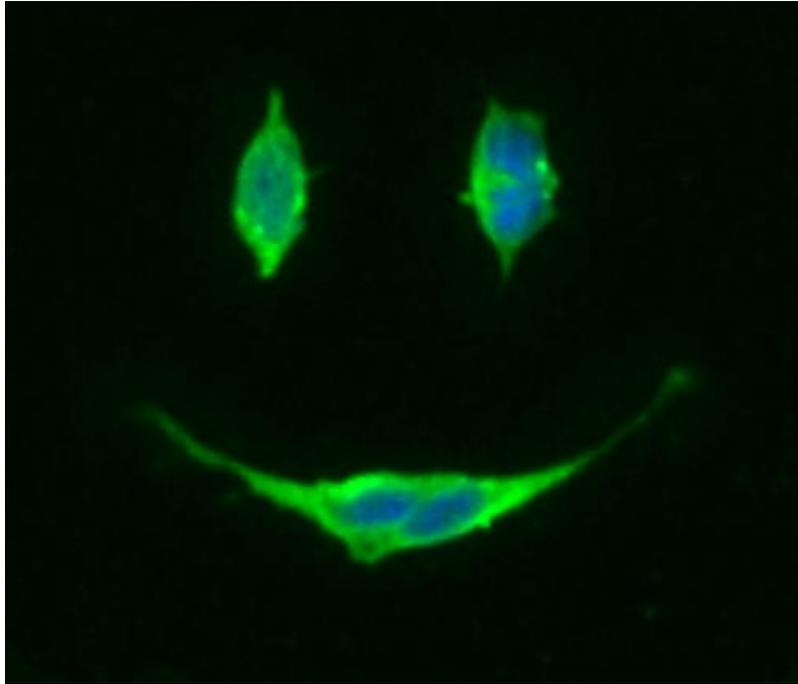
Evidemment, je remercie vivement les lecteurs de ce manuscrit. Merci **Sabine François**, et Brahim **Selmaoui** pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Merci à **Isabelle Lagroye, Sophie Langouet, et David Crouzier** d'avoir accepté de faire partie des membres du jury.

Merci à **Nathalie Theret** et **Xavier Le Goff** pour leurs conseils et leur écoute dans les moments compliqués. Sans eux, ce challenge n'aurait sans doute pas été relevé !

Merci à l'armée des **doctorants et post-doctorants**, ceux qui restent (courage à vous !) comme ceux qui sont partis, pour cette entraide mutuelle, ces coups de blues et ces éclats de rire. **Léa, Edith, Nad, Indhu, Leila, Juliette, Salomé, Mayrine, Pauline, Juliette, Louis, Remi, Annabelle, Nad**, et tous les autres, votre soutien et vos sourires ont été déterminant ! Malgré la crise du COVID-19, malgré les hauts et les bas que l'on connaît dans une thèse, nous sommes restés soudés tous ensemble, dans le même bateau.

Je garde un souvenir réjouissant du club **DOC'7** dans lequel j'ai pu enrichir mes compétences de management et de gestion de projet. Merci à mes collègues, membre du bureau, sans qui tout cela n'aurait pas été possible. Mention spéciale à **Ghania** avec qui nous sommes cassées la tête pour mener à bien toutes nos missions !

Je remercie toutes les personnes avec qui j'ai partagé mes études et notamment ces années de thèse. Mes derniers remerciements vont bien sûr à ma famille et à « chéri » qui ont tout fait pour m'aider et surtout qui m'ont soutenu dans tout ce que j'ai entrepris.



Happy cells

Coloration en immunofluorescence de la sérotonine (vert) et des noyaux (bleu) dans des cellules de la lignée SH-SY5Y

A ma famille

A chéri

Résumé

En France, la douleur est à l'origine de près des deux tiers des consultations médicales [INSERM 2016]. Le traitement de la douleur chez l'adulte repose principalement sur des médicaments dits analgésiques tels que le paracétamol, les opioïdes ou les médicaments morphiniques. Efficaces contre la douleur aiguë, ces médicaments peuvent entraîner des effets secondaires importants s'ils sont utilisés de façon chronique. Afin d'augmenter la qualité de la prise en charge de la douleur, diverses techniques antalgiques complémentaires non pharmacologiques sont à l'étude, notamment dans le domaine des champs électromagnétiques. Cela inclut la thérapie stimulation nerveuse électrique transcutanée (TENS, Vance et al. 2014), la stimulation magnétique transcrânienne (TEMS-Vance et al. 2014, Wassermann et Epstein, 2008) ou encore l'exposition aux ondes millimétriques (OMM) [Pakhomov 1998, Ziskin, 2013].

Les OMM sont des ondes électromagnétiques dans la gamme de fréquences de 30 à 300 GHz, correspondant à la partie supérieure du spectre des micro-ondes. Principalement utilisée en Europe de l'Est, pays de l'ex-URSS, la thérapie utilisant les OMM était une technique non invasive utilisée pour traiter de nombreuses maladies telles que cardiovasculaires, le cancer, le diabète, et surtout pour le soulagement de la douleur [Rojavin et Ziskin, 1998 ; Ziskin, 2013]. Cet effet analgésique a été optimisé pour une fréquence de 61,22 GHz pour une densité de puissance incidente comprise entre 10 et 15 mW/cm² [Radzievsky, 2008]. A ce niveau de puissance, un échauffement des tissus est induit, nécessaire pour permettre un effet analgésique [Radzievsky et al. 2001]. Cependant, le mécanisme ne semble pas être purement thermique puisque les effets analgésiques ne sont pas reproduits par un chauffage laser équivalent [Radzievsky, 2004]. L'effet des OMM n'est pas encore bien compris, mais une activation du système nerveux périphérique, puis du système nerveux central, est suspectée. Ainsi, la dénervation des zones exposées ainsi que l'utilisation d'antagonistes non sélectifs des récepteurs opioïdes ont significativement réduit cet effet analgésique [Radzievsky et al. 2001 et 2008]. L'étude de ces publications a inspiré la société REMEDEE Labs. En 2016, elle décide de remettre cette thérapie analgésique sur le devant de la scène. Leur but est de pouvoir proposer un traitement alternatif aux médicaments antalgiques « lourds » susceptibles

d'induire des effets secondaires ou des problèmes d'accoutumance. Ainsi, ils ont développé le stimulateur d'endorphine à ondes millimétriques à usage individuel appelé « Remedee One ». Sous la forme d'un bracelet, ce dispositif médical renferme un module permettant de générer des OMM aux alentours de 61 GHz pour une densité de puissance incidente de 12,8 mW/cm². REMEDEE labs a déjà lancé plusieurs essais cliniques en collaboration avec le CHU de Grenoble, portant sur le soulagement de migraines, de fibromyalgies ou encore sur la maladie de Parkinson.

Le présent travail est divisé en deux objectifs principaux. Le premier consiste à analyser l'innocuité de cette thérapie anti-douleur au niveau cellulaire. Les conditions expérimentales se sont basées sur le traitement préconisé par la société REMEDEE Labs, à savoir 1h par jour. Différents stress ont été analysés. Tout d'abord le stress thermique, via l'étude de protéines cyto-protectrices. En effet, la puissance utilisée par Remedee one entraîne une augmentation locale de la température. Par la suite, le potentiel oxydant des OMM, pouvant être responsable d'effets cancérogènes, a été examiné. La surproduction de ROS est ainsi suspectée, via des lésions des macromolécules telles que les protéines, les lipides et l'ADN, dans l'induction de maladies (cancers, diabète ou syndromes neurodégénératifs). L'accent a été mis sur l'impact des ROS sur l'ADN avec l'étude de l'activation des systèmes de réparation des acides nucléiques. Le deuxième objectif de thèse est de déterminer les mécanismes précis sous-jacents aux effets analgésiques. Comment la stimulation de certaines cellules de la peau peut-elle entraîner un soulagement de la douleur ? L'implication du système sérotoninergique et de la substance P a été investigué utilisant différentes approches biochimiques et métabolomiques. En conclusion, ce projet de thèse a permis de renforcer les connaissances sur l'impact des ondes millimétriques aux conditions utilisées par Remedee one sur les cellules de peaux humaines.

Abstract

Pain is the cause of nearly two-thirds of medical consultations [INSERM 2016]. Treatment of pain in adults is based mainly on so-called analgesic drugs such as paracetamol, opioid or morphine drugs. Effective against acute pain, these drugs have significant side effects if used for a prolonged period or even chronically. In order to increase the quality of pain management, various complementary non-pharmacological analgesic techniques are being researched, particularly in the field of electromagnetic fields. This includes the transcutaneous electrical nerve stimulation therapy (TENS, Vance et al. 2014), transcranial magnetic stimulation (TEMS-Vance et al. 2014, Wassermann and Epstein, 2008) or millimeter wave (mmW) exposure [Pakhomov 1998, Ziskin, 2013].

mmW are electromagnetic waves in the frequency range of 30 to 300 GHz, corresponding to the upper part of the microwave spectrum. Mainly used in Eastern Europe, countries of the former USSR, MMW therapy was a non-invasive technique used to treat many diseases such as cardiovascular, cancer, diabetes, and especially for the relief of pain [Rojavin and Ziskin, 1998; Ziskin, 2013]. This analgesic effect was optimized for a frequency of 61.22 GHz for an incident power density between 10 and 15 mW/cm² [Radzievsky, 2008]. At this power level, a heating of the tissues is induced, and Ziskin and collaborators have shown that to induce an analgesic effect, increase in temperature is necessary. However, the mechanism does not seem to be purely thermal since the analgesic effects are not reproduced by equivalent laser heating [Radzievsky, 2004]. Indeed, it is believed that MMW should allow thermal energy to be focused at a certain depth of the skin without bringing excess heat to the surface and therefore without harming the environment of the tissues [Alekseev et al., 2012]. The effect of mmW is not yet well understood, but an activation of the peripheral nervous system, then of the central nervous system, is suspected. Thus, denervation of exposed areas as well as the use of non-selective opioid receptor antagonists significantly reduced this analgesic effect [Radzievsky et al. 2001 and 2008].

The study of publications on the therapeutic and more precisely analgesic effects of mmW inspired the company REMEEDEE Labs. Their goal is to be able to offer an alternative treatment to "heavy" analgesic drugs that may induce side effects or addiction problems.

Thus, they developed the millimeter wave endorphin stimulator for individual use called "Remedee One". In the form of a bracelet, this medical device contains a module for generating mmW around 61 GHz for an incident power density of 12.8 mW / cm². REMEDEE labs has already launched several clinical trials in collaboration with the Grenoble's Hospital, focusing on the relief of migraines, fibromyalgia or even Parkinson's disease.

This work is divided into two main objectives. The first is to analyze the safety of this pain relief therapy at the cellular level. The experimental conditions were based on the treatment recommended by the company REMEDEE Labs, that is 1 hour per day. Different stresses were analyzed. First, heat stress, through the study of cyto-protective proteins. Indeed, the incident power density used by Remedee one causes a local increase in temperature. Subsequently, the oxidative potential of mmW, which may be responsible for carcinogenic effects, was examined. Overproduction of ROS is thus suspected, via lesions of macromolecules such as proteins, lipids and DNA, in the induction of diseases (cancer, diabetes or neurodegenerative syndromes). Emphasis was placed on the impact of ROS on DNA with the study of the activation of nucleic acid repair systems. The second objective of the thesis is to determine the precise mechanisms underlying the analgesic effects. How stimulation of certain skin cells lead to pain relief? The involvement of the serotonergic system and substance P has been investigated using different biochemical and metabolomic approaches. In conclusion, this thesis project has strengthened knowledge on the impact of millimeter waves under the conditions used by Remedee one on human skin cells.

Abréviations

α	Risque de première espèce
λ	Longueur d'onde
γ	Gamma
γH2AX	Phosphorylation de l'histone H2Ax
4-HNE	4-hydroxynonenal
8OH-dG	8-oxo-2'-désoxyguanosine
8oxoG	8-oxo-guanine

A

A	Ampère
ACP	Analyse en composante principale
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNmt	ADN mitochondrial
ADP	Adénosine DiPhosphate
AGTC	Adénine, guanine, thymine, cytosine
AP	Site abasique
APEX1	<i>Apurinic/Apyrimidinic Endodeoxyribonuclease 1</i>
ARN	Acide ribonucléique
ASIC	<i>Application Specific Integrated Circuit</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATM-p	ATM-p : ATM-phosphorylé
ATP/ADP	Adénosine triphosphate / Adénosine diphosphate
ATR	Ataxia Telangiectasia And Rad3-Related Protein
ATRIP	<i>ATR Interacting Protein</i>

B

B	Champ magnétique
BARD1	<i>BRCA1 Associated RING Domain 1</i>
BER	<i>Base excision repair</i> – voie de réparation par excision de base
BRCA1	<i>DNA Repair Associated</i>
BRIP1	<i>BRCA1 Interacting Helicase 1</i>

C

c	Célérité
Cat	Catalase
CHEK1	<i>Checkpoint kinase 1</i>
CHEK2	<i>Checkpoint kinase 2)</i>
CIRC	Centre international de recherche sur le cancer
CO₂	Dioxyde de carbone

D

DAS	Débit d'absorption spécifique
DB	Double brin
DNPH	Di-nitro-phényl hydrazine
DNP	Di-nitro-phényl hydrazone
DPI	Densité de Puissance Incidente

E

e-	Electrons
E	Champ électrique
EXPO	Cellules exposées aux OMM
ERRC1	<i>Excision Repair 2</i>
EXO1	<i>Exonuclease 1</i>

F

Fe^{2/3+}	Ions ferreux
FADH₂	<i>Flavine adénine dinucléotide</i>
FANCG	<i>Fanconi anemia complementation group</i>
FEN1	<i>Flap endonuclease 1</i>

G

GABA	Acide γ-aminobutyrique
GHz	Gigahertz
GO	Glucose oxydase
GPx	Glutathion peroxydase

H

H⁺	Proton
H2AX	Histone H2AX
H₂O	Molécule d'eau
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HaCaT	Lignée cellulaire de kératinocytes humains
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyethyl)-1- piperazine ethane sulfonique
HRP	Peroxydase de raifort
HRR	Recombinaison homologue
HSP27	<i>Heat Shock Protein 27</i>
HSP27-p	HSP27 phosphorylé
HSP70	Heat Shock Protein 70
HSP	Heat shock Protein
HUS1	Checkpoint Protein
Hz	Hertz

I

ICNR	Commission Internationale de Protection contre les Rayonnements Non Ionisants
IETR	Institut d'Electronique et des Technologies du numéRique
IF	Immunofluorescence
IPD	Incidence Power Density
IPD_{eq}	IPD absorbé par l'échantillon

K

k	Nombre de paramètres indépendants
K+	Potassium
KBRO₃	Bromate de potassium
Kg	Kilogramme

L

LIG3	Ligase 3
-------------	----------

M

m	Mètre
MBD4	<i>Methyl-CpG Binding Domain 4, DNA Glycosylase</i>
MDA	Malondialdéhyde
MDC1	<i>Mediator of DNA damage checkpoint protein 1</i>
MeOH	Méthanol
MLH1	MutL Homolog 1
MPG	N-Methylpurine DNA Glycosylase
MRE11	Homolog, Double Strand Break Repair Nuclease
MRN	Complexe MRE11-RAD50-NBS1
MRR	<i>Mismatch repair</i>
MS	Spectromètre de masse
MSH2	DNA mismatch repair protein

MTH1	<i>7,8-Dihydro-8-Oxoguanine Triphosphatase</i>
MutS	MutS Homolog 2
MUTYH	<i>mutY DNA glycosylase</i>

N

NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NBS1	Nibrin
NEIL1	<i>Nei Like DNA Glycosylase 1</i>
NER	Réparation par excision de nucléotides
NHEJ	Réparation par jonction d'extrémités non homologues
NS	Non significatif
NTHL1	<i>Nth Like DNA Glycosylase 1</i>

O

O₂	Oxygène
O₂^{°-}	Anion superoxyde
OGG1	<i>Oxoguanine DNA Glycosylase 1</i>
OH[°]	Radical hydroxyle
OMM	Ondes millimétriques

P

p-CPA	Para-chlorophénylalanine
P53	<i>Tumor Protein 53</i>
P53-p	P53 phosphorylé
PARP1	<i>poly(ADP-ribose) polymérase 1</i>
PBS	Tampon phosphate salin
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
Pi	Phosphate inorganique
PMS1	<i>Homolog 1, Mismatch Repair System Component</i>
PMS2	<i>Homolog 2, Mismatch Repair System Component</i>

polβ	ADN polymérase β
pPnn	Pyrimidine/purine nucléotide 5'-monophosphate nucléosidase

Q

qPCR	Réaction de polymérisation en chaine quantitative en temps réel
-------------	---

R

R	Acide gras
R°	Lipide radicalaire
RAD1	Checkpoint DNA Exonuclease
RAD17	Cell Cycle Checkpoint Protein
RAD18	E3 Ubiquitin Protein Ligase
RAD50	Double Strand Break Repair Protein
REV1	DNA Directed Polymerase
RF	Radiofréquences
ROO°	Radical peroxyde
ROOH	Hydroperoxyde
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> - Espèces réactives de l'oxygène
RPA	<i>Replication Protein A1</i>
RT	<i>Reverse transcriptase</i>

S

s	Seconde
SAR	<i>Specific Absorption Rate</i>
SB	Simple brin
SH	Groupement thiols
SHAM	Exposition factice

SIRT1	Sirtuin 1
SNP	Système nerveux périphérique
SNC	Système nerveux central
SOD	Superoxydes dismutases
SVF	Serum de veau fœtal

T

T	Période
TBA	Acide thiobarbiturique
TC	Contrôle thermique
TEMS	Stimulation magnétique transcrânienne
TENS	Stimulation nerveuse électrique transcutanée
TOBP1	<i>DNA topoisomerase 2-binding protein 1</i>

U

UNG	<i>Uracil DNA Glycosylase</i>
UPLC- HRMS	Chromatographie en phase liquide à ultra-haute pression couplée à un spectromètre de masse à haute résolution - <i>Ultrahigh Pressure Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry</i>

W

W	watt
WPAN	<i>Wireless Personal Area Network</i>
WLAN	<i>Wireless Local Area Network</i>

X

XPA	DNA Damage Recognition And Repair Factor
XRCC1	<i>X-ray repair cross complementing 1</i>
XRCC1-p	XRCC1 phosphorylé
XRCC2	<i>X-Ray Repair Cross Complementing 2</i>
XRCC3	<i>X-Ray Repair Cross Complementing 3</i>
XRCC6	<i>X-Ray Repair Cross Complementing 6 (ku70)</i>

Sommaires

Chapitre 1 Introduction générale

I-	Ondes électromagnétiques	9
1.	Rappels physiques	9
2.	Dosimétrie	11
3.	Spectre électromagnétique.....	12
II-	Ondes Millimétriques.....	13
1.	Ondes millimétriques et peau	14
2.	Ondes millimétriques et réglementation.....	15
3.	Ondes millimétriques et applications	16
3.1.	Réseaux de transmission / détection sans fil	16
3.2.	Sécurité.....	17
3.3.	Domaine médical.....	17
III-	REMEEDEE Labs	18
IV-	Contexte de l'étude	19
1.	Vue d'ensemble de la littérature sur les OMM.....	19
2.	Stratégie et Objectif	21
V-	Références	22

Chapitre 2 Matériels et méthodes

I-	Culture cellulaire et réactifs	29
1.	Choix des cellules	29
2.	Condition de culture.....	31
3.	Réactifs récurrents	32
II-	Imagerie.....	32
1.	Immunofluorescence	32
2.	ImPACcell-Cellomics.....	34

3.	Détection des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS)	36
III-	Analyses transcriptomiques	37
1.	Extraction ARN et qPCR.....	37
2.	RT ² Profiler PCR array.....	38
IV-	Analyses biochimiques.....	40
1.	Détection du peroxyde d'hydrogène H ₂ O ₂	40
2.	Protéines carbonylées	41
3.	Lipides oxydés intracellulaires et extracellulaires.....	43
4.	Elisa sérotonine	44
V-	Analyses métabolomiques	45
1.	Exposition des cellules HaCaT	46
2.	Purification des milieux de culture.....	47
3.	Flux métabolomique par UPLC-HRMS.....	47
VI-	Analyses statistiques.....	48
1.	Immunomarquage (IF, ROS).....	48
2.	Expression génique (RT-qPCR, RT ²).....	49
3.	Dosage des molécules oxydées.....	49
VII-	Références	49

Chapitre 3 Mise au point des systèmes d'expositions *in vitro*

I-	Système « Remedee ».....	53
II-	Système « IETR ».....	55
III-	Effet thermique dû à l'exposition.....	56
IV-	Analyse des conditions d'exposition	59
1.	Stress thermique	59
2.	Intégrité cellulaire	64
V-	Conclusion	69
VI-	Références	70

Chapitre 4 Impact des OMM sur le stress oxydant dans les cellules HaCaT

I-	Le Stress oxydant	75
1.	Source intracellulaire	76
2.	Défenses cellulaires.....	78
3.	Cibles biologiques.....	80
3.1.	Lipopéroxydation.....	80
3.2.	Peroxydation protéique.....	83
3.3.	Domage à l'ADN	83
4.	OMM et stress oxydant.....	84
II-	Résultats	88
1.	OMM et production de ROS.....	89
1.1.	Analyse des ROS intracellulaires	89
1.2.	H ₂ O ₂ intracellulaire et extracellulaire.....	91
2.	OMM et Impact des ROS	94
2.1.	Oxydation des protéines intracellulaires sous OMM	94
2.2.	Oxydation des lipides intracellulaires et extracellulaires sous OMM.....	96
III-	Discussion et conclusion	102
IV-	Références	108

Chapitre 5 Impact des OMM sur le stress génotoxique dans les cellules HaCaT

I-	Stress génotoxique : contexte bibliographique	119
1.	Lésions oxydatives de l'ADN.....	119
1.1.	Bases oxydées.....	120
1.2.	Sites abasiques (AP).....	121
1.3.	Cassure simple brin (SB)	122
1.4.	Cassure double brin (DB).....	123
1.5.	Stress répliatif	123
2.	Conséquences des dommages à l'ADN	124

3.	Détection des principales lésions de l'ADN.....	125
3.1.	Base excision repair (BER)	126
3.2.	Détection cassure double brin : voie ATM	131
3.3.	Stress répliatif : voie ATR	134
3.4.	Résilience des voies de réparation de l'ADN.....	135
4.	OMM et stress génotoxique.....	136
4.1.	Littérature.....	136
4.2.	Techniques utilisées	142
II-	Résultats	144
1.	Impact des ROS sur l'oxydation de l'ADN	145
2.	Voie de réparation BER	147
2.1.	BER -expression génétique :.....	147
2.2.	BER- Activation phosphorylation.....	151
3.	Cassure double brin – voie ATM	152
3.1.	Analyse voie expression génétique	153
4.	Stress répliatif – voie ATR.....	157
4.1.	ATR -expression génétique :.....	157
III-	Conclusion stress génotoxique.....	160
VI-	Références	164

Chapitre 6 Impact des OMM sur le métabolisme de la sérotonine *in vitro*

I-	Introduction	177
1.	La douleur, expérience multi-composante	177
2.	Intégration nociceptive – voies afférentes	179
2.1.	Transduction du signal douloureux.....	180
2.2.	Propagation du signal douloureux	183
3.	Modulation de la douleur - voies efférentes	185
4.	Thérapie OMM	187
5.	Etude du mécanisme des OMM sur la douleur.....	189
6.	Hypothèses de travail.....	193
6.1.	La présente étude.....	195

II-	Résultats	196
1.	Impact des OMM sur le métabolisme sérotoninergique et sur la substance P.....	196
1.1.	Mise au point des expériences.....	196
1.2.	Sérotonine intracellulaire.....	199
1.3.	Substance P intracellulaire	200
2.	OMM et sérotonine extracellulaire.....	202
2.1.	Dosage chimique ELISA.....	202
2.2.	Approches métabolomiques	203
III-	Discussion	208
IV-	Références	210

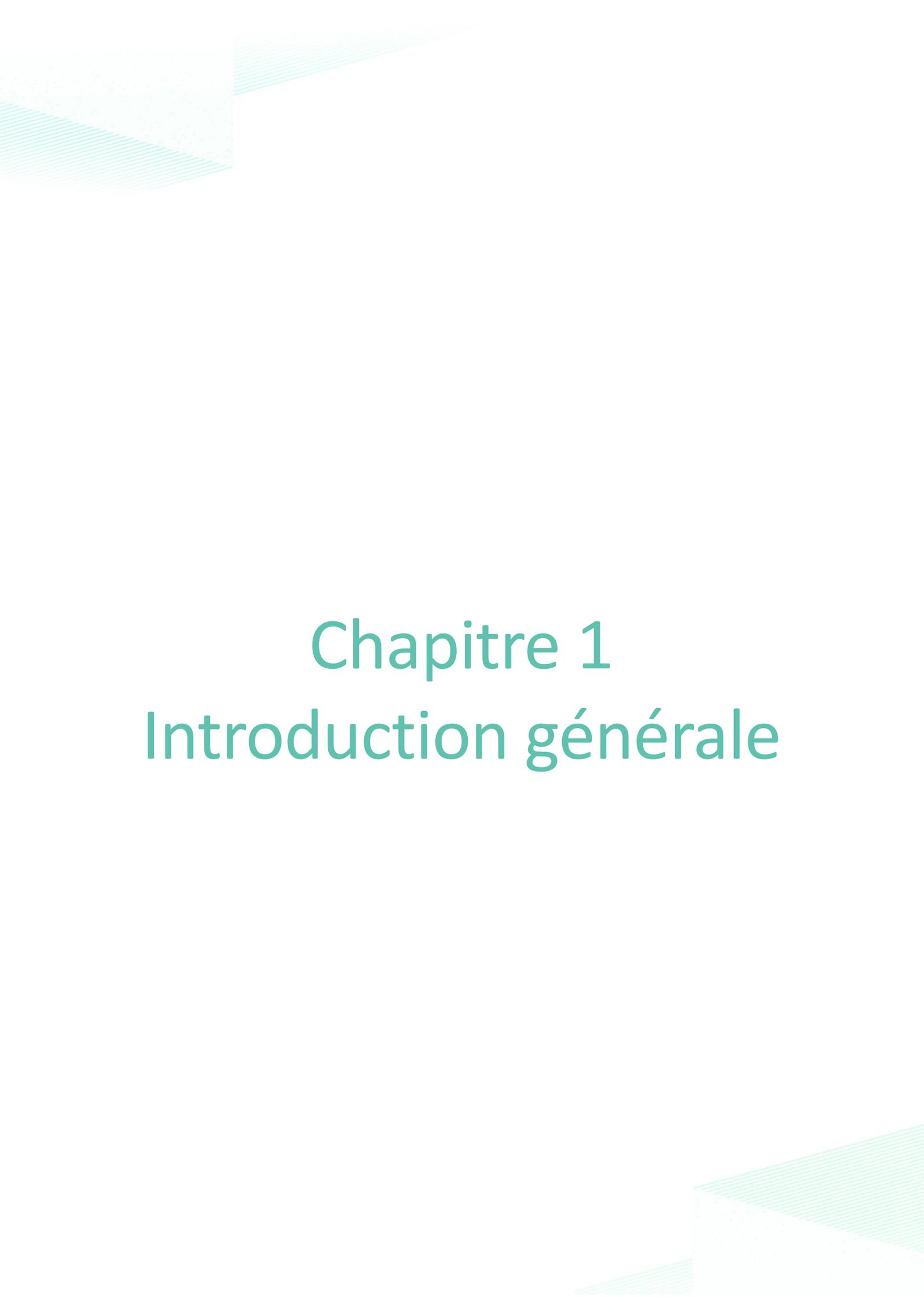
Chapitre 7 Conclusion et discussion

I-	Innocuité du dispositif REMEDEE	222
1.	Stress thermique	222
2.	Intégrité cellulaire	223
3.	Stress oxydant	224
4.	Stress génotoxique	228
II-	Mécanismes.....	230
III-	Conclusion générale.....	232
VI-	Références	234

Articles Scientifiques

I-	Les ondes électromagnétiques en médecine : cas des ondes millimétriques.....	239
II-	Assessment of oxidative stress in keratynocytes cells under exposure to millimeter waves.....	246

A propos de l'auteur



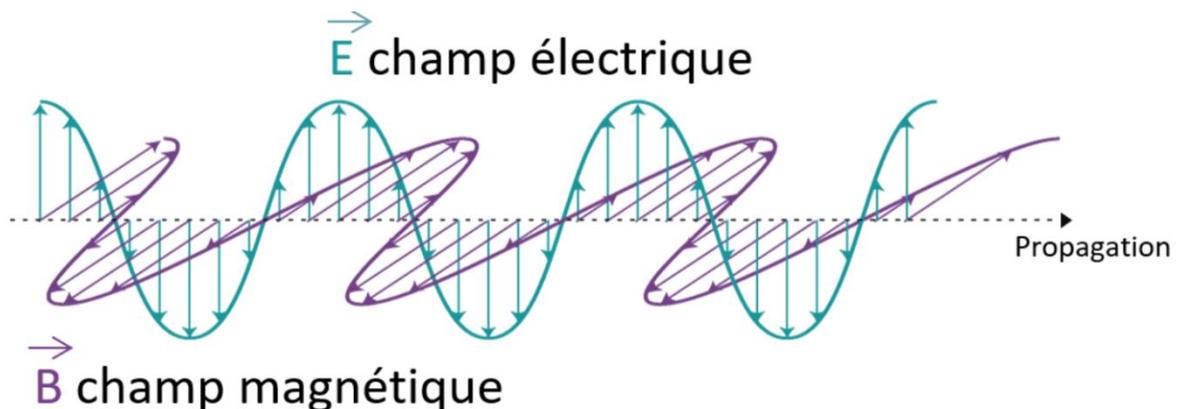
Chapitre 1

Introduction générale

I- Ondes électromagnétiques

1. Rappels physiques

5 Le travail présenté ici porte sur l'utilisation des ondes millimétriques à des fins thérapeutiques. Dans un souci de clarté, la place des ondes millimétriques sera précisée, notamment dans le spectre électromagnétique global. Cette présentation a volontairement été limitée aux éléments indispensables à la compréhension, sans procéder à une analyse physique détaillée. Les ondes électromagnétiques correspondent à un transport d'énergie sans support de
10 matériel, pouvant se déplacer dans un milieu de propagation comme le vide ou l'air. Elles résultent de deux phénomènes indissociables : le champ électrique (E) et le champ magnétique (B), qui sont perpendiculaires entre eux et perpendiculaires à la direction de propagation (Figure CH1-1).



15 **Figure CH1-1 : Onde électromagnétique décomposée en champ électrique (E) et champ magnétique (B)** (adapté de Les collections NUMERIQUES : Science Physique et chimiques en Laboratoire)

Les principales caractéristiques d'une onde électromagnétique sont (Figure CH1-2) :

- **La fréquence f**, exprimée en Hertz (Hz ou s^{-1}) traduit par son nombre d'oscillations par seconde
20
- **La période** où $T = \frac{1}{f}$ exprimée en seconde (s). Elle correspond à la durée séparant deux oscillations qui se reproduisent au cours du temps.
- **La vitesse ou Célérité**. Les ondes électromagnétiques se propagent dans le vide à la vitesse : $c = 3 \cdot 10^8 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ (vitesse de la lumière dans le vide).

- 25 - **La longueur d'onde dans le vide** $\lambda = cT = \frac{c}{f}$. La longueur d'onde correspond à la distance de propagation durant une période T , c'est-à-dire entre deux oscillations, exprimée en mètre (m).
- **Intensité des champs** : exprimé en Volt par mètre (V/m) dans le cas du champ électrique et en Ampère par mètre (A/m) pour le champ magnétique. A partir de ces composantes,
- 30 la puissance P de l'onde exprimée en watts (W) sera calculée.

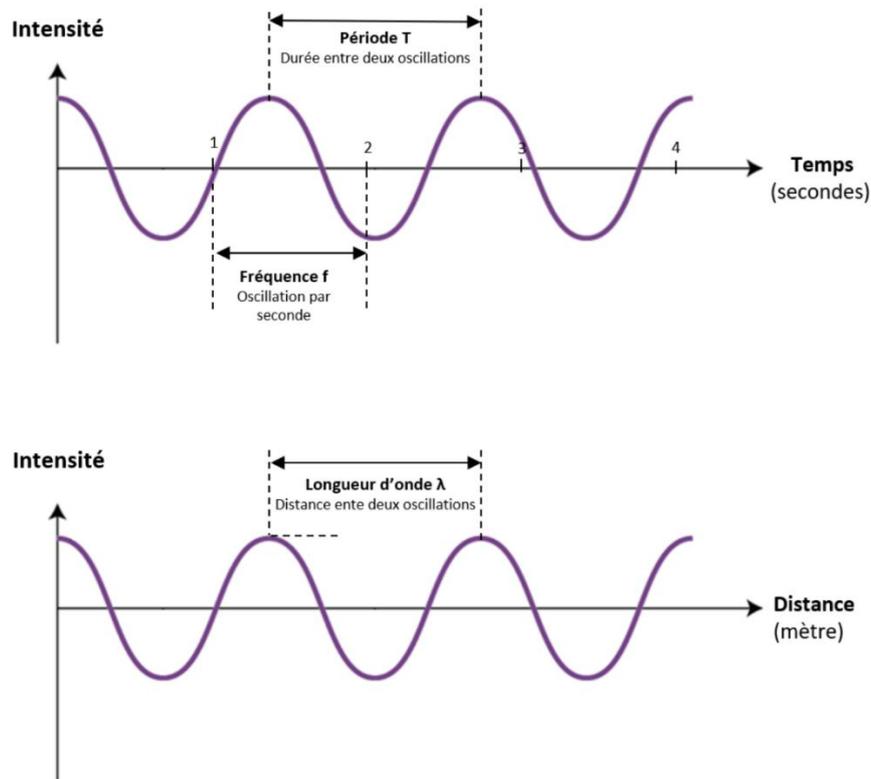


Figure CH1-2 : Caractéristiques principales d'une onde électromagnétique en fonction du temps ou de la distance, fréquence (f), période (T), longueur d'onde (λ) (Illustration personnelle)

- 35 L'interaction d'une onde incidente avec un milieu ne se limite pas à une simple absorption. En effet, à l'interface entre deux milieux, comme par exemple entre l'air et un tissu biologique, une partie de l'onde incidente est réfléchiée et une partie sera absorbée (Figure CH1-3). Cela dépendra alors de deux paramètres :
- La fréquence de l'onde électromagnétique qui jouera sur son pouvoir pénétrant.
- 40 - Les propriétés de la matière et plus particulièrement de sa permittivité c'est-à-dire, la capacité du tissu à absorber ou réfléchir le rayonnement électromagnétique

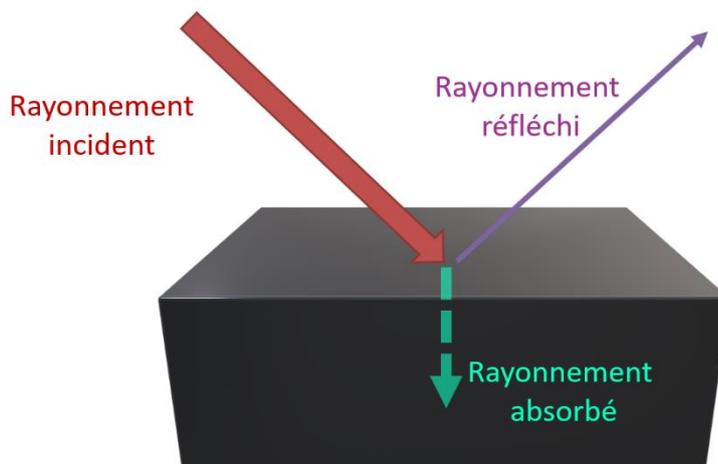


Figure CH1-3 : Décomposition d'un rayonnement incident en rayonnement réfléchi et rayonnement absorbé (Illustration personnelle)

45

2. Dosimétrie

Pour réaliser des études précises et reproductibles, il est important d'évaluer les doses de rayonnement absorbées par un tissu vivant. C'est ce qu'on appelle la dosimétrie. En fonction des bandes de fréquences étudiées, deux systèmes de quantification ont été adoptés :

- Le **DAS** (débit d'absorption spécifique) encore appelé **SAR en anglais** (*Specific Absorption Rate*) représente la puissance incidente absorbée par unité de

$$DAS = \frac{P}{m}$$

masse de tissu biologique, exprimée en Watt par kilogramme [W/kg]. Avec P la puissance du rayonnement incident [W] et m est la masse du tissu [kg]

- Le **DPI** (Densité de Puissance Incidente) ou **IPD en anglais** (*incidence Power Density*) est la puissance délivrée par unité de surface en un lieu donné par rapport à l'émetteur. Elle s'exprime en Watts par mètre carré [W/m², ou plus commodément mW/cm²].

60

Avec P la puissance incidente exprimée en Watt [W], S est l'aire de la surface exposée [m²].

$$DPI = \frac{P}{S}$$

Cette grandeur, mesurable et contrôlable, est généralement plus utilisée que le DAS pour des ondes électromagnétiques supérieures à 6 Gigahertz (GHz). En effet, à partir de ces fréquences, l'onde ne pénètre que très peu dans l'organisme. Il est alors plus pertinent de parler de surface (m²).

70

3. Spectre électromagnétique

Les ondes électromagnétiques sont souvent représentées sous la forme d'un spectre de fréquences (Figure CH1-4). Ce spectre est divisé en plusieurs grandes classes, allant des très basses fréquences (quelques Hertz) aux très hautes fréquences telles que les rayons gamma (γ , > 3.10²⁰ Hertz).

75

D'un point de vue sanitaire, on distingue les rayonnements ionisants des rayonnements non-ionisants en fonction de l'énergie des photons (exprimée en électronvolt, eV) qu'ils véhiculent : plus la fréquence de l'onde est élevée, plus l'énergie véhiculée est forte.

80

- Les rayonnements ionisants tels que les rayons X ou rayons γ transportent suffisamment d'énergie pour pouvoir ioniser les atomes. Ainsi, ils peuvent ajouter ou supprimer une(des) charge(s) électrique(s) à des atomes ou des molécules, les transformant en ions. Leur utilisation au quotidien est limitée aux domaines médical-diagnostic ou thérapeutique (radiographies à rayons X pour l'analyse osseuse par exemple) et industriel (Energie, traçages sidérurgiques, etc)

85

- Les rayonnements non-ionisants englobent les fréquences extrêmement basses aux ultra-violets proches en passant par les radiofréquences et le visible. Leurs photons, par définition, n'ont pas assez d'énergie pour arracher des électrons. Actuellement dans notre société les radiofréquences sont très utilisées car considérées comme non dangereuses. Elles sont utilisées dans de nombreuses applications de la vie courante : smartphone, télévision, radio, etc. Elles couvrent les gammes qui s'étendent de 3 kHz à 300 GHz (ITU 2012), dans le domaine des rayonnements non-ionisants. Selon leur longueur d'onde λ , ces bandes sont, elles-mêmes subdivisées en plusieurs bandes

90

95 allant des ondes « basses fréquences » aussi nommées ondes kilométriques, intermédiaires, hautes, très hautes, « super hautes » et ondes « extrêmement hautes fréquences » ou ondes millimétriques (OMM).

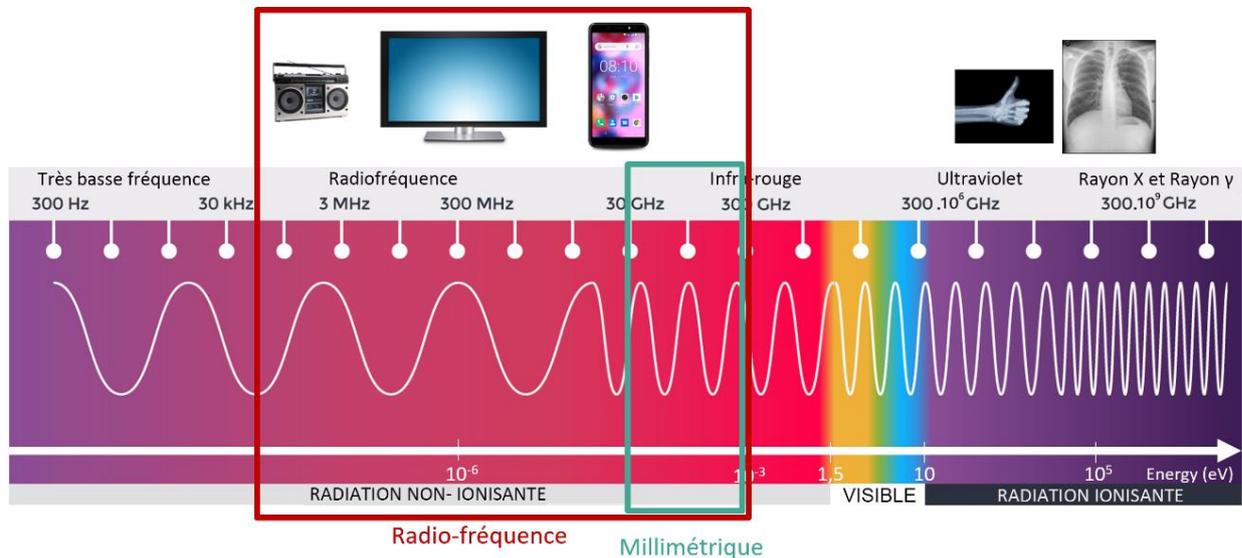


Figure CH1-4 : le spectre électromagnétique (adapté de Life Maxx, 2018)
Les ondes millimétriques de 30 à 300 GHz sont indiquées par le cadre bleu.

100

II-Ondes Millimétriques

Les ondes millimétriques s'étendent de 30 GHz à 300 GHz [Wiltse, 1984]. Elles doivent leur nom à leur longueur d'onde (λ) qui se situe entre 1 mm et 10 mm. Elles sont classées dans les rayonnements non-ionisants et sont très faiblement représentées dans le spectre électromagnétique naturel terrestre puisqu'elles sont fortement absorbées par l'oxygène et l'eau. C'est pourquoi, les ondes millimétriques ne pénètrent que très peu dans les tissus biologiques telle que la peau qui est composée à 65,3% d'eau [Duck, 2012]. En effet, il a été montré que les OMM pénètrent de 0,5 à 1,5 mm selon la fréquence utilisée dans la peau [Zhadobov et al. 2016]. Le dépôt d'énergie se faisant à un niveau correspondant à l'épaisseur de la peau, celle-ci constitue (avec les yeux) la cible principale des ondes millimétriques. Il est alors indispensable de comprendre ses propriétés et sa structure.

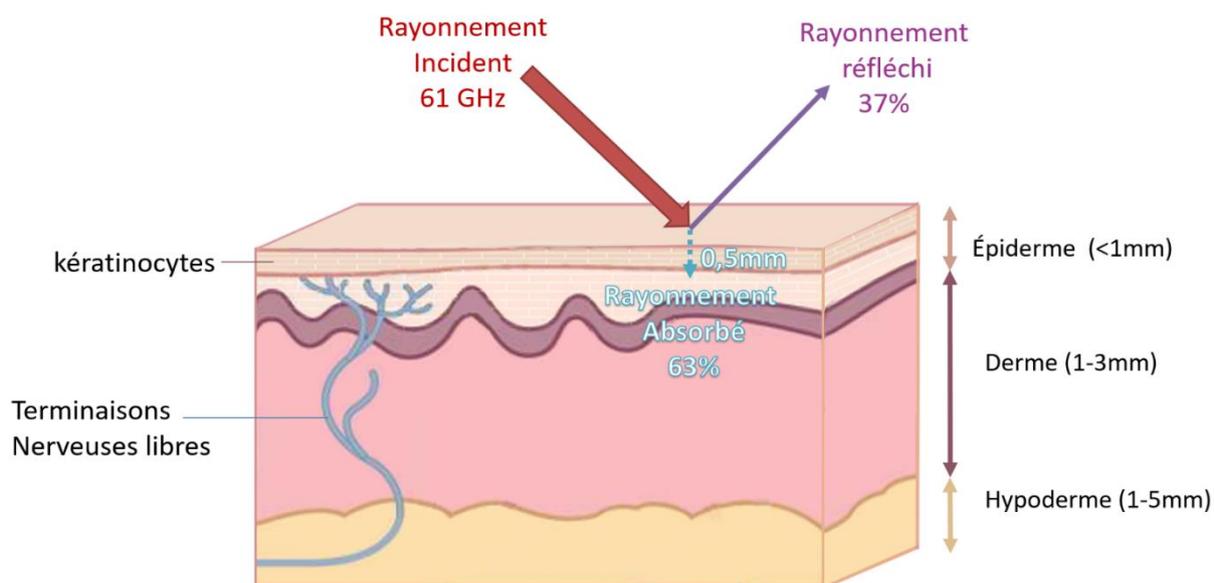
110

1. Ondes millimétriques et peau

115

Chez l'homme, la peau est l'organe le plus étendu et le plus en surface [Moore et al, 2001], étant ainsi l'organe le plus exposé aux OMM. Elle couvre une surface totale d'environ 1,7 m² et représente ~ 15% du poids corporel total [Zohra et al, 2010]. Elle est composée de trois couches de tissus (Figure CH1-5) :

- 120
- L'épiderme qui est la couche superficielle ayant une épaisseur moyenne de moins d'un millimètre,
 - Le derme, la couche intermédiaire allant de 1 à 3 mm,
 - L'hypoderme, aussi appelé couche grasseuse sous-cutanée, correspondant à la couche la plus profonde dont l'épaisseur varie de 1 à 5 mm.



125

Figure CH1-5 : Structure simplifiée de la peau avec l'épiderme constitué majoritairement de kératinocytes et où se termine les terminaisons nerveuses libres, le derme et l'hypoderme. A 61 GHz, le rayonnement incident est absorbé à 63% mais cette absorption reste en surface au niveau de l'épiderme principalement (0,5 mm) (Illustration personnelle)

130

Chaque couche est composée de différents types de cellules. Dans l'épiderme, les cellules kératinocytes prédominent, accompagnées de cellules immunitaires telles que les macrophages ou les cellules de Langerhans. Le derme protège le réseau vasculaire et les fibres nerveuses. Il est composé majoritairement de fibroblastes qui synthétisent le collagène, de

135 terminaisons nerveuses libres (organes sensoriels de la douleur et de la chaleur) qui remontent jusque dans l'épiderme et d'autres cellules immunitaires telles que les histiocytes et les mastocytes. Enfin l'hypoderme est un tissu adipeux traversé par les vaisseaux sanguins et les nerfs arrivant dans le derme. Il est à noter que l'épaisseur des différentes couches diffère en fonction de la localisation sur le corps. En effet, le derme et l'épiderme varient de
140 0,4 à 3,2 mm chez un même individu en fonction de la zone analysée [Lee and Hwang, 2002] et tend à s'affiner avec l'âge [Waller and Maibach, 2005].

Lorsqu'un rayonnement millimétrique frappe la peau, une partie du rayonnement va être réfléchi tandis que l'autre sera absorbée. La puissance du rayonnement absorbée diminue
145 exponentiellement dans la peau en fonction de la profondeur [Alekseev et al. 2008]. Durant cette étude, nous avons sélectionné des fréquences de 60,4 à 61 GHz, avec une densité de puissance absorbée maximal de 15 mW/cm². A ces paramètres, 63% de la puissance électromagnétique transmise au corps est absorbée dans les 0,5 premiers millimètres de la peau (Figure CH1-5, Zhadobov et al. 2016). Il est donc probable que le rayonnement
150 électromagnétique atteigne uniquement l'épiderme et la partie supérieure du derme. Ces informations ont permis de déterminer les modèles *in vitro* présentés dans le **Chapitre 2 - matériels et méthodes**. Les OMM vont induire des phénomènes de rotation et de frottement des molécules d'eau du tissu qui seront traduits sous forme de chaleur. Ces effets thermiques sont bien connus et ils sont à la base de la réglementation actuelle.

155

2. Ondes millimétriques et réglementation

Afin de prévenir les risques de surexposition aux OMM, des valeurs seuils ont été définies. L'ICNIRP (Commission Internationale de Protection contre les Rayonnements Non Ionisants)
160 en 1998, se basant sur les connaissances scientifiques et les expérimentations animales, a établi des restrictions de base (qui sont des niveaux à ne pas atteindre), et des niveaux de références (en général des conditions d'exposition pratiques mesurables permettant de satisfaire les restrictions de base). L'effet thermique étant pour le moment le seul effet avéré à ces fréquences, les seuils ont été fixés de façon à ne pas entraîner une élévation de
165 température tissulaire supérieure à 1°C. La limite d'exposition fixée pour le grand public est

de 1 mW/cm², celle des travailleurs est de 5 mW/cm² (Tableau CH1-1). Ces normes sont largement reconnues, notamment au niveau européen. En 2013, la Commission Européenne a délivré une directive qui s'applique à l'ensemble de ses membres, et en droit français s'impose au droit du travail. Elles ne sont cependant pas universelles : par exemple les USA reconnaissent des normes différents. Depuis 2020, l'ICNIRP a modifié ses normes qui sont actuellement en discussion au niveau Européen. Si elles sont acceptées, elles seront intégrées au droit français dans plusieurs années.

Tableau CH1-1 : Seuil d'exposition aux ondes millimétriques d'après ICNIRP (1998)

IPD	
Grand public	1 mW/cm ²
Travailleurs	5 mW/cm ²

3. Ondes millimétriques et applications

La plage des OMM est riche en applications scientifiques et technologiques. Grâce à leur fort potentiel de transmission de l'information (en termes de quantité et de rapidité de transfert d'informations), les OMM sont très intéressantes dans le domaine de la communication et seront prochainement installées sur le sol français. On les retrouve aussi dans d'autres domaines comme le domaine médical, notamment à des fins d'explorations diagnostiques superficielles.

3.1. Réseaux de transmission / détection sans fil

Les OMM seront grandement utilisées dans le domaine de la communication [Nagatsuma et al. 2019, Koenig et al. 2014]. Les fréquences hautes permettent des débits élevés ce qui a pour conséquences un transfert d'informations plus important par unité de temps. De ce fait, elles seront énormément déployées dans les réseaux mobiles futurs tels que la 5G+ ou 6G en fonction des pays. D'autre part, dans les bandes 57-64 GHz, on les retrouvera dans le système

WPAN (*Wireless Personal Area Network*) pour les particuliers, et WLAN (*Wireless Local Area Network*) pour les entreprises qui permettent la communication d'objets connectés sans câblage [Park et al. 2007]. Elles seront aussi utilisées dans des capteurs corporels (*Body Area Network*) surveillant les paramètres physiologiques des patients et permettant une prise en charge hospitalière par exemple [Pellegrini et al. 2013].

3.2. Sécurité

La gamme des OMM est utilisée dans les radars dits « *radio detection and ranging* ». Ces radars émettent des micro-ondes pour déterminer la distance et la position d'objets tels que des avions, bateaux, nuages [Menhaj et al. 1999]. On les retrouve aussi dans les radars automobiles à courte portée [77-81 GHz, Hasch et al. 2012], dans les scanners corporels de sécurité dans les aéroports [70-80 GHz, Blazeck et al. 2020] ou encore dans un système d'arme non létale appelé « *Active denial system* » permettant de disperser les foules [Zohuri, 2019].

3.3. Domaine médical

Enfin, on retrouve les OMM dans plusieurs champs du domaine médical. On peut citer les applications de détections de cancers tels que le cancer de la peau [40 GHz, Mansutti et al. 2020] ou le cancer du sein [20-40 GHz, Iliopoulos et al. 2021] actuellement en cours de développement. Ces techniques de détection de cancers sont basées sur le changement diélectrique principalement lié au contenu en eau entre des cellules saines et des cellules cancéreuses. Utilisant les effets thermiques délivrés, les OMM pourront être utilisées en chirurgie pour l'ablation de tumeurs de la peau. Le principe est simple : de façon non-invasive, l'énergie délivrée par les ondes va chauffer les tumeurs sans pour autant détruire les tissus sains environnants. Actuellement, la technique est toujours majoritairement du domaine de la recherche mais a été validée par l'expérimentation [42,25 GHz, 1,8 W/cm², Szabo et al. 2004, 58,4 GHz, Orlacchio et al. 2019]. Cette alternative à l'ablation par ondes radiofréquences permettra une meilleure prise en charge des mélanomes. En effet, les mélanomes sont très sensibles à la chaleur [Mameghan et Knittel, 1988] et la pénétration peu profonde des OMM entraîne un dépôt de chaleur superficiel dans la peau.

Enfin, on retrouve aussi les OMM en tant que traitement analgésique. Cette thérapie était beaucoup utilisée dans les années 1970-1990 en ex-URSS. Elle consistait en une exposition locale de la peau pendant 15-30 minutes, utilisant 3 fréquences empiriques autour de 42,2 GHz ; 53,6 GHz et 61,2 GHz [Betskii et al. 2000, Pakhomov et Murthy, 2000]. Les puissances utilisées étaient assez faibles aux alentours de 10 mW/cm². L'effet anti-douleur, observé sur des modèles animaux [Rojavin et al. 2000, Radvieski et al. 2001] et chez l'humain [Usichenko et al. 2003], est utilisé dans de nombreuses pathologies telles que les céphalées, certaines maladies de peau, les douleurs articulaires ou encore certains cancers [Rojavin et al. 1998]. Cependant, les mécanismes expliquant cet effet anti-douleur demeurent inconnu. Les hypothèses de ces mécanismes seront plus amplement discutées lors du « **Chapitre 5 Impact des OMM sur le métabolisme de la sérotonine *in vitro*** ». Il est cependant à noter que les puissances utilisées dans cette thérapie sont supérieures d'un facteur 100 à 1000 à celles utilisées en télécommunication.

III- REMEEDDEE Labs

L'étude des publications sur les effets thérapeutiques et plus précisément analgésiques des OMM a inspiré la société REMEEDDEE Labs. En 2016, elle décide de remettre cette thérapie analgésique sur le devant de la scène. Leur but est de pouvoir proposer un traitement alternatif aux médicaments analgésiques « lourds » susceptibles d'induire des effets secondaires ou des problèmes d'accoutumance. Ainsi, ils ont développé le stimulateur d'endorphine à ondes millimétriques à usage individuel appelé « Remedee One » (Figure CH1-6). Contrairement aux systèmes développés en ex-URSS, leur dispositif est beaucoup plus petit et tient dans la main. L'ingéniosité réside dans la miniaturisation du générateur d'ondes millimétriques. Sous la forme d'un bracelet, ce dispositif médical renferme un module permettant de générer des OMM aux alentours de 61 GHz grâce à 4 patchs ASIC (*Application Specific Integrated Circuit*), soudés sur une antenne planaire. Chaque réseau de patchs couvre 0,67 cm², ce qui permet au module de couvrir une surface totale de 2,5 cm². Le traitement consiste à installer le dispositif autour du poignet du patient, les antennes côté palmaire (proche du nerf médian), zone connue pour être très innervée et à l'épaisseur cutanée très

faible. Une première pression sur le bouton met sous tension le dispositif d'émission, et une
260 deuxième pression déclenche une séance d'émission de 30 minutes d'OMM. Deux séances
par jour, soit 1h d'exposition, sont recommandées en tant que traitement. Le IPD absorbée
par la peau est de 12,8 mW/cm², au-dessus de la norme fixée pour le grand public (1 mW/cm²).
Cependant, en tant que dispositif médical, une étude de bénéfices/risques est nécessaire et
elle est actuellement en cours. REMEDEE labs a déjà lancé plusieurs essais cliniques en
265 collaboration avec le CHU de Grenoble, portant sur le soulagement de migraines, de
fibromyalgies ou encore sur la maladie de Parkinson. Ainsi les OMM générées par le bracelet
permettront de concentrer l'énergie thermique à une profondeur spécifique de la peau sans
apporter d'excès de chaleur à la surface et de ce fait sans douleur



Figure CH1-6 : Présentation du dispositif « Remedee one »

280

IV- Contexte de l'étude

1. Vue d'ensemble de la littérature sur les OMM

Pour répondre à la question de la recherche d'effets biologiques ou sanitaires associés aux
OMM, la littérature a été centrée sur l'utilisation des fréquences proches de celles utilisées
285 par le dispositif REMEDEE labs c'est-à-dire entre 10 et 110 GHz, et réalisée sur des modèles
mammaliens. Du fait de nos critères d'inclusions, il n'existe que 293 études (*in vitro* et *in vivo*
confondues) de 1974 à 2021 dont certaines sont rédigées en Russe. En effet, en Occident, la
recherche sur les OMM est relativement récente. De plus, certaines études manquent

sérieusement de rigueur. 5 critères de qualités sont habituellement recherchés pour intégrer
290 les résultats d'une étude : la présence d'un contrôle de référence (appelé SHAM pour
exposition factice), la dosimétrie, les contrôles positifs, le contrôle de la température et le fait
que l'étude ait été faite en aveugle quand nécessaire (notamment pour les techniques
d'analyse d'images où l'interprétation humaine pourrait orienter les résultats). Ses 5 critères
sont rarement retrouvés dans les études sur les OMM [Karapiris et al. 2021]. Comme il n'existe
295 pas d'études épidémiologiques sur les OMM, l'essentiel des résultats repose sur des études
utilisant des modèles cellulaires ou animaux et d'études cliniques. *In vivo*, il est rarement
possible de modifier la température des modèles animaux et la thermorégulation
physiologique compense ou gomme les variations thermiques induites par les OMM. A
l'inverse, *in vitro*, l'exposition et la température sont contrôlables et modifiables et il est
300 possible de s'affranchir d'effets thermiques. Au sein de cet exposé, en cas de lacunes dans la
recherche de potentiels effets biologiques à ces fréquences, nous étendrons nos paramètres
à des fréquences proches pour avoir des références plausibles dans les différents domaines
étudiés.

De plus, la diversité des modèles d'étude et des paramètres utilisés rendent difficile toute
305 comparaison et ne permettent pas de tirer des conclusions convaincantes sur des effets
biologiques ou les mécanismes sous-jacents aux effets analgésiques. Néanmoins, l'implication
cutanée est partout admise et est placée au premier plan. L'effet analgésique retenu *a priori*
repose sur une élévation thermique liée à l'absorption d'énergie, par l'intermédiaire
d'agitation thermique de l'eau tissulaire (effet thermique, Zhadobov et al. 2008]. Les effets
310 thermiques pour les OMM apparaissent pour des IPD supérieur à 10 mW/cm². En dessous de
10 mW/cm², ils sont considérés comme négligeables au niveau de l'organisme, la thermolyse
(thermorégulation physiologique) permettant de gérer la légère augmentation de
température. De fait, l'existence d'effets biologiques indépendants de l'élévation de la
température, pouvant être défini comme des effets électromagnétiques purs, est toujours
315 controversée et les résultats obtenus jusqu'à récemment ne permettent pas de conclure.
Cependant, quelques effets biologiques indépendants de la température semblent se dégager
et seront discutés dans les chapitres suivants.

2. Stratégie et Objectif

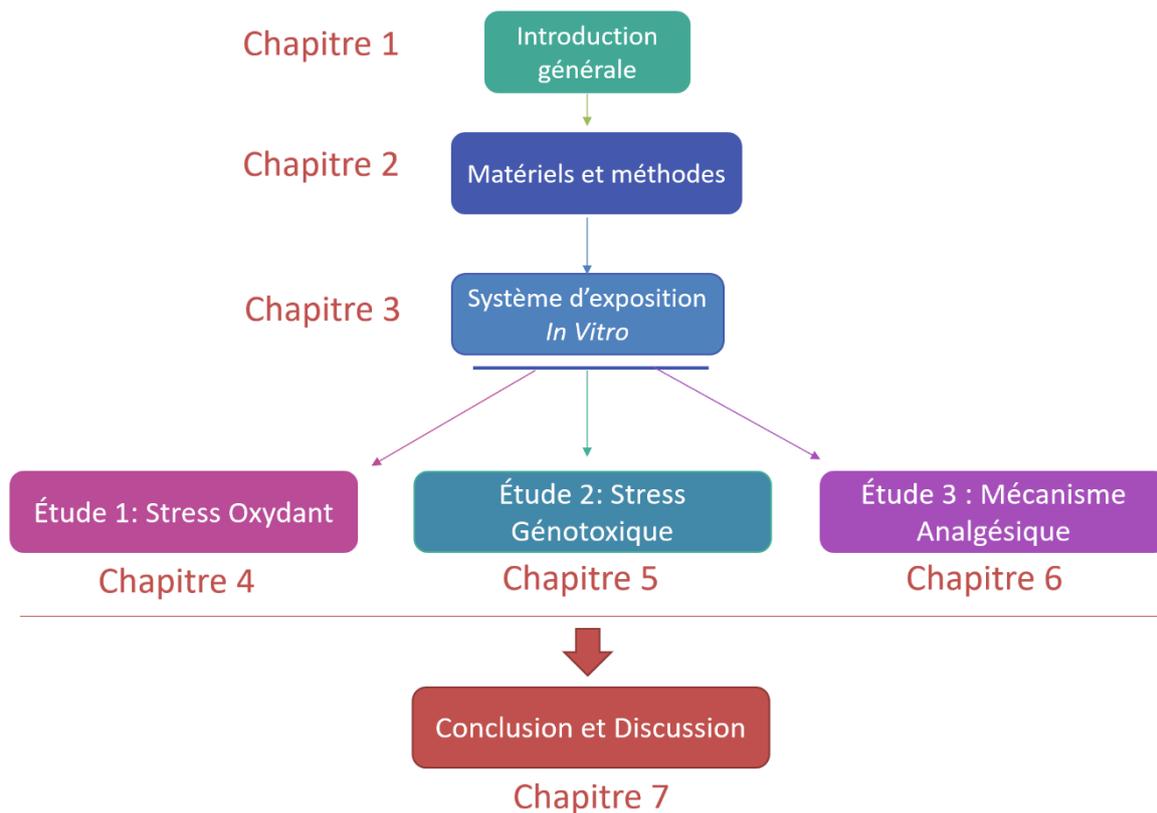
320 Le présent travail consiste à analyser l'innocuité de cette thérapie antidouleur et à déterminer les mécanismes sous-jacents aux effets analgésiques. Un système d'exposition adapté à la culture cellulaire a été envoyé par REMEDEE Labs. Il génère la même puissance et la même IPD que le bracelet et sera présenté en détail dans le [chapitre 3](#). Les conditions expérimentales se sont basées sur le traitement préconisé par la société REMEDEE Labs, à

325 savoir 1h par jour. Pour confirmer les résultats obtenus avec le dispositif de REMEDEE labs, le dispositif provenant de l'IETR (Institut d'Electronique et des Technologies du numéRique) présent au laboratoire depuis une dizaine d'années a aussi été utilisé [[Zhadabov et al. 2008](#)]. De plus, pour éviter de passer à côté de tout effet biologique détectable, des expositions de 24h ont été réalisées afin de mimer une utilisation prolongée à l'extrême du bracelet.

330 Pour plus de clarté, la construction de cet exposé sort un peu de l'ordinaire. De ce fait, ce manuscrit est construit comme suit :

- **Chapitre 1** : Introduction générale sur les ondes électromagnétiques
- **Chapitre 2** : il sera consacré aux méthodes et techniques utilisées lors de ce projet
- 335 - **Chapitre 3** : La mise au point des dispositifs d'expositions adaptés pour les cellules sera présentée dans ce chapitre.
- **Chapitre 4** : La première **étude** se consacrera à l'analyse d'un potentiel stress oxydant induit par Remedee one et ses conséquences *in vitro*
- **Chapitre 5** : La deuxième **étude** se focalisera sur le stress génotoxique et l'implication
- 340 des systèmes de réparation *in vitro*
- **Chapitre 6** : Enfin durant la troisième **étude**, nous analyserons les mécanismes sous-jacents aux effets analgésiques *in vitro*
- **Chapitre 7** : Conclusion et discussion

345 Chaque chapitre possède son introduction propre avec la description des effets biologiques observés, une revue sur la littérature entre les OMM et l'effet biologique d'intérêt, les hypothèses de travail, les résultats obtenus après expérimentation suivi d'une conclusion et discussion.



350 Figure CH1-7 : Construction du manuscrit de thèse

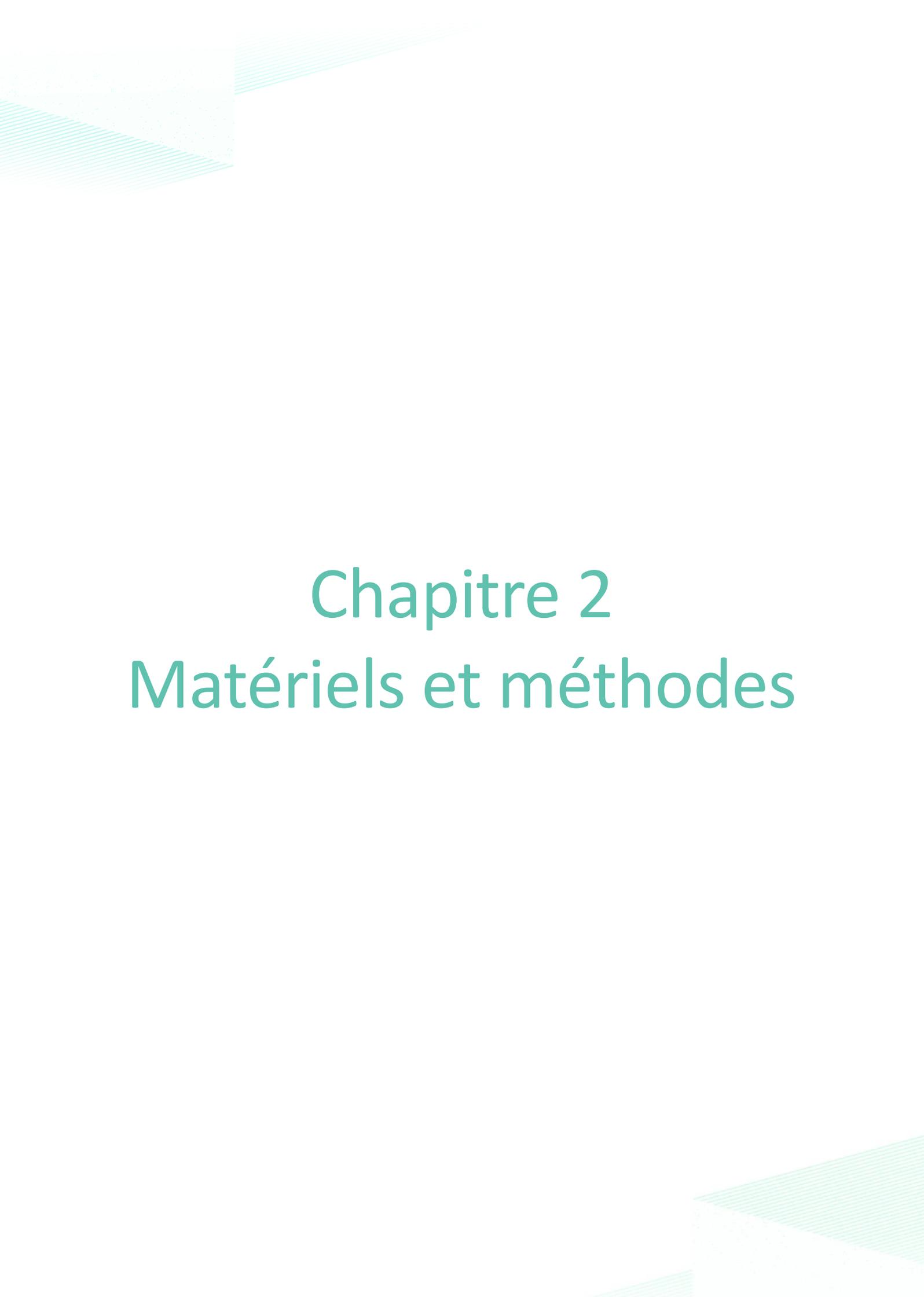
V-Références

- Alekseev, S. I., Radzievsky, A. A., Logani, M. K., & Ziskin, M. C. (2008). Millimeter wave dosimetry of human skin. *Bioelectromagnetics*, 29(1), 65-70. <https://doi.org/10.1002/bem.20363>
- Alekseev, S. I., Szabo, I., & Ziskin, M. C. (2008). Millimeter wave reflectivity used for measurement of skin hydration with different moisturizers. *Skin Research and Technology: Official Journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI)*, 14(4), 390-396. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2008.00319.x>
- Betskii, O. V., Devyatkov, N. D., & Kislov, V. V. (2000). Low intensity millimeter waves in medicine and biology. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 28(1-2), 247-268. <https://doi.org/10.1615/critrevbiomedeng.v28.i12.420>
- Blažek, P., O'Connor, M. J., Weigand, S., Grebmer, C., Reif, S., Fichtner, S., Friedrich, L., Reents, T., Kottmaier, M., Semmler, V., Bourier, F., Schunkert, H., Deisenhofer, I., Kolb, C., & Lennerz, C. (2020). Security millimetre wave body scanner safe for patients with leadless pacemakers or subcutaneous implantable cardioverter-defibrillators. *Journal of Interventional Cardiac*

- Electrophysiology*. <https://doi.org/10.1007/s10840-020-00830-x>
- Duck, F. A. (2012). *Physical properties of tissue : A comprehensive reference book* (Paperback edition). Institute of Physics and Engineering in Medicine.
- Hasch, J., Topak, E., Schnabel, R., Zwick, T., Weigel, R., & Waldschmidt, C. (2012). Millimeter-Wave Technology for Automotive Radar Sensors in the 77 GHz Frequency Band. *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques*, 60(3), 845-860. <https://doi.org/10.1109/TMTT.2011.2178427>
- Iliopoulos, I., Meo, S. D., Pasian, M., Zhadobov, M., Pouliguen, P., Potier, P., Perregrini, L., Sauleau, R., & Ettorre, M. (2021). Enhancement of Penetration of Millimeter Waves by Field Focusing Applied to Breast Cancer Detection. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 68(3), 959-966. <https://doi.org/10.1109/TBME.2020.3014277>
- International Telecommunication Union (Éd.). (2012). Measuring the information society 2012. International telecommunications union.
- International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection. (1998). ICNIRP GUIDELINES FOR LIMITING EXPOSURE TO TIME-VARYING ELECTRIC, MAGNETIC AND ELECTROMAGNETIC FIELDS (UP TO 300 GHZ). *HEALTH PHYSICS* 74 (4):494-522; 1998, 74(4), 494-522.
- International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection. (2020). Guidelines for Limiting Exposure to Electromagnetic Fields (100 kHz to 300 GHz). *Health Physics*, 118(5), 483-524. <https://doi.org/10.1097/HP.0000000000001210>
- Karipidis, K., Mate, R., Urban, D., Tinker, R., & Wood, A. (2021). 5G mobile networks and health-a state-of-the-science review of the research into low-level RF fields above 6 GHz. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*, 31(4), 585-605. <https://doi.org/10.1038/s41370-021-00297-6>
- Koenig, S., Lopez-Diaz, D., Antes, J., Boes, F., Henneberger, R., Leuther, A., Tessmann, A., Schmogrow, R., Hillerkuss, D., Palmer, R., Zwick, T., Koos, C., Freude, W., Ambacher, O., Leuthold, J., & Kallfass, I. (2014). Wireless sub-THz communication system with high data rate enabled by RF photonics and active MMIC technology. *2014 IEEE Photonics Conference*, 414-415. <https://doi.org/10.1109/IPCon.2014.6995424>
- Lee, Y., & Hwang K. (2002). Skin thickness of Korean adults. *Surgical and Radiologic Anatomy*, 24(3-4), 183-189. <https://doi.org/10.1007/s00276-002-0034-5>
- Mameghan, H., & Knittel, T. (1988). Response of melanoma to heat and radiation therapy—A review of the literature and experience from The Prince of Wales Hospital, Sydney. *The Medical Journal of Australia*, 149(9), 474-476, 478-481.
- Mansutti, G., Mobashsher, A. T., Bialkowski, K., Mohammed, B., & Abbosh, A. (2020). Millimeter-Wave Substrate Integrated Waveguide Probe for Skin Cancer Detection. *IEEE Transactions on*

- Biomedical Engineering*, 67(9), 2462-2472. <https://doi.org/10.1109/TBME.2019.2963104>
- Menhaj, A., Deloof, P., Assaad, J., & Rouvaen, J. (1999). Des systèmes radar dédiés à l'anticollision. *Recherche - Transports - Sécurité*, 62, 24-33. [https://doi.org/10.1016/S0761-8980\(99\)80026](https://doi.org/10.1016/S0761-8980(99)80026)
- Moore, K. L. & Dalley, A. F. (2001). *Anatomie médicale : Aspects fondamentaux et applications*.
- Nagatsuma, T. (2019). Advances in Terahertz Communications Accelerated by Photonics Technologies. *2019 24th OptoElectronics and Communications Conference (OECC) and 2019 International Conference on Photonics in Switching and Computing (PSC)*, 1-3. <https://doi.org/10.23919/PS.2019.8818026>
- Orlacchio, R., Le Page, Y., Le Dréan, Y., Le Guével, R., Sauleau, R., Alekseev, S., & Zhadobov, M. (2019). Millimeter-wave pulsed heating in vitro : Cell mortality and heat shock response. *Scientific Reports*, 9(1), 15249. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51731-7>
- Pakhomov, A. G., & Murthy, P. R. (2000). Low-intensity millimeter waves as a novel therapeutic modality. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 28(1), 34-40. <https://doi.org/10.1109/27.842821>
- Park, E., Kim, D., Choi, C., & So, J. (2007). Improving Quality of Service and Assuring Fairness in WLAN Access Networks. *IEEE Transactions on Mobile Computing*, 6(4), 337-350. <https://doi.org/10.1109/TMC.2007.53>
- Pellegrini, A., Brizzi, A., Zhang, L., Ali, K., Hao, Y., Wu, X., Constantinou, C. C., Nechayev, Y., Hall, P. S., Chahat, N., Zhadobov, M., & Sauleau, R. (2013). Antennas and Propagation for Body-Centric Wireless Communications at Millimeter-Wave Frequencies : A Review [Wireless Corner]. *IEEE Antennas and Propagation Magazine*, 55(4), 262-287. <https://doi.org/10.1109/MAP.2013.6645205>
- Radzievsky, A. A., Gordiienko, O. V., Alekseev, S., Szabo, I., Cowan, A., & Ziskin, M. C. (2008). Electromagnetic millimeter wave induced hypoalgesia : Frequency dependence and involvement of endogenous opioids. *Bioelectromagnetics*, 29(4), 284-295. <https://doi.org/10.1002/bem.20389>
- Radzievsky, A. A., Rojavin, M. A., Cowan, A., Alekseev, S. I., Radzievsky, A. A., & Ziskin, M. C. (2001). Peripheral neural system involvement in hypoalgesic effect of electromagnetic millimeter waves. *Life Sciences*, 68(10), 1143-1151. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(00\)01016-X](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(00)01016-X)
- Rojavin, A. A., Radzievsky, A. Co, M. (2000). Pain relief caused by millimeter waves in mice : Results of cold water tail flick tests. *International Journal of Radiation Biology*, 76(4), 575-579. <https://doi.org/10.1080/095530000138592>
- Rojavin, M. (1998). Medical application of millimetre waves. *QJM*, 91(1), 57-66. <https://doi.org/10.1093/qjmed/91.1.57>
- Szabo, I., Alekseev, S. I., Acs, G., Radzievsky, A. A., Logani, M. K., Makar, V. R., Gordiienko, O. R., &

- Ziskin, M. C. (2004). Destruction of Cutaneous Melanoma With Millimeter Wave Hyperthermia in Mice. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 32(4), 1653-1660. <https://doi.org/10.1109/TPS.2004.830957>
- Usichenko, T. I., Ivashkivsky, O. I., & Gizhko, V. V. (2003). Treatment of Rheumatoid Arthritis with Electromagnetic Millimeter Waves Applied to Acupuncture Points—A Randomized Double Blind Clinical Study. *Acupuncture & Electro-Therapeutics Research*, 28(1), 11-18. <https://doi.org/10.3727/036012903815901723>
- Waller, J. M., & Maibach, H. I. (2005). Age and skin structure and function, a quantitative approach (I) : Blood flow, pH, thickness, and ultrasound echogenicity. *Skin Research and Technology*, 11(4), 221-235. <https://doi.org/10.1111/j.0909-725X.2005.00151.x>
- Wiltse J. History of millimeter and submillimeter waves. *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.* 1984,32, 1118–1127
- Zhadobov M., Chahat N., Sauleau R., & Leduc C. (2016). Antenna/human body interactions in the 60 GHz band : State of knowledge and recent advances. In *Advances in Body-Centric Wireless Communication : Applications and state-of-the-art* (p. 97-142). Institution of Engineering and Technology. https://doi.org/10.1049/PBTE065E_ch5
- Zhadobov, M., Sauleau, R., Le Dréan, Y., Alekseev, S., & Ziskin, M. C. (2008). Numerical and Experimental Millimeter-Wave Dosimetry for In Vitro Experiments. *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques*, 56(12, Part 1), 2998-3007. <https://doi.org/10.1109/TMTT.2008.2006797>
- Zohra Z. & S.W. Lanigan. (2010). *Skin : Structure and Function*. *Dermatology in Clinical Practice*, 22 January 2010, pp 1-15
- Zohuri, B. (2019). Millimeter-Wave Energy as Weapon. In B. Zohuri, *Directed-Energy Beam Weapons* (p. 377-396). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-20794-6_7



Chapitre 2

Matériels et méthodes

355 Le chapitre 2 est consacré aux descriptions précises des techniques et des analyses
expérimentales utilisées lors de ce projet.

I- Culture cellulaire et réactifs

1. Choix des cellules

360

L'objectif de ces études était d'identifier et d'analyser de possibles effets biologiques et/ou
délétères sur les cibles cellulaires des OMM. L'énergie électromagnétique des OMM à
60-61 GHz est principalement absorbée dans les couches épidermiques de la peau,
composées à 90% de kératinocytes. Cette couche superficielle est aussi au contact avec les
365 terminaisons nerveuses libres [Tortora et al. 1994]. Afin d'éviter une grande hétérogénéité
due aux cultures de cellules primaires, des lignées cellulaires bien caractérisées ont été
choisies :

- d'une part la lignée de kératinocytes humain HaCaT, modèle bien établi d'étude des
événements épidermiques chez l'homme.

370

- d'autre part des cellules neurales afin de mimer les terminaisons nerveuses libres. La lignée
dérivée de neuroblastome SH-SY5Y, a été sélectionnée pour sa capacité à synthétiser et
sécréter de la sérotonine. Elle a donc été dédiée aux expériences explorant le mécanisme
analgésique.

375

A partir de ces deux modèles cellulaires, deux projets ont été amorcés :

- 1) L'analyse de l'impact des OMM sur le stress cellulaire : plus précisément sur le stress
oxydant et génotoxique et leurs conséquences,
- 2) L'analyse de l'impact des OMM sur la sécrétion de facteurs pouvant être impliqués
dans le mécanisme analgésique.

380

Pour cela, une étape cruciale fut la mise en place des dispositifs d'exposition *in vitro* qui sera détaillée dans le « **Chapitre 3 -Mise au point des systèmes d'exposition *in vitro*** ». Toutes les expérimentations ont donc été réalisées à la fois avec le dispositif de REMEDEE Labs, ainsi qu'avec le dispositif de l'IETR, avec deux durées d'exposition différentes. Au final, 3
385 paramètres ont été analysés :

- 1) REMEDEE 1h
- 2) IETR 1h
- 3) IETR 24h

Pour chaque expérience, des comparaisons ont été réalisées entre des cellules exposées (EXPO) ou non exposées (SHAM). De plus, les ondes millimétriques à 15 mW/cm² induisent une augmentation de la température qui n'est pas négligeable (qui sera présenté dans le chapitre 3 - III). **Les effets thermiques sont inhérents au système REMEDEE**. C'est pourquoi, lors de l'expérimentation, les températures sous exposition n'ont pas été compensées afin de rester le plus proche de la réalité. De ce fait, pour pouvoir différencier les effets thermiques des effets électromagnétiques, une autre condition appelée « contrôle thermique » (TC-Thermal Control) a été ajoutée. Elle consiste à élever la température de l'incubateur cellulaire afin d'atteindre la même température que sous exposition (Figure CH2-1).
395

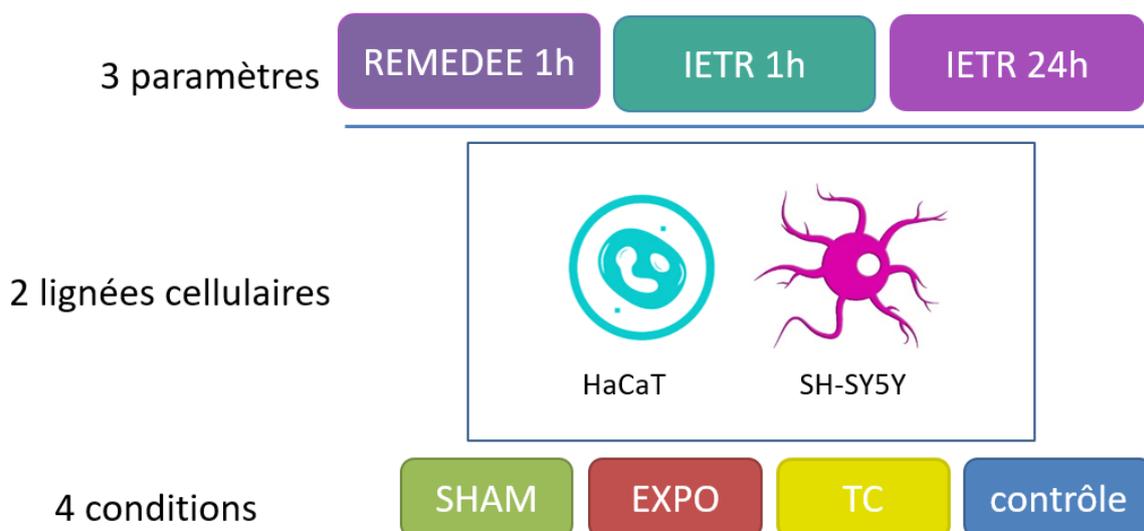


Figure CH2-1 : Représentation schématique du protocole expérimental (illustration personnelle)

400 Pour faciliter la lecture et l'analyse des figures, un code couleur a été appliqué à travers tout l'exposé. Vous trouverez donc représentées en couleur **verte** les cellules non exposées « SHAM », en couleur **rouge** les cellules exposées « EXPO », en **jaune** le contrôle thermique (TC) et en **bleu** ou **violet** les différents traitements chimiques (H₂O₂, GO) permettant de valider l'expérimentation.

405

2. Condition de culture

Les kératinocytes primaires (HaCaT- Invitrogen) ont été cultivés dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium ; 4,5 g / L de glucose) supplémenté avec 8 % de sérum de veau foetal (SVF, Biowest, France) et 1 % d'antibiotique (Life Technologies) dans un incubateur à 95 % d'air, 5% de dioxyde de carbone (CO₂) à 37 ° C. La ligné SH-SY5Y (MERCK) non différenciée est cultivée en DMEM / F-12 (21041, thermofisher) complétée avec 8 % de SVF et 1 % d'antibiotique dans un incubateur à 95 % d'air, 5 % de CO₂ à 37 °C. Pour éviter une dérive cellulaire potentielle, les cultures sont régulièrement arrêtées afin de repartir avec de nouvelles cellules cryogénisées. De plus, les passages cellulaires sont limités à 24 passages et 10 passages pour les cellules HaCaT et les cellules SH-SY5Y respectivement.

Afin d'être le plus reproductible possible, le protocole d'ensemencement est resté constant lors des expériences. Les cellules ont étéensemencées la veille pour le lendemain. Pour une plaque 96-puits, 7 000 et 5 000 cellules étaientensemencées pour 1h et 24h de traitement respectivement. Lors de l'utilisation d'une plaque 6-puits, 200 000 et 100 000 cellules étaientensemencées pour 1h et 24h de traitement respectivement. Ainsi, on arrive à environ 70-80% de confluence pour chaque expérimentation, évitant ainsi un potentiel effet d'inhibition par confluence.

425

3. Réactifs récurrents

- **Glucose Oxydase** (GO ; G2133 Sigma) : Elle permet l'oxydation du glucose en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène.
430
- **Peroxyde d'hydrogène** (H₂O₂; laboratoire Gilbert, 10 volumes) : Agent oxydant et sous-produit de la respiration mitochondriale
- **Hoechst** (33342 Sigma, 1 :1 000) : Le Hoechst est un colorant qui se fixe au niveau du petit sillon du double-brin d'ADN.
- **MG132** (BMLPI102-0025 enzolife) : il inhibe le protéasome, ce qui induit un fort stress protéotoxique du fait de l'accumulation de protéines altérées qui auraient dû être éliminées par le protéasome.
435
- **Bromate de potassium** (KBrO₃, 26703.232 VWR Chemicals) : Il perturbe le métabolisme mitochondrial, ce qui augmente la production de dérivé réactif de l'oxygène (ROS) intracellulaire [[Mangal et al. 2009](#)]
440

II- Imagerie

1. Immunofluorescence

445 Les cellules HaCaT et SH-SY5Y sontensemencées dans des plaques 96-puits de façon à être à 75% de confluence pour être traitées chimiquement par du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ou de la glucose oxydase (GO) ou exposées à des ondes millimétriques (EXPO), ou non (SHAM). Puis les cellules sont fixées dans du paraformaldéhyde 4% pendant 10 min. Une attention particulière est portée sur les cellules SH-SY5Y lors de cette étape car elles se décollent très
450 facilement. Les membranes cellulaires sont ensuite perméabilisées dans 150 µL de tampon phosphate salin (PBS, 1X - Gibco) à 0,3% Triton-X100 pendant 45 min à température ambiante. Après 3 lavages au PBS de 10 minutes, les kératinocytes sont incubés toute la nuit à 4° avec les anticorps primaires ([Tableau CH2-1](#)) dilués dans du PBS-SVF 3 %. Après lavages au PBS (3 x

10 min), les cellules sont incubées 1 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire (Tableau CH2-2) et du Hoechst (dans du PBS-SVF 3%). Après lavage au PBS (3x10 min), les images et quantifications de fluorescences réalisées en aveugle par la plateforme ImpACcell de Rennes.

Tableau CH2-1 : Anticorps primaires utilisés en Immunohistochimie

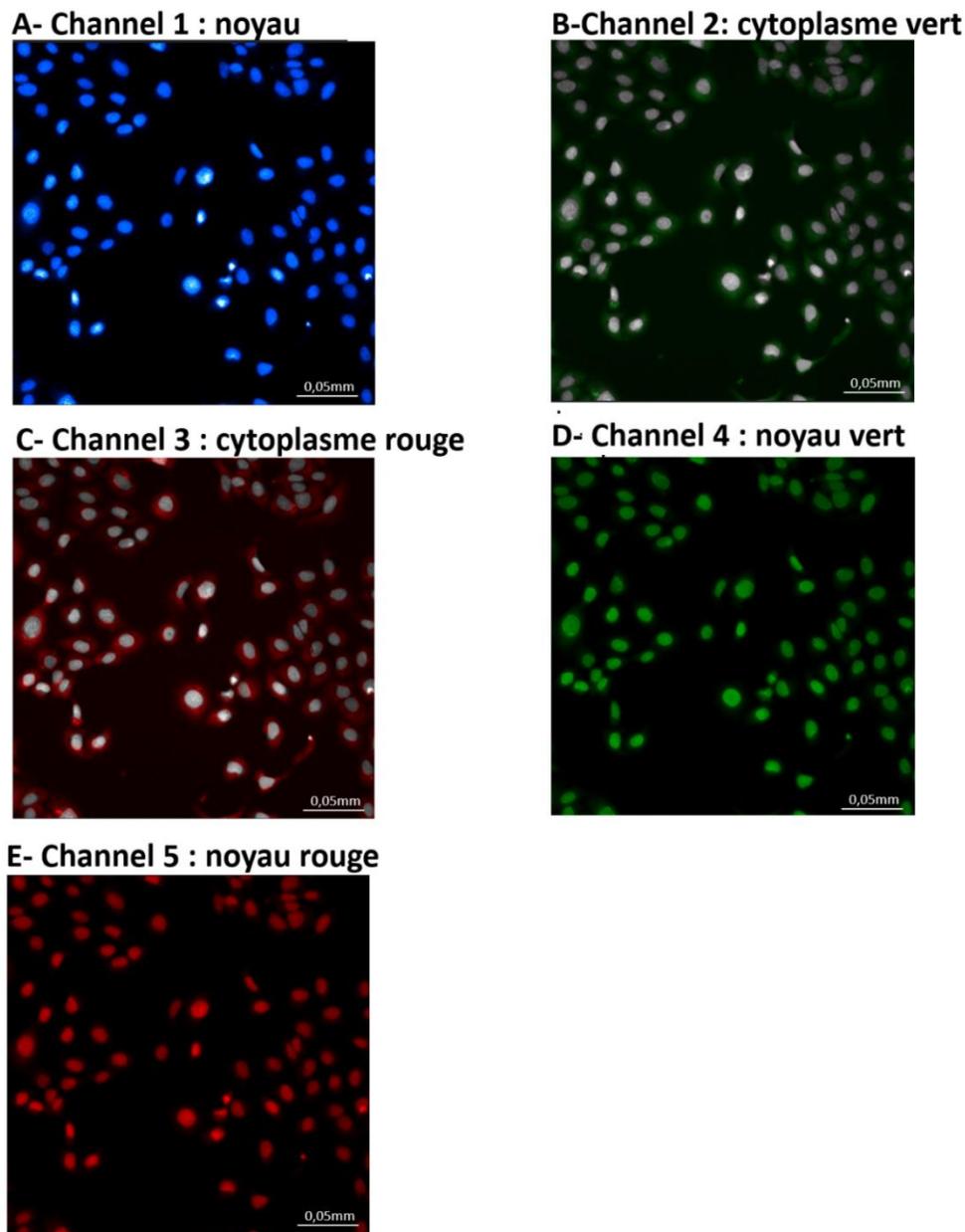
Anticorps	Référence	Compagnie	Hôte	Concentration
8OHDG	SC-393870	Santa Cruz biotechnology	Mouse	1 : 200
ATM	07-1286	Merk millipore	Rabbit	1 : 1 000
ATMp	#5883	Cells signaling technology	Rabbit	1 : 1 000
ATRp	ABE389	Millipore sigma	Rabbit	1 : 1 000
CHK1-p	Ab59239	Abcam	Rabbit	1 : 1 000
CHK2-p	Ab85743	Abcam	Rabbit	1 : 1 000
HNE	Ab46545	Abcam	Goat	1 : 400
HSP27-p	2401	Cells signaling technology	Rabbit	1 : 1 000
HSP70	Ab2787	Abcam	Mouse	1 : 1 000
MTH1	NB100-109SS	Novus biological	Rabbit	1 : 500
MUTYH	H00004595-M01	Abnova	Mouse	1 : 500
NEIL1	12145-1-AP	Proteintech	Rabbit	1 : 500
OGG1	NB100-106SS	Novus biologicals	Rabbit	1 : 200
P53-p	#9284	Cells signaling technology	Rabbit	1 : 400
PCNA	Ab18197	Abcam	Rabbit	1 : 1 000
Sérotonine	Ab66047	Abcam	Goat	1 : 1 000
xRCC1	Ab1838	Abcam	Mouse	1 : 200
xRCC1-p	A300-231A-M	Bethyl laboratories, inc	Rabbit	1 : 1 000

460

Tableau CH2-2 : Anticorps secondaires utilisés en Immunohistochimie

Anticorps	Référence	Compagnie	Concentration
Anti-souris conjugué à l'Alexa Fluor [®] 488	Ab150109	Abcam	1 : 1 000
Anti-souris conjugué à l'Alexa Fluor [®] 594	Ab150116	Abcam	1 : 1 000
Anti-lapin conjugué à l'Alexa Fluor [®] 488	Ab150077	Abcam	1 : 1 000
Anti-lapin conjugué à l'Alexa Fluor [®] 594	Ab150080	Abcam	1 : 1 000
Anti-chèvre conjugué à l'Alexa Fluor [®] 488	Ab150129	Abcam	1 : 1 000

2. ImPACcell-Cellomics



465 Figure CH2-2 : Séparation des différents canaux de fluorescence par le microscope « Cellomics » : fluorescence bleu (canal 1), fluorescence verte dans le cytosol (canal 2) et le noyau (canal 4) et fluorescence rouge dans le cytosol (canal 3) et le noyau (canal 5)

Les quantifications de fluorescence et les photos des cellules sont confiées à la plateforme technologique ImPACcell (Biosit) de l'université de Rennes 1. Leur technique d'imagerie en
470 semi-haut débit (cellomics) permet de quantifier de nombreuses cellules pour différents marquage.

L'analyse des images est divisée en plusieurs canaux (Figure CH2-2).

- Le premier canal se focalise sur l'identification des noyaux grâce au Hoechst qui permettra d'analyser l'intégrité des cellules (voir partie chapitre 3 IV.2)

- 475
- Les canaux suivants identifient la fluorescence verte ou rouge en fonction de leur localisation : noyau ou cytoplasme.

Cette méthode permet, selon l'anticorps utilisé, d'obtenir de nombreuses informations cellulaires tels que le nombre de cellules par puits, la morphologie des noyaux (forme, aire, intensité du Hoechst), la fluorescence totale et/ou concentrée dans le noyau (foci ou diffus)
480 par cellule. La quantification est faite en aveugle sur la plateforme qui nous transmet les data brutes afin de les analyser.

Le fichier Excel généré par la plateforme contient un millier de lignes, chacune correspondant à la fluorescence de chaque canal par cellule. D'un réplicat biologique à l'autre, il existe une grande variabilité dans l'intensité de fluorescence d'une molécule d'intérêt. Cela s'explique
485 principalement par l'efficacité de fixation des anticorps d'une manipulation à l'autre et des réglages utilisés lors de la prise d'image. Afin de pouvoir comparer nos différents réplicats biologiques, la méthode ci-dessous de calcul de facteur d'induction (fold change) a été appliquée : Pour chaque molécule d'intérêt détectées en immunofluorescence, 2 puits (réplicats techniques) lui sont dédiée sur 3 plaques de 96-puits différentes pour les 3
490 conditions : SHAM, EXPO et Contrôle thermique (TC) ainsi que le(s) contrôle(s) positif(s). Les moyennes de fluorescence de chaque puit sont calculées. La moyenne totale de la plaque SHAM est prise en référence pour obtenir les ratios des moyennes des différentes conditions par puits. Cette technique est réalisée sur 4 expériences indépendantes c'est-à-dire sur un nouvel ensemencement de cellules et une nouvelle exposition à chaque fois, soit N=4 réplicats
495 biologiques indépendants (Figure CH2-3). Les moyennes des réplicats biologiques et

techniques sont alors compilées et les différentes conditions sont comparées grâce à un test de Mann Whitney avec correction de Bonferroni (voir VII.)

500

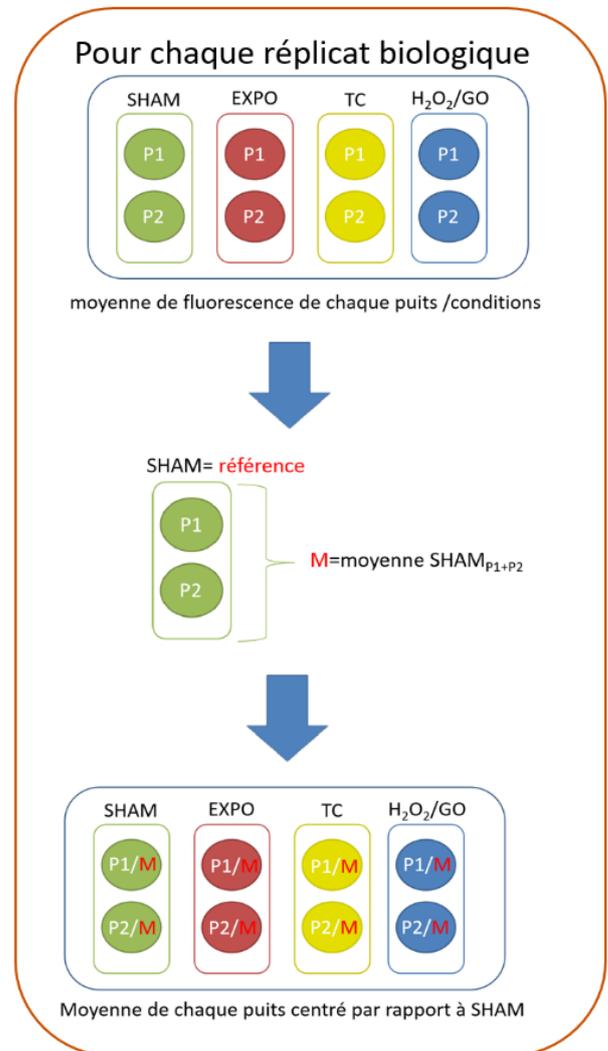
Figure CH2-3 : représentation schématique des calculs effectués en immunofluorescence (illustration personnelle)

505

Pour un réplicat biologique, pour chaque condition « SHAM », « EXPO », « TC », « H₂O₂/GO », la moyenne totale de fluorescence des cellules pour les puits P1 et P2 sont calculées. La moyenne **M** des deux puits de la condition SHAM est désignée comme référence. Chaque moyenne des deux puits de chaque condition est divisée par **M** permettant ainsi de calculer le ratio par rapport au SHAM. Cette technique nous permet de pouvoir comparer différents réplicats biologiques lorsqu'il existe une grande variabilité d'intensité de fluorescence entre les réplicats.

510

515



X N=4

520

3. Détection des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS)

525

Pour quantifier la production de ROS intracellulaires présents dans nos échantillons, le kit CellROX® Oxidative Stress Reagents (C10444, moléculaire probes®) a été utilisé conformément aux instructions du constructeur. Brièvement, après ensemencement, les plaques sont soumises aux OMM ou non (EXPO, SHAM), en même temps, dans des incubateurs différents. En tant que contrôle, les cellules ont été traitées avec un agent oxydant (H₂O₂, 0,5 mM pendant 1h, GO 0,05 UI/mL 24h). Après traitement, les cellules ont été incubées

avec le réactif CellROX® (5 µM) 30 minutes à 37 ° C dans l'obscurité. La présence de ROS
530 permet l'oxydation du réactif et induit une fluorescence dont les valeurs maximales
d'absorption /émission s'élèvent à ~485/520 nm. Les puits sont ensuite lavés et les cellules
fixées avec du paraformaldéhyde à 4% pendant 15 minutes puis colorées avec du Hoechst. Les
plaques sont ensuite envoyées à la plateforme ImPACcell (Biosit) pour être photographiées et
quantifiées, en aveugle. La même opération a été répétée pour 4 expériences indépendantes
535 impliquant à chaque fois 4 puits par condition. La méthode de calcul expliquée dans le
paragraphe précédent est alors appliquée.

III- Analyses transcriptomiques

1. Extraction ARN et qPCR

540

L'ARN total a été extrait à l'aide du kit « NucleoSpin® RNA » (MACHEREY-NAGEL) selon le
protocole du fabricant. La quantité et la qualité des ARN ont été estimées par le
spectrophotomètre « Nanodrop 8000 » (Thermo Fisher). La transcription inverse de l'ARN
total a été effectuée en utilisant la transcription inverse QuantiTect (Qiagen) selon les
545 instructions du fabricant. La PCR quantitative a été réalisée en utilisant le système de PCR en
temps réel le « CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System » (Bio-Rad). Les valeurs
d'expression relative ont été calculées avec Excel sur la base des valeurs $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [Livak et
Schmittgen, 2001]. Les séquences d'amorces des protéines heat shock 70 (HSP70) et Heat
shock 27 (HSP27) ainsi que les gènes de ménage Glyceraldehyde-3-Phosphate
550 Dehydrogenase et TATA-box Binding Protein utilisées dans cette étude sont indiquées dans le
Tableau CH2-3. En tant que témoin positif, des cellules ont été incubées à 43°C pendant 1h
avec du milieu d'exposition.

555

Tableau CH2-3 : Primers utilisés lors des RT-qPCR

Nom des gènes	Forward primer	Reverse primer
Heat Shock Protein 70	AGGCCGACAAGAAGAAGGTGCT	TGGTACAGTCCGCTGATGATGG
Heat Shock Protein 27	CAGGACGAGCATGGCTACATCT	GGGATGGTGATCTCGTTGGAC
Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
TATA-box Binding Protein	TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA	CACATCACAGCTCCCCACCA

560 2. RT² Profiler PCR array

La RT² profiler PCR array a été réalisée à l'aide du kit « *RT² Profiler PCR Array Human DNA Damage Signaling Pathway* » (Qiagen). 48 gènes ont été sélectionnés parmi une liste de 89 gènes impliqués dans la réparation de l'ADN fournies par l'entreprise (Tableau CH2-4). Les matrices sont désignées à façon par le laboratoire Qiagen avec les primers des gènes correspondants. 400 ng d'ARN sont rétro-transcrits à l'aide du kit « RT² First Strand Kit » (Qiagen) dans le thermocycleur « *MJ Mini™* » (Bio-Rad). Les ADNc sont ensuite amplifiés avec le « *RT² SYBR Green qPCR Mastermix* » (Qiagen) et déposer dans les puits de la plaque matrice. La PCR quantitative a été réalisée en utilisant le même matériel que précédemment (Bio-Rad). 4 gènes de références sont utilisés pour normaliser les données (ACTB, GADPH, RTC et PPC). 570 Celles-ci sont traitées avec le logiciel « *Biorad CFX Manager* » et la méthode des $2^{-\Delta\Delta C_t}$ est utilisée [Livak et Schmittgen, 2001].

Tableau CH2-4 : Gènes sélectionnés appartenant aux différentes voies de réparation analysées

Nom	Nom complet	Voie principale
APEX1	Apurinic/Apyrimidinic Endodeoxyribonuclease 1	BER
ATM	ATM Serine/Threonine Kinase Ataxia Telangiectasia Mutated	ATM
ATR	ATR Serine/Threonine Kinase	ATR
ATRIP	ATR Interacting Protein	ATR
BARD1	BRCA1 Associated RING Domain 1	ATM
BRCA1	BRCA1 DNA Repair Associated	ATM
BRIP1	BRCA1 Interacting Helicase 1	ATM
CHEK1	Checkpoint Kinase 1	ATR
CHEK2	Checkpoint Kinase 2	ATM
ERCC2	ERCC Excision Repair 2, TFIIH Core Complex Helicase Subunit	NER
EXO1	Exonuclease 1	MMR
FANCG	DNA Repair Protein XRCC9	ATM
FEN1	Flap Structure-Specific Endonuclease	BER
HUS1	Checkpoint Protein HUS1	ATR
MBD4	Methyl-CpG Binding Domain 4, DNA Glycosylase	BER
MDC1	Mediator Of DNA Damage Checkpoint 1	ATM
MLH1	MutL Homolog 1	MMR
MPG	N-Methylpurine DNA Glycosylase	NER
MRE11A	MRE11 Homolog, Double Strand Break Repair Nuclease	DSB
MSH2	MutS Homolog 2	MMR
NTHL1	Nth Like DNA Glycosylase 1	BER
OGG1	8-Oxoguanine DNA Glycosylase	BER
PARP1	Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1	BER
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen	BER
PMS1	PMS1 Homolog 1, Mismatch Repair System Component	MMR
PMS2	PMS1 Homolog 2, Mismatch Repair System Component	MMR
RAD1	RAD1 Checkpoint DNA Exonuclease	ATR
RAD17	Cell Cycle Checkpoint Protein RAD17	ATR
RAD18	RAD18 E3 Ubiquitin Protein Ligase	ATR

RAD50	RAD50 Double Strand Break Repair Protein	ATM
RAD51B	RAD51 recombinase Paralog B	ATM
RAD9A	Cell Cycle Checkpoint Control Protein RAD9A	ATR
REV1	REV1 DNA Directed Polymerase	BER
RPA1	Replication Protein A1	ATR
SIRT1	Sirtuin 1	NER
TOPBP1	DNA Topoisomerase II Binding Protein 1	ATR
TP53BP1	Tumor Protein P53 Binding Protein 1	ATM
UNG	Uracil DNA Glycosylase	BER
XPA	XPA, DNA Damage Recognition And Repair Factor	NER
XRCC1	X-Ray Repair Cross Complementing 1	BER
XRCC2	X-Ray Repair Cross Complementing 2	ATM
XRCC3	X-Ray Repair Cross Complementing 3	ATM
XRCC6	X-Ray Repair Cross Complementing 6 = ku70	ATM

575 IV- Analyses biochimiques

1. Détection du peroxyde d'hydrogène H₂O₂

Pour quantifier la concentration en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) dans les échantillons, le réactif Amplex® Red (10-acétyl-3,7-dihydroxyphénoxazine, A22188 Invitrogen) a été utilisé
580 conformément aux instructions du constructeur. Brièvement, les cellules HaCaT ont été ensemencées en plaque de 6-puits et incubées avec seulement 1 mL de milieu d'exposition afin d'éviter les phénomènes de dilution d'H₂O₂ lorsqu'il passe dans le milieu extracellulaire et le détecter plus facilement. Les plaques sont directement exposées 1h ou 24h aux OMM. Le milieu d'exposition est ensuite récupéré afin de mesurer la quantité d'H₂O₂ excrétée.
585 Parallèlement les cellules sont lysées avec 500 µL de tampon de lyse 1X (Reporter Lysis 5X buffer, E397A Promega). En présence de peroxydase, le réactif Amplex® Red réagit avec l'H₂O₂ produisant le produit d'oxydation rouge-fluorescent, resorufin. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission étaient réglées à 544 nm et 590 nm respectivement sur un fluorimètre (Enspire). L'H₂O₂ fourni dans le kit a permis de réaliser une gamme d'étalonnage,

590 allant de 10 nM à 1 µM. Un traitement à la glucose oxydase (GO, 5 mUI/mL) a été utilisé
comme contrôle positif.

2. Protéines carbonylées

595 Le kit Oxiselect™ Protein Carbonyl ELISA (STA-310, Cell Biolabs) a été utilisé afin de quantifier
la production de protéines carbonylées dans nos échantillons. Les cellules HaCaT ont été
traitées (H₂O₂, GO ou EXPO / SHAM N = 5) dans des plaques 6-puits. Elles sont ensuite
récupérées par grattage dans 1 ml de PBS et centrifugées pendant 5 min 2000 g. Si les
échantillons ne sont pas analysés le jour même, les culots cellulaires sont stockés à -80 ° C si
600 besoin. Le jour de l'expérience, les culots secs sont repris dans 500 µL de PBS puis soniqués.
La concentration en protéines a été déterminée par dosage de Bradford et les extraits ont été
dilués pour atteindre une concentration en protéines de 10 µg/mL. En parallèle, une gamme
de protéines carbonylées (0-7,5 nmol / mg de protéines) fournie par le fabricant a été réalisée.
Chaque échantillon a été déposé sur plaque 96-puits ELISA en duplicata et incubé pendant 2
605 heures à 37 °C afin de s'absorber à la plaque. Ensuite, 100 µL de di-nitro-phényl hydrazine
(DNPH) ont été ajoutés dans chaque puits pendant 45 minutes à température ambiante. La
DNPH réagit avec les groupes carbonyles des protéines en produisant une fraction protéine-
di-nitro-phényl hydrazone (DNP). Les puits sont ensuite lavés et traités avec 100 µL
d'anticorps anti-di-nitro-phényl hydrazone, 1 h à température ambiante suivi de 100 µL
610 d'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase de raifort (HRP), pendant 1 heure à
température ambiante. Enfin, les cellules sont incubées avec 100 µL de solution de substrat
pendant 30 min en fonction de la concentration de protéines carbonylées (Figure CH2-4). La
réaction a été stoppée avec 100 µL de « STOP enzyme » et l'absorbance a été lue à 450 nm
grâce au spectrophotomètre (Biorad). Les données de l'absorbance sont converties en
615 concentration de protéines carbonylées pour chaque condition grâce à la gamme.

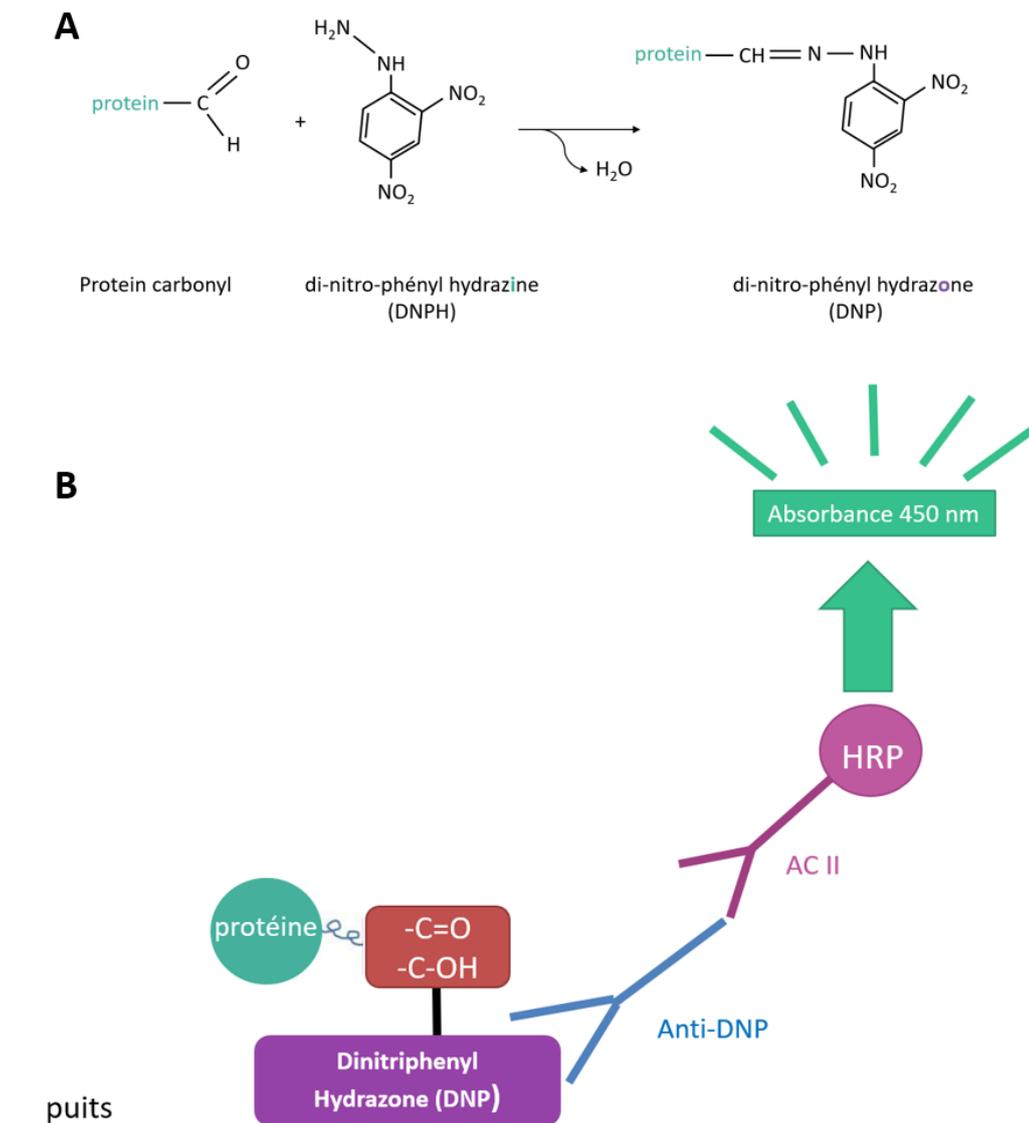


Figure CH2-4 : Principe du kit Oxiselect™ Protein Carbonyl ELISA (STA-310, Cell Biolabs) (Illustration personnelle)

620 A) Dérivation du groupe carbonyle avec di-nitro-phényl hydrazine DNPH générant un composé protéine-DNP hydrazone

625 B) Les protéines carbonylées présentes dans l'échantillon permettent la dérivation du di-nitro-phényl hydrazine (DNPH) en un adduit protéine - DNP hydrazone (DNP). Plus il y a de protéines carbonylées présentes dans l'échantillon, plus il y aura de DNP et donc plus le puits émettra une absorbance intense. DNP présents dans l'échantillon et donc de protéines carbonylées, plus le puits émettra une absorbance intense grâce à une succession d'anticorps couplée à la peroxydase de raifort (HRP)

3. Lipides oxydés intracellulaires et extracellulaires

En utilisant le kit « Oxiselect TBARS » (STA-330 Cell Biolabs), la production de malondialdéhyde (MDA), un produit naturel de la peroxydation lipidique, a été quantifiée (Figure CH2-5). Pour cette expérience, une grande quantité de cellules était indispensable. De ce fait, des flasques 75 cm² entières ont étéensemencées à environ 10⁷ cellules HaCaT et traitées (GO 0,05 UI/mL pendant 24h, EXPO/SHAM avec 10 mL de milieu d'exposition). Les cellules et 100 µL du milieu de culture associés ont été récupérés, permettant ainsi de doser le contenu « **intracellulaire** » mais aussi de doser le milieu de culture correspondant à la fraction « **extracellulaire** ». En parallèle, une gamme de dilution de MDA (0-125 µM) fournie par le fabricant a été réalisée. Chaque point de gamme de MDA et chaque échantillon ont été dupliqués. 250 µL de réactif acide thiobarbiturique sont ajoutés à chaque échantillon et incubés à 95 °C pendant 1 heure. MDA forme un adduit 1 : 2 avec l'acide thiobarbiturique (TBA) qui devient fluorescent. Ensuite, les échantillons, une fois refroidis sur glace, sont centrifugés pendant 15 minutes et 100 µL du surnageant est utilisé pour mesurer la fluorimétrie dans une plaque 96-puits. La plaque est lue à une excitation de 540 nm et une émission de 590 nm par un spectrophotomètre (Biorad).

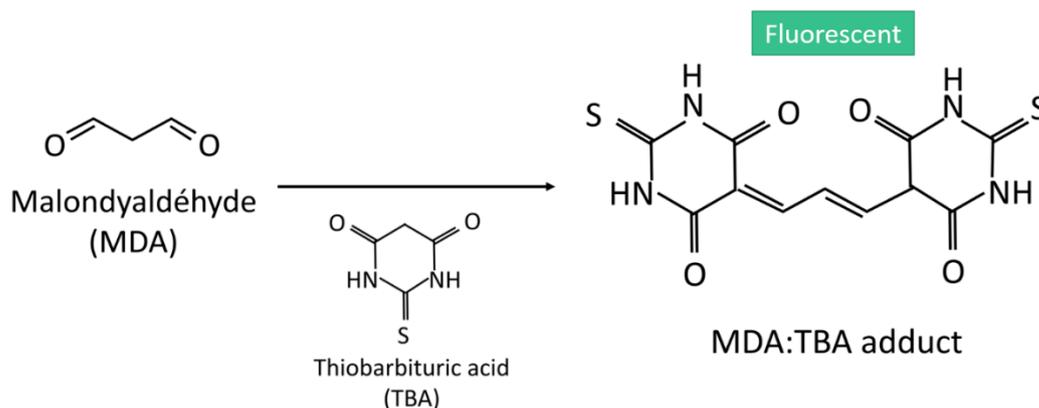


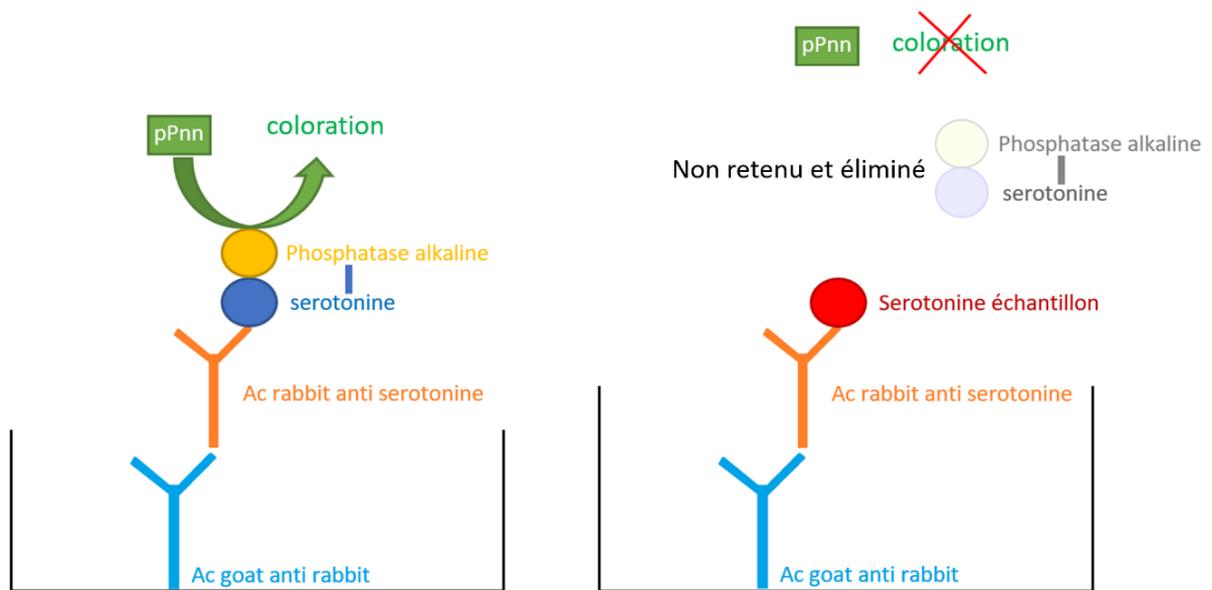
Figure CH2-5 : Principe du kit Oxiselect™ TBARS (STA-330 Cell Biolabs) (Illustration personnelle)

Formation de l'adduit MDA-TBA 2 qui émet une fluorescence à 590 nm

645

4. Elisa sérotonine

650 La concentration de sérotonine présente dans nos échantillons est analysée en utilisant un test ELISA Sérotonine (ab133053, Abcam). Il repose sur une compétition entre la sérotonine présent dans les échantillons analysés et la sérotonine couplée à la phosphatase alcaline. Plus il y a de sérotonine dans les échantillons d'intérêt, moins il y aura une fluorescence intense. Pour ce test, des flasques entières de cellules HaCaT et SH-655 SY5Y ont étéensemencées avec environ 10^7 cellules par flasque. Elles ont ensuite été soit exposées (EXPO) ou non (SHAM), soit soumises au contrôle thermique (TC) pendant 1h ou 24h ou traitées à un contrôle positif (H_2O_2 ou GO). Les cellules sont récupérées, lysées et centrifugées afin d'être stockées sous forme de culot sec. Les milieux de culture sont eux aussi récupérés et stockés à $-80^\circ C$. Le jour de l'expérience, les cellules sont re-suspendues dans 500 μL de PBS et lysées. 100 μL de lysats cellulaires et de milieux de cultures sont déposés dans une plaque 96-puits préfixée avec un anticorps de chèvre anti-lapin. En parallèle, une gamme de concentration en sérotonine (0-500 ng/mL) compris dans le kit est ajoutée dans les puits correspondants. 50 μL d'anticorps de lapin anti-sérotonine sont ajoutés dans les puits et vont être retenus par les anticorps anti-lapin fixés sur la plaque. 665 Puis 50 μL de sérotonine conjuguée à la phosphatase alcaline sont ajoutés et vont entrer en compétition avec la sérotonine présente dans les échantillons pour se fixer aux anticorps anti-sérotonine. L'ensemble est incubé 2 heures à température ambiante sous agitation (~ 500 tours/min). Les puits sont ensuite lavés et 200 μL de pyrimidine/purine nucléotide 5'-monophosphate nucléosidase (pPnn) est ajouté et incubé pendant 1h. Le 670 pPnn réagit avec la phosphatase alcaline retenue dans certains puits en induisant une coloration jaune qui peut être lue à 405 nm. L'intensité de la coloration jaune est inversement proportionnelle à la quantité de sérotonine des échantillons capturée dans la plaque (Figure CH2-6).



675 Figure CH2-6 : Principe du test ELISA Serotonine (ab133053, abcam) (Illustration personnelle).

La sérotonine présente dans les échantillons et la sérotonine conjuguée à la phosphatase alcaline rentrent en compétition pour les anticorps de lapin anti-sérotonine couplés à l'anticorps anti-lapin. L'ajout du substrat pPnn avec la phosphatase alcaline permet l'apparition d'une coloration jaune dont l'absorbance est lue à 405nm.

680 V- Analyses métabolomiques

La métabolomique permet l'identification mais aussi la quantification de l'ensemble des métabolites présents dans un échantillon. Une précédente étude de notre groupe [Le Pogam et al. 2019] consistait en une approche métabolomique, c'est-à-dire l'identification et la

685 quantification non ciblées de tous les métabolites, dans des cellules HaCaT exposées à 60 GHz, à 20 mW/cm² pendant 24h en condition athermique. Il avait été reporté des différences de métabolome uniquement dans l'**exométabolome**, c'est-à-dire les molécules hydrophiles présentes dans le milieu de culture. De ce fait, se basant sur leurs résultats, seul l'exométabolome a été analysé. Ces expériences de métabolomique ont été réalisées en

690 collaboration avec l'IETR en utilisant une chromatographie en phase liquide à ultra-haute pression couplée à un spectromètre de masse à haute résolution (UPLC-HRMS- *Ultrahigh Pressure Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry*).

1. Exposition des cellules HaCaT

695 Deux approches ont été réalisées : une approche métabolomique non ciblée, puis un profilage
métabolique sur la sérotonine. Devant la sensibilité de cette technique, la rigueur dans les
procédés est de mise. Pour cela, les cellules HaCaT ont étéensemencées dans un seul puits
d'une plaque 6-puits avec 1 mL ou 2 mL de milieu d'expo pour 1h ou 24h d'exposition
respectivement. Pour atténuer la variabilité entre les expositions, des groupes ont été
700 constitués :

- « **REMEDEE 1h** » : 4 plaques ont étéensemencées le même jour et elles correspondent
soit à l'EXPO, au SHAM, au contrôle thermique (TC) ou au traitement chimique par le
peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 , 0,5 mM, 2h). Les plaques sont utilisées le même jour,
dans le même incubateur contenant le dispositif REMEDEE. Ce procédé est ensuite
705 réalisé 4 fois sur 4 jours différents pour obtenir les 4 réplicats biologiques (N=4).
- « **IETR 1h** » : les mêmes conditions que pour « REMEDEE 1h » ont été appliquées, mais
avec l'incubateur contenant le dispositif IETR.
- « **IETR 24h** » : En début de semaine, 4 flasques de 25 cm² sontensemencées. Pour
chaque condition, la veille pour le lendemain, 100 000 cellules sontensemencées dans
710 un puits de la plaque 6-puits avant d'être, soit exposées 24h (EXPO), ou non (SHAM),
ou soumises au contrôle thermique (TC) ou au traitement chimique (H_2O_2 0,5mM, 2h).
Les plaques sont utilisées dans la même semaine, dans le même incubateur contenant
le dispositif IETR. De même, ce procédé est réalisé 4 fois durant 4 semaines différentes
pour obtenir les 4 réplicats biologiques (N=4).

715 Au final, 200 µL de milieu d'exposition de chaque puits sont récupérés et stockés à -80°C avant
d'être purifiés.

720

2. Purification des milieux de culture

Une fois les 64 échantillons récupérés, la purification des milieux de culture a été réalisée en même temps. Tout d'abord les solutions « standards » mères ont été constituées :

725

- Le standard interne contient C17:0 (sigma H3500-16), crea-d3 (sigma 616249.250mg), lys-d4 (sigma 616.192) , dilués dans Méthanol (MeOH)/H₂O (80 : 20) pour atteindre 10 ng/μL. Il permet de savoir si l'extraction a été correcte.
- Le standard externe contient Leu-d3 (Aldrich 486825), Trypto-d3 (CDN isotope D-7419), Ind-AA-d5 (CDN isotope D-2203) , Tetra-A-d24 (CDN isotope D-5074), dilués dans du MeOH pour atteindre 1 ng/μL. Ce contrôle est ajouté avant l'analyse par

730

Puis, sur glace, 400 μL de standard interne sont ajoutés à 100 μL d'échantillon. Le tout est complété par 550 μL d'éthyl tert-butyl éther et vortexé. 200 μL d'eau froide sont ajoutés à l'ensemble et centrifugés (12 000 g, 4 °C, 15 min). 300 μL de la phase aqueuse sont transférés dans un Eppendorf filtrant de 10 KDa (UFC501096, Millipore) et centrifugés (12 000 g, 4 °C, 15 min). Afin de standardiser les échantillons, 100 μL sont récupérés et déposés dans un vial LC (VWR 548-1055). 10 μL par échantillons sont récupérés en parallèle, pour constituer le contrôle qualité (QC) par condition (REMEDEE 1h, IETR 1h ou IETR 24h). 40 μL de contrôle externe sont ajoutés dans tous les tubes. Les échantillons ont ensuite été envoyés à l'IETR afin d'être analysés en UPLC-HRMS ([voir paragraphe suivant](#)) et stockés à -80°C.

740

3. Flux métabolomique par UPLC-HRMS

Les échantillons sont lyophilisés et repris par 200 μL acétonitril/H₂O (90:10). Par la suite, ils sont injectés dans la machine à chromatographie liquide à ultra haute performance (UPLC-Waters Acquity) couplée à un spectromètre de masse (HRMS-Thermo QExactive). Globalement, les échantillons sont entraînés par la phase mobile (acétonitrile/eau) dans la colonne (phase stationnaire) de l'UPLC. Dans ce contexte, chaque métabolite migrant au sein

745

750 du système chromatographique, est associé à un « temps de rétention » qui dépend de ses propriétés physico-chimiques. Les composés séparés par le système chromatographique sont introduits dans la source d'ionisation du spectromètre de masse dans laquelle ils forment des espèces ioniques gazeuses dont le rapport masse sur nombre de charge (m/z) est mesuré par la partie analyseur du spectromètre, l'intensité de chaque ion étant révélée par leur impact sur un détecteur. L'association de l'intensité du signal détecté au temps de rétention chromatographique, permet de générer un chromatogramme d'ions totaux. Les analyses statistiques sont réalisées par le professeur D. Rondeau via le logiciel ProgenesisQI. Dans le cadre de cette thèse, seuls les échantillons REMEDEE 1H ont été analysés. Les résultats axés sur la sérotonine seront présentés au [Chapitre 6 - Impact des OMM sur le métabolisme de la sérotonine *in vitro*](#).

760

VI- Analyses statistiques

Toutes les expériences ont été réalisées à minimum N=4 avec les trois différents paramètres : REMEDEE 1h (sauf quelques exceptions qui seront indiqué dans le manuscrit), IETR 1h et IETR 24h, pour les 4 conditions EXPO/SHAM/TC et au minimum un contrôle positif.

765 1. Immunomarquage (IF, ROS)

Les moyennes de l'effet observé sont calculées pour chaque condition et pour chaque réplicat biologique. Elles sont ensuite compilées et chaque condition est analysée avec le SHAM comme référence. Etant dans un cas de comparaisons multiples, l'utilisation du test non-paramétrique de Mann Whitney avec une correction de Bonferroni du risque de première espèce α a été effectuée avec la formule :

770

$$\text{Risque } \alpha_{\text{corrigé}} = \alpha / k$$

Avec k le nombre de paramètres indépendants. Dans le cas des immunofluorescences des protéines impliquées dans les voies de réparation, k a été fixé à 3. En effet, k désigne les 3 différentes voies de réparation analysées. Dans ce cas précis, le risque $\alpha_{\text{corrigé}} = 0,016$.

775

2. Expression génique (RT-qPCR, RT²)

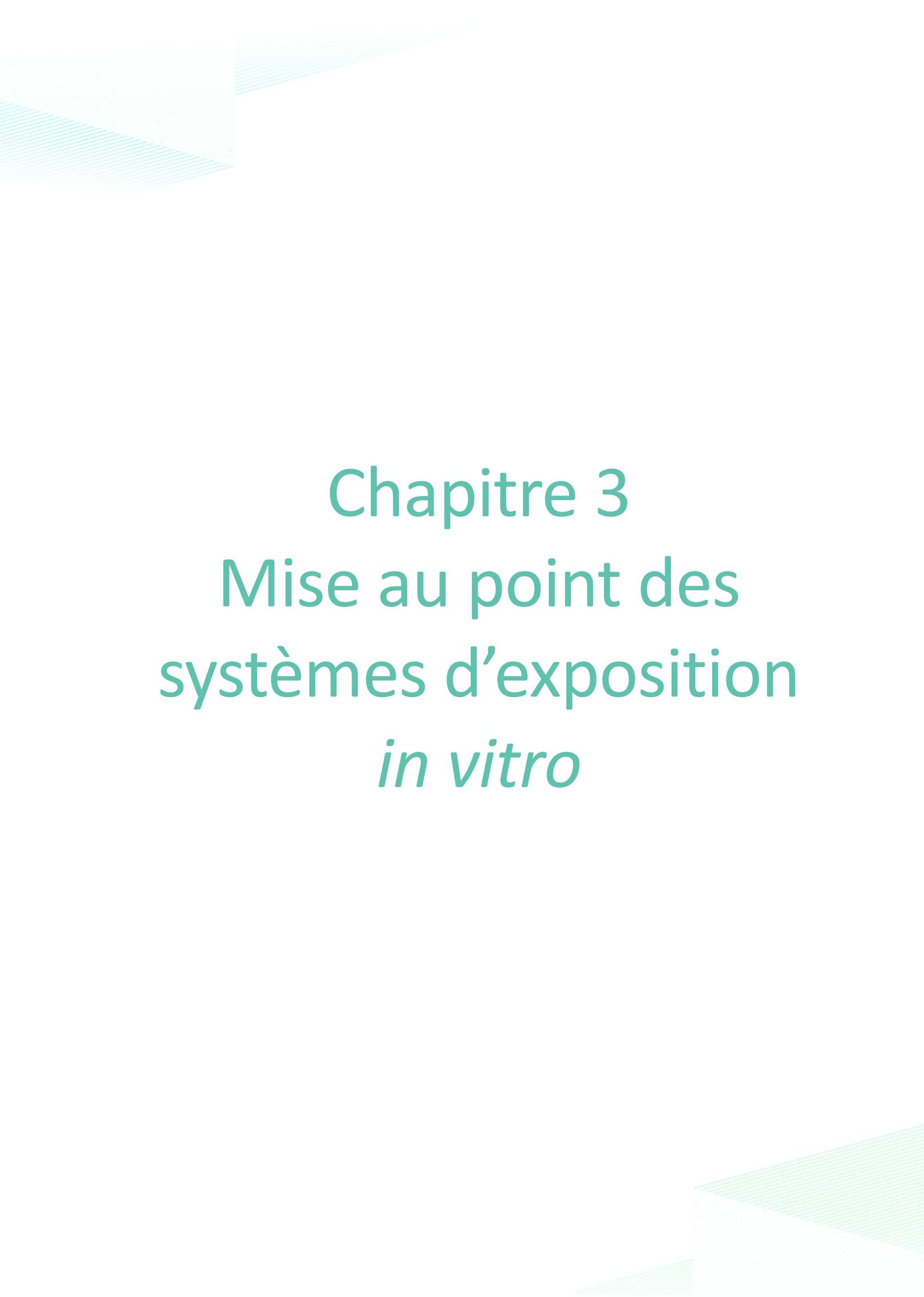
780 Les valeurs d'expression relative calculées sur la base des valeurs $2^{-\Delta\Delta Ct}$ des différentes conditions pour N=4 sont ensuite comparé avec le SHAM comme référence par un test ANOVA de comparaison multiple avec le risque α de première espèce fixé à 0,05 grâce au logiciel graphpad. En effet, Le test ANOVA permet d'analyser la variance afin de déterminer si le comportement d'une variable quantitative peut être expliqué par une ou de plusieurs variables qualitatives.

785 3. Dosage des molécules oxydées

La moyenne des concentration des molécules dosées, pour chaque réplicat biologique est calculée. Chaque condition est alors analysée avec le SHAM comme référence par un test non-paramétrique de Mann Whitney avec le risque α de première espèce fixé à 0,05 grâce au logiciel en ligne biostatgv.

790 VII- Références

- Le Pogam, P., Le Page, Y., Habauzit, D., Doué, M., Zhadobov, M., Sauleau, R., Le Dréan, Y., & Rondeau, D. (2019). Untargeted metabolomics unveils alterations of biomembranes permeability in human HaCaT keratinocytes upon 60 GHz millimeter-wave exposure. *Scientific Reports*, *9*(1), 9343. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45662-6>
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods*, *25*(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Mangal, D., Vudathala, D., Park, J.-H., Lee, S. H., Penning, T. M., & Blair, I. A. (2009). Analysis of 7,8-Dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine in Cellular DNA during Oxidative Stress. *Chemical Research in Toxicology*, *22*(5), 788-797. <https://doi.org/10.1021/tx800343c>
- Tortora, G. J. (1994). *Principes d'anatomie et de physiologie*. De Boeck.



Chapitre 3

Mise au point des systèmes d'exposition *in vitro*

Une étape cruciale de l'étude fut de mettre en place du dispositif d'exposition utilisant la
795 même source que Remedee one et adapté à la culture *in vitro*.

I- Système « Remedee »

La société REMEDEE Labs nous a alors fourni un dispositif d'émission à 61 GHz à placer en incubateur (Figure CH3-1). Pour plus de facilité, ce dispositif adapté à la culture cellulaire est
800 appelé « dispositif REMEDEE ». Ce module est composé d'un générateur produisant des ondes électromagnétiques qui sont ensuite émises au moyen d'une antenne cornet pyramidale. Le dispositif est placé dans un incubateur Memmert UN55 afin de garder une température constante compatible avec la culture cellulaire. La température de 33,8°C a été sélectionnée puisqu'elle correspond à la température de surface de la peau [Tortora et al. 2000]. La
805 difficulté amenée par ce système d'exposition est de garder un environnement de culture cellulaire adéquate (température, humidité, pH) tout en ayant une exposition maximale et homogène. L'incubateur ne pouvant pas être hermétique à cause du passage du guide d'onde, ne permet pas l'injection de CO₂. De ce fait, le milieu de culture des cellules est changé par un milieu d'exposition afin de garder le pH adéquat. Ce milieu d'exposition est constitué de
810 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium ; 4,5 g / L de glucose) supplémenté de SVF (8%), d'antibiotique (1%) et de l'acide 4-(2-hydroxyethyl) -1- piperazine ethane sulfonique (HEPES). 2 mL et 250 µL de milieu d'exposition sont ajoutés pour une plaques 6-puits ou 96-puits respectivement (sauf exception pour éviter des phénomènes de dilution de la molécule étudiée). Les plaques de cellules (6- et 96-puits) sont alors placées à 1 cm au-dessus de
815 l'antenne. Les cellules adhérentes sont exposées par le dessous de la plaque pour éviter une absorption par le milieu de culture qui est riche en molécules d'eau. Il est à noter que le système Remedee est fait de tel sorte que seuls les puits F6-F7, G6-G7 de la plaque 96-puits et 1 puits de la plaque 6-puits sont irradiés. Le temps d'exposition peut se régler par tranche de 30 minutes avec ce système. De ce fait, seul un temps d'exposition maximal de 1h à été
820 choisi pour ce modèle.

La différence majeure avec le dispositif Remedee one sous forme de bracelet est l'antenne émettrice, pyramidale ou planaire. Dans les deux cas, on reste dans une configuration en champ proche avec les mêmes paramètres de sortie : 61 GHz, 12,8 mW/cm². La dosimétrie a

825 été effectuée pour le bracelet, montrant une densité de puissance absorbée moyenne par l'échantillon de $12,8 \text{ mW/cm}^2$. La dosimétrie pour le dispositif de culture cellulaire a été calculée par la société de façon purement théorique. De ce fait, afin de confirmer les résultats utilisés avec le dispositif REMEDEE, les expérimentations ont aussi été reproduites avec un dispositif venant de l'IETR dont la dosimétrie a été réalisée, contrôlée et publiée [Zhadabov et al. 2008].

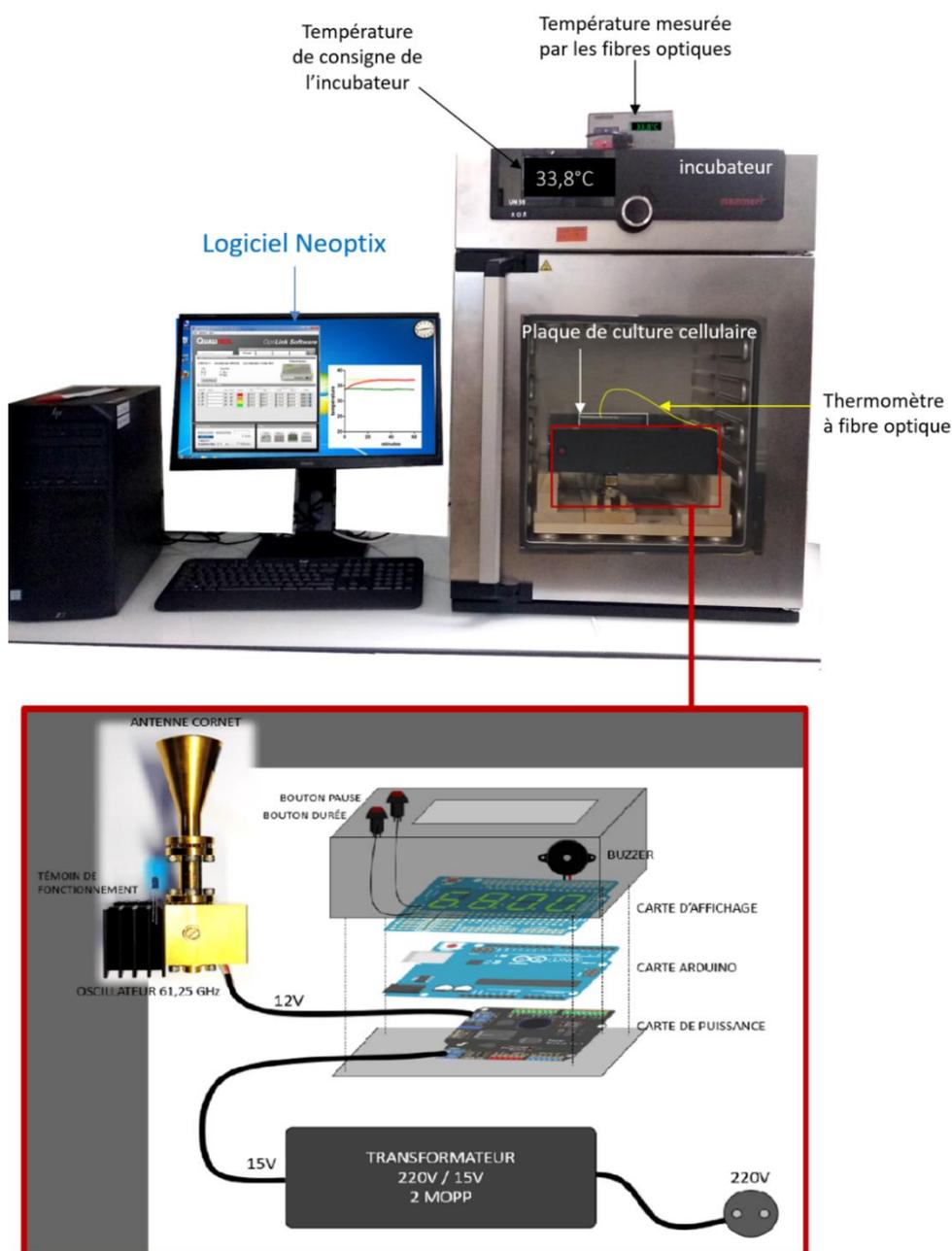


Figure CH31-1 : Système d'exposition adapté à la culture cellulaire envoyé par REMEDEE Labs, appelé « dispositif REMEDEE ». L'antenne en cornet pyramidale permet l'émission des OMM à 61,25 GHz. Ce dispositif est placé dans un incubateur dont la température de consigne est réglée à 33,8°C. La température est contrôlée durant chaque manipulation grâce à des fibres optiques reliées au logiciel Neoptix, placées dans les puits de culture.

835

II- Système « IETR »

Le champ électromagnétique du dispositif « IETR » (Figure CH3-2) est généré par un
840 générateur OMM ((QuinStar Technology, Torrance, CA) à une fréquence de 60,4 GHz. Le signal
est amplifié et envoyé grâce à un cornet pyramidal à guide d'onde rectangulaire (WR15). La
puissance incidente moyenne absorbée, appelé IPD_{eq} par l'échantillon en champ lointain est
de 15 mW/cm^2 . Cette donnée a été calculé en tenant compte de la réflexion du au plastique
des plaques de culture [Haas et al. 2016]. L'ensemble est placé dans un incubateur MEMMERT
845 UNE 400 (Memmert, Schwabach, Germany) tapissé de plaques absorbantes (ECCOSORB AN,
Emerson & Coming) sur les parois afin d'éviter tout phénomène de réflexion.

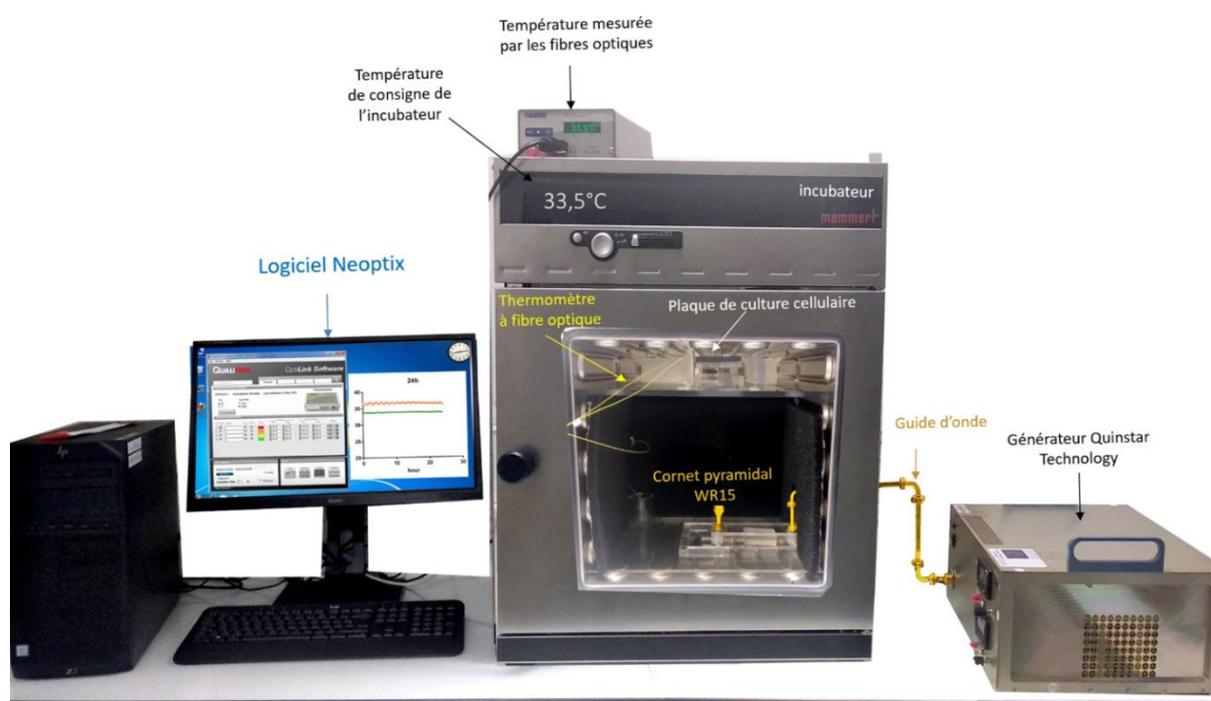


Figure CH3-2 : système d'exposition de IETR placé dans un incubateur en champ lointain

850 L'antenne en cornet pyramidal (WR15) permet l'émission des OMM à 60,4 GHz grâce au générateur QuinStar Technology, conduit par un guide d'onde. Le dispositif est placé dans un incubateur dont la température de consigne est réglée à 33,5°C. La température est contrôlée durant chaque manipulation grâce à des fibres optiques reliées au logiciel Neoptix, placées dans les puits de culture.

Le système « IETR » permet à la fois de confirmer les résultats obtenus avec le dispositif
855 REMEDEE, mais aussi de se placer dans un cas de puissance incidente un peu plus importante permettant de valider *a fortiori* les résultats obtenus à des niveaux inférieurs sur l'innocuité. Le système de l'IETR permet en outre d'exposer une plus grande quantité de cellules, parfois

même une flasque 75 cm² entière, nécessaire pour certaines expériences. Enfin, avec ce système, nous pouvons changer le temps d'exposition de 1h à 24h pour se placer dans des conditions d'utilisation extrême. On peut alors étudier l'impact des OMM à temps court (1h) et à temps long (24h).

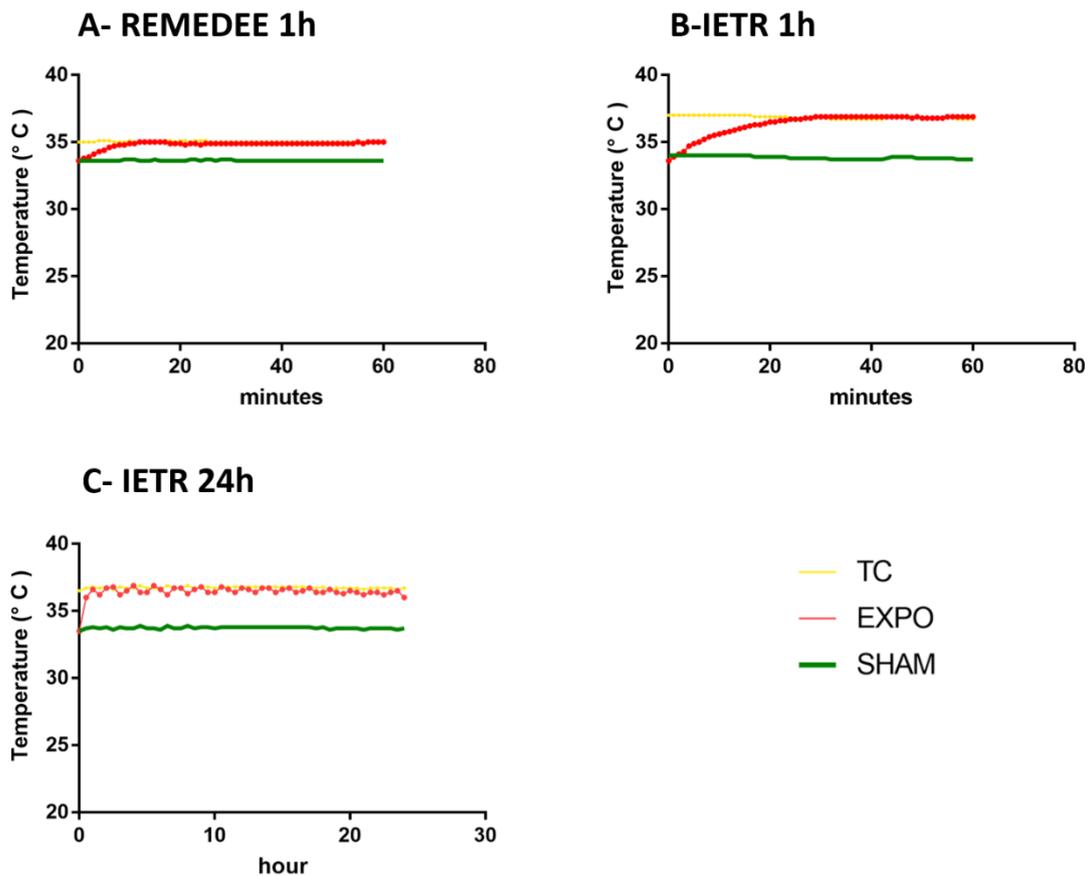
Les paramètres d'exposition du dispositif REMEDEE et IETR sont récapitulés dans le **Tableau CH3-1**.

Tableau CH3-1 : Récapitulatif des paramètres pour les expositions *in vitro* utilisées pour le dispositif REMEDEE et le dispositif IETR. IPD correspond à la densité de puissance incidente émise par le dispositif. IPD_{éq} (IPD_{équivalent}) correspond à la densité de puissance incidente absorbée par les cellules, en tenant compte de la réflexion du au plastique des plaques de culture.

Dispositif	REMEDEE	IETR
Durée d'exposition	1h	1h et 24h
Fréquences (GHz)	61	60,4
IPD (mW/cm ²)	12,8	/
IPD _{EQ} (mW/cm ²)		15
Champ	Proche	Lointain

III- Effet thermique dû à l'exposition

L'utilisation des OMM à 15 mW/cm² induit des effets thermiques non négligeables. En effet, le bracelet Remedee one chauffe lors de son utilisation. Cette augmentation de température, même si elle est non douloureuse, pourrait entraîner une réponse thermique au niveau des cellules. Afin de pouvoir déterminer ce différentiel thermique, des mesures de températures ont été réalisées grâce à des fibres optiques (neoptix) introduites dans les puits de cellules (Figure CH3-1 et CH3-2).



885

Figure CH3-3 : Courbes de températures après exposition aux OMM dans les cellules HaCaT

Courbes de température réalisées avec le dispositif de REMEDEE pendant 1h (A), avec le dispositif de l'IETR pendant 1h (B) et 24h(C) sur des cellules HaCaT exposées (EXPO), non exposées (SHAM) et sous contrôle thermique (TC).

890 A) Avec le dispositif REMEDEE, la température sous SHAM est de 33,8°C et monte jusqu'à 35°C sous EXPO avec un différentiel de température (Δt) de 1,2°C +/- 0,3°C (moyenne des réplicats biologiques +/- écart type des réplicats biologiques, N=4). La température du contrôle thermique (TC) est de 35°C

895 B-C) Avec le dispositif de l'IETR, la température sous SHAM est de 33,5°C et monte jusqu'à 36,9°C sous EXPO avec un différentiel de température (Δt) de 3,4°C +/- 0,4°C (moyenne des réplicats biologiques +/- écart type, N=4). La température du contrôle thermique (TC) est de 36,9°C.

Concernant le dispositif REMEDEE, une augmentation de température $\Delta T^{\circ C}_{remedee} = 1,2 +/- 0,3^{\circ C}$ (moyenne réalisée sur quatre expériences indépendantes) a été enregistrée entre les cellules non exposées et exposées allant de 33,8°C à 35°C respectivement (Figure CH3-3 A).

900 En effet, La majeure partie de l'énergie des OMM absorbée par la peau est convertie en chaleur. Il est donc difficile de dissocier les effets thermiques et électromagnétiques purs. Pour pouvoir les différencier, se basant sur ce $\Delta T^{\circ C}_{remedee}$, nous avons généré des contrôles thermiques (TC). Les cellules sont soumises à la même température que sous exposition, en

augmentant la température de consigne de l'incubateur (35°C), mais sans allumer le
905 générateur d'onde. Ce TC nous permet alors d'étudier uniquement les effets thermiques, sans
la composante électromagnétique.

Les mêmes expériences ont été réalisées avec le dispositif de l'IETR pour 1h et 24h
d'exposition (Figure CH3-3 BC). Le différentiel de température $\Delta T^{\circ}C_{IETR} = 3,4 \pm 0,4^{\circ}C$ passant
de 33,5°C à 36,9°C. La différence de $\Delta T^{\circ}C$ entre le dispositif REMEDEE et IETR s'explique par
910 plusieurs critères. Les IPD diffèrent entre les deux systèmes d'exposition, en moyenne
12,8 mW/cm² et 15 mW/cm² pour le système de REMEDEE et le système de l'IETR
respectivement. La dosimétrie effectuée avec le système IETR donne des valeurs en IPD_{éq},
c'est-à-dire que la réflexion dû aux plaques de culture a été prise en compte. La puissance a
été estimée au niveau de l'échantillon biologique, ici la monocouche cellulaire [Haas et al.
915 2016]. De plus, le dispositif REMEDEE est en champ proche alors que celui de l'IETR est en
champ lointain. Ce champ lointain permet d'obtenir un champ électromagnétique plus
homogène et réparti. Ainsi en champ proche, il est plus compliqué de faire la dosimétrie car
le champ électromagnétique n'est pas stable et homogène. Les différences de température
entre le dispositif REMEDEE et IETR sont notées dans le Tableau CH3-2.

920

Tableau CH3-2 : Analyse de l'effet thermique dû à l'exposition

Récapitulatif des températures pour les cellules exposées (EXPO), non exposées (SHAM) et sous
contrôle thermique (TC) pour le dispositif REMEDEE et IETR (moyenne +/- écart-type, N=4)

Température (°C)	Remedee	IETR
SHAM	33,8 (+/- 0,13°C)	33,5 (+/- 0,15)
EXPO	35 (+/- 0,26°C)	36,9 (+/- 0,4)
Δt	1,2 (+/- 0,31°C)	3,4 (+/- 0,26°C)
Contrôle thermique (TC)	35 (+/- 0,09°C)	36,9 (+/- 0,11)

IV- Analyse des conditions d'exposition

925 1. Stress thermique

Les écarts de température dus à l'exposition des cellules ne sont pas négligeables. Bien que l'on reste dans des conditions physiologiques, un changement de température de l'environnement pourrait créer un stress thermique dans les cellules ou dans les organismes
930 étudiés. Des échauffements significatifs ($> 0,1^{\circ}\text{C}$) peuvent apparaître dès $1 \text{ mW}/\text{cm}^2$ à 60 GHz [Zhadobov et al. 2011]. A des puissances très fortes, l'élévation locale de la température peut conduire à des brûlures [35 GHz, $75 \text{ W}/\text{cm}^2$ -Frei et al. 1995, 95GHz-Debouzy et al. 2007]. Les protéines, macromolécules les plus sensibles aux changements de température, risquent de perdre leurs conformations et d'être dénaturées. Pour répondre à ce stress thermique, la
935 cellule exprime des protéines cyto-protectrices telles que les protéines de choc thermique (HSP). Ce sont des protéines chaperonnes qui vont prendre en charge les protéines mal configurées, empêchant ainsi leur accumulation pouvant mener à l'apoptose. Elles sont classées en fonction de leur masse moléculaire. Deux protéines clefs sont souvent analysées : Heat Shock Protein 70 (HSP70) et Heat Shock Protein 27 (HSP27). HSP70 joue de nombreux
940 rôles essentiels à la survie cellulaire et au maintien d'une fonction cellulaire normale. C'est aussi une foldase qui aide les protéines à retrouver une conformation correcte empêchant ainsi l'accumulation de protéines mal conformées. En cas d'échec, une co-chaperonne amène la protéine mal configurée au protéasome ou aux lysosomes pour y être dégradée [Mayer et Bukau, 1998]. HSP27 va prévenir l'agrégation de ces protéines altérées et interagit avec des
945 facteurs pro-apoptotiques intrinsèques pour retarder l'apoptose. La non prise en charge des protéines mal configurées peut entraîner un choc protéotoxique délétère dans la cellule.

Quelques études se sont intéressées à l'impact de l'élévation de la température *in vitro*, dû aux puissances des OMM proche de celles utilisées en thérapie. En 2003, dans des
950 kératinocytes HaCaT, Szabo et son équipe [Szabo et al. 2003] ont mesuré une augmentation de la température sous exposition ($+ 1,6^{\circ}\text{C}$), sans pour autant mettre en évidence d'augmentation de la protéine HSP70 à $20 \text{ mW}/\text{cm}^2$ à 61,2 GHz. *A contrario*, ils ont trouvé une

augmentation en réalisant un contrôle où les cellules ont été exposées à forte puissance (225 mW/cm²), confirmant ainsi que plus la puissance incidente est un paramètre à ne pas négliger. Plus la puissance est importante, plus la température augmente, pouvant induire un stress thermique. Toujours dans des cellules HaCaT, une étude a montré que HSP70 n'était pas activée pour des fréquences de 60 GHz, à 1 mW/cm² [Zhadobov et al. 2009]. Il semblerait que les OMM à des niveaux de puissances ne générant pas d'élévation de la température élevée, n'induisent pas de stress protéotoxique [Nicolas Nicolaz et al. 2009, Le Quement et al. 2012].

L'induction transcriptionnelle de HSP70 et HSP27 sous exposition a tout d'abord été analysée par RT-PCR dans des cellules HaCaT. Avec le système REMEDEE, aucune différence n'a été mise en évidence entre les cellules non exposées (SHAM) ou exposées (EXPO) (Figure CH3-4 AE). De même le contrôle thermique (TC) n'a pas montré d'augmentation de l'induction de HSP70 ou HSP27 ; contrairement au contrôle positif (Heat shock 43°C- HS 43°C) où les cellules ont été soumises à une température de 43°C pendant 2h, température connue pour induire un choc thermique (Figure CH3-4 DH, test non paramétrique Mann Whitney, HS43°_{HSP70}(Pvalue)=0,004 ; HS43°_{HSP27}(pvalue)= 0,028 ; NS : non significatif). L'exposition par le système de REMEDEE ne semble pas induire la transcription des protéines chaperonnes HSP70 et HSP27. En effet, la température reste dans des conditions physiologiques, ne dépassant pas 37°C sous exposition. Son augmentation ne semble pas suffisante pour générer l'apparition de protéines dénaturées et nécessiter l'expression de protéines chaperonnes.

Les mêmes expériences ont été réalisées avec le dispositif de l'IETR pour 1h (Figure CH3-4 BD) et 24h (Figure CH3-4 CG). De même, aucun choc thermique n'a été mis en évidence sous exposition.

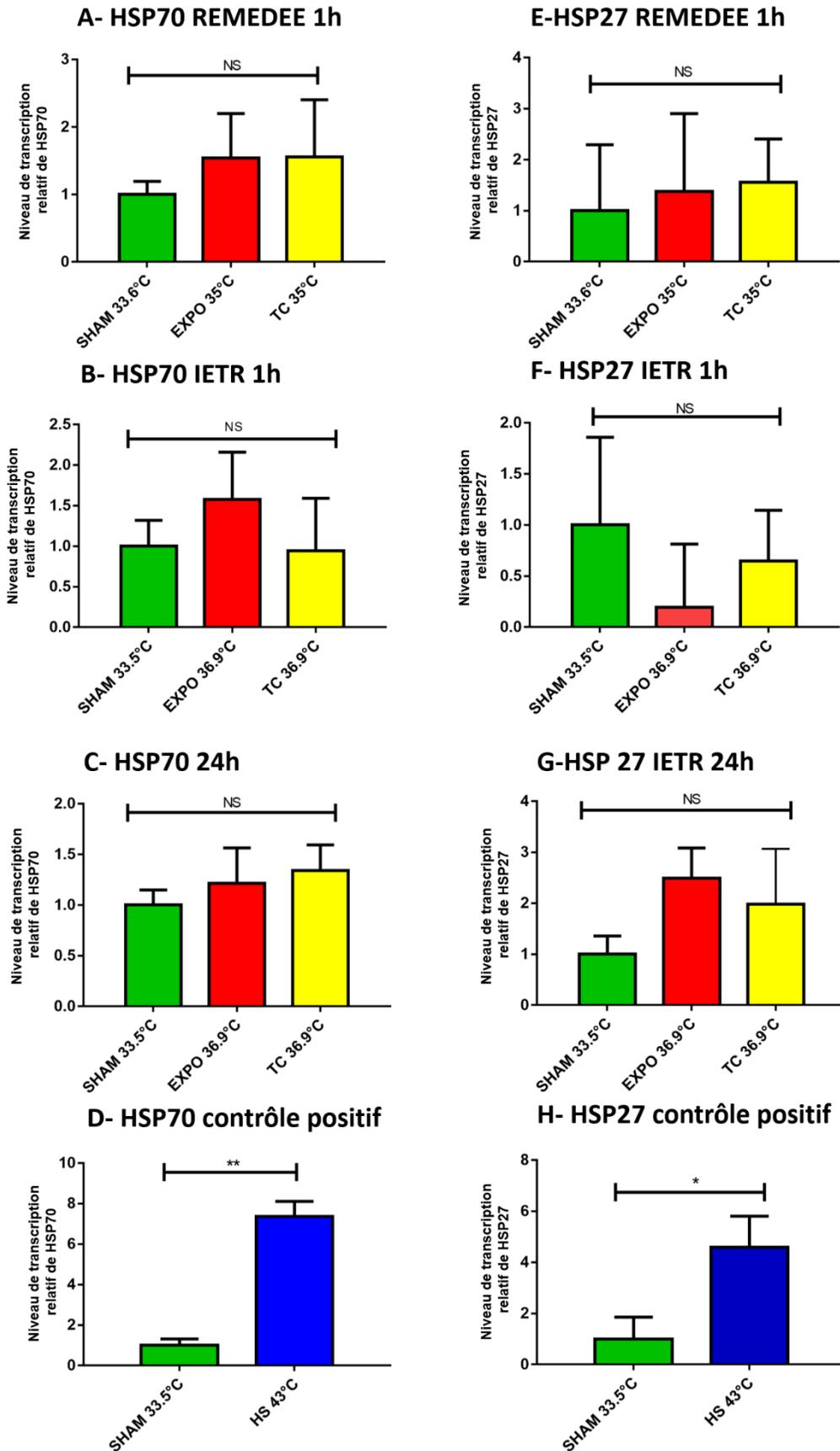
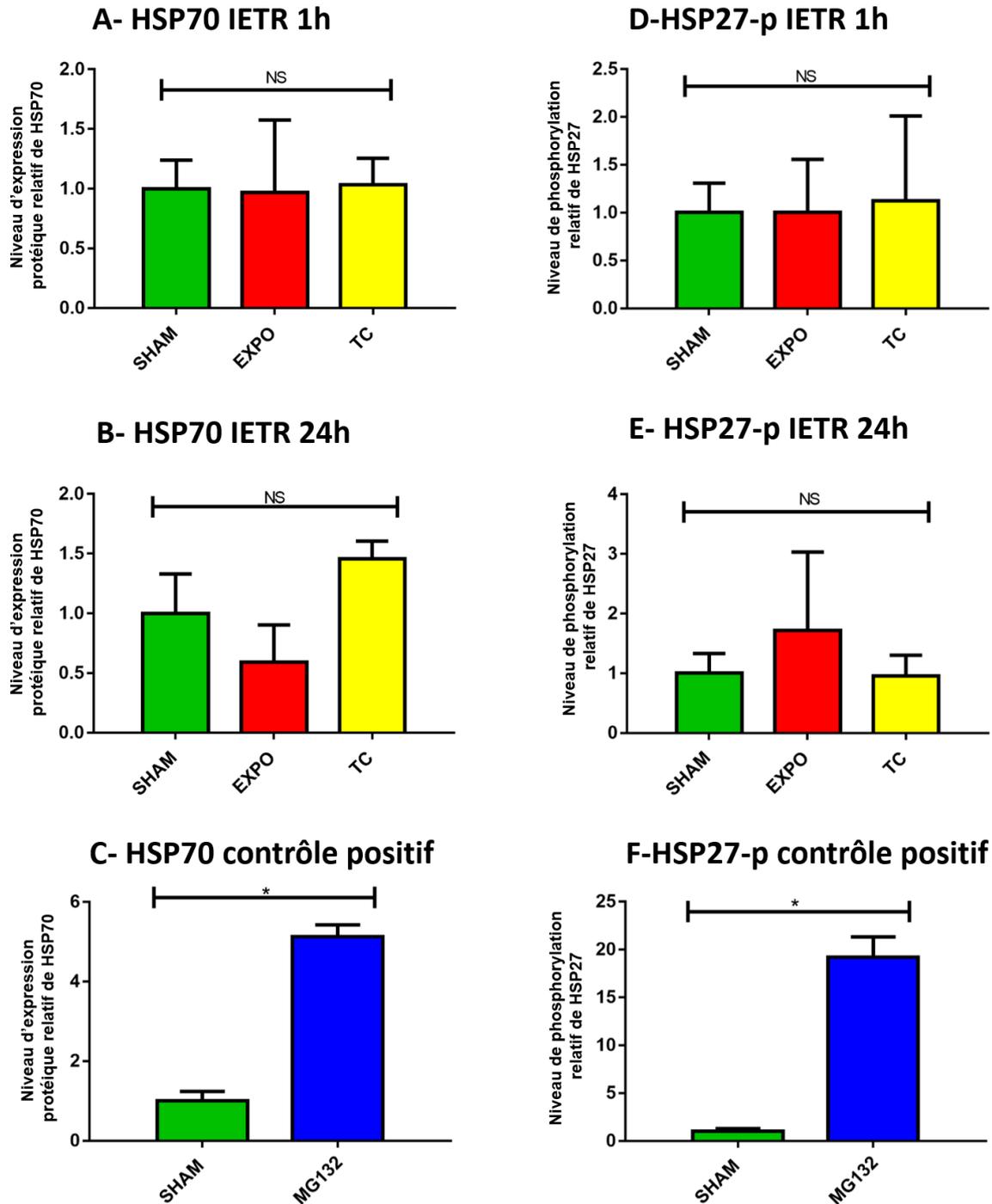


Figure CH3-4 : Réponse transcriptomique au stress thermique de HSP70 et HSP27 après exposition aux OMM dans les cellules HaCaT

980 Niveau d'induction d'ARN de HSP70 (**panel de gauche**) et de HSP27 (**panel de droite**) dans des cellules HaCaT analysées par RT-qPCR après exposition aux OMM (EXPO) ou non (SHAM) ou sous contrôle thermique (TC) avec le dispositif de REMEDEE pendant 1h (**AE**) de IETR pendant 1h (**B,F**) et 24h (**CG**). En tant que contrôle technique, les cellules ont été exposées pendant 2h à 43°C (HS 43°C, **DH**), température connue pour induire un choc thermique. Les histogrammes présentent le $2^{-\Delta\Delta Ct}$ mesurés par rapport au SHAM selon la méthode (Livak et Schmittgen, 2001), +/- l'écart type des réplicats biologiques, N=8. Les tests non paramétriques Mann Whitney avec correction de Bonferroni ont été utilisés (*<0,05, **<0.005 ; NS : non significatif).

Pour confirmer ces résultats, le niveau protéique de HSP70 et de HSP27 phosphorylé après exposition a été analysé. Ces analyses ont été faites par immunofluorescence en exposant des plaques de 96-puits entières dans le cadre de notre étude. L'exposition d'une plaque entière n'étant pas possible avec le système de REMEDEE, cette expérience a été uniquement réalisée avec le système IETR. Après 1h, aucune augmentation de la concentration en protéine HSP70 n'a été observée entre SHAM, EXPO et TC (**test de Mann Whitney, NS : non significatif, Figure CH3-5 A**). Cependant, la synthèse d'une protéine est un processus multi-étapes finement régulé qui demande du temps. De ce fait, ce n'est pas surprenant de ne pas voir d'expression différentielle d'une protéine après 1h00. Il est probable qu'au bout d'un temps relativement court, la transcription et la traduction de HSP70 n'aient pas encore abouti. Cependant, au bout de 24h, on ne met pas en évidence une différence d'expression de la protéine HSP70 entre les cellules exposées ou non exposées (**test de Mann Whitney, NS : non significatif, Figure CH3-5 B**). MG132, un inhibiteur du protéasome, a été utilisé comme contrôle positif pour valider l'approche immunofluorescence sur la même plaque (**test de Mann Whitney, $MG132_{HSP70}(pvalue)=0,028$, Figure CH3-5 C**). Par la suite la phosphorylation de HSP27 a été étudiée. En cas de choc thermique ou de stress protéotoxique, HSP27 est phosphorylée dans les 15 minutes [Olsen et al. 2006]. Aucune différence dans la phosphorylation d'HSP27 que ce soit pour 1h ou 24h d'exposition n'a été observée (**test de Mann Whitney, NS : non significatif, Figure CH3-5 DE**). Cependant, le traitement par MG132 induit une augmentation significative de la phosphorylation de HSP27 validant ainsi notre protocole (**test de Mann Whitney, $MG132_{HSP27p}(pvalue)=0,028$, Figure CH3-5 F**).



1010

Figure CH3-5 : Expression des protéines HSP70 et HSP27-phosphorylée après exposition aux OMM dans les cellules HaCaT

1015

Niveau d'induction de de HSP70 (panel de gauche) et HSP27-phosphorylé (HSP27-p, panel de droite) dans des cellules HaCaT analysées par immunofluorescence après exposition aux OMM (EXPO) ou non (SHAM) ou sous contrôle thermique (TC) avec le dispositif de IETR pendant 1h (AD) et 24h (BE). MG132 à 1mM pendant 4h a été utilisé comme contrôle positif (CF). Les histogrammes présentent le ratio de l'intensité de fluorescence de HSP70 et HSP27-p dans les différentes conditions par rapport au SHAM, +/- l'écart type des réplicats biologiques, N=4. Les tests non paramétriques Mann Whitney ont été utilisés (*<0,05, **<0,005 ; NS : non significatif).

1020

Dans les conditions expérimentales utilisées, l'utilisation du dispositif REMEDEE ou IETR, à 1 ou 24h, n'entraîne pas de stress thermique chez les cellules HaCaT. De ce fait, le dispositif ne semble pas dénaturer les protéines et n'induit alors pas d'effet protéotoxique.

1025

2. Intégrité cellulaire

1030

Les données générées par le « Cellomics » lors des immunofluorescences permettent d'analyser la prolifération et l'intégrité des cellules après exposition. L'impact des ondes millimétriques sur la prolifération cellulaire est très controversé. Dans des modèles de cellules tumorales humaines, plusieurs équipes observent une diminution de la prolifération [Beneduci et al. 2005, Radziewsk et al. 2004, Chidichimo et al. 2002], et même des effets pro-apoptotiques [Zhao et al. 2020]. A l'inverse, d'autres équipes montrent que les OMM ne semblent pas avoir d'impact sur la prolifération cellulaire [Zhadobov et al. 2009, Szabo et al. 2003, Tableau CH3-3]. Il semblerait que l'effet de prolifération dépendrait du modèle utilisé et serait anti-prolifératif dans les cellules cancéreuses. C'est l'hypothèse que soutient Chidichimo et son équipe (2002). Il était de ce fait indispensable de vérifier l'impact du cycle cellulaire avec nos paramètres et notre modèle *in vitro*.

1035

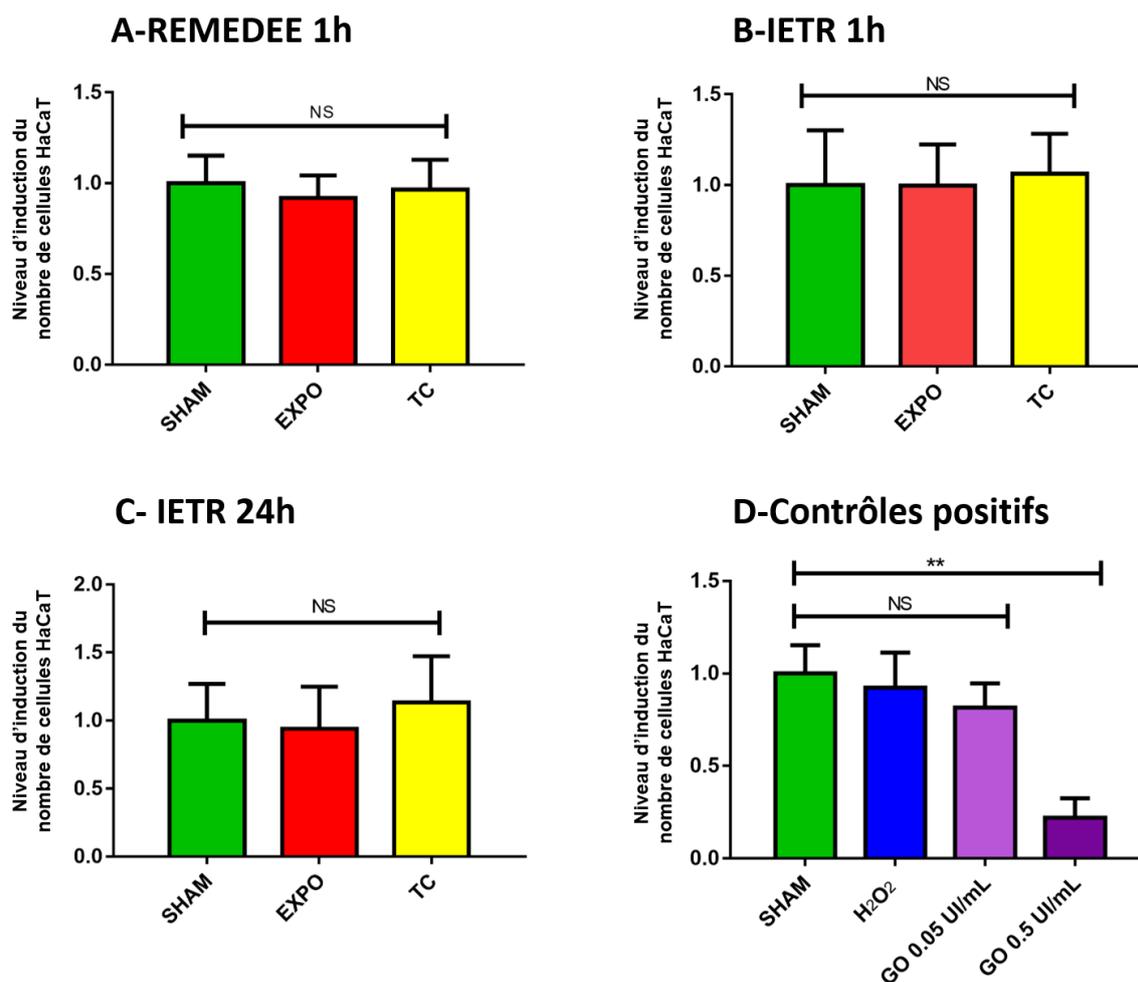
1040

L'analyse des données brutes permet d'obtenir des valeurs pour chaque cellule et d'effectuer un comptage précis. L'exposition aux OMM via le dispositif REMEDEE pendant 1h (Figure CH3-6 A) n'entraîne aucune différence dans le nombre de cellules. L'utilisation du dispositif IETR à 1h ou 24h (Figure CH3-6 BC) n'induit pas non plus de mort cellulaire. Par la même occasion, nous avons vérifié si les traitements effectués en tant que contrôle positifs avaient un impact sur la culture cellulaire. Pour H₂O₂, 0,5 mM pendant 1h, la durée du traitement et sa concentration semblent insuffisantes pour induire une mort cellulaire détectable. Par contre, la glucose oxydase (GO), à 0,5 UI/mL pendant 24h entraîne une diminution drastique (75%) de la détection des cellules, soit par mort cellulaire ou par décollement (Figure CH3-6 D, test non paramétrique Mann Whitney, GO_{0,5UI/mL}(Pvalue)=0,004). Par la suite des expériences, la concentration de GO a été diluée d'un facteur 10 pour atteindre 0,05 UI/mL.

1045

Tableau CH3-3 : Référence bibliographique sur la prolifération cellulaire après expositions aux OMM

1 ^{er} Auteur	Cellules	Fréquence (GHz)	IPD (mW/cm ²)	Effet prolifération
Beneduci 2009	Mélanome humain RPMI 7932	52-78	1	Diminution
Chidichimo 2002	Tumeur mammaire MCF-7 Leucémie myéloïde K562	53,57	7.10 ⁻¹⁸	Diminution Diminution
Radziewsky 2004	Mélanome humain B16 F10	61,22	133	Diminution
Szabo 2003	Kératinocyte HaCaT	60,2	20	Aucun effet
Zhao 2020	Mélanome malin humain A375	35,2	0,16	Diminution
Zhadobov 2009	Kératinocyte HaCaT Lignée d'astrocytome humain U251-MG	60	1	Aucun effet



1050

Figure CH3-6 : Comptage des cellules HaCaT après exposition aux OMM

Niveau d'induction du nombre des cellules HaCaT analysées par immunofluorescence après exposition (EXPO), ou non (SHAM) ou soumis au contrôle thermique (TC) par le dispositif REMEDEE pendant 1h (A), IETR pendant 1h (B) et 24h (C). L'impact du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 0,5mM pendant 2h et la glucose oxydase (GO) à 0,5 UI/ml et 0,05 UI/ml pendant 24h a été déterminé (D). Les histogrammes présentent le ratio de l'intensité de fluorescence du Hoechst dans les différentes conditions par rapport au SHAM, +/- l'écart type des réplicats biologiques, N=4. Les tests non paramétriques Mann Whitney été utilisés (*<0,05, **<0,005 ; NS : non significatif).

1055

1060 Les mêmes expériences ont été réalisées avec les cellules SH-SY5Y (résultats non présentés), ne montrant pas d'impact des OMM sur leur intégrité cellulaire.

Nos résultats montrent clairement que l'exposition n'induit pas d'impact majeur sur nos cultures HaCaT et SH-SY5Y en termes de nombre de cellules

1065

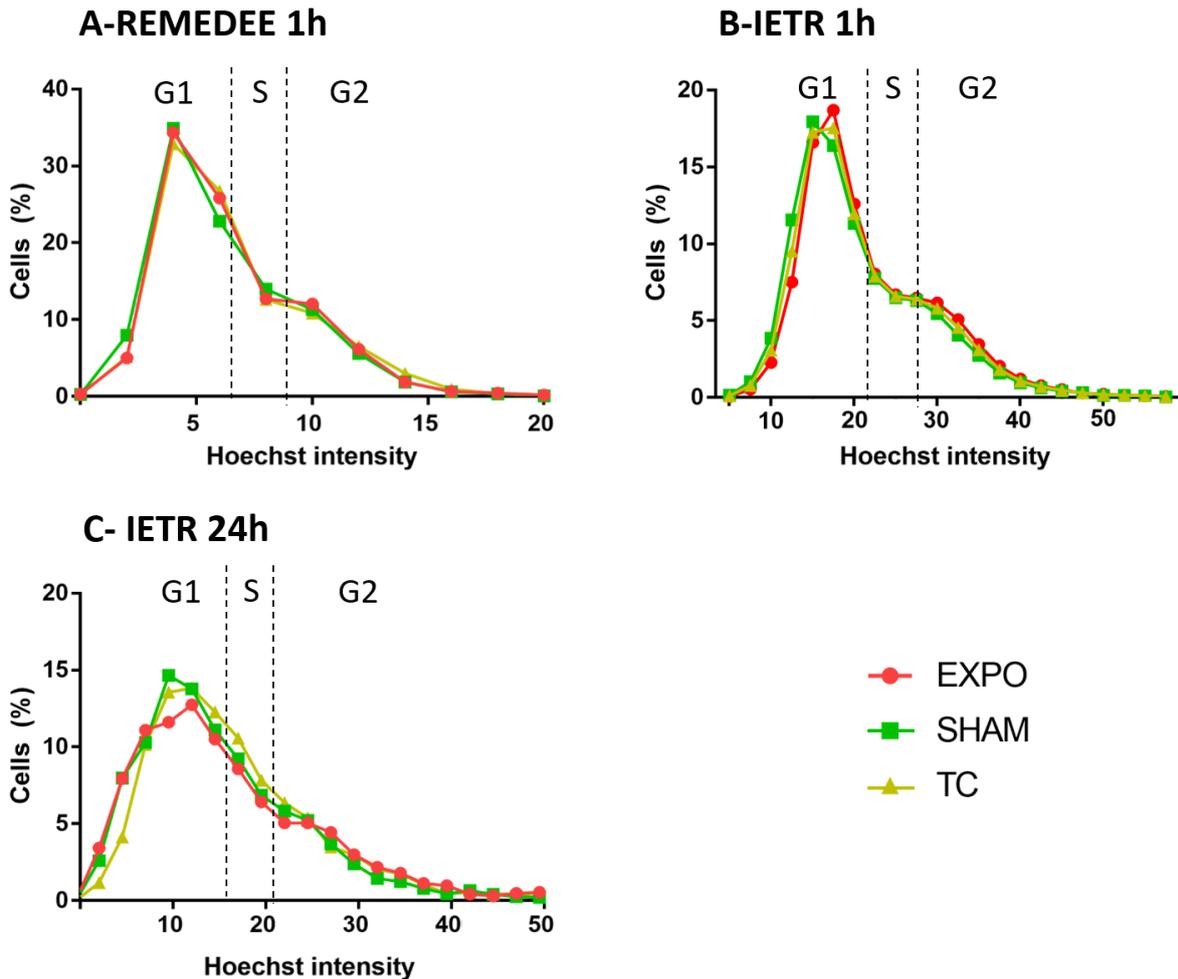


Figure CH3-7 : Phase du cycle cellulaire des HaCaT après exposition aux OMM

Répartition du Hoechst (unités relatives) des cellules HaCaT par immunofluorescence exposées aux OMM (EXPO) ou non (SHAM) ou sous contrôle thermique (TC) avec le dispositif REMEDEE pendant 1h (A), IETR pendant 1h (B) et 24h (C). La fréquence du Hoechst permet de déterminer dans quelle phase du cycle les cellules se trouvent : en phase G1, S ou G2. Les graphes présentent le pourcentage de cellules HaCaT en fonction de l'intensité du Hoechst dans les différentes conditions par rapport au SHAM, +/- l'écart type des réplicats biologiques, N=4.

1070

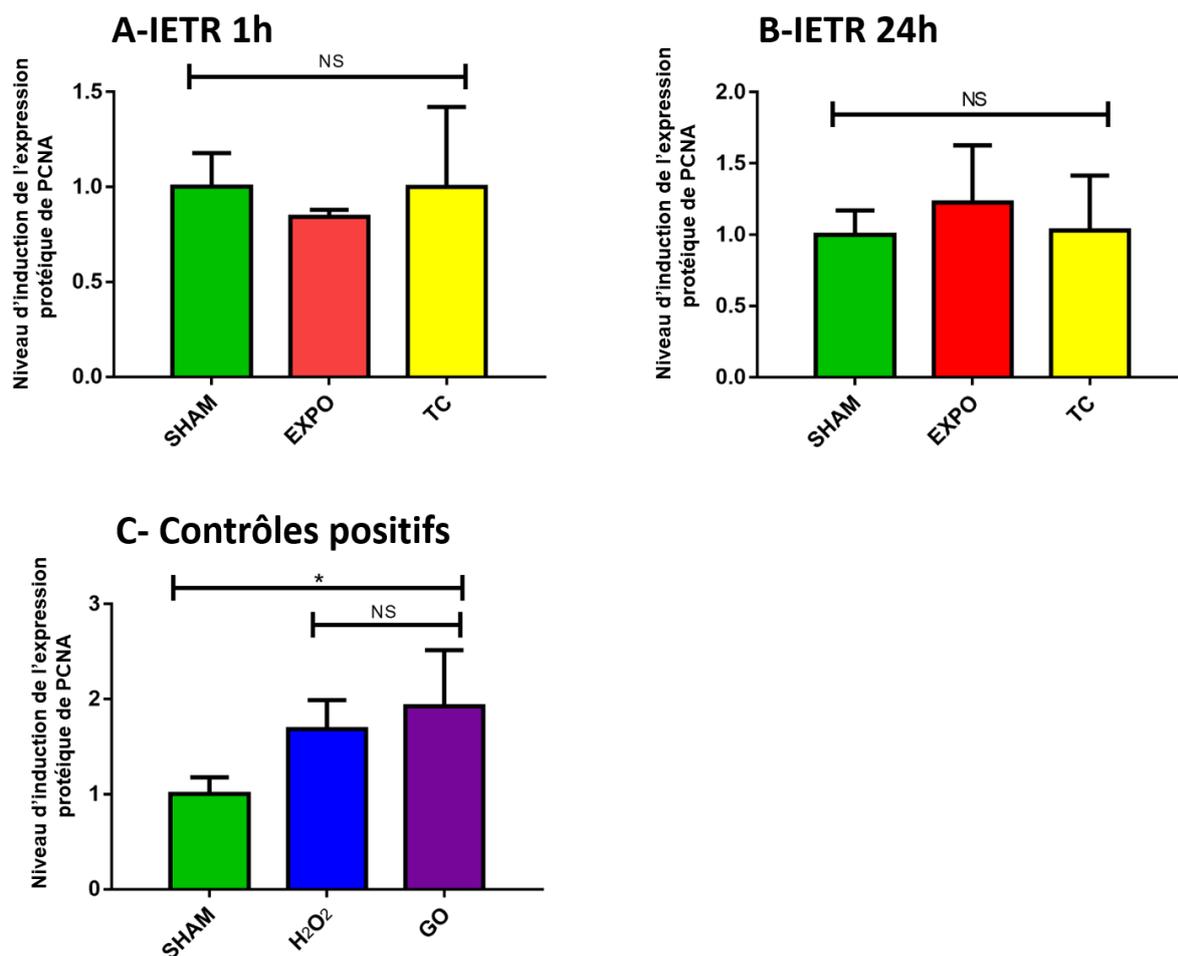
1075

L'analyse du cycle cellulaire après exposition aux OMM a été la prochaine étape. Pour cela, nous avons analysé la répartition du Hoechst après fixation de nos cellules. La fluorescence de Hoechst est directement proportionnelle à la quantité d'ADN cellulaire. Cette caractéristique nous permet alors de déterminer l'étape du cycle cellulaire de chaque cellule.

1080

Après exposition via le système « REMEDEE » pendant 1h (Figure CH3-7 A), aucune différence dans la répartition des cellules en fonction des phases du cycle cellulaire n'a été observée. De même pour IETR à 1h et 24h, les profils entre SHAM, EXPO et TC sont semblables (Figure CH3-

7 BC). Il est cependant à noter que, pour IETR 24h (Figure CH3-7 C), on remarque un étalement des pics dans la répartition du Hoechst plus important. On pourrait penser que les conditions de culture dans l'incubateur, (notamment le milieu d'exposition) peuvent changer légèrement la vitesse du cycle. Cependant, cette modification est indépendante de l'exposition ou de l'effet de température.



1090 Figure CH3-8 : Marquage PCNA (reflet de la prolifération) des cellules HaCaT après expositions aux OMM

1095 Niveau d'induction de PCNA dans des cellules HaCaT analysées par immunofluorescence après exposition aux OMM (EXPO) ou non (SHAM) ou sous contrôle thermique (TC) avec le dispositif IETR pendant 1h (A) ou 24h (B). H₂O₂ (0,5 mM, 1h) et GO (0,05 UI/mL, 24h) ont été utilisés comme contrôles positifs. Les histogrammes présentent le ratio de l'intensité de fluorescence du PCNA dans les différentes conditions par rapport au SHAM, +/- l'écart type des réplicats biologiques, N=4. Les tests non paramétriques Mann Whitney été utilisés (*<0,05 ; NS : non significatif).

Pour confirmer ces résultats, une analyse de la prolifération cellulaire par « Proliferating Cell Nuclear Antigen » PCNA a été effectuée. PCNA est une protéine indispensable à la prolifération cellulaire de par son rôle dans la réplication et la réparation de l'ADN. Elle est présente de façon basale dans la cellule et est exprimée de façon plus importante en phase S. Pour cette expérience, seul le dispositif IETR a été testé. Après exposition endant 1h et 24h (Figure CH3-8 AB), aucune différence de l'expression de PCNA entre SHAM et EXPO ou TC n'a été observée. Pourtant avec les contrôles positifs (H₂O₂ et GO 0,05UI/mL), une augmentation de l'induction de PCNA dans les HaCaT a été enregistré. Cette augmentation de PCNA reflète sans doute l'impact d'un stress réplicatif causé par le stress oxydant qui induit un allongement de la phase S (test non paramétrique Mann Whitney, H₂O₂_{pvalue}=0,019 ; GO_{pvalue}=0,0357).

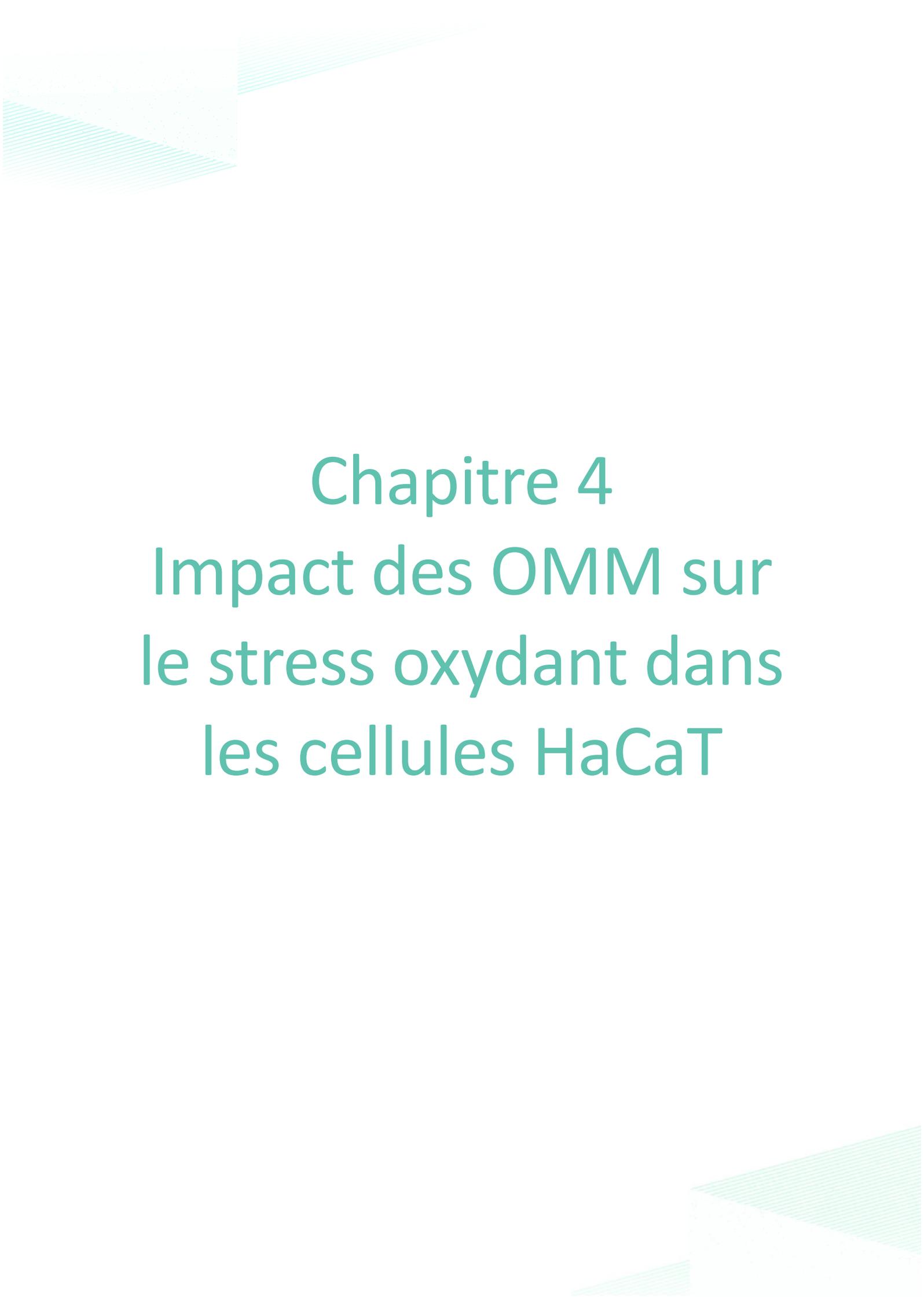
Nos résultats suggèrent que l'exposition n'induit pas de changements de la prolifération cellulaire dans les HaCaT pour 1h ou 24h d'exposition.

V- Conclusion

Les systèmes d'exposition *in vitro*, que ce soit le dispositif REMEDEE ou le dispositif IETR, ont montré des résultats similaires. L'exposition aux ondes millimétriques n'ont pas induit de stress thermique (Figure CH3-4 et CH3-5) ni de bouleversement dans la culture cellulaire notamment au niveau de la mortalité, de la prolifération et du cycle (Figure CH3-6, CH3-7 et CH3-8). Ces observations s'expliquent sans doute par le fait que l'élévation de la température sous exposition est relativement faible (1,2 +/-0,31°C et 3,4 +/- 0,26°C pour les dispositifs REMEDEE et IETR respectivement) et reste dans des conditions physiologiques. Pour autant, des effets plus subtils, notamment un stress oxydant et un stress génotoxique, restent à analyser.

- Beneduci, A. (2009). Evaluation of the Potential In Vitro Antiproliferative Effects of Millimeter Waves at Some Therapeutic Frequencies on RPMI 7932 Human Skin Malignant Melanoma Cells. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 55(1), 25-32. <https://doi.org/10.1007/s12013-009-9053-8>
- Chidichimo, G., Beneduci, A., Nicoletta, M., Critelli, M., De Rose, R., Tkatchenko, Y., Abonante, S., Tripepi, S., & Perrotta, E. (2002). Selective inhibition of tumoral cells growth by low power millimeter waves. *Anticancer Research*, 22(3), 1681-1688.
- Debouzy, J.-C., Crouzier, D., Dabouis, V., Malabiau, R., Bachelet, C., & Perrin, A. (2007). Effets biologiques des rayonnements millimétriques (94 GHz). Quelles conséquences à long terme ? *Pathologie Biologie*, 55(5), 246-255. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2006.02.006>
- Frei, M. R., Ryan, K. L., Berger, R. E., & Jauchem, J. R. (1995). Sustained 35-GHz radiofrequency irradiation induces circulatory failure: *Shock*, 4(4), 289-293. <https://doi.org/10.1097/00024382-199510000-00010>
- Haas, A. J., Le Page, Y., Zhadobov, M., Boriskin, A., Sauleau, R., & Le Dréan, Y. (2016). Impact of 60-GHz millimeter waves on stress and pain-related protein expression in differentiating neuron-like cells : TRPV Expression Under MMW Exposure. *Bioelectromagnetics*, 37(7), 444-454. <https://doi.org/10.1002/bem.21995>
- Le Quément, C., Nicolas Nicolaz, C., Zhadobov, M., Desmots, F., Sauleau, R., Aubry, M., Michel, D., & Le Dréan, Y. (2012). Whole-genome expression analysis in primary human keratinocyte cell cultures exposed to 60 GHz radiation. *Bioelectromagnetics*, 33(2), 147-158. <https://doi.org/10.1002/bem.20693>
- Mayer, M. P., & Bukau, B. (1998). Hsp70 chaperone systems : Diversity of cellular functions and mechanism of action. *Biological Chemistry*, 379(3), 261-268.
- Nicolas Nicolaz, C., Zhadobov, M., Desmots, F., Sauleau, R., Thouroude, D., Michel, D., & Le Drean, Y. (2009). Absence of direct effect of low-power millimeter-wave radiation at 60.4 GHz on endoplasmic reticulum stress. *Cell Biology and Toxicology*, 25(5), 471-478. <https://doi.org/10.1007/s10565-008-9101-y>
- Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnad, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., & Mann, M. (2006). Global, In Vivo, and Site-Specific Phosphorylation Dynamics in Signaling Networks. *Cell*, 127(3), 635-648. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.026>
- Radzievsky, A. A., Gordiienko, O. V., Szabo, I., Alekseev, S. I., & Ziskin, M. C. (2004). Millimeter wave-induced suppression of B16 F10 melanoma growth in mice : Involvement of endogenous opioids. *Bioelectromagnetics*, 25(6), 466-473. <https://doi.org/10.1002/bem.20018>

- Szabo, I., Manning, M. R., Radziewsky, A. A., Wetzel, M. A., Rogers, T. J., & Ziskin, M. C. (2003). Low power millimeter wave irradiation exerts no harmful effect on human keratinocytes in vitro. *Bioelectromagnetics*, 24(3), 165-173. <https://doi.org/10.1002/bem.10077>
- Tortora, G. J. (1994). *Principes d'anatomie et de physiologie*. De Boeck.
- Zhadobov, M., Chahat, N., Sauleau, R., Le Quement, C., & Le Drean, Y. (2011). Millimeter-wave interactions with the human body : State of knowledge and recent advances. *International Journal of Microwave and Wireless Technologies*, 3(2), 237-247. <https://doi.org/10.1017/S1759078711000122>
- Zhadobov, M., Nicolaz, C. N., Sauleau, R., Desmots, F., Thouroude, D., Michel, D., & Le Drean, Y. (2009). Evaluation of the Potential Biological Effects of the 60-GHz Millimeter Waves Upon Human Cells. *IEEE Transactions on Antennas and Propagation*, 57(10), 2949-2956. <https://doi.org/10.1109/TAP.2009.2029308>
- Zhadobov, M., Sauleau, R., Le Dréan, Y., Alekseev, S., & Ziskin, M. C. (2008). Numerical and Experimental Millimeter-Wave Dosimetry for In Vitro Experiments. *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques*, 56(12, Part 1), 2998-3007. <https://doi.org/10.1109/TMTT.2008.2006797>
- Zhao, R., Liu, Y., Liu, S., Luo, T., Zhong, G. Y., Liu, A., Zeng, Q., & Xin, S. X. (2020). Apoptosis-Promoting Effects on A375 Human Melanoma Cells Induced by Exposure to 35.2-GHz Millimeter Wave. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 19, 153303382093413. <https://doi.org/10.1177/1533033820934131>



Chapitre 4

Impact des OMM sur le stress oxydant dans les cellules HaCaT

Le chapitre 3 est consacré à l'étude de l'innocuité du dispositif Remedee labs *In vitro* sur les cellules HaCaT. L'un des principaux griefs concernant les ondes radiofréquences en général est leur potentiel oxydant, qui pourrait expliquer l'effet cancérigène suspecté des ondes. Le stress oxydant est également impliqué dans de nombreuses maladies, telles que le cancer, le diabète ou les syndromes neurodégénératifs [Favier, 2003]. Il est de ce fait important de savoir si les ondes millimétriques, aux paramètres utilisés par le dispositif Remedee one, sont susceptibles d'entraîner un stress oxydant important. De ce fait, dans un premier temps, le stress oxydant et ses conséquences cellulaires seront décrits, suivi d'un état de l'art de la littérature concernant les OMM sur le stress oxydant. Les résultats de cette présente étude seront ensuite présentés et discutés.

I- Le Stress oxydant

Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour *Reactive Oxygen Species* en anglais) et la capacité du système biologique à éliminer les intermédiaires réactifs [Delattre et al. 2005]. Les espèces réactives de l'oxygène sont constamment produites en situation physiologique au sein de l'organisme et entraînent inévitablement certains dégâts au sein de la cellule. Néanmoins, ces sous-produits du métabolisme peuvent également jouer un rôle de second messager et participer à la signalisation cellulaire [Valko et al. 2007].

Les principales ROS sont :

- Les dérivés radicalaires de l'oxygène tels que le radical superoxyde $O_2^{\circ-}$ et le radical hydroxyle OH° . Ce sont des espèces chimiques possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche de valence, les rendant chimiquement instables et très réactifs.
- Les dérivés non radicalaires tel que le peroxyde d'hydrogène H_2O_2

Dans les conditions physiologiques, leur production est aigue et transitoire et ils sont rapidement pris en charge par le système antioxydant. La régulation entre la production de

ROS et l'élimination des ROS se fait en permanence, en constante dynamique. Cependant, par certains mécanismes physio-pathologiques (inflammation, activité sportive...) ou certains facteurs environnementaux (tabac, alcool, médicament, rayons gamma ou ultra-violets...), un déséquilibre peut apparaître, soit parce que la cellule fait face à une surproduction d'espèces chimiques réactives, soit une perte d'efficacité quand le système de détoxification est submergé, ou encore par une association de ces deux phénomènes. Une concentration excessive et répétée des ROS dans le temps engendre un stress oxydant chronique (Figure CH4-1, Dröge et al. 2002 ; Halliwell et al. 1991). Ce stress est impliqué dans de nombreuses maladies telles que l'athérosclérose, le cancer, le diabète ainsi que des désordres neurologiques comme les maladies de Parkinson et d'Alzheimer [Favier, 2003].

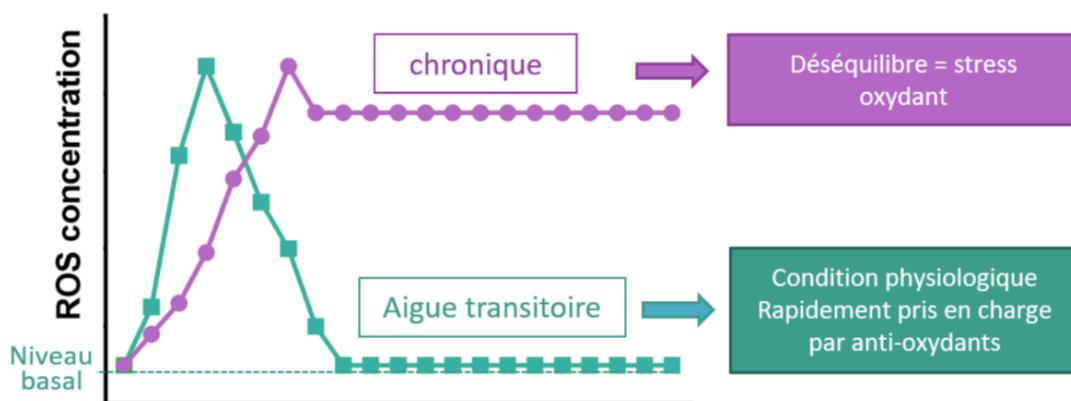


Figure CH4-1 : Production des ROS, entre rôle physiologique et stress oxydant

1. Source intracellulaire

Bien que les ROS puissent être générés dans divers compartiments subcellulaires tels que les membranes cellulaires, les lysosomes, les peroxysomes et le réticulum, seule la mitochondrie, productrice de 90% des ROS cellulaires sera décrite dans cet exposé [Balaban et al. 2005]. Les mitochondries sont des organites présents dans le cytoplasme des cellules eucaryotes (sauf très rares exceptions). Elles comportent 2 membranes, externe et interne, qui délimitent 3 compartiments : le milieu extra-mitochondrial, l'espace inter-membranaire et la matrice mitochondriale. Elles possèdent leur propre ADN (ADNmt), sous forme circulaire double-brin (db) [Anderson et al. 1981]. Les mitochondries produisent la majeure partie de l'énergie de

la cellule sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) grâce à la phosphorylation oxydative, aussi appelée « respiration cellulaire ». Lors de ce processus, les coenzymes nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et flavine adénine dinucléotide (FADH₂), obtenus par le cycle de Krebs ou la β-oxydation sont utilisés par la mitochondrie. Leur oxydation via le complexe I (NADH-ubiquinone oxydoréductase) et II (succinate déshydrogénase) de la chaîne respiratoire permet la formation d'un gradient électrochimique de proton H⁺. Ce dernier est consommé par l'ATP synthase permettant la phosphorylation de l'ADP (Adénosine DiPhosphate) et de phosphate inorganique (Pi) en ATP (Figure CH4-2, Mitchell, 1978).

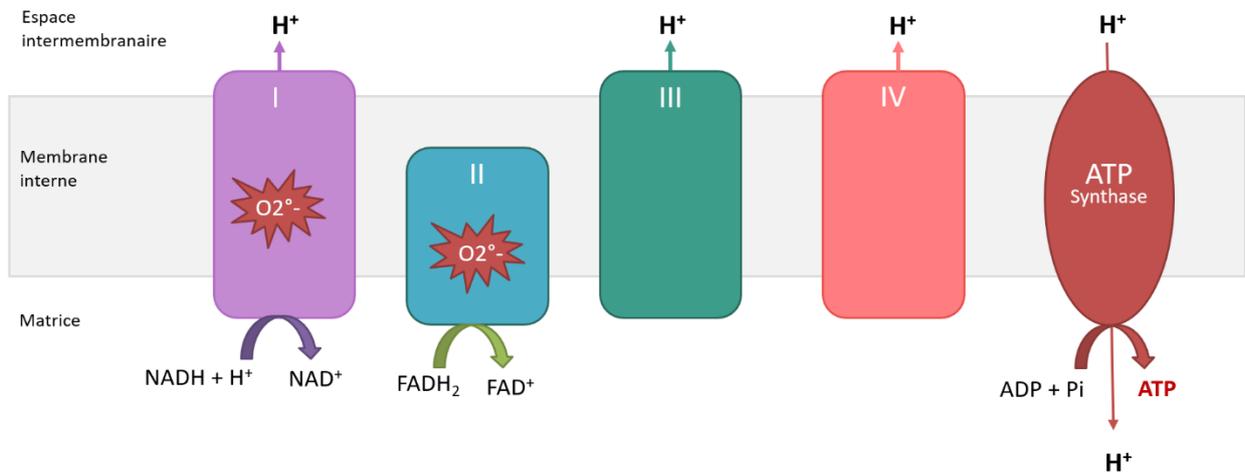
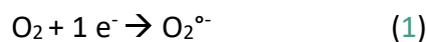


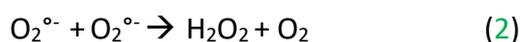
Figure CH4-2 : Phosphorylation oxydative de la mitochondrie

Les coenzymes NADH et FADH₂ obtenu via le cycle de Krebs et la β-oxydation sont réduits au niveau du complexe I (NADH-ubiquinone oxydoréductase) et II (succinate déshydrogénase) respectivement. Le transfert de leur électron e⁻ s'effectue du complexe III (ubiquinol cytochrome-c réductase) au complexe IV (cytochrome-c oxydase) jusqu'à l'accepteur final. Ce flux d'électrons est associé à un transfert actif de protons H⁺ de la matrice vers l'espace intermembranaire formant un gradient de protons essentiel à la phosphorylation de l'ADP en ATP grâce à l'ATP synthase.

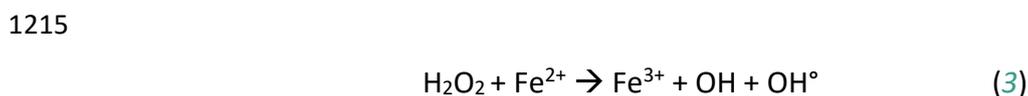
Les électrons e⁻ des coenzymes réduits circulent du complexe I vers le complexe IV (cytochrome-c oxydase) en passant par le complexe III (ubiquinol cytochrome-c réductase). Le radical superoxyde est produit à partir des complexes I et III, par l'ajout d'un électron au dioxygène O₂ (réaction 1).



1205 $O_2^{\circ-}$ est considéré comme le ROS « primaire ». On estime que, dans la chaîne respiratoire mitochondriale, environ 0,2 % de l'oxygène consommé n'est pas transformé en eau mais en anions superoxydes. La dismutation du superoxyde entraîne l'apparition du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (*réaction 2*), molécule moins toxique pour la cellule.



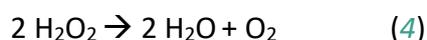
1210 L' H_2O_2 est ensuite catalysé en radical hydroxyle OH° , en particulier en présence de Fer (Fe^{2+}), selon la réaction de Fenton ([Fenton 1894](#), *réaction 3*). De par sa demi-vie très courte (10^{-9} secondes), OH° réagit à proximité de son site de formation.



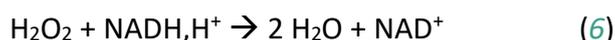
1220 Les ROS sont des sous-produits naturels du métabolisme normal de l'oxygène. Cet équilibre extrêmement dynamique, en perpétuelle évolution, est alors très compliqué à observer puisque le passage de l'état normal à pathologique est rapidement pris en charge par la cellule. Cette dynamique introduit une contrainte temporelle délicate pour l'observation du stress oxydant dû aux machineries cellulaires qui tendent toujours à retrouver l'équilibre originel.

1225 2. Défenses cellulaires

Pour maintenir les ROS à un niveau non cytotoxique, la cellule possède des substances appelées antioxydants ([Figure CH4-3](#), [Halliwell et al. 1991](#)). Parmi les antioxydants enzymatiques, la catalase (Cat) permet la dismutation de H_2O_2 en $H_2O + O_2$ [[Valko et al. 2007](#)]
1230 selon la réaction (*réaction 4*) :

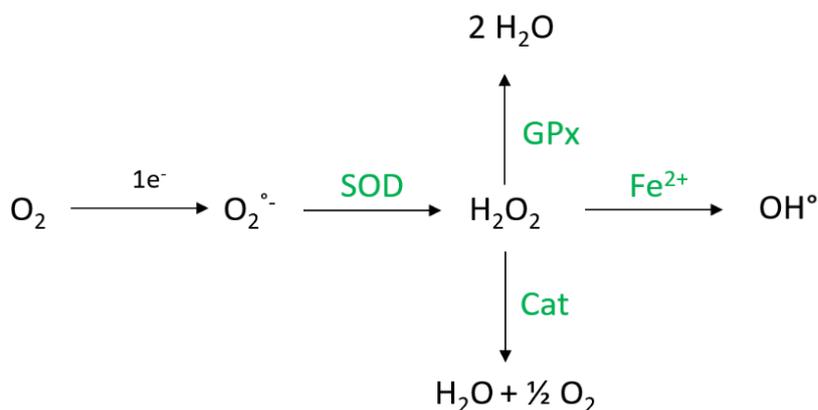


1235 Les métalo-enzymes appelées Superoxydes dismutases (SOD) en synergie avec la glutathion peroxydase (GPx), permettent la dismutation des anions superoxyde $O_2^{\circ-}$ en oxygène O_2 et peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (*réaction 5*) puis en H_2O (*réaction 6*, Zelko et al. 2002) :



1240 D'autres systèmes non enzymatiques, apportés par l'alimentation, permettent le maintien des ROS à un niveau basal. Il s'agit d'oligoéléments (cuivre, zinc, manganèse, sélénium et fer), l'ubiquinone ou encore les vitamines E et C. Ainsi, en conditions physiologiques, les ROS sont éliminées au fur et à mesure qu'elles sont produites. Elles ont de ce fait une demi-vie très courte. Cependant, les défenses anti-oxydantes peuvent être dépassées par une défaillance

1245 de ces systèmes ou une surproduction de ROS, induisant ainsi un déséquilibre entre la production et l'élimination des ROS. Les ROS vont alors s'accumuler dans la cellule et conduire à un stress oxydant.



1250 **Figure CH4-3 : Intermédiaires réduits de l'oxygène et enzymes antioxydantes** (illustration personnelle)
 Le gain d'un électron du dioxygène (O_2) entraîne l'apparition du radical superoxyde ($O_2^{\circ-}$). Ce dernier va être pris en charge par la superoxyde dismutase (SOD) entraînant l'apparition du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . La catalase (Cat) et la glutathion peroxydase permettent la dismutation de H_2O_2 en H_2O tandis que le fer ferreux (Fe^{2+}) le réduit en radical hydroxyle OH° .

1255

3. Cibles biologiques

Du fait de leur haute réactivité, les ROS peuvent attaquer plusieurs cibles biologiques (Figure CH4-4) tels que l'ADN [Beckman et Ames 1998], les lipides [Girotti et al. 1998] ou encore les protéines [Berlett et Stadtman, 1997]. De ce fait, l'analyse de ces dérivés oxydés est un bon indicateur du stress oxydant.

1260

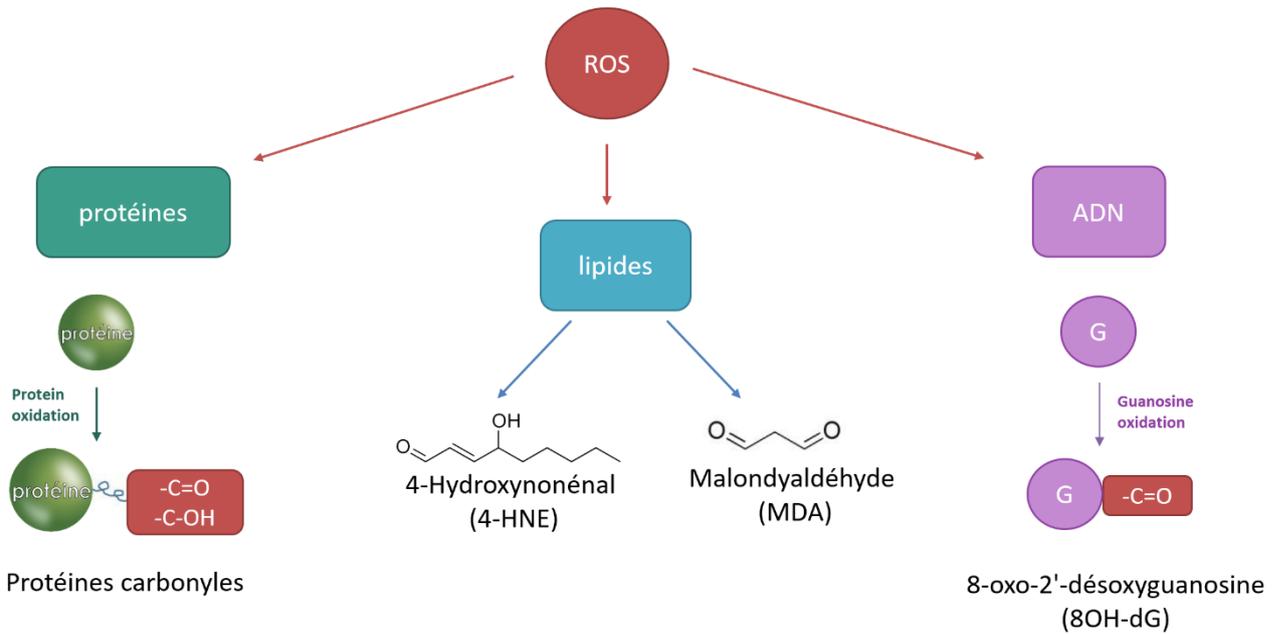


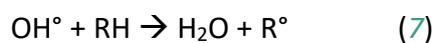
Figure CH4-4 : Les différentes cibles cellulaires des espèces réactives de l'oxygène (ROS)

3.1. Lipopéroxydation

1265

Les lipides membranaires, riches en acides gras polyinsaturés sont les lipides les plus sensibles aux ROS [Pamplona et al. 2000]. Le radical hydroxyle OH° attaque l'acide gras (R) en retirant un atome d'hydrogène H⁺ provenant d'un groupement méthylène (-CH₂-) pour former un lipide radicalaire R° (réaction 7).

1270



Le lipide radicalaire (R°) réagit avec l'oxygène moléculaire (O_2) formant ainsi un radical peroxyde (ROO° , *réaction 8*).

1275



Ce dernier, très instable, attaque les chaînes lipidiques adjacentes (RH) afin de former un hydroxyperoxyde ($ROOH$) et un nouveau radical lipidique (R°) ce qui amplifie la lipopéroxydation (Lacraz et al. 2009, *réaction 9*).

1280



Les hydroperoxydes ($ROOH$), toxiques et réactifs, sont dotés d'activités de seconds messagers dans la régulation de certaines fonctions métaboliques, de l'expression de gènes et de la prolifération cellulaire [Delattre et al. 2005]. De plus, leurs modifications structurales entraînent une désorganisation membranaire, changeant sa composition et modifiant sa fluidité, sa perméabilité et son excitabilité [Valko et al. 2007]. Enfin, deux radicaux peroxydes (ROO°) peuvent se combiner pour former un composé intermédiaire tetroxyde ($ROOOOR$) instable qui sera décomposé pour former des produits non radicalaires (*réaction 10*).

1285

1290



Les sous-produits non radicalaires formés durant ces réactions sont principalement des aldéhydes : le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonanal (4-HNE), considérés comme les marqueurs de la lipopéroxydation [Esterbauer and Cheeseman, 1990]. Ces molécules sont très réactives et peuvent réagir rapidement avec de nombreux constituants cellulaires, notamment les protéines, générant une grande variété d'adduits. De plus, elles peuvent diffuser dans les différents compartiments de la cellule [Halliwell, 2012].

1295

- 1300 - Le MDA existe sous forme libre ou sous forme liée aux molécules biologiques. Il diffuse facilement jusqu'au noyau cellulaire ou il interagit avec les bases de l'ADN créant des liaisons et des ponts entre les brins d'ADN. Ainsi, un grand nombre d'effets imputés aux ROS sont en réalité dus aux MDA. Il est considéré comme mutagène dans les cellules de mammifères. In vivo, une partie du MDA est sécrété dans les urines (Figure
- 1305 CH4-5, [Siu et al. 1982](#)).
- Le 4-HNE à forte concentration (1-20 μM) dans les cellules peut inhiber la synthèse de l'ADN et des protéines [[Esterbauer et al., 1990](#)]. Il est faiblement mutagène et semble être le principal produit de la peroxydation lipidique. Il est considéré comme l'un des principaux produits toxiques générés par la lipoperoxydation du fait de ses réactions rapides avec les acides aminés ([Hurst et al. 1987](#)).
- 1310

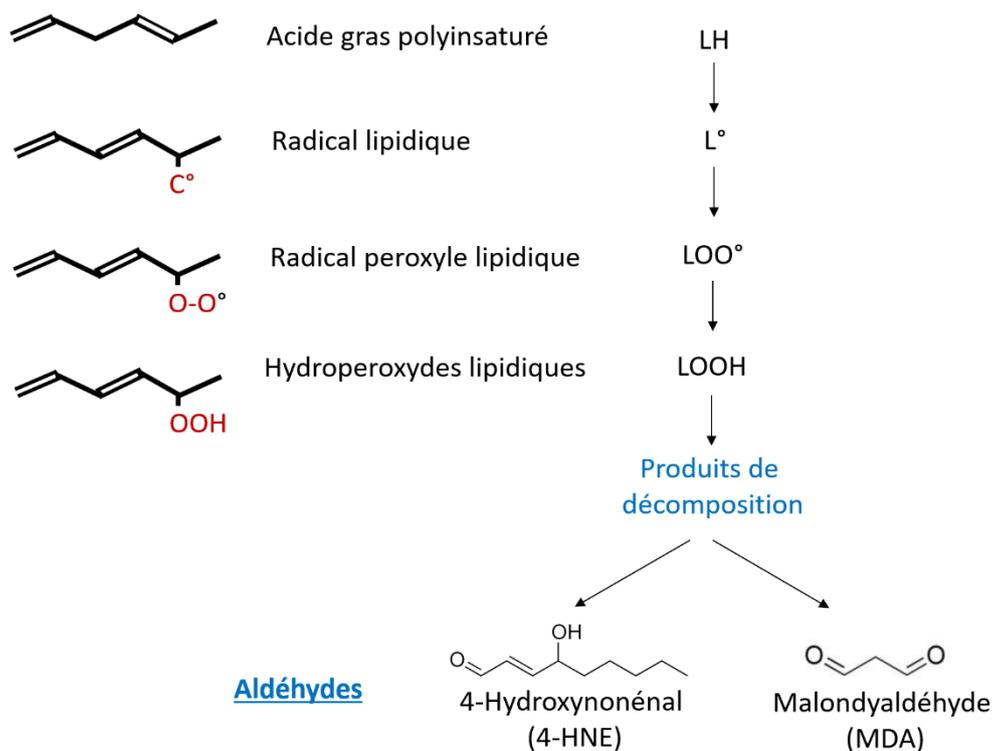


Figure CH4-5 : Formation simplifiée des sous-produits de la lipoperoxydation : les aldéhydes 4-hydroxy-3-nonanal (4-HNE) et le malondialdéhyde (MDA) à partir de lipides (L)

- 1315 Le MDA et le 4-HNE peuvent être réduits en alcools par des aldo-céto réductases ou des alcools déshydrogénases, ou peuvent être oxydés en acides par des aldéhydes déshydrogénases [[Barrera et al. 2015](#)].

3.2. Peroxydation protéique

1320 L'oxydation des protéines est un phénomène complexe qui va dépendre des cibles protéiques
et des réactions d'oxydation. Elle se réalise soit sur le squelette de liaison peptidique, soit sur
la chaîne latérale d'acides aminés. Les oxydations sont généralement classées selon deux
critères :

- Réversibles comme par exemple l'oxydation des groupements thiols (SH) qui, dans les
1325 acides aminés cystéine et méthionine entraîne l'apparition de ponts disulfures
réversibles (S-S, [Favier, 2003](#))
- Non réversibles comme l'addition de groupes carbonylés sur les acides aminés tels que
l'arginine, l'histidine, la proline ou la lysine [[Dalle-Donne et al. 2006](#)]. Ou encore
comme l'ajout de sous-produits réactionnels d'oxydation, notamment ceux issus de la
1330 peroxydation lipidiques [[Lacraz, 2009](#)]. Ces composés sont chimiquement stables et
considérés comme les marqueurs du stress oxydatif.

L'oxydation des protéines affecte à la fois leur fonction, mais aussi leur structure secondaire
et tertiaire. Lorsque ces protéines possèdent une fonction enzymatique, l'oxydation peut
1335 l'inactiver [[Sonntag et al. 1987](#)], entraînant de nombreux dysfonctionnements [[Tissier et al.
2012](#)]. Lorsque l'oxydation de la protéine est irréversible ou dépasse les capacités
antioxydantes de la cellule, elles sont envoyées au protéasome, complexe protéolytique
possédant plusieurs activités peptidases, pour être éliminées [[Hanna et al. 2019](#)]. La protéine
oxydée est reconnue par le protéasome qui l'hydrolyse en acides aminés et petits peptides.

1340

3.3. Dommage à l'ADN

Dans le cas de dommage à l'ADN, c'est plus particulièrement le radical hydroxyle OH° qui entre
en jeu. Il réagit avec les bases en s'additionnant sur les doubles liaisons [[Cadet et al. 1999](#)],
1345 induisant des cassures ou pouvant altérer le système de réparation. L'adduit le plus commun

est l'oxydation de la guanine en 8-oxo-2'-désoxyguanosine (8OH-dG), considéré comme un marqueur du stress oxydant [Beckman et al. 1998]. Les dommages à l'ADN seront approfondis dans le [Chapitre 5 : Impact des OMM sur le stress génotoxique dans les cellules HaCaT.](#)

1350

4. OMM et stress oxydant

Le stress oxydant a fait l'objet de nombreuses études dans le domaine des radiofréquences (RF) en général. Plusieurs rapports ou revues de synthèse très complets se sont intéressés à l'impact des RF sur le stress oxydant [ANSES 2013, Schuermann et al. 2021 ; Mana et al. 2016].

1355

Sans vouloir rentrer dans les détails puisque notre sujet concerne les ondes millimétriques, nous ne pouvons faire l'impasse sur les RF. Dans ces revues, il est souligné que certaines études ne montrent pas d'effet des RF sur le stress oxydant *in vitro* [Campisi et al. 2010 ; Poulletier de Gannes et al. 2012 ; Luukkonen et al. 2010] comme *in vivo* [Khalil et al. 2011], tandis que d'autres montrent une augmentation de la production de ROS ou de leur dégâts *in vitro* [Xu et al. 2010] et *in vivo* [Dasdag et al. 2009, Guler et al. 2010 ; Kesari et al. 2009 ; Ozgur et al. 2010 ; Esmekaya et al. 2011]. Certaines études montrent même un effet bénéfique des RF induisant une diminution de marqueurs du stress oxydant après exposition [Arendash et al. 2010, Dragicevic et al. 2011]. La disparité des résultats entretient le doute empêchant toutes conclusions définitives. Les résultats observés semblent dépendre du modèle utilisé ainsi que du temps d'exposition. Des recherches complémentaires restent à entreprendre. Il était donc indispensable d'investiguer la piste d'un potentiel stress oxydant induit par les ondes millimétriques.

1360

1365

Au sein des OMM, peu d'articles se sont consacrés à l'étude du stress oxydant. De façon à se rapprocher des conditions utilisées en thérapie, l'analyse de la littérature a été effectuée sur des modèles mammaliens exposés à des fréquences comprises entre 30 et 80 GHz. Seuls 7 études se sont consacrées à ce sujet (4 *in vitro* et 3 *in vivo*)

1370

3 études *in vitro* se sont intéressées à l'impact des OMM sur la production de ROS : Ces études ont toutes utilisé des neutrophiles activés issus d'animaux comme modèle :

- 1375 - [Vlasova et son équipe](#) en 2018 ont exposé des neutrophiles activés à 32,9-39,6 GHz, à 10 mW/cm² pendant 5, 15 et 30 minutes. Cette étude se place dans un cadre thérapeutique où le rayonnement millimétrique était soupçonné d'avoir un impact sur le système immunitaire. Les niveaux de production de ROS ont été mesurés par chimiluminescence dépendant du luminol. Ils ont observé une augmentation de l'oxydation du luminol par les ROS (ratio EXPO/SHAM : + 1,36) après 15 minutes
- 1380 d'exposition. Ce résultat n'a pas été retrouvé pour 5 et 30 minutes d'exposition. Cependant, ils concluent que cette augmentation de l'oxydation pourrait être due à un effet de chauffage.
- 1385 - Néanmoins, [Gapeyev](#) et son équipe en 1997, en utilisant la même technique, cette fois-ci à 41,8–42 GHz pour 240 μW/cm² pendant 40 minutes montrent une inhibition de la production de ROS après exposition dans les neutrophiles péritonéaux de souris activés.
- 1390 - Enfin en 2002, [Safrona](#) et son équipe ont utilisé des neutrophiles activés de souris en les exposant (41,95 GHz) pendant 20 minutes à 19,5 μW/cm². Ils n'ont pas observé de différence dans la production de ROS via chimiluminescence.

1390

Ces deux dernières études se classent dans un contexte d'analyse du risque de l'exposition environnementale, ce qui explique leurs très faibles puissances. On peut penser que le temps et la puissance utilisée sont des facteurs clés dans la production de ROS. C'est un phénomène très transitoire et pris en charge très rapidement par les systèmes antioxydants. Puisqu'il est

1395 compliqué d'analyser la production de ROS, d'autres articles se sont intéressés à leurs dégâts au sein des cellules.

1 étude *in vitro* a analysé l'impact des ROS sur les lipides

En 1996, [Logani](#) et son équipe étudient l'effet des OMM sur des liposomes artificiels à 53,6 GHz, 61,2 GHz et 78,2 GHz à des densités de puissance incidente de 10, 1 mW/cm² et 500

1400 mW/cm² respectivement, pendant 30 minutes et 1h. Cependant, ils n'ont montré aucune différence dans la formation de peroxydes lipidiques par rapport aux échantillons non irradiés.

3 études ont été réalisées *in vivo* avec des expositions de faibles puissances en condition semi-chronique

- 1405 - [Poghosyan](#) et son équipe (2017) ont exposé des rats à des fréquences de 42,2 GHz et 50,3 GHz (densité de puissance incidente de 0,06 mW/cm²) pendant 20 min/jour, pendant cinq jours. Ils ont quantifié la teneur en malondialdéhyde (MDA) dans différents organes tels que le cerveau, le foie, le cœur et les muscles squelettiques. Ils n'ont pas montré de différence de la quantité de MDA dans les muscles squelettiques et dans le cœur. Cependant ils ont observé une augmentation, très faible mais
- 1410 significative du taux de MDA pour le cerveau (ratio EXPO/SHAM : +1,16) et le foie (ratio EXPO/SHAM : +1,13).
- 1415 - En 2010, [Kumar](#) et son équipe ont exposé des rats Wistar (âgés de 70 jours) à 50 GHz, à 0,86 μW/cm², 2h/jour pendant 45 jours. Le sang a été récupéré et analysé. Les auteurs ont observé une augmentation significative de la production de ROS (ratio EXPO/SHAM : +1,68) ainsi qu'une augmentation de l'activité de la catalase (Cat - ratio EXPO/SHAM : +1,074) et une diminution de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD - ratio EXPO/SHAM : -1,89) et de la glutathion peroxydase (GPx - ratio EXPO/SHAM : - 2,04) après exposition.
- 1420 - Enfin, en 2009 [kesari](#) et son équipe ont exposé des rats Wistar à 50 GHz, 2h/jour pendant 45 jours à 0,86 μW/cm². Les cerveaux ont été récupérés et homogénéisés. Ils ont noté une diminution de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD - ratio EXPO/SHAM : -1,12) ainsi que de la glutathion peroxydase (GPX- ratio EXPO/SHAM - 1,33) mais une augmentation de l'activité de la catalase (Cat - ratio EXPO/SHAM +1,43) après exposition.
- 1425 Il est à noter que ces deux dernières études proviennent du même groupe. Les différentiels très faibles (par ex +1,074) ainsi que les écarts types déterminés (N=6) sont surprenants.

Tableau CH4-1 : Analyse de la littérature sur le stress oxydant induit par les OMM (NS : non significatif)

Nom 1er auteur	Fréquence (GHz)	IPD (mW/cm ²)	Durée	Modèle	Test	Ratio (EXPO/SHAM)
Gapeyev 1997	41,95	0,240	40 min	<i>In vitro</i> Neutrophiles activés	ROS via chimiluminescence du luminol	Diminution ROS
Kesari & Behari 2009	50	0,00086	2h/j 45 jours	<i>In vivo</i> N=6 Rats Wistar	Enzymes anti-oxydantes	Cerveau entier CAT : +1,43 SOD : -1,12 GPX : -1,33
Kumar 2010	50	0,00086	2h/j - 45 jours Corps entier	<i>In vivo</i> N=6 Rats Wistar	Enzymes anti-oxydantes	Sang ROS : +1,68 CAT +1,074 SOD -1,89 GPX -2,04
Logani 1996	53,6 61,2 78,2	10 1 500	30-60 min	<i>In vitro</i> Liposomes artificiels	Peroxydation lipidique (TBARS)	Pas d'effet
Poghosyan 2017	42,2 50,3	0,06	20 min/j 20 jours	<i>In vivo</i> N=10 rats	Peroxydation lipidique (TBARS)	Foie : +1,13 Cerveau : +1,16 Muscle squelettique, cœur : NS
Safrona 2002	41,95	0,0195	20 min	<i>In vitro</i> Neutrophiles N=35 neutrophiles par animal	ROS via chimiluminescence du luminol	Pas d'effet
Vlasova 2018	33-39	10	5,10 et 30 min	<i>In vitro</i> Neutrophiles activés	ROS via chimiluminescence du luminol	15min : +1,36 5 min et 30 min : pas de différence

1430 La littérature étudiant l'impact des OMM sur le stress oxydant est trop peu fournie pour avoir
des conclusions définitives. Cependant, quelques pistes semblent se dessiner. *In vitro*, le
temps d'exposition, la densité de puissance incidente et le modèle d'étude semblent être des
facteurs capitaux dans la détection d'un stress oxydant. *In vivo*, l'impact des OMM sur le stress
1435 oxydant semble dépendre de l'organe étudié. Cependant, dans tous les cas, les différences
observées restent à des niveaux relativement faibles (ratio EXPO/SHAM inférieur à 2). Ainsi,
avec l'augmentation des applications utilisant les OMM et l'étude du dispositif Remedee one,
il est devenu essentiel d'étudier l'impact des OMM sur le stress oxydant et ses conséquences
sur les cellules directement exposées lors de ces traitements. Le présent travail étudie l'impact
des OMM (60 GHz, 15 mW/cm²) sur un stress oxydant dans les cellules de kératinocytes HaCaT
1440 pendant une durée d'exposition courte (1 h) et longue (24 h). Dans ce contexte, nous avons
d'abord évalué l'augmentation de la production de ROS, puis l'impact des ROS sur les
différentes macromolécules.

II- Résultats

1445 Comme vu précédemment, le code couleur a été conservé durant tout l'exposé avec en
couleur **verte** les cellules HaCaT non exposées « SHAM », en couleur **rouge** les cellules
exposées « EXPO », en **jaune** le contrôle thermique (TC) et en **bleu** ou **violet** les différents
traitements (H₂O₂, GO) permettant de valider l'expérimentation. Durant cette étude, le
contenu de la cellule, c'est-à-dire l'**intracellulaire** a été analysé ainsi que le contenu du milieu
1450 de culture appelé « **extracellulaire** » lorsque l'expérience le permettait.

1. OMM et production de ROS

1.1. Analyse des ROS intracellulaires

1455

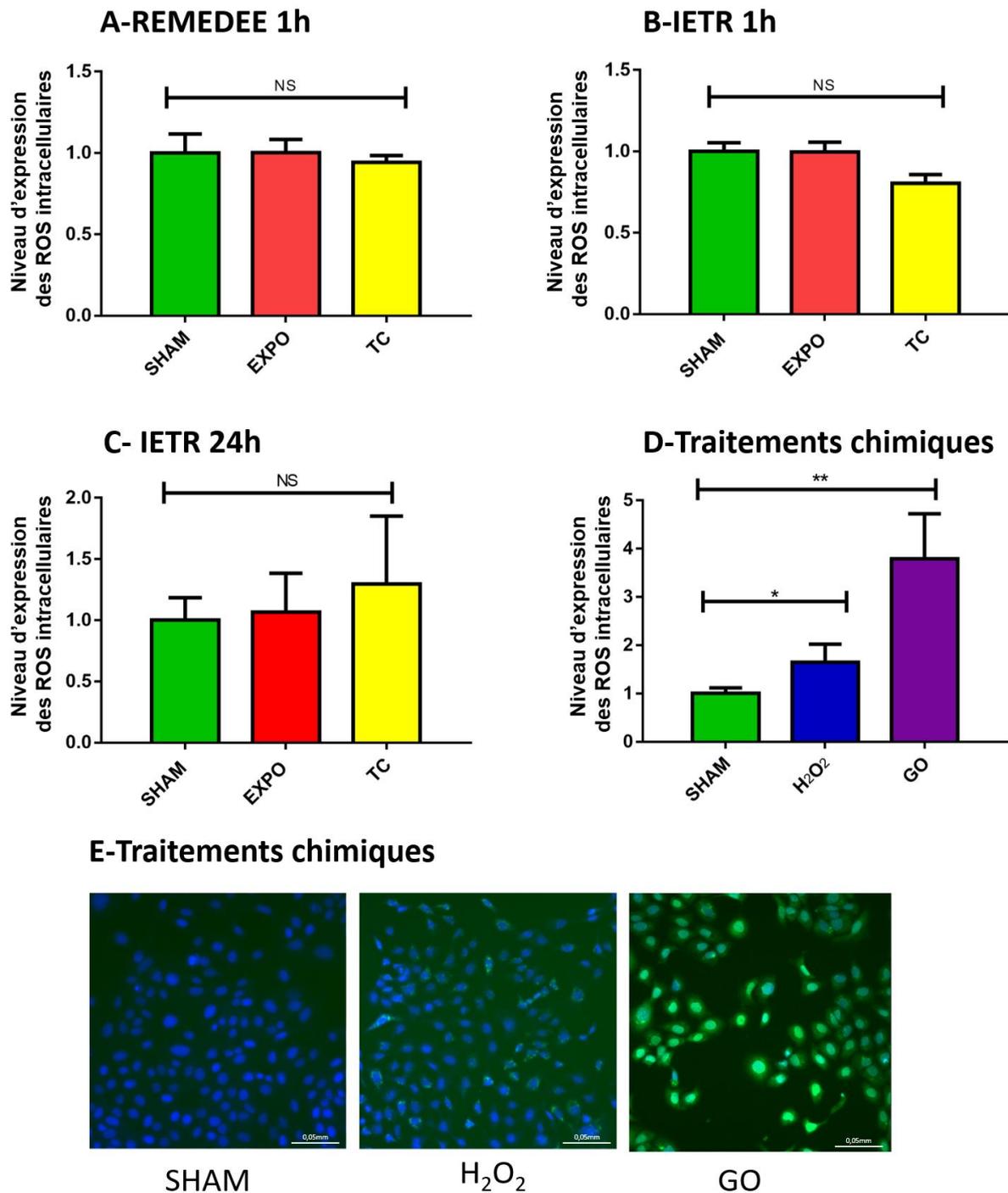
L'exposition des cellules HaCaT, avec le dispositif de REMEDEE pendant 1 heure n'a montré aucune différence statistiquement significative de la production **intracellulaire** de ROS entre SHAM et EXPO. Le contrôle thermique (TC) n'a pas non plus montré de changement (**test de Mann Whitney, EXPO-1h_{pvalue} = 0,59 ; TC-1h_{pvalue} = 0,6 ; Figure CH4-6 A**).

1460

De même, pour 1h et 24h d'exposition, avec le dispositif de l'IETR, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre EXPO, SHAM et le contrôle thermique (TC) (**test de Mann Whitney, EXPO- 1h_{pvalue} = 0,35 ; TC- 1h_{pvalue} = 0,6 ; EXPO- 24h_{pvalue} = 0,96 ; TC- 24h_{pvalue} = 0,17 ; Figure CH4-6 BC**).

1465

Néanmoins, l'utilisation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) pendant 2h à 0,5 mM et de la glucose oxydase (GO) à 0,05 UI/mL pendant 24h montre une nette augmentation des ROS intracellulaires, validant ainsi notre protocole (**test de Mann Whitney, H₂O₂_{pvalue} = 0,028, GO_{pvalue} = 0,003, Figure CH4-6 DE**).



1470 **Figure CH4-6 : Concentration intracellulaire en ROS intracellulaires**

Niveaux d'expression des ROS analysés entre les cellules exposées (EXPO) ou non (SHAM) et le contrôle thermique (TC) avec le dispositif REMEDEE pendant 1h (A) et avec le dispositif IETR pendant 1h (B) et 24h (C). Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 0,5 mM pendant 2h et la glucose oxydase (GO) à 0,05 U/mL pendant 24h ont été utilisés comme contrôles techniques. Les histogrammes représentent le ratio de l'intensité de fluorescence des ROS dans les différentes conditions par rapport au SHAM +/- l'écart type des réplicats biologiques, N=4. Les tests non paramétriques Mann Whitney ont été utilisés (*<0,05 ; **<0,005 ; NS : non significatif)

1475

1480

Ces résultats semblent montrer que les OMM dans ces conditions d'utilisation sur les keratinocytes HaCat n'induisent pas de surproduction de ROS. Cependant, la prise en charge des ROS est un processus très dynamique. Les ROS ont une demi-vie très courte et peuvent être soit rapidement éliminés soit modifiés en réagissant avec d'autres molécules.

1485

De ce fait, la suite de l'étude s'est focalisée sur le peroxyde d'hydrogène H₂O₂, qui possède la demi-vie la plus longue (quelques minutes) et a la capacité de traverser les membranes biologiques [Bienert et al. 2006]. Ce dernier point a permis de s'intéresser à la fois au contenu de la cellule, l'**intracellulaire** mais aussi à l'**extracellulaire**, c'est-à-dire le contenu du milieu de culture.

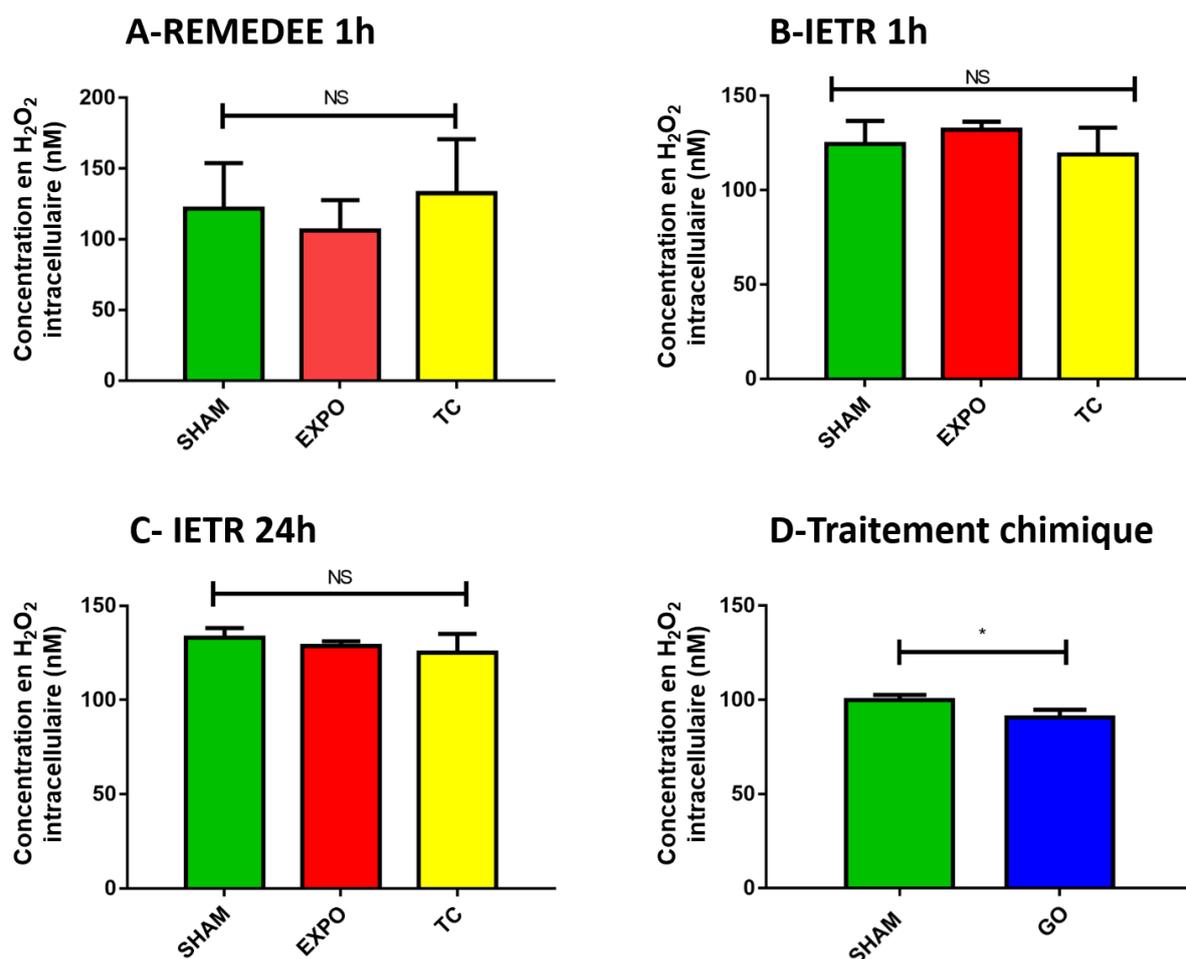
1.2. H₂O₂ intracellulaire et extracellulaire

1490

1495

1500

En **intracellulaire**, avec le système de REMEDEE pendant 1h, aucune différence significative de la concentration de H₂O₂ n'a été observée. L'augmentation de la température (TC) ne semble pas non plus avoir d'impact sur la concentration de H₂O₂ (test non paramétrique Mann Whitney, EXPO-1h_{pvalue}= 0,32 ; TC-1h_{pvalue}= 0,39 ; Figure CH4-7 A). De même pour le système IETR, à 1h (EXPO-1h_{pvalue}= 0,48; TC-1h_{pvalue}= 0,66 ; Figure CH4-7 B) ou à 24h (EXPO-24_{pvalue}= 0,32; TC-24h_{pvalue}= 0,28 ; Figure CH4-7 C), la concentration intracellulaire en H₂O₂ ne varie pas après exposition ou après le contrôle thermique (TC). Cependant, une diminution significative de la concentration intracellulaire de H₂O₂ est observée suite au traitement par GO, à 0,05 U/mL pendant 6h (test non paramétrique Mann Whitney, GO_{pvalue}= 0,028). Cette diminution est intéressante car la GO catalyse la production de l'H₂O₂ par oxydation de glucose en acide gluconique. Une hypothèse possible est que l'accumulation d'H₂O₂ via GO stimule davantage les systèmes de désintoxication de la cellule. Ces systèmes anti-oxydants éliminent alors l'H₂O₂ soit en le dégradant, soit en l'excrétant à l'extérieur de la cellule, d'où une baisse significative de H₂O₂ en **intracellulaire**.



1505

Figure CH4-7 : Concentration intracellulaire en H₂O₂

Concentration intracellulaire de H₂O₂ dosée via le réactif Amplex® Red dans les cellules exposées (EXPO) ou non (SHAM) et le contrôle thermique (TC) avec le dispositif REMEDEE pendant 1h (A) et avec le dispositif IETR pendant 1h (B) et 24h (C). La glucose oxydase (GO) à 0,05 U/mL pendant 6h a été utilisée comme contrôle technique. Les histogrammes représentent la concentration intracellulaire de H₂O₂ en nM dans les différentes conditions par rapport au SHAM +/- l'écart type des réplicats biologiques, N=4. Les tests non paramétriques Mann Whitney ont été utilisés (*<0,05 ; **< 0,005 ; NS : non significatif)

1510

Pour vérifier cette hypothèse, le milieu de culture c'est-à-dire la fraction **extracellulaire** a été analysée. Après traitement par la GO, il existe bien une accumulation de H₂O₂ dans le milieu de culture (environ 2 900 nM en extracellulaire contre 90 nM en intracellulaire soit un facteur X32, test non paramétrique Mann Whitney, GO_{pvalue}= 0,0021, Figure CH4-8 ABC). Il semble que la majeure partie de l'H₂O₂ ait été excrétée ou a diffusée dans le milieu de culture. Cette observation avait déjà été faite par l'équipe de Soares en 2005 qui montre une augmentation de la concentration extracellulaire d'H₂O₂ d'environ 2 500 nM après traitement à la GO à 0,05 UI/mL pendant 30 minutes dans des fibroblastes d'embryons murins [Soares et

1520

al. 2005]. Cependant, concernant les OMM, quel que soit le système d'exposition et quel que soit le temps d'exposition, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre SHAM, EXPO et le contrôle thermique (TC ; test non paramétrique Mann Whitney, $pvalue > 0,05$, Figure CH4-8 ABC).

1525

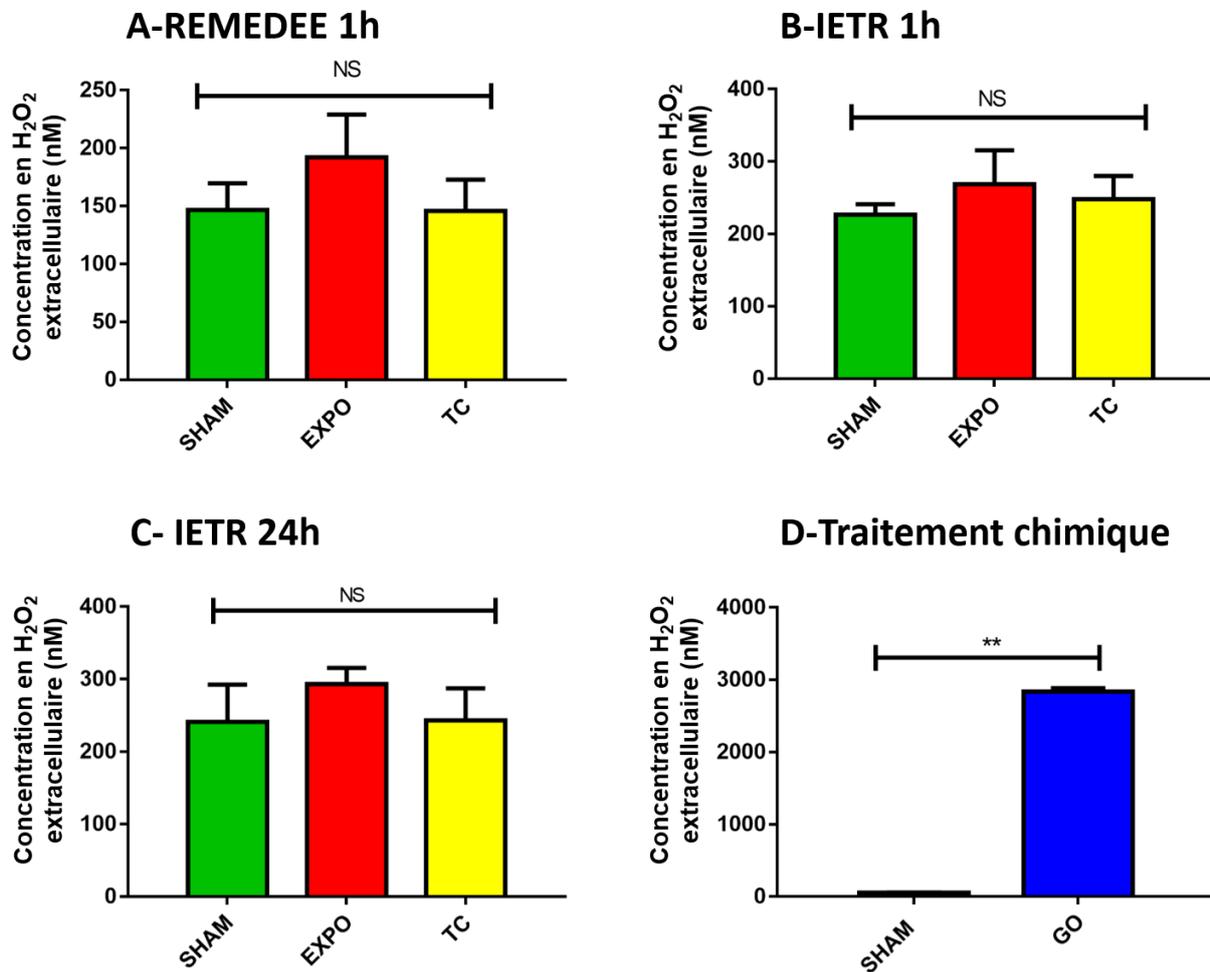


Figure CH4-8 : Concentration extracellulaire en H₂O₂ extracellulaires

Concentration extracellulaire de H₂O₂ dosée via le réactif Amplex® Red entre les cellules exposées (EXPO) ou non (SHAM) et le contrôle thermique (TC) avec le dispositif REMEDEE pendant 1h (A) et avec le dispositif IETR pendant 1h (B) et 24h (C). La glucose oxydase (GO) à 0,05 UI/mL pendant 24h a été utilisée comme contrôle technique. Les histogrammes représentent la concentration extracellulaire de H₂O₂ en nM dans les différentes conditions par rapport au SHAM +/- l'écart type des réplicats biologiques, N=4. Les tests non paramétriques Mann Whitney ont été utilisés (*<0,05 ; **< 0,005 ; NS : non significatif)

1530

1535

Par conséquent, dans ces conditions d'utilisation des OMM, une surproduction de H₂O₂ n'a pas été détectée, suggérant que ces expositions n'ont pas submergé les capacités antioxydantes des kératinocytes HaCaT.

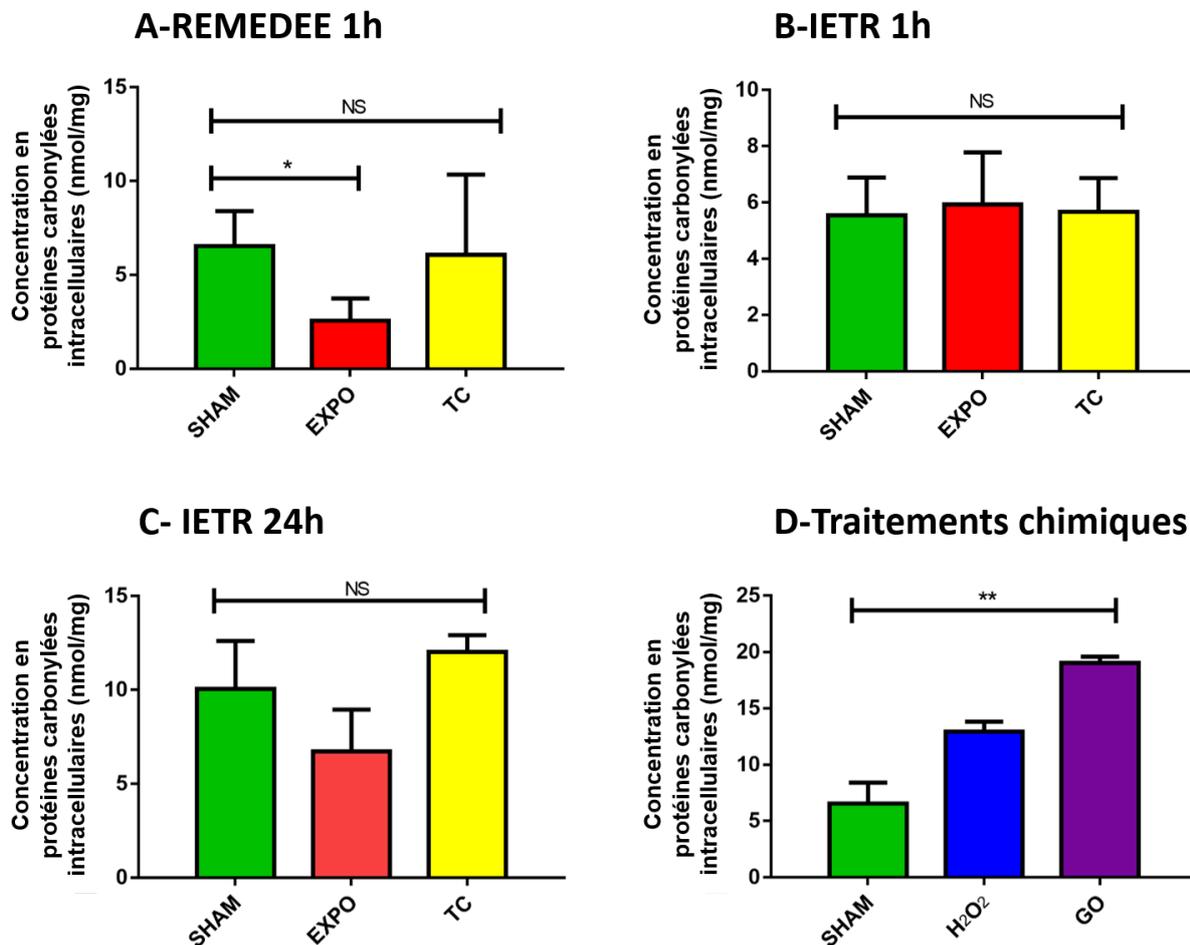
1540 Par la suite, l'impact des ROS sur les macromolécules de la cellule tels que les protéines et les lipides a été analysé. L'ADN sera quant à lui examiné dans le [Chapitre 5 : Impact des OMM sur le stress génotoxique dans les cellules HaCaT](#).

2. OMM et Impact des ROS

2.1. Oxydation des protéines intracellulaires sous OMM

1545 Les produits les plus courants de l'oxydation des protéines dans les échantillons biologiques sont les dérivés protéiques carbonylés. C'est pourquoi les extraits cellulaires protéiques ont été dosés. L'utilisation du dispositif de REMEDEE pendant 1h semble induire une diminution significative de la concentration de protéines carbonylées entre EXPO et SHAM (ratio EXPO/SHAM : -2.5). Cette diminution n'est pas retrouvée lorsque le chauffage seul est appliqué (TC, [test non paramétrique Mann Whitney, EXPO-1h_{pvalue}= 0,028, TC-1h_{pvalue}= 0,85 ; Figure CH4-9](#)). Cependant, avec le dispositif de l'IETR, après 1h d'exposition, cette baisse significative n'est pas retrouvée ([test non paramétrique Mann Whitney, EXPO-1h_{pvalue}= 1, TC-1h_{pvalue}= 1 ; Figure CH4-9 B](#)). Il est étonnant de voir que le même résultat n'est pas obtenu 1555 avec les deux dispositifs pendant 1h. Malgré les faibles différences dans les paramètres d'exposition des deux systèmes (~61,5 GHz ; 12,5 mW/cm² en champ proche pour REMEDEE et 60,4 GHz ; 15 mW/cm² en champ lointain pour l'IETR), celles-ci n'entraînent pas les mêmes effets biologiques sur les cellules. Cependant, on ne peut pas exclure le fait que ce résultat pourrait aussi être dû aux variations du bruit de fond. En effet, les concentrations des protéines carbonylées dans les SHAM oscillent entre 5 et 10 mmol/mL. De plus, gardons à l'esprit que le système de détoxification des molécules oxydées est un processus très dynamique. Pour 24h d'exposition, une diminution de la concentration des protéines carbonylées dans l'exposition est aussi détectée, mais en limite de significativité (ratio EXPO/SHAM : -1,5 ; [test non paramétrique Mann Whitney, EXPO-24h_{pvalue}= 0,057, TC-24h_{pvalue}= 0,68 ; Figure CH4-9 C](#)). Des traitements à H₂O₂ à 0,5 mM pendant 2 heures, et GO à 0,05 UI/mL pendant 24h ont été utilisés afin de valider l'expérimentation : une augmentation 1560

de la concentration de protéines carbonylées avec ces deux oxydants a été mesurée (test non paramétrique Mann Whitney, H_2O_2 -pvalue= 0,0013 ; GO_{pvalue}= 0,003).



1570 **Figure CH4-9 : Concentration intracellulaire en protéines carbonylées**

Concentration intracellulaire des protéines carbonylées intracellulaires dosée via Le kit OxiselectTM Protein Carbonyl ELISA entre les cellules exposées (EXPO) ou non (SHAM) et le contrôle thermique (TC) avec le dispositif REMEDEE pendant 1h (A) et avec le dispositif IETR pendant 1h (B) et 24h (C). Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et la glucose oxydase (GO) à 0,05 U/mL pendant 24h ont été utilisés comme contrôles techniques. Les histogrammes représentent la concentration intracellulaire de protéines carbonylées en nmol/mg de protéines dans les différentes conditions par rapport au SHAM +/- l'écart type des réplicats biologiques, N=4. Les tests non paramétriques Mann Whitney ont été utilisés (**< 0,005 ; NS : non significatif)

1580 Ces résultats que les OMM pourraient permettre une détoxification via une élimination plus efficace des protéines oxydées.

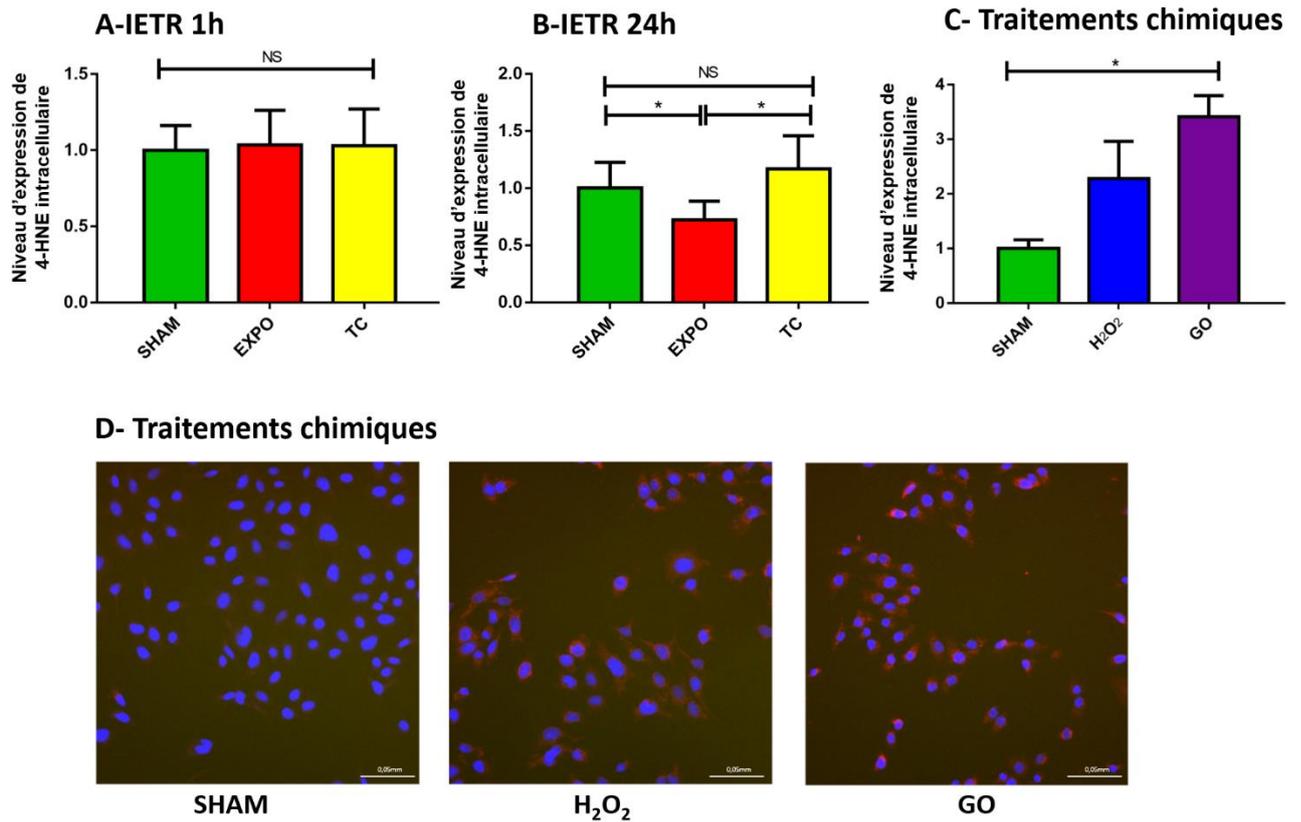
2.2. Oxydation des lipides intracellulaires et extracellulaires sous OMM

1585

La lipopéroxydation induit la formation de composés réactifs tels que le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal (4-HNE). Pour ces expériences, l'exposition de plaques 96-puits et de flasques 75 cm² entières était nécessaire. L'utilisation de plaques 96-puits est compliquée avec le dispositif REMEDEE car seuls 4 puits reçoivent les rayonnements millimétriques. Les flasques 75 cm² quant à elles, ne peuvent pas être utilisées avec ce dispositif. Devant ces contraintes, les expériences ont alors été réalisées uniquement avec l'appareil de l'IETR.

2.2.1. 4-HNE intracellulaire

1595 En premier lieu, l'analyse du 4-HNE a été investiguée. Après 1h d'exposition, aucune différence dans la concentration de 4-HNE entre SHAM, EXPO ou encore le contrôle thermique (TC) n'a été mis en évidence (test non paramétrique Mann Whitney, EXPO-1h_{pvalue}= 0,81 ; TC-1h_{pvalue}= 0,91 ; Figure CH4-10 A). Cependant, après 24h, une diminution de la concentration de 4-HNE a été retrouvée dans les cellules exposées (ratio EXPO/SHAM : -1,4). Ce résultat n'a pas été reproduit par le chauffage seul (TC ; test non paramétrique Mann Whitney, EXPO-1600 24h_{pvalue}= 0,006, TC-24h_{pvalue}= 0,35 ; Figure CH4-10 B). Les traitements H₂O₂ à 0,5 mM pendant 2 heures et GO à 0,05 UI/mL pendant 16h induit une augmentation significative de la concentration de 4-HNE validant ainsi notre expérience (test non paramétrique Mann Whitney, H₂O₂ _{pvalue}= 0,028 GO_{pvalue}= 0,028 ; Figure CH4-10 C).



1605

Figure CH4-10 : Concentration intracellulaire de 4-hydroxynonanal (4-HNE)

Niveaux d'expression de 4-HNE analysés par Immunofluorescence entre les cellules exposées (EXPO) ou non (SHAM) et le contrôle thermique (TC) avec le dispositif IETR pendant 1h (A) et 24h (B). Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 0,5 mM pendant 2h et la glucose oxydase (GO) à 0,05 UI/mL pendant 24h ont été utilisés comme contrôles techniques (C). Les histogrammes représentent le ratio de l'intensité de fluorescence de 4-HNE dans les différentes conditions par rapport au SHAM +/- l'écart type des réplicats biologiques, N=4. Les tests non paramétriques Mann Whitney ont été utilisés (*<0,05 ; **< 0,005 ; NS : non significatif)

1610

1615

Dans l'objectif d'évaluer la peroxydation lipidique induite par les OMM sur les kératinocytes HaCat, leur contenu intracellulaire et extracellulaire en malondialdéhyde (MDA) a été quantifié via le kit TBARS

1620

2.2.2. MDA intracellulaire

Après 1h d'exposition, la concentration de MDA intracellulaire reste stable, environ 70 nM pour les cellules exposées (EXPO) ou non (SHAM), ou soumises au contrôle thermique (TC ; test non paramétrique Mann Whitney, EXPO-1h_{pvalue}= 1 ; TC-1h_{pvalue}= 0,88 ; Figure CH4-11 A). Cependant, après 24h d'exposition, une diminution significative de la concentration intracellulaire de MDA a été reportée : 170,7 nM (+/- 20,9) contre 96,8 (+/- 13,2) pour SHAM et EXPO respectivement, soit une diminution d'un facteur 0,56. Cette différence n'est pas retrouvée par le chauffage seul (TC ; test non paramétrique Mann Whitney, EXPO-24h_{pvalue}= 0,28 ; TC-24h_{pvalue}= 0,28 ; Figure CH4-11 B).

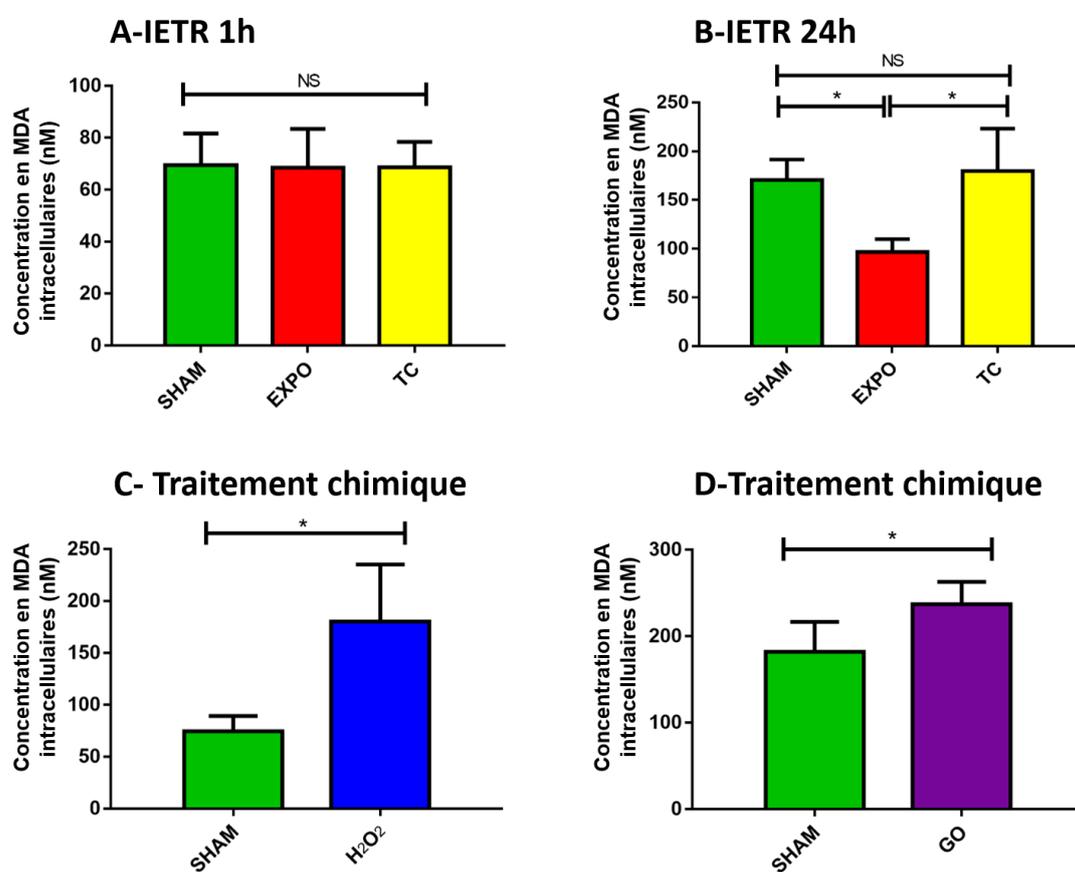


Figure CH4-11 : Concentration intracellulaire en malondialdéhyde (MDA)

Concentration intracellulaire de malondialdéhyde dosée via Le kit Oxiselect TM TBARS entre les cellules exposées (EXPO) ou non (SHAM) et le contrôle thermique (TC) avec le dispositif IETR pendant 1h (A) et 24h (B). Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂, C) à 0,5 mM pendant 2h et la glucose oxydase (GO, D) à 0,05 UI/mL pendant 24h ont été utilisés comme contrôles techniques. Les histogrammes représentent la concentration intracellulaire de MDA en nM dans les différentes conditions par rapport au SHAM +/- l'écart type des répliquats biologiques, N=4. Les tests non paramétriques Mann Whitney ont été utilisés (*<0,05 ; **< 0,005 ; NS : non significatif)

Il est à noter que la concentration de MDA augmente d'un facteur 2,5 entre SHAM 1h et SHAM 24h, laissant supposer que le milieu d'exposition pourrait avoir un impact sur le métabolisme cellulaire. L'utilisation des traitements chimiques à savoir H₂O₂ à 0,5 mM pendant 2h et GO à 0,05 UI/mL pendant 24h ont induit une augmentation significative de la concentration intracellulaire en MDA (test non paramétrique Mann Whitney, H₂O₂_{pvalue} = 0,009, GO_{pvalue} = 0,028 ; Figure CH4-11 C).

Suite à 24 heures d'exposition aux OMM, une diminution significative de la peroxydation lipidique est observée, suggérant qu'elles puissent protéger les lipides de l'oxydation ou favoriser leur prise en charge par le système anti-oxydant. Pour approfondir cette hypothèse, le contenu extracellulaire en MDA a été quantifié.

2.2.3. MDA extracellulaire

Après 1h d'exposition, en **extracellulaire**, il n'y a pas de différences significatives dans la concentration de MDA entre SHAM, EXPO et TC (test non paramétrique Mann Whitney EXPO-1h_{pvalue} = 0,68 ; TC-1h_{pvalue} = 0,68 ; Figure CH4-12 A). Après 24h d'exposition, une augmentation significative (X1,3) de la concentration de MDA a été observée entre SHAM et EXPO. Cette augmentation n'est pas retrouvée avec le contrôle thermique (TC, test non paramétrique Mann Whitney, EXPO-24h_{pvalue} = 0,006 ; TC-24h_{pvalue} = 0,54 ; Figure CH4-12 B). De plus, les concentrations de MDA extracellulaires sont 4,8 fois supérieures qu'en intracellulaires (Figure CH4-11) laissant supposer que la détoxification de MDA se fait par excrétion. Ensemble, ces résultats suggèrent une excrétion plus efficace de MDA de l'**intracellulaire** vers le milieu **extracellulaire** par les OMM. Le traitement au peroxyde d'hydrogène à 0,5 mM pendant 2 h et à la glucose oxydase à 0,05 UI/mL pendant 24h montre une augmentation significative de la concentration extracellulaire de MDA (facteur +2,1 et +2,5 respectivement - test non paramétrique Mann Whitney, H₂O₂_{pvalue} = 0,028 ; GO_{pvalue} = 0,028 ; Figure CH4-12 CD).

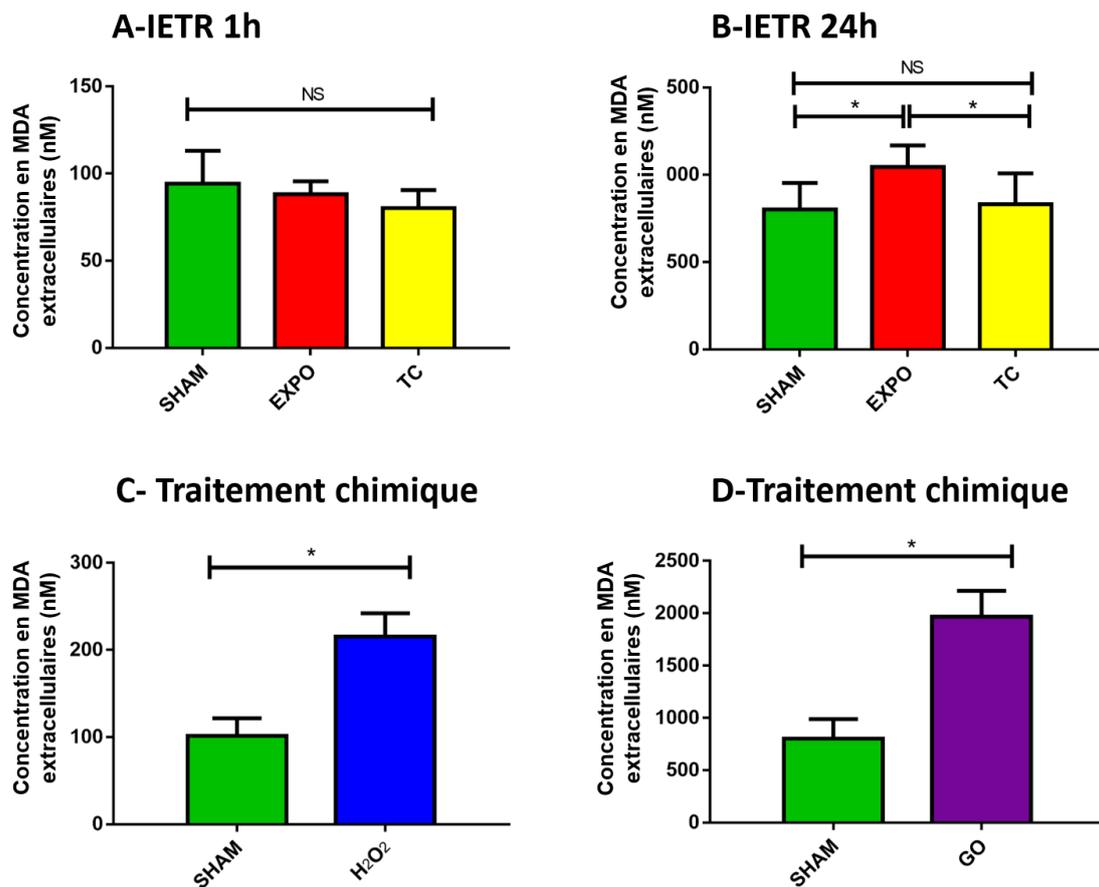


Figure CH4-12 : Concentration extracellulaire en malondialdéhyde (MDA)

1670 Concentration **extracellulaire** de malondialdéhyde dosée via Le kit Oxiselect TM TBARS entre les cellules exposées (EXPO) ou non (SHAM) et le contrôle thermique (TC) avec le dispositif IETR pendant 1h (A) et 24h (B). Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂, C) à 0,5 mM pendant 2h et la glucose oxydase (GO, D) à 0,05 UI/mL pendant 24h ont été utilisés comme contrôles techniques. Les histogrammes représentent la concentration **extracellulaire** de MDA en nM dans les différentes conditions par rapport au SHAM +/- l'écart type des réplicats biologiques, N=4. Les tests non paramétriques Mann Whitney ont été utilisés (*<0,05 ; **< 0,005 ; NS : non significatif).

1675

1680 Grâce à deux approches différentes (Immunofluorescence et « TBARS »), une diminution significative de la concentration **intracellulaire** des lipides oxydés a été mise en évidence après 24h d'exposition. De plus, une augmentation dans l'**extracellulaire** a été observée. De ce fait, les OMM semblent permettre une meilleure excrétion des lipides oxydés. Un stress oxydant induit par H₂O₂ et GO augmente à la fois en **intracellulaire** mais aussi en **extracellulaire** la concentration de lipides oxydés. Finalement, les OMM induisent-elles une augmentation de la peroxydation des lipides ou bien la baisse **intracellulaire** et l'augmentation **extracellulaire** se compensent-elles ?

1685

2.2.4. MDA quantité totale

Puisque les échantillons intracellulaire et extracellulaire proviennent des mêmes flaques (voir le [chapitre 2 : matériels et méthodes](#)), la quantité totale de MDA après 1h d'exposition a été calculée.

1690

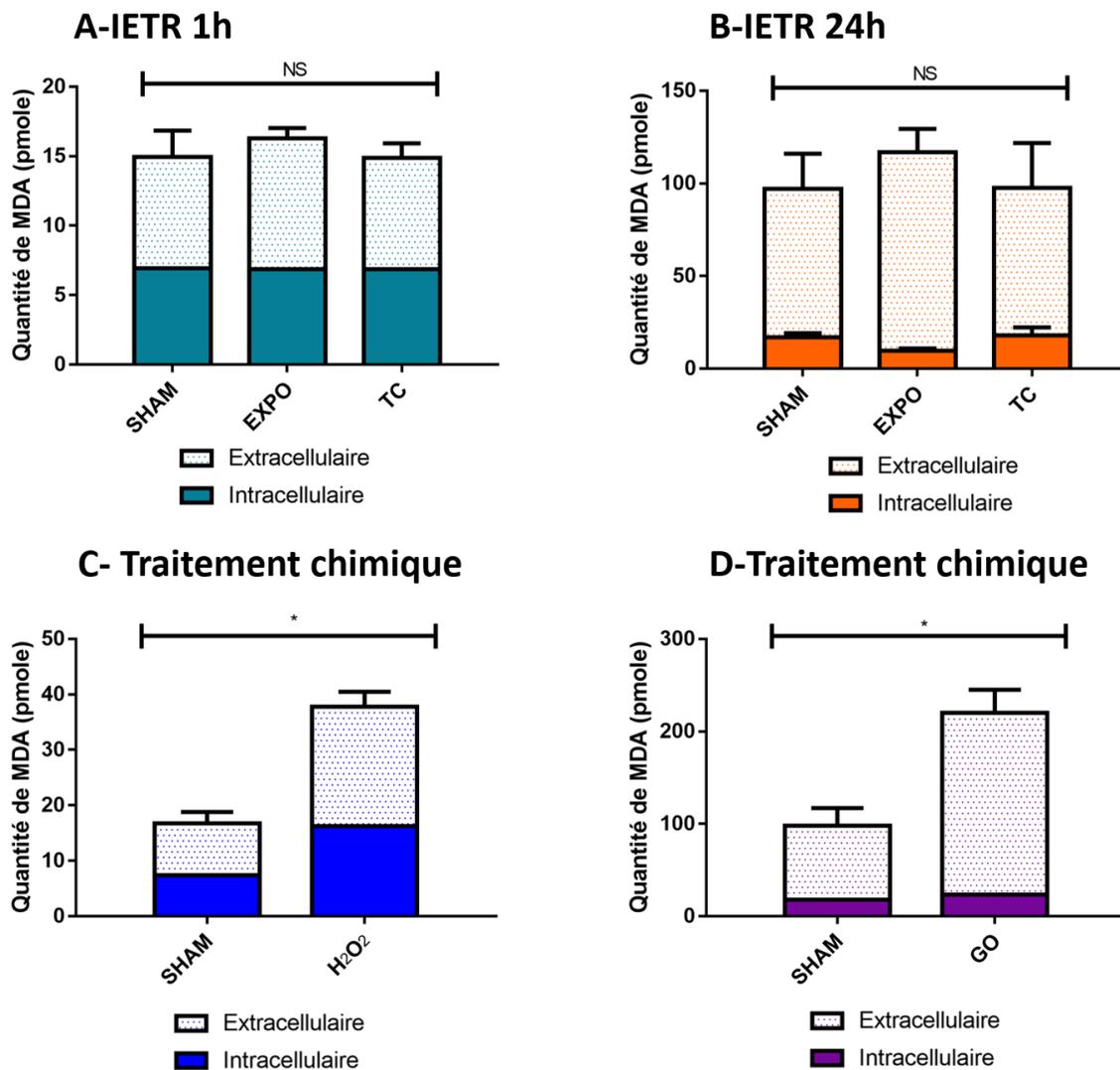


Figure CH4-13 : Quantité globale en malondialdéhyde (MDA)

Quantité **globale** de malondialdéhyde présente dans les échantillons intracellulaires et extracellulaires, calculée via Le kit Oxiselect TM TBARS entre les cellules exposées (EXPO) ou non (SHAM) et le contrôle thermique (TC) avec le dispositif IETR pendant 1h (A) et 24h (B). Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂, C) à 0,5 mM pendant 2h et la glucose oxydase (GO, D) à 0,05 UI/mL pendant 24h ont été utilisés comme contrôles techniques. Les histogrammes représentent la quantité globale de MDA en pmole dans les différentes conditions par rapport au SHAM +/- l'écart type des répliquats biologiques, N=4. Les tests non paramétriques Mann Whitney ont été utilisés (*<0,05 ; **< 0,005 ; NS : non significatif).

1695

1700

La moyenne de la quantité **globale** en MDA par échantillon entre SHAM (16,36 +/- 2,38 pmol), EXPO (15,66 +/- 0,78 pmole) et TC (14,87 +/- 1,81 pmole) ne diffère pas (**test non paramétrique Mann Whitney, Whitney EXPO-1h_{pvalue}= 0,68 ; TC-1h_{pvalue}= 0,68 ; Figure CH4-13 A**). De même, après 24h, aucune différence n'est retrouvée dans la quantité globale en MDA entre SHAM (97,07 +/- 19,34 pmol), EXPO (116,9 +/- 13,6 pmole) et TC (97,46 +/- 26,77 pmole - **test non paramétrique Mann Whitney, EXPO-24h_{pvalue}= 0,34 ; TC-24h_{pvalue}= 0,88 ; Figure CH4-13 B**). Cependant, les quantités globales après traitements chimiques sont multipliées par un facteur 2,25 (**test non paramétrique Mann Whitney, test non paramétrique Mann Whitney, H₂O₂_{pvalue} = 0,02 ; GO_{pvalue} = 0,02 ; Figure CH4-13 CD**). Ces résultats suggèrent que les OMM n'augmentent pas la concentration de MDA et de ce fait n'augmentent pas la concentration en lipides oxydés.

De ce fait, après 24h d'exposition, la lipopéroxydation **globale** ne semble pas modifiée. Par contre, l'augmentation de MDA observée dans la fraction **extracellulaire** après exposition correspondrait à la diminution observée dans la fraction **intracellulaire**, à la façon des vases communicants.

III- Discussion et conclusion

Au cours de cette étude, l'impact des ondes millimétriques sur le stress oxydant a été analysé. Après 1h et 24h d'exposition, nous n'avons pas mis en évidence de différence de production de ROS (**Figure CH4-6**). Pour autant, différentes études montrent que l'élévation de la température dans divers organismes entraîne une augmentation de la production de ROS et des dommages oxydants [**Pörtner et al. 1999, Paital & Chainy 2014, Lushchak et al. 2007, Kitagawa et al. 2015**]. Il était alors important de vérifier que la fluctuation de la température, inhérente au dispositif REMEDEE n'induisait pas d'augmentation de ROS. Cette observation a été validée par l'expérimentation où il a été observé une corrélation entre l'augmentation de la température et la production de ROS dans les cellules HaCaT mais pour des température

supérieurs à 37°C, ce qui n'est pas le cas avec le dispositif Remedee one (test non
1730 paramétrique Mann Whitney, 36°C_{pvalue}= 0,08 ; 38°C_{pvalue}= 0,05 ; Figure CH4-14).

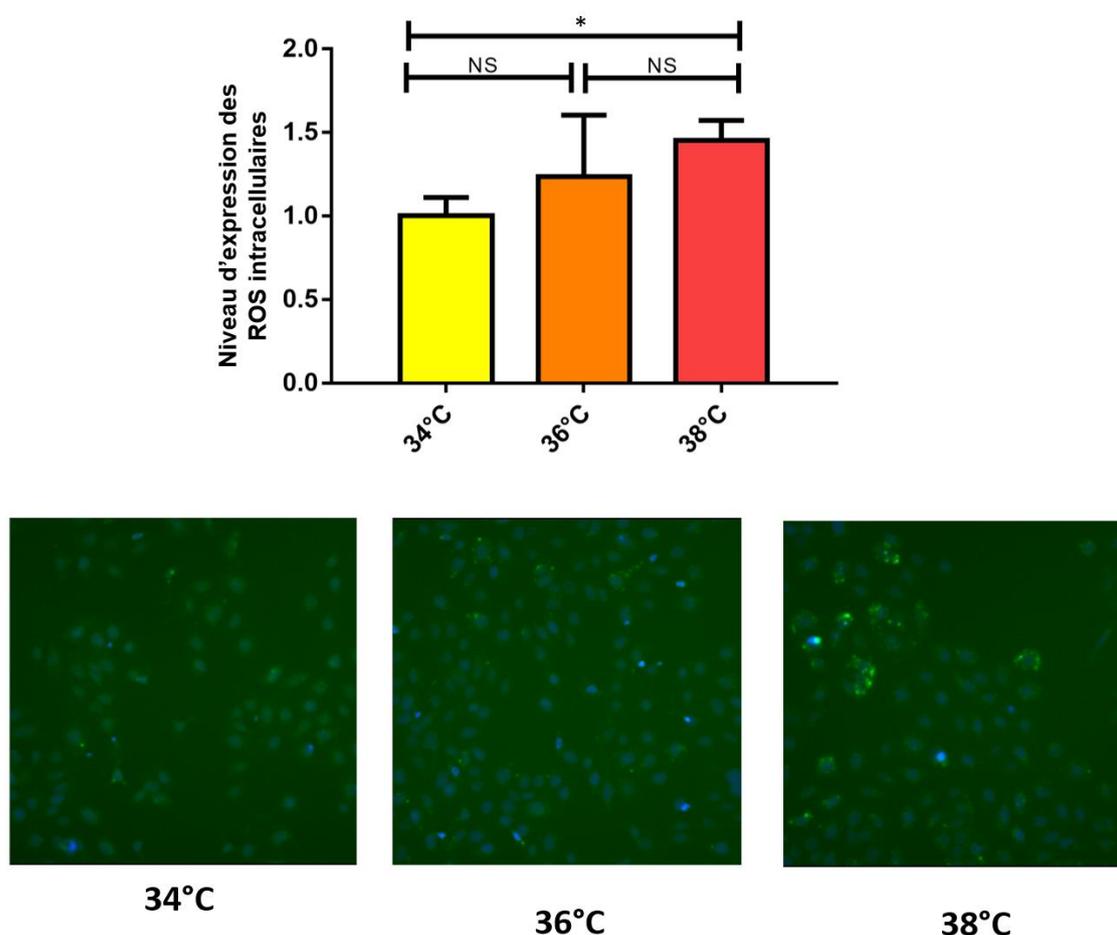


Figure CH4-14 : Effet de la température sur la concentration intracellulaire de ROS

Niveaux d'expression des ROS entre les cellules soumises à une température croissante (34°C, 36°C,
1735 38°C) pendant 2h. Les histogrammes représentent le ratio de l'intensité de fluorescence des ROS dans
les différentes conditions par rapport à la température 34°C +/- l'écart type des réplicats biologiques,
N=4. Les tests non paramétriques Mann Whitney ont été utilisés (*< 0,05 ; NS : non significatif)

Afin de gagner en sensibilité, la concentration de peroxyde d'hydrogène H₂O₂, molécule
1740 connue pour avoir la demi-vie la plus longue et la capacité de passer à travers les membranes
plasmiques, a été quantifiée. Que ce soit en **intracellulaire** (Figure CH4-7) ou en
extracellulaire (Figure CH4-8), aucune différence dans la concentration d'H₂O₂ n'a été mise en
évidence. Cependant, il convient de noter que la détoxification des ROS est un processus très
dynamique. En effet, les ROS sont des espèces chimiques de l'oxygène très réactives et ont
1745 une durée de vie courte. De ce fait, il est très difficile de les détecter dans des environnements

biologiques complexes. De plus, le système de réparation cellulaire est très efficace, et prend en charge immédiatement un déséquilibre des ROS dans la limite de leur capacité. Nos résultats suggèrent que les effets oxydants potentiels des ondes ne dépassent pas les capacités de réparation de la cellule. Si cette étude devait être poursuivie, il faudrait donc
1750 trouver la bonne fenêtre temporelle pour mettre en évidence une potentielle surproduction des ROS. Cette notion de temps est suggérée dans les travaux de [Vlasova](#) et son équipe (2018) qui observe une augmentation significative de la production ROS après 15 minutes d'exposition, mais pas après 5 minutes et 30 minutes.

1755 En raison de leur grande réactivité, les ROS peuvent attaquer plusieurs cibles biologiques telles que l'ADN, les lipides ou les protéines. Par conséquent, il est pertinent d'analyser leurs dommages au sein de la cellule. L'analyse de l'oxydation des protéines intracellulaires a montré une diminution après 1h et 24h d'exposition. Cette diminution n'est pas reproduite par le chauffage seul (Figure CH4-9). Néanmoins, il est surprenant que les résultats entre
1760 REMEDEE 1h et IETR 1h soit différents. Il est possible que

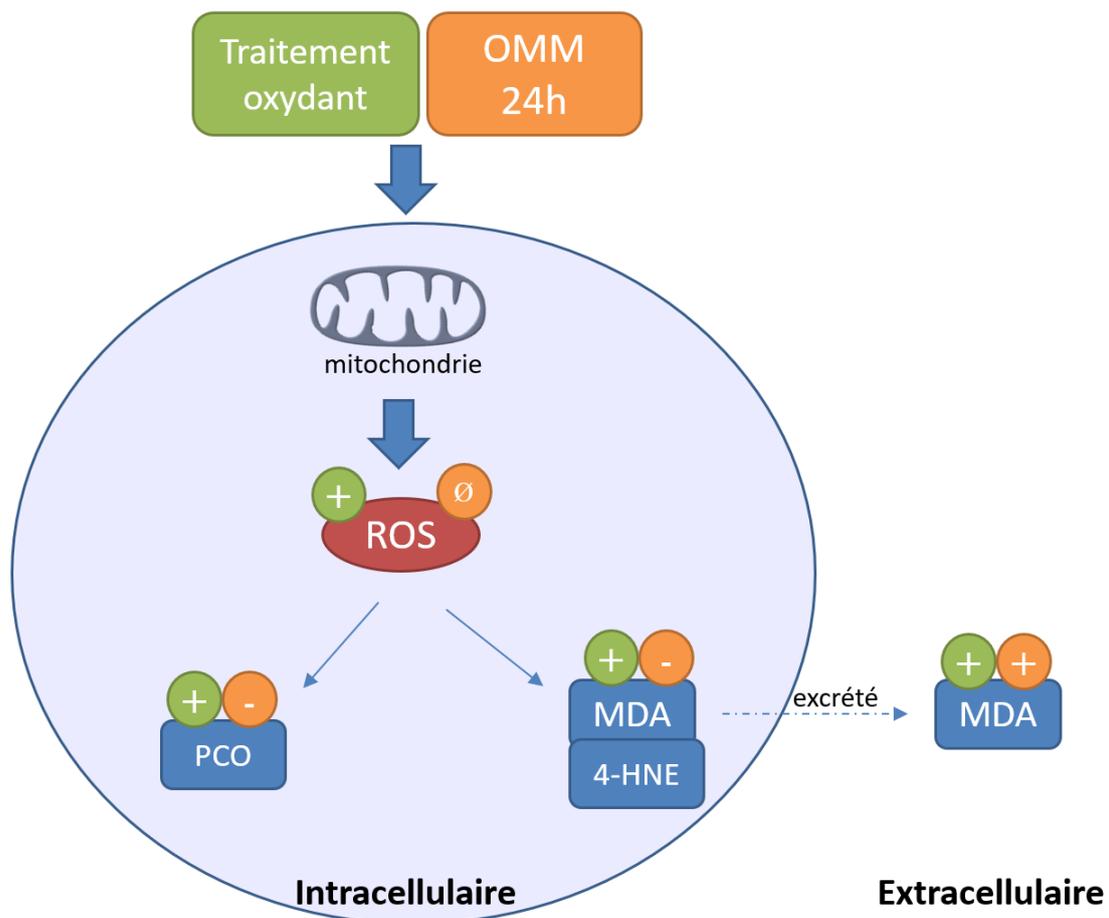
- Soit les différences de paramètres utilisées entre les deux dispositifs, notamment dans l'induction de la température sous exposition, impactent les résultats.
- Soit ces résultats sont le reflet de fluctuations naturelles du bruit de fond et qu'ils s'agissent en réalité d'artefacts.

1765 A notre connaissance, aucune autre étude sur les OMM ne s'est intéressée à l'oxydation des protéines. Cependant, dans le domaine des radiofréquences, [Marjanovic Cermak](#) et son équipe [2018] ont pu montrer une augmentation des protéines carbonylées après 30 minutes d'exposition (+1,38) à 1,8 GHz dans des cellules neurales SH-SY5Y. Après 60 minutes d'exposition, ces cellules tendent à retrouver leur équilibre (+1,15). Cependant, les mêmes
1770 expériences réalisées sur des fibroblastes de souris, par le même groupe, n'avaient pas montré d'augmentation significative des protéines carbonylées [[Marjanovic Cermak et al. 2017](#)]. Les effets biologiques semblent alors dépendre du modèle cellulaire utilisé et tributaires de la capacité des cellules à détecter et éliminer les molécules oxydées au fur et à mesure qu'elles apparaissent.

1775 L'analyse de l'oxydation des lipides (Figure CH4-10 à CH4-13) a été réalisée grâce aux sous-produits de lipopéroxydation : le 4-Hydroxynonanal (4-HNE) et le malondialdéhyde (MDA).

L'analyse de la concentration **intracellulaire** de 4-HNE n'a pas montré de différence après 1h d'exposition. Cependant, après 24h, une diminution significative a été observée dans les cellules exposées. Cet effet n'a pas été retrouvé dans le contrôle thermique (Figure CH4-10).

1780 Le même profil a été observé en analysant la concentration **intracellulaire** de MDA à savoir pas de différence après 1h d'exposition. Cependant, une diminution de la concentration de MDA dans l'EXPO, non reproduite par le contrôle thermique a été observée après 24h d'exposition (Figure CH4-11).



1785

Figure CH4-20 : schématisation des résultats obtenus durant cette étude du Chapitre 3

Le traitement par un agent oxydant (couleur verte) des cellules HaCaT induit une augmentation de la concentration intracellulaire de ROS, ainsi qu'une augmentation de l'oxydation des protéines (PCO) intracellulaires. La lipopéroxydation, analysée par la concentration de malondialdéhyde (MDA) et de 4-Hydroxynonanal (4-HNE) a montré une augmentation à la fois intracellulaire et extracellulaire. Cependant, le rayonnement des ondes électromagnétiques pendant 24h (couleur orange) n'a pas montré le même profil qu'un stress oxydant. La concentration intracellulaire de ROS est restée inchangée alors que la concentration de lipides oxydés intracellulaires et de protéines oxydées intracellulaires a diminuée. La lipopéroxydation extracellulaire, quant à elle a augmentée.

1790

1795

+ : augmentation de la concentration, - : diminution de la concentration, Ø : pas d'effet

En outre, l'analyse **extracellulaire** a montré une augmentation significative de la concentration de MDA uniquement dans l'EXPO après 24h. Ce résultat suggère une augmentation de la prise en charge des MDA au sein de la cellule sous exposition et entraîne une meilleure excrétion ou élimination. De plus, le kit utilisé nous permet de connaître la concentration **intra** et **extracellulaire** pour un même échantillon. De ce fait, la quantité globale de MDA a pu être analysée pour chaque échantillon et les différentes conditions comparées. Or, il n'y avait pas d'augmentation de MDA global, suggérant qu'il n'y ait pas plus de lipides oxydés après 24h d'exposition. Il semblerait que les OMM induisent une différence dans la répartition entre l'**intra** et l'**extracellulaire**, à la façon des « vases communicants ». Cette observation est soutenue par le traitement à la glucose oxydase qui démontre qu'au bout de 24h, lors d'un stress oxydant, on retrouve un niveau basal de MDA **intracellulaire** (légèrement supérieur à celui du SHAM) mais une excrétion plus importante de MDA **extracellulaire** (Figure CH4-20). Globalement, pour 1h d'exposition, les OMM à 60 GHz, à 15 mW/cm² ne semblent pas induire de stress oxydant important dans les cellules ni de dégâts aux macromolécules. Ces résultats sont confirmés par les études de [Logani \(1996\)](#), [Safrona \(2002\)](#) et [Vlasova \(2018\)](#) qui ne montrent pas d'effet sur la surproduction de ROS ni sur la lipopéroxydation après 30 minutes à 1h d'exposition. Ces résultats sont rassurants puisque les paramètres utilisés dépassent les normes pour le grand public.

Cependant pour une longue exposition de 24h, une diminution **intracellulaire** des protéines et des lipides oxydés ainsi qu'une augmentation **extracellulaire** des lipides oxydés sont observées. Ces résultats ne sont pas retrouvés lors d'un traitement via un agent oxydant.

Un stress oxydant notable n'a pas pu être mis en évidence, suggérant que, si l'exposition aux OMM a un impact sur ce phénomène, il ne dépasse pas les capacités de réparation de la cellule. Cependant, cela ne signifie pas pour autant qu'un stress oxydant, à bas bruit, n'existe pas. Dans ce cas, il pourrait avoir un impact sur la réponse anti-oxydante de la cellule et une stimulation des systèmes d'élimination des lipides et protéines oxydées. Cette stimulation des systèmes de réparation expliquerait nos résultats, c'est-à-dire une diminution **intracellulaire** des macromolécules oxydées et une augmentation dans la fraction **extracellulaire**. En se référant à la littérature, deux études *in vivo*, sur des modèles de rats Wistar ont été réalisées par la même équipe [[Kesari & Behari 2009](#) et [Kumar et al. 2010](#)]. Ils se sont intéressés à l'activité des enzymes antioxydantes clefs des ROS dans le sang de rats ainsi que dans les

cerveaux entiers, exposés à 50 GHz. Ils ont observé une surproduction des ROS (ratio EXPO/SHAM : non dosé et +1,68 respectivement), une augmentation de l'activité de la catalase (ratio EXPO/SHAM : +1,43 et +1,074 respectivement), une diminution de l'activité du superoxyde dismutase (ratio EXPO/SHAM : -1,12 et -1,89 respectivement) et une diminution de l'activité du glutathion peroxydase (-1,33 et -2,04 respectivement). Les auteurs concluent que la surproduction excessive de ROS due aux OMM entraîne l'épuisement de l'activité du mécanisme de défense de la cellule. Nos résultats semblent plutôt montrer l'inverse. Cependant, les modèles d'études et d'exposition sont très différents, ce qui rend difficile toutes comparaisons directes.

Une autre hypothèse serait que les OMM n'induisent pas de stress oxydant supplémentaire mais une modification de la membrane plasmique. Ce changement de fluidité permettrait une diffusion des molécules entre le milieu intracellulaire et extracellulaire ce qui expliquerait la diminution **intracellulaire** des protéines et lipides oxydés et l'augmentation **extracellulaire** des lipides oxydés. Certaines études montrent un effet des OMM sur la membrane plasmique sans pour autant déterminer un mécanisme précis [Ramundo-Orlando et al. 2007 ;2009 ;2010, Logani & Ziskin 1996, Di Donato et al. 2012, Beneduci et al. 2013 ;2014, Cosentino et al. 2013, Szabo et al. 2006]. Ils supposent que les OMM peuvent modifier la structure et les propriétés, soit des composants membranaires entraînant alors des changements de perméabilité, soit des canaux ioniques entraînant une altération du gradient de fluidité trans-bicouche. Ces modifications seraient d'ailleurs initiées par l'oxydation des protéines et des lipides. En effet, La lipoperoxydation entraîne des modifications importantes de la fluidité membranaire [Craetes de Paulet et al. 2012].

Ces travaux réalisés restent à ce jour initiateurs dans les études de l'impact des OMM. La comparaison avec d'autres résultats est difficile dû au manque d'études dans ce domaine. Des recherches plus approfondies sont à effectuer sur le sujet. Quelques pistes avaient été réfléchies durant ce projet, notamment l'analyse des vésicules (exosomes, microvésicules) excrétées sous exposition. Cependant, après concertation avec des collègues spécialistes du sujet, ces expériences auraient été compliquées. En effet, il aurait fallu des millions de cellules pour avoir une analyse biochimique pertinente sur des vésicules. Or le système d'exposition limite le nombre de cellules exposables, ce qui rendrait l'analyse biochimique très délicate.

IV- Références

- Alekseev, S. I., & Ziskin, M. C. (1995). Millimeter microwave effect on ion transport across lipid bilayer membranes. *Bioelectromagnetics*, *16*(2), 124-131.
<https://doi.org/10.1002/bem.2250160209>
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J. H., Staden, R., & Young, I. G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, *290*(5806), 457-465. <https://doi.org/10.1038/290457a0>
- ANSES. (2013). *Radiofréquences et santé* (Édition scientifique).
- Arendash, G. W., Sanchez-Ramos, J., Mori, T., Mamcarz, M., Lin, X., Runfeldt, M., Wang, L., Zhang, G., Sava, V., Tan, J., & Cao, C. (2010). Electromagnetic Field Treatment Protects Against and Reverses Cognitive Impairment in Alzheimer's Disease Mice. *Journal of Alzheimer's Disease*, *19*(1), 191-210. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1228>
- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid Peroxidation : Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2014*, 1-31. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Bagnyukova, T. V., Lushchak, O. V., Storey, K. B., & Lushchak, V. I. (2007). Oxidative stress and antioxidant defense responses by goldfish tissues to acute change of temperature from 3 to 23°C. *Journal of Thermal Biology*, *32*(4), 227-234.
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2007.01.004>
- Balaban, R. S., Nemoto, S., & Finkel, T. (2005). Mitochondria, Oxidants, and Aging. *Cell*, *120*(4), 483-495. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.001>
- Barrera, G., Pizzimenti, S., Ciamporcerio, E. S., Daga, M., Ullio, C., Arcaro, A., Cetrangolo, G. P., Ferretti, C., Dianzani, C., Lepore, A., & Gentile, F. (2015). Role of 4-Hydroxynonenal-Protein Adducts in Human Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, *22*(18), 1681-1702.
<https://doi.org/10.1089/ars.2014.6166>
- Beckman, K. B., & Ames, B. N. (1998). The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiological Reviews*, *78*(2), 547-581. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.2.547>
- Beneduci, A., Cosentino, K., & Chidichimo, G. (2013). Millimeter Wave Radiations Affect Membrane Hydration in Phosphatidylcholine Vesicles. *Materials*, *6*(7), 2701-2712.
<https://doi.org/10.3390/ma6072701>
- Beneduci, A., Cosentino, K., Romeo, S., Massa, R., & Chidichimo, G. (2014). Effect of millimetre waves

- on phosphatidylcholine membrane models : A non-thermal mechanism of interaction. *Soft Matter*, 10(30), 5559-5567. <https://doi.org/10.1039/C4SM00551A>
- Berlett, B. S., & Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(33), 20313-20316. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.33.20313>
- Bienert, G. P., Schjoerring, J. K., & Jahn, T. P. (2006). Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(8), 994-1003. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.02.015>
- Bodera, P., Stankiewicz, W., Antkowiak, B., Paluch, M., Kieliszek, J., Sobiech, J., & Niemcewicz, M. (2015). Influence of electromagnetic field (1800 MHz) on lipid peroxidation in brain, blood, liver and kidney in rats. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 28(4), 751-759. <https://doi.org/10.13075/ijomeh.1896.00255>
- Cadet, J., Delatour, T., Douki, T., Gasparutto, D., Pouget, J.-P., Ravanat, J.-L., & Sauvaigo, S. (1999). Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 424(1-2), 9-21. doi /10.1016/S0027-5107(99)00004-4
- Campisi, A., Gulino, M., Acquaviva, R., Bellia, P., Raciti, G., Grasso, R., Musumeci, F., Vanella, A., & Triglia, A. (2010). Reactive oxygen species levels and DNA fragmentation on astrocytes in primary culture after acute exposure to low intensity microwave electromagnetic field. *Neuroscience Letters*, 473(1), 52-55. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.02.018>
- Chuyan, E. N. (2004). Interhemisphere Asymmetry of the Pro-/Antioxidant Systems in the Rat Brain : Effects of Hypokinesia and Extrahigh-Frequency Electromagnetic Radiation. *Neurophysiology*, 36(1), 22-23. <https://doi.org/10.1023/B:NEPH.0000035966.18122.7e>
- Cosentino, K., Beneduci, A., Ramundo-Orlando, A., & Chidichimo, G. (2013). The influence of millimeter waves on the physical properties of large and giant unilamellar vesicles. *Journal of Biological Physics*, 39(3), 395-410. <https://doi.org/10.1007/s10867-012-9296-2>
- Crastes de Paulet, L. Douste-Blazy, Rodolfo Paoletti. (2012). *Free Radicals, Lipoproteins, and Membrane Lipids*.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., & Milzani, A. (2006). Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. *Clinical Chemistry*, 52(4), 601-623. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.061408>
- Dasdag, S., Akdag, M. Z., Ulukaya, E., Uzunlar, A. K., & Ocak, A. R. (2009). Effect of Mobile Phone Exposure on Apoptotic Glial Cells and Status of Oxidative Stress in Rat Brain. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 28(4), 342-354. <https://doi.org/10.3109/15368370903206556>
- Delattre J., Beaudoux J.L., Bonnefont-Rousselot D.(2005). *Radicaux libres et stress oxydant*. Librairie Lavoisier. <https://www.lavoisier.fr/livre/sciences-de-la-vie/radicaux-libres-et-stress->

oxydant/delattre/descriptif-9782743009731

- Devrim, E., Ergüder, İ. B., Kılıçoğlu, B., Yaykaşlı, E., Çetin, R., & Durak, İ. (2008). Effects of Electromagnetic Radiation Use on Oxidant/Antioxidant Status and DNA Turn-over Enzyme Activities in Erythrocytes and Heart, Kidney, Liver, and Ovary Tissues From Rats : Possible Protective Role of Vitamin C. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 18(9), 679-683. <https://doi.org/10.1080/15376510701380182>
- Di Donato, L., Cataldo, M., Stano, P., Massa, R., & Ramundo-Orlando, A. (2012). Permeability Changes of Cationic Liposomes Loaded with Carbonic Anhydrase Induced by Millimeter Waves Radiation. *Radiation Research*, 178(5), 437-446. <https://doi.org/10.1667/RR2949.1>
- Dragicevic, N., Bradshaw, P. C., Mamcarz, M., Lin, X., Wang, L., Cao, C., & Arendash, G. W. (2011). Long-term electromagnetic field treatment enhances brain mitochondrial function of both Alzheimer's transgenic mice and normal mice : A mechanism for electromagnetic field-induced cognitive benefit? *Neuroscience*, 185, 135-149. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.04.012>
- Dröge, W. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47-95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>
- Esmekaya, M., Ozer, C., & Seyhan, N. (2011). 900 MHz pulse-modulated radiofrequency radiation induces oxidative stress on heart, lung, testis and liver tissue. *General Physiology and Biophysics*, 30(1), 84-89. https://doi.org/10.4149/gpb_2011_01_84
- Esterbauer, H., & Cheeseman, K. H. (1990). [42] Determination of aldehydic lipid peroxidation products : Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. In *Methods in Enzymology* (Vol. 186, p. 407-421). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86134-H](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86134-H)
- Favier, A. (2003). *Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique*. L'actualité chimique, 108-115.
- Fenton, H. J. H. (1894). LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 65(0), 899-910. <https://doi.org/10.1039/CT8946500899>
- Gallerano, G. P., Doria, A., Giovenale, E., De Amicis, A., De Sanctis, S., Di Cristofaro, S., Franchini, V., Lista, F., Regalbuto, E., Sgura, A., Coluzzi, E., Marinaccio, J., Bei, R., Fantini, M., Benvenuto, M., & Masuelli, L. (2015). Effects of mm-waves on human fibroblasts in-vitro. *2015 40th International Conference on Infrared, Millimeter, and Terahertz waves (IRMMW-THz)*, 1-2. <https://doi.org/10.1109/IRMMW-THz.2015.7327476>
- Gapeyev, A. B., Safronova, V. G., Chemeris, N. K., & Fesenko, E. E. (1997). Inhibition of the production of reactive oxygen species in mouse peritoneal neutrophils by millimeter wave radiation in the near and far field zones of the radiator. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 43(2), 217-220. [https://doi.org/10.1016/S0302-4598\(96\)05155-0](https://doi.org/10.1016/S0302-4598(96)05155-0)

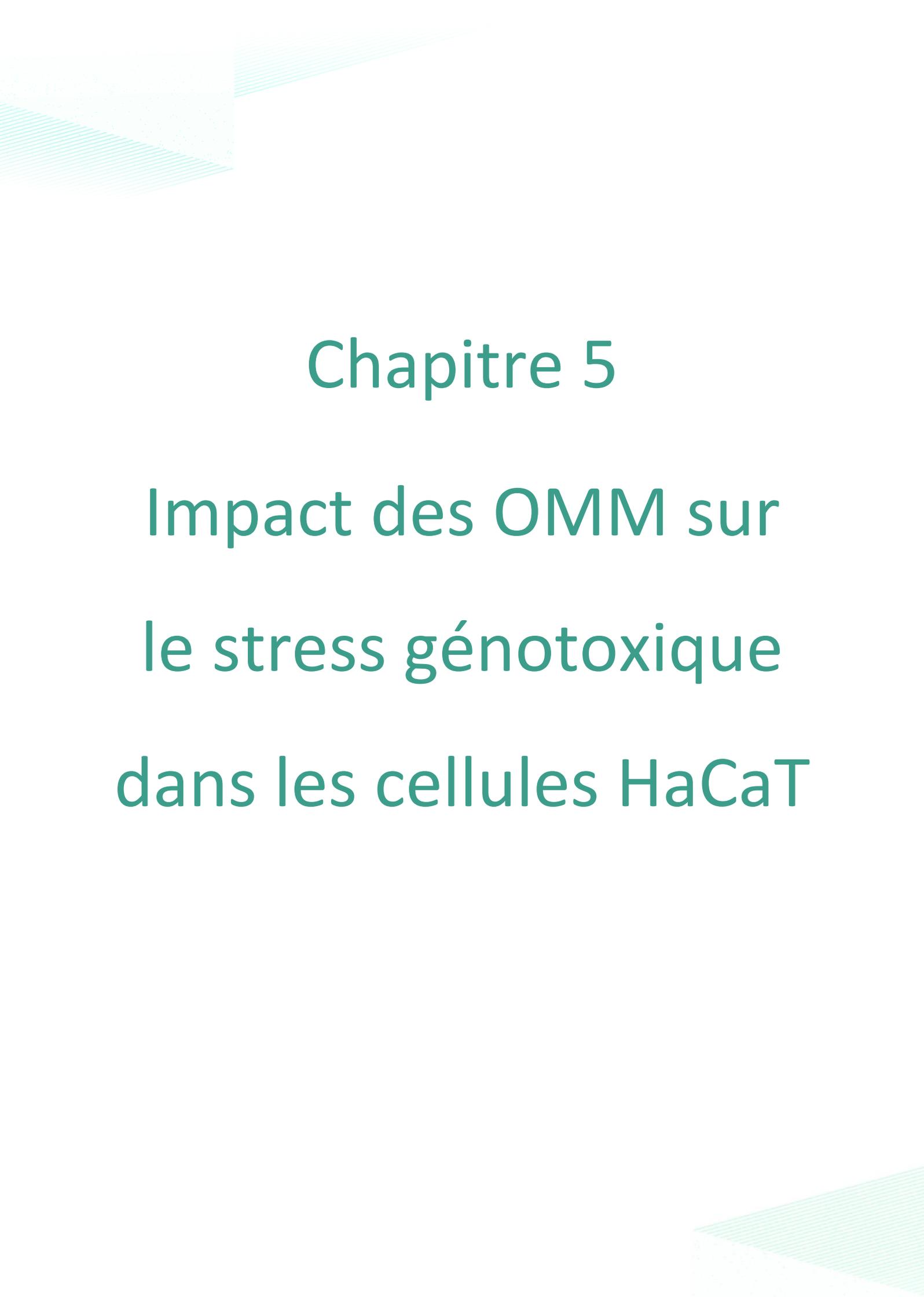
- Girotti, A. W. (1998). Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of Lipid Research*, 39(8), 1529-1542.
- Guler, G., Tomruk, A., Ozgur, E., & Seyha, N. (2010). The effect of radiofrequency radiation on DNA and lipid damage in non-pregnant and pregnant rabbits and their newborns. *General Physiology and Biophysics*, 29(1), 59-60. https://doi.org/10.4149/gpb_2010_01_59
- Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems : Source, biochemistry, and role in human disease. *The American Journal of Medicine*, 91(3), S14-S22. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(91\)90279-7](https://doi.org/10.1016/0002-9343(91)90279-7)
- Halliwell, B. (2012). Free radicals and antioxidants : Updating a personal view. *Nutrition Reviews*, 70(5), 257-265. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>
- Hanna, J., Guerra-Moreno, A., Ang, J., & Micoogullari, Y. (2019). Protein Degradation and the Pathologic Basis of Disease. *The American Journal of Pathology*, 189(1), 94-103. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.09.004>
- Hurst, J. S., Slater, T. F., Lang, J., Juergens, G., Zollner, H., & Esterbauer, H. (1987). Effects of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal on the aggregation of human platelets. *Chemico-Biological Interactions*, 61(2), 109-124. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(87\)90033-0](https://doi.org/10.1016/0009-2797(87)90033-0)
- Kesari, K. K., & Behari, J. (2009). Fifty-gigahertz Microwave Exposure Effect of Radiations on Rat Brain. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 158(1), 126-139. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8469-8>
- Kesari, K. K., & Behari, J. (2012). Evidence for mobile phone radiation exposure effects on reproductive pattern of male rats : Role of ROS. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 31(3), 213-222. <https://doi.org/10.3109/15368378.2012.700292>
- Kesari, K. K., Kumar, S., & Behari, J. (2012). Pathophysiology of Microwave Radiation : Effect on Rat Brain. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(2), 379-388. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9433-6>
- Khalil, A. M., Alshamali, A. M., & Gagaa, M. H. (2011). *Detection Of Oxidative Stress Induced By Mobile Phone Radiation In Tissues Of Mice Using 8-Oxo-7, 8-Dihydro-2'-Deoxyguanosine As A Biomarker*. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.1333106>
- Kitagawa, T., Yamamoto, J., Tanaka, T., Nakano, Y., Akiba, D., Ueta, K., & Nishizawa, S. (2015). 5-Aminolevulinic acid strongly enhances delayed intracellular production of reactive oxygen species (ROS) generated by ionizing irradiation : Quantitative analyses and visualization of intracellular ROS production in glioma cells in vitro. *Oncology Reports*, 33(2), 583-590. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3618>

- Kumar, S., Kesari, K. K., & Behari, J. (2010). Evaluation of genotoxic effects in male Wistar rats following microwave exposure. *Indian Journal of Experimental Biology*, 48(6), 586-592.
- Lacraz, G., Giroix, M.-H., Kassis, N., Coulaud, J., Galinier, A., Noll, C., Cornut, M., Schmidlin, F., Paul, J.-L., Janel, N., Irminger, J.-C., Kergoat, M., Portha, B., Donath, M. Y., Ehses, J. A., & Homo-Delarche, F. (2009). Islet Endothelial Activation and Oxidative Stress Gene Expression Is Reduced by IL-1Ra Treatment in the Type 2 Diabetic GK Rat. *PLoS ONE*, 4(9), e6963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006963>
- Logani, M. K., Agelan, A., & Ziskin, M. C. (2002). Effect of millimeter wave radiation on catalase activity. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 21(3), 303-308. <https://doi.org/10.1081/JBC-120016009>
- Logani, M. K., & Ziskin. (1996). Continuous millimeter-wave radiation has no effect on lipid peroxidation in liposomes. *RADIATIONRESEARCH*145,231-235.
- Lushchak, V. I., Bagnyukova, T. V., Lushchak, O. V., Storey, J. M., & Storey, K. B. (2007). Diethyldithiocarbamate injection induces transient oxidative stress in goldfish tissues. *Chemico-Biological Interactions*, 170(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2007.06.033>
- Luukkonen, J., Juutilainen, J., & Naarala, J. (2010). Combined effects of 872 MHz radiofrequency radiation and ferrous chloride on reactive oxygen species production and DNA damage in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Bioelectromagnetics*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/bem.20580>
- Manna, D., & Ghosh, R. (2016). Effect of radiofrequency radiation in cultured mammalian cells : A review. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 35(3), 265-301. <https://doi.org/10.3109/15368378.2015.1092158>
- Marjanovic Cermak, A. M., Pavicic, I., & Trosic, I.(2017) In vitro non-thermal oxidative stress response after 1800 MHz radiofrequency radiation. *Gen Physiol Biophys* . 2017 Oct;36(4):407-414. doi: 10.4149/gpb_2017007. Epub 2017 Aug 24. DOI: 10.4149/gpb_2017007
- Marjanovic Cermak, A. M., Pavicic, I., & Trosic, I. (2018). Oxidative stress response in SH-SY5Y cells exposed to short-term 1800 MHz radiofrequency radiation. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 53(2), 132-138. <https://doi.org/10.1080/10934529.2017.1383124>
- Mitchell, P. (1978). David Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. *SCIENCE* 7 Dec 1979 Vol 206, Issue 4423 pp. 1148-1159
- Moustafa, Y. M., Moustafa, R. M., Belacy, A., Abou-El-Ela, S. H., & Ali, F. M. (2001). Effects of acute exposure to the radiofrequency fields of cellular phones on plasma lipid peroxide and antioxidant activities in human erythrocytes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 26(4), 605-608. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(01\)00492-7](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(01)00492-7)
- Ozgur, E., Güler, G., & Seyhan, N. (2010). Mobile phone radiation-induced free radical damage in the

- liver is inhibited by the antioxidants n-acetyl cysteine and epigallocatechin-gallate. *International Journal of Radiation Biology*, 86(11), 935-945.
<https://doi.org/10.3109/09553002.2010.496029>
- Özsobacı, N. P., Ergün, D. D., Tunçdemir, M., & Özçelik, D. (2020). Protective Effects of Zinc on 2.45 GHz Electromagnetic Radiation-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in HEK293 Cells. *Biological Trace Element Research*, 194(2), 368-378. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01811-6>
- Paital, B., & Chainy, G. B. N. (2014). Effects of temperature on complexes I and II mediated respiration, ROS generation and oxidative stress status in isolated gill mitochondria of the mud crab *Scylla serrata*. *Journal of Thermal Biology*, 41, 104-111.
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2014.02.013>
- Pamplona, R., Portero-Otin, M., Riba, D., Requena, J. R., Thorpe, S. R., Lopez-Torres, M., & Barja, G. (2000). Low Fatty Acid Unsaturation : A Mechanism for Lowered Lipoperoxidative Modification of Tissue Proteins in Mammalian Species With Long Life Spans. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 55(6), B286-B291.
<https://doi.org/10.1093/gerona/55.6.B286>
- Poghosyan, G., Mikaelyan, M., Nerkararyan, A., & Vardevanyan, P. (2017). Effect of whole body extremely high frequency electromagnetic irradiation exposure on lipid peroxidation in rats. *Biologija*, 63(3). <https://doi.org/10.6001/biologija.v63i3.3578>
- Pörtner, H. O., Hardewig, I., & Peck, L. S. (1999). Mitochondrial function and critical temperature in the Antarctic bivalve, *Laternula elliptica*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 124(2), 179-189. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(99\)00105-1](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(99)00105-1)
- Pouletier de Gannes, F., Haro, E., Hurtier, A., Taxile, M., Athane, A., Ait-Aissa, S., Masuda, H., Percherancier, Y., Ruffié, G., Billaudel, B., Dufour, P., Veyret, B., & Lagroye, I. (2012). Effect of In Utero Wi-Fi Exposure on the Pre- and Postnatal Development of Rats : in utero wi-fi exposure and teratology. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 95(2), 130-136. <https://doi.org/10.1002/bdrb.20346>
- Ramundo-Orlando, A. (2010). Effects of Millimeter Waves Radiation on Cell Membrane—A Brief Review. *Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves*, 31(12), 1400-1411.
<https://doi.org/10.1007/s10762-010-9731-z>
- Ramundo-Orlando, A., Gallerano, G. P., Stano, P., Doria, A., Giovenale, E., Messina, G., Cappelli, M., D'Arienzo, M., & Spassovsky, I. (2007). Permeability changes induced by 130 GHz pulsed radiation on cationic liposomes loaded with carbonic anhydrase. *Bioelectromagnetics*, 28(8), 587-598. <https://doi.org/10.1002/bem.20343>

- Ramundo-Orlando, A., Longo, G., Cappelli, M., Girasole, M., Tarricone, L., Beneduci, A., & Massa, R. (2009). The response of giant phospholipid vesicles to millimeter waves radiation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1788(7), 1497-1507.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.04.006>
- Safronova, V. G., Gabdoulkhakova, A. G., & Santalov, B. F. (2002). Immunomodulating action of low intensity millimeter waves on primed neutrophils. *Bioelectromagnetics*, 23(8), 599-606.
<https://doi.org/10.1002/bem.10056>
- Schuermann, D., & Mevissen, M. (2021). Manmade Electromagnetic Fields and Oxidative Stress— Biological Effects and Consequences for Health. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3772. <https://doi.org/10.3390/ijms22073772>
- Siu, G. M., & Draper, H. H. (1982). Metabolism of malonaldehyde in vivo and in vitro. *Lipids*, 17(5), 349-355. <https://doi.org/10.1007/BF02535193>
- SOARES, F. (2005). *Effets du stress oxydant sur le fonctionnement des adipocytes : Adiponectine et prostaglandines*. 133.
- Sonntag, C. von. (1987). *The chemical basis of radiation biology*. Taylor & Francis.
- Szabo, I., Kappelmayer, J., Alekseev, S. I., & Ziskin, M. C. (2006). Millimeter wave induced reversible externalization of phosphatidylserine molecules in cells exposed in vitro. *Bioelectromagnetics*, 27(3), 233-244. <https://doi.org/10.1002/bem.20202>
- Szabo, I., Manning, M. R., Radzievsky, A. A., Wetzell, M. A., Rogers, T. J., & Ziskin, M. C. (2003). Low power millimeter wave irradiation exerts no harmful effect on human keratinocytes in vitro. *Bioelectromagnetics*, 24(3), 165-173. <https://doi.org/10.1002/bem.10077>
- Szabo, I., Rojavin, M. A., Rogers, T. J., & Ziskin, M. C. (2001). Reactions of keratinocytes to in vitro millimeter wave exposure. *Bioelectromagnetics*, 22(5), 358-364.
<https://doi.org/10.1002/bem.62>
- Tissier, M., Bonneton, P., Marche, F., Chazel, F., & Lannes, D. (2012). A new approach to handle wave breaking in fully non-linear Boussinesq models. *Coastal Engineering*, 67, 54-66.
<https://doi.org/10.1016/j.coastaleng.2012.04.004>
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44-84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- Vinagre, C., Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H. N., & Diniz, M. (2012). Effect of temperature on oxidative stress in fish : Lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Ecological Indicators*, 23, 274-279.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2012.04.009>
- Vlasova, I. I., Mikhalchik, E. V., Gusev, A. A., Balabushevich, N. G., Gusev, S. A., & Kazarinov, K. D.

- (2018). Extremely high-frequency electromagnetic radiation enhances neutrophil response to particulate agonists : MMWs Enhance Neutrophil Response to Agonists. *Bioelectromagnetics*, 39(2), 144-155. <https://doi.org/10.1002/bem.22103>
- Xu, S., Zhou, Z., Zhang, L., Yu, Z., Zhang, W., Wang, Y., Wang, X., Li, M., Chen, Y., Chen, C., He, M., Zhang, G., & Zhong, M. (2010). Exposure to 1800 MHz radiofrequency radiation induces oxidative damage to mitochondrial DNA in primary cultured neurons. *Brain Research*, 1311, 189-196. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.10.062>
- Zelko, I. N., Mariani, T. J., & Folz, R. J. (2002). Superoxide dismutase multigene family : A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(3), 337-349. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00905-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00905-X)



Chapitre 5

Impact des OMM sur
le stress génotoxique
dans les cellules HaCaT

1860 Ce cinquième chapitre est consacré à l'étude d'un potentiel stress génotoxique induit par les ondes millimétriques. Un agent dit génotoxique est capable d'endommager l'ADN (Wurgler and Kramers, 1992) de façon directe ou indirecte. Les OMM sont des ondes non-ionisantes. De ce fait, leur énergie est insuffisante pour générer des cassures à l'ADN de façon directe. Il est alors plus probable que les dommages génotoxiques, s'il y en a, soient générés indirectement.

Deux hypothèses ont été considérées :

1865 - Les OMM induiraient une augmentation de la production de ROS. Ces derniers amplifieraient le taux naturel de lésions oxydatives de l'ADN et induiraient un stress génotoxique.

Et/ou

1870 - Les OMM inhiberaient (partiellement) l'expression et/ou l'efficacité de certaines enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN. De ce fait les OMM seraient un agent co-génotoxique puisqu'elles aggraveraient les effets d'agents génotoxiques directs.

1875 Dans ce chapitre, les lésions de l'ADN provoquées par le stress oxydant seront discutées ainsi que leur détection par les différents systèmes de réparation. Puis un état de l'art sur l'impact des OMM sur le stress génotoxique sera analysé. Enfin les résultats de cette étude seront présentés et discutés.

I- Stress génotoxique : contexte bibliographique

1. Lésions oxydatives de l'ADN

1880 En plus des lipides et des protéines, les ROS attaquent l'ADN, lui infligeant de nombreux dégâts. Le radical hydroxyle (OH^\bullet) est le ROS qui réagit le plus avec les acides nucléiques. On estime le taux de lésions naturelles de l'ADN par les ROS à plus de 10^4 par cellule et par jour (De Bont et al. 2004 ; Nakamura & Swenberg, 1999). L'oxydation de l'ADN via les ROS produit un large éventail de modifications chimiques telles que l'oxydations des bases de l'ADN, la

1885 création de sites abasiques, qui conduisent à des cassures simple brin (SB) ou double brin (DB) (Krokan et al 1997) ou encore à un stress répliatif (Kuzminov et al, 2001, Figure CH5-1).

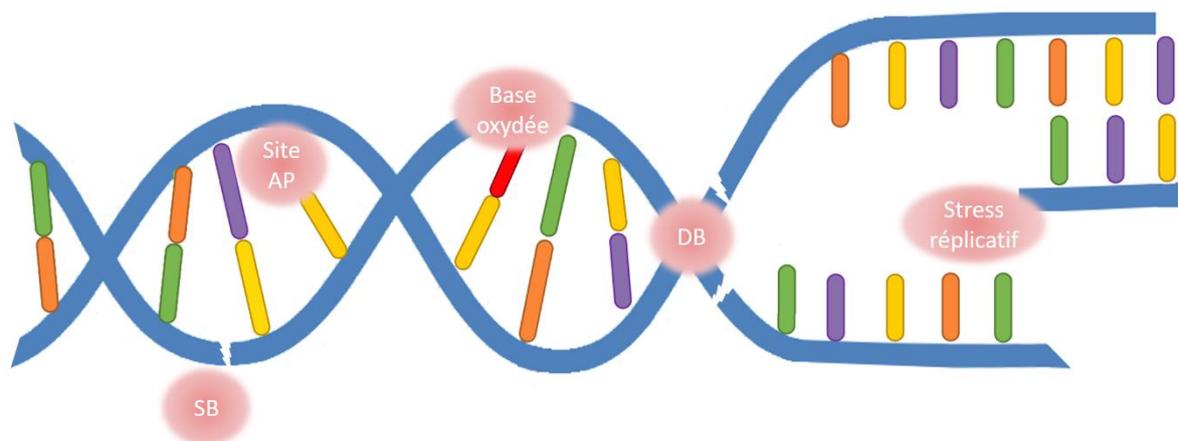


Figure CH5-1 : Lésions de l'ADN possibles induites par un stress oxydant. Base oxydée, site abasique (AP), cassure simple brin (SB), cassure double brin (DB) et stress répliatif (illustration personnelle)

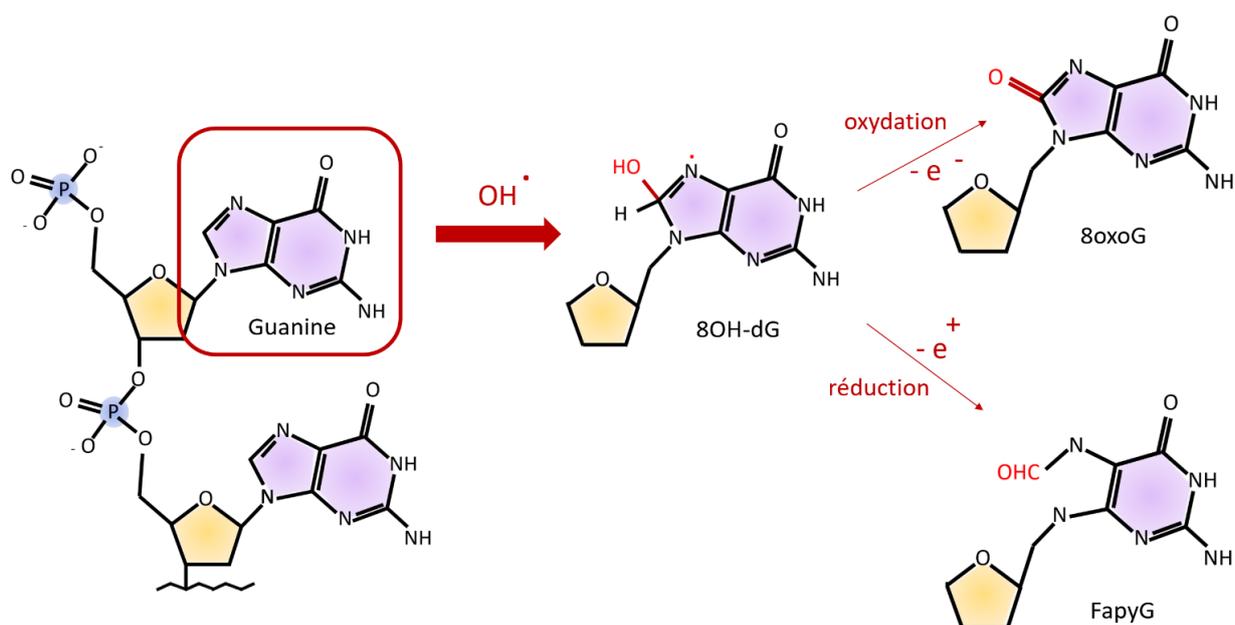
1890 1.1. Bases oxydées

1895 Parmi toutes les différentes lésions de l'ADN induites par les ROS, l'oxydation des bases est celle rencontrée le plus souvent. Elle consiste en l'attaque d'un atome d'oxygène sur une double liaison, perturbant ainsi la conformation de l'ADN. Elles sont principalement générées par l'addition du radical OH^\bullet sur la double liaison en position C5 et C6 des bases pyrimidiques (cytosine, thymine) et C4 et C8 des bases puriques (adénine, guanine). La mieux caractérisée est la 8-oxo-2'-désoxyguanosine (8OH-dG) qui est aussi la plus courante (Dizdaroglu et al. 1991).

1900 La guanine est la base privilégiée de nombreux oxydants. Son oxydation peut générer la 8OH-dG considérée comme biomarqueur du stress oxydatif (Kasai et al. 1986). Cependant, de nombreuses formes alternatives de l'oxydation de la guanine peuvent apparaître en fonction de l'attaque radicalaire. Par exemple, l'oxydation de la 8OH-dG entraîne l'apparition de la forme 8 oxo-guanine (8oxoG) et la réduction de la 8OH-dG engendre la FapyGuanine (Figure CH5-2).

1905 On estime que plusieurs centaines de molécules de 8OH-dG sont générées par jour dans une cellule humaine (Lindahl, 1993). La 8OH-dG résulte de l'oxydation de la guanine sur son

1910 carbone 8, changeant ainsi sa conformation. Ce réarrangement structurel n'est pas anodin puisque, lors de la réplication de l'ADN, les ADN polymérases peuvent reconnaître la 8OH-dG comme une thymine dont la configuration est proche et y associer une adénosine (Shibutani et al. 1991). Si cette transversion n'est pas repérée par le système de réparation dédié, la cellule acquiert une mutation ayant des conséquences plus ou moins graves pour la cellule en fonction de sa localisation dans le génome (voir la section 1.2 conséquences des dommages à l'ADN).



1915 **Figure CH5-2 : Réaction de la guanine avec le radical hydroxyle OH^\bullet** (Illustration personnelle)

L'attaque de OH^\bullet sur la guanine entraîne l'apparition de la base oxydée 8-oxo-2'-désoxyguanosine (8OH-dG). Son oxydation entraîne la forme 8 oxo-guanine (8oxoG) et sa réduction la Fapyguanine (FapyG)

1920 1.2. Sites abasiques (AP)

L'attaque de l'ADN par les ROS peut aussi induire la rupture de la liaison N-glycosidique entre le squelette phospho-glucosidique et la base azotée associée conduisant à l'apparition d'un site abasique : site apurinique/aprimidique (Figure CH5-3, Pogozelski and Tullius, 1998). Ces derniers peuvent aussi être générés de façon indirecte, lors de la réparation par excision de

1925

base (BER) (voir le paragraphe [1.3.1 base excision repair](#)). Ce sont des lésions prémutagènes les plus fréquentes pouvant empêcher la réplication normale de l'ADN.

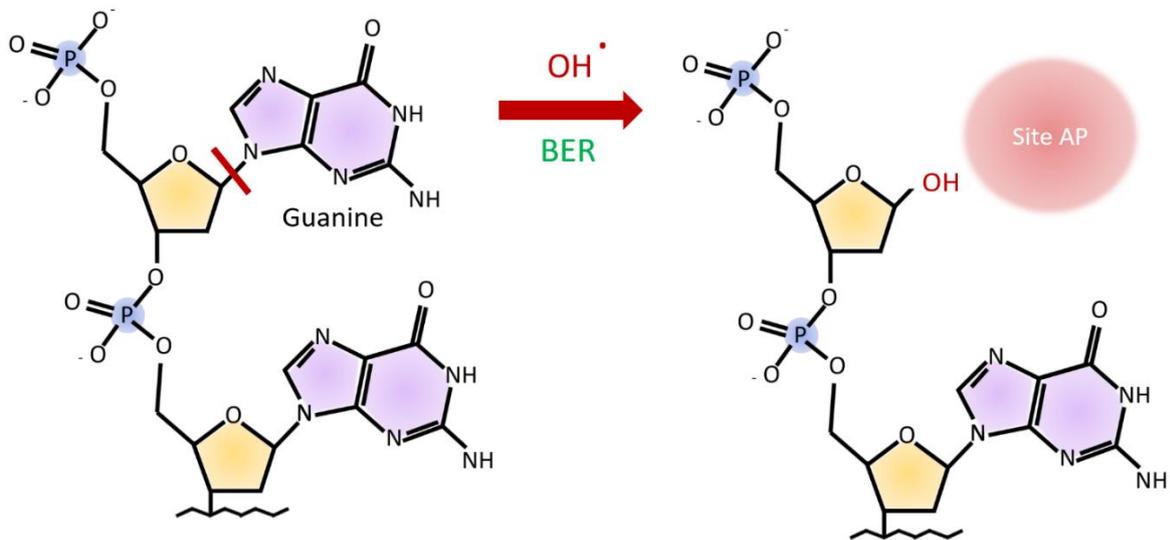


Figure CH5-3 : Apparition d'un site abasique (AP) (Illustration personnelle)

1930 Hydrolyse de la liaison N-glycosidique entre le désoxyribose et la base azotée. Le site abasique peut être généré de façon directe par l'attaque du radical hydroxyle OH^\bullet , ou de façon indirecte lors de la voie « base excision repair » (BER).

1.3. Cassure simple brin (SB)

1935

Les ROS peuvent induire des cassures simple brin (SB) c'est-à-dire une discontinuité d'un seul des deux brins de l'ADN :

1- Soit de façon directe par la coupure du sucre oxydé. Généralement, les cassures SB résultent de l'attaque des radicaux OH^\bullet sur le désoxyribose entraînant la rupture des liaisons phosphate-sucre [[Pogozelski et al, 1998](#)].

1940

2- Soit de façon indirecte lors de la réparation par excision de bases d'ADN (BER, voir le paragraphe [1.3.1 base excision repair](#)).

La non-réparation de cette lésion dans des cellules en prolifération entraîne le blocage et l'effondrement des fourches de réplication, pouvant induire des cassures double brin

1945

([Kuzminov et al, 2001](#)).

1.4. Cassure double brin (DB)

1950 Une cassure double brin (DB) correspond à deux cassures simple brin séparées de moins d'une dizaine de paires de bases. Ces cassures sont parmi les lésions les plus toxiques car cela peut conduire à une perte d'information. De plus, le mécanisme de réparation est complexe, très long à se mettre en place (demandant une à plusieurs heures) et est plus ou moins fidèle. Deux mécanismes sont proposés pour expliquer les cassures double brin induites par un stress oxydant :

- 1) Le premier implique l'attaque d'un radical hydroxyle OH^\bullet sur le 2-désoxyribose d'un brin de l'ADN puis son transfert sur le deuxième brin.
- 2) Le second suppose l'attaque de l'ADN par plusieurs radicaux hydroxyles dans un champ rapproché (Siddiqi & Bothe, 1987).

1960 De plus, comme indiqué précédemment, les cassures DB peuvent se former lorsque le système de réplication de l'ADN rencontre des cassures simple brin non réparées (Pfeiffer et al. 2000).

1.5. Stress répliatif

1965 Les lésions induites par les ROS peuvent avoir des conséquences diverses sur la cellule. Si les « obstacles » se situent près de la fourche de réplication, la polymérase peut être bloquée alors que les hélicases continuent de dérouler l'ADN parental [Byun et al. 2005] formant ainsi de l'ADN simple brin. Cette accumulation d'ADN SB peut entraîner l'apparition d'un stress répliatif pouvant aller jusqu'à l'incapacité à ré-initier la synthèse de l'ADN après un blocage de la réplication [Seigneur et al. 1998 ; Petermann et al. 2010].

1970

2. Conséquences des dommages à l'ADN

L'ADN ne peut pas être dégradé contrairement aux lipides ou aux protéines mais il doit être réparé en gardant intact l'information qu'il code grâce à sa structure double brin. Or la cellule subit des dommages génotoxiques chaque jour, ce que nous appellerons le « niveau basal » dans ce manuscrit. A ce niveau, ces dégâts sont très rapidement pris en charge et ne dépassent pas les capacités de réparation de la cellule. Cependant, en cas d'augmentation d'un stress cellulaire, les lésions peuvent être plus nombreuses et attaquer de manière aléatoire le génome. En fonction du type de lésions et de sa localisation dans le génome, les conséquences pour la cellule sera soit la réparation, soit la mutation. Les mutations, en fonction de leur localisation peuvent ne pas induire de conséquences (ex : régions non codantes non informatives) ou entraîner des instabilités génomiques, premiers pas vers la cancérogenèse. Si les lésions sont trop importantes et dépassent les capacités de réparation de la cellule, cette dernière va s'engager dans la mort cellulaire programmée [Teyssier et al. 1999] afin de préserver le tissu. Cependant, l'apoptose devient problématique en cas de mort massive. De ce fait, au sein de l'organisme, si de nombreuses cellules subissent des lésions trop nombreuses et/ou trop graves qui s'accumulent de façon irréversible sur le long terme, le tissu ou l'organe touché va devenir défaillant. C'est l'effet déterministe [ICRP 2007]. Cet effet est bien documenté dans le cas des rayonnements ionisants. Au-delà d'un certain seuil de dose, la gravité des effets déterministes augmente avec la dose reçue. Entre le niveau basal et l'effet déterministe se trouve l'effet stochastique où les lésions peuvent provoquer des effets mais qui semblent aléatoires et difficiles à prédire (Figure CH5-4). Ces effets peuvent être des cancers dus à une mutation des cellules somatiques ou encore des effets héréditaires du fait de mutations dans les cellules germinales.

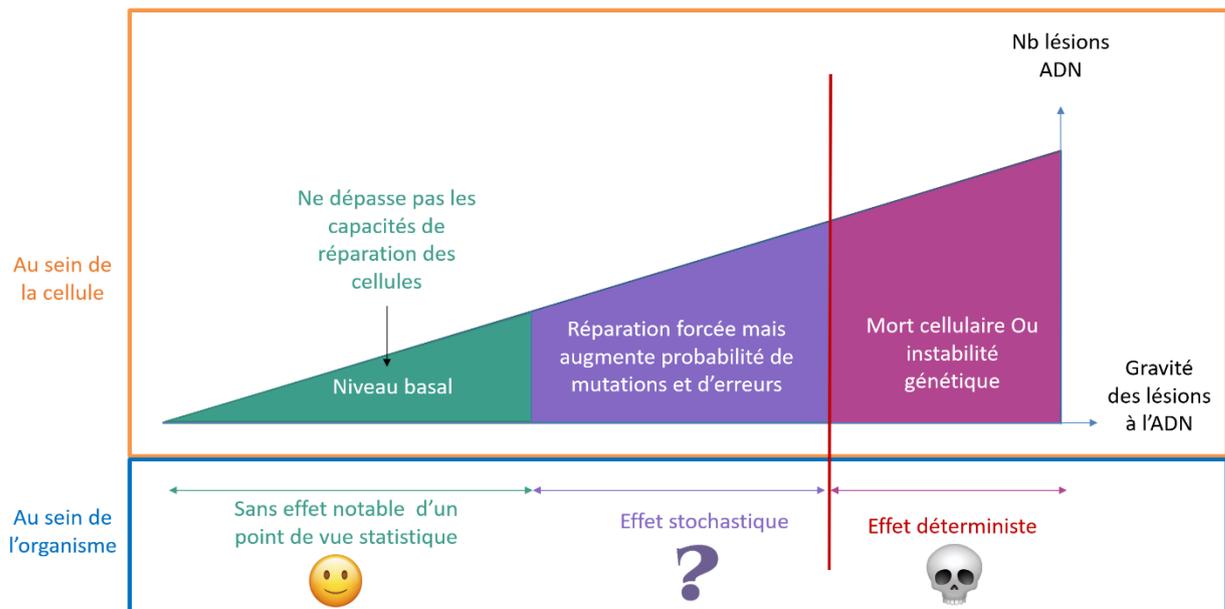


Figure CH5-4 : Impact des lésions de l'ADN en fonction du nombre et de la gravité (Illustration personnelle)

2000

3. Détection des principales lésions de l'ADN

La détection des lésions de l'ADN est indispensable pour assurer la viabilité et la survie de la cellule. En fonction de la lésion, différents senseurs ou capteurs vont la détecter et l'identifier.

2005

Chaque système de réparation utilise des senseurs spécifiques. Pour autant, différentes protéines peuvent avoir un rôle dans les différentes voies de réparation de l'ADN qui consistent en des ensembles de processus complexes, enchevêtrés les uns avec les autres [Bartek & Lukas, 2003]. Cette redondance des capteurs est d'une importante capitale pour la cellule et permet une résilience de l'intégrité du génome. Dans ce projet, 3 systèmes de

2010

détections des lésions du stress oxydant ont été investigués (Figure CH5-5) :

- 1) La détection des bases oxydées, des sites abasiques et des cassures simple brin se font par des capteurs appartenant au système de réparation « base excision repair » (BER)
- 2) La détection des cassures double brin est prise en charge par le voie ATM (ATM Sérine/Thréonine Kinase)

2015

- 3) La détection du stress réplcatif se fait par la voie ATR (ATR Sérine/Thréonine Kinase)

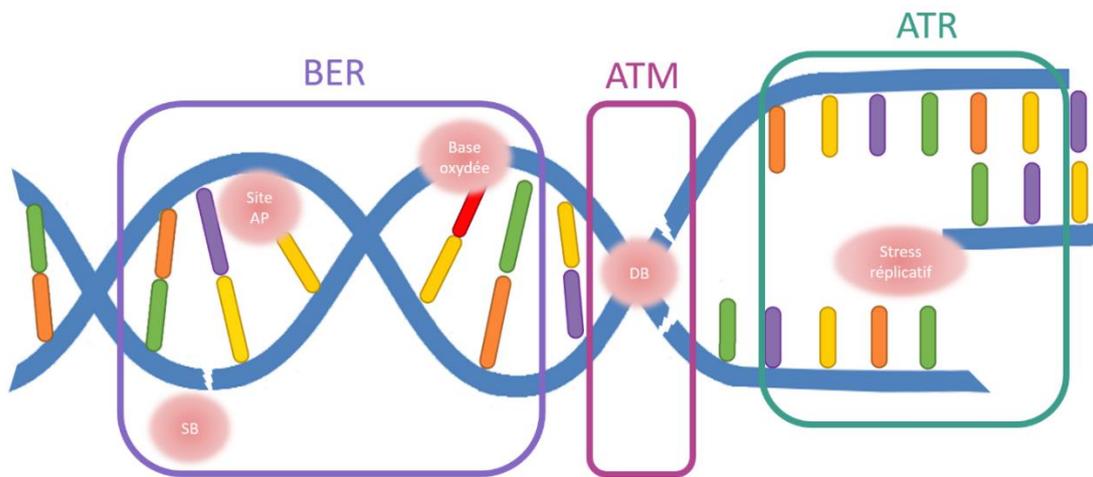


Figure CH5-5 : Le stress oxydant induit par les ROS peut générer différentes lésions telles que l'oxydation des bases, la production de sites Abasiques (AP), des cassures simple brin (SB) et double brin (DB). Ces lésions seront détectées par la voie BER ou ATM. Le stress oxydant peut générer un stress réplcatif qui se traduit par l'arrêt de la réplication. Ce stress réplcatif sera identifié par la voie ATR (Illustration personnelle)

2020

3.1. Base excision repair (BER)

2025 La voie BER est spécialisée dans la détection de bases modifiées, principalement par oxydation, désamination ou alkylation. Elle est complémentaire au système « Nucleotide excision repair » (NER) qui s'occupe des grosses lésions comme des pontages avec des molécules exogènes qui entraînent des modifications importantes de la conformation de l'ADN (Krokan et al. 1997). La voie BER est une voie complexe possédant de nombreux sous-modèles en fonction de la lésion (principalement oxydation ou dépurination des bases). De nombreuses enzymes sont impliquées, ayant des rôles spécifiques pour assurer l'efficacité du système face à la diversité des dommages. Dans le cadre de ce projet, seules les lésions induites par un stress oxydant ont été analysées et sont décrites dans la suite de l'exposé.

2030

La voie BER se déroule en 3 étapes :

2035 1- Elimination de la base altérée

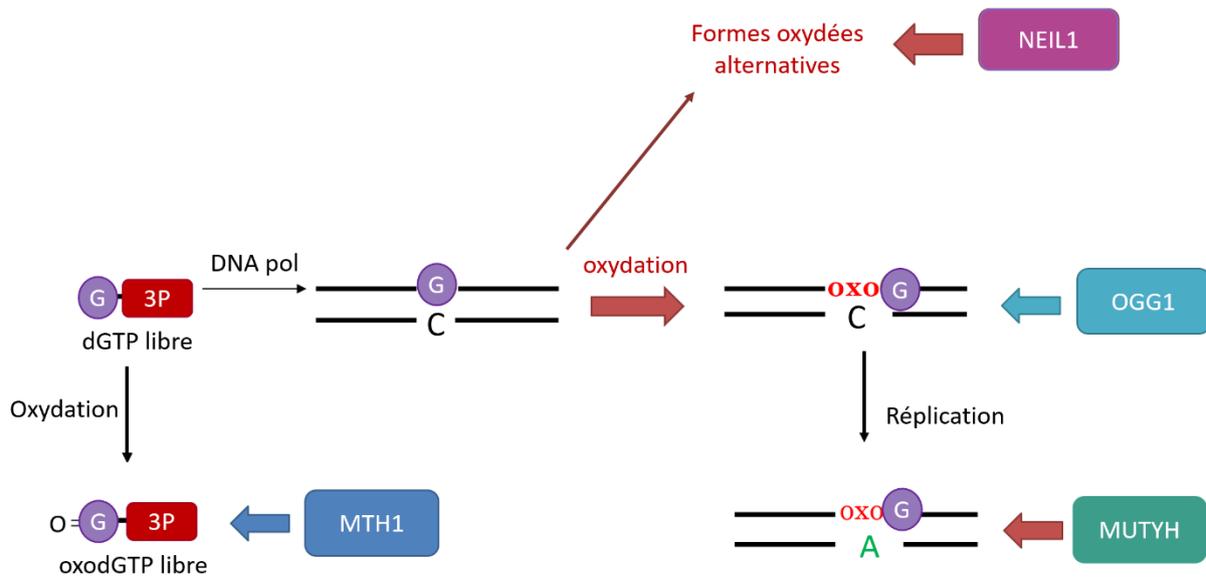
2- Elimination du désoxyribose

3- Synthèse et ligation d'ADN

3.1.1. Elimination de la base altérée

2040 La base altérée est repérée par une ADN glycosylase qui catalyse le clivage de la liaison base-sucre. L'excision de la base génère un site abasique. Il existe de nombreuses ADN glycosylases spécialistes d'un type de base oxydée. Différentes enzymes vont entrer en jeu en fonction de la forme oxydée. La détection de l'oxydation de la guanine est particulièrement bien décrite dans la littérature puisqu'elle est la cible privilégiée des oxydants. Parmi les détecteurs des
2045 formes oxydées de la guanine, il est retrouvé (Figure CH5-6) :

- **OGG1** (*Oxoguanine DNA Glycosylase 1*) : Elle est considérée comme l'enzyme clef de la voie BER. OGG1 reconnaît spécifiquement la 8OH-dG de l'ADN et l'excise [Boiteux et al. 2000].
- **MTH1** (*7,8-Dihydro-8-Oxoguanine Triphosphatase*) : cette enzyme est une exception parmi les capteurs car c'est une triphosphatase et non une ADN glycosylase. Si l'oxydation a lieu
2050 au niveau du nucléotide libre dGTP, la triphosphatase MTH1 va hydrolyser les nucléosides triphosphates puriques oxydés en monophosphates, et empêche leur ajout dans l'ADN [Rudling et al. 2017].
- **MUTYH** (*mutY DNA glycosylase*) : S'il y a eu transversion suite à la réplication de l'ADN, MUTYH va reconnaître cette association incorrecte et va retirer l'adénine apparié à la 8OH-
2055 dG [Oka et al. 2015].
- **NEIL1** (*Nei Like DNA Glycosylase 1*) : Neil1 va reconnaître et exciser les formes alternatives de la guanine telle que FapyGuanine [Galick et al. 2017].



2060 Figure CH5-6 : Oxydation de la guanine et enzymes de détection de la voie BER (Illustration personnelle)
 La guanine se trouve sous forme libre dans la cellule (dGTP libre), ou sous forme complexée à l'ADN (G).

3.1.2. Elimination du désoxyribose

2065 Les sites abasiques, formés de façon directe par hydrolyse spontanée ou indirectement au cours de la réparation par excision de base (BER) sont détectés par la protéine APEX1 (*Apurinic/Apyrimidinic Endodeoxyribonuclease 1*). Elle catalyse l'incision du squelette phosphodiester immédiatement adjacent aux dommages, générant une cassure simple brin. Au sein de la voie BER, cette action peut aussi être réalisée par une ADN glycosylase qui possède cette activité nucléase.

2070

Les cassures simple brin directs, générées par la désintégration du sucre oxydé sont reconnues par PARP1 (*poly(ADP-ribose) polymérase 1*, D'amour et al, 1999) qui s'active. Elle se modifie elle-même par ajout de chaînes ramifiées de poly (ADP-ribose). Il est à noter que les PARP1 sont aussi activées lors de l'apparition de cassures SB qu'elles soient générées par BER ou par des attaques directes sur l'ADN [Durkacz et al. 1980]. PARP1 permet l'accumulation de la protéine XRCC1 (*X-ray repair cross complementing 1*), échafaudage moléculaire qui permettra la stabilisation et l'activation d'effecteurs en aval, notamment de la ligase 3 (LIG 3) et de l'ADN polymérase β (pol β , Caldecott, 2003). XRCC1 est impliquée dans la réparation des cassures

2075

simple brin, la réparation par excision des bases (BER) et la dernière étape de la réparation
2080 par excision des nucléotides (NER) [London, 2015]

3.1.3. Synthèse de l'ADN et ligation

L'ADN polymérase β , en se basant sur le brin complémentaire, synthétise le nucléotide
2085 manquant. On parle de réparation par « *short patch* » dans le cas où un seul nucléotide est
rajouté au niveau du site abasique. Cependant, il existe un deuxième sous-modèle appelé
« *long patch* » : lors de la synthèse du nucléotide manquant, l'ADN polymérase β , δ/ϵ et PCNA
entrent en jeu et génèrent un fragment plus long, ne pouvant alors être relié à l'extrémité
correspondante et générant une portion d'ADN SB non appariée. C'est cet ADN flottant qui
2090 est coupé et excisé par l'enzyme FEN1, (Flap endonuclease 1, Hoeijmakers, 2001). Enfin la
cellule va faire appel à la ligase 3 qui permet de restaurer l'intégrité de la double hélice d'ADN
(Figure CH5-7).

Les cassures SB non réparées dans les cellules en prolifération peuvent entraîner le blocage
ou l'effondrement des fourches de réplication de l'ADN, conduisant éventuellement à la
2095 formation de cassures DB [Kuzminov et al. 2001]. Ces cassures DB vont activer la voie ATM.

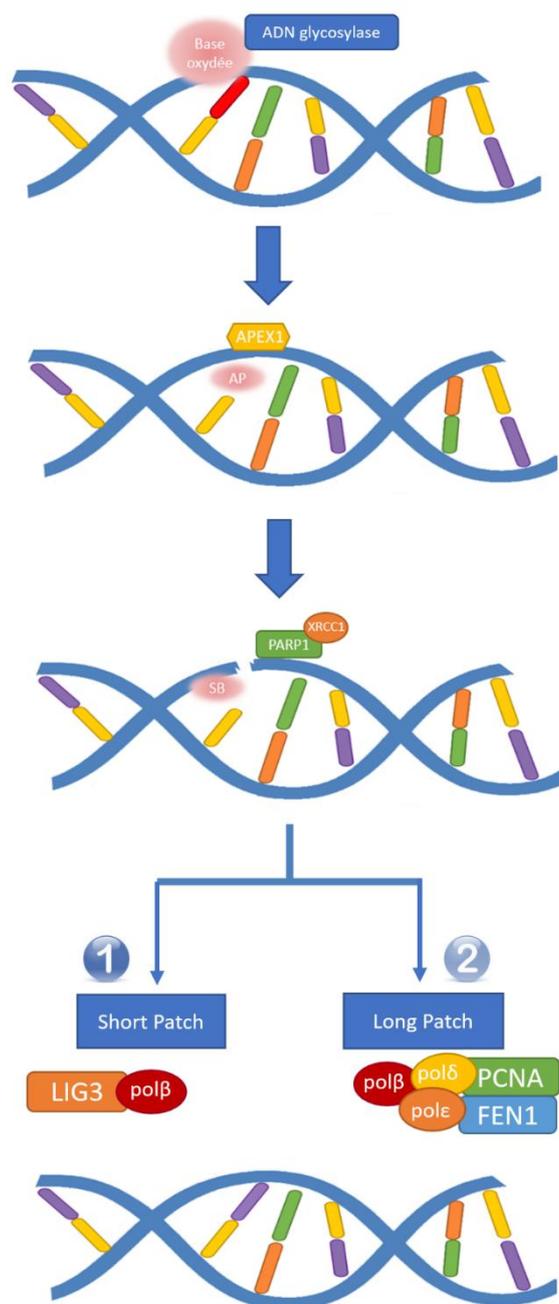


Figure CH5-7 : réparation de l'ADN par « base excision repair » BER lors de l'oxydation de l'ADN (Illustration personnelle)

L'élimination de la base oxydée est réalisée principalement par une ADN glycosylase qui conduit à l'apparition d'un site abasique (AP), reconnu par APEX1. Ce dernier permet l'élimination du désoxyribose et induit une cassure simple brin qui est reconnue par PARP1 et XRCC1. Ces molécules permettent la synthèse et la ligation de l'ADN via la voie 1 : « short patch » où interviennent la polymérase β et la ligase 3 (LIG 3) ou via la voie 2 « Long Patch » avec les polymérases β, δ, ϵ , PCNA et FEN1. Les deux voies aboutissent à la réparation de l'ADN.

3.2. Détection cassure double brin : voie ATM

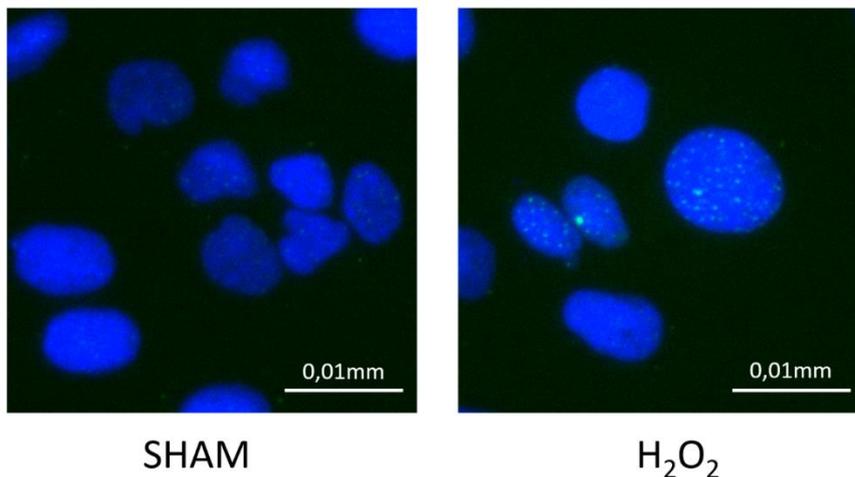
2100

3.2.1. Voie canonique

2105

2110

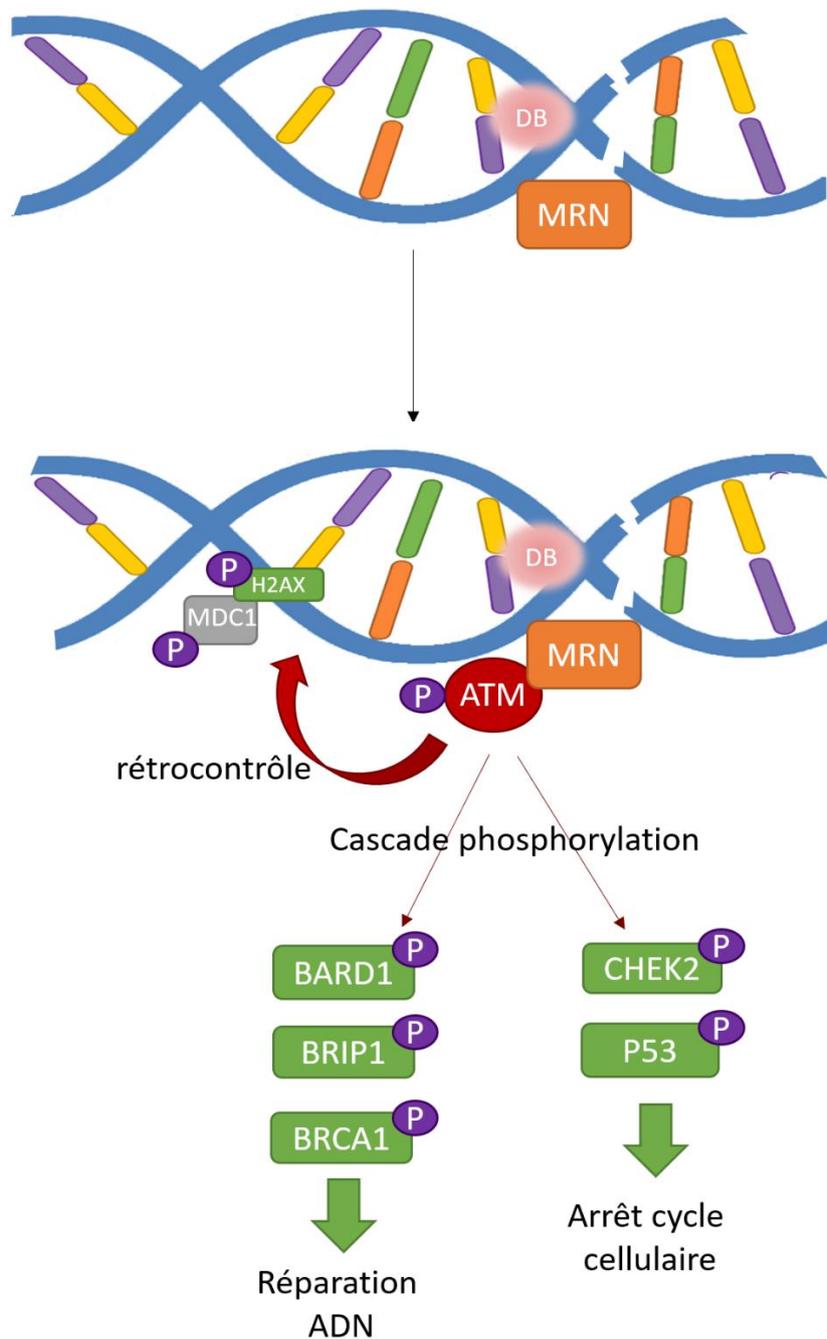
La détection des cassures double brin induites par le stress oxydatif se fait principalement par la voie ATM [Kozlov et al. 2016] qui va mobiliser un réseau de signalisation extrêmement étendu et finement régulé [Shiloh et al. 2013]. L'évènement qui active la protéine ATM, après l'induction des cassures DB fait toujours objet de débats et semble être dépendant de plusieurs complexes protéiques. Cependant, l'agrégation au site de cassure du complexe protéique MRE11-RAD50-NBS1 appelé complexe-MRN semble indispensable pour recruter et activer la kinase ATM [Lavin, 2008]. ATM se trouve sous forme de dimères inactifs dans le noyau et le cytoplasme. Après l'induction des cassures DB, les protéines d'ATM cytoplasmiques vont être transloquées dans le noyau et les protéines d'ATM nucléaires s'autophosphorylent en monomères actifs [Bakkenist et al. 2003] qui s'agrègent sous forme de foci (Figure CH5-8). Cette autophosphorylation s'effectue via différents sites de phosphorylation [Kozlov et al. 2016].



2115

Figure CH5-8 : Agrégation sous forme de foci d'ATM nucléaire

Induction de foci après traitement des cellules HaCaT au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), 2h à 0,5 mM



2120

Figure CH5-9 : Réparation des cassures double brin (DB) par la voie ATM (illustration personnelle)

Les cassures double brin sont détectées par le complexe MRN qui permet l'activation et la phosphorylation de ATM. ATM phosphoryle de nombreuses cibles protéiques : H2AX et MDC1 qui permet de recruter et activer d'autres protéines ATM ; BARD1, BRIP1 et BRCA1 impliquées dans la réparation de l'ADN ou encore CHEK2 et P53 permettant l'arrêt du cycle cellulaire.

2125

ATM-p va entraîner des cascades de phosphorylation. La phosphorylation des effecteurs est un point central dans la voie ATM. On estime à plus de 700 le nombre de ces cibles, impliquées dans de multiples contrôles cellulaires tels que la progression du cycle, la réparation de l'ADN,

2130 la réponse au stress génotoxique et le maintien de la stabilité génétique [Derheimer et al. 2010, Shiloh et al. 2013]. Parmi ses cibles, ATM-p phosphoryle la queue de l'histone H2AX (γ H2AX) qui recrute MDC1 (*mediator of DNA damage checkpoint protein 1*). Cette association protéique entraîne une boucle de rétrocontrôle positive au maintien et au recrutement de ATM [Jungmichel, et al. 2012]. De plus MDC1 permet le recrutement des protéines BARD1
2135 (*BRCA1 Associated RING Domain 1*), BRIP1 (*BRCA1 Interacting Helicase 1*), BRCA1 (*BRCA1 DNA Repair Associated*) impliquées dans la réparation de l'ADN [Doil et al. 2009 ; Gudjonsson et al. 2012]. D'autres cibles, comme CHEK2 (*Checkpoint kinase 2*), p53 (*Tumor Protein 53*) sont impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire [Ciccia & Elledge, 2010 ; Jackson & Bartek, 2009 ; Figure CH5-9).

2140 La réparation des cassures DB est ensuite médiée soit

- Par recombinaison homologue (**HRR**) qui permet l'échange de fragments d'ADN entre des ADN possédant des séquences identiques [Szostak et al. 1983].
- Par une réparation par jonction d'extrémités non homologues (**NHEJ**) c'est-à-dire par ligation des extrémités de la cassure de l'ADN [Hefferin & Tomkinson, 2005].

2145 L'hypothèse privilégiée durant cette étude est l'implication d'un stress oxydant induit par les OMM. De ce fait, les voies de réparation **HRR** et **NHEJ**, spécifique des cassures double brin, ne seront pas décrites dans cet exposé. En effet, la voie ATM a été privilégiée dans cette étude car elle est aussi impliquée dans des phénomènes d'oxydation comme il est expliqué dans le paragraphe suivant.

2150

3.2.2. Voie ATM indépendant des cassures DB

De nouvelles études suggèrent que ATM serait impliquée dans d'autres réponses telle que la réponse au stress oxydatif en l'absence de dommages à l'ADN [Bhatia et al, 2018 ; Guo et al,
2155 2020]. Kovlov et son équipe (2016), en utilisant l' H_2O_2 à 0,5 mM ont pu mettre en évidence la phosphorylation d'ATM. ATM serait dans ce cas un senseur du stress oxydatif [Guo et al. 2010]. Son autophosphorylation serait indépendante du complexe MRN et resterait sous forme de dimères cytoplasmiques. La cascade de phosphorylation en aval semble plus

restreinte que celle impliquée dans les cassures DB, et serait donc moins facilement mise en
2160 évidence par l'expérimentation. Le chevauchement des substrats de ces deux signalisations
n'est pas encore déterminé [Alexander et al. 2010, Bakkenist et al. 2003]. ATM semble être
une kinase polyvalente impliquée dans de nombreux stress grâce à des mécanismes
d'activation distincts aujourd'hui toujours incompris.

Dans le cadre du projet concernant l'innocuité des OMM, les deux voies BER et ATM ont été
2165 investiguées en réponse aux lésions de l'ADN par oxydation. Cependant, il est à noter que ces
lésions peuvent induire un stress répliatif que nous ne pouvons ignorer.

3.3. Stress répliatif : voie ATR

2170 Comme vu précédemment, les lésions de l'ADN induites par un stress oxydant peuvent
entraîner un stress répliatif en désynchronisant les polymérase et les hélicase [Byun et al.
2005]. L'ADN simple brin déroulé va être protégé par la protéine RPA (*Replication Protein A1*,
Wold 1997]. Plus l'ADN SB est déroulé, plus la protéine RPA va s'accumuler et recruter ses
partenaires TOBP1 (*DNA topoisomerase 2-binding protein 1*), RAD17 (*RAD17 Checkpoint*
2175 *Clamp Loader Component*) et le complexe 9-1-1 (HUS1, RAD1, RAD9, Byun et al. 2005). Cette
plateforme de signalisation va permettre le recrutement et l'activation par phosphorylation
de ATR et ATRIP (*ATR Interacting Protein*). Tout comme la voie ATM, on retrouve la
phosphorylation d'effecteurs comme clef de voute de la voie ATR. ATR-p va réaliser des
phosphorylations en cascades afin d'activer des régulateurs du cycle cellulaire tel que CHEK1
2180 (*Checkpoint kinase 1*). CHEK1-p et ATR-p sont considérées comme les marqueurs du stress
répliatif (Figure CH5-10). Cependant, il est à noter que l'activation de l'ensemble de la voie
ATR nécessite un stress répliatif important. En effet, lors d'un stress répliatif localisé, c'est-
à-dire sur une ou quelques fourches de répliation, il est possible que seul ATR soit
phosphorylé sans pour autant entraîner une réponse globale de la voie ATR et des checkpoints
2185 associés [Koundrioukoff et al. 2013]. Il est alors difficile de mettre en évidence une activation
de cette voie.

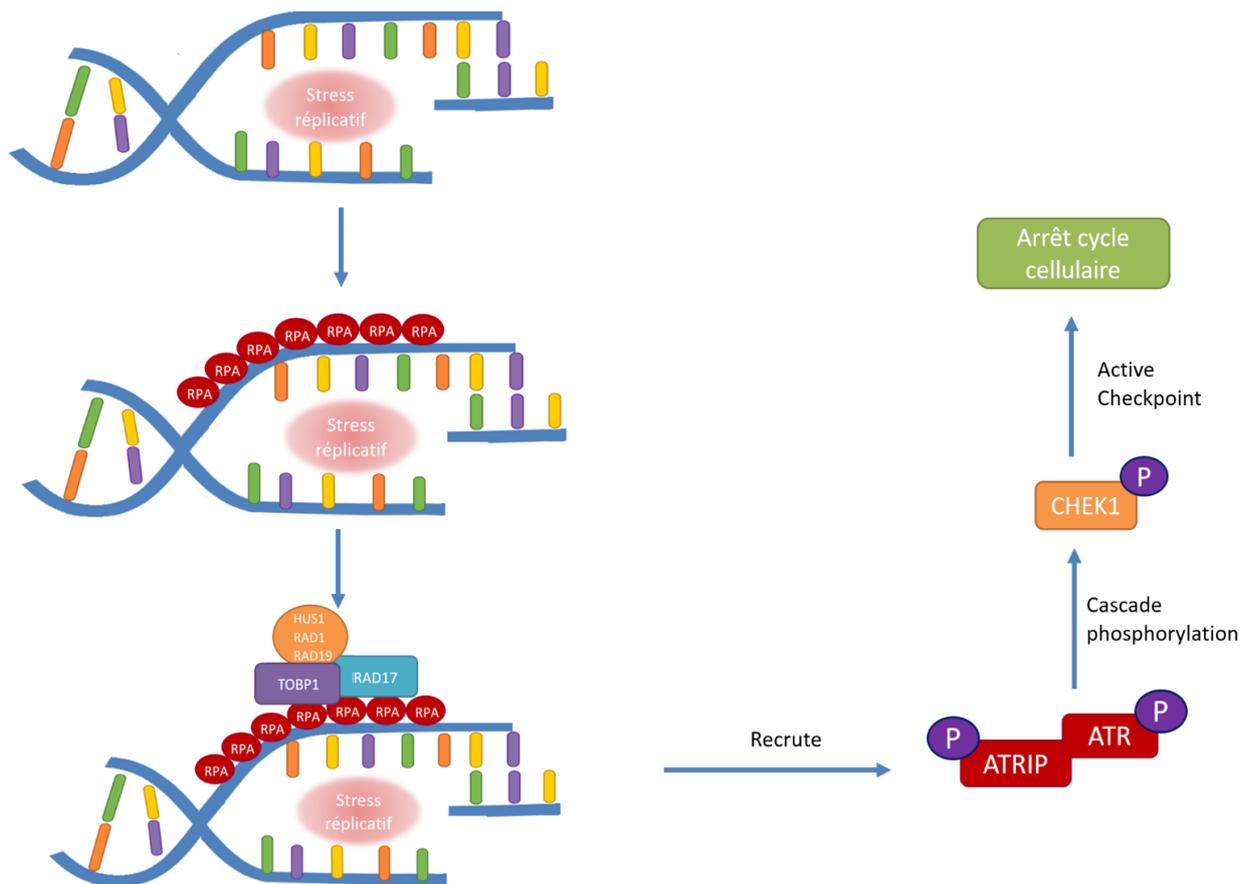


Figure CH5-10 : Réparation d'un stress réplcatif par la voie ATR (illustration personnelle)

2190 L'ADN simple brin déroulé lors de la réplcation de l'ADN est détecté et protégé par les protéines RPA. Ces dernières recrutent TOBP1, RAD17 et le complexe HUS1, RAD1 et RAD19 qui permettent la phosphorylation d'ATRIP et d'ATR. ATR phosphoryle de nombreuses cibles protéiques comme CHEK1.

3.4. Résilience des voies de réparation de l'ADN

2195

La richesse des voies de réparation de la cellule lui permet de faire face à la diversité des dommages à l'ADN qu'elle peut rencontrer. Néanmoins, il existe certains chevauchements des effecteurs des différents systèmes qui entraînent une grande résilience de la réparation de l'ADN. De plus, bien qu'elles aient été présentées séparément, ces voies sont imbriquées les unes dans les autres. Par exemple, un stress réplcatif prolongé induit l'apparition de cassures double brin qui activent la kinase ATM [Saintigny et al. 2001 ; Petermann et al. 2010]. Enfin, il existe d'autres voies de réparation telles que la voie NER, plutôt spécialisé dans la réparation

2200 unes dans les autres. Par exemple, un stress réplcatif prolongé induit l'apparition de cassures double brin qui activent la kinase ATM [Saintigny et al. 2001 ; Petermann et al. 2010]. Enfin, il existe d'autres voies de réparation telles que la voie NER, plutôt spécialisé dans la réparation lié à des adduits chimiques à l'ADN ou à des pontages, citée plus haut. Ou encore la voie MRR

2205 « Mismatch repair » spécialisée dans la reconnaissance et la réparation des mésappariements de l'ADN. Bien que des tests aient été effectués sur l'implication de ces deux systèmes (Résultats non montrés), la littérature concernant les radiofréquences (RF), ne montrent que peu ou pas d'éléments quant à leur utilisation.

4. OMM et stress génotoxique

2210 4.1. Littérature

2215 Ce projet se consacre aux ondes millimétriques et leur impact sur le stress génotoxique. Cependant, historiquement, nous ne pouvions faire l'impasse sur les nombreuses études réalisées dans le domaine des radiofréquences qui est le point de départ des craintes et des interrogations du grand public quant à la dangerosité des ondes électromagnétiques. Dans le domaine du bio-électromagnétisme, la recherche de lésions à l'ADN est principalement réalisée par deux tests :

2220 - **Le test des comètes** qui permet de quantifier le taux de cassures simple ou double brin à l'ADN. L'ADN est déposé sur un gel d'électrophorèse et migre selon sa taille. Les cassures fragmentent l'ADN. Plus l'ADN est fragmenté, plus il migre dans le gel, formant ainsi une comète (ADN non fragmenté) et sa queue (ADN fragmenté). La longueur de la queue et la quantité d'ADN sont quantifiés.

2225 - **Le test des micronoyaux** permet de déterminer si la cellule a subi des cassures double brin ou des anomalies dans la ségrégation des chromosomes durant la mitose. Les micronoyaux sont des fragments de chromosomes ou des chromosomes entiers qui sont séparés du reste du génome lors de la division cellulaire formant ainsi un « faux noyau » bien individualisés dans le cytoplasme de la cellule. Toutefois, ces événements étant assez rares, leur quantification nécessite l'analyse d'un grand nombre de cellules.

2230 En 2011, les ondes radiofréquences ont été classées dans la classe 2B « cancérigène possible » par le centre international de recherche sur le cancer (CIRC), sur la base d'études

épidémiologiques montrant une corrélation entre « utilisation intensive de téléphones portables » et « risque de tumeur cérébrale » [Cardis et al. 2011]. Pour autant, aucun mécanisme précis de cancérogenèse n'a été mis en évidence. Une cinquantaine d'articles se sont intéressés à la génotoxicité des RF. De très bons rapports et revues existent sur le sujet, reprenant point par point chaque étude et parfois discutant de l'importance des contrôles et de la qualité technique dans le domaine pour interpréter les résultats [ANSES 2013, Verschaeve et al. 2010, Vijayalaxmi et al. 2012 et 2018, Kocaman et al. 2018]. Sans pour autant avoir le désir de réaliser un état de l'art exhaustif dans les RF, on peut citer certaines études récentes qui montrent que les radiofréquences pourraient entraîner des effets génotoxiques par divers mécanismes : soit en augmentant le nombre de cassures à l'ADN en *in vitro* et *in vivo* [Alkis et al. 2019 ; Ioniță et al. 2021], ou en diminuant les machineries de réparation [Markova et al. 2010, Sanie-Jahromi et al. 2018, Fragopoulos et al. 2018]. L'augmentation des lésions à l'ADN peut entraîner des mutations, premier pas vers la cancérogenèse. Cependant, on peut citer d'autres articles qui réfutent ces résultats, ne montrant que peu ou pas de dégâts sur l'ADN des cellules cultivées [Lerchl et al. 2020, Hansteen et al. 2009, Ziemann et al. 2009, Hintzsche et al. 2010] voire même une protection de l'ADN via un agent génotoxique [Robison et al. 2002, Jin et al. 2015]. Du fait de la grande variabilité des résultats, des fréquences et des modèles utilisés, Vijayalax et al (2012) réalisent une méta-analyse de 88 publications étudiant les RF et le stress génotoxique. Ils concluent que, à quelques exceptions près, « les indices de génotoxicité chez les témoins exposés et non exposés aux RF se situaient à l'intérieur des indices spontanés rapportés dans les bases de données ». De plus, de nombreuses études réalisées sur des animaux, irradiés durant toute ou une grande partie de leur vie ne montrent aucun effet déterministe en condition athermique [Ziemann et al., 2009 ; Zook et al. 2006, Shirai et al. 2005 et 2007, Heikkinen et al. 2006, Oberto et al., 2007, Smith et al., 2007, Tillmann et al. 2007]. Ces résultats suggèrent que le potentiel stress génotoxique induit par les RF n'est pas suffisamment élevé pour induire d'effet déterministe. Cependant, cela n'enlève pas la possibilité d'induire des cassures sans dépasser les systèmes de réparation. De ce fait, le doute subsiste. Qu'en est-il des ondes millimétriques ?

2260

Bien que les OMM soient des ondes un peu plus énergétiques que les RF et déposent plus d'énergie électromagnétique à la surface des tissus, elles restent relativement proches des

radiofréquences et pourraient partager les mêmes propriétés. En outre, la littérature dans ce domaine est très faible. De 1984 à 2021, seulement 11 études (6 *in vitro*, 5 *in vivo*) se sont intéressées à l'impact des OMM sur l'ADN et leurs résultats sont contradictoires (pour inclure un maximum de données, les papiers travaillant sur les ondes électromagnétiques de 15 GHz à 110 GHz ont été conservés, [Tableau CH5-1](#)):

4 études *in vitro* n'ont montré aucune cassure à l'ADN après exposition aux OMM

- [Koyoma](#) et son équipe, en 2016 et 2019 ont soumis des cellules épithéliales cornéennes humaines (HCE-T) et des cellules épithéliales du cristallin humain (SRA01/04) dérivées de l'œil humain à des fréquences de 45 et 60 GHz, pendant 24h à 1 mW/cm², qui correspond à la limite d'exposition du grand public. Il est cependant à noter que cette puissance est inférieure à celle utilisée en thérapie. Aucun effet n'a été détecté dans les cassures d'ADN (test des comètes), ni de formation de micronoyaux. Ils en concluent que les OMM n'induisent pas de stress génotoxique aux cellules oculaires humaines.
- De même [Hinstzche](#) et al. (2012) ont étudié l'impact génotoxique des OMM à 106 GHz, à 2 mW/cm² sur des kératinocytes (HaCaT) et des fibroblastes (HDFa) pendant 2h à 24h. Le test des comètes n'a pas montré de cassures à l'ADN après exposition et ils n'ont détecté aucune formation de micronoyaux.
- Cependant, [Gapeyev](#) et son équipe (2014) ont pu montrer un effet protecteur des OMM à un agent oxydant. Ils ont exposé des leucocytes de souris à 42 GHz, à 0,1 mW/cm², pendant 20 minutes avant de les traiter au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂, à 4,6 nM). Ils ont observé une diminution des dommages à l'ADN de 20-45% dans les cellules exposées. Ils soumettent l'idée que les OMM ont un effet protecteur de l'ADN. Cette hypothèse d'une **réponse adaptative** c'est-à-dire d'une meilleure résistance à un agent génotoxique, s'il y a eu en aval une pré-exposition aux ondes électromagnétiques, est retrouvée dans les radiofréquences. Ainsi, cette étude est à rapprocher de celles réalisées sur les RF non-ionisantes montrant des réponses adaptatives *in vitro* et *in vivo* ([Jin et al. 2015](#), [Sannino et al. 2009 et 2014](#), [Cao et al. 2014](#)). Les mécanismes ne sont pas encore clairement compris, cependant les voies de réparation de l'ADN et les systèmes de détoxification des ROS semblent jouer un rôle important ([Vijayalaxmi et al. 2014](#)).

2 études *in vitro* ont montré un effet génotoxique :

- 2295 - Franchin [et son équipe \(2018\)](#) ont travaillé sur des fibroblastes humains fœtaux en les exposant à des OMM à une fréquence de 25 GHz, à 2 mW/cm² pendant 24h. Ils ont recherché des cassures à l'ADN par le test des comètes sans trouver de différences significatives. Cependant, ils ont observé une augmentation significative des micronoyaux d'un facteur +1,5 dans les cellules après exposition. Ils défendent alors l'idée que les OMM pourraient induire une augmentation de l'aneuploïdie (c'est-à-dire une mauvaise division des chromosomes durant la mitose) plutôt que des lésions directes sur l'ADN.
- 2300 - De même, [Gallerano et son équipe \(2015\)](#) ont exposé des fibroblastes humains à 25,26 GHz, à 20 mW/cm². Ils ont observé une augmentation des micronoyaux après exposition (facteur +2).
- 2305 - Ces résultats ont été corroborés par [Korenstein-Ilan et son équipe, \(2008\)](#) qui se sont intéressés aux lymphocytes humains. Ils les ont exposés aux OMM de 100 GHz, à 0,031 mW/cm² pendant 1h, 2h et 24 h. Ils ont pu observer une répllication asynchrone des centromères 1,5 fois plus élevée que dans les cellules non exposées, en utilisant une technique l'hybridation *in situ* en fluorescence interphase (FISH).

1 étude *in vivo* n'a pas noté d'effets :

- 2310 - [Logani et al. \(2004\)](#), ont exposé des souris adultes (N=8 souris par groupes) à 42,2 GHz, à 31 mW/cm², 30 minutes par jour pendant 3 jours. Ils ont ensuite prélevé les érythrocytes polychromatiques du sang périphérique et des cellules de la moelle osseuse, 24h après le traitement. Ils n'ont pas observé d'augmentation des micronoyaux dans les échantillons exposés.

2315 3 études *In vivo* ont montré un effet :

- 2320 - [Paulraj et al, \(2006\)](#) ont exposé des rats à 16 GHz, à 1 mW/cm², 2h par jour pendant 35 jours et ont prélevé les cerveaux. Leur étude a montré une augmentation significative des cassures simple brin de l'ADN dans les cellules cérébrales du rat par le test des comètes (induction de la migration en µm de la queue de l'ADN d'un facteur +1,4 par rapport au SHAM, moyenne réalisée sur 100 cellules, N= 6 rats par groupes).

2325 - En utilisant la même technique, en 2009, Kesari et al, ont travaillé avec des fréquences de 50 GHz à un très faible niveau de puissance (86 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) en exposant des rats 2h par jour pendant 45 jours. Ils ont observé une migration de la queue de la comète d'un facteur +6,23 après expo (N=6 rats par groupe). Ils concluent que l'exposition chronique à ces radiations provoque une rupture double brin de l'ADN dans les cellules cérébrales de rats.

- Enfin, Kumar et al (2010) se sont intéressés à l'induction de micronoyaux dans les cellules sanguines et le sérum de rats. Les rats ont été exposés à 50 GHz, à 0,21 mW/cm², 2h par jour pendant 45 jours. Ils ont observé une augmentation de micronoyaux +1,6 fois supérieur dans l'EXPO que dans le SHAM (N=6 rat dans chaque groupe).

2330 Le peu d'études dans ce domaine et les résultats contradictoires ne permettent pas d'arriver à quelque conclusion que ce soit. Néanmoins, quelques tendances semblent ressortir qui nécessiteraient des confirmations expérimentales.

⇒ *In vitro*, il est difficile de rechercher des corrélations entre les différentes études puisqu'elles utilisent des modèles, des fréquences, des puissances et des temps différents.

2335 Il semblerait tout de même qu'il n'y ait pas d'effets génotoxiques directs sur l'ADN mais plutôt des effets d'aneuploïdie.

⇒ Cependant *in vivo*, certains points se démarquent :

2340 - Il semblerait que le temps d'exposition puisse avoir un impact sur la génotoxicité : l'étude sans effet a été réalisée avec un temps d'exposition aiguë (3 jours) alors que les études avec effets sont réalisées avec des expositions chroniques (35 et 45 jours).

- Cependant, l'étude sans effet rassemble un plus grand nombre de souris par groupe (N= 8) par rapport aux études démontrant un effet (N= 6)

2345

Tableau CH5-1 : Études expérimentales portant sur les OMM et l'effet génotoxique.

Nom 1er auteur	Fréquence (GHz)	IPD (mW/cm ²)	Modèle	Effet génotoxique	Ratio (EXPO/SHAM)
Korenstein-Ilan 2008	100	0,031	<i>In vitro</i> Lymphocytes humains	Instabilité chromosomique	+1,5
Franchini 2018	25	2	<i>In vitro</i> Fibroblastes humain	Pas de lésion ADN mais induction aneuploïdie (comète, micronoyaux)	+1,5
Gapeyev 2014	42	0,1	<i>In vitro</i> Leucocytes de souris	Diminution dommage ADN par H ₂ O ₂ après expo (comètes)	/
Hintzsche 2012	106	0,04–2	<i>In vitro</i> Kératinocytes (HaCaT) Fibroblastes (HDFA)	Pas de lésion ADN (comète, micronoyaux)	/
Koyama 2016	60	1	<i>In vitro</i> Cellules épithéliales yeux humains	Pas de lésion ADN (comète, micronoyaux)	/
Koyama 2019	45	1	<i>In vitro</i> Cellules épithéliales yeux humains	Pas de lésion ADN (comète, micronoyaux)	/
Kesari 2009	50	0,00086	<i>In vivo</i> N=6 rats	Lésion ADN (comète)	+6,23
Paulraj 2006	16.5	1	<i>In vivo</i> N=6 rats	Lésion ADN (comète)	+1,4
Kumar 2010	50	0,21	<i>In vivo</i> N=6 rats	Lésion ADN (micronoyaux)	+1,6
Logani 2004	42	31	<i>In vivo</i> N=8 souris	Pas de lésion ADN (micronoyaux)	/
Gallerano 2015	25,58	20	<i>In vitro</i> Fibroblastes humains	Lésion ADN (micronoyau)	+2

- ⇒ En comparant les études *in vivo* et *in vitro* : une tendance se dessine en fonction du modèle utilisé. En effet, avec des expositions aiguës *in vivo* et *in vitro*, aucun effet n'est généralement mis en évidence. Alors qu'en *in vivo*, avec des expositions chroniques, des effets génotoxiques sont retrouvés. Or si le rayonnement électromagnétique, à ces fréquences, induisait un effet direct sur l'ADN, c'est-à-dire des cassures à l'ADN, il devrait être mis en évidence, *in vivo* et *in vitro*, quel que soit le temps d'exposition. Or il semblerait qu'un besoin d'accumulation dû à une exposition chronique soit nécessaire pour induire de la génotoxicité, argumentant vers un mécanisme d'action indirect.
- 2350
- ⇒ Toutes ces tendances et ces interrogations mettent en évidence le besoin d'études complémentaires dans ce domaine.
- 2355

Dans l'ensemble, il n'y a aucune preuve confirmée que les OMM causeraient des dommages génotoxiques. Ces résultats contradictoires peuvent être dus à des différences de fréquence, de densité, de puissance ou de conception expérimentale entre les différentes études. De ce fait, les facteurs sous-jacents à ces divergences nécessitent une enquête plus approfondie. D'autant qu'aucune étude n'a été réalisée à des niveaux de puissance utilisés en thérapie. Il est ainsi important d'étudier l'impact des OMM dans nos conditions. Dans ce contexte hétérogène, l'utilisation d'un modèle *in vitro* a été choisi afin de tester nos hypothèses. L'objectif est de fournir un peu plus de matière sur l'impact direct des OMM dans le stress génotoxique en utilisant des techniques innovantes, tout en se rapprochant au maximum des conditions d'utilisation du dispositif REMEDEE.

2360

2365

4.2. Techniques utilisées

Les tests utilisés traditionnellement pour détecter des dommages à l'ADN (test des comètes et test des micronoyaux), dans le domaine de la bio-électromagnétique sont très efficaces lorsque l'agent génotoxique induit des dommages importants. Cependant, ils manquent de sensibilité lorsque l'agent génotoxique est faible. Dans ce cas, ils peuvent entraîner des artefacts. Or nous pensons que, si stress génotoxique il y a, il se trouve très proche du bruit de fond et est très rapidement pris en charge par les différents systèmes de réparation, ce qui

2370

2375

le rend difficilement détectable. Il est donc indispensable d'utiliser d'autres techniques plus sensibles.

Afin d'étudier l'impact de l'exposition, trois techniques ont été réalisées (Figure CH5-11) :

- 2380
- **1)** L'analyse des effets directs, en étudiant l'oxydation de l'ADN grâce à la 8OH-dG par immunofluorescence.
 - L'analyser des systèmes de réparation : Si stress génotoxique il y a, les systèmes de réparation de l'ADN présentés dans la section **I.1 Lésions oxydatives de l'ADN** devraient être activés. Deux approches d'analyse des voies de réparation ont été utilisées :
- 2385
- **2)** L'étude d'un effet précoce en regardant l'activation de facteurs impliqués dans les voies de réparation de l'ADN grâce à la phosphorylation. La phosphorylation et la déphosphorylation des protéines sont des processus réversibles et hautement dynamiques qui peuvent se produire en quelques minutes, ou quelques heures (Olsen et al. 2006). De ce fait, cette approche nous permet d'analyser l'impact des OMM sur
- 2390
- l'activation par phosphorylation de certaines protéines impliquées dans la réparation de l'ADN.
 - **3)** Un effet retardé en analysant l'expression génétique de ces facteurs et notamment des senseurs par deux méthodes :
- Une étude transcriptionnelle par RT-qPCR
- 2395
- Une étude des niveaux protéiques par immunofluorescence grâce à des anticorps dirigés contre la protéine totale, permettant une détection complètement indépendante des niveaux de phosphorylation.

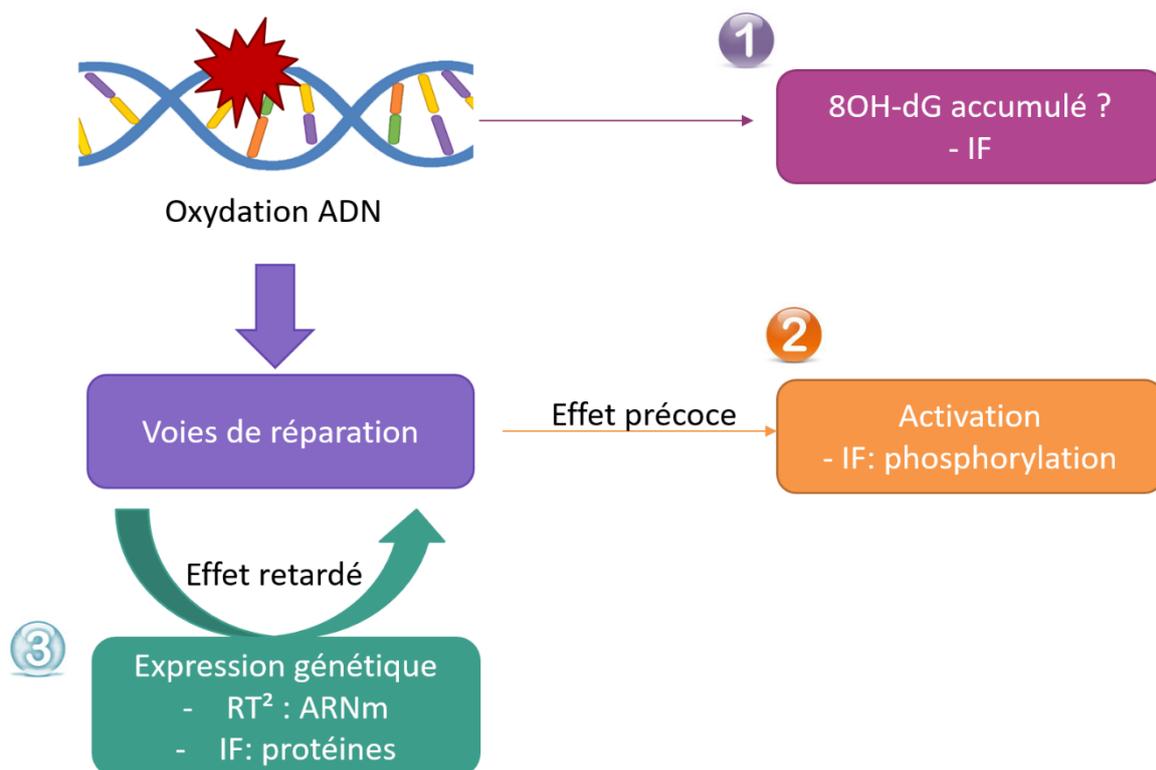


Figure CH5-11 : 3 techniques utilisées dans la recherche de génotoxicité

2400 RT² (méthode de RT-qPCR, IF (méthode d'immunofluorescence)

II- Résultats

2405 Pour cette étude de génotoxicité, la configuration de l'exposition de l'appareil REMEDEE n'était pas adaptée aux techniques utilisées. En effet, seul 1 puits ou 4 puits pouvaient être exposés sur une plaque de 6-puits ou 96-puits respectivement. Pour gagner en efficacité et en temps, seul l'appareil IETR a été utilisé, excepté pour les expériences d'analyses par RT² (voir chapitre 2 : matériels et méthodes).

2410 Tout comme pour le chapitre 3, les cellules HaCaT ont soit été exposées (EXPO- en rouge) à 60 GHz, à 15 mW/cm² pendant 1h ou 24h avec le dispositif de REMEDEE ou de l'IETR, soit non exposées (SHAM- en vert) soit soumis à une température qui mime l'effet thermique retrouvé pendant l'exposition (TC- en jaune). De plus, des tests chimiques (peroxyde d'hydrogène H₂O₂

en bleu et le bromate de potassium KBrO_3 en violet) sont réalisés en tant que contrôle pour valider nos approches.

2415

1. Impact des ROS sur l'oxydation de l'ADN

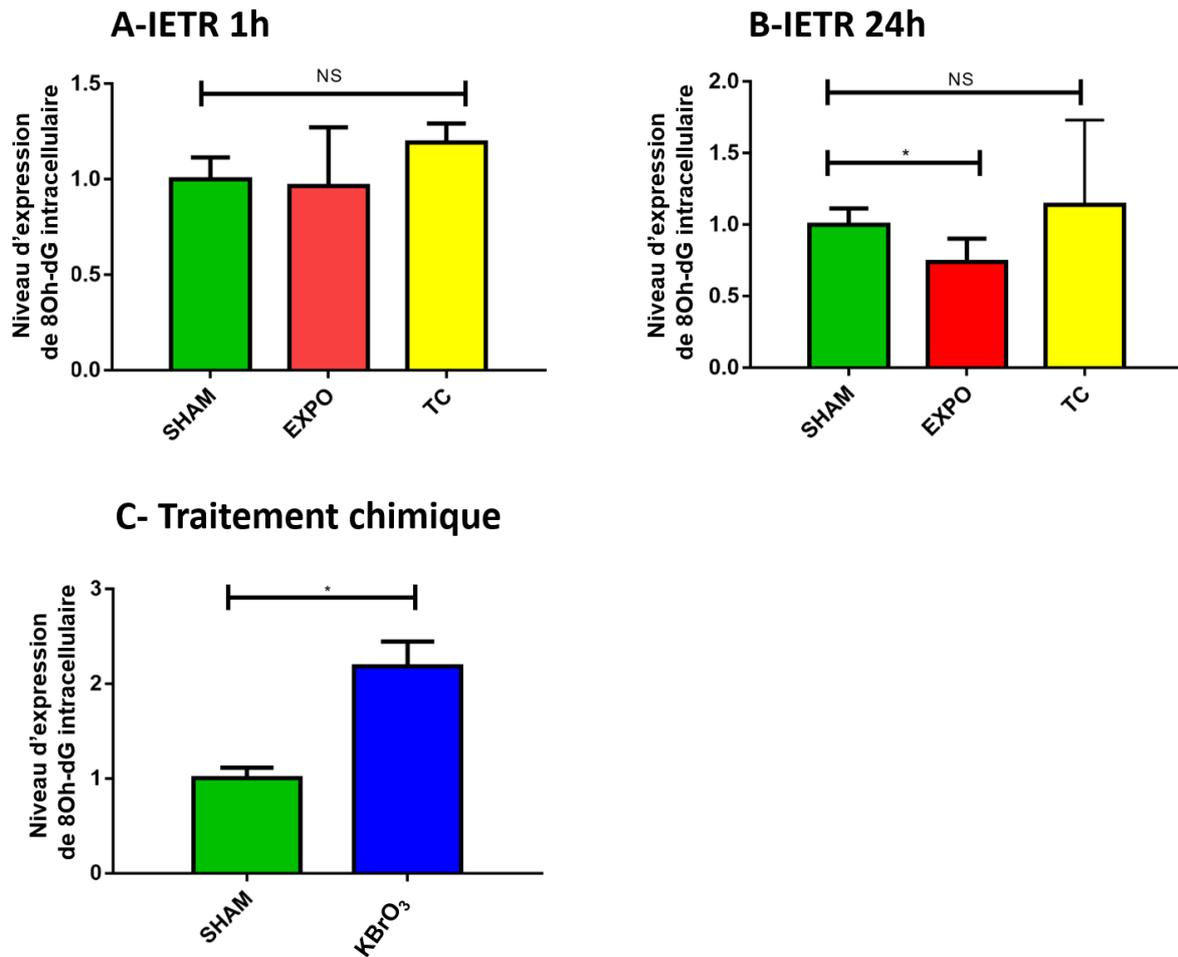


Figure CH5-12 : Concentration intracellulaire en 8OH-dG

2420 Niveau d'expression de 8OH-dG analysé par Immunofluorescence entre les cellules exposées (EXPO) ou non (SHAM) et le contrôle thermique (TC) pendant 1h (A) et 24h (B). Le bromate de potassium (KBrO_3) à 1 mM pendant 16h a été utilisé comme contrôle technique. Les histogrammes représentent le ratio de l'intensité de fluorescence de 8OH-dG dans les différentes conditions par rapport au SHAM +/- l'écart type des réplicats biologiques, N=4. Les tests non paramétriques Mann Whitney avec correction de Bonferroni ont été utilisés (*<0,016 ; NS : non significatif)

2425

L'analyse de l'oxydation de l'ADN par les ROS a été effectuée en étudiant l'oxydation de la 8OH-dG par immunofluorescence. Une précédente étude, dans notre laboratoire, avait mis en évidence une augmentation significative de la concentration de 8OH-dG dans le milieu de culture après 24h d'exposition en condition athermique (60 GHz, 20 mW/cm², 24h, [Le Pogam et al. 2019](#)). Cette augmentation de l'oxydation de la guanine est-elle retrouvée dans la cellule ? Après 1h00 d'exposition, aucune différence dans la concentration de 8OH-dG entre SHAM, EXPO ou encore TC n'a été mise en évidence ([test de Mann Whitney avec correction de Bonferroni, EXPO-1h_{pvalue}= 0,66 ; TC-1h_{pvalue}= 0,59 ; Figure CH5-12 A](#)). Cependant, après 24h d'exposition, une diminution significative de la concentration en 8OH-dG a été retrouvée. Cette baisse n'est pas reproduite par le chauffage seul (TC) ([test de Mann Whitney avec correction de Bonferroni, EXPO-24h_{pvalue}= 0,004; TC-24h_{pvalue}= 0,1 ; Figure CH5-12 B](#)). L'utilisation de KBrO₃, à 1 mM pendant 16h a montré une nette augmentation de la concentration de 8OH-dG dans la cellule démontrant ainsi qu'un stress oxydant induit une augmentation de la 8OH-dG intracellulaire ([test de Mann Whitney avec correction de Bonferroni, KBrO₃_{pvalue}= 0,0022 ; Figure CH5-12 C](#)).

Ces résultats mettent en évidence qu'après 1h00 d'exposition à nos conditions, les OMM n'induisent pas d'oxydation de l'ADN dans les kératinocytes HaCaT. En revanche, une exposition prolongée de 24 heures engendre une diminution significative de la concentration intracellulaire d'ADN oxydé. Ceci suggérant que Les OMM permettraient une meilleure élimination de la base oxydée ou une meilleure excrétion. Or l'excrétion des bases oxydées est un processus utilisé après la réparation BER. Les OMM induiraient-elles une meilleure prise en charge de la base oxydée par le système BER ?

C'est pourquoi l'étude de la voie de réparation BER a été réalisée, en s'intéressant à la fois à l'expression génétique mais aussi à l'activation de certains facteurs clefs.

2455

2. Voie de réparation BER

2.1. BER -expression génétique :

2460 L'expression génétique est un ensemble multi-étape, très finement régulée et dynamique. En
cas de perte d'homéostasie cellulaire, la cellule va enclencher une réponse en modifiant son
expression génétique, afin de synthétiser des facteurs qui permettront de répondre à ces
changements. Ainsi, son étude permet de comprendre comment les cellules peuvent détecter
et réagir aux OMM. Certains auteurs ont montré que, en condition athermique, les OMM ne
2465 semblent pas avoir d'impact sur la transcription *in vivo* et *in vitro* [Habauzit et al. 2014, Le
Quément et al. 2012]. Cependant, le dispositif Remedee one induit une légère augmentation
de température. Il était alors important d'étudier l'expression génétique dans ces conditions.

2.1.1. BER - Analyse Transcriptomique par RT²

2470 L'analyse d'une dizaine de gènes impliqués dans la voie de réparation BER a été réalisée, par
RT² (voir chapitre 2 – matériels et méthodes). Cette approche nous permet de considérer de
nombreux de gènes. Les cellules HaCaT ont été exposées aux OMM avec le dispositif de
REMEDEE pendant 1h (Figure CH5-13 A), le dispositif de l'IETR pendant 1h (Figure CH5-13 B)
2475 et 24h (Figure CH5-13 C). Aucun gène impliqué dans la voie de réparation BER n'a été
différentiellement exprimé entre SHAM et EXPO ou sous contrôle thermique (TC) (test de
Mann Whitney avec correction de Bonferroni, $p_{\text{value}} > 0,016$). En tant que contrôle technique,
les cellules ont été exposées à une température de 43°C pendant 2h (Figure CH5-13 D). Six
gènes sur dix ont été différentiellement exprimés, permettant ainsi de valider l'approche
2480 expérimentale (test de Mann Whitney avec correction de Bonferroni, $APEX1_{p_{\text{value}}} < 0,00016$,
 $FEN1_{p_{\text{value}}} < 0,00016$, $MBP4_{p_{\text{value}}} = \text{NS}$, $MPG_{p_{\text{value}}} = \text{NS}$, $NTHL1_{p_{\text{value}}} = \text{NS}$, $OGG1_{p_{\text{value}}} = \text{NS}$,
 $PARP1_{p_{\text{value}}} < 0,00016$, $PCNA_{p_{\text{value}}} < 0,00016$, $XRCC1_{p_{\text{value}}} ** < 0,0016$).

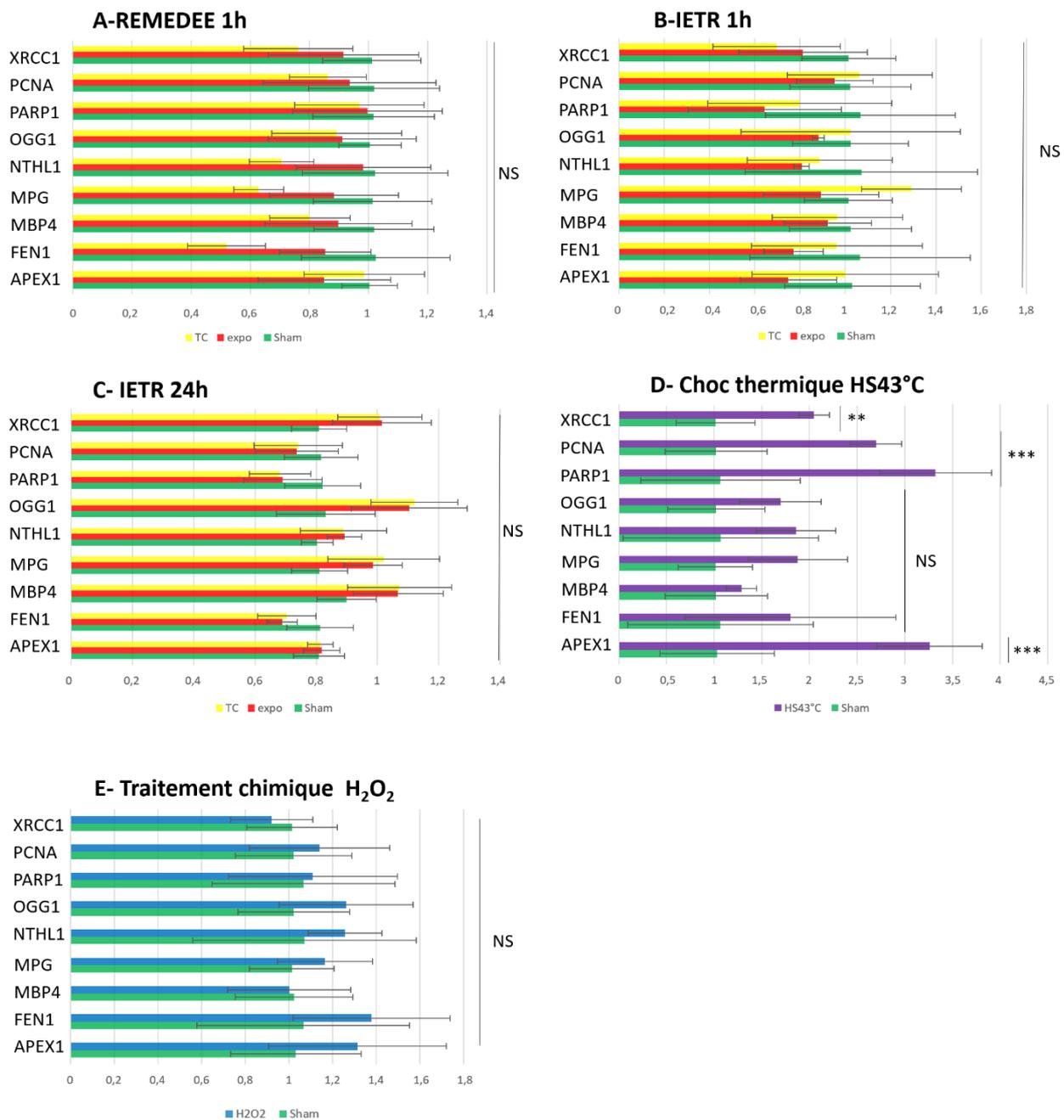


Figure CH5-13 : Analyse transcriptomique de la voie BER après exposition aux OMM

- 2485 Niveaux d'expression des ARN messagers impliqués dans la voie BER : APEX1, FEN1, MBP4, MPG, NTHL1, OGG1, PARP1, PCNA, XRCC1 analysés par RT² entre les cellules exposées (EXPO) ou non (SHAM) avec le dispositif de REMEDEE pendant 1h (A), le dispositif IETR pendant 1h (B) et 24h (C). L'exposition des cellules HaCaT à 43°C (D) et à l'H₂O₂ 0,5 mM (E) pendant 2h ont été utilisés comme contrôles techniques. Les histogrammes représentent le 2^{-ΔΔCt} mesurés par rapport au SHAM selon la méthode (Livak et Schmittgen, 2001) +/- l'écart type des réplicats biologiques, N=8. Les tests non paramétriques Mann Whitney avec correction de Bonferroni ont été utilisés (*<0,016, **<0,0016 ***<0,00016; NS : non significatif).
- 2490

Un autre contrôle a été réalisé, utilisant H₂O₂ à 0,5 mM pendant 2h. Cependant, aucun gène ne s'est montré différentiellement exprimé après ce traitement (Figure CH5-13 E). On aurait pu penser que, via un stress oxydant, la cellule engagerait une induction des gènes impliqués dans la réparation. Ici, dans nos conditions, il semblerait que ce feedback n'existe pas, du moins au niveau transcriptionnel. Une autre hypothèse est que le stress oxydant induit par H₂O₂ à cette concentration est trop « doux » pour induire l'induction des gènes de réparation de la voie BER.

2500

Ce résultat suggère que les OMM n'induisent pas la transcription de gènes impliqués dans la voie BER après 1h et 24h d'exposition.

2.1.2. BER – Analyse de protéines par IF

2505

Afin de confirmer ce résultat, l'analyse de l'expression protéique a été effectuée. Quatre ADN glycosylases impliquées dans la voie BER ont été analysées : MTH1, MUTYH, NEIL1, OGG1, ainsi que PARP1 et XRCC1 impliquées dans des étapes plus tardives.

Après 1h d'exposition, aucune différence n'a été observée entre SHAM, EXPO et le contrôle thermique (TC) (test de Mann Whitney avec correction de Bonferroni, pvalue > 0,016 ; Figure CH5-14, panel de gauche). Ce résultat n'est pas surprenant puisque la transcription de protéines est un processus cellulaire long. Il semble peu probable que la cellule ait le temps de transcrire et traduire les gènes d'intérêt en seulement 1h. C'est pourquoi nous avons étendu la durée d'exposition à 24h. De même, aucune différence n'est mise en évidence après 24h d'exposition ou avec le contrôle thermique (TC, test de Mann Whitney avec correction de Bonferroni, pvalue > 0,016 ; Figure CH5-14, panel de milieu). L'utilisation de KBrO₃ à 1 mM pendant 16h a induit une différence d'expression significative des ADN glycosylases MTH1, MUTYH et OGG1. Seuls NEIL1 et XRCC1 se sont montrés non significatifs, suggérant que l'oxydation par KBrO₃ n'induit pas de rétrocontrôle positif sur ces deux produits de gènes (test de Mann Whitney avec correction de Bonferroni, MTH1_{pvalue}= 0,006, MUTYH_{pvalue}= 0,004, NEIL1_{pvalue}= 0,21, OGG1_{pvalue}= 0,006, PARP1_{pvalue}= 0,004, XRCC1_{pvalue} = 0,17 ; Figure CH5-14, panel de droite).

2520

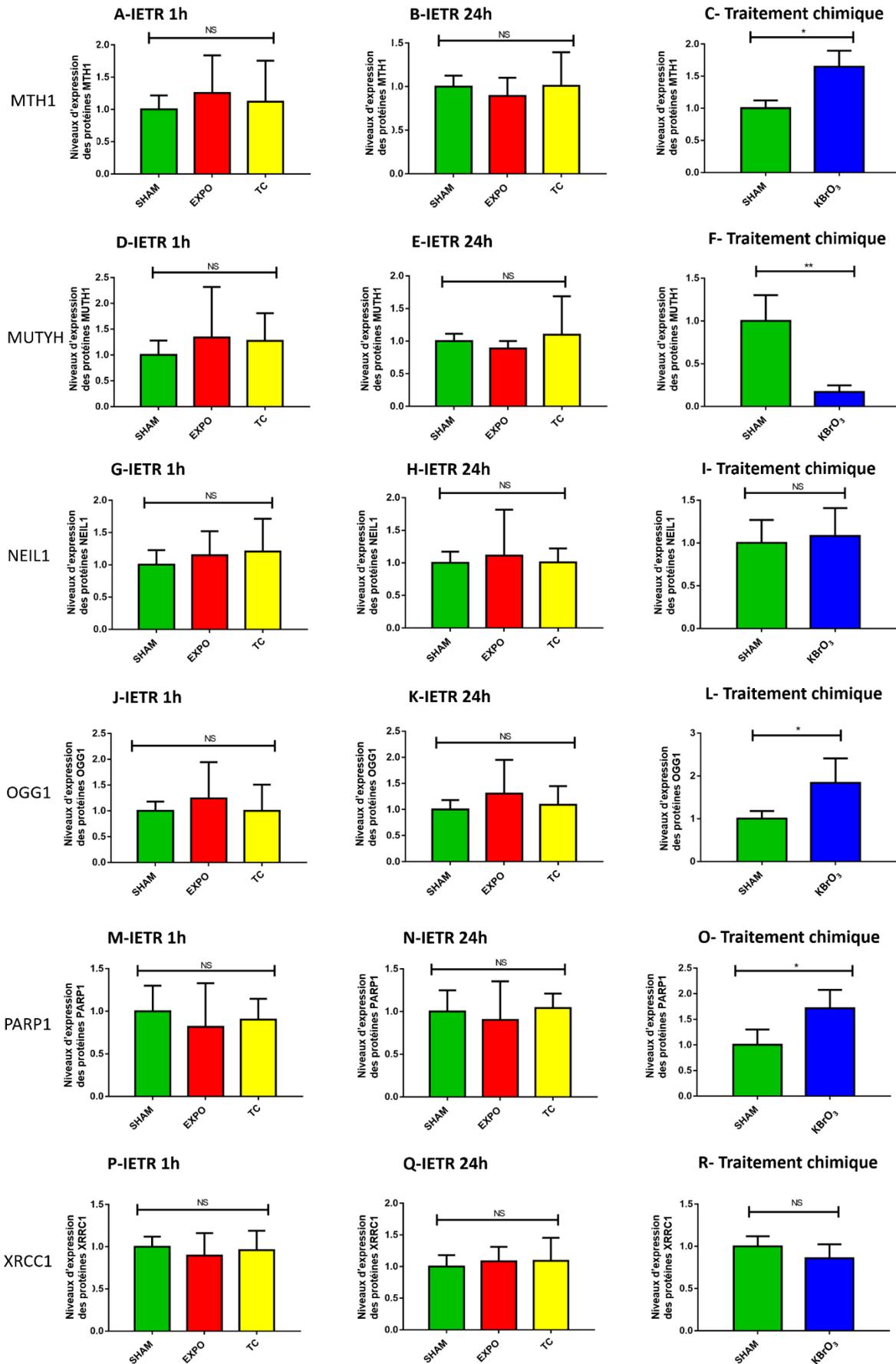


Figure CH5-14 : Analyse de protéines clés de la voie BER

2525 Niveaux d'expression des protéines ADN glycosylases impliquées dans la voie BER : MTH1, MUTYH, NEIL1, OGG1, ainsi que de PARP1 et XRCC1 analysés par Immunofluorescence entre les cellules exposées (EXPO) ou non (SHAM) ou sous contrôle thermique (TC) pendant 1h (panel de gauche) ou 24h (panel du milieu). Le bromate de potassium (KBrO₃, panel de droite) à 1 mM pendant 16h a été utilisé comme contrôle technique. Les histogrammes représentent le ratio de l'intensité de fluorescence pour une protéine donnée dans les différentes conditions par rapport au SHAM, +/- l'écart type des réplicats biologiques, N=4. Les tests non paramétriques Mann Whitney avec correction de Bonferroni ont été utilisés (*<0,016 ; NS : non significatif)

2530

2535 Par conséquent, les OMM à 60 GHz, à 15 mW/cm² ne semblent pas avoir d'impact sur la traduction des ARN messagers codant pour des facteurs impliqués dans la voie BER, dans des cellules HaCaT. Cependant, le stress oxydant induit par KBrO₃ entraîne des modifications traductionnelles ou post-traductionnelles (stabilité).

2.2. BER- Activation phosphorylation

2540

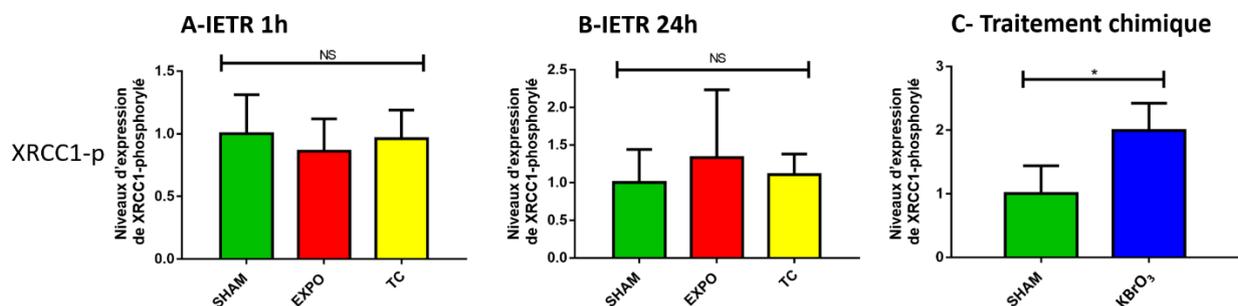


Figure CH5-15 : Analyse de l'activation par phosphorylation de XRCC1

2545 Niveaux d'expression de XRCC1-phosphorylé analysés par Immunofluorescence entre les cellules exposées (EXPO) ou non (SHAM) pendant 1h (A) ou 24h (B). Le bromate de potassium (KBrO₃, C) à 1 mM pendant 16h a été utilisé comme contrôle technique. Les histogrammes représentent le ratio de l'intensité de phosphorylation de XRCC1 dans les différentes conditions par rapport au SHAM, +/- l'écart type des réplicats biologiques, N=4. Les tests non paramétriques Mann Whitney avec correction de Bonferroni ont été utilisés (*<0,016 ; NS : non significatif).

2550 L'activation par phosphorylation a ensuite été investiguée. Cependant, la voie BER est pauvre en protéines activées par phosphorylation. Une exception à cela est XRCC1. De ce fait, seul XRCC1 phosphorylé a été analysé. Il est à noter que cette enzyme n'est pas spécifique de la voie BER mais est activée dans d'autres voies de réparation telles que la voie NER, ATM et ATR. L'analyse de la phosphorylation de XRCC1 pour 1h (Figure CH5-15 A) et 24h (Figure CH5-

2555 **15 B)** d'exposition aux OMM n'a pas montré de différence entre SHAM, EXPO et TC alors qu'on observe une augmentation de la phosphorylation de XRCC1 après traitement au KBrO_3 à 1 mM pendant 16h (Figure CH5-15 C ; test de Mann Whitney avec correction de Bonferroni, EXPO-1h_{pvalue}= 0,33 ; TC-1h_{pvalue}= 0,57 ; EXPO-24h_{pvalue}= 0,44 ; TC-24h_{pvalue}= 0,72 ; KBrO_3 -_{pvalue}= 0,01)

2560

En conclusion, les OMM à 60 GHz, 15 mW/cm² ne semblent pas induire la transcription, ni la traduction de certains facteurs impliqués dans la voie BER. L'activation de la voie BER est compliquée à mettre en évidence via les techniques utilisées car elle est pauvre en protéines phosphorylées. Cependant, il a été montré que XRCC1 n'était pas phosphorylé après exposition aux OMM.

2565

3. Cassure double brin – voie ATM

2570 Puisque les protéines clefs de la voie BER ne peuvent être activées par phosphorylation, il était intéressant d'étudier d'autres voies qui utilisent la phosphorylation. Ainsi la voie ATM a ensuite été analysée, suivant les mêmes étapes que précédemment à savoir l'étude de l'expression génétique (ARNm et protéines) puis l'analyse de l'activation par phosphorylation.

3.1. Analyse voie expression génétique

3.1.1. ATM - analyse Transcriptomique : RT²

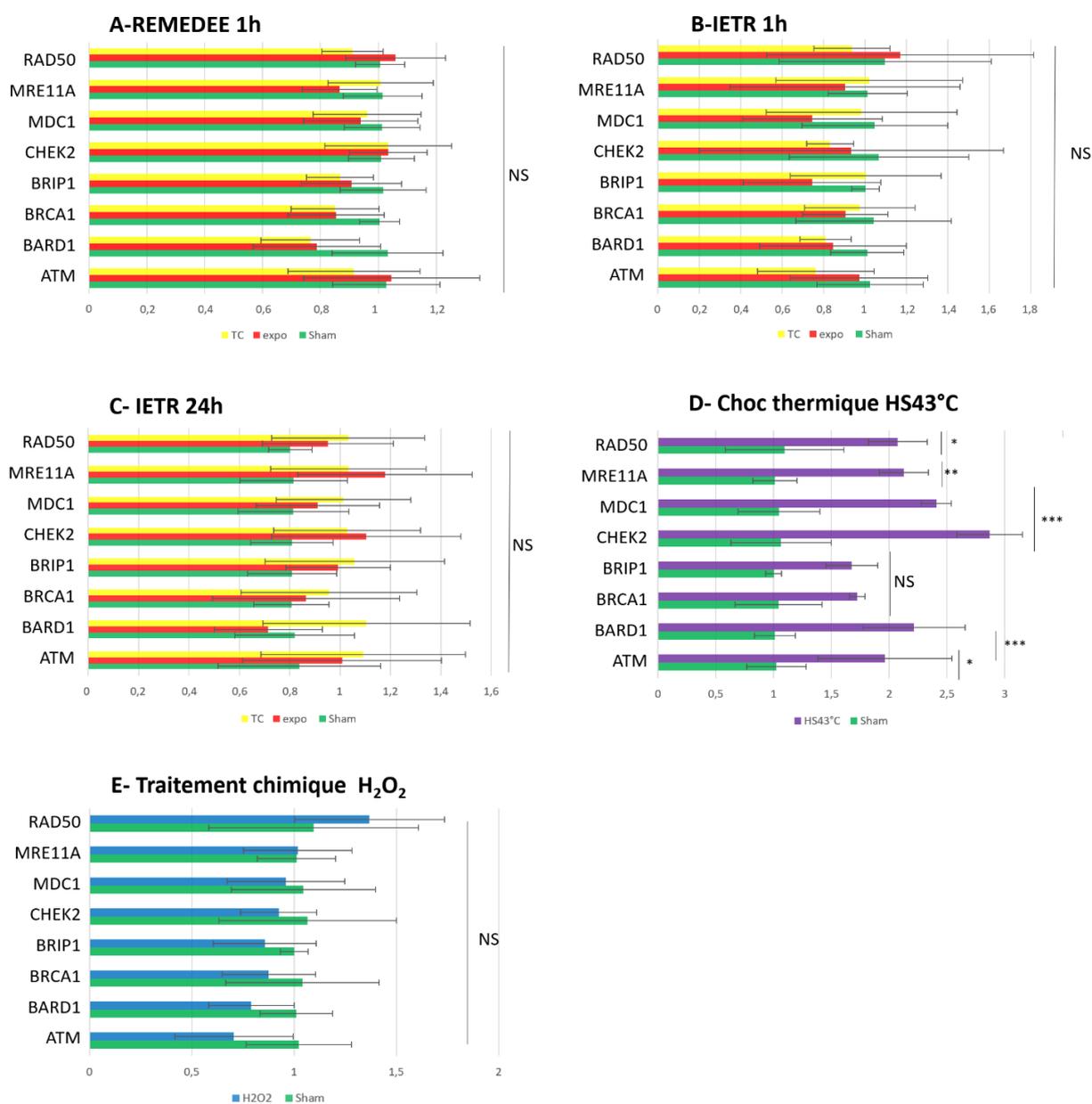


Figure CH5-16 : Analyse transcriptomique de la voie ATM après expositions aux OMM

Niveaux d'expression des ARN messagers impliqués dans la voie ATM : ATM, BARD1, BRCA1, BRIP1, CHEK2, MDC1, MRE11A, RAD50 analysés par RT² entre les cellules exposées (EXPO) ou non (SHAM) avec le dispositif de REMEDEE pendant 1h (A), le dispositif IETR pendant 1h (B) et 24h (C). L'exposition des cellules HaCaT à 43°C pendant 2h (D) et au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 0,5 mM pendant 2h (E) ont été utilisés comme contrôles techniques. Les histogrammes représentent le 2^{-ΔΔCt} mesurés par rapport au SHAM selon la méthode (Livak et Schmittgen, 2001), +/- l'écart type des réplicats biologiques, N=8. Les tests non paramétriques Mann Whitney avec correction de Bonferroni ont été utilisés (*<0,016, **<0,0016 ; ***<0,00016 ; NS : non significatif).

2580

2585

Une dizaine de gènes impliqués dans la voie ATM ont été sélectionnés et testés en RT². Les cellules HaCaT ont été exposées aux OMM avec le dispositif de REMEDEE pendant 1h (Figure CH5-16 A), le dispositif de l'IETR pendant 1h (Figure CH5-16 B) et 24h (Figure CH5-16 C). Les gènes impliqués dans la voie de réparation ATM n'ont pas été différentiellement exprimés entre SHAM et EXPO ou sous contrôle thermique (TC) (test de Mann Whitney avec correction de Bonferroni, pvalue > 0,016). De même, l'utilisation d'H₂O₂ à 0,5 mM pendant 2h n'a pas induit de feedback sur la transcription des gènes impliqués dans cette voie de réparation, contrairement au choc thermique à 43°C pendant 2h pour lequel six gènes sur les huit gènes analysés ont été retrouvés différentiellement exprimés. (Figure CH5-16 ED, test de Mann Whitney avec correction de Bonferroni, ATM_{pvalue}< 0,016, BARD1_{pvalue}< 0,00016, BRCA1_{pvalue}= NS, BRIP1_{pvalue}= NS, CHEK2_{pvalue}< 0,00016, MDC1_{pvalue}< 0,00016, MRE11A_{pvalue}< 0,0016, RAD50_{pvalue}< 0,016).

3.1.2. ATM – Analyse de la protéine

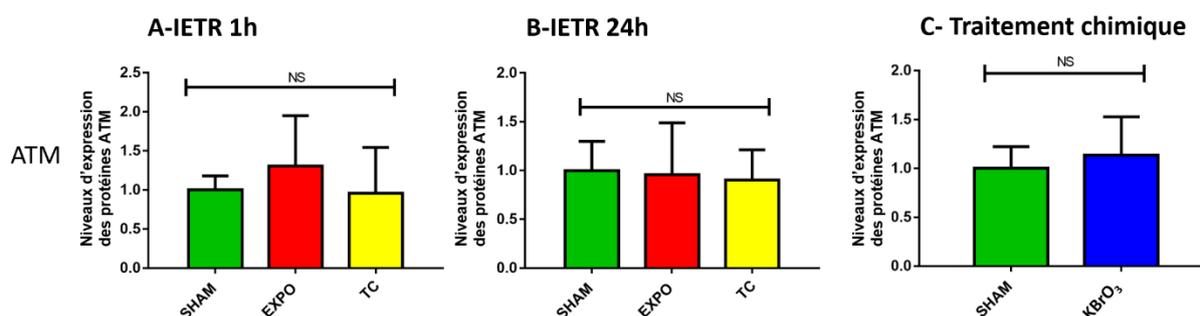


Figure CH5-17 : Analyse de protéines clés de la voie ATM

Niveaux d'expression d'ATM analysés par Immunofluorescence entre les cellules exposées (EXPO) ou non (SHAM) ou sous contrôle thermique (TC) par le dispositif IETR pendant 1h (A) ou 24h (B). Le bromate de potassium (KBrO₃, C) à 1 mM pendant 16h a été utilisé pour induire un stress génotoxique. Les histogrammes représentent le ratio de l'intensité de fluorescence de la protéine ATM dans les différentes conditions par rapport au SHAM, +/- l'écart type des réplicats biologiques, N=4. Les tests non paramétriques Mann Whitney avec correction de Bonferroni ont été utilisés (*<0,016 ; NS : non significatif).

Par la suite, l'expression de ATM, protéine clef de la voie de détection des cassures DB a été analysée par immunofluorescence. Cependant après 1h (Figure CH5-17 A) ou 24h (Figure CH5-17 B) d'exposition des cellules HaCaT aux OMM par le dispositif IETR, la protéine ATM ne s'est pas montrée différentiellement exprimée entre SHAM, EXPO ou sous contrôle thermique

(TC). De plus, le stress génotoxique généré par KBrO_3 n'a pas augmenté le niveau d'ATM dans nos cellules (Figure CH5-17 C). Ce résultat semble indiquer que, même s'il y a un stress génotoxique, il n'y a pas de traduction de protéines ATM supplémentaires (test de Mann Whitney correction de Bonferroni, EXPO-1h_{pvalue}= 0,26 ; TC-1h_{pvalue}= 0,68 ; EXPO-24h_{pvalue}= 0,53 ; TC-24h_{pvalue}= 0,72, KBrO_3 _{pvalue}= 0,68).

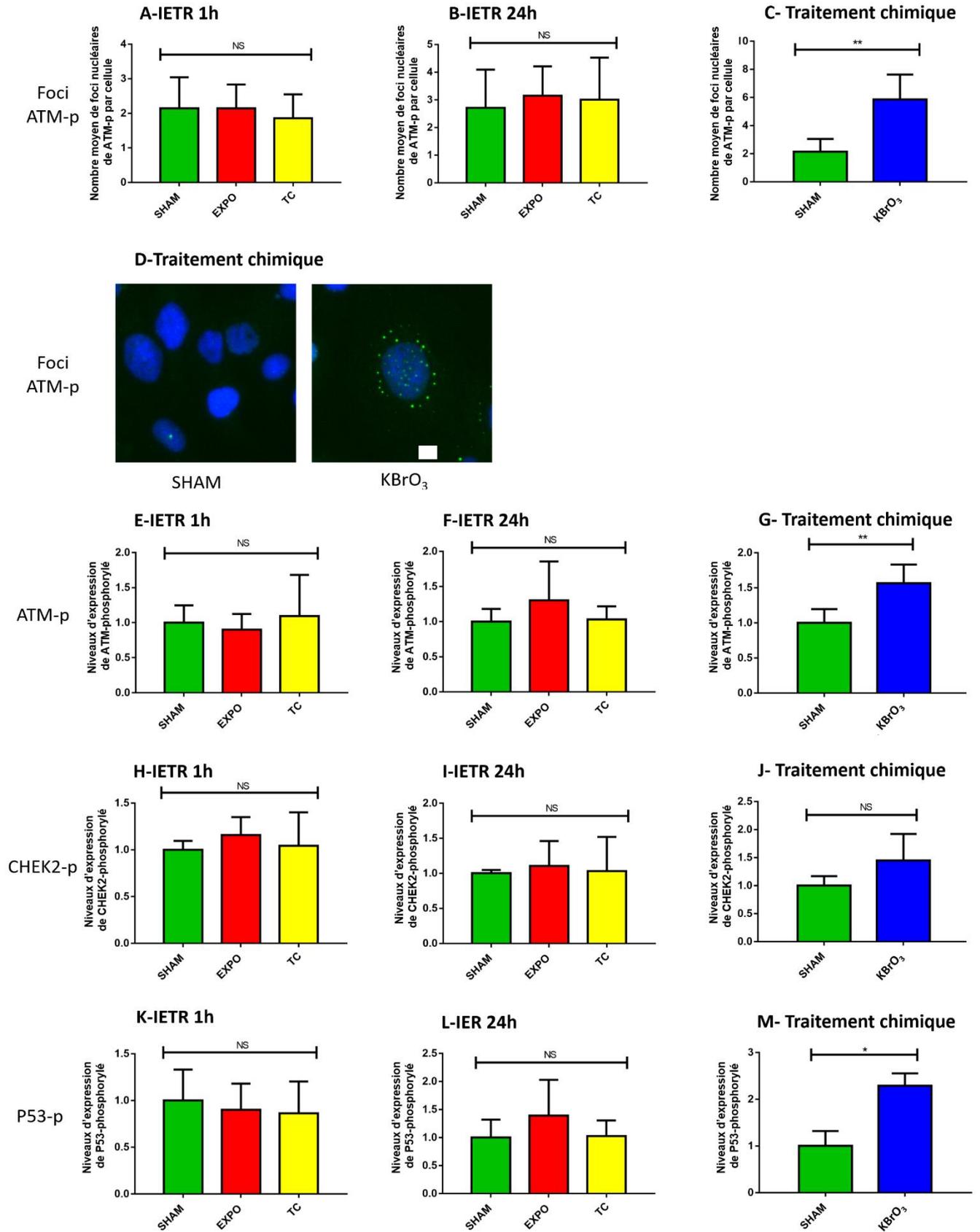
2620

3.1.3. ATM-activation par phosphorylation

Par la suite, les données du phosphoprotéome de la voie ATM ont été investiguées. Trois protéines capitales de cette voie ont été considérées : ATM, CHEK2 et P53. Le traitement des cellules HaCaT par du bromate de potassium (KBrO_3 , 1 mM pendant 16h, Figure CH5-18, **panel de droite**) a induit une augmentation significative de la phosphorylation d'ATM et de p53. De même, le nombre de foci d'ATMp par cellule a augmenté et les foci ont été retrouvés à la fois dans le noyau, mais aussi dans le cytoplasme. Les comptages des foci ont été faits dans les noyaux, qui correspondent au foci classique du système de réparation. Dans le cytoplasme, les foci semblent liés à la réponse KBrO_3 , sans que l'on sache encore réellement le rôle de ces agrégats [Guleria et Chandna, 2016]. Par contre, une augmentation non significative de CHEK2-p a été observée, laissant sous-entendre que sa phosphorylation est transitoire et difficilement mise en évidence (test de Mann Whitney correction de Bonferroni, Foci ATM-p_{pvalue}= 0,0015 ; ATM-p_{pvalue}= 0,00484, CHEK2-p_{pvalue}= 0,17, P53-p_{pvalue}= 0,012). Après 1h (Figure CH5-18, **panel de gauche**) et 24h (Figure CH5-18, **panel du milieu**) d'exposition aux OMM, il n'a pas été détecté de modification dans le nombre de foci d'ATM, ni de changement de phosphorylation de ATM, P53 et CHEK2 dans les cellules exposées (EXPO) ou non (SHAM) ou soumises à un contrôle thermique (TC) (test de Mann Whitney correction de Bonferroni, pvalue > 0,016).

2630

2635



2640 Figure CH5-18 : Analyse du nombre de foci nucléaires d'ATM-p par cellule et de l'intensité de phosphorylation d'ATM, CHEK2 et P53

2645 Nombre de foci nucléaires d'ATM-p par cellule et niveaux d'expression de ATM-phosphorylé, CHEK2-phosphorylé et P53-phosphorylé analysés par Immunofluorescence entre les cellules exposées (EXPO) ou non (SHAM) ou sous contrôle thermique (TC) pendant 1h (**panel de gauche**) ou 24h (**panel du milieu**). Le bromate de potassium (KBrO₃, **panel de droite**) à 1 mM pendant 16h a été utilisé comme contrôle technique. Les histogrammes représentent le ratio de l'intensité de fluorescence pour une protéine donnée dans les différentes conditions par rapport au SHAM, +/- l'écart type des réplicats biologiques, N=4. Les tests non paramétriques Mann Whitney avec correction de Bonferroni ont été utilisés (*<0,016 ; NS : non significatif).

2650

Par conséquent, dans notre modèle, les OMM ne semblent pas entrainer de rétrocontrôle de la voie ATM ni d'activation par phosphorylation des protéines clefs. Par contre, un stress génotoxique induit par un stress oxydant (KBrO₃) active bien la voie ATM, validant ainsi notre approche méthodologique.

2655

4. Stress réplicatif – voie ATR

4.1. ATR -expression génétique :

2660 Enfin l'expression génétique de facteurs impliqués dans la voie ATR a été analysées. Seules des expériences de RT² ont pu être effectuées car les anticorps achetés et testés pour les immunofluorescences dirigées contre les protéines totales n'ont pas donné satisfaction. Huit gènes ayant des rôles clefs dans la voie ATR ont été sélectionnés : ATR, ATRIP, CHEK1, HUS1, RAD1, RAD17, RPA1, TOBP1. L'utilisation de l'H₂O₂ (0,5 mM, 2h) a été utilisée sur les cellules afin de créer un stress oxydant. Seule l'expression de RAD1 a été augmentée significativement
2665 après traitement (**Figure CH5-19 E**), **test de Mann Whitney correction de Bonferroni, RAD1_{pvalue}< 0,0016**). Après un choc thermique à 43°C (**Figure CH5-19 D**), six gènes sur les huit sélectionnés se sont montrés différentiellement exprimés (**test de Mann Whitney correction de Bonferroni, ATR_{pvalue}< 0,00016, ATRIP_{pvalue}= NS, CHEK1_{pvalue}< 0,0016, HUS1_{pvalue}= NS, RAD1_{pvalue}< 0,00016, RAD17_{pvalue}< 0,00016, RPA1_{pvalue}< 0,00016, TOBP1_{pvalue}< 0,0016**). Les
2670 cellules ont ensuite été soumises aux OMM via le dispositif de REMEDEE pendant 1h (**Figure CH5-19 A**), du dispositif de l'IETR pendant 1h (**Figure CH5-19 B**) et 24h (**Figure CH5-19 C**). Aucun gène sélectionné ne s'est montré différentiellement exprimé après exposition (EXPO)

ou sous contrôle thermique (TC) par rapport au SHAM (test de Mann Whitney correction de Bonferroni, $RAD1_{pvalue} < 0,0016$).



2675

Figure CH5-19 : Analyse transcriptomique de la voie ATR après exposition aux OMM

Niveaux d'expression des ARN messagers impliqués dans la voie ATR : ATR, ATRIP, CHEK1, HUS1, RAD1, RAD17, RAP1, TOPBP1 analysés par RT² entre les cellules exposées (EXPO) ou non (SHAM) avec le dispositif de REMEDEE pendant 1h (A), le dispositif IETR pendant 1h (B) et 24h (C). L'exposition des cellules HaCaT à 43°C (D) et au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 0,5mM (E) pendant 2h a été utilisée comme contrôle technique. Les histogrammes représentent le 2^{-ΔΔCt} mesurés par rapport au SHAM selon la méthode (Livak et Schmittgen, 2001), +/- l'écart type des réplicats biologiques, N=8. Les tests non paramétriques Mann Whitney avec correction de Bonferroni ont été utilisés (*<0,016, **<0,0016 ; ***<0,00016 ; NS : non significatif).

2680

2685 De plus, en utilisant cette technique d'analyse semi-haut débit de l'expression des ARNm, les voies NER, MMR et HHR ont été analysées (résultats non montrés). Aucune différence significative n'a été observée concernant toutes ces voies de réparation après EXPO ou après contrôle thermique (TC), contrairement aux contrôles techniques.

2690 4.2. ATR-Activation par phosphorylation

Par la suite, la phosphorylation de ATR et CHEK1, marqueurs du stress réplcatif, a été analysée par immunofluorescence.

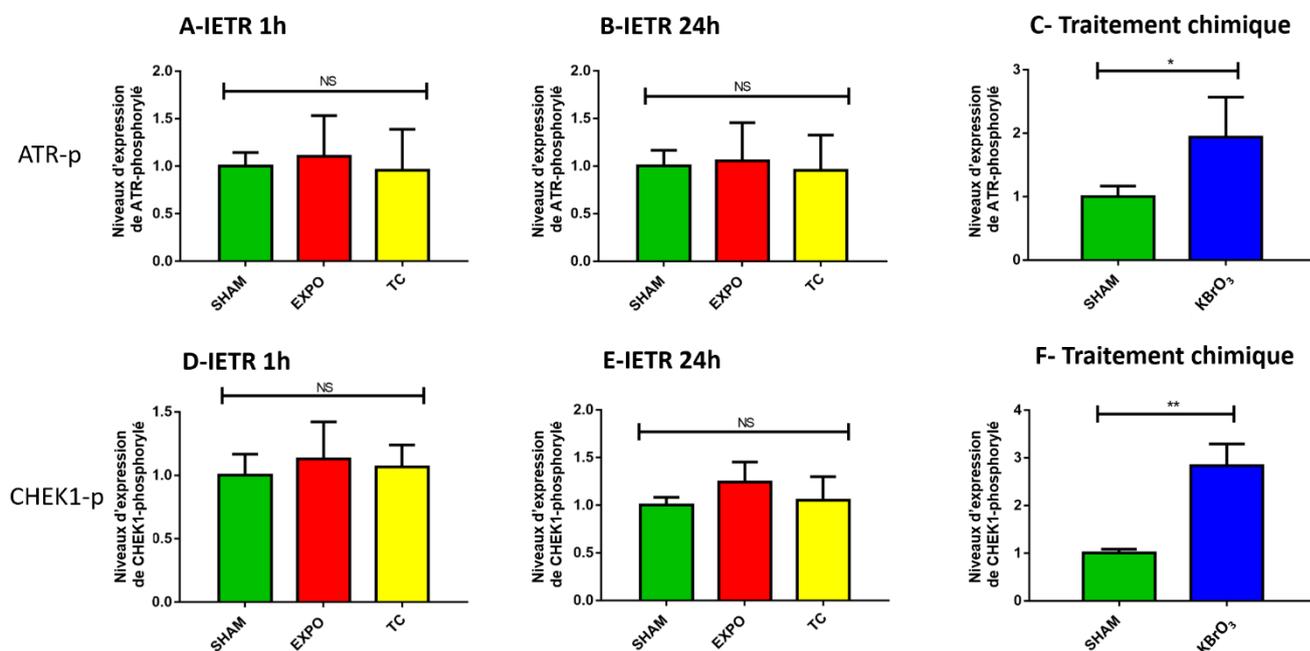


Figure CH5-20 : Analyse de l'activation par phosphorylation de ATR et de CHEK1

2695 Niveaux d'expression de ATR-phosphorylé et CHEK1-phosphorylé analysés par Immunofluorescence entre les cellules exposées (EXPO) ou non (SHAM) ou sous contrôle thermique (TC) pendant 1h (A) ou 24h (B). Le bromate de potassium (KBrO₃, C) à 1 mM pendant 16h a été utilisé comme contrôle technique. Les histogrammes représentent le ratio de l'intensité de fluorescence pour une protéine donnée dans les différentes conditions par rapport au SHAM, +/- l'écart type des réplicats biologiques, N=4. Les tests non paramétriques Mann Whitney avec correction de Bonferroni ont été utilisés (*<0,016 ; NS : non significatif).

2700

Pour valider notre expérience, les cellules HaCaT ont été traitées aux KBrO₃ à 0,5 mM pendant 16h. ATR et CHEK1 ont été significativement phosphorylées après traitement (Figure CH5-20

2705 **CF** ; test de Mann Whitney correction de Bonferroni, ATR-p_{pvalue}= 0,008 ; CHEK1-p_{pvalue}= 0,004).

Cependant, après 1h (Figure CH5-20 AD) et 24h (Figure CH5-20 BE), ATR et CHEK1 n'ont pas été différenciellement phosphorylées après exposition (EXPO) ou sous contrôle thermique (TC) par rapport au SHAM (test de Mann Whitney correction de Bonferroni, pvalue > 0,016).

2710 Les OMM ne semblent pas créer un stress génotoxique suffisant pour induire un stress répliatif et activer les voies de réparation d'ATR.

III- Conclusion stress génotoxique

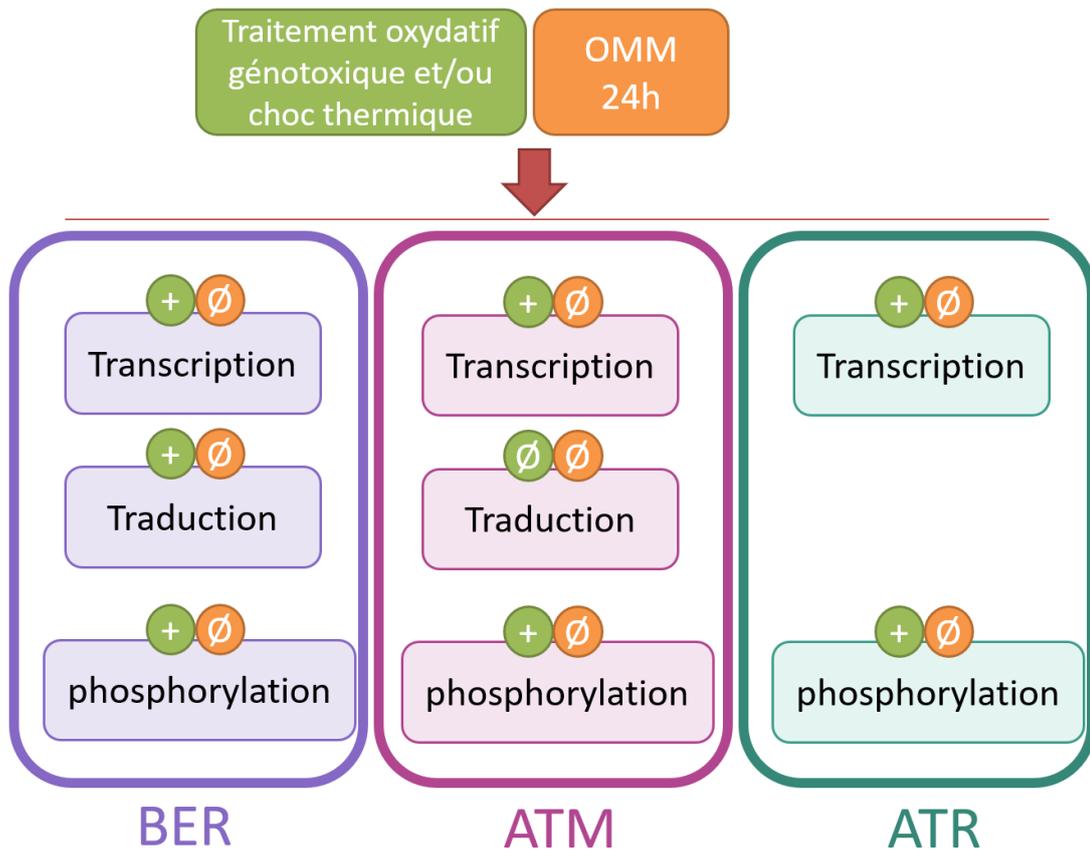
2715 Les résultats discordants de l'impact des ondes millimétriques sur le stress génotoxique illustrent la nécessité de réaliser des études complémentaires dans le domaine. L'objectif de la présente étude était de mettre en lumière d'éventuels effets génotoxiques dus aux ondes millimétriques, dans des kératinocytes humains exposés à 60 GHz, à 15 mW/cm². La difficulté majeure de cette étude est de mettre en évidence des lésions de l'ADN qui ne dépassent pas les lésions basales de la cellule. C'est pourquoi des expériences innovantes ont été réalisées afin de conférer une plus grande sensibilité à l'étude de ce stress. Dans cette étude, la volonté n'était pas de chercher à détecter directement des dégâts à l'ADN via, par exemple, le test des comètes ou des micronoyaux, car ces techniques ont déjà été grandement utilisées dans le cadre des radiofréquences. De plus, il y a un risque de ne rien détecter si la réparation a lieu au fur et à mesure de l'apparition des dégâts. De ce fait, il semblait plus pertinent de vérifier si les systèmes de réparation étaient activés lors de l'exposition.

2730 Durant cette étude, il a été démontré que pour un temps d'exposition court (1h), la concentration **intracellulaire** en 8OH-dG restait inchangée après exposition (EXPO) ou après contrôle thermique (TC). Cependant, après une exposition longue (24h), une diminution significative de la concentration en 8OH-dG était observée dans les cellules (Figure CH5-12). Or la 8OH-dG avait été analysée dans une précédente étude de notre groupe, portant sur la métabolomique. Elle avait été augmentée en **extracellulaire** après exposition pendant 24h [Le Pogam et al. 2019]. Cela semble indiquer une meilleure élimination ou excrétion de l'ADN oxydé. De ce fait, l'hypothèse soulevée à ce moment-là était que les OMM boosterait les

2735 systèmes de réparation et notamment le système BER qui induit la coupure de la base oxydée. Cette base pouvant ensuite être sortie de la cellule par excrétion et éliminée par les urines. De ce fait, l'activation par phosphorylation de facteurs clés des voies de réparation a été analysée. Le stress oxydant induit par KBrO_3 a induit une différence significative de toutes les protéines analysées (sauf CHEK2) (Figure CH5-15, CH5-18, CH5-20). Cependant, après 1h et 2740 24h de traitement, sous EXPO ou sous contrôle thermique (TC), aucune protéine impliquée dans les voies de réparation BER, ATM ou ATR analysée ne s'est montrée différentiellement phosphorylée. De ce fait, les données de phosphoprotéome présentées dans ce travail ont montré que, quelle que soit la voie de réparation analysée, les OMM n'induisaient pas l'activation de ces voies contrairement à un stress génotoxique généré par KBrO_3 . Ce résultat 2745 est en accord avec les expériences de Gallerano et son équipe (2015) qui ne montrent pas non plus d'augmentation de la phosphorylation de H2AX après 2h et 24h d'exposition (25,28 GHz, 20 mW/cm²) dans des fibroblastes humains.

Une deuxième hypothèse était que les OMM, à une puissance relativement élevée pour entraîner des effets thermiques, pourraient modifier l'activité transcriptionnelle de certains 2750 gènes de réparation de l'ADN. La transcription des systèmes de réparation BER, ATM et ATR ont été analysés (Figure CH5-21). D'abord grâce à une méthode de RT-qPCR à semi-haut-débit, permettant de vérifier 48 gènes sur un panel de 300 gènes pré-établis (voir le **chapitre 2 Matériels et Méthodes**). Les 48 gènes ont été sélectionnés en fonction de leur rôle dans les voies de réparation de l'ADN et notamment des gènes codants pour des senseurs de lésions à 2755 l'ADN. Cependant, que ce soit pour les voies BER, ATM ou ATR, aucun gène ne s'est montré différentiellement exprimé après exposition ou sous contrôle thermique (TC) (Figure CH5-13, CH5-16, CH5-19). Ces résultats suggèrent que les OMM n'induisent pas la transcription de gènes impliqués dans ces voies de réparation. Les résultats sur les ARNm sont en concordance avec d'autres études qui démontrent qu'une exposition aiguë aux OMM, avec une puissance 2760 proche de celle utilisée en thérapie, ne modifie peu ou pas l'ensemble du profil d'expression génique dans les cultures primaires de kératinocytes humains [Soubere Mahamoud et al. 2016, Le Quément et al. 2012, Habauzit et al. 2014]. Fait intéressant, l'utilisation d'un oxydant doux n'induit pas non plus la transcription de gènes impliqués dans les voies de réparation, suggérant qu'il n'existe pas de rétrocontrôle (ou très peu), suite à un stress oxydant de cette 2765 envergure. Cependant, un choc thermique à 43°C induit la transcription de nombreux gènes

sélectionnés. Cela illustre l'importance de l'intégration de la température dans le fondement des normes d'exposition (IRC/NIP). L'augmentation de température due aux OMM dans nos conditions n'est pas assez importante pour entraîner un choc thermique et un rétrocontrôle sur ces gènes.



2770

Figure CH5-21 : Impact d'un stress génotoxique (en vert) et des ondes millimétriques pendant 24h (en orange) sur les voies de réparation BER, ATM et ATR. + : a un effet, Ø : pas d'effet

Par la suite, une étude au niveau des protéines clés de ces voies de réparation a été réalisée après exposition. Cependant, que ce soit pour 1h ou 24h d'exposition, aucune protéine d'intérêt ne s'est montrée différenciellement traduite (Figure CH5-14, CH5-18). Les cellules ne traduisent pas d'ADN glycosylases supplémentaires lors d'une exposition longue aux OMM. Ce qui laisse à penser que les OMM n'induisent pas de dommages directs à l'ADN. Suite à un traitement oxydant (bromate de potassium, $KBrO_3$), une induction de la traduction de plusieurs ADN glycosylases a été observée. Ce résultat suggère qu'il existe bien un rétrocontrôle dû au stress oxydant, mais plutôt au niveau protéique qu'au niveau transcriptionnel. En adéquation avec ce résultat, en 2015, Jin et son équipe ont observé une

2780

augmentation protéique cytoplasmique de OGG1 mais sans surexpression de l'ARNm dans du
tissus pulmonaires de rats exposés à l'hyperoxie [Jin et al. 2015]. A notre connaissance, aucune
2785 autre étude n'a analysée la traduction de protéines impliquées dans les réparations de l'ADN
suite à l'exposition aux OMM.

Globalement, il apparaît que l'exposition aux OMM dans les HaCaT, dans nos conditions,
n'induit pas d'effets génotoxiques importants dans la cellule. Le métabolisme de l'ADN
(réparation et synthèse) n'est pas modifié de façon dramatique (Figure CH5-22). Il reste
2790 possible que les OMM aient un impact direct sur l'oxydation de l'ADN, mais il est trop faible
pour être mis en évidence. De ce fait, pour une exposition aigue de courte durée, les niveaux
d'oxydation de l'ADN, d'après nos travaux, sont trop faibles pour craindre un effet délétère.
Cependant, gardons à l'esprit que les effets biologiques semblent dépendre fortement d'un
certains nombres de paramètres tels que la fréquence, la puissance, le temps d'exposition, la
2795 température ainsi que le modèle utilisé. Le choix des différents modèles d'études dans la
littérature pourrait expliquer les résultats contradictoires. Cependant, puisque les OMM ont
une faible pénétration dans la peau, les cellules kératinocytes restent, pour nous, un modèle
de choix.

Enfin, si les résultats obtenus sur la 8OH-dG ne sont pas le fait de l'activation des systèmes de
2800 réparation, existerait-il d'autres moyens d'élimination/excrétion ? La modification de la
perméabilité membranaire due aux ondes millimétriques pourrait expliquer ce résultat. Cette
hypothèse sera plus détaillée durant la discussion générale (chapitre 7).

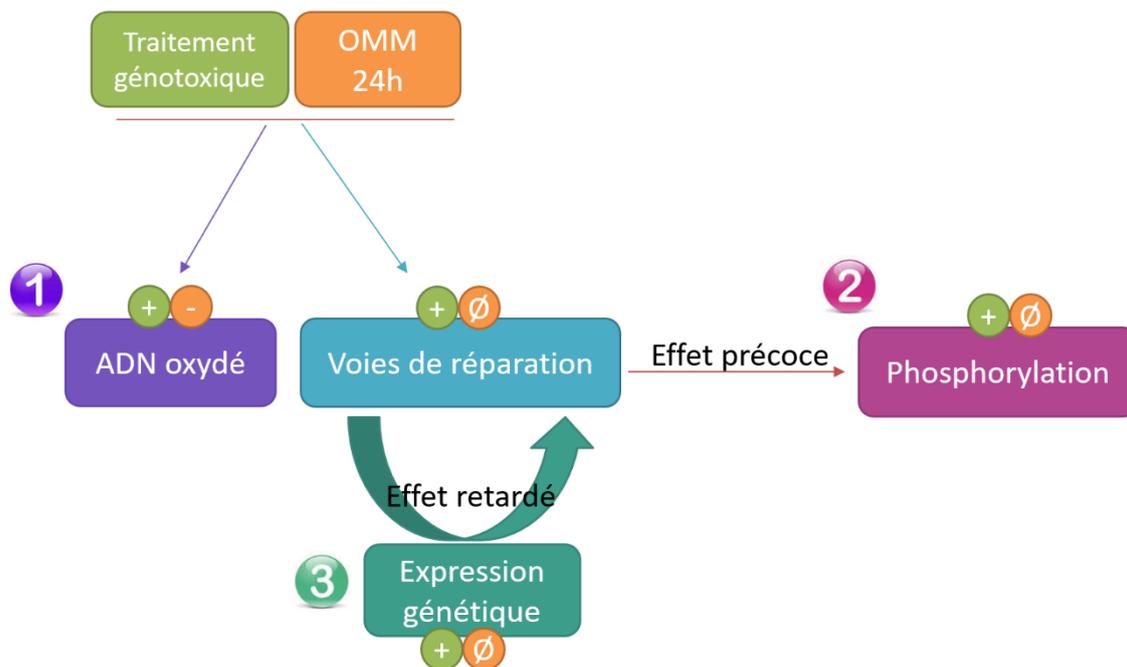


Figure CH5-22 : schématisation des résultats obtenus durant cette étude du chapitre 4

2805 Le traitement par un agent génotoxique (couleur verte) des cellules HaCaT induit une augmentation de l'oxydation de l'ADN ainsi que de l'expression génétique et de l'activation des voies de réparation de l'ADN. Cependant, le rayonnement des ondes millimétriques pendant 24h (couleur orange) n'a pas montré le même profil qu'un stress génotoxique. La concentration d'ADN oxydé a diminué après 24h alors qu'il n'y a pas eu d'impact sur les voies de réparation analysées.

2810 + : augmentation - : diminution, Ø : pas d'effet

VI- Références

- Alexander, A., Cai, S.-L., Kim, J., Nanez, A., Sahin, M., MacLean, K. H., Inoki, K., Guan, K.-L., Shen, J., Person, M. D., Kusewitt, D., Mills, G. B., Kastan, M. B., & Walker, C. L. (2010). ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(9), 4153-4158. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913860107>
- Alkis, M. E., Bilgin, H. M., Akpolat, V., Dasdag, S., Yegin, K., Yavas, M. C., & Akdag, M. Z. (2019). Effect of 900-, 1800-, and 2100-MHz radiofrequency radiation on DNA and oxidative stress in brain. *Electromagnetic Biology and Medicine*, *38*(1), 32-47. <https://doi.org/10.1080/15368378.2019.1567526>
- ANSES. (2013). *Radiofréquences et santé* (Édition scientifique).
- Bakkenist, C. J., & Kastan, M. B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular

- autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 421(6922), 499-506.
<https://doi.org/10.1038/nature01368>
- Bartek, J., & Lukas, J. (2003). Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell*, 3(5), 421-429. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00110-7](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00110-7)
- Bhatia, V., Valdés-Sánchez, L., Rodriguez-Martinez, D., & Bhattacharya, S. S. (2018). Formation of 53BP1 foci and ATM activation under oxidative stress is facilitated by RNA:DNA hybrids and loss of ATM-53BP1 expression promotes photoreceptor cell survival in mice. *F1000Research*, 7, 1233. <https://doi.org/10.12688/f1000research.15579.1>
- Boiteux, S., & Radicella, J. P. (2000). The Human OGG1 Gene : Structure, Functions, and Its Implication in the Process of Carcinogenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 377(1), 1-8. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.1773>
- Byun, T. S. (2005). Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. *Genes & Development*, 19(9), 1040-1052.
<https://doi.org/10.1101/gad.1301205>
- Caldecott, K. W. (2003). XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair*, 2(9), 955-969.
[https://doi.org/10.1016/S1568-7864\(03\)00118-6](https://doi.org/10.1016/S1568-7864(03)00118-6)
- Cao, Y., & Tong, J. (2014). Adaptive Response in Animals Exposed to Non-Ionizing Radiofrequency Fields : Some Underlying Mechanisms. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(4), 4441-4448. <https://doi.org/10.3390/ijerph110404441>
- Cardis, E., Armstrong, B. K., Bowman, J. D., Giles, G. G., Hours, M., Krewski, D., McBride, M., Parent, M. E., Sadetzki, S., Woodward, A., Brown, J., Chetrit, A., Figuerola, J., Hoffmann, C., Jarushak, A., Montestruq, L., Nadon, L., Richardson, L., Villegas, R., & Vrijheid, M. (2011). Risk of brain tumours in relation to estimated RF dose from mobile phones : Results from five Interphone countries. *Occupational and Environmental Medicine*, 68(9), 631-640.
<https://doi.org/10.1136/oemed-2011-100155>
- Ciccia, A., & Elledge, S. J. (2010). The DNA Damage Response : Making It Safe to Play with Knives. *Molecular Cell*, 40(2), 179-204. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.019>
- D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I., & Poirier, G. G. (1999). Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochemical Journal*, 342(Pt 2), 249-268.
- De Bont, R. (2004). Endogenous DNA damage in humans : A review of quantitative data. *Mutagenesis*, 19(3), 169-185. <https://doi.org/10.1093/mutage/geh025>
- Derheimer, F. A., & Kastan, M. B. (2010). Multiple roles of ATM in monitoring and maintaining DNA integrity. *FEBS Letters*, 584(17), 3675-3681. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.05.031>
- Dizdaroglu, M. (1991). Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Biology and Medicine*, 10(3-4), 225-242. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90080-M](https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90080-M)

- Doil, C., Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Menard, P., Larsen, D. H., Pepperkok, R., Ellenberg, J., Panier, S., Durocher, D., Bartek, J., Lukas, J., & Lukas, C. (2009). RNF168 Binds and Amplifies Ubiquitin Conjugates on Damaged Chromosomes to Allow Accumulation of Repair Proteins. *Cell*, 136(3), 435-446. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.12.041>
- Durkacz, B. W., Omidiji, O., Gray, D. A., & Shall, S. (1980). (ADP-ribose)_n participates in DNA excision repair. *Nature*, 283(5747), 593-596. <https://doi.org/10.1038/283593a0>
- Fragopoulou, A. F., Polyzos, A., Papadopoulou, M.-D., Sansone, A., Manta, A. K., Balafas, E., Kostomitsopoulos, N., Skouroliakou, A., Chatgialiloglu, C., Georgakilas, A., Stravopodis, D. J., Ferreri, C., Thanos, D., & Margaritis, L. H. (2018). Hippocampal lipidome and transcriptome profile alterations triggered by acute exposure of mice to GSM 1800 MHz mobile phone radiation : An exploratory study. *Brain and Behavior*, 8(6), e01001. <https://doi.org/10.1002/brb3.1001>
- Franchini, V., Ceccuzzi, S., Doria, A., Gallerano, G. P., Giovenale, E., Ravera, G. L., De Amicis, A., De Sanctis, S., Di Cristofaro, S., Regalbuto, E., Coluzzi, E., Marinaccio, J., Sgura, A., Bei, R., Benvenuto, M., Modesti, A., Masuelli, L., & Lista, F. (2018). Biological Effects of 25 to 150 GHz Radiation After In Vitro Exposure of Human Fibroblasts : A Comparison of Experimental Results. *Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves*, 39(9), 899-911. <https://doi.org/10.1007/s10762-018-0514-2>
- Frank, J. W. (2021). Electromagnetic fields, 5G and health : What about the precautionary principle? *Journal of Epidemiology and Community Health*, 75(6), 562-566. <https://doi.org/10.1136/jech-2019-213595>
- Galick, H. A., Marsden, C. G., Kathe, S., Dragon, J. A., Volk, L., Nemeč, A. A., Wallace, S. S., Prakash, A., Doublí, S., & Sweasy, J. B. (2017). The NEIL1 G83D germline DNA glycosylase variant induces genomic instability and cellular transformation. *Oncotarget*, 8(49), 85883-85895. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20716>
- Gallerano, G. P., Doria, A., Giovenale, E., De Amicis, A., De Sanctis, S., Di Cristofaro, S., Franchini, V., Lista, F., Regalbuto, E., Sgura, A., Coluzzi, E., Marinaccio, J., Bei, R., Fantini, M., Benvenuto, M., & Masuelli, L. (2015). Effects of mm-waves on human fibroblasts in-vitro. *2015 40th International Conference on Infrared, Millimeter, and Terahertz waves (IRMMW-THz)*, 1-2. <https://doi.org/10.1109/IRMMW-THz.2015.7327476>
- Gapeyev, A. B., Lukyanova, N. A., & Gudkov, S. V. (2014). Hydrogen peroxide induced by modulated electromagnetic radiation protects the cells from DNA damage. *Central European Journal of Biology*, 9(10), 915-921. <https://doi.org/10.2478/s11535-014-0326-x>
- Gerner, C., Haudek, V., Schandl, U., Bayer, E., Gundacker, N., Hutter, H. P., & Mosgoeller, W. (2010). Increased protein synthesis by cells exposed to a 1,800-MHz radio-frequency mobile phone

- electromagnetic field, detected by proteome profiling. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 83(6), 691-702. <https://doi.org/10.1007/s00420-010-0513-7>
- Gudjonsson, T., Altmeyer, M., Savic, V., Toledo, L., Dinant, C., Grøfte, M., Bartkova, J., Poulsen, M., Oka, Y., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., Neumann, B., Heriche, J.-K., Shearer, R., Saunders, D., Bartek, J., Lukas, J., & Lukas, C. (2012). TRIP12 and UBR5 Suppress Spreading of Chromatin Ubiquitylation at Damaged Chromosomes. *Cell*, 150(4), 697-709. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.039>
- Guleria, A., & Chandna, S. (2016). ATM kinase : Much more than a DNA damage responsive protein. *DNA Repair*, 39, 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.12.009>
- Guo, Q., Wang, S., Zhang, S., Xu, H., Li, X., Guan, Y., Yi, F., Zhou, T., Jiang, B., Bai, N., Ma, M., Wang, Z., Feng, Y., Guo, W., Wu, X., Zhao, G., Fan, G., Zhang, S., Wang, C., ... Cao, L. (2020). ATM2-Beclin 1 axis promotes autophagy to maintain ROS homeostasis under oxidative stress. *The EMBO Journal*, 39(10). <https://doi.org/10.15252/embj.2019103111>
- Guo, Z., Deshpande, R., & Paull, T. T. (2010). ATM activation in the presence of oxidative stress. *Cell Cycle*, 9(24), 4805-4811. <https://doi.org/10.4161/cc.9.24.14323>
- Habauzit, D., Le Quément, C., Zhadobov, M., Martin, C., Aubry, M., Sauleau, R., & Le Dréan, Y. (2014). Transcriptome Analysis Reveals the Contribution of Thermal and the Specific Effects in Cellular Response to Millimeter Wave Exposure. *PLoS ONE*, 9(10), e109435. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109435>
- Hansteen, I.-L., Clausen, K. O., Haugan, V., Svendsen, M., Svendsen, M. V., Eriksen, J. G., Skiaker, R., Hauger, E., Lågeide, L., Vistnes, A. I., & Kure, E. H. (2009). Cytogenetic effects of exposure to 2.3 GHz radiofrequency radiation on human lymphocytes in vitro. *Anticancer Research*, 29(11), 4323-4330.
- Hefferin, M. L., & Tomkinson, A. E. (2005). Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair*, 4(6), 639-648. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.12.005>
- Heikkinen, P., Ernst, H., Huuskonen, H., Komulainen, H., Kumlin, T., Mäki-Paakkanen, J., Puranen, L., & Juutilainen, J. (2006). No Effects of Radiofrequency Radiation on 3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone-Induced Tumorigenesis in Female Wistar Rats. *Radiation Research*, 166(2), 397-408. <https://doi.org/10.1667/RR3588.1>
- Hintzsche, H., Jastrow, C., Kleine-Ostmann, T., Kärst, U., Schrader, T., & Stopper, H. (2012). Terahertz Electromagnetic Fields (0.106 THz) Do Not Induce Manifest Genomic Damage In Vitro. *PLoS ONE*, 7(9), e46397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046397>
- Hintzsche, H., & Stopper, H. (2010). Micronucleus frequency in buccal mucosa cells of mobile phone users. *Toxicology Letters*, 193(1), 124-130. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.12.016>

- Hoeijmakers, J. H. J. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411(6835), 366-374. <https://doi.org/10.1038/35077232>
- ICRP. (2007). Preface, Executive Summary and Glossary. *Annals of the ICRP*, 37(2-4), 9-34. <https://doi.org/10.1016/j.icrp.2007.10.003>
- ICRP. (2009). *Recommandations 2007 de la Commission internationale de protection radiologique*. Éd. Tec & doc.
- Ioniță, E., & Marcu, A. (2021.). *Radiofrequency EMF irradiation effects on pre-B lymphocytes undergoing somatic recombination | Scientific Reports*. <https://www.nature.com/articles/s41598-021-91790-3>
- Jackson, S. P., & Bartek, J. (2009). *The DNA-damage response in human biology and disease | Nature*. <https://www.nature.com/articles/nature08467>
- Jin, L., Yang, H., Fu, J., Xue, X., Yao, L., & Qiao, L. (2015). Association between oxidative DNA damage and the expression of 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 in lung epithelial cells of neonatal rats exposed to hyperoxia. *Molecular Medicine Reports*, 11(6), 4079-4086. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3339>
- Jungmichel, S., Clapperton, J. A., Lloyd, J., Hari, F. J., Spycher, C., Pavic, L., Li, J., Haire, L. F., Bonalli, M., Larsen, D. H., Lukas, C., Lukas, J., MacMillan, D., Nielsen, M. L., Stucki, M., & Smerdon, S. J. (2012). The molecular basis of ATM-dependent dimerization of the Mdc1 DNA damage checkpoint mediator. *Nucleic Acids Research*, 40(9), 3913-3928. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1300>
- Kasai, H., Crain, P. F., Kuchino, Y., Nishimura, S., Ootsuyama, A., & Tanooka, H. (1986). Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. *Carcinogenesis*, 7(11), 1849-1851. <https://doi.org/10.1093/carcin/7.11.1849>
- Kesari, K. K., & Behari, J. (2009). Fifty-gigahertz Microwave Exposure Effect of Radiations on Rat Brain. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 158(1), 126-139. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8469-8>
- Kocaman, A., Altun, G., Kaplan, A. A., Deniz, Ö. G., Yurt, K. K., & Kaplan, S. (2018). Genotoxic and carcinogenic effects of non-ionizing electromagnetic fields. *Environmental Research*, 163, 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.01.034>
- Korenstein-Ilan, A., Barbul, A., Hasin, P., Eliran, A., Gover, A., & Korenstein, R. (2008). Terahertz Radiation Increases Genomic Instability in Human Lymphocytes. *Radiation Research*, 170(2), 224-234. <https://doi.org/10.1667/RR0944.1>
- Koundrioukoff, S., Carignon, S., Técher, H., Letessier, A., Brison, O., & Debatisse, M. (2013). Stepwise Activation of the ATR Signaling Pathway upon Increasing Replication Stress Impacts Fragile Site Integrity. *PLoS Genetics*, 9(7), e1003643. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003643>

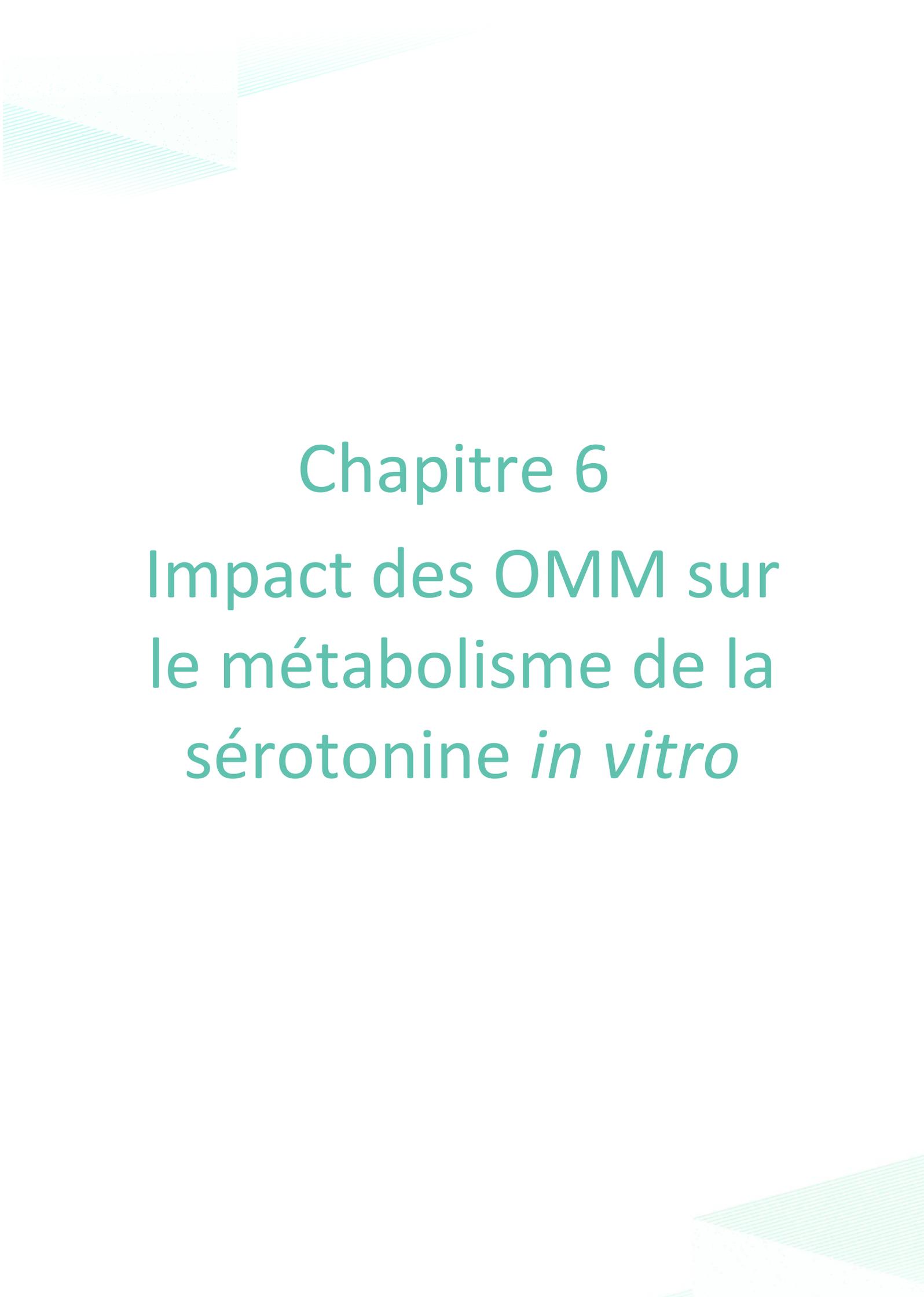
- Koyama, S., Narita, E., Shimizu, Y., Suzuki, Y., Shiina, T., Taki, M., Shinohara, N., & Miyakoshi, J. (2016). Effects of Long-Term Exposure to 60 GHz Millimeter-Wavelength Radiation on the Genotoxicity and Heat Shock Protein (Hsp) Expression of Cells Derived from Human Eye. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *13*(8), 802. <https://doi.org/10.3390/ijerph13080802>
- Koyama, S., Narita, E., Suzuki, Y., Shiina, T., Taki, M., Shinohara, N., & Miyakoshi, J. (2019). Long-term exposure to a 40-GHz electromagnetic field does not affect genotoxicity or heat shock protein expression in HCE-T or SRA01/04 cells. *Journal of Radiation Research*, *60*(4), 417-423. <https://doi.org/10.1093/jrr/rrz017>
- Kozlov, S. V., Waardenberg, A. J., Engholm-Keller, K., Arthur, J. W., Graham, M. E., & Lavin, M. (2016). Reactive Oxygen Species (ROS)-Activated ATM-Dependent Phosphorylation of Cytoplasmic Substrates Identified by Large-Scale Phosphoproteomics Screen. *Molecular & Cellular Proteomics*, *15*(3), 1032-1047. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.055723>
- Kozuch, O., & Mayer, V. (1975). Pig kidney epithelial (PS) cells : A perfect tool for the study of flaviviruses and some other arboviruses. *Acta Virologica*, *19*(6), 498.
- Krokan, H. E., Standal, R., & Slupphaug, G. (1997). DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochemical Journal*, *325*(1), 1-16. <https://doi.org/10.1042/bj3250001>
- Kumar, S., Kesari, K. K., & Behari, J. (2010). Evaluation of genotoxic effects in male Wistar rats following microwave exposure. *Indian Journal of Experimental Biology*, *48*(6), 586-592.
- Kuzminov, A. (2001). DNA replication meets genetic exchange : Chromosomal damage and its repair by homologous recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(15), 8461-8468. <https://doi.org/10.1073/pnas.151260698>
- Lavin, M. F. (2008). Ataxia-telangiectasia : From a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *9*(10), 759-769. <https://doi.org/10.1038/nrm2514>
- Le Pogam, P., Le Page, Y., Habauzit, D., Doué, M., Zhadobov, M., Sauleau, R., Le Dréan, Y., & Rondeau, D. (2019). Untargeted metabolomics unveil alterations of biomembranes permeability in human HaCaT keratinocytes upon 60 GHz millimeter-wave exposure. *Scientific Reports*, *9*(1), 9343. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45662-6>
- Le Quément, C., Nicolas Nicolaz, C., Zhadobov, M., Desmots, F., Sauleau, R., Aubry, M., Michel, D., & Le Dréan, Y. (2012). Whole-genome expression analysis in primary human keratinocyte cell cultures exposed to 60 GHz radiation. *Bioelectromagnetics*, *33*(2), 147-158. <https://doi.org/10.1002/bem.20693>
- Lerchl, A., Klose, M., & Drees, K. (2020). No Increased DNA Damage Observed in the Brain, Liver, and Lung of Fetal Mice Treated With Ethylnitrosourea and Exposed to UMTS Radiofrequency

- Electromagnetic Fields. *Bioelectromagnetics*, 41(8), 611-616.
<https://doi.org/10.1002/bem.22301>
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362(6422), 709-715.
<https://doi.org/10.1038/362709a0>
- Loft, S., Høgh Danielsen, P., Mikkelsen, L., Risom, L., Forchhammer, L., & Møller, P. (2008). Biomarkers of oxidative damage to DNA and repair. *Biochemical Society Transactions*, 36(5), 1071-1076. <https://doi.org/10.1042/BST0361071>
- Logani, M. K., Bhanushali, A., Ziskin, M. C., & Prihoda, T. J. (2004). Micronuclei in Peripheral Blood and Bone Marrow Cells of Mice Exposed to 42 GHz Electromagnetic Millimeter Waves. *Radiation Research*, 161(3), 341-345. <https://doi.org/10.1667/RR3121>
- London, R. E. (2015). The structural basis of XRCC1-mediated DNA repair. *DNA Repair*, 30, 90-103.
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.02.005>
- Markovà, E., Malmgren, L. O. G., & Belyaev, I. Y. (2010). Microwaves from Mobile Phones Inhibit 53BP1 Focus Formation in Human Stem Cells More Strongly Than in Differentiated Cells : Possible Mechanistic Link to Cancer Risk. *Environmental Health Perspectives*, 118(3), 394-399. <https://doi.org/10.1289/ehp.0900781>
- Nakamura, J., & Swenberg, J. A. (1999). Endogenous apurinic/aprimidinic sites in genomic DNA of mammalian tissues. *Cancer Research*, 59(11), 2522-2526.
- Nemec, A. A., Wallace, S. S., & Sweasy, J. B. (2010). Variant base excision repair proteins : Contributors to genomic instability. *Seminars in Cancer Biology*, 20(5), 320-328.
<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2010.10.010>
- Oberto, G., Rolfo, K., Yu, P., Carbonatto, M., Peano, S., Kuster, N., Ebert, S., & Tofani, S. (2007). Carcinogenicity Study of 217 Hz Pulsed 900 MHz Electromagnetic Fields in *Pim1* Transgenic Mice. *Radiation Research*, 168(3), 316-326. <https://doi.org/10.1667/rr0425.1>
- Oka, S., Leon, D., Tsuchimoto, D., Sakumi, K., & Nakabeppu, Y. (2015). *MUTYH, an adenine DNA glycosylase, mediates p53 tumor suppression via PARP-dependent cell death | Oncogenesis*.
<https://www.nature.com/articles/oncsis201435>
- Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnäd, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., & Mann, M. (2006). Global, In Vivo, and Site-Specific Phosphorylation Dynamics in Signaling Networks. *Cell*, 127(3), 635-648. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.026>
- Paulraj, R., & Behari, J. (2006). Single strand DNA breaks in rat brain cells exposed to microwave radiation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 596(1-2), 76-80. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.12.006>
- Petermann, E., Orta, M. L., Issaeva, N., Schultz, N., & Helleday, T. (2010). Hydroxyurea-Stalled Replication Forks Become Progressively Inactivated and Require Two Different RAD51-

- Mediated Pathways for Restart and Repair. *Molecular Cell*, 37(4), 492-502.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.021>
- Pfeiffer, P. (2000). Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis*, 15(4), 289-302.
<https://doi.org/10.1093/mutage/15.4.289>
- Pogozelski, W. K., & Tullius, T. D. (1998). Oxidative Strand Scission of Nucleic Acids : Routes Initiated by Hydrogen Abstraction from the Sugar Moiety. *Chemical Reviews*, 98(3), 1089-1108.
<https://doi.org/10.1021/cr960437i>
- Ramachandran, E. N., Karuppasamy, C. V., Kumar, V. A., Soren, D. C., Kumar, P. R. V., Koya, P. K. M., Jaikrishan, G., & Das, B. (2016). Radio-adaptive response in peripheral blood lymphocytes of individuals residing in high-level natural radiation areas of Kerala in the southwest coast of India. *Mutagenesis*, gew057. <https://doi.org/10.1093/mutage/gew057>
- Robison, J. G., Pendleton, A. R., Monson, K. O., Murray, B. K., & O'Neill, K. L. (2002). Decreased DNA repair rates and protection from heat induced apoptosis mediated by electromagnetic field exposure. *Bioelectromagnetics*, 23(2), 106-112. <https://doi.org/10.1002/bem.103>
- Rudling, A., Gustafsson, R., Almlöf, I., Homan, E., Scobie, M., Warpman Berglund, U., Helleday, T., Stenmark, P., & Carlsson, J. (2017). Fragment-Based Discovery and Optimization of Enzyme Inhibitors by Docking of Commercial Chemical Space. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(19), 8160-8169. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01006>
- Saintigny, Y. (2001). Characterization of homologous recombination induced by replication inhibition in mammalian cells. *The EMBO Journal*, 20(14), 3861-3870.
<https://doi.org/10.1093/emboj/20.14.3861>
- Sanie-Jahromi, F., & Saadat, M. (2018). Effects of electromagnetic field, cisplatin and morphine on cytotoxicity and expression levels of DNA repair genes. *Molecular Biology Reports*, 45(5), 807-814. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4223-7>
- Sannino, A., Zeni, O., Romeo, S., Massa, R., Gialanella, G., Grossi, G., Manti, L., Vijayalaxmi, & Scarfi, M. R. (2014). Adaptive response in human blood lymphocytes exposed to non-ionizing radiofrequency fields : Resistance to ionizing radiation-induced damage. *Journal of Radiation Research*, 55(2), 210-217. <https://doi.org/10.1093/jrr/rrt106>
- Sannino, A., Di Costanzo, G., Brescia, F., Sarti, M., Zeni, O., Juutilainen, J., & Scarfi, M. R. (2009). Human Fibroblasts and 900 MHz Radiofrequency Radiation : Evaluation of DNA Damage after Exposure and Co-exposure to 3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-Hydroxy-2(5h)-furanone (MX). *Radiation Research*, 171(6), 743-751. <https://doi.org/10.1667/RR1642.1>

- Seigneur, M., Bidnenko, V., Ehrlich, S. D., & Michel, B. (1998). RuvAB Acts at Arrested Replication Forks. *Cell*, *95*(3), 419-430. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81772-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81772-9)
- Shibutani, S., Takeshita, M., & Grollman, A. P. (1991). Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature*, *349*(6308), 431-434. <https://doi.org/10.1038/349431a0>
- Shiloh, Y., & Ziv, Y. (2013). The ATM protein kinase : Regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *14*(4), 197-210. <https://doi.org/10.1038/nrm3546>
- Shirai, T., Ichihara, T., Wake, K., Watanabe, S., Yamanaka, Y., Kawabe, M., Taki, M., Fujiwara, O., Wang, J., Takahashi, S., & Tamano, S. (2007). Lack of promoting effects of chronic exposure to 1.95-GHz W-CDMA signals for IMT-2000 cellular system on development of N-ethylnitrosourea-induced central nervous system tumors in F344 rats. *Bioelectromagnetics*, *28*(7), 562-572. <https://doi.org/10.1002/bem.20324>
- Shirai, T., Kawabe, M., Ichihara, T., Fujiwara, O., Taki, M., Watanabe, S., Wake, K., Yamanaka, Y., Imaida, K., Asamoto, M., & Tamano, S. (2005). Chronic exposure to a 1.439 GHz electromagnetic field used for cellular phones does not promote N-ethylnitrosourea induced central nervous system tumors in F344 rats. *Bioelectromagnetics*, *26*(1), 59-68. <https://doi.org/10.1002/bem.20079>
- Siddiqi, M. A., & Bothe, E. (1987). Single- and Double-Strand Break Formation in DNA Irradiated in Aqueous Solution : Dependence on Dose and OH Radical Scavenger Concentration. *Radiation Research*, *112*(3), 449-463. <https://doi.org/10.2307/3577098>
- Smith, P., Kuster, N., Ebert, S., & Chevalier, H.-J. (2007). GSM and DCS Wireless Communication Signals : Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Study in the Wistar Rat. *Radiation Research*, *168*(4), 480-492. <https://doi.org/10.1667/RR0680.1>
- Soubere Mahamoud, Y., Aite, M., Martin, C., Zhadobov, M., Sauleau, R., Le Dréan, Y., & Habauzit, D. (2016). Additive Effects of Millimeter Waves and 2-Deoxyglucose Co-Exposure on the Human Keratinocyte Transcriptome. *PLOS ONE*, *11*(8), e0160810. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160810>
- Szostak, J. W., Orr-Weaver, T. L., Rothstein, R. J., & Stahl, F. W. (1983). The double-strand-break repair model for recombination. *Cell*, *33*(1), 25-35. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90331-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90331-8)
- Teyssier, F., Bay, J. O., Dionet, C., & Verrelle, P. (1999). [Cell cycle regulation after exposure to ionizing radiation]. *Bulletin Du Cancer*, *86*(4), 345-357.
- Tillmann, T., Ernst, H., Ebert, S., Kuster, N., Behnke, W., Rittinghausen, S., & Dasenbrock, C. (2007).

- Carcinogenicity study of GSM and DCS wireless communication signals in B6C3F1 mice. *Bioelectromagnetics*, 28(3), 173-187. <https://doi.org/10.1002/bem.20283>
- 2815 Verschaeve, L., Juutilainen, J., Lagroye, I., Miyakoshi, J., Saunders, R., de Seze, R., Tenforde, T., van Rongen, E., Veyret, B., & Xu, Z. (2010). In vitro and in vivo genotoxicity of radiofrequency fields. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 705(3), 252-268. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2010.10.001>
- Vijayalaxmi, Cao, Y., & Scarfi, M. R. (2014). Adaptive response in mammalian cells exposed to non-ionizing radiofrequency fields : A review and gaps in knowledge. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 760, 36-45. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2014.02.002>
- Vijayalaxmi, & Prihoda, T. J. (2012). Genetic damage in human cells exposed to non-ionizing radiofrequency fields : A meta-analysis of the data from 88 publications (1990–2011). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 749(1-2), 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2012.09.007>
- Vijayalaxmi, V., & Prihoda, T. J. (2018). Comprehensive Review of Quality of Publications and Meta-Analysis of Genetic Damage in Mammalian Cells Exposed to Non-Ionizing Radiofrequency Fields. *Radiation Research*, 191(1), 20. <https://doi.org/10.1667/RR15117.1>
- Wang, K., Maayah, M., Sweasy, J. B., & Alnajjar, K. S. (2021). The role of cysteines in the structure and function of OGG1. *Journal of Biological Chemistry*, 296, 100093. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.016126>
- Wold, M. S. (1997). REPLICATION PROTEIN A:A Heterotrimeric, Single-Stranded DNA-Binding Protein Required for Eukaryotic DNA Metabolism. *Annual Review of Biochemistry*, 66(1), 61-92. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.66.1.61>
- Wurgler, F. E., & Kramers, P. G. N. (1992). Environmental effects of genotoxins (eco-genotoxicology). *Mutagenesis*, 7(5), 321-327. <https://doi.org/10.1093/mutage/7.5.321>
- Ziemann, C., Brockmeyer, H., Reddy, S. B., Vijayalaxmi, null, Prihoda, T. J., Kuster, N., Tillmann, T., & Dasenbrock, C. (2009). Absence of genotoxic potential of 902 MHz (GSM) and 1747 MHz (DCS) wireless communication signals : In vivo two-year bioassay in B6C3F1 mice. *International Journal of Radiation Biology*, 85(5), 454-464. <https://doi.org/10.1080/09553000902818907>
- Zook, B. C., & Simmens, S. J. (2006). The Effects of Pulsed 860 MHz Radiofrequency Radiation on the Promotion of Neurogenic Tumors in Rats. *Radiation Research*, 165(5), 608-615. <https://doi.org/10.1667/RR3551.1>



Chapitre 6

Impact des OMM sur le métabolisme de la sérotonine *in vitro*

Le chapitre 6 est consacré aux mécanismes sous-jacents aux effets analgésiques des ondes millimétriques. L'effet anti-douleur est l'un des seuls effets reproductibles des OMM, à la fois sur des modèles animaux ou sur des volontaires humains en conditions expérimentales « en double aveugle » [Radziewsky et al. 2001 ; Usichenko et al. 2003]. Pour bien comprendre les hypothèses de travail, les mécanismes simplifiés de la douleur et de sa modulation seront illustrés dans un premier temps. Puis un état de l'art sur les mécanismes possibles des OMM comme agent analgésique, ainsi que nos pistes de recherche seront présentés. Les résultats obtenus lors de cette étude seront montrés et clôturés par une discussion et conclusion.

2825 I- Introduction

1. La douleur, expérience multi-composante

La douleur est définie, selon l'« *International Association for the study of pain* » comme « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, liée à une lésion tissulaire existante ou potentielle, ou décrite en termes évoquant une telle lésion » [Merskey and Bogduk, 1994]. La douleur a pour première fonction un comportement de survie par rapport à un danger qui menace l'intégrité du corps. Les stimulations internes et externes potentiellement nocives pour l'organisme vont permettre l'activation de récepteurs sensoriels spécifiques, appelés « **nocicepteurs** » [Sherrington, 1952]. La nociception correspond à l'intégration de la douleur au niveau du système nerveux somato-sensoriel. Outre sa composante purement mécanique, l'interprétation de la douleur est une expérience consciente, plurifactorielle, influencée par de nombreuses composantes tels que le souvenir, l'affectif, les pathologies ainsi que des facteurs génétiques et cognitifs.

La douleur peut être classée selon différents critères :

2840 Etiologique

- **Douleur Nociceptive /physiologique** : Elle est induite par une lésion (coupure, brûlure, ...), une inflammation des tissus ou un traumatisme (muscle, articulation) activant ainsi les nocicepteurs.

2845 - **Douleur Neuropathique** : Elle est provoquée par une lésion ou une maladie du système nerveux somato-sensoriel, c'est-à-dire touchant le cerveau, la moelle épinière ou les nerfs. Les principales causes pourraient être principalement dues à une inflammation ou à des maladies métaboliques telles que le diabète, les tumeurs, les maladies neurologiques.

2850 - **Douleur psychogène** : elles sont dues à un dysfonctionnement des systèmes de contrôle de la douleur sans lésion identifiée. La fibromyalgie et la céphalée en sont les plus fréquentes.

Temporelle :

2855 - **Douleur Aigue** : Elle est transitoire et disparaît lorsque la cause est supprimée. Elle survient généralement lors d'une lésion tissulaire ou nerveuse et consiste en un signal d'alarme pour la survie de l'individu. Elle est traitée avec des moyens pharmacologiques tels que des antidouleurs. Insuffisamment traitées, les douleurs aiguës peuvent devenir des douleurs chroniques.

2860 - **Douleur Chronique** : D'après la Haute Autorité de Santé [HAS-2008], la douleur chronique décrit une douleur persistante depuis plus de 3 mois, affectant le comportement et le bien-être du patient. La douleur peut être constante ou varier en intensité en fonction des périodes et les traitements proposés sont insuffisants. En Europe, 20% de la population adulte souffre de douleurs chroniques [Breivik et al. 2006]. Pourtant la prise en charge de la douleur de façon efficace ne dépasse pas 50% des patients [INSERM 2017]. Le traitement de la douleur chez l'adulte repose principalement sur des médicaments dits analgésiques tels que le paracétamol, les opioïdes ou les médicaments morphiniques.

2865 Néanmoins, ces médicaments s'accompagnent d'effets secondaires importants s'ils sont utilisés de façon chronique, pouvant entraîner une dépendance ou une addiction [Jensen et Finnerup 2007]. Peu de solutions sont proposées dans ce domaine. De ce fait, il y a un réel besoin de nouveaux traitements.

2870

2. Intégration nociceptive – voies afférentes

2875 L'intégration de la douleur est possible grâce aux voies afférentes de la douleur. Elles comprennent l'ensemble des éléments du système nerveux périphérique (SNC-nerfs et ganglions) et central (SNC-moelle osseuse et encéphale) permettant de détecter, transmettre, analyser et contrôler les informations générées par un stimulus douloureux. Globalement, le message nociceptif est capté aux niveaux des récepteurs nociceptifs et est dirigé vers la corne postérieure de la moelle épinière via un protoneurone ou neurone de premier ordre. Le deutoneurone ou neurone de 2^{ème} ordre prend le relais jusqu'au thalamus. Enfin le 3^{ème} neurone transmet le signal au cortex cérébral, aux niveaux de nombreuses régions, où l'information sera traduite (Figure CH6-1). Chaque élément constituant cette chaîne d'information est détaillé ci-dessous. Une fois intégré par le cerveau, ce dernier va envoyer

2885 une réponse aux organes effecteurs via les voies descendantes de la douleur (voir paragraphe 3. Modulation de la douleur).

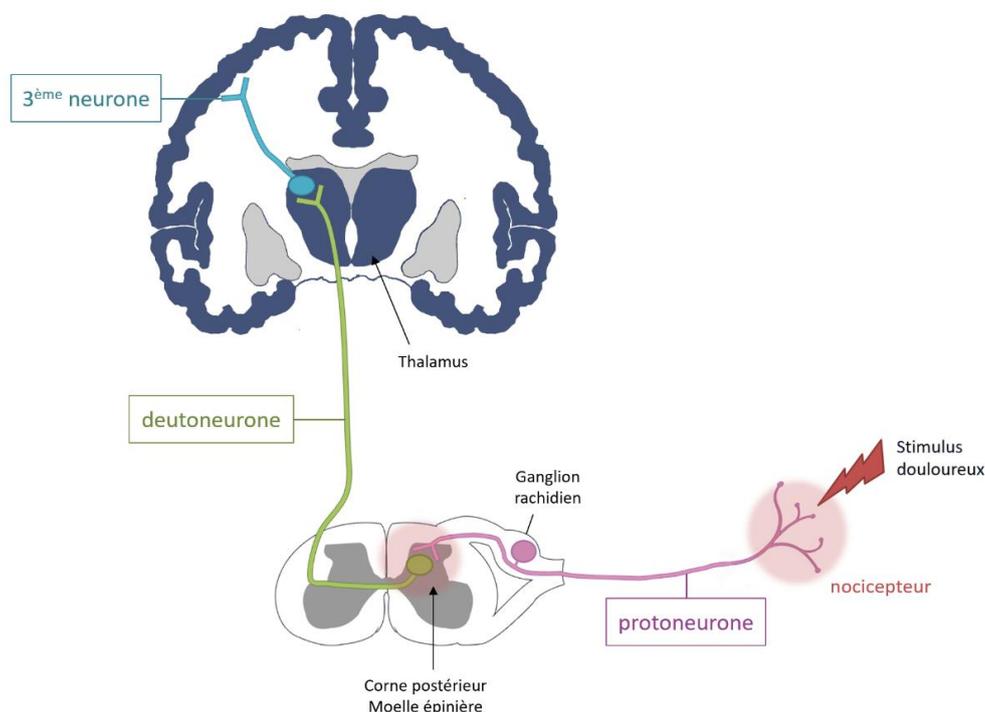


Figure CH6- 1 : Schéma simplifié des voies ascendantes de la douleur (illustration personnelle)

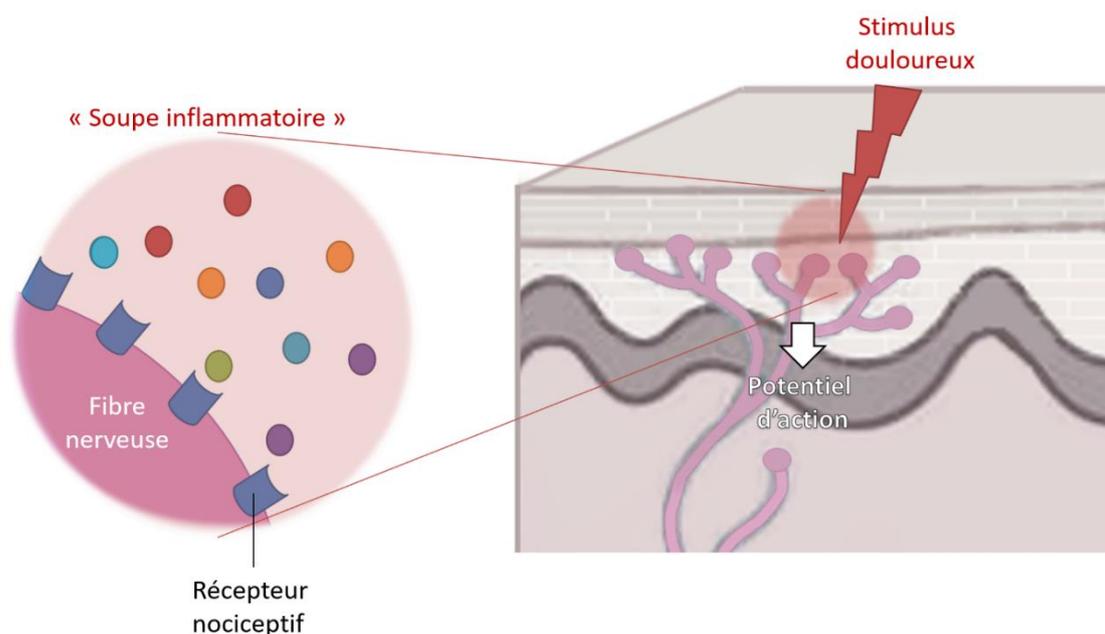
2890 Le stimulus douloureux est capté au niveau du nocicepteur du protoneurone (rose). Ce dernier transmet l'information au deutoneurone (vert) au niveau de la corne postérieure de la moelle épinière. Le deutoneurone remonte jusqu'au thalamus où il fait synapse avec le 3^{ème} neurone (bleu) qui permettra l'intégration du message douloureux.

2.1. Transduction du signal douloureux

2895 Les « récepteurs de la douleur » sont des terminaisons nerveuses libres, c'est-à-dire des extrémités distales d'axones. Ils sont classés en 2 principaux types de nocicepteurs :

- **Les mécanorécepteurs (ou nocicepteurs unimodaux) :** Ces récepteurs sont sensibles à des stimulations mécaniques de forte intensité. La « douleur » est proportionnelle à l'intensité de la pression ou de la tension exercée. Ils ne sont présents que dans la peau.

2900 - **Les nocicepteurs polymodaux :** ils représentent 75 à 80 % de tous les nocicepteurs. Ils sont sensibles à de nombreux stimuli mécaniques (pression/étirement), chimiques (substances algogènes) et thermiques (température supérieure à 42°C). On les retrouve à la fois au niveau cutané, mais aussi au niveau des organes internes et des viscères.



2905 **Figure CH6-2 : Transduction du signal nociceptif.** Un stimulus douloureux va entraîner la sécrétion de nombreuses substances algogènes constituant la « soupe inflammatoire ». Ces molécules stimulent les récepteurs nociceptifs de la fibre nerveuse. Le message douloureux sera envoyé au SNC sous forme de potentiel d'action.

2910

Quand une région du corps subit un stimulus douloureux, de nombreuses substances algogènes sont sécrétées localement par les cellules lésées et par les cellules présentes à proximité. Les cellules lésées vont libérer leur contenu cellulaire riche en ions potassium (K^+),

l'ion hydrogène (H^+) et en ATP. Une inflammation locale se développe et les cellules sanguines (plaquettes, polynucléaires, mastocytes, macrophages) pénètrent la lésion et libèrent des médiateurs de l'inflammation : bradykinine, sérotonine, histamine, prostaglandine, substance P, ... Ces médiateurs et ces ions constituent une « soupe inflammatoire » capable d'activer les nocicepteurs (Figure CH6-2).

L'information nociceptive remonte ensuite le long de l'axone des fibres nerveuses. Parmi ces fibres nerveuses présentes au niveau de la peau, il existe (Figure CH6-3) :

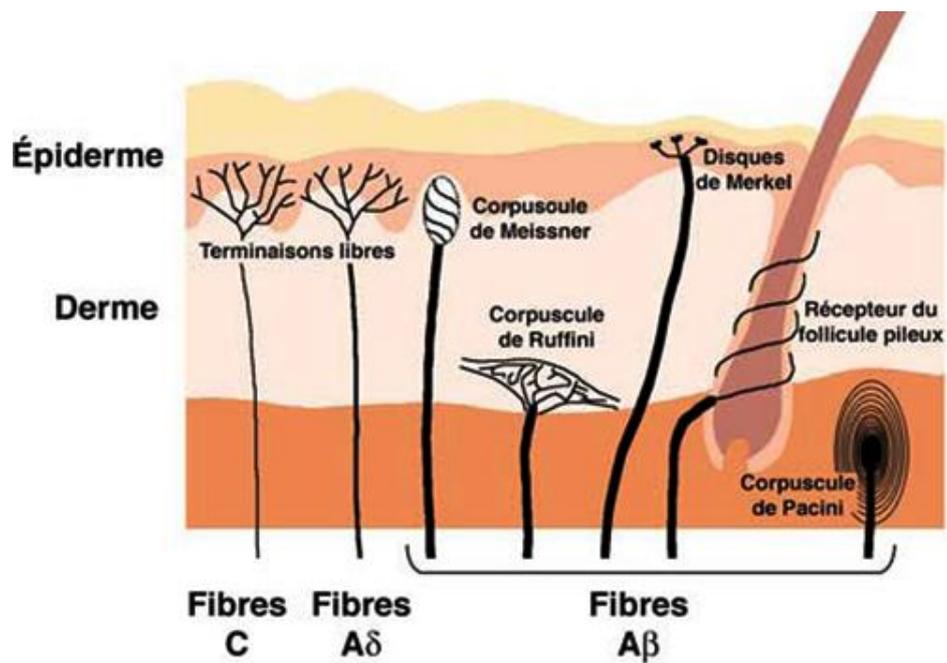


Figure CH6-3 : Récepteur de la peau et fibres nerveuses associées (Palli-science, 2005-2021). Les fibres nerveuses C et A δ sont en relation avec les terminaisons libres de la peau. Les Fibres A β sont liées aux corpuscules de Meissner, aux corpuscules de Ruffini, aux disques de Merkel, aux récepteurs du follicule pileux ainsi qu'aux corpuscules de Pacini.

- **Des Fibres nerveuses de type A δ .** Ce sont des fibres de calibre moyen (1-5 μm) ; myélinisées permettant ainsi une conduction rapide (5-30 mètres par seconde). Elles sont principalement en lien avec les mécanorécepteurs.
- **Des Fibres nerveuses de type C,** retrouvées principalement avec les nocicepteurs polymodaux. Elles ont un petit calibre (0,3-1,5 μm), non-myélinisées avec une conduction lente du signal nerveux (0,5-3 mètres par seconde). Avec les fibres A δ , les fibres C sont reliées aux terminaisons nerveuses (Figure CH6-3)

2935 - Il existe aussi des **fibres appelées A α et A β** , de gros calibre, fortement myélinisées, dont la vitesse de conduction du message nerveux est la plus rapide (35-120 m/s). Ces fibres permettent de véhiculer la sensibilité tactile et proprioceptive en lien avec le corpuscule de Meissner (toucher superficiel), le corpuscule de Ruffini (température et pression), les disques de Merkel (toucher discrimination tactile), les récepteurs du follicule pileux et le corpuscule de Pacini (vibration). Elles sont non nociceptives. Les corpuscule de Ruffini et les corpuscules de Pacini, de par leur profondeur au sein du derme voire de l'hypoderme ne sont probablement pas impliqués dans l'effet analgésique des OMM. En effet, les OMM ne pénètrent que très peu dans les tissus biologiques, s'arrêtant au niveau de la partie supérieure du derme.

2945

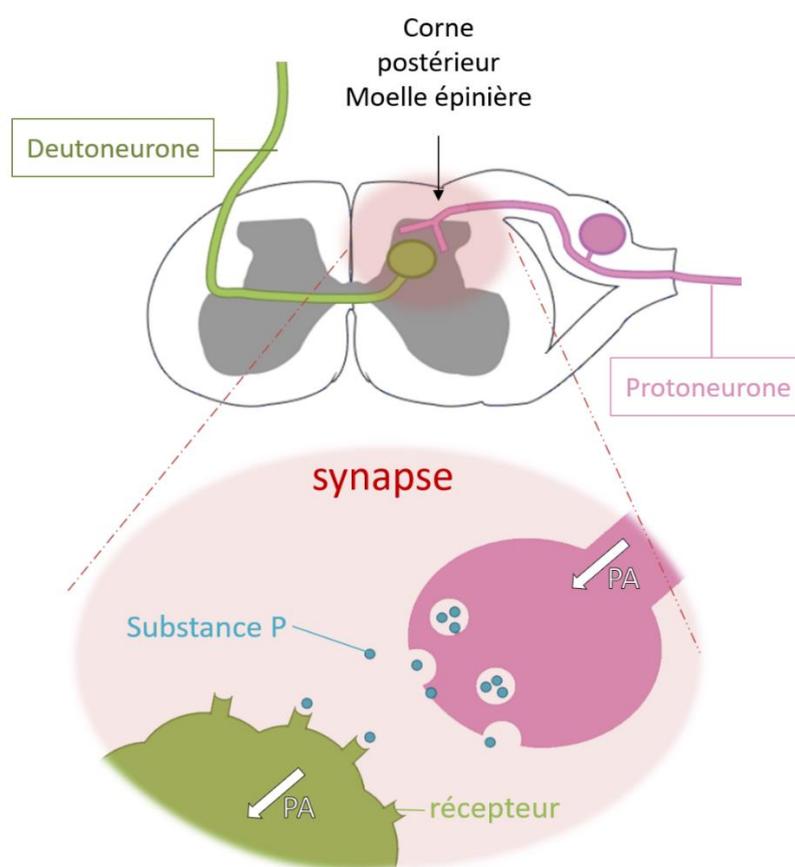
Tableau CH6-1 : Propriétés des fibres nerveuses A β , A δ et C

Fibres	Diamètre (μm)	Myélinisation	Vitesse conduction (m/s)	Information	Récepteur de la peau
A α et β	6-20	+++	35-120	Sensorielles (tactiles et proprioceptives)	Corpuscule de Meissner, corpuscule de Ruffini, disque de Merkel, récepteurs du follicule pileux, corpuscule de Pacini
A δ	1-5	+	5-30	Nociceptif	Mécanorécepteurs
C	0,3-1,5	-	0,5-3	Nociceptif	Polymodaux

2.2. Propagation du signal douloureux

2950 Dans la corne postérieure de la moelle osseuse, le protoneurone et le deutoneurone vont faire synapse. En arrivant au niveau du terminal pré-synaptique, le protoneurone libère les neurotransmetteurs, principalement de la substance P, dans la fente synaptique qui vont se fixer sur les récepteurs spécifiques situés sur la membrane plasmique du deutoneurone. La substance P est un neuropeptide (Figure CH6-6) synthétisé à la fois par les terminaisons nerveuses centrales et périphériques [Otsuka et al. 1993]. Elle est fortement localisée dans la

2955 racine dorsale de la moelle épinière ainsi qu'au niveau de la peau et des muscles [Henry, 1980]. Son rôle principal dans la douleur est de transmettre et d'intégrer le message nociceptif de la périphérie au SNC. En se fixant sur le deutoneurone, la substance P permet la formation d'un potentiel post-synaptique (Figure CH6-4).

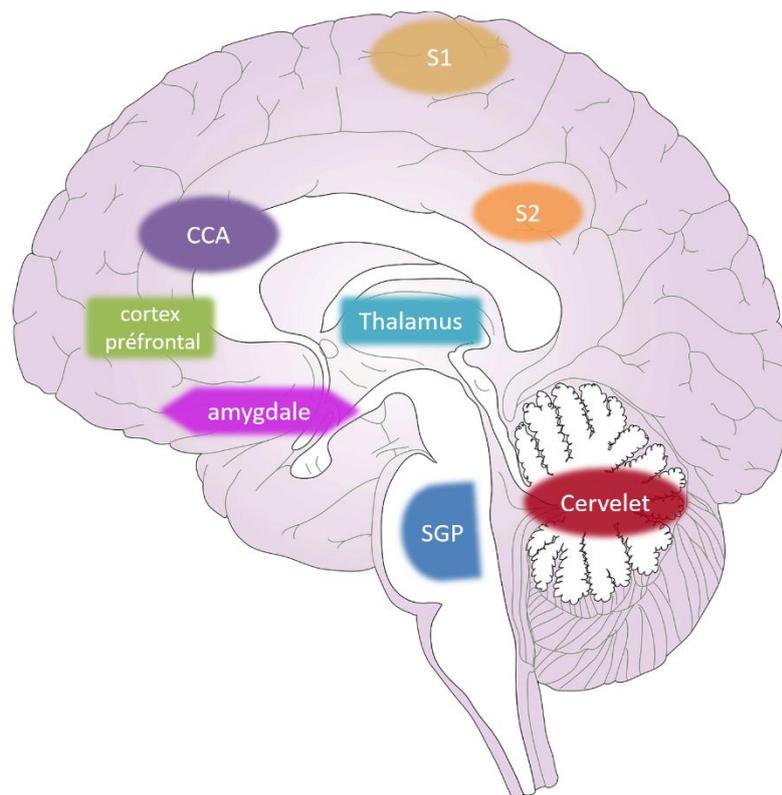


2960

Figure CH6-4 : Transduction du signal douloureux de la périphérie au SNC (illustration personnelle)

Le potentiel d'action permet au protoneurone (rose) de libérer dans la fente synaptique des neurotransmetteurs, principalement de la substance P. La substance P se fixe à son récepteur spécifique et permet de transmettre le potentiel d'action au deutoneurone (vert)

2965 Le deutoneurone traverse alors la moelle osseuse pour arriver au thalamus où il rejoint le
neurone de 3^{ème} ordre. Par la suite, ce dernier arrive au cortex sensitif où l'information
douloureuse va être intégrée, c'est-à-dire que l'individu va prendre conscience du caractère
douloureux du signal, parvenant ainsi à en déterminer la localisation. Il n'existe pas un centre
unique de la douleur mais de très nombreuses structures cérébrales qui sont impliquées dans
2970 la perception douloureuse (Figure CH6-5). Ensemble, elles forment un réseau appelé « Pain
Matrix » (Tracey et al, 2010). Ainsi le cortex somatosensoriel primaire (S1) et secondaire (S2),
le cortex cingulaire antérieur et le cortex préfrontal constituent les centres principaux
d'intégration du message. De façon inconstante, des sous-systèmes cérébraux ont été
identifiés, tels que l'amygdale, la substance grise périaqueducale et le cervelet (Apkarian et
2975 al. 2005, Tracey & Mantyh 2007, Wiech et al. 2005, Villemure et al. 2009). Une fois le message
douloureux discriminé, le cerveau envoie une réponse par divers réactions comme la sueur,
la décharge d'adrénaline, le mouvement de réflexe, la fuite, ...



2980 Figure CH6-5 : Centres principaux de traitement de la douleur au niveau cérébral (illustration personnelle) : le cortex somatosensoriel primaire (S1) et secondaire (S2), le cortex cingulaire antérieur (CCA), le cortex préfrontal, l'amygdale, la substance grise périaqueducale (SGP) et le cervelet.

3. Modulation de la douleur - voies efférentes

2985 Les voies nociceptives afférentes sont en permanence régulées par des systèmes, essentiellement inhibiteurs. Via le biais de connexions synaptiques utilisant de nombreux neurotransmetteurs (Figure CH6-6), il existe plusieurs contrôles des centres supérieurs provenant de diverses structures cérébrales comme le tronc cérébral, l'hypothalamus, le thalamus et le cortex cérébral. Ces contrôles sont, de plus, associés à des phénomènes

2990 psychologiques complexes expliquant par exemple la réponse placebo. Cependant les mécanismes ne sont pas bien compris.

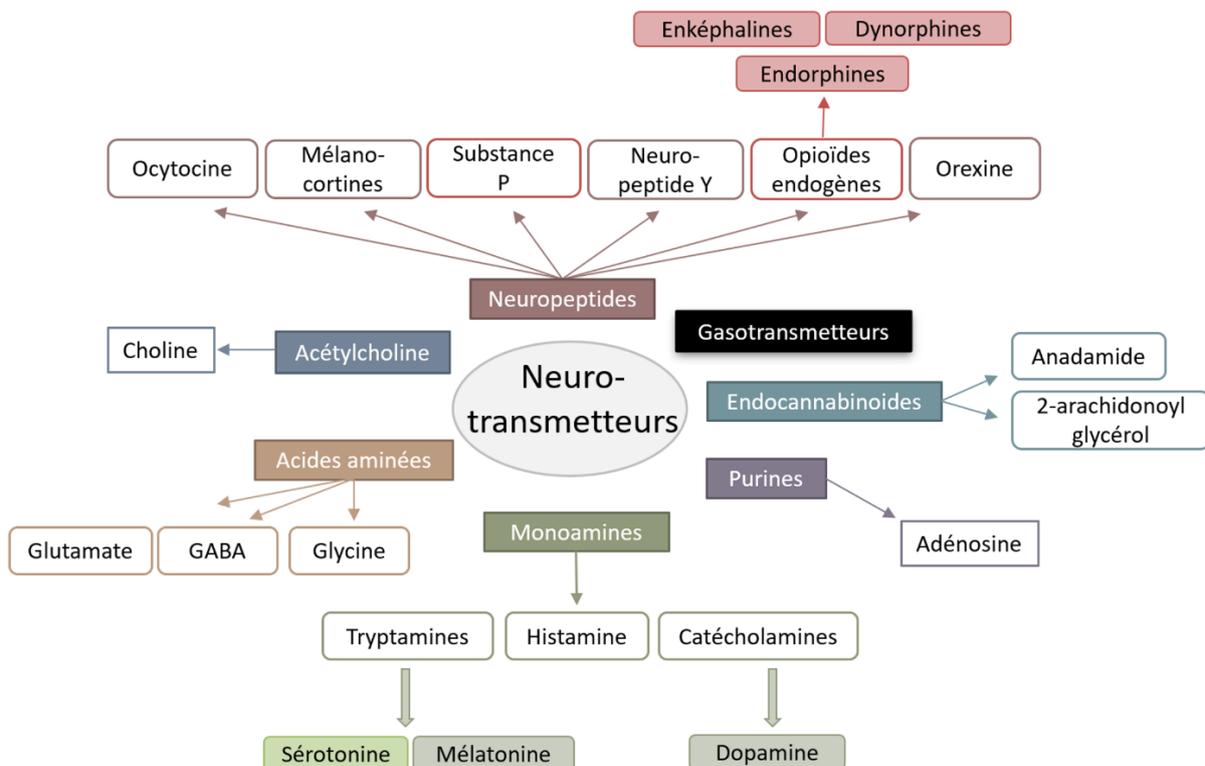
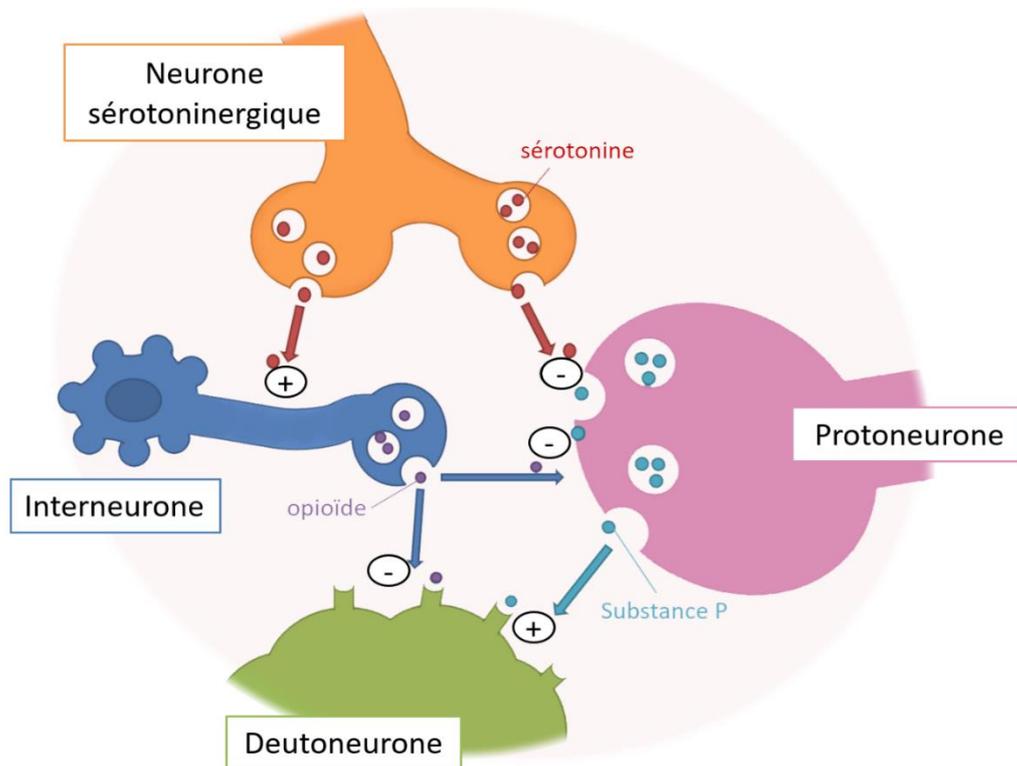


Figure CH6-6 : Famille des neurotransmetteurs (illustration personnelle)

2995 Les neurotransmetteurs sont divisés en 7 grandes familles. Les neuropeptides sont divisés en 6 sous familles : L'ocytocine, les mélanocortines, la substance P, le neuropeptide Y, les opioides endogènes (parmi lesquels on peut citer les enképhalines, les dysmorphines, ainsi que les endorphines) et l'orexine. Les endocannabinoïdes sont composés des anadamides et des 2-arachidonoyl glycérol. Parmi les purines, on retrouve les adénosines. Les monoamines sont divisées en 3 sous-familles : les tryptamines qui comprennent la sérotonine et la mélatonine, l'histamine et les catécholamines avec la dopamine. A

3000 partir des acides aminés, 3 neurotransmetteurs principaux sont synthétisés : le glutamate, l'acide γ -aminobutyrique (GABA) et la glycine. Enfin on retrouve la famille de l'acétylcholine et des gasotransmetteurs.

La voie efférente la plus étudiée s'effectue dans la moelle épinière (Figure CH6-7) faisant intervenir le système opioïde et le système monoaminergique. Dans un premier temps, des neurones monoaminergiques vont descendre au niveau de la corne postérieure de la moelle épinière, proche de la synapse entre le protoneurone et le deutoneurone. Le système monoaminergique est un modulateur endogène de la douleur [Bannister et Dickenson, 2016], impliquant principalement la sérotonine. La sérotonine est un neurotransmetteur de petite taille, synthétisée à partir du tryptophane. Elle est excrétée par exocytose dans l'espace synaptique où elle se fixera à un récepteur. Il existe 7 familles principales de récepteurs de la sérotonine : 5-HT₁ à 5-HT₇ que l'on retrouve dans le SNC, le SNP, les vaisseaux sanguins et même le système digestif puisqu'elle joue de nombreux rôles, notamment dans les émotions, l'agressivité, les comportements sexuels, la digestion, etc [Nichols & Nichols, 2008]. Pour autant, son rôle dans la douleur n'est pas clair, étant à la fois pro-nocicepteur et anti-nociceptif [Fields, 2004]. Des études complémentaires sur l'action centrale de la sérotonine restent à entreprendre. Cependant, au sein de la moelle épinière, elle permet d'inhiber la sécrétion de substance P du neurone de premier ordre et ainsi de stopper le message nociceptif entre le protoneurone et le deutoneurone. De plus, elle active les interneurons adjacents. Ces derniers sécrètent des opioïdes endogènes qui renforcent l'inhibition du protoneurone (Figure CH6-7). Les opioïdes endogènes sont répartis en trois familles principales : les enképhalines, les endorphines et les dynorphines. Ils se lient, avec des affinités différentes, à 3 récepteurs : μ -opioïdes (récepteur préférentiel des endorphines), les récepteurs δ -opioïdes (récepteur préférentiel des enképhalines) et les récepteurs κ -opioïdes (récepteur préférentiel des dynorphines) [Roth-Deri et al, 2008]. Les opioïdes ainsi que leurs récepteurs sont répartis dans l'ensemble du SNC et SNP mais sont synthétisés essentiellement au niveau du cerveau [Maldonado, 2010]. Le système opioïde endogène joue un rôle central dans la régulation de la douleur.



3030

Figure CH6-7 : Contrôle descendant de la douleur au sein de la moelle épinière (illustration personnelle)

Le neurone sérotoninergique descend de la moelle épinière afin de sécréter de la sérotonine qui agit sur l'interneurone en l'activant et sur le protoneurone en l'inhibant. A son tour, l'interneurone inhibe le protoneurone et le deutoneurone grâce à la sécrétion d'opioïdes endogènes afin de stopper le message nociceptif.

3035

Un fonctionnement anormal des mécanismes de modulation de la douleur pourrait expliquer certains cas de douleurs chroniques [Yarnitsky et al. 2010]. Afin de soulager le patient, une

3040 thérapie non médicamenteuse favorisant l'expression et/ou la sécrétion de neurotransmetteurs anti-nociceptifs semble prometteuse.

4. Thérapie OMM

3045 L'utilisation des ondes millimétriques dans le domaine médical a débuté dans les années 1970 en ex-URSS. Plus de 3 millions de patients ont été traités avec cette thérapie. Utilisée de manière empirique, elle a permis de traiter plus de 50 pathologies, telles que le traitement de

maladies gastro-intestinales, de maladie de peau, psychiques, cardiovasculaires, de cicatrisation ou encore de cancers [Rojavi & Ziskin, 1997] avec une efficacité de traitement oscillant entre 60 et 95% selon la maladie [Betski, 2000]. De plus, les essais cliniques n'ont rapporté que de très faibles effets secondaires tels que de légers maux de tête, des variations transitoires de la pression artérielle, des éruptions prurigineuses locales au niveau du site d'exposition ou une légère augmentation de la température corporelle [Rojavin & Ziskin 1998]. Il a été démontré que les effets analgésiques induits par la thérapie sont reproductibles à la fois chez des modèles animaux [Bagatskaya et al. 2013, Gura et al. 2012, 2006, Sushko et al. 2013, Chuyan et al. 2006, Nessin et al. 2006, 2007, Radzievsky et al. 2001 et 2004, Lysenyuk et al. 2000, Rojavin et al. 2000], mais aussi chez l'humain, même si un effet placebo ne peut être encore totalement écarté [Tarakanov et al. 2021, Partyla et al. 2017, Rabenok et al. 2009 ; Radzievsky et al., 2000, Usichenko et al. 2003]. Cette technique non invasive consiste à exposer la région douloureuse pendant 15 à 30 min, en utilisant 3 principales fréquences autour de 42,2 ; 53,6 et 61,2 GHz. L'expérimentation a montré que les effets hypoalgésiques optimaux sont retrouvés pour des fréquences aux alentours de 60 GHz et pour des densités de puissance incidence comprises entre 5 et 15 mW/cm², ce qui induit une légère augmentation de température en surface de la peau (de 1,5 à 3°C), sans endommager les tissus [Ziskin, 2006 ; Radzievsky et al. 2008]. La puissance semble avoir une importance capitale dans la genèse de l'hypoalgésie [Pakhomov et al. 1997, Lysenyuk et al. 2000] et n'est pas retrouvée pour des densités de puissance inférieures à 0,5 mW/cm² qui ne génèrent pas de chaleur [Rojavin et al. 2000]. Pour autant, la composante thermique n'est pas le seul facteur puisque l'utilisation d'un chauffage via un rayon laser ne reproduit pas d'effet analgésique [Radzievsky et al. 2004]. De ce fait, les effets biologiques décrits ne peuvent pas être considérés comme purement non-thermiques. Pour autant, cette thérapie n'a pas été adoptée par la médecine occidentale. Plusieurs raisons expliquent cela :

- Premièrement, la majorité des ouvrages sur le sujet avant 1998 sont écrites en russes, non traduites, rendant compliquées l'analyse et la réflexion sur cette technique.
- Deuxièmement, les différences importantes d'utilisation de cette technique (exposition totale du corps ou l'irradiation des zones douloureuses ou encore l'exposition sur des points d'acupuncture [Pakhomov 2000] entraînent le scepticisme de la médecine européenne.

3080 - Troisièmement, les mécanismes précis impliqués dans l'effet des OMM sur la suppression de la douleur sont encore inconnus [Usichenko et al. 2006]. Néanmoins, quelques pistes sur les mécanismes semblent prometteuses.

5. Etude du mécanisme des OMM sur la douleur

3085 Pour étudier ces effets analgésiques, une recherche bibliographique a été effectuée, en conservant uniquement les études publiées en anglais, utilisant des puissances proches des paramètres utilisés en thérapie. Plusieurs pistes de mécanismes se dessinent (Tableau CH6-1).

3090 En 2006, Chuyan et son équipe ont réalisé un vaste ciblage de plusieurs neurotransmetteurs candidats qui pourraient être impliqués dans la réponse analgésique médiée par les OMM. Pour cela, ils ont induit un modèle de douleur aiguë chez le rat par injection de formol. Puis ils exposent certains groupes de rats immédiatement aux OMM et/ou à des molécules ayant un effet sur les neurotransmetteurs : le Naloxone (antagoniste non-sélectif des récepteurs aux opioïdes de tout type), le para-chlorophénylalanine (p-CPA, molécule influençant le métabolisme de la sérotonine à la fois au niveau du système nerveux périphérique mais aussi 3095 du système nerveux central), le Propranolol (bloque les β -adrenorecepteurs), le nicergoline (bloque les α -adrenorecepteurs), le haloperidole (bloque les récepteurs à la dopamine) et le luzindole (bloque le récepteur de la mélatonine). Ils ont observé une diminution de l'effet anti-nociceptif des OMM modulé par le blocage des récepteurs des peptides opioïdes (ratio - 1,78), 3100 des récepteurs β -adrénergiques (ratio -1,58), de la mélatonine (-1,58), ainsi que de l'inhibition de la synthèse de la sérotonine (ratio -2). De ce fait, leurs expériences semblent impliquer plusieurs voies, notamment les systèmes opioïdes, sérotoninergiques et adrénergiques dans la réponse analgésique des OMM.

L'implication du système opioïde a été mis en évidence par six articles :

3105 En 1998, Rojavin de l'équipe de Ziskin a exposé des souris mâles SWISS (61,22 GHz, 15 mW/cm², 15 minutes) après avoir injecté dans leur dos un agent pruritogène. Il a compté l'activité de grattage des souris (nombre de griffures et nombre de fois où la patte arrière a

été levée pour se gratter) et il a observé une diminution de ces phénomènes après exposition. Lorsqu'il utilise le naloxone, ce dernier inhibe l'effet des OMM, de façon dose-dépendante (ratio -2). Ils en concluent que la modulation de la réponse aux démangeaisons par les OMM est médiée par les récepteurs opioïdes. Ils retrouvent les mêmes résultats en 2000, en exposant des souris mâles SWISS (61,22 GHz, 0,15 à 5 mW/cm² pendant 15 minutes) et en leur faisant subir le test de la queue dans l'eau froide (« *Cold water tail flick test* »). Ils ont observé un temps de latence du retrait de la queue deux fois supérieure après exposition. De même, l'utilisation du naloxone a bloqué les effets des OMM (ratio -2). De plus, ils concluent que la puissance incidente est un paramètre capital dans l'effet analgésique car l'effet des OMM disparaît à des IPD inférieures ou égales à 0,5 mW/cm².

En 2008, Babatskaya et son équipe se sont intéressés à l'impact des OMM sur la douleur viscérale. Ils ont injecté une solution d'acide acétique par voie intra-péritonéale à des souris albinos. Les auteurs comptent ensuite les effets posturaux typiques de douleurs viscérales chez le rongeur (contraction du muscle abdominal oblique avec flexion du membre postérieur, extension du tronc, appui de la partie inférieure du ventre au sol et léchage du ventre). Ils montrent ainsi que l'exposition aux OMM à 61 GHz (3.10⁻⁶ mW/cm²) pendant 10 minutes induit un effet analgésique (diminution de la souffrance d'un facteur 2). Cependant, après injections de la naloxone, la durée de la réaction douloureuse a augmenté (ratio avec naloxone/sans naloxone= +1,5) après exposition.

La même année (2008), Radziewsky et son équipe (équipe de Ziskin) exposent le nez de souris mâles SWISS-Webster à différents rayonnements millimétriques (42,25 GHz ; 53,57 GHz et 61,22 GHz à 13,3 mW/cm²) pendant 15 minutes. Ils ont utilisé 3 antagonistes de récepteurs aux opioïdes :

- De la b-funaltrexamine , un antagoniste des récepteurs μ -opioïdes
- Du méthanesulfonate de naltrindole : antagoniste des récepteurs δ -opioïdes
- De la nor-binaltorphine : antagoniste sélectif des récepteurs κ -opioïdes

Ils ont observé une suppression significative de l'effet analgésique des OMM après traitement avec le nor-binaltorphine (κ -opioïdes, ratio -2) et dans une moindre mesure avec le méthanesulfonate de naltrindole (δ - opioïdes, -1,45). De plus, par dosage, ils ont observé une

augmentation significative de δ -opioïdes (enképhalines) dans le tronc cérébral et les régions hypothalamiques (1,6 et 2 respectivement) du SNC murin en 20 min mais pas pour les opioïdes endorphines et dynorphines. Ils en concluent que les récepteurs δ et κ sont principalement
3140 impliqués dans cet effet, et que le système opioïde endogène joue un rôle prépondérant dans la réponse analgésique des OMM.

De même, [Nessin](#) et son équipe (2007) ont exposé des souris albinos mâles aux OMM (ne donne pas la fréquence précise) à 3.10^{-6} mW/cm² pendant 10 minutes et injecte une solution d'acide acétique par voie intra-péritonéale afin d'induire une douleur viscérale. En utilisant la
3145 naloxone, ils observent une diminution de l'effet antinociceptif des OMM (1,4). Ils en concluent que les systèmes cérébraux opioïdes sont sans doute impliqués dans l'effet analgésique des OMM. Cependant, ils vont plus loin en utilisant aussi du parachlorophénylalanine (p-CPA, inhibiteur de la synthèse de sérotonine), ils observent une
3150 diminution de l'effet anti-nociceptif des OMM (1,63). Ils concluent que les systèmes cérébraux opioïdes et sérotoninergiques sont sans doute impliqués dans l'effet analgésique des OMM.

De même certains auteurs ont analysé l'implication des monoamines et plus précisément de la sérotonine et de la dopamine (4 études).

En 2002, [Gura](#) et son équipe ont injecté du formalin dans l'une des pattes des souris afin d'induire une douleur chronique. Après exposition (61 GHz, 3.10^{-6} mW/cm²) pendant 10
3155 minutes, ils ont observé une diminution du comportement douloureux chez la souris. Cependant, l'utilisation du p-CPA, a entraîné une augmentation de la durée de la réaction douloureuse malgré le rayonnement millimétrique (2,1). Ils en concluent que le système sérotoninergique joue un rôle déterminant dans les effets analgésiques induits par les OMM.

[Babatskaya](#) et son équipe (2005) et plus récemment [Gura](#) (2015) ont induit des douleurs viscérales à des souris (injection d'acide acétique par voie intra-péritonéale) et utilisent du p-CPA après exposition aux OMM (61 GHz) et observent une diminution du niveau d'analgésie
3160 (facteur 1,4 et 2,2 respectivement).

3165

Tableau CH6-1 : Etudes des mécanismes analgésiques sous-jacents aux OMM

Nom 1er auteur	Fréquence (GHz)	IPD (mW/cm ²)	Modèle	OMM	Traitement	Perception douleur (EXPO/traitement)
IN VIVO						
Chuyan 2006	42,3	0,1	Rats Wistar N=10	-2	Naloxone	+1,78
					p-CPA	+2
					Propranolol	+1,58
					Nicergoline	+1
					Haloperidol	+1
					Luzindole	+1,58
Rojavin 1998	61,22	15	Souris SWISS N=15	-2	Naloxone	+2
Rojavin 2000	61,22	0,15 -5	Souris SWISS N=15	-2	Naloxone	+2
Babatskaya 2008	61	3,10 ⁻⁶	Souris SWISS N=10	-1,2	Naloxone	+1,5
Radziesky 2008	42,25 53,57 61,22	13,3	Souris SWISS -Webster N=10	-2	funaltrexamine	+1,2
					méthanesulfonate de naltrindole	+1,5
					nor-binaltorphine	+2
						+2
Nessin 2007		3.10 ⁻⁶	Souris N=10	-1,6	Naloxone P-CPA	+1,4 +1,63
Gura 2002	61	3,10 ⁻⁶	Souris N=10	-1,3	P-CPA	+2,1
Babatskaya 2005	61	0,05	Souris N=10	-1,6	P-CPA	+1,4
Gura 2015	61	0,05	Souris N=12	-2	P-CPA	+2,2
IN VITRO						
Haas 2015	60,4	5	Cellules nerveuses PC12	/	Dopamine et précurseurs	Pas d'effet
Le Pogam 2019	60,4	20	Kératinocytes HaCaT	/	Sérotonine et précurseurs	Dosage expo/sham +2,13

Une autre monoamine, la dopamine a été analysée *in vitro* par notre groupe [Haas et al. 2017]. Des cellules nerveuses dopaminergiques PC12 ont été exposées aux OMM, à 60,4 GHz, à 5 mW/cm². L'analyse des contenus intracellulaires et extracellulaires de la dopamine et un de ces métabolites, l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique a été réalisée. Cependant, les OMM n'ont pas affecté le renouvellement de la dopamine ni l'accumulation en extracellulaire de l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique. Tout comme Chuyan (2006) *in vivo*, Haas et collaborateurs (2016) n'ont pas mis en évidence d'implication de la dopamine dans l'effet analgésique des OMM *in vitro*. Cependant, la même équipe a pu montrer une augmentation extracellulaire de la sérotonine ainsi que de ses précurseurs après exposition aux OMM, à 61 GHz, à 20 mW/cm² pendant 24h en condition athermique avec des cellules HaCaT [Le Pogam et al. 2019].

3180 6. Hypothèses de travail

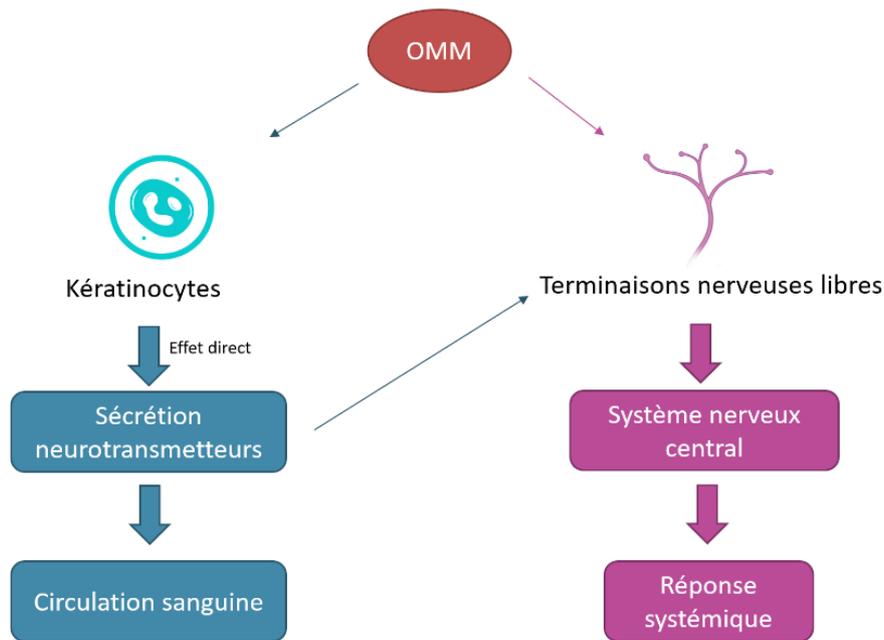
Les résultats des études *in vitro* et *in vivo* convergent vers l'idée que les OMM pourraient moduler les neurotransmetteurs et impliqueraient les systèmes sérotoninergiques et opioïdes. Néanmoins, de nombreuses questions restent sans réponses. Par exemple, comment la stimulation de certaines cellules des couches supérieures de la peau peut-elle entraîner un soulagement de la douleur ? Quel est le point de départ ? La peau n'est pas isolée du reste de l'organisme mais est fortement innervée et vascularisée [Hilliges et al. 1995 ; Johansson, 1995]. Une activation à ce niveau peut générer un signal, soit via la libération de molécules dans la circulation sanguine, soit via l'activation du système nerveux périphérique. Cette idée est corrélée par l'étude théorique de Korolev et son équipe (2003) qui montre que les OMM pourraient atteindre certaines terminaisons nerveuses et certaines cellules immunocompétentes, excrétrices de neurotransmetteurs.

La **première hypothèse** consiste en une réponse directe des cellules cutanées. Au sein de la peau, de nombreuses cellules existent (kératinocytes, fibroblastes, mastocytes, ...). Ce pourrait-il que le rayonnement millimétrique permette la sécrétion de facteurs de signalisations moléculaires dans la circulation sanguine générale. En effet, comme cité plus haut, la sérotonine et ses précurseurs ont été retrouvé augmentés après exposition dans le

milieu de culture de kératinocytes [Le Pogam et al. 2019]. De plus, en 2014, Anton et son
équipe mettent en évidence un impact des OMM sur la dégranulation des mastocytes,
3200 induisant une modification de l'excitabilité des récepteurs nociceptifs sans implication des
structures nerveuses centrales.

Une **deuxième hypothèse** consiste en l'activation d'une réponse systémique c'est-à-dire une
réponse de tout l'organisme passant par le système nerveux. L'implication du système
nerveux central a été démontrée par 4 études. En 2000, Radziewsky et son équipe exposent
3205 des souris au niveau des coussinets, du museau et du dos. Ils démontrent qu'une réduction
des comportements douloureux suite à l'exposition aux OMM apparaît uniquement pour les
zones très fortement innervées c'est-à-dire le museau et les coussinets. Un an plus tard, ils
observent que la section du nerf sciatique de la souris élimine l'effet hypo-algésique des OMM
[Radziewsky et al. 2001]. Ce résultat suggère qu'une information nerveuse essentielle à l'effet
3210 analgésique est transmise du système périphérique jusqu'au système nerveux central. De
plus, l'équipe de Nokikova (42,19 GHz, 20 mW/cm², 2008) ont montré que l'exposition de la
peau aux OMM activait les cellules hypothalamiques (en termes de nombre de cellules c-Fos-
positives par rapport au nombre total de cellules dans la région hypothalamique étudiée).

D'après la littérature, le système nerveux central et périphérique semblent impliqués dans la
3215 réponse analgésique. Il est possible que les effets analgésiques des OMM soient médiés par
les deux processus (cutané et systémique, Figure CH6-8). En effet, la douleur et l'analgésie
sont des réactions poly-systémiques. Il est difficile de discriminer précisément les systèmes et
facteurs qui modulent de telles réactions.



3220

Figure CH6-8 : Hypothèses des mécanismes expliquant les effets analgésiques médiés par les OMM : implication cutanée et/ou systémique

6.1. La présente étude

3225

Durant ce projet, l'hypothèse n°1 d'une réponse cutanée a été investiguée. Puisque le rayonnement électromagnétique peut atteindre les terminaisons nerveuses libres de la peau [Ziskin, 2013], il était intéressant d'étudier l'impact des ondes sur un modèle cellulaire neuronal. Dans cette étude, l'impact des OMM sur la sérotonine a été investigué dans un modèle de cellules épidermiques (HaCaT) et neurales (SH-SY5Y). De plus, la substance P a aussi été analysée. En effet, la substance P est produite au niveau de la peau et a un rôle primordial dans la nociception. De ce fait, elle est une candidate de choix dans cette recherche.

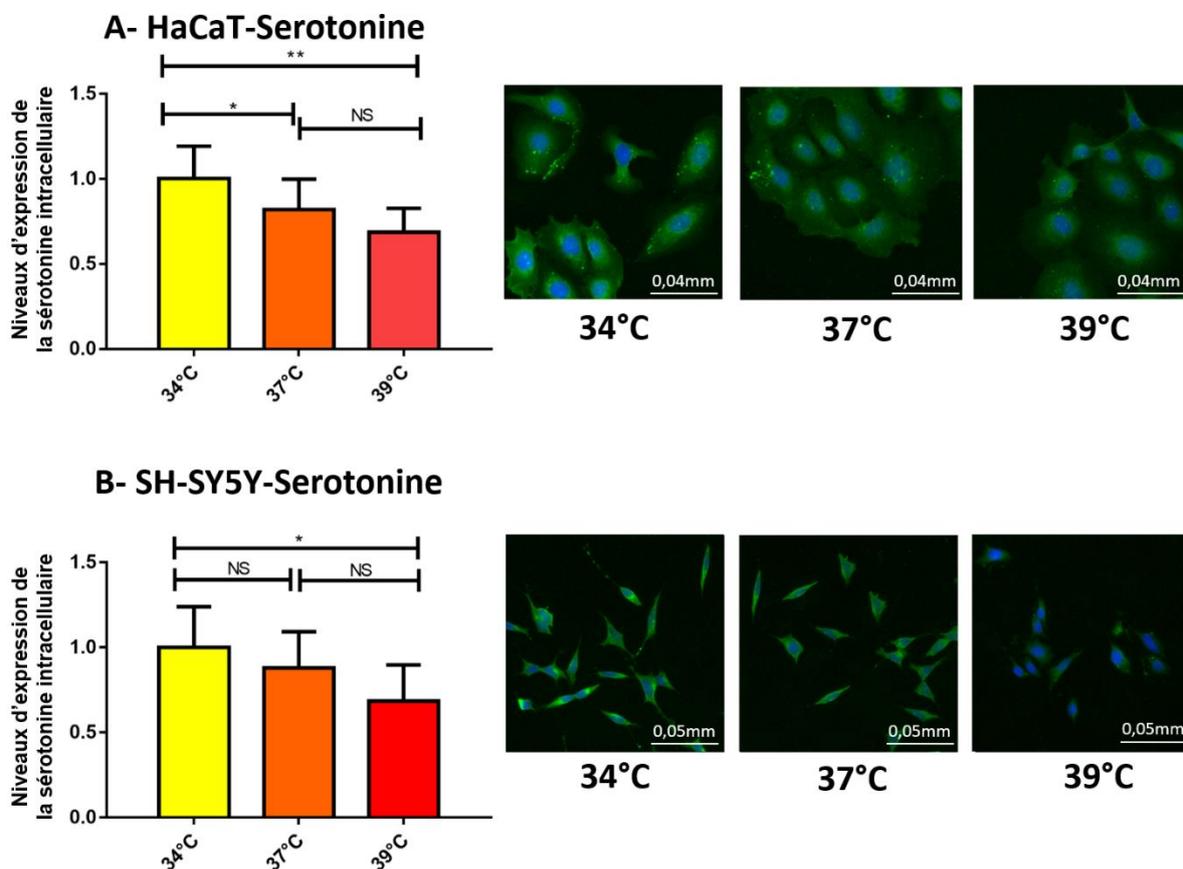
3230

II-Résultats

3235 Dans un premier temps, le contenu intracellulaire en sérotonine et en substance P a été étudié.

1. Impact des OMM sur le métabolisme sérotoninergique et sur la substance P

1.1. Mise au point des expériences



3240

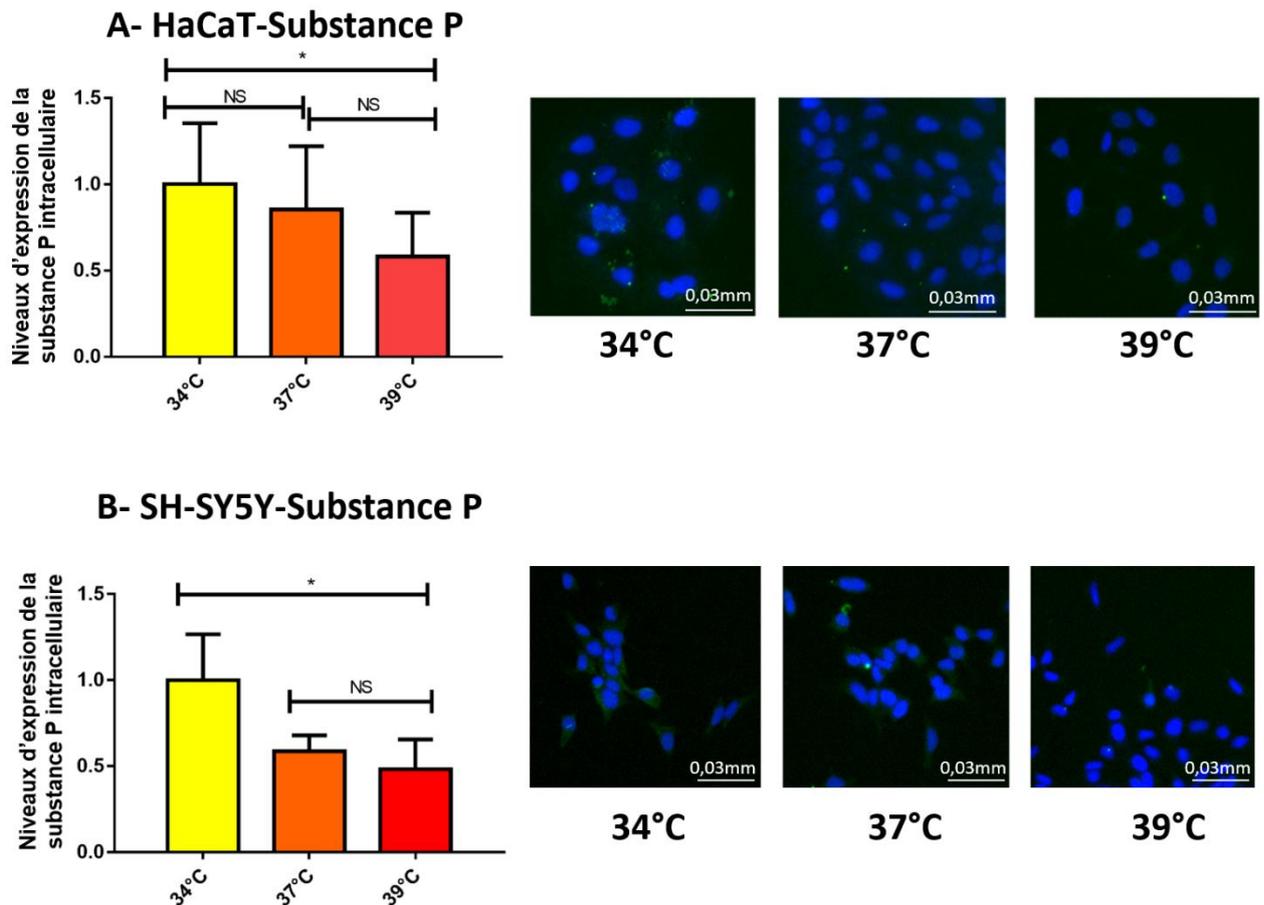
Figure CH6-9 : Impact de la température sur la concentration intracellulaire de sérotonine

3245 Niveaux d'expression de la sérotonine intracellulaire analysés par immunofluorescence dans des cellules HaCaT (A) et des cellules SH-SY5Y (B) après les avoir soumis à des températures croissantes (34°C, 37°C, 39°C) pendant 2h. Les histogrammes représentent le ratio de l'intensité de fluorescence de la sérotonine intracellulaire dans les différentes conditions par rapport aux cellules soumises à 34°C, +/- l'écart type des réplicats biologiques, N=4. Les tests non paramétriques Mann Whitney ont été utilisés (*<0,05 ; **< 0,005 ; NS : non significatif)

Dans la littérature, il est compliqué de trouver une molécule agissant sur la sécrétion de
3250 sérotonine efficace *in vitro*. De ce fait, plusieurs molécules, à différentes concentrations, ont
été testées telles que la para-Chlorophénylalanine, la Fluorexine (inhibiteur sélectif de la
recapture de la sérotonine) ou encore le chlorure de potassium (l'hypothèse testée ici était
que le chlorure de potassium induirait une dépolarisation membranaire et entrainerait une
sécrétion de la sérotonine par exocytose) ainsi que des agents oxydants (peroxyde
3255 d'hydrogène, glucose oxydase, bromate de potassium). Cependant aucun de ces traitements
n'a influencé la concentration intracellulaire de sérotonine (résultats non montrés).

De ce fait, chimiquement, il n'a pas été possible d'obtenir des contrôles positifs soit par
surexpression intracellulaire soit par excrétion massive de la sérotonine. Par contre, des
3260 résultats ont été obtenus lors de tests sur l'impact de la température. Pour cela, les cellules
HaCaT et SH-SY5Y ont été soumises à des températures croissantes pendant 2h et les deux
modèles cellulaires ont montré une diminution significative de la concentration intracellulaire
de sérotonine avec l'augmentation de la température (test de Mann Whitney, SHSY5Y-
(34°C- 37°C)_{pvalue}= 0,01 ; SHSY5Y-(34°C-39°C)_{pvalue}= 0,001 ; HaCaT-(34°C- 37°C)_{pvalue}= 0,54 ;
3265 HaCaT-(34°C-39°C)_{pvalue}= 0,008 ; Figure CH6-9).

Les niveaux intracellulaires en substance P ont également été analysés par la même technique.
Tout comme pour la sérotonine, de nombreuses molécules ont été testées sur les cellules afin
de déterminer un contrôle positif pertinent (chlorure de potassium, agents oxydants tels que
le peroxyde d'hydrogène, la glucose oxydase, le bromate de potassium), sans succès (résultats
3270 non montrés). Cependant, les changements de température durant 2h ont induit des
différences dans la concentration intracellulaire de la substance P. Dans les cellules HaCaT,
l'augmentation de la température induit une diminution significative de la concentration
intracellulaire de substance P (Test de Mann whitney, HaCaT-(34°C- 37°C)_{pvalue}=0,53 ; HaCaT-
(34°C-39°C)_{pvalue}=0,02 ; Figure CH6-10). Ce même résultat est retrouvé chez les cellules
3275 SH- SY5Y (Test de Mann whitney, SHSY5Y-(34°C- 37°C)_{pvalue}=0,41 ; SHSY5Y-(34°C-
39°C)_{pvalue}=0,028 ; Figure CH6-10). Les deux types cellulaires synthétisent bien de la substance
P. Cependant, il est à noter que le signal de fluorescence reste relativement faible pour les
deux modèles cellulaires.



3280 **Figure CH6-10 : Impact de la température sur la concentration intracellulaire de substance P**

Niveaux d'expression de substance P intracellulaire analysés par Immunofluorescence dans des cellules HaCaT (A) et des cellules SH-SY5Y (B) après les avoir soumis à des températures croissantes (34°C, 37°C, 39°C) pendant 2h. Les histogrammes représentent le ratio de l'intensité de fluorescence de la substance P intracellulaire dans les différentes conditions par rapport aux cellules soumises à 34°C, l'écart type des réplicats biologiques, N=4. Les tests non paramétriques Mann Whitney ont été utilisés (*<0,05 ; **<0,005 ; NS: non significatif)

3285

3290

La température a un réel impact sur le contenu intra-cellulaire de sérotonine et de la substance P dans les deux modèles cellulaires étudiés. Ce résultat valide l'approche technique utilisée. Néanmoins il pose problème quant à l'effet d'un potentiel effet thermique induit par les OMM.

1.2. Sérotonine intracellulaire

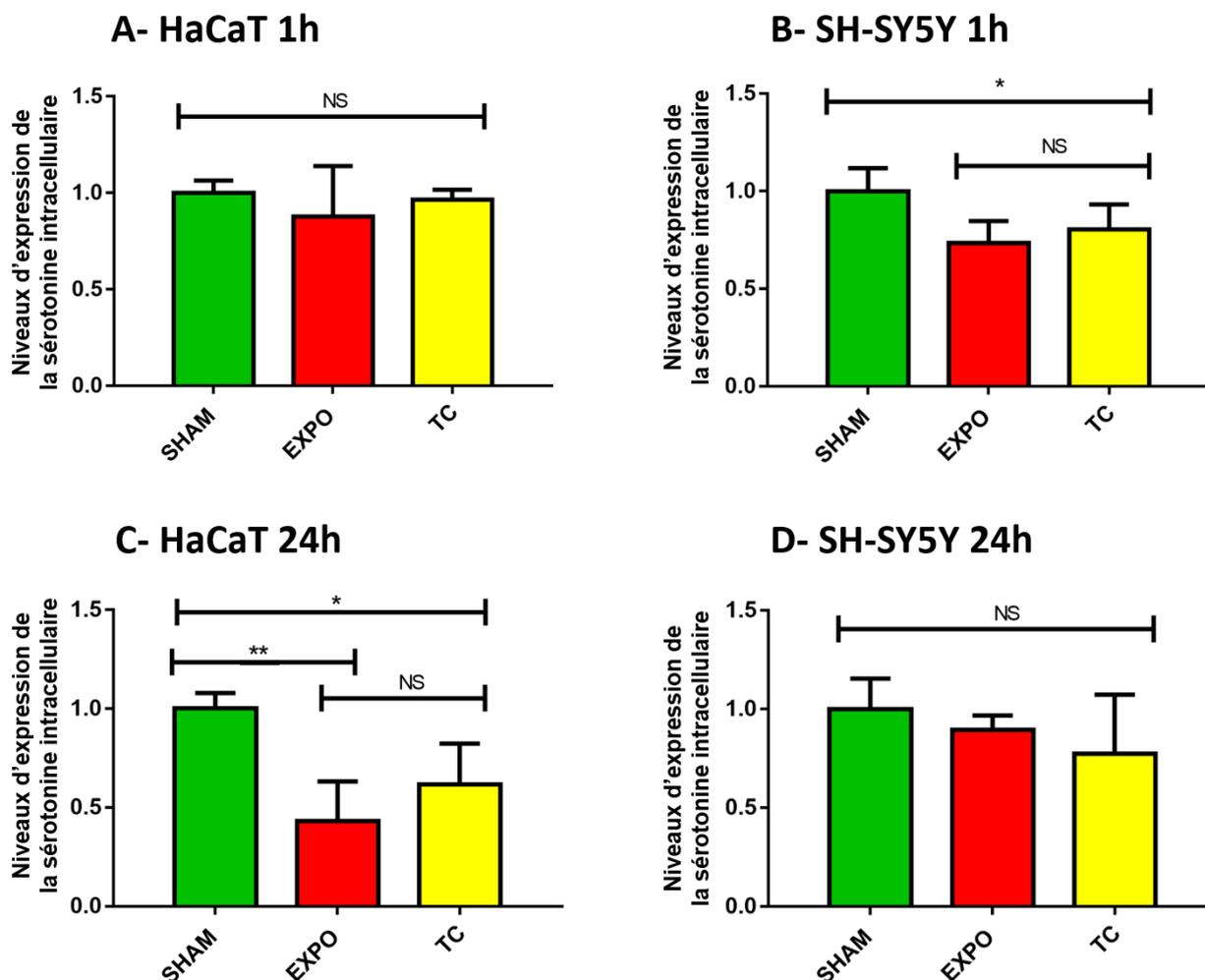


Figure CH6-11 : Concentration intracellulaire de sérotonine dans des cellules HaCaT et SH-SY5Y

- 3295 Niveaux d'expression de la sérotonine intracellulaire analysés par Immunofluorescence entre
- les cellules HaCaT exposées (EXPO) ou non (SHAM) et le contrôle thermique (TC) pendant 1h (A) et 24h (B).
 - les cellules SH-SY5Y exposées (EXPO) ou non (SHAM) et le contrôle thermique (TC) pendant 1h (C) et 24h (D).

3300 Les histogrammes représentent le ratio de l'intensité de fluorescence de la sérotonine intracellulaire dans les différentes conditions par rapport au SHAM, +/- l'écart type des réplicats biologiques, N=4. Les tests non paramétriques Mann Whitney ont été utilisés (*<0,05 ; **< 0,005 ; NS : non significatif)

Les cellules ont ensuite été exposées aux OMM. Après 1h d'exposition, les cellules HaCaT n'ont
3305 montré aucune différence alors que les cellules SH-SY5Y ont montré une diminution de la concentration intracellulaire de la sérotonine après exposition. Cette observation a été retrouvée suite au contrôle thermique (TC, test de Mann Whitney, HaCaT-EXPO_{pvalue}=0,53 ;

HaCaT-TC_{pvalue=0,89} ; SH-SY5Y-EXPO_{pvalue=0,02} ; SH-SY5Y -TC_{pvalue=0,035} ; Figure CH6-11 AB).

3310 Après 24h d'exposition, le profil observé s'est inversé : les cellules HaCaT exposées et
soumises à un contrôle thermique ont montré une diminution significative de la concentration
intracellulaire en sérotonine alors que les cellules SH-SY5Y n'ont montré aucune différence
(test de Mann Whitney, test de Mann Whitney, HaCaT-EXPO_{pvalue= 0,0015} ; HaCaT-TC_{pvalue=}
0,0051 ; SH-SY5Y-EXPO_{pvalue= 0,65} ; SH-SY5Y -TC_{pvalue= 0,056} ; Figure CH6-11 CD)

3315 Par conséquent, l'impact des OMM diffèrent en fonction **du type cellulaire** et du **temps**
d'exposition. Pour des temps courts, la concentration en sérotonine intracellulaire des
cellules SH-SY5Y diminue et est sans doute dû à l'augmentation de la température. Par contre,
la concentration retourne à l'équilibre après 24h. Pour les cellules HaCaT, le profil est inversé.
Aucune modification de la sérotonine intracellulaire n'est enregistrée après 1h d'exposition.
3320 Par contre, pour un temps long, une diminution significative de la concentration intracellulaire
est enregistrée. De plus, ces modifications sont retrouvées lors d'un chauffage seul ce qui
laisse supposer que l'effet observé est dû à l'effet thermique des OMM

1.3. Substance P intracellulaire

3325

Par la suite, la concentration intracellulaire de la substance P a été analysée. Dans les cellules
HaCaT, au bout d'1h et 24h d'exposition, aucune différence n'a été enregistrée dans la
concentration intracellulaire de substance P dû à une grande variabilité (test de Mann
whitney, $pvalue > 0,05$; Figure CH6-12 AC). Il est à noter que sous exposition et sous contrôle
3330 thermique, la température ne dépasse pas les 37°C. Ces résultats sont donc en accord avec les
tests d'effet de la température. Concernant les cellules SH-SY5Y, au bout d'1h d'exposition, la
concentration intracellulaire en substance P a diminué de façon significative (ratio -1,84).
Néanmoins, ces résultats sont à prendre avec prudence car le niveau de fluorescence détecté
est très proche du bruit de fond. Cette diminution n'a pas été reproduite par le chauffage seul
3335 (test de Mann whitney, SH-SY5Y-EXPO-1h_{pvalue= 0,006} ; SH-SY5Y-TC-1h_{pvalue= 0,08} ; Figure CH6-
12 B). Après 24h d'exposition, aucune différence n'a été notifiée (Test de Mann Whitney,
EXPO-24h_{pvalue= 0,06} ; TC-24h_{pvalue= 0,08} ; Figure CH6-12 D).

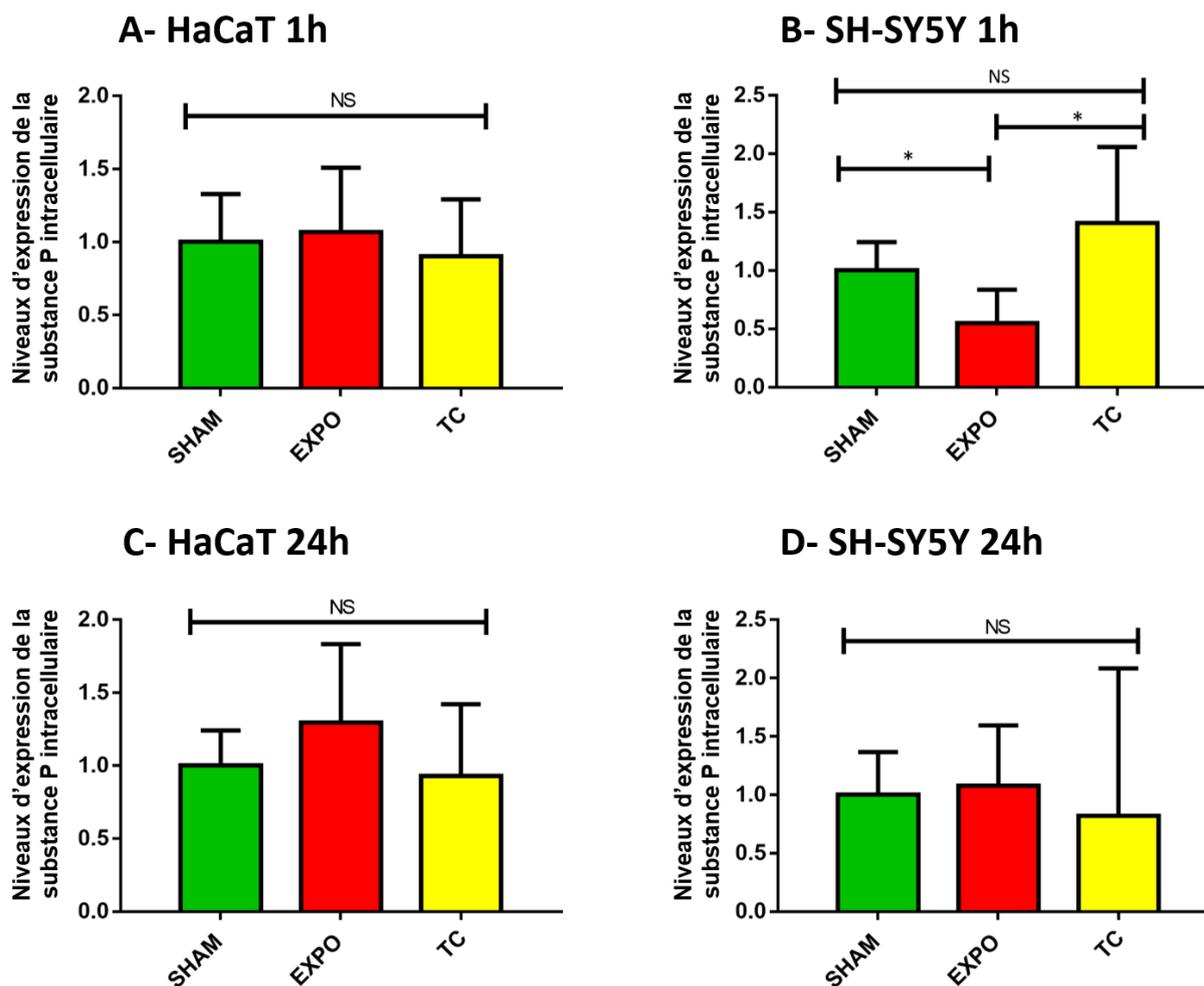


Figure CH6-12 : Concentration intracellulaire de substance P dans des cellules HaCaT et SH-SY5Y

- 3340 Niveaux d'expression de la substance P intracellulaire analysés par Immunofluorescence entre
- Les cellules HaCaT exposées (EXPO) ou non (SHAM) et le contrôle thermique (TC) pendant 1h (A) et 24h (B).
 - Les cellules SH-SY5Y exposées (EXPO) ou non (SHAM) et le contrôle thermique (TC) pendant 1h (C) et 24h (D).

3345 Les histogrammes représentent le ratio de l'intensité de fluorescence de la substance P intracellulaire dans les différentes conditions par rapport au SHAM, +/- l'écart type des réplicats biologiques, N=4. Les tests non paramétriques Mann Whitney ont été utilisés (*<0,05 ; **< 0,005 ; NS: non significatif)

3350 Par conséquent, les OMM ne semblent pas induire de sécrétion/élimination de la substance P dans les cellules HaCaT. L'augmentation de la température sous exposition ne semble pas assez élevée (36,9°C) pour avoir un impact sur la concentration intracellulaire de substance P comme il a été démontré dans la Figure CH6-10 où une diminution de la concentration intracellulaire en substance P parviendrait uniquement pour des températures à 39°C au bout

3355 de 2h. Par contre, dans les cellules SH-SY5Y, les OMM semblent induire une diminution de la concentration de substance P intracellulaire après exposition. Fait intéressant, le contrôle thermique ne reproduit pas cette diminution au bout d'1h. Par contre, une température à 37°C et à 39°C induit une diminution de la concentration intracellulaire en substance P (Figure CH6-10). Les OMM semblent avoir des conséquences plus rapides que le chauffage seul. Néanmoins, les observations ont toutes une composante thermique.

3360 Au vu de ces résultats, l'étude de la sérotonine a été privilégiée. Le rayonnement millimétrique induit-il une élimination de la sérotonine ou une meilleure excrétion ? Pour répondre à cette question, la concentration extracellulaire de sérotonine a été analysée par deux méthodes : un dosage chimique (test ELISA) et une approche métabolomique.

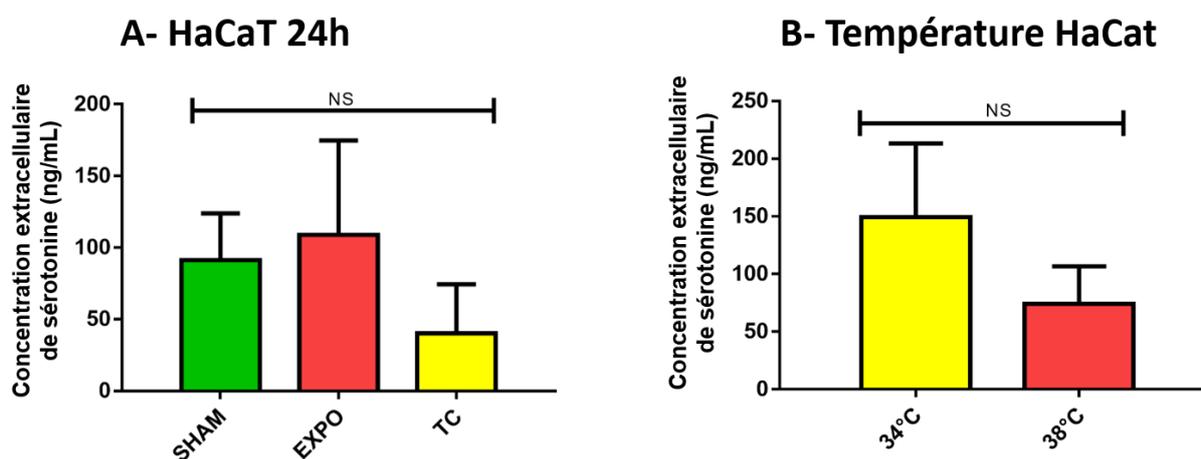
3365 2. OMM et sérotonine extracellulaire

2.1. Dosage chimique ELISA

Dans un premier temps, un dosage chimique par ELISA a été réalisé à la fois sur le milieu de culture mais aussi dans des extraits intracellulaires de cellules HaCaT et SH-SY5Y. Cependant, 3370 les concentrations étaient très proches du bruit de fond. De ce fait, seuls les résultats pour la fraction extracellulaire des cellules HaCaT sous exposition pendant 24h ou soumis à un contrôle de températures (34°C et 37°C) ont été conservés et considérés comme non artéfactuels. Les 7 autres fractions analysées (fraction intracellulaire 1h et 24h pour les deux types cellulaires ainsi que la fraction extracellulaire 1h et 24h pour les cellules HaCaT et SH- 3375 SY5Y respectivement) ne seront pas présentées car les résultats sont sous le seuil de détection et ne sont pas exploitables.

Concernant les cellules HaCaT exposées aux OMM, une légère augmentation non significative a été observée. Par contre, sous contrôle thermique, une diminution non significative a été enregistrée (test de Mann Whitney, EXPO-HaCaT-24h_{pvalue}= 1 ; TC-HaCaT-24h_{pvalue}= 0,1 ; 3380 Figure CH6-13 A). L'impact d'un changement de température (34°C et 37°C) pendant 2h dans les cellules HaCaT a montré une diminution non significative avec l'augmentation de la température (test de Mann Whitney, 37°C-HaCaT_{pvalue}= 0,58 ; Figure CH6-13 B). Par rapport

aux résultats de la concentration intracellulaire en sérotonine, une diminution intra et
extracellulaire, due à la température est observée. Ces résultats pencheraient vers
3385 l'hypothèse d'une élimination ou un arrêt/ralentissement de la production de la sérotonine
et non pas une excrétion. Cependant, les niveaux de détection sont trop faibles pour émettre
une conclusion fiable.



3390 Figure CH6-13 : Dosage chimique de la concentration extracellulaire de sérotonine dans des cellules HaCaT

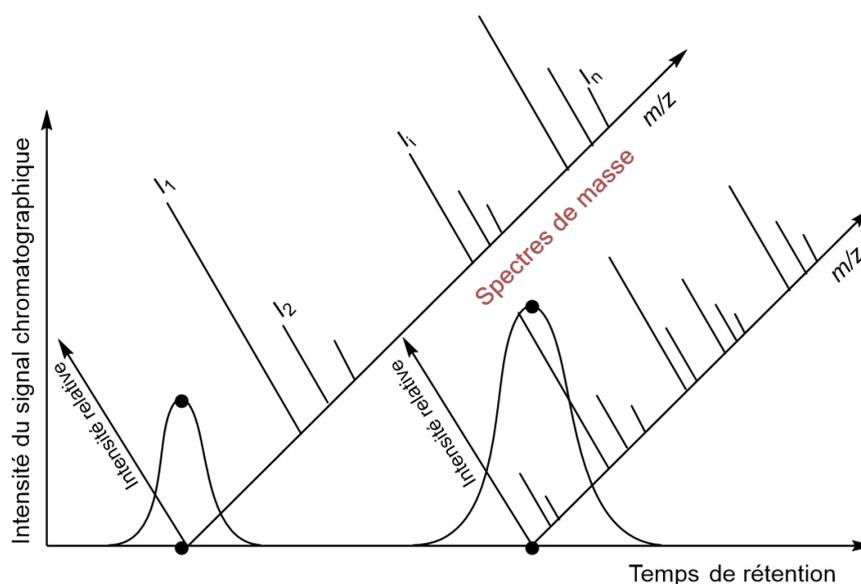
3395 Concentration de la sérotonine extracellulaire analysée par ELISA entre dans les cellules HaCaT exposées (EXPO) ou non (SHAM) et le contrôle thermique (TC) pendant 24h (A). Des tests de température (34°C et 38°C) pendant 2h ont été utilisés comme contrôle technique. Les histogrammes représentent la concentration de sérotonine extracellulaire en ng/mL dans les différentes conditions, +/- l'écart type des réplicats biologiques, N=3. Les tests non paramétriques Mann Whitney ont été utilisés (*<0,05 ; **< 0,005 ; NS : non significatif)

Afin de gagner en sensibilité, une approche métabolomique, plus précise a été réalisée.

3400 2.2. Approches métabolomiques

C'est une approche métabolomique non ciblée qui a été mise en œuvre dans ces travaux de thèse. Trois grandes séries d'exposition ont été expérimentées « Remedee 1h », « IETR 1h », « IETR 24h » (voir chapitre 2.V-Analyses métabolomiques). Cependant, pour le moment, seule
3405 la série REMEDEE 1h a pu être soumise à l'analyse métabolomique sans *a priori*. Lors de la série d'expositions, les cellules HaCaT ont étéensemencées dans 4 plaques différentes, le même jour. Elles correspondent soit aux références EXPO, SHAM, contrôle thermique TC ou

traitement chimique par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 , 0,5 mM, 2h). Les plaques sont
utilisées le même jour, dans le même incubateur contenant le dispositif REMEDEE. Seul le
3410 milieu de culture, c'est-à-dire l'exométabolome est récupéré, purifié, standardisé. De plus,
seule la fraction hydrophile a été étudiée, car c'est seulement dans cette fraction qu'une
différence de concentration de sérotonine avait été observé [Le Pogam et al. 2019]. Le
protocole utilisé, incluant l'extraction du milieu cellulaire, l'échantillonnage de
l'exométabolome et l'analyse UPLC-HRMS (*Ultrahigh Pressure Liquid Chromatography-High*
3415 *Resolution Mass Spectrometry*) était basé sur les travaux publiés par Le Pogam et
collaborateurs [2019]. L'exposition/extraction été réalisée 4 fois sur 4 jours différents pour
obtenir les 4 répliquats biologiques (N=4). Chaque répliquat biologique a fait l'objet de 6
analyses UPLC-HRMS, constituant ainsi 6 reliquats techniques.

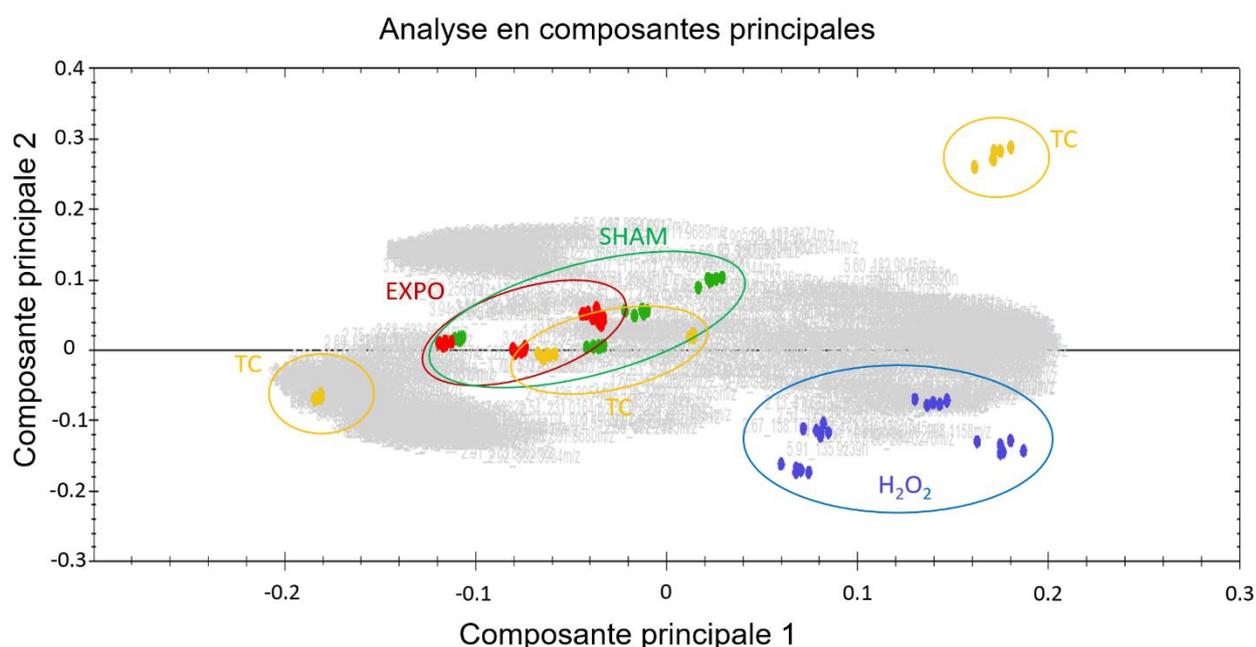


3420 **Figure CH6-14 : Chromatogramme** (illustration David Rondeau)

Globalement, les échantillons sont entraînés par la phase mobile (acétonitrile/eau) dans la
colonne (phase stationnaire) de l'UPLC. Dans ce contexte, chaque métabolite migrant au sein
du système chromatographique, est associé à un « temps de rétention » qui dépend de ses
propriétés physico-chimiques. Les composés séparés par le système chromatographique sont
3425 introduits dans la source d'ionisation du spectromètre de masse dans laquelle ils forment des
espèces ioniques gazeuses dont le rapport masse sur nombre de charge (m/z) est mesuré par
la partie analyseur du spectromètre, l'intensité de chaque ion étant révélée par leur impact
sur un détecteur. L'association de l'intensité du signal détecté au temps de rétention

3430 chromatographique, permet de générer un chromatogramme d'ions totaux (TIC pour *Total Ion Chromatogram*, Figure CH6-14).

Les analyses des données brutes ont été réalisées par David Rondeau à l'IETR. Une première étape de prétraitement est effectuée afin d'aligner les temps de rétention des différentes analyses UPLC-HRMS. Par la suite, l'aire des pics est calculée, ce qui correspond aux signaux générés par les molécules. De nombreux contrôles internes et de qualités sont effectués
3435 durant ce prétraitement des données (normalisation, contrôle qualité, etc). Afin d'obtenir une analyse la plus discriminante possible et supprimer le bruit de fond, seuls les ions élués de la colonne entre 0,3 et 6 minutes, ainsi qu'ayant une largeur de pics de 0,1 minutes de rétention ont été conservés.



3440 Figure CH6- 15 : Empreinte métabolique des ions par analyse en composantes principales

Répartition par analyse en composantes principales (ACP) de l'exométabolome hydrophile des cellules HaCaT après exposition aux OMM (EXPO) ou non (SHAM) ou sous contrôle thermique (TC) avec le dispositif de REMEDEE pendant 1h. En tant que contrôle technique, les cellules ont été exposées pendant 2h au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 0,5 mM afin d'induire un stress oxydant. Chaque point
3445 correspond à un réplicat (4 réplicats biologiques, 6 réplicats techniques).

Dans un premier temps, une empreinte métabolique a été réalisée. Cette méthode prend en compte un maximum de métabolites, sans identification afin de comparer les différences métaboliques entre nos 4 conditions (EXPO/SHAM/TC et H₂O₂- Figure CH6-15). L'analyse en
3450 composante principale (ACP) a été utilisée afin de représenter nos échantillons en fonction de

deux composantes. Chaque point représente un réplicat (biologique ou technique) pour chaque condition. Il a été observé un regroupement des réplicats pour chaque groupe, excepté le contrôle thermique (TC) qui semble dispersé en fonction des réplicats biologiques. Cependant, les groupes « EXPO », « SHAM » sont strictement dans la même répartition, ainsi
3455 qu'une partie des « TC ». Les réplicats composants le contrôle H₂O₂ sont eux, représentés à l'écart des autres groupes, ce qui montre une empreinte métabolomique particulière due au stress oxydant. Ce résultat permet de valider l'approche métabolomique.

De ce fait, l'exposition aux OMM pendant 1h n'a pas d'impact sur la sécrétion/excrétion de métabolites hydrophiles dans les cellules HaCaT et n'induit pas un changement
3460 métabolomique que pourrait induire un stress oxydant. Ces résultats sont rassurants car ils sont réalisés dans les conditions d'utilisation des applications thérapeutiques (exposition de la peau 1h maximum

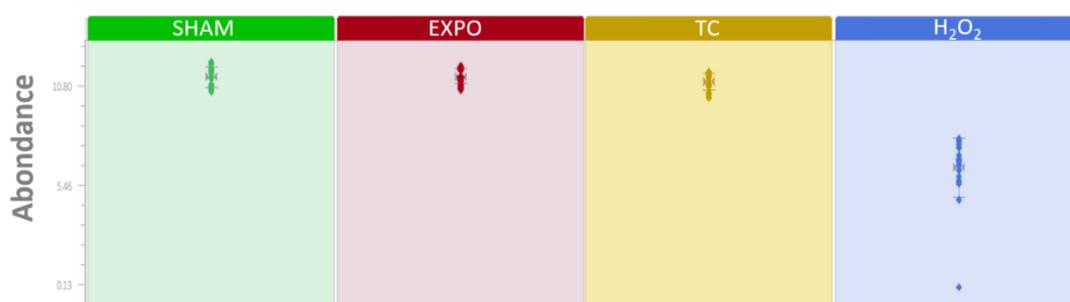
Les données ayant permis d'obtenir la représentation de la **Figure CH6-15**, ont ensuite été plus particulièrement scrutées afin de pouvoir révéler l'impact de la quantité de sérotonine
3465 détectée sur la nature du modèle généré par l'analyse en composantes principales. La sérotonine a été identifiée dans le mélange analysée au travers de la mesure de la masse précise de sa molécule protonée ([M+H]⁺). La formule élémentaire de cet ion est C₁₀H₁₃N₂O. La mesure de masse exacte, calculée à partir des masses exactes des isotopes de plus faible masse qui le constituent est *m/z* 177,1028. La présence d'un ion mesuré au *m/z* 177,1024 a
3470 été mise en évidence au sein du mélange élué. L'erreur de mesure estimée étant de 1,10 ppm, elle permet de conclure sans ambiguïté sur une formule brute correspondant à l'ion [M+H]⁺ de la sérotonine. Dans ce contexte, l'abondance de cet ion caractéristique de la sérotonine a été recherchée dans chaque jeu de données issues des analyses UPLC-HRMS des milieux extracellulaires. Les abondances de l'ion [M+H]⁺ attribué à la sérotonine sont reportées dans
3475 la **Figure CH6-16 A**. Mentionnons que l'identification de la sérotonine a été confirmée grâce à la détection d'un ion *m/z* 160,0759 supplémentaire apparaissant sur les spectres de masse, au même temps de rétention que l'ion *m/z* 177,1024. Il est connu que la sérotonine peut se fragmenter lors de l'ionisation. Cet ion supplémentaire qui est issu de la perte d'une molécule de NH₃ à partir de la molécule protonée de la sérotonine, est caractéristique d'une réaction
3480 de fragmentation de ce type d'ions se produisant dans la source du spectromètre de masse. La comparaison de la masse mesurée pour cet ion avec la masse exacte correspondant à une

composition élémentaire $C_{10}H_{10}NO$ constitue un critère additionnel de caractérisation de la sérotonine (Tableau CH6-2).

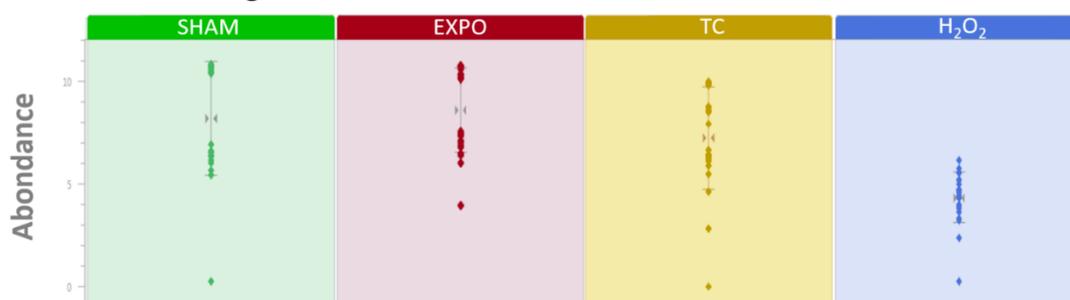
Tableau CH6-2 : Données générées par le logiciel d'étude de l'UPLC-HRMS

Formule chimique	m/z	Erreur de masse (ppm)	Identification
$C_{10}H_9NO$	160,0759	1,48	Ion $[M+NH_3+H]^+$ de la sérotonine
$C_{10}H_{12}N_2O$	177,1024	1,10	Ion $[M+H]^+$ de la sérotonine

A- Sérotonine



B- sérotonine fragmentée



3485

Figure CH6-16 : A) Abondance de la sérotonine extracellulaire sécrétée ou excrétée à partir des cellules HaCaT après exposition aux OMM (EXPO) ou non (SHAM) ou sous contrôle thermique (TC) avec le dispositif de REMEDEE pendant 1h. B) abondance de la sérotonine fragmentée obtenu lors de l'ionisation. En tant que contrôle technique, les cellules ont été exposées pendant 2h au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à 0,5 mM afin d'induire un stress oxydant. Chaque point correspond à un réplicat (4 réplicats biologiques, 6 réplicats techniques) par condition.

3490

Ainsi, d'après la Figure CH6-16 A, cette dernière ne montre pas de différence significative après exposition (EXPO) ou non (SHAM) ou soumis au contrôle thermique (TC). Cependant, après traitement à l' H_2O_2 une diminution de l'abondance extracellulaire de sérotonine a été

3495 enregistrée. De plus, le même profil d'abondance que la sérotonine pour les différentes conditions a été observée (Figure CH6-16 B).

3500 En conclusion, avec les deux techniques utilisées (dosage et métabolomique), l'exposition aux OMM pendant 1h n'a pas d'impact sur la sécrétion ou l'excrétion de la sérotonine dans les cellules HaCaT. Il serait intéressant d'analyser les résultats métabolomiques après 24h d'exposition dans les cellules HaCaT ainsi que pour les cellules SH-SY5Y.

III- Discussion

3505 Le manque de mécanismes précis pour expliquer les effets analgésiques sous-jacents à la thérapie par les OMM montre le besoin de recherches complémentaires dans ce domaine. Dans cette étude, l'accent a été mis sur le système sérotoninergique, ainsi que sur la substance P dans une moindre mesure. Deux modèles cellulaires ont été sélectionnés afin d'étudier l'hypothèse d'une réponse cutanée : les kératinocytes humains de la lignée HaCaT et les cellules neurales sérotoninergiques humaines SH-SY5Y. Toutes deux ont été exposées à environ 60,4 GHz, à 15 mW/cm² pendant 1h et 24h.

3510 Durant cette étude, il a été démontré que, dans les cellules HaCaT (Figure CH6-17), pour 1h d'exposition, les OMM n'avaient pas d'impact sur la concentration intracellulaire de la substance P ou de la sérotonine. De même, le métabolisme général des cellules ainsi que la sécrétion/excrétion de la sérotonine ne sont pas modifiés. Dans les conditions d'utilisation de Remedee one, les OMM ne semblent pas modifier le métabolisme sérotoninergique de la cellule. Néanmoins ces résultats donnent des arguments contre l'hypothèse d'un effet thérapeutique passant par la sécrétion de neurotransmetteurs par les kératinocytes, en tout cas pour 1h d'exposition. En effet, pour 24h d'exposition, une diminution de la concentration en sérotonine intracellulaire a été observée. Ce même résultat a été reproduit lorsque les cellules ont été exposées à des températures élevées (37°C au lieu de 34°C), laissant supposer un impact thermique. Cependant, l'effet induit par la température est moindre par rapport aux OMM. Les expériences en UPLC-HRMS sur le milieu de culture de cellules HaCaT exposées pendant 24h ont été réalisées. Cependant, les résultats ne nous sont pas encore été parvenus

à ce jour, ne permettant pas de conclure sur une élimination ou une excrétion induite par les

3525 OMM.

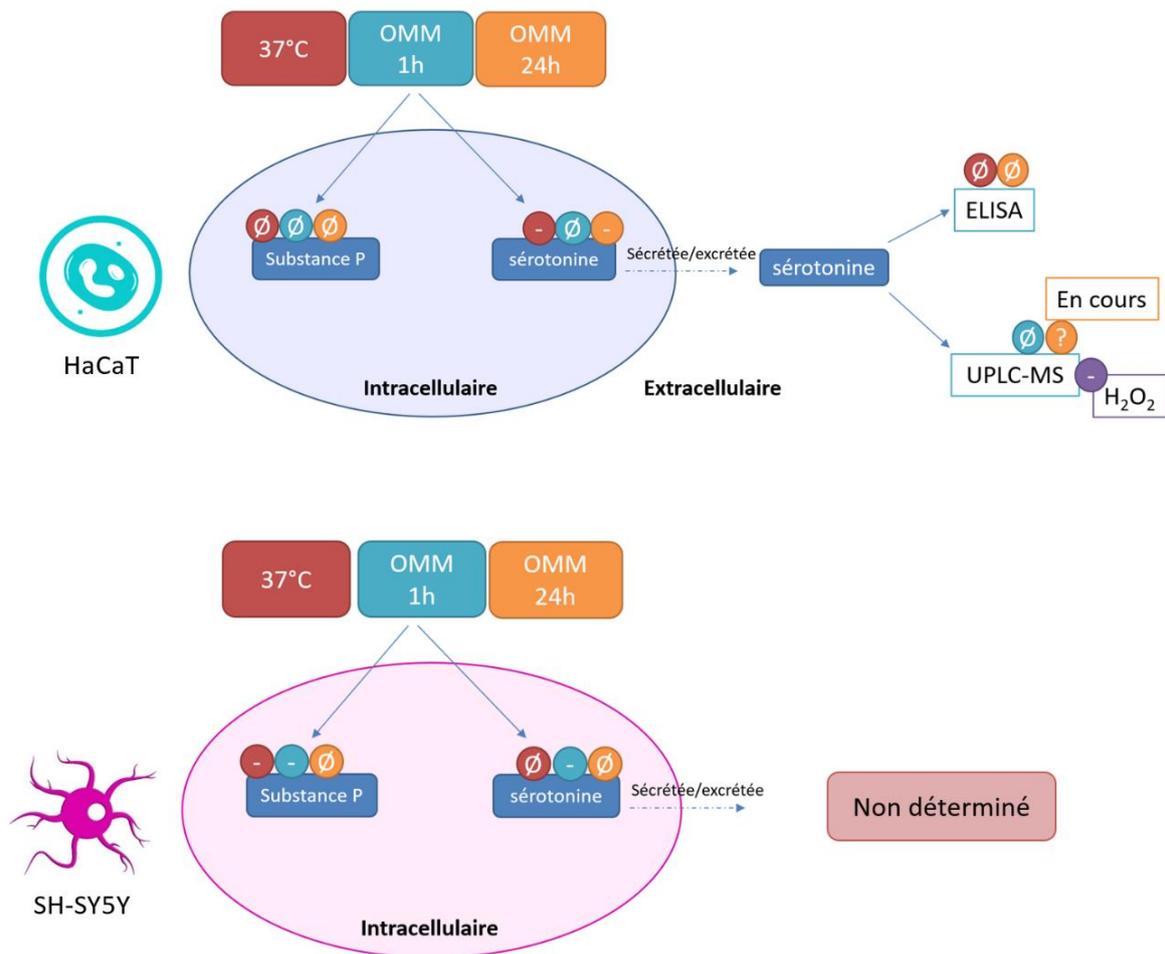


Figure CH6-17 : schématisation des résultats obtenus pour les cellules HaCaT (bleu) et pour les cellules SH-SY5Y (rose). Les cellules ont été soumises à une température de 37°C pendant 2h (rouge), soit exposées aux ondes millimétriques pendant 1h (turquoise) ou 24h (orange) ou encore traitées au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂, 0,5 mM, 2h, violet).

3530

- : diminution de la concentration, + : augmentation de la concentration, Ø : pas d'effet

Dans les cellules SH-SY5Y (Figure CH6-17), seules les concentrations intracellulaires en sérotonine et en substance P ont pu être analysées. Il a été mis en évidence une diminution de la sérotonine et de la substance P après 1h d'exposition aux OMM. Ces résultats suggèrent un impact des OMM dès 1h d'exposition, qui passerait par la stimulation des terminaisons nerveuses. Néanmoins, cette hypothèse nécessite des expériences complémentaires pour apporter une confirmation. A 24h d'exposition, aucune différence n'a été observée dans la concentration intracellulaire de substance P ou de sérotonine. Il aurait été intéressant

3535

3540 d'analyser le contenu extracellulaire afin de déterminer s'il était enrichi ou si c'était plutôt un phénomène de sécrétion ou de dégradation de la sérotonine et de la substance P.

Globalement, il apparaît que l'exposition aux OMM dans les cellules, à nos conditions ne modifie pas le métabolisme sérotoninergique (synthèse, élimination) de façon drastique. Aucune autre étude *in vitro* n'a été réalisée concernant l'impact des OMM sur la sérotonine et la substance P. Il est de ce fait impossible d'avoir des éléments de comparaison. Néanmoins, tout comme plusieurs auteurs *in vivo* (Chuyan et al. 2006, Nessin et al. 2006, Gura et al. 2002 et 2015, Babatskaya et al. 2005), nous avons pu mettre en évidence l'implication du système sérotoninergique. Les quelques résultats obtenus lors de cette étude semblent être en faveur d'une réponse cutanée, passant directement par les terminaisons nerveuses libres pour une durée d'exposition utilisée en thérapie. Pour 24h d'exposition, différents systèmes peuvent être impliqués, expliquant la sécrétion de sérotonine par les kératinocytes observée par Le Pogam (2019). Cependant, ces résultats n'excluent pas l'implication d'une réponse systémique. En effet, le système nociceptif est poly-systémique, impliquant de nombreux processus et interactions entre neurotransmetteurs. Il est de ce fait compliqué de déterminer l'implication de certains facteurs par rapport à d'autres, notamment sur des modèles *in vitro*.

IV- Références

- Alekseev, S. I., Gordiienko, O. V., Radzievsky, A. A., & Ziskin, M. C. (2009). Millimeter wave effects on electrical responses of the sural nerve in vivo. *Bioelectromagnetics*, <https://doi.org/10.1002/bem.20547>
- Anton, E., Aurel, S., Gabriela, S., Ciobica, A., Bruma, Si., & Anton, C. (2014). The involvement of cutaneous receptors in the biological effects of electromagnetic millimeter waves. *Archives of Biological Sciences*, *66*(4), 1575-1580. <https://doi.org/10.2298/ABS1404575A>
- Apkarian, A. V., Bushnell, M. C., Treede, R.-D., & Zubieta, J.-K. (2005). Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *European Journal of Pain*, *9*(4), 463-463. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2004.11.001>
- Attal, N., Lanteri-Minet, M., Laurent, B., Fermanian, J., & Bouhassira, D. (2011). The specific disease

- burden of neuropathic pain : Results of a French nationwide survey. *Pain*, 152(12), 2836-2843.
<https://doi.org/10.1016/j.pain.2011.09.014>
- Bagatskaya, E. V., & Gura, E. V. (2005). Analgesia Induced by Microwave Irradiation of an Acupuncture Point under Conditions of Visceral Pain in Mice : Role of the Serotonergic Cerebral System. *Neurophysiology*, 37(3), 219-224. <https://doi.org/10.1007/s11062-005-0068-5>
- Bagatskaya, E. V., Gura, E. V., & Limanskii, Yu. P. (2008, septembre). Analgesia Induced by Microwave Irradiation of an Acupuncture Point in Mice with Visceral Pain : Role of the Cerebral Opioid System. *Neurophysiology*, Vol. 40, Nos. 5/6, 2008. 10.1007/s11062-009-9060-9
- Bagatskaya, Ye. V., & Gura, Ye. V. (2013). Hypoalgesia Induced by Preliminary Microwave Irradiation of an Acupuncture Point : Effects on Somatic Pain in Mice. *Neurophysiology*, 45(5-6), 453-458.
<https://doi.org/10.1007/s11062-013-9393-2>
- Bannister, K., & Dickenson, A. H. (2016). What the brain tells the spinal cord. *Pain*, 157(10), 2148-2151.
<https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000568>
- Betskii, O. V., Devyatkov, N. D., & Kislov, V. V. (2000). Low intensity millimeter waves in medicine and biology. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 28(1-2), 247-268.
<https://doi.org/10.1615/critrevbiomedeng.v28.i12.420>
- Breivik, H., Collett, B., Ventafridda, V., Cohen, R., & Gallacher, D. (2006). Survey of chronic pain in Europe : Prevalence, impact on daily life, and treatment. *European Journal of Pain (London, England)*, 10(4), 287-333. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2005.06.009>
- Chuyan, E. N., & Dzheldubayeva, É. R. (2006). Antinociceptive effects of low-intensity extrahigh-frequency electromagnetic radiation. *Neurophysiology*, 38(4), 277-285.
<https://doi.org/10.1007/s11062-006-0057-3>
- Del Seppia, C., Ghione, S., Luschi, P., Ossenkopp, K.-P., Choleric, E., & Kavaliers, M. (2007). Pain perception and electromagnetic fields. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 31(4), 619-642.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2007.01.003>
- Fields, H. (2004). State-dependent opioid control of pain. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(7), 565-575.
<https://doi.org/10.1038/nrn1431>
- Funk, R. H. W., & Monsees, T. K. (2006). Effects of Electromagnetic Fields on Cells : Physiological and Therapeutical Approaches and Molecular Mechanisms of Interaction. *Cells Tissues Organs*, 182(2), 59-78. <https://doi.org/10.1159/000093061>
- Funk, R. H. W., Monsees, T., & Özkucur, N. (2009). Electromagnetic effects – From cell biology to medicine. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 43(4), 177-264.
<https://doi.org/10.1016/j.proghi.2008.07.001>
- Gura, E. & Gonchar, E. M. (2006). *Microwave-induced and pharmacological suppression of somatic pain under conditions of the formalin test in mice* | SpringerLink.

- <https://link.springer.com/article/10.1007/s11062-006-0024-z>
- Gura, E., Bagatskaya, E., & Limanskii, Y. (2002). Involvement of the Serotonergic System in Analgesia Induced by the Influence of Low-Intensity Microwaves on an Antipain Acupuncture Point. *Neurophysiology*, 34, 291-296. <https://doi.org/10.1023/A:1021235730673>
- Gura, Ye. V., & Bagatskaya, Ye. V. (2012). Analgesic Effects of Preliminary Microwave Irradiation of an Acupuncture Point on Visceral Pain in Mice. *Neurophysiology*, 44(3), 234-239. <https://doi.org/10.1007/s11062-012-9292-y>
- Gura, Ye. V., & Bagatskaya, Ye. V. (2015). Role of the Serotonergic System in Suppression of Visceral Pain Induced in Mice by Preliminary Microwave Irradiation of an Acupuncture Point. *Neurophysiology*, 47(3), 238-243. <https://doi.org/10.1007/s11062-015-9527-9>
- Haas, A. J., Le Page, Y., Zhadobov, M., Boriskin, A., Sauleau, R., & Le Dréan, Y. (2016). Impact of 60-GHz millimeter waves on stress and pain-related protein expression in differentiating neuron-like cells: TRPV Expression Under MMW Exposure. *Bioelectromagnetics*, 37(7), 444-454. <https://doi.org/10.1002/bem.21995>
- Haas, A. J., Le Page, Y., Zhadobov, M., Sauleau, R., Dréan, Y. L., & Saligaut, C. (2017). Effect of acute millimeter wave exposure on dopamine metabolism of NGF-treated PC12 cells. *Journal of Radiation Research*, 58(4), 439-445. <https://doi.org/10.1093/jrr/rrx004>
- Harrison, S. (2001). Substance P. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 33(6), 555-576. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(01\)00031-0](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(01)00031-0)
- HAS - Haute Autorité de Santé. (2008). *Douleur chronique : Reconnaître le syndrome douloureux chronique, l'évaluer et orienter le patient Consensus formalisé*. HAS / Service des bonnes pratiques professionnelles/ Décembre 2008. https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2009-01/douleur_chronique_argumentaire.pdf
- Henry, J. L. (1980). Substance P and pain: An updating. *Trends in Neurosciences*, 3(4), 95-97. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(80\)90036-3](https://doi.org/10.1016/0166-2236(80)90036-3)
- Hilliges, M., Wang, L., & Johansson, O. (1995). Ultrastructural evidence for nerve fibers within all vital layers of the human epidermis. *The Journal of Investigative Dermatology*, 104(1), 134-137. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12613631>
- INSERM. (2017) *Douleur · Inserm, La science pour la santé*. <https://www.inserm.fr/dossier/douleur/>
- Jensen, T. S., & Finnerup, N. B. (2007). Management of neuropathic pain. *Current Opinion in Supportive & Palliative Care*, 1(2), 126-131. <https://doi.org/10.1097/SPC.0b013e3282eeb45f>
- Johansson, O., Virtanen, M., & Hilliges, M. (1995). Histaminergic nerves demonstrated in the skin. A new direct mode of neurogenic inflammation? *Experimental Dermatology*, 4(2), 93-96. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.1995.tb00229.x>
- Kolosova, L. I., Akoev, G. N., Ryabchikova, O. V., & Avelev, V. D. (1998). Effect of low-intensity

- millimeter-range electromagnetic irradiation on the recovery of function in lesioned sciatic nerves in rats. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 28(1), 26-30. <https://doi.org/10.1007/BF02461908>
- Korolev A, Kozar A, Morosov V, Sheveleva E, Sysoev N. (2003). *Bioelectrodynamic criterions of the NLW effectiveness estimation and the interaction mechanisms of the multiplayer skin tissues with EMR in 3rd.*
- Le Pogam, P., Le Page, Y., Habauzit, D., Doué, M., Zhadobov, M., Sauleau, R., Le Dréan, Y., & Rondeau, D. (2019). Untargeted metabolomics unveil alterations of biomembranes permeability in human HaCaT keratinocytes upon 60 GHz millimeter-wave exposure. *Scientific Reports*, 9(1), 9343. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45662-6>
- Levine, D. N. (2007). Sherrington's "The Integrative action of the nervous system" : A centennial appraisal. *Journal of the Neurological Sciences*, 253(1-2), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2006.12.002>
- Lysenyuk, V. P., Samosyuk, I. Z., Kulikovich, Y. N., & Kozhanova, A. K. (2000). EXPERIMENTAL STUDY ON THE LOW-INTENSITY MILLIMETER-WAVE ELECTRO-MAGNETIC STIMULATION OF ACUPUNCTURE POINTS. *Acupuncture & Electro-Therapeutics Research*, 25(2), 91-99. <https://doi.org/10.3727/036012900816356181>
- Maaroufi, K., Had-Aissouni, L., Melon, C., Sakly, M., Abdelmelek, H., Poucet, B., & Save, E. (2014). Spatial learning, monoamines and oxidative stress in rats exposed to 900MHz electromagnetic field in combination with iron overload. *Behavioural Brain Research*, 258, 80-89. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.10.016>
- Maldonado, R. (2010). Le système opioïde endogène et l'addiction aux drogues. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 68(1), 3-11. <https://doi.org/10.1016/j.pharma.2009.12.001>
- Megha, K., Deshmukh, P. S., Ravi, A. K., Tripathi, A. K., Abegaonkar, M. P., & Banerjee, B. D. (2015). Effect of Low-Intensity Microwave Radiation on Monoamine Neurotransmitters and Their Key Regulating Enzymes in Rat Brain. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 73(1), 93-100. <https://doi.org/10.1007/s12013-015-0576-x>
- Merskey, H., & Bogduk N. (1994). *Classification of Chronic Pain*, IASP Press, Seattle
- Minasyan, S. M., Grigoryan, G. Yu., Saakyan, S. G., Akhumyan, A. A., & Kalantaryan, V. P. (2007). Effects of the action of microwave-frequency electromagnetic radiation on the spike activity of neurons in the supraoptic nucleus of the hypothalamus in rats. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 37(2), 175-180. <https://doi.org/10.1007/s11055-007-0165-6>
- Nesin, E. (2006). Suppression of synthesis of serotonin: Effect on antinociception induced by microwave irradiation and analgesic remedies. *Neurophysiology*, 38, 427-428. <https://doi.org/10.1007/s11062-006-0082-2>

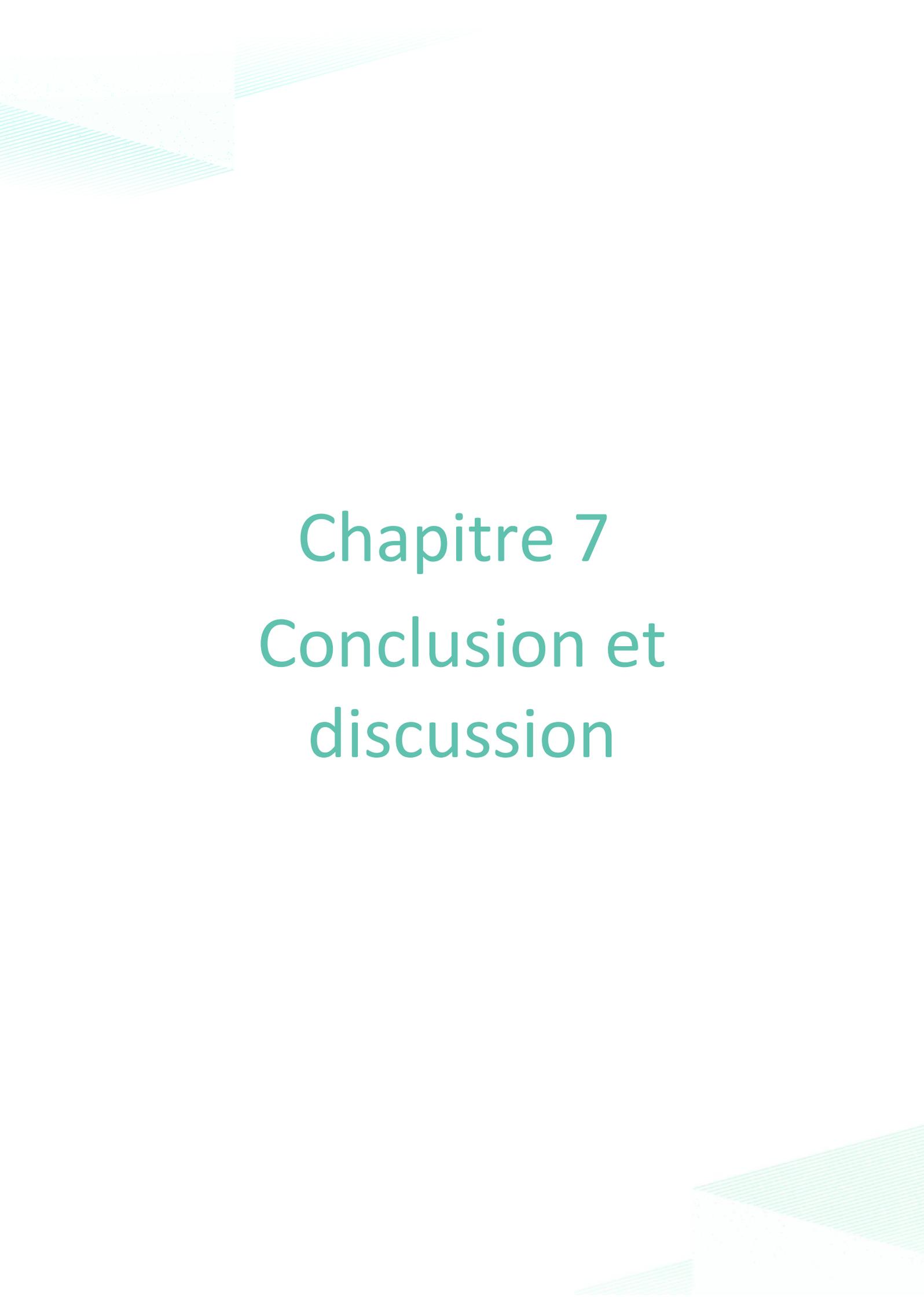
- Nesin, E. N., & Gura, E. V. (2006). Analgesia induced by combined action of Tramadol and microwave irradiation in somatic pain in mice. *Neurophysiology*, 38(4), 261-266. <https://doi.org/10.1007/s11062-006-0055-5>
- Nesin, E. N., Gura, E. V., & Kolbun, M. D. (2007). Combination of pharmacological analgesics and microwave irradiation of an acupuncture point for suppression of visceral pain in mice : Role of the opioid and serotonergic cerebral systems. *Neurophysiology*, 39(6), 406-413. <https://doi.org/10.1007/s11062-008-9004-9>
- Nichols, D. E., & Nichols, C. D. (2008). Serotonin Receptors. *Chemical Reviews*, 108(5), 1614-1641. <https://doi.org/10.1021/cr078224o>
- Novikova, N. S., Kazakova, T. B., Rogers, V., & Korneva, E. A. (2008). Expression of the c-Fos gene in the rat hypothalamus in electrical pain stimulation and UHF stimulation of the skin. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 38(4), 415-420. <https://doi.org/10.1007/s11055-008-0059-2>
- Otsuka, M., & Yoshioka, K. (1993). Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiological Reviews*, 73(2), 229-308. <https://doi.org/10.1152/physrev.1993.73.2.229>
- Pakhomov, A. G., & Murthy, P. R. (2000). Low-intensity millimeter waves as a novel therapeutic modality. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 28(1), 34-40. <https://doi.org/10.1109/27.842821>
- Pakhomov, A. G., Prol, H. K., Mathur, S. P., Akyel, Y., & Campbell, C. B. (1997a). Search for frequency-specific effects of millimeter-wave radiation on isolated nerve function. *Bioelectromagnetics*, 18(4), 324-334. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1521-186x\(1997\)18\(4\)324-334](https://doi.org/10.1002/(sici)1521-186x(1997)18(4)324-334)
- Pakhomov, A. G., Prol, H. K., Mathur, S. P., Akyel, Y., & Campbell, C. B. G. (1997b). Frequency-Specific Effects of Millimeter-Wavelength Electromagnetic Radiation in Isolated Nerve. *Electro- and Magnetobiology*, 16(1), 43-57. <https://doi.org/10.3109/15368379709016172>
- Pakhomov, A. G., Prol, H. K., Mathur, S. P., Akyel, Y., & Campbell, C. B. G. (1997c). Role of field intensity in the biological effectiveness of millimeter waves at a resonance frequency. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 43(1), 27-33. [https://doi.org/10.1016/S0302-4598\(97\)00022-6](https://doi.org/10.1016/S0302-4598(97)00022-6)
- Partyla, T., Hacker, H., Edinger, H., Leutzow, B., Lange, J., & Usichenko, T. (2017). Remote Effects of Electromagnetic Millimeter Waves on Experimentally Induced Cold Pain : A Double-Blinded Crossover Investigation in Healthy Volunteers. *Anesthesia & Analgesia*, 124(3), 980-985. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000001657>
- Peyron, R. (2007). Physiologie de la douleur. *EMC - Kinésithérapie - Médecine physique - Réadaptation*, 3(3), 1-14. [https://doi.org/10.1016/S1283-0887\(07\)49922-4](https://doi.org/10.1016/S1283-0887(07)49922-4)
- Rabenok, L., Hernandez, N. O., & Alatorre, J. E. (2009, août 18). Using Electromagnetic Microwave Field in Treatment of Lumbar Pain. *Progress In Electromagnetics Research Symposium Proceedings*.

- Radzievsky, A. A., Gordiienko, O. V., Alekseev, S., Szabo, I., Cowan, A., & Ziskin, M. C. (2008). Electromagnetic millimeter wave induced hypoalgesia: Frequency dependence and involvement of endogenous opioids. *Bioelectromagnetics*, 29(4), 284-295. <https://doi.org/10.1002/bem.20389>
- Radzievsky, A. A., Gordiienko, O. V., Szabo, I., Alekseev, S. I., & Ziskin, M. C. (2004). Millimeter wave-induced suppression of B16 F10 melanoma growth in mice: Involvement of endogenous opioids. *Bioelectromagnetics*, 25(6), 466-473. <https://doi.org/10.1002/bem.20018>
- Radzievsky, A. A., Rojavin, M. A., Cowan, A., Alekseev, S. I., Radzievsky, A. A., & Ziskin, M. C. (2001). Peripheral neural system involvement in hypoalgesic effect of electromagnetic millimeter waves. *Life Sciences*, 68(10), 1143-1151. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(00\)01016-X](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(00)01016-X)
- Radzievsky, A. A., Rojavin, M. A., Cowan, A., Alekseev, S. I., & Ziskin, M. C. (2000). Hypoalgesic effect of millimeter waves in mice: Dependence on the site of exposure. *Life Sciences*, 66(21), 2101-2111. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(00\)00536-1](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(00)00536-1)
- Radzievsky, A., Gordiienko, O., Cowan, A., Alekseev, S. I., & Ziskin, M. C. (2004). Millimeter-Wave-Induced Hypoalgesia in Mice: Dependence on Type of Experimental Pain. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 32(4), 1634-1643. <https://doi.org/10.1109/TPS.2004.830972>
- Rojavin, A. A., Radzievsky, A. Co, M. (2000). Pain relief caused by millimeter waves in mice: Results of cold water tail flick tests. *International Journal of Radiation Biology*, 76(4), 575-579. <https://doi.org/10.1080/095530000138592>
- Rojavin M.A., Ziskin M.C. (1997). Electromagnetic millimeter waves increase the duration of anaesthesia caused by ketamine and chloral hydrate in mice. *International Journal of Radiation Biology*, 72(4), 475-480. <https://doi.org/10.1080/095530097143248>
- Rojavin, M. A., Cowan, A., Radzievsky, A. A., & Ziskin, M. C. (1998). Antipruritic effect of millimeter waves in mice: Evidence for opioid involvement. *Life Sciences*, 63(18), PL251-PL257. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(98\)00436-6](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(98)00436-6)
- Roth-Deri, I., Green-Sadan, T., & Yadid, G. (2008). β -Endorphin and drug-induced reward and reinforcement. *Progress in Neurobiology*, 86(1), 1-21. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2008.06.003>
- Sherrington, C. (1952). *The Integrative Action of the Nervous System*. CUP Archive.
- Sushko, B. S. (2013). *Interaction between antinociceptive effects of preventive microwave irradiation of an acupuncture point and pharmacological blocking of NO synthase in mice*. *Neurophysiology*(Vol. 45, Issue 2) Springer.
- Tarakanov, A. V., Tarakanov, A. A., Vesnin, S., Efremov, V. V., Goryanin, I., & Roberts, N. (2021). Microwave Radiometry (MWR) temperature measurement is related to symptom severity in patients with Low Back Pain (LBP). *Journal of Bodywork and Movement Therapies*, 26, 548-552.

<https://doi.org/10.1016/j.jbmt.2021.02.005>

- Titushkin, I. A., Rao, V. S., Pickard, W. F., Moros, E. G., Shafirstein, G., & Cho, M. R. (2009). Altered Calcium Dynamics Mediates P19-Derived Neuron-Like Cell Responses to Millimeter-Wave Radiation. *Radiation Research*, 172(6), 725-736. <https://doi.org/10.1667/RR1760.1>
- Torrance, N., Ferguson, J. A., Afolabi, E., Bennett, M. I., Serpell, M. G., Dunn, K. M., & Smith, B. H. (2013). Neuropathic pain in the community : More under-treated than refractory? *Pain*, 154(5), 690-699. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2012.12.022>
- Tracey, I., & Johns, E. (2010). The pain matrix : Reloaded or reborn as we image tonic pain using arterial spin labelling. *Pain*, 148(3), 359-360. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2009.11.009>
- Tracey, I., & Mantyh, P. W. (2007). The Cerebral Signature for Pain Perception and Its Modulation. *Neuron*, 55(3), 377-391. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.07.012>
- Usichenko, T. I., Edinger, H., Gizhko, V. V., Lehmann, C., Wendt, M., & Feyerherd, F. (2006). Low-Intensity Electromagnetic Millimeter Waves for Pain Therapy. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 3(2), 201-207. <https://doi.org/10.1093/ecam/nel012>
- Usichenko, T. I., Ivashkivsky, O. I., & Gizhko, V. V. (2003). Treatment of Rheumatoid Arthritis with Electromagnetic Millimeter Waves Applied to Acupuncture Points—A Randomized Double Blind Clinical Study. *Acupuncture & Electro-Therapeutics Research*, 28(1), 11-18. <https://doi.org/10.3727/036012903815901723>
- Vance, C. G., Dailey, D. L., Rakel, B. A., & Sluka, K. A. (2014). Using TENS for pain control : The state of the evidence. *Pain Management*, 4(3), 197-209. <https://doi.org/10.2217/pmt.14.13>
- Villemure, C., & Bushnell, M. C. (2009). Mood Influences Supraspinal Pain Processing Separately from Attention. *Journal of Neuroscience*, 29(3), 705-715. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3822-08.2009>
- Vorobyov, V. V., & Khramov, R. N. (2002). Hypothalamic Effects of Millimeter Wave Irradiation Depend on Location of Exposed Acupuncture Zones in Unanesthetized Rabbits. *The American Journal of Chinese Medicine*, 30(01), 29-35. <https://doi.org/10.1142/S0192415X0200003X>
- Walters, T. J., Blick, D. W., Johnson, L. R., Adair, E. R., & Foster, K. R. (2000a). Heating and pain sensation produced in human skin bu millimeter waves : comparison to a simple thermal model. *Health Physics*, 78(3), 259-267. <https://doi.org/10.1097/00004032-200003000-00003>
- Wiech, K., Seymour, B., Kalisch, R., Enno Stephan, K., Koltzenburg, M., Driver, J., & Dolan, R. J. (2005). Modulation of pain processing in hyperalgesia by cognitive demand. *NeuroImage*, 27(1), 59-69. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2005.03.044>
- Yam, M., Loh, Y., Tan, C., Khadijah Adam, S., Abdul Manan, N., & Basir, R. (2018). General Pathways of Pain Sensation and the Major Neurotransmitters Involved in Pain Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2164. <https://doi.org/10.3390/ijms19082164>

- Yarnitsky, D. (2010). Conditioned pain modulation (the diffuse noxious inhibitory control-like effect) : Its relevance for acute and chronic pain states. *Current Opinion in Anaesthesiology*, 23(5), 611-615. <https://doi.org/10.1097/ACO.0b013e32833c348b>
- Ziskin, M. C. (2006). Physiological mechanisms underlying millimeter wave therapy/ *SpringerLink*. BIOELECTROMAGNETICS Current Concepts pp 241-251. https://doi.org/10.1007/1-4020-4278-7_14
- Ziskin, M. C. (2013). Millimeter waves : Acoustic and electromagnetic. *Bioelectromagnetics*, 34(1), 3-14. <https://doi.org/10.1002/bem.21750>



Chapitre 7

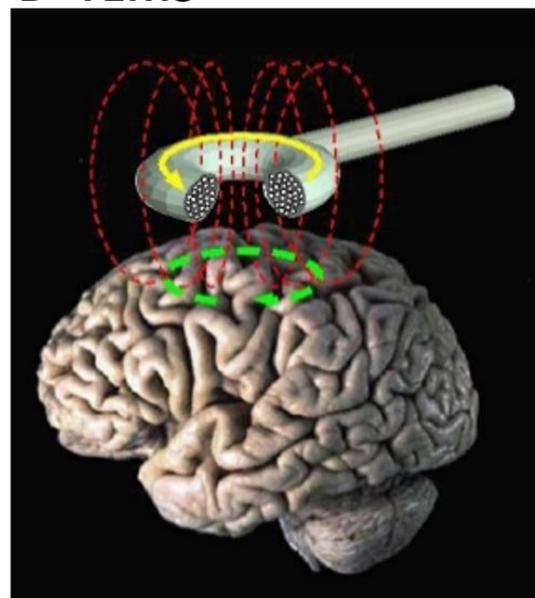
Conclusion et discussion

La douleur est un mécanisme essentiel à la survie de l'être humain, en tant que signal d'alerte permettant au corps de répondre de façon adaptée aux différentes agressions. Cependant, lorsque la douleur s'installe durablement, elle devient pathologique. On parle de douleur chronique lorsqu'elle réside plus de 3 mois chez le patient [HAS, 2008]. Pour autant, la douleur peut avoir un impact considérable sur la qualité de vie des patients, en tant que telle et par ses conséquences telles que les insomnies, les troubles alimentaires, des problèmes de stress et de dépression [Bair et al., 2003, Fine 2011, Berryman et al. 2013]. En France, 32% des patients souffrent de douleurs chroniques et seulement 50% d'entre eux ont un traitement adapté [INSERM 2017]. Le traitement de la douleur chronique est un enjeu thérapeutique majeur. En effet, la plupart des médicaments proposés peuvent induire des effets secondaires graves, lors d'une utilisation sur le long terme, comme par exemple l'addiction dans le cas des opiacés [Jensen et Finnerup 2007, Toblin et al. 2011]. C'est pourquoi, des thérapies non-médicamenteuses ont été développées comme traitements alternatifs aux médicaments analgésiques « lourds ». On peut citer la technologie de stimulation nerveuse électrique transcutanée (TENS) ou encore la stimulation magnétique transcrânienne (TEMS- Figure CH7-1, Vance et al. 2014, Wassermann et Epstein, 2012) utilisant des champs électriques ou magnétiques.

A- TENS



B- TEMS



3575

Figure CH7-1 : Concurrents de REMEDEE one, la technologie de stimulation nerveuse électrique transcutanée TENS (Triomed) et la stimulation magnétique transcrânienne TEMS (E. Wassermann 2012)

« Remedee one », décrit comme « le premier stimulateur d'endorphine à usage personnel » est une méthode parmi les autres, utilisant un champ électromagnétique. Ce dispositif, basé sur des thérapies Russes des années 1970, utilise les ondes millimétriques aux alentours de 61 GHz. La puissance délivrée lors de cette thérapie (12,8 mW/cm²) est au-dessus des normes d'exposition autorisées pour le grand public (1 mW/cm²). Cependant, en tant que dispositif médical, l'analyse bénéfice/risque permet de s'affranchir de ces normes. Toute l'ingéniosité de cette innovation réside dans la miniaturisation de la puce délivrant les OMM, permettant ainsi à l'utilisateur de le porter au poignet. Le patient peut alors réaliser jusqu'à deux séances de 30 minutes d'induction des ondes électromagnétiques par jour, à proximité immédiate du nerf médian, au niveau de la face palmaire du poignet. L'enjeu pour la société REMEDEE Labs est de proposer une alternative, un soulagement pour les patients atteints de douleurs chroniques. Le travail présenté lors de ce manuscrit consiste d'une part à analyser l'innocuité de la thérapie antidouleur mise au point par REMEDEE labs, en s'intéressant à différents types de stress : thermique, oxydant et génotoxique. D'autre part, à déterminer les mécanismes moléculaires sous-jacents aux effets analgésiques et en particulier l'implication du système sérotoninergique. Pour investiguer ses interrogations, un premier travail de criblage a été mené *in vitro*. Les ondes millimétriques ne pénétrant que très peu dans les tissus biologiques (0,5 mm aux paramètres utilisés, [Zhadobov et al. 2008](#)), les kératinocytes humains de la lignée HaCaT semblaient des candidats pertinents pour l'étude de l'innocuité du dispositif, adapté pour la culture cellulaire.

I- Innocuité du dispositif REMEDEE

1. Stress thermique

Le premier stress vérifié, possiblement induit par l'utilisation du dispositif, était le stress thermique. En effet, l'augmentation de la température induite par les OMM est inhérente au dispositif de REMEDEE. La puissance utilisée lors de cette thérapie induit une augmentation de la température. Cette élévation thermique locale peut-elle modifier l'intégrité des cellules, voir conduire à des sensations de douleurs [[Debouzy et al. 2007](#)] ? Il a été montré que

l'induction de la température lors de l'utilisation du dispositif adapté en *in vitro* ne dépassait pas les +1,2°C (+/- 0,3 ; Figure CH3-3). L'induction de la température locale chez le patient via Remedee one n'a pas encore été enregistrée, les tests sont néanmoins en cours. Il est probable que la température mesurée chez les patients ne dépasse pas les +1,2°C, voir même soit moindre car il existe une déperdition de chaleur (thermolyse) liée à la circulation sanguine qu'on ne retrouve pas dans le système *in vitro*. En outre, l'utilisation du dispositif de l'IETR montrait une augmentation plus importante de +3,4°C (+/- 0,26). En effet, le dispositif de l'IETR émet directement dans l'échantillon, une IPD_{éq} de 15 mW/cm². La dosimétrie a tenu compte de la réflexion du au plastique des boites de culture. Cela n'est pas le cas du dispositif de REMEDEE qui génère une onde avec une IPD de 12,8 mW/cm². L'IPD_{éq} dans ce cas de figure est sans doute moindre. Néanmoins, ces températures demeurent à des conditions physiologiques. Pour autant, il était important de vérifier, à l'échelle moléculaire, si cette différence de température peut induire une réponse au choc thermique dans nos conditions. Pour ce faire, les protéines cyto-protectrices HSP70 et HSP27 ont été dosées. D'abord leur transcription via RT-qPCR (Figure CH3-4) ainsi que leur traduction et leur phosphorylation par immunofluorescence (Figure CH3-5). Dans les conditions d'utilisation ou avec une utilisation extrême du dispositif (24h), aucune modification n'avait été enregistrée après exposition. Ces résultats sont en accord avec plusieurs publications qui ne montrent pas d'induction de la protéine HSP70 pour des densités de puissances de 1 et 20 mW/cm², à 61 GHz pendant 24h ou 1h respectivement [Zhadobov et al. 2009, Szabo et al. 2003]. Néanmoins, à 20 mW/cm² pendant 24h, une induction des protéines HSP est enregistrée [Habauzit et al. 2014]. Mais les conditions de culture utilisées dans cette étude induisaient une élévation supra-physiologique de la température. En la compensant au niveau de l'incubateur, les protéines HSP n'étaient plus surexprimées.

2. Intégrité cellulaire

L'intégrité cellulaire, sous rayonnement électromagnétique, a ensuite été analysée. En effet, l'impact des ondes millimétriques sur la prolifération cellulaire est controversé. Alors que plusieurs équipes montrent un effet antiprolifératif [Beneduci et al. 2005, Radziewsk et al.

2004, Chidichimo et al. 2002, Zhao et al. 2020] d'autres ne constatent aucun effet sur la prolifération cellulaire [Zhadobov et al. 2009, Szabo et al. 2003]. Dans le cas de cette thèse, les cellules HaCaT et SH-SY5Y après exposition, à court ou long terme, n'a pas montré d'impact sur la mortalité (Figure CH3-6), ni sur les phases du cycle cellulaire (Figure CH3-7) ou sur la prolifération (Figure CH3-8). Dans les conditions d'utilisation de REMEDEE Labs, le rayonnement millimétrique ne semble pas entraîner d'impact visible dans la culture cellulaire.

3. Stress oxydant

Le potentiel oxydant des OMM, pouvant être responsable d'effets cancérigènes, a ensuite été examiné. La surproduction de ROS est ainsi suspectée, via des lésions des macromolécules, dans l'induction de maladies telles que le cancer, le diabète ou des syndromes neurodégénératifs [Favier, 2003]. Dans un premier temps, la production de ROS a été analysée après exposition pendant 1h et 24h dans les cellules HaCaT. Aucune modification de la concentration intracellulaire et extracellulaire de ROS n'a été observée lors de l'exposition aux OMM (Figure CH4-6 à CH4-8). Par contre, une exposition à des températures croissantes pendant 2h l'augmentait d'un facteur 1,5. Ces résultats indiquent que la température induite par le dispositif Remedee one n'est pas suffisamment élevée pour perturber l'équilibre Redox de la cellule. Ce résultat est en accord avec de nombreuses publications *in vitro* [Safrona 2002, Poghosyan et al. 2017 ; Vlasova et al. 2018]. Cependant, d'autres études démontrent l'inverse [Kumar et al. 2010 ; Vlasova et al. 2018]. Néanmoins, il est à souligner que le stress oxydant détecté lors de ces études reste mineur (facteur allant de 1,074 à 2,04) et pourrait refléter des fluctuations naturelles du niveau basal de la production de ROS soit des modifications du bruit de fond. L'induction d'un stress oxydant apparaît également très liée à la durée d'exposition et au modèle expérimental, ce qui rend délicate toute interprétation définitive.

En outre, la prise en charge des ROS est un processus très dynamique. Les ROS ont une demi-vie très courte et peuvent être soit rapidement éliminés, soit modifiés en réagissant avec d'autres molécules. C'est pourquoi la peroxydation lipidique et protéique a été investiguée. La concentration intracellulaire en protéines oxydées a montré une diminution après 1h et 24h d'exposition (Figure CH4-9). Cela suggère que les OMM pourraient permettre une

détoxification ou une élimination plus efficace des protéines oxydées, sans doute via le protéasome. L'analyse des lipides oxydés intracellulaires a montré le même profil après un temps long, c'est-à-dire une diminution après exposition (Figure CH4-10 et CH4-11). Quelques publications s'étaient intéressées à la peroxydation lipidique. Logani et son équipe (1996) n'avaient pas remonté d'effets des OMM *in vitro* dans des liposomes artificiels alors que Poghasyan et son équipe (2017) montraient une augmentation *in vivo* dans certains organes tels que le foie et le cerveau chez le rat. On retrouve encore ici une notion de modèle d'étude qui influe sur les résultats. Dans la présente étude, une augmentation de la concentration de MDA a été enregistrée après 24h d'exposition (Figure CH4-11). Pourtant, de façon globale, la quantité de MDA par échantillon est inchangée (Figure CH4-12). Une différence de répartition des lipides oxydés semble avoir lieu. Cela suggère que les OMM perturberaient le transport des lipides oxydés, induisant une différence de gradient trans-bicouches. En effet, plusieurs équipes avaient remonté l'impact des OMM sur la membrane plasmique. Ramundo-Orlando et son équipe (2009) avaient indiqué une modification dynamique (élongation, attraction entre vésicules) et structurales des membranes plasmiques de façon réversible, notamment en observant une fuite de colorants présents dans les vésicules (53,37 GHz, 0,1 mW/cm²) et une augmentation de la perméabilité des liposomes (130 GHz, 1 à 17 mW/cm², 2007). Les membranes cellulaires seraient selon Ramundo-Orlando (2010) la cible principale des OMM. Dans ce sens, Di Donato et collaborateurs, de l'équipe que Ramundo-Orlando, ont eux aussi observé une perméabilité augmentée de la membrane de liposomes artificiels, laissant diffuser des petites molécules (53,37 GHz, 0,1 mW/cm², 2012). Cosentino et collaborateurs (2013, même équipe que Ramundo-Orlando), dans de grandes vésicules unilamellaires observent une diminution de la perméabilité à l'eau après exposition aux OMM (52-72 GHz, 0,0035-0,01 mW/cm²). Ils expliquent leurs résultats par une déshydratation de la membrane, entraînant une augmentation de la rigidité membranaire. Ces résultats sont retrouvés par Beneduci (2013,2014 - Il est néanmoins à noter que toutes ces recherches ont été effectuées par le même groupe). En outre, Ayrapetyan et son équipe (2008) émettent l'hypothèse que cette déshydratation cellulaire due aux OMM pourrait expliquer l'effet analgésique. En effet, un des mécanisme principal de la nociception serait l'hydratation neuronale, provoquant alors l'ouverture des canaux ioniques et la génération d'un potentiel d'action (Basbum et al. 2009). Nous reviendrons sur ce point dans le paragraphe II. Mécanismes.

3700

Néanmoins, d'autres mécanismes ont été proposés. En 2006, Szabo et son équipe ont mis en évidence l'externalisation réversible de la phosphatidylsérine dans des cellules HaCaT. La phosphatidylsérine est connue pour son rôle dans l'initiation de l'apoptose. Cependant, les auteurs ne montrent aucun dommage cellulaire et concluent à un rôle dans la signalisation cellulaire encore inconnu.

Tableau CH7-1 : Références traitant de l'impact des OMM sur la perméabilité membranaire

* même groupe

Nom 1er auteur	Fréquence (GHz)	IPD (mW/cm ²)	Modèle	Expériences
Logani et Ziskin 1996	53,6 61,2 71,2	10 1 500	<i>In vitro</i> Vésicules lipidiques	Lipoperoxydation des membranes
*Ramundo-Orlando 2009	53,37	0,1	<i>In vitro</i> Vésicules lipidiques géantes	Elongation, diffusion et attraction accrue entre les vésicules
*Ramundo-Orlando 2007	130	1-17	<i>In vitro</i> Liposomes	Augmentation de la perméabilité membranaire
*Di Donato 2012	53,37 GHz	0,1	<i>In vitro</i> Liposomes artificiels	Perméabilité membranaire
*Beneduci et al. 2013	53,57-78,33 GHz	0,01	<i>In vitro</i> Vésicules lipidiques	Changement de distribution de l'eau au niveau des tête polaire des lipides
*Cosentino et al. 2013	52-72 GHz	0,0035-0,01	<i>In vitro</i> Vésicules lipidiques	Pas de modification de taille Perméabilité membranaire
*Beneduci et al. 2014	53,57-78,33 GHz	0,01	<i>In vitro</i> Vésicules lipidiques formées à partir de jaunes d'œufs	Hydratation des vésicules lipidiques
Szabo 2006	42,25	1,23	<i>In vitro</i> Kératynocytes HaCaT,	Externalisation réversible de phosphatidylsérine

3705

De ce fait, plusieurs hypothèses se dessinent. Les OMM pourraient entraîner une peroxydation lipidique et/ou une déshydratation de la membrane plasmique qui auraient diverses conséquences telles que des modifications de la perméabilité membranaire, des phénomènes de diffusion moléculaire, de modifications de rigidité membranaire, ou encore

3710 des rôles de signalisation cellulaire (Figure CH7-2). Des recherches complémentaires restent à
entreprendre. Néanmoins, ces hypothèses pourraient expliquer nos résultats.

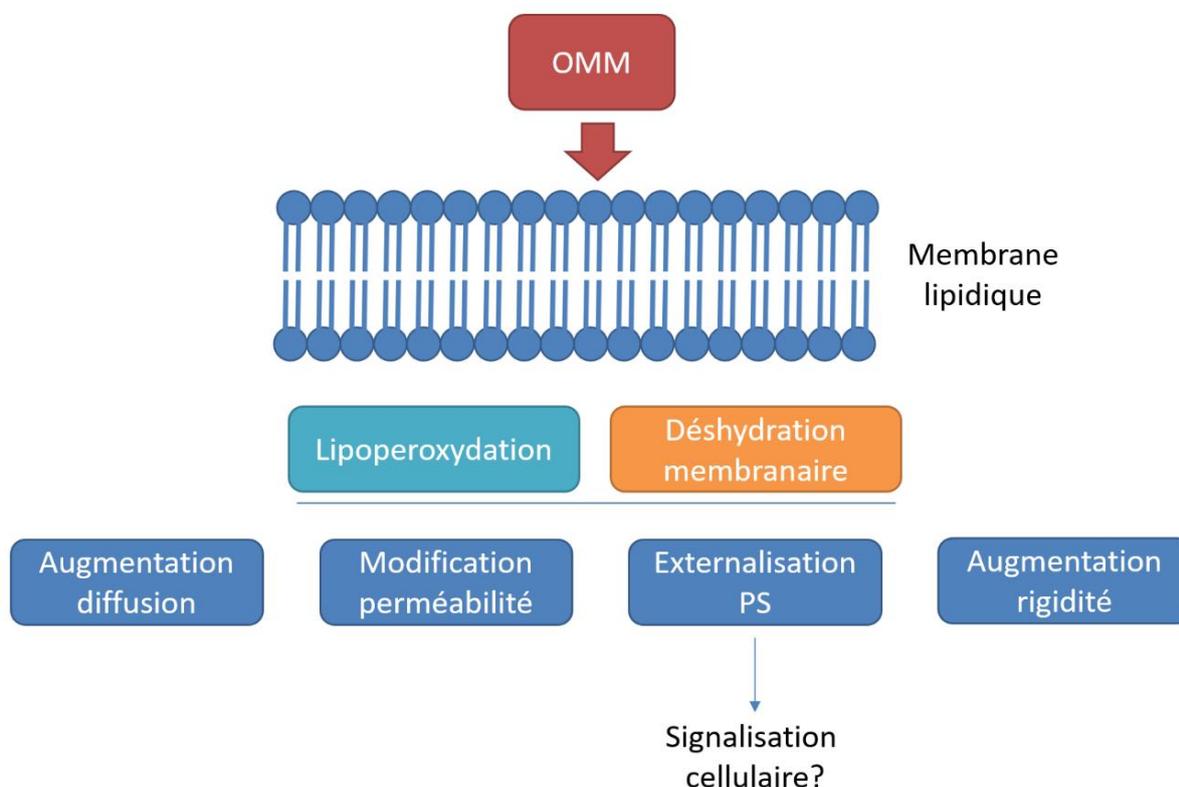


Figure CH7-2 : Hypothèses de l'impact des OMM sur la membrane lipidique

Globalement, ces résultats sont rassurants quant à l'utilisation de Remedee one par les
3715 patients. La durée des traitements thérapeutiques varie entre 30 minutes et 1h. A ces temps
d'exposition, aucune modification n'est observée. Par contre, pour 24h d'exposition, un début
de réponse semble se dégager laissant présager un impact plus important lors d'une utilisation
chronique. Dans le cadre de Remedee one, une contre-indication du dispositif serait d'éviter
une exposition prolongée et continue. Pour pouvoir déterminer l'impact des OMM sur le
3720 stress oxydant de façon chronique, un modèle *in vivo* serait déterminant. Nous en reparlerons
dans la section « II. Mécanismes »

4. Stress génotoxique

3725

L'induction de cancers par l'exposition aux ondes électromagnétiques est une question majeure de santé publique. Alors que les RF de faibles fréquences (ordre du MHz) sont bloquées par la membrane cellulaire, les OMM ne sont pas arrêtées par la membrane et peuvent pénétrer jusqu'au noyau [Haider et al. 2021]. C'est pourquoi il était pertinent d'analyser un potentiel stress génotoxique direct. En premier lieu, le dosage de la 8OH-dG intracellulaire, marqueur du stress oxydant sur l'ADN a été réalisé. Après 1h d'exposition, aucune différence n'a pu être mise en évidence. Par contre, après 24h, une diminution significative avait été observée dans les cellules exposées. Ce résultat n'avait pas été reproduit par le chauffage seul (Figure CH5-12). De plus, une récente étude de notre groupe [Le Pogam et al. 2019] avait pu montrer une augmentation de la concentration de 8OH-dG dans le milieu extracellulaire. De ce fait, les OMM permettraient-elles une meilleure élimination de la base oxydée ou une meilleure excrétion ? Gapeyev et son équipe (2014) émettent l'hypothèse d'une réponse adaptative des OMM. Ces résultats suggèrent que les OMM induiraient une meilleure prise en charge des dégâts à l'ADN par les systèmes de réparation. C'est pourquoi l'étude des voies de réparation de l'ADN a été réalisée, en s'intéressant à la fois à l'expression génétique mais aussi à l'activation de facteurs clefs de ces systèmes. En premier lieu, la voie BER en charge de l'élimination des bases oxydées de l'ADN a été analysée. Après 1h et 24h d'exposition, aucune différence n'a été enregistrée, que ce soit dans la concentration d'ARNm, de protéines intracellulaires ou de phosphorylations protéiques impliquées dans la voie BER (Figure CH5-13 à CH5-15). D'autres systèmes de réparation, activés lors de stress oxydant, ont aussi été investigués : la voie de réparation ATM et la voie de réparation ATR. De même pour ces deux voies, aucune différence n'a été mise en évidence (Figure CH5-16 à CH5-20). De ce fait, l'exposition des OMM aux conditions utilisées par Remedee one ne semble pas avoir un impact suffisant sur l'induction des voies de réparation, pour être détectée par des techniques « classiques » de transcriptomique ou d'analyses protéiques.

3750

Les systèmes de réparation cellulaire sont très performants. Il est de ce fait difficile de mettre en évidence des dégâts à l'ADN car ils peuvent être réparés au fur et à mesure qu'ils se font.

De plus, l'approche par immunofluorescence utilisée pendant cette étude permettait uniquement d'apprécier l'oxydation de l'ADN globale, négligeant alors l'ADN mitochondrial (ADNmt). En effet, la mitochondrie est une cible préférentielle des ROS. D'une part car elle est la source principale, mais aussi car son ADN est nu, non protégé par des histones et elle possède des mécanismes de réparation moins variés que le noyau [Ames et al. 1993, Cann et al. 1987 ; Cortopassi et al. 1992, Richter et al. 1988]. Le stress oxydant peut léser le génome mitochondrial d'un facteur 10 par rapport au génome nucléaire [Richter et al. 1988]. Les conséquences peuvent être délétères car les mutations de l'ADNmt altèrent la morphologie mitochondriale, son fonctionnement et empêche son renouvellement [Bulteau et al. 2006]. Il était donc intéressant d'investiguer plus précisément l'ADN de cet organe. A notre connaissance, aucune étude sur les OMM ne s'est penchée sur cette idée. Par contre, dans le domaine des radiofréquences, on peut citer Xu et son équipe (2010) qui ont exposés des neurones corticaux primaires à 1,8 GHz pendant 24h. Ils ont montré une augmentation de l'oxydation de l'ADN mitochondrial (augmentation de la 8Oh-dG colocalisée avec un mitotracker) après exposition. Dans cette optique, des expérimentations sont en cours afin d'évaluer l'impact de l'exposition aux OMM sur l'ADN mitochondrial. Pour ce faire, l'utilisation de tests par PCR a été envisagée sur la base des travaux de Gonzalez-Hunt (2016). L'idée est d'amplifier un fragment court et un fragment long du génome mitochondrial. Le principe est que, si des oxydations ont lieu, une baisse de l'efficacité de l'ADN polymérase utilisée lors de l'amplification se produira, réduisant ainsi la quantité de fragments longs amplifiés. Cette expérience est ensuite réalisée entre des cellules exposées et non exposées et l'indice (quantité de fragments courts)/(quantité de fragments longs), permettrait de savoir s'il y a plus d'oxydations dans l'une ou l'autre des conditions. Les mises au point ont été commencées sur cette technique mais, du fait du manque de temps, ces travaux n'ont pas abouti.

Les résultats obtenus à partir des paramètres investigués sont très rassurants si l'exposition aux OMM est de courte durée, c'est-à-dire dans les conditions utilisées en thérapie. Dans ce cas, aucune modification cellulaire ou moléculaire n'est observée. Dans un contexte d'exposition prolongée à 24h, les quelques variations observées nécessitent des expérimentations supplémentaires afin de comprendre leurs relevances biologiques : il s'agit de diminution des protéines, des lipides et de l'ADN oxydés intracellulaire. Il est possible que les OMM puissent induire une stimulation de la réponse anti-oxydante, comme un effet

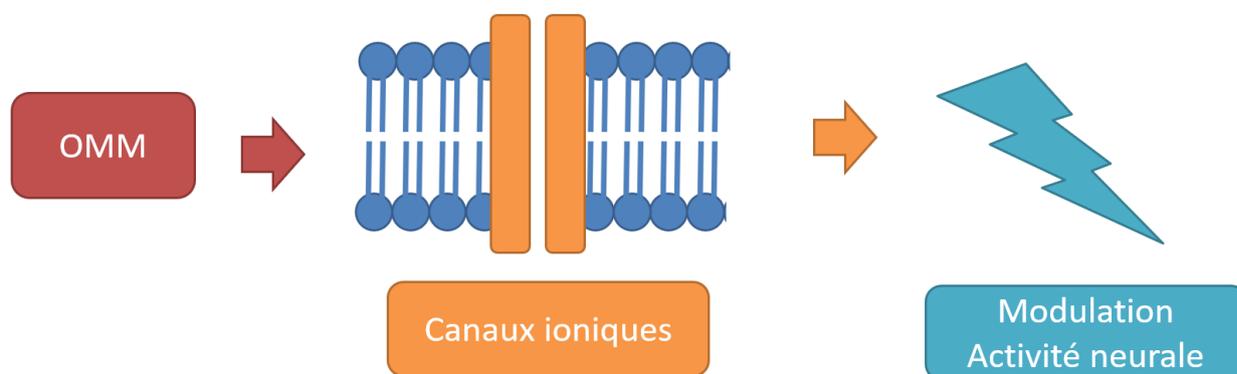
adaptatif, qui amplifierait la prise en charge des macromolécules oxydées. Cette hypothèse
3785 est délicate à tester avec les techniques d'immunofluorescences ou de RT-qPCR réalisées, du
fait de la dynamique des systèmes de réparation. En outre, vis-à-vis de Remedee one, il serait
plus prudent d'éviter toute exposition prolongée de plus de 24h. Les recherches dans ce
domaine mériteraient d'être plus poussées dans un modèle *in vivo*.

3790 II-Mécanismes

Les mécanismes sous-jacents aux effets analgésiques induits par les OMM sont toujours mal
définis. Dans cette étude, l'accent a été mis sur une réponse cutanée, notamment par le
système sérotoninergique et à moindre mesure une réponse de la substance P, *in vitro* sur des
3795 cellules de peau. Le choix a été fait d'adopter aussi un modèle neuronal pour imiter les
terminaisons nerveuses libres de la peau : la lignée SH-SY5Y. Après avoir vérifié que les deux
modèles cellulaires exprimaient ces deux neurotransmetteurs, leur concentration
intracellulaire a été analysée. Il a été enregistré une diminution de la concentration
intracellulaire de sérotonine dans les cellules SH-SY5Y et les cellules HaCaT après 1h et 24h
3800 d'exposition respectivement. Ces résultats étaient mimés par le contrôle thermique (TC) ce
qui laisse supposer un simple effet de l'élévation de la température dû à l'exposition.
Cependant, dans les cellules SH-SY5Y, une diminution de la concentration de substance P a
été observée uniquement après 1h d'exposition. Pour se rapprocher de ce résultat par le
chauffage, il fallait augmenter le temps de traitement (2h à 37°C dans notre étude-Figure CH6-
3805 9 à CH6-12). Cette observation suggère que le pouvoir pénétrant des ondes millimétriques,
bien que limité, est sans doute primordial. L'utilisation d'une fréquence autour de 61 GHz
permet sans doute de déposer l'énergie thermique à la bonne profondeur dans la peau,
activant ainsi des cibles cellulaires, et ceci sans apporter d'excès de chaleur et donc sans
douleur. La question posée à ce moment était de savoir si la diminution intracellulaire des
3810 neurotransmetteurs était due à une élimination (dégradation au sein des cellules) ou à une
excrétion dans le milieu de culture. Pour répondre à cela, le contenu en sérotonine des cellules
HaCaT a été analysé. Un dosage ELISA ciblé sur la sérotonine a d'abord été utilisé (Figure CH6-
13). Cependant, cette technique n'a pas abouti du fait d'un manque de sensibilité. De ce fait,

la chromatographie en phase liquide à ultra-haute pression couplée à un spectromètre de
3815 masse à haute résolution (UPLC-HRMC) a été envisagée. Après 1h d'exposition aux OMM, le
métabolisme global (Figure CH6-15) des cellules exposées (EXPO) ou non (SHAM) ou soumis à
un contrôle thermique (TC) s'est montré relativement semblable. Ce qui ne fut pas le cas du
métabolisme des cellules traitées au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 , 0,5 mM, 2h). Par la suite,
l'accent a été mis sur la sérotonine grâce à une méthode de métabolomique ciblée (Figure
3820 CH6-16). De même, aucune différence dans l'abondance de sérotonine extracellulaire entre
les cellules exposées (EXPO) ou non (SHAM) ou sous contrôle thermique (TC) n'a été
enregistrée contrairement au traitement à l' H_2O_2 qui a montré une diminution. Ainsi, ces
approches ont démontré que, dans les conditions d'utilisation de Remedee one, le
métabolisme des kératinocytes n'était pas modifié et ces dernières ne subissaient pas un
3825 stress oxydant majeur sous exposition. A ce jour, les résultats de l'UPLC-HRMS sur les cellules
HaCaT exposées aux OMM pendant 24h ne nous sont pas encore parvenus, laissant planer le
doute sur une élimination ou une excrétion de la sérotonine induit par les OMM. Néanmoins,
en 2019, Le Pogam et collaborateurs ont pu montrer une augmentation de la concentration
extracellulaire de sérotonine dans des cellules HaCaT, exposées pendant 24h aux OMM en
3830 condition athermique à 20 mW/cm². Ce résultat laisserait sous-entendre un phénomène
d'excrétion ou de fuite des métabolites par les OMM. Cet évènement pourrait-être dû à des
modifications de la membrane plasmique comme vu précédemment. Ces modifications
pourraient entraîner des modulations de l'activité neuronale ainsi que des modifications de
sensibilité des nocicepteurs impliquant alors une réponse systémique. En effet, plusieurs
3835 hypothèses émergent de la littérature. Les OMM auraient un impact sur les canaux ioniques.
En 1995, Geletyuk et son équipe ont montré que les OMM (42,25 GHz, 0,1mW/cm²)
entraînaient une diminution de l'ouverture des canaux calciques dans des cellules rénales de
ouistitis verts africains. Alekseev et son équipe (1999) ont exposé des neurones de mollusques
à 75 GHz pour 1,8 à 12,6 mW/cm². Ils ont observé des modifications des courants ioniques
3840 potassium (K^+) et calcium (Ca^{2+}) lors de l'exposition. L'impact des OMM sur les canaux ioniques
a été validé par d'autres auteurs, sans pour autant pouvoir éliminer la composante thermique
[Siegel et al. 2010]. De plus, les canaux ioniques, en fonction de leur propriété, pourraient
modifier le potentiel nerveux et/ou induiraient une libération de molécules telles que les
neurotransmetteurs, les hormones, etc... Une autre approche est d'étudier le potentiel
3845 d'action induit par les canaux ioniques. Plusieurs groupes de recherche ont pu montrer, *in vivo*

et *in vitro*, des modulations sur l'activité neurale suite aux rayonnements millimétriques [Pakhomov et al. 1997a, 1997b, 1997c, Pikov et al. 2010, Chuyan et al. 2016, Romanenko et al. 2014]. Les données de la littérature restent contradictoires allant de la facilité de la propagation du signal électrique [D'Agostino et al. 2018, Romanenko et al. 2019], ou au contraire, son ralentissement voire son inhibition [Alekseev et al. 2009, Sivachenko et al. 2016]. Néanmoins, ces pistes de mécanismes semblent prometteuses et mériteraient des études complémentaires (Figure CH7-3).



3855 Figure CH7-3 : Hypothèses de l'impact des OMM sur le mécanisme analgésique

III- Conclusion générale

Ce projet de thèse a renforcé les connaissances sur l'innocuité des ondes millimétriques aux conditions utilisées par Remedee one. En effet, une exposition aigüe, de courte (1h) ou de longue durée (24h) ne semble pas engendrer d'effets délétères sur les cellules de peau humaine. Avec un traitement d'1h, les résultats sont très rassurants, montrant une absence de stress thermique, de stress oxydant et de stress génotoxique majeur (Figure CH7-4). Néanmoins, si stress il y a, notamment avec des expositions de 24h, la prise en charge cellulaire semble être efficace, voir même protectrice. Il est à noter que les travaux présentés ont été réalisés *in vitro*, avec un traitement aigüe de 1h ou 24h car il est difficile de réaliser des expositions chroniques sur des cultures cellulaires. De ce fait, il serait intéressant d'étudier l'impact de la thérapie *in vivo* afin de pouvoir moduler le traitement. Il est certain qu'au niveau

de la peau, les différents types de cellules (kératinocytes, fibroblastes, mélanocytes, lymphocytes, etc) interagissent entre elles par l'intermédiaire de diverses molécules pouvant agir comme messagers inter- et intracellulaires. Pour réaliser ces manipulations, une cage réverbérante a été mise au point par l'IETR, permettant d'exposer des souris sans entraver leurs mouvements. La dosimétrie a déjà été effectuée et a fait l'objet d'une publication [Fall et al. 2020]. Opérationnelle, elle aurait dû faire partie de ce projet. Hélas, l'arrêt des expérimentations lors de crise sanitaire du COVID-19 nous a obligé à revoir nos ambitions à la baisse. Pour autant, ces premiers résultats n'ont pas permis de confirmer certaines pistes qui demandent plus d'investigations, notamment au niveau du mécanisme. La piste d'une réponse cutanée, notamment par la sécrétion de facteurs par les cellules kératinocytes semble moins crédible, tout du moins pour un temps court d'exposition, au vu des résultats de la présente étude. Il est à envisager une réponse systémique plus globale avec l'activation des cellules nerveuses. Des recherches dans ce sens sont à entreprendre.

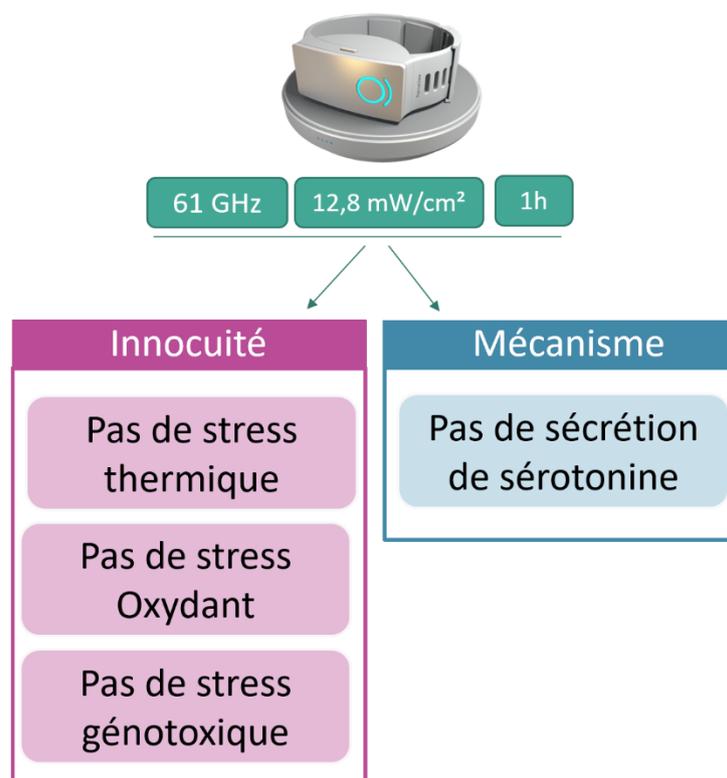


Figure CH7-4 : résultats de l'étude *in vitro* après exposition de kératinocyte HaCaT aux OMM aux conditions de Remedee one (61GHz, 12,8mW :cm² pendant 1h)

D'un point de vue plus large, l'augmentation des technologies utilisant les OMM, notamment les réseaux de télécommunication 5G (et *a fortiori* la future 6G) entraîne le questionnement et l'inquiétude du grand public. Nos résultats ne sont pas forcément transposables à la

situation de la 5G. D'une part car les puissances utilisées en thérapie sont 1 000 fois supérieures à celles utilisées en télécommunication. Comme la puissance semble être un
3890 facteur important dans les effets biologiques, il est impossible de les prédire avec des puissances utilisées dans ces réseaux. Les gammes de fréquence 5G ne sont pas non plus similaires, mais se rapprocheraient de celles de la 6G. De plus, les durées d'exposition ne sont pas comparables. Les présents résultats reposent sur des traitements aigus et ne sont pas transposables à l'exposition chronique réalisée par les réseaux de télécommunication. Il est
3895 donc nécessaire de continuer les recherches dans le domaine des ondes millimétriques, avec différentes puissances et différentes durées d'exposition.

VI- Références

- Albini, M., Dinarelli, S., Pennella, F., Romeo, S., Zampetti, E., Girasole, M., Morbiducci, U., Massa, R., & Ramundo-Orlando, A. (2014). Induced movements of giant vesicles by millimeter wave radiation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1838(7), 1710-1718. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.03.021>
- Albini, M., Salvi, M., Altamura, E., Dinarelli, S., Di Donato, L., Lucibello, A., Mavelli, F., Molinari, F., Morbiducci, U., & Ramundo-Orlando, A. (2019). Movement of giant lipid vesicles induced by millimeter wave radiation change when they contain magnetic nanoparticles. *Drug Delivery and Translational Research*, 9(1), 131-143. <https://doi.org/10.1007/s13346-018-0572-y>
- Alekseev, S. I., Gordiienko, O. V., Radzievsky, A. A., & Ziskin, M. C. (2009). Millimeter wave effects on electrical responses of the sural nerve in vivo. *Bioelectromagnetics*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/bem.20547>
- Alekseev, S. I., & Ziskin, M. C. (1999). Effects of millimeter waves on ionic currents of Lymnaea neurons. *Bioelectromagnetics*, 20(1), 24-33.
- Alekseev, S. I., & Ziskin, M. C. (2009). Influence of blood flow and millimeter wave exposure on skin temperature in different thermal models. *Bioelectromagnetics*, 30(1), 52-58. <https://doi.org/10.1002/bem.20444>
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(17), 7915-7922. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.17.7915>
- Ayrapetyan, Sinerik, Moazezi, Z., & Seyed Mohammad Masood HOJJATI. (2008). Low Intensity

Millimeter Wave as a Potential Tool in Treatment of Diabetic Sensorymotor Polyneuropathy. *International Dental and Medical Disorders IS*.

- Bair, M. J., Robinson, R. L., Katon, W., & Kroenke, K. (2003). Depression and Pain Comorbidity : A Literature Review. *Archives of Internal Medicine*, *163*(20), 2433.
<https://doi.org/10.1001/archinte.163.20.2433>
- Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., & Julius, D. (2009). Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell*, *139*(2), 267-284. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.028>
- Beneduci, A., Chidichimo, G., De Rose, R., Filippelli, L., Straface, S. V., & Venuta, S. (2005). Frequency and irradiation time-dependant antiproliferative effect of low-power millimeter waves on RPMI 7932 human melanoma cell line. *Anticancer Research*, *25*(2A), 1023-1028.
- Beneduci, A., Cosentino, K., & Chidichimo, G. (2013). Millimeter Wave Radiations Affect Membrane Hydration in Phosphatidylcholine Vesicles. *Materials*, *6*(7), 2701-2712.
<https://doi.org/10.3390/ma6072701>
- Beneduci, A., Cosentino, K., Romeo, S., Massa, R., & Chidichimo, G. (2014). Effect of millimetre waves on phosphatidylcholine membrane models : A non-thermal mechanism of interaction. *Soft Matter*, *10*(30), 5559-5567. <https://doi.org/10.1039/C4SM00551A>
- Berryman, C., Stanton, T. R., Bowering, J. K., Tabor, A., McFarlane, A., & Moseley, L. G. (2013). Evidence for working memory deficits in chronic pain : A systematic review and meta-analysis. *Pain*, *154*(8), 1181-1196. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.03.002>
- Bulteau, A.-L., Szweda, L. I., & Friguet, B. (2006). Mitochondrial protein oxidation and degradation in response to oxidative stress and aging. *Experimental Gerontology*, *41*(7), 653-657.
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2006.03.013>
- Cann, R. L., Stoneking, M., & Wilson, A. C. (1987). Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature*, *325*(6099), 31-36. <https://doi.org/10.1038/325031a0>
- Chidichimo, G., Beneduci, A., Nicoletta, M., Critelli, M., De Rose, R., Tkatchenko, Y., Abonante, S., Tripepi, S., & Perrotta, E. (2002). Selective inhibition of tumoral cells growth by low power millimeter waves. *Anticancer Research*, *22*(3), 1681-1688.
- Chuyan, E., & Tribat, N. (2016). Changes in effector function of sensory peptidergic perivascular fibers after multiple exposures to low-intensity millimeter radiation. *Human Physiology*, *42*, 438-443. <https://doi.org/10.1134/S0362119716010072>
- Cortopassi, G. A., Shibata, D., Soong, N. W., & Arnheim, N. (1992). A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(16), 7370-7374.
- Cosentino, K., Beneduci, A., Ramundo-Orlando, A., & Chidichimo, G. (2013). The influence of millimeter waves on the physical properties of large and giant unilamellar vesicles. *Journal of*

- Biological Physics*, 39(3), 395-410. <https://doi.org/10.1007/s10867-012-9296-2>
- D'Agostino, S., Della Monica, C., Palizzi, E., Di Pietrantonio, F., Benetti, M., Cannatà, D., Cavagnaro, M., Sardari, D., Stano, P., & Ramundo-Orlando, A. (2018). Extremely High Frequency Electromagnetic Fields Facilitate Electrical Signal Propagation by Increasing Transmembrane Potassium Efflux in an Artificial Axon Model. *Scientific Reports*, 8(1), 9299. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27630-8>
- Debouzy, J.-C., Crouzier, D., Dabouis, V., Malabiau, R., Bachelet, C., & Perrin, A. (2007). Effets biologiques des rayonnements millimétriques (94 GHz). Quelles conséquences à long terme ? *Pathologie Biologie*, 55(5), 246-255. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2006.02.006>
- Di Donato, L., Cataldo, M., Stano, P., Massa, R., & Ramundo-Orlando, A. (2012). Permeability Changes of Cationic Liposomes Loaded with Carbonic Anhydrase Induced by Millimeter Waves Radiation. *Radiation Research*, 178(5), 437-446. <https://doi.org/10.1667/RR2949.1>
- Fall, A. K., Lemoine, C., Besnier, P., Sauleau, R., Dréan, Y. L., & Zhadobov, M. (2020). Exposure Assessment in Millimeter-Wave Reverberation Chamber Using Murine Phantoms. *Bioelectromagnetics*, 41(2), 121. <https://doi.org/10.1002/bem.22243>
- Favier, A. (2003). *Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique*. L'actualité chimique - novembre-décembre 2003
- Fine, P. G. (2011). Long-Term Consequences of Chronic Pain : Mounting Evidence for Pain as a Neurological Disease and Parallels with Other Chronic Disease States. *Pain Medicine*, 12(7), 996-1004. <https://doi.org/10.1111/j.1526-4637.2011.01187.x>
- Gapeyev, A. B., Lukyanova, N. A., & Gudkov, S. V. (2014). Hydrogen peroxide induced by modulated electromagnetic radiation protects the cells from DNA damage. *Central European Journal of Biology*, 9(10), 915-921. <https://doi.org/10.2478/s11535-014-0326-x>
- Geletyuk, V. I., Kazachenko, V. N., Chemeris, N. K., & Fesenko, E. E. (1995). Dual effects of microwaves on single Ca²⁺-activated K⁺ channels in cultured kidney cells *Vero*. *FEBS Letters*, 359(1), 85-88. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00002-Q](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00002-Q)
- Gibson, W., Wand, B. M., & O'Connell, N. E. (2017). Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) for neuropathic pain in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2021(3). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011976.pub2>
- Gonzalez-Hunt, C. P., Rooney, J. P., Ryde, I. T., Anbalagan, C., Joglekar, R., & Meyer, J. N. (2016). PCR-Based Analysis of Mitochondrial DNA Copy Number, Mitochondrial DNA Damage, and Nuclear DNA Damage. *Current Protocols in Toxicology*, 67(1). <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx2011s67>
- Haas, A. J., Le Page, Y., Zhadobov, M., Boriskin, A., Sauleau, R., & Le Dréan, Y. (2016). Impact of 60-GHz millimeter waves on stress and pain-related protein expression in differentiating

- neuron-like cells : TRPV Expression Under MMW Exposure. *Bioelectromagnetics*, 37(7), 444-454. <https://doi.org/10.1002/bem.21995>
- Habauzit, D., Le Quément, C., Zhadobov, M., Martin, C., Aubry, M., Sauleau, R., & Le Dréan, Y. (2014). Transcriptome Analysis Reveals the Contribution of Thermal and the Specific Effects in Cellular Response to Millimeter Wave Exposure. *PLoS ONE*, 9(10), e109435. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109435>
- HAIDER, Z., Nikolayev, D., DREAN, Y. L., ANGELIS, A. D., Liberti, M., Sauleau, R., & Zhadobov, M. (2021). Local Dosimetry at Cellular and Subcellular Level in HF and Millimeter-Wave Bands. *IEEE Journal of Microwaves*, 1(4), 1003-1014. <https://doi.org/10.1109/JMW.2021.3111965>
- HAS Haute Autorité de Santé. (2008). *Douleur chronique : Reconnaître le syndrome douloureux chronique, l'évaluer et orienter le patient Consensus formalisé*. HAS / Service des bonnes pratiques professionnelles/ Décembre 2008. https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2009-01/douleur_chronique_argumentaire.pdf
- INSERM. (2017) *Douleur · Inserm, La science pour la santé*. <https://www.inserm.fr/dossier/douleur/>
- Jensen, T. S., & Finnerup, N. B. (2007). Management of neuropathic pain. *Current Opinion in Supportive and Palliative Care*, 1(2), 126-131. <https://doi.org/10.1097/SPC.0b013e3282eeb45f>
- Kumar, S., Kesari, K. K., & Behari, J. (2010). Evaluation of genotoxic effects in male Wistar rats following microwave exposure. *Indian Journal of Experimental Biology*, 48(6), 586-592.
- Le Pogam, P., Le Page, Y., Habauzit, D., Doué, M., Zhadobov, M., Sauleau, R., Le Dréan, Y., & Rondeau, D. (2019). Untargeted metabolomics unveil alterations of biomembranes permeability in human HaCaT keratinocytes upon 60 GHz millimeter-wave exposure. *Scientific Reports*, 9(1), 9343. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45662-6>
- Logani, M. K., & Ziskin. (1996). Continuous millimeter-wave radiation has no effect on lipid peroxidation in liposomes. *RADIATIONRESEARCH*145,231-235.
- Pakhomov, A. G., Prol, H. K., Mathur, S. P., Akyel, Y., & Campbell, C. B. (1997a). Search for frequency-specific effects of millimeter-wave radiation on isolated nerve function. *Bioelectromagnetics*, 18(4), 324-334. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1521-186x\(1997\)18:4<324::aid-bem5>3.0.co;2-4](https://doi.org/10.1002/(sici)1521-186x(1997)18:4<324::aid-bem5>3.0.co;2-4)
- Pakhomov, A. G., Prol, H. K., Mathur, S. P., Akyel, Y., & Campbell, C. B. G. (1997b). Frequency-Specific Effects of Millimeter-Wavelength Electromagnetic Radiation in Isolated Nerve. *Electro- and Magnetobiology*, 16(1), 43-57. <https://doi.org/10.3109/15368379709016172>
- Pakhomov, A. G., Prol, H. K., Mathur, S. P., Akyel, Y., & Campbell, C. B. G. (1997d). Role of field intensity in the biological effectiveness of millimeter waves at a resonance frequency. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 43(1), 27-33. <https://doi.org/10.1016/S0302->

4598(97)00022-6

- Pikov, V., Arakaki, X., Harrington, M., Fraser, S. E., & Siegel, P. H. (2010). Modulation of neuronal activity and plasma membrane properties with low-power millimeter waves in organotypic cortical slices. *Journal of Neural Engineering*, 7(4), 045003. <https://doi.org/10.1088/1741-2560/7/4/045003>
- Poghosyan, G., Mikaelyan, M., Nerkararyan, A., & Vardevanyan, P. (2017). Effect of whole body extremely high frequency electromagnetic irradiation exposure on lipid peroxidation in rats. *Biologija*, 63(3). <https://doi.org/10.6001/biologija.v63i3.3578>
- Radziewsky, A., Gordiienko, O., Cowan, A., Alekseev, S. I., & Ziskin, M. C. (2004). Millimeter-Wave-Induced Hypoalgesia in Mice : Dependence on Type of Experimental Pain. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 32(4), 1634-1643. <https://doi.org/10.1109/TPS.2004.830972>
- Ramundo-Orlando, A. (2010). Effects of Millimeter Waves Radiation on Cell Membrane—A Brief Review. *Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves*, 31(12), 1400-1411. <https://doi.org/10.1007/s10762-010-9731-z>
- Ramundo-Orlando, A., Gallerano, G. P., Stano, P., Doria, A., Giovenale, E., Messina, G., Cappelli, M., D'Arienzo, M., & Spassovsky, I. (2007). Permeability changes induced by 130 GHz pulsed radiation on cationic liposomes loaded with carbonic anhydrase. *Bioelectromagnetics*, 28(8), 587-598. <https://doi.org/10.1002/bem.20343>
- Ramundo-Orlando, A., Longo, G., Cappelli, M., Girasole, M., Tarricone, L., Beneduci, A., & Massa, R. (2009). The response of giant phospholipid vesicles to millimeter waves radiation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1788(7), 1497-1507. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.04.006>
- Richter, C., Park, J. W., & Ames, B. N. (1988). Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(17), 6465-6467. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.17.6465>
- Romanenko, S., Harvey, A. R., Hool, L., Fan, S., & Wallace, V. P. (2019). Millimeter Wave Radiation Activates Leech Nociceptors via TRPV1-Like Receptor Sensitization. *Biophysical Journal*, 116(12), 2331-2345. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.04.021>
- Romanenko, S., Siegel, P. H., Wagenaar, D. A., & Pikov, V. (2014). Effects of millimeter wave irradiation and equivalent thermal heating on the activity of individual neurons in the leech ganglion. *Journal of Neurophysiology*, 112(10), 2423-2431. <https://doi.org/10.1152/jn.00357.2014>
- Romanenko, S., Siegel, P. H., Wagenaar, D. A., & Pikov, V. (2013). *Comparison of the effects of millimeter wave irradiation, general bath heating, and localized heating on neuronal activity in the leech ganglion* (G. J. Wilmink & B. L. Ibey, Éd.s.; p. 85850N).

<https://doi.org/10.1117/12.2006504>

- Safronova, V. G., Gabdoulkhakova, A. G., & Santalov, B. F. (2002). Immunomodulating action of low intensity millimeter waves on primed neutrophils. *Bioelectromagnetics*, *23*(8), 599-606.
<https://doi.org/10.1002/bem.10056>
- Siegel, P., & Pikov, V. (2010). Impact of low intensity millimetre waves on cell functions. *Electronics Letters*, *46*, s70-s72. <https://doi.org/10.1049/el.2010.8442>
- Sivachenko, I. B., Medvedev, D. S., Molodtsova, I. D., Panteleev, S. S., Sokolov, A. Yu., & Lyubashina, O. A. (2016). Effects of Millimeter-Wave Electromagnetic Radiation on the Experimental Model of Migraine. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, *160*(4), 425-428.
<https://doi.org/10.1007/s10517-016-3187-7>
- Szabo, I., Kappelmayer, J., Alekseev, S. I., & Ziskin, M. C. (2006). Millimeter wave induced reversible externalization of phosphatidylserine molecules in cells exposed in vitro. *Bioelectromagnetics*, *27*(3), 233-244. <https://doi.org/10.1002/bem.20202>
- Szabo, I., Manning, M. R., Radzievsky, A. A., Wetzell, M. A., Rogers, T. J., & Ziskin, M. C. (2003). Low power millimeter wave irradiation exerts no harmful effect on human keratinocytes in vitro. *Bioelectromagnetics*, *24*(3), 165-173. <https://doi.org/10.1002/bem.10077>
- Toblin, R. L., Mack, K. A., Perveen, G., & Paulozzi, L. J. (2011). A population-based survey of chronic pain and its treatment with prescription drugs. *Pain*, *152*(6), 1249-1255.
<https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.12.036>
- Vance, C. G., Dailey, D. L., Rakel, B. A., & Sluka, K. A. (2014). Using TENS for pain control : The state of the evidence. *Pain management*, *4*(3), 197-209. <https://doi.org/10.2217/pmt.14.13>
- Vlasova, I. I., Mikhailchik, E. V., Gusev, A. A., Balabushevich, N. G., Gusev, S. A., & Kazarinov, K. D. (2018). Extremely high-frequency electromagnetic radiation enhances neutrophil response to particulate agonists : MMWs Enhance Neutrophil Response to Agonists. *Bioelectromagnetics*, *39*(2), 144-155. <https://doi.org/10.1002/bem.22103>
- Wassermann, E., & Epstein, C. (2012). *The Oxford handbook of transcranial stimulation*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/oxfordhb/9780198568926.001.0001>
- Xu, S., Zhou, Z., Zhang, L., Yu, Z., Zhang, W., Wang, Y., Wang, X., Li, M., Chen, Y., Chen, C., He, M., Zhang, G., & Zhong, M. (2010). Exposure to 1800 MHz radiofrequency radiation induces oxidative damage to mitochondrial DNA in primary cultured neurons. *Brain Research*, *1311*, 189-196. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.10.062>
- Zhadobov, M., Nicolaz, C. N., Sauleau, R., Desmots, F., Thouroude, D., Michel, D., & Le Drean, Y. (2009). Evaluation of the Potential Biological Effects of the 60-GHz Millimeter Waves Upon Human Cells. *IEEE Transactions on Antennas and Propagation*, *57*(10), 2949-2956.
<https://doi.org/10.1109/TAP.2009.2029308>

Zhadobov, M., Sauleau, R., Le Drean, Y., Alekseev, S. I., & Ziskin, M. C. (2008). Numerical and Experimental Millimeter-Wave Dosimetry for *In Vitro* Experiments. *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques*, *56*(12), 2998-3007.
<https://doi.org/10.1109/TMTT.2008.2006797>

Zhao, R., Liu, Y., Liu, S., Luo, T., Zhong, G. Y., Liu, A., Zeng, Q., & Xin, S. X. (2020). Apoptosis-Promoting Effects on A375 Human Melanoma Cells Induced by Exposure to 35.2-GHz Millimeter Wave. *Technology in Cancer Research & Treatment*, *19*, 153303382093413.



Articles Scientifiques

Les ondes électromagnétiques en médecine : cas des ondes millimétriques.

Morgane LEBOSQ et Yves LE DREAN

Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) – UMR_S 1085, F-35000 Rennes, France.

Mots clés.

Champs électromagnétiques, ondes millimétriques, thérapie.

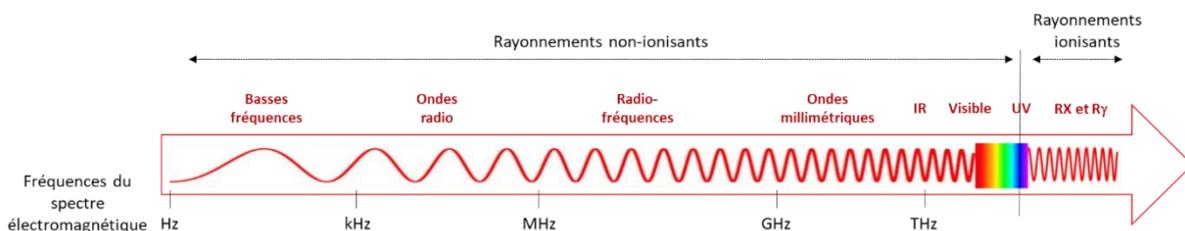
Electomagnetic field, millimeter waves, therapy.

Résumé.

L'idée d'utiliser les ondes électromagnétiques pour soigner est aussi vieille que leur découverte. Mis à part la radiothérapie utilisant les rayonnements ionisants pour soigner le cancer, ces pistes de travail sont souvent restées marginales et la médecine occidentale s'est plutôt spécialisée dans l'emploi de drogues et de produits pharmacologiques. Depuis, quelques décennies, le besoin de développer des méthodes alternatives a remis ces voies de recherche sur le devant de la scène et un certain nombre de pratiques sont maintenant utilisées dans le monde entier. Dans un premier temps, cet article donnera un aperçu des nombreuses applications qui jouent déjà un rôle clinique. Dans un second temps, nous présenterons le cas des ondes millimétriques dont les applications médicales ont été développées de façon empirique dans les années 1970 en Europe de l'Est. Nous présenterons spécifiquement l'impact de ces ondes sur la sensation de la douleur car ce domaine a été étudié plus en détail par les scientifiques.

1. L'emploi des champs électromagnétiques en médecine

Le spectre électromagnétique est large et va du champ statique à la lumière et même au-delà avec les UV et les rayonnements ionisants (voir figure ci-dessous).



Bien qu'il existe des applications médicales dans le domaine du visible et des rayonnements ionisants (la plus connue étant la radiothérapie pour soigner les cancers), cet article se concentrera sur les applications médicales utilisant des fréquences inférieures à celles du spectre visible. Nous nous focaliserons ainsi sur des applications sans doute moins connues du grand public, mais qui peuvent être appelées à se développer [pour revue, voir Mattsson & Simkó 2019]. Dans la gamme de fréquences allant de 0 Hz à 380 THz (début du visible), il existe de deux grands champs d'applications possibles : 1) l'utilisation des ondes à des fins de diagnostic, que nous ne verrons pas ; 2) l'utilisation des ondes à des fins thérapeutiques que nous présenterons succinctement.

La stimulation magnétique transcrânienne permet d'exciter certaines régions du cortex cérébral. Cette technique est non invasive car elle utilise des bobines externes placée contre le crâne. Le champ magnétique produit par ces bobines (champs statique, variable ou pulsé suivant les protocoles), induit un champ électrique interne, pouvant aller jusqu'à une dépolarisation neuronale. Le but étant d'activer, ou d'inhiber certaines régions cérébrales, en fonction du mode de stimulation choisi. Cette neuromodulation répétée aura un impact thérapeutique dans un grand nombre de maladies où le système nerveux central joue un rôle majeur. Aussi, cette technique a attiré une attention particulière de la part des neurologues, psychiatres et neuroscientifiques. Les applications majeures de cette thérapie se sont étendues au traitement de la dépression, de l'épilepsie, de troubles psychiatriques, de l'addiction, de la lutte contre la douleur et des soins après des accidents vasculaires cérébraux. Ce traitement présente l'avantage d'être bien toléré par les patients, et il présente très peu d'effets secondaires. L'effet indésirable le plus sérieux étant la survenue de crises d'épilepsie.

Les champs magnétiques d'extrême basse fréquence (de quelques dizaines à quelques centaines de Hz) sont quant à eux utilisés dans la guérison de plaies, en particulier pour la réparation des fractures osseuses. En général, ces champs sont appliqués sous forme de pulses. Les mécanismes d'action ne sont pas clairs, et plusieurs hypothèses tournant autour d'une éventuelle polarisation électrique ou d'une modification des flux calciques cellulaires ont été avancées. Cependant des résultats intéressants ont été obtenus par de nombreuses équipes indépendantes et aux USA, la FDA (*Food and Drug Administration*) a approuvé ce traitement pour soigner les fractures non consolidées, en particulier celles qui présentent des retards de régénération avec des méthodes conventionnelles.

Parmi les propriétés des ondes électromagnétiques non ionisantes, les effets thermiques peuvent avoir un intérêt fort pour des protocoles thérapeutiques. Dans le domaine des radiofréquences, l'oscillation du champ électrique peut induire la rotation des molécules d'eau libres, ce qui occasionne des frictions moléculaires et donc un dégagement de chaleur. Cette élévation de température peut dépasser les niveaux physiologiques (ou parle alors d'hyperthermie), et suivant les conditions, elle peut même être suffisamment élevée pour induire la mort cellulaire. Si la région cancéreuse n'est pas trop grande, on peut ainsi provoquer la coagulation et la nécrose des tissus tumoraux, ce qui correspond à une ablation de la tumeur [Rao et al., 2010]. Plusieurs protocoles existent et en général, l'ablation par radiofréquences nécessite d'introduire

une électrode en forme d'aiguille dans la tumeur. Des alternatives moins invasives existent et des techniques ont été mises au point, où les sondes insérées dans la tumeur peuvent être supprimées grâce à l'emploi de nanoparticules métalliques. Ces nanoparticules sont administrées localement et leur présence au niveau de la tumeur permet un chauffage par effet joule, via l'application d'un champ électromagnétique externe de type radiofréquences [Rejinold et al., 2015]. L'ablation par radiofréquences est généralement considérée comme un traitement de choix pour les patients ayant des tumeurs difficilement opérables, où ne répondant pas à une radiothérapie classique.

L'ablation par hyperthermie n'est pas la seule approche utilisant des fréquences du spectre électromagnétique pour lutter contre le cancer. Parmi celles-ci, on peut aussi citer l'électroporation. Le but de cette technique est d'utiliser des pulses de forte intensité de champs électrique, afin de perforer les membranes cellulaires [Breton & Mir, 2012]. Deux principales stratégies sont possibles : 1) la formation de pores dans les membranes peuvent servir pour adresser des médicaments anticancéreux pénétrant difficilement par eux-mêmes dans les cellules. En France, Mir et son équipe ont été les premiers à combiner ces impulsions électriques perméabilisantes avec la bléomycine, une toxine utilisée en chimiothérapie et qui a la capacité de tuer sélectivement les cellules en division, sans nuire aux tissus environnants normaux. 2) en modifiant les paramètres de pulses, on peut réaliser une électroporation irréversible qui provoque une perméabilisation permanente des cellules, entraînant leur mort.

D'autres applications thérapeutiques sont en développement. Des essais sont effectués dans certains laboratoires pour explorer l'impact des champs électromagnétiques pulsés sur le système immunitaire. Dans un domaine non médical, les effets thermiques des radiofréquences peuvent être aussi recherchés dans un but purement esthétique, puisque des appareils utilisant ces ondes sont maintenant disponibles pour réaliser des épilations ou des lipolyses.

2. Le cas des ondes millimétriques

L'utilisation des ondes millimétriques dans le domaine médical n'est pas nouvelle puisqu'elle était utilisée dans les années 1970 en ex-URSS. Ces applications étaient utilisées de manière empirique pour plus de 50 pathologies, telles que le traitement de maladie de peau, de maladies gastro-intestinales, cardiovasculaires, psychiques, de cicatrisation ou encore de cancer [Pakhomov et al, 1998 ; Rojavi & Ziskin 1998]. Plus de 3 millions patients ont été traités avec cette thérapie avec une efficacité de traitement entre 60 et 95% selon la maladie [Betski, 2000]. Malgré ce succès apparent, ces thérapies n'ont pas été utilisées en occident. Il faut dire que les études réalisées à l'époque sont rédigées pour la grande majorité en russe, sans traduction, et ne sont pas facilement disponibles. Les changements géopolitiques induits par la chute du mur de Berlin ont permis de meilleures communications entre scientifiques de l'Est et de l'Ouest, et ces échanges ont remis en avant les effets des ondes millimétriques sur le vivant. Ce n'est qu'en 1988, que Pakhomov et son équipe réalisèrent une revue détaillée des publications russes sur le sujet [Pakhomov et al, 1998]. A cela s'ajoute le manque d'explication au niveau du mécanisme biologique, et le peu d'essais cliniques

contrôlés en double-aveugle qui n'ont pas convaincu les chercheurs et médecins occidentaux. La diversité des pathologies pouvant être soignées par des expositions aux ondes millimétriques laisse songeur, et n'a pas favorisé la crédibilité de ce traitement. Néanmoins parmi cette pléiade d'effets, seul l'effet analgésique peut être ressorti du lot, car relié à une littérature scientifique de qualité, qui met en avant des effets qui semblent réels mais encore mal caractérisés.

La thérapie utilisant les ondes millimétriques est une technique non invasive qui consiste en une exposition locale de la région douloureuse pendant 15 à 30 min, en utilisant 3 principales fréquences autour de 42.2 ; 53.6 et 61.2 GHz. Les puissances utilisées sont assez faibles, à la limite des effets thermiques, c'est-à-dire aux alentours de 10 mW/cm². Ce traitement a été décrit comme efficace dès les premières séances. Il peut raccourcir d'un facteur 1,5 à 2 le processus de guérison. L'exposition à ces puissances n'entraîne que de très faibles effets secondaires, et lors des essais cliniques, n'ont été rapportés que de légers maux de tête, des variations transitoires de la pression artérielle, des éruptions prurigineuses locales au niveau du site d'exposition ou une légère augmentation de la température corporelle [Rojavin & Ziskin 1998]. Fin des années 1990 et début des années 2000, l'équipe de Ziskin aux USA s'est intéressée aux mécanismes sous-jacents aux effets analgésiques. Ils vérifièrent la véracité et la reproductibilité de ces effets, à la fois chez des modèles animaux [Rojavin et al., 2000 ; Radvieski et al., 2001], mais aussi chez l'humain [Radzievsky et al., 1999]. D'autres équipes ont mené des études cliniques en double aveugle, confirmant les effets anti-douleurs [Usichenko et al., 2003], même si un effet placebo ne peut être encore totalement écarté [Partyla et al., 2017]. En utilisant des paramètres d'expositions se calquant sur les conditions empiriques utilisées en ex-URSS, l'équipe de Ziskin démontra que les effets hypoalgésiques optimaux sont obtenus pour des fréquences aux alentours de 60 GHz et pour des densités de puissance d'incidence comprises entre 5 et 15 mW / cm², ce qui induit une légère augmentation de température en surface de la peau (de 1.5 à 3°C), sans endommager les tissus [Ziskin, 2006 ; Radzievsky et al., 2008]. L'effet analgésique dépend de la puissance et n'est pas observé pour des densités de puissance inférieures à 0,5 mW/cm² qui ne génèrent pas de chaleur [Rojavin et al., 2000]. Une augmentation de température semble donc nécessaire pour induire l'effet analgésique mais elle ne constitue pas la seule composante, car le chauffage *via* un rayon laser est sans effet [Radzievsky et al., 2004a]. Cette observation laisse penser que le pouvoir pénétrant des ondes millimétriques, bien que limité, est sans doute primordial. L'utilisation d'une fréquence précise autour de 60 GHz permet sans doute de déposer l'énergie thermique à la bonne profondeur dans la peau, permettant ainsi l'activation de cibles cellulaires, et ceci sans apporter d'excès de chaleur et donc sans douleur.

Le mécanisme précis impliqué dans l'effet des ondes millimétriques sur la suppression de la douleur est encore mal défini mais plusieurs hypothèses sont émises. Vu que les ondes millimétriques à 60 GHz ne pénètrent que très peu dans l'organisme (moins d'un millimètre), elles sont principalement absorbées par la peau. La peau n'est pas isolée du reste de l'organisme et une activation à ce niveau peut générer un signal, soit via la libération de molécules dans la circulation sanguine, soit via l'activation du système nerveux périphérique. Des études menées chez l'animal ont montré que le système nerveux périphérique et central pourraient être impliqués [Radzievsky et al., 2001 et 2008]. Ces travaux montrent que le traitement hypoalgésique est plus efficace s'il est appliqué sur des régions du corps possédant une concentration plus élevée en

terminaisons nerveuses. Par ailleurs, la dénervation de ces zones diminue l'efficacité du traitement [Lysenyuk et al., 2000]. De plus, l'utilisation de naloxone, un antagoniste non sélectif des récepteurs opioïdes supprime l'action antidouleur [Radzievsky et al., 2004b]. Ainsi, un des mécanismes possibles est la transduction neuronale du signal via la stimulation des terminaisons nerveuses libres. Le signal serait ensuite transmis jusqu'au système nerveux central, ce qui aurait comme conséquence de moduler la sécrétion d'opioïdes endogènes qui serait à l'origine des effets analgésiques [Radzievsky et al, 2008]. Ce mécanisme est plausible, cependant, de nombreuses interrogations restent encore en suspens : quels sont exactement la ou les cellules cibles au niveau de la peau ; quel est le senseur ; quels opioïdes sont impliqués ; quelle(s) zone(s) du cerveau est stimulée(s) et quelle est l'ampleur de la réponse dans cet organe ? Des investigations supplémentaires restent clairement nécessaires pour élucider les mécanismes. Néanmoins, l'utilisation de cette thérapie est relancée en France, avec de nouveaux tests cliniques en cours.

Conclusion

Les traitements médicaux employant des champs électromagnétiques non ionisants sont nombreux et variés. Cependant, ils ne sont pas encore très largement utilisés et en général, ils ne remplacent pas les méthodes conventionnelles qui sont souvent appliquées en priorité. A l'heure actuelle, l'usage des ondes est plutôt vu comme une méthode alternative ou complémentaire, quand justement les traitements conventionnels posent problème. Néanmoins, de grand progrès ont été réalisés ces dernières années et le recours à ces alternatives commencent à entrer dans les mœurs. Le principal frein à l'acceptation de ces méthodes a souvent été le manque d'explications scientifiques permettant de comprendre les effets de ces champs électromagnétiques. Certains mécanismes commencent à émerger, même si tout n'a pas encore été éclairci. On peut gager qu'avec le temps, les mises au point empiriques permettront de gagner en efficacité et que la découverte des mécanismes cellulaires et physiologiques sous-jacents rendra possible de nouvelles améliorations.

Références :

BETSKII O.V., DEVYATKOV N. D., KISLOV V.V. (2000) "Low-intensity Millimeter Waves in Biology and Medicine" *Crit Rev Biomed Eng.*; n°28, pp.247-68

BRETON M & MIR LM. (2012). "Microsecond and nanosecond electric pulses in cancer treatments", *Bioelectromagnetics*. N°33, pp.106-23.

MATTSSON MO & SIMKO M (2019) "Emerging medical applications based on non-ionizing electromagnetic fields from 0 Hz to 10 THz", *Medical Devices: Evidence and Research*, n°12, pp.347–368

PAKHOMOV A.G., AKYEL Y., PAKHOMOVA O.N., STUCK B.E., MURPHY M.R. (1998) "Current State and Implications of Research on Biological Effects of Millimeter Waves: A Review of the Literature", *Bioelectromagnetics* , n°19, pp.393–413

PARTYLA T., HACKER H., EDINGER H., LEUTZOW B., LANGE J., USHOCHENKO T. (2017) "Remote Effects of Electromagnetic Millimeter Waves on Experimentally Induced Cold Pain: A Double-Blinded Crossover Investigation in Healthy Volunteers", *Anesth. Analg.*, vol. 124, no. 3, pp. 980–985,

RADZIEVSKI A., ROJAVIN M.A., ZISKIN M.C. (1999) "Suppression of pain sensation caused by millimeter waves: a double blind, crossover, prospective human volunteer study", *Anesthesia and Analgesia*; n°88, pp.836

RADZIEVSKY A.A., ROJAVIN M.A., COWAN J., ALEKSEEV S.I., RADZIEVSKY A.A.Jr, ZISKIN M.C. (2001) "Peripheral neural system involvement in hypoalgesic effect of electromagnetic millimeter waves", *Life Sciences*, n°68, pp.1143–1151.

RADZIEVSKY A.A., GORDIJENKO O.V., COWAN A., ALEKSEEV S.I., ZISKIN M.C. (2004a) "Millimeter wave induced hypoalgesia in mice: Dependence on type of experimental pain", *IEEE Trans Plasma Sci* n°32, pp.1634–1643.

RADZIEVSKY A.A., GORDIJENKO O.V., SZABO I., ALEKSEEV S.I., ZISKIN M.C. (2004b) "Millimeter Wave-Induced Suppression of B16F10 Melanoma Growth in Mice: Involvement of Endogenous Opioids", *Bioelectromagnetics*, n°25, pp.466–473.

RADZIEVSKY A.A., GORDIJENKO O.V., ALEKSEEV S.I., SZABO I., COWAN A., ZISKIN M.C., (2008) "Electromagnetic millimeter wave induced hypoalgesia: frequency dependence and involvement of endogenous opioids", *Bioelectromagnetics*.n°29, pp.284-95

RAO W, DENG Z-S, LIU J. (2010) "A review of hyperthermia combined with radiotherapy/chemotherapy on malignant tumors" *Crit Rev Biomed Eng*. N°38(1), pp:101–116.

REJINOLD NS, JAYAKUMAR R, KIM YC. (2015) "Radiofrequency responsive nano-biomaterials for cancer therapy", *J Control Release*. N°204, pp.85–97.

ROJAVIN M.A., ZISKIN M.C., (1998) "Medical application of millimeter waves", *Q. J. Med.*, n°91, pp.57–66.

ROJAVIN M.A., RADZIEVSKY A.A., COWAN A., ZISKIN M.C., (2000) "Pain relief caused by millimeter waves in mice: results of cold water tail flick tests", *Int. J. Radiat. Biol*, n°76, pp. 575–579.

USICHENKO T.I., IVASHKIVSKY O., GIZHKO G., (2003) " Treatment of rheumatoid arthritis with electromagnetic millimeter waves applied to acupuncture points—a randomized double blind clinical study", *Acupunct. Electrother. Res.*, vol. 28, n°1–2, pp. 11–18.

ZISKIN M. (2006) "Physiological mechanisms underlying millimeter wave therapy" *BIOELECTROMAGNETICS Current Concepts* pp. 241-251

ZISKIN M.C. (2013) "Millimeter waves: Acoustic and electromagnetic" *Bioelectromagnetics.*; n°34, pp. 3–14.

Assessment of oxidative stress in keratynocytes cells under exposure to millimeter waves

Morgane Lebosq^{1,2}, Catherine Martin¹, Rémy Le Guével³, Maxim Zhadabov⁴, Yves Le Dréan¹

Affiliation :

¹Univ Rennes 1, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) – UMR_S 1085, F-35000 Rennes, France.

²Remedee labs, 35 Chemin du Vieux Chêne, 38240 Meylan

³ImPACcell, SFR Biosit, Univ Rennes, Rennes, France

⁴Institut d'Electronique et des Technologies du numéRique (IETR), UMR CNRS 6164, University of Rennes 1, Campus de Beaulieu, 263 avenue du Général Leclerc, 35042 Rennes Cedex, France.

Abstract

Millimeter-waves (MMW) are increasingly used for wireless communications, as well as for biomedical purposes. To get an insight into the potential biological impacts of these radiations, we investigated their impact on the HaCaT keratinocyte cell line. We studied 60 GHz MMW at 15 mW/cm² which corresponds to the parameters used during analgesic therapies, for 1 hour and 24 hours. We first verified whether these MMW induce heat stress and stimulate production of HSP70. Then, we analyzed the level of oxidative stress by examining the overproduction of ROS or their impact on cellular lipids and proteins. We found no significant changes in HSP70 levels, suggesting that MMW exposure does not cause heat stress. We also did not find increases in reactive oxygen species (ROS) levels after 1 or 24 hours of exposure. While we did not detect any changes in the oxidation of proteins or lipids after 1 hour of exposure, we observed a decrease in intracellular oxidized lipids and an increase in extracellular oxidized lipids after 24 hours. This suggests an elimination of oxidized molecules by the cells which could be caused by an excretion phenomenon. In summary, no significant deleterious effects were found after exposure of HaCaT cells to MMW at 60 GHz, 15 mW / cm², for 1 hour or 24 hours.

Introduction

Pain is the cause of nearly two-thirds of medical consultations [INSERM 2016]. Treatment of pain in adults relies mainly on analgesic drugs such as paracetamol or opioids. Effective against acute pain, these drugs have significant side effects if used for a prolonged period. In order to improve pain management, various complementary non-pharmacological analgesic techniques are being researched, particularly in the area of electromagnetic field therapy. This includes pulsed electromagnetic field (PEMF) therapy [Alzayed, 2020], transcutaneous neurostimulation [TENS, Sluka and Walsh, 2003], percutaneous electrical nerve stimulation [PENS, Ghoname et al. 1999], or millimeter wave (MMW) exposure [Pakhomov 1998, Ziskin, 2013].

MMW are electromagnetic waves in the frequency range of 30 to 300 GHz, corresponding to the upper part of the microwave spectrum. Mainly used in Eastern European countries MMW therapy is a non-invasive technique used to treat many conditions such as cardiovascular diseases, cancer and diabetes, and it is especially used for pain relief [Rojavin and Ziskin, 1998; Ziskin, 2013]. The analgesic effect was optimized at a frequency of 61.22 GHz with an incident power density between 10 and 15 mW/cm² [Radzievsky, 2008]. At this power level heating of the tissues is induced, and Ziskin and collaborators have shown that an increase in temperature is necessary to induce an analgesic effect. However, the mechanism does not seem to be purely thermal since the analgesic effects are not reproduced by equivalent laser heating [Radzievsky, 2004]. MMW are thought to allow thermal energy to be focused at a certain depth of the skin without bringing excess heat to the surface and without harming the surrounding tissues [Alekseev et al., 2012]. The effects of MMW are not yet well understood, but an activation of the peripheral nervous system, followed by activation of the central nervous system, is suspected. Indeed, denervation of exposed areas as well as the use of non-selective opioid receptor antagonists significantly reduced the analgesic effect of MMW [Radzievsky et al. 2001 and 2008].

However, the use of electromagnetic waves in the health sector is not trivial and raises the question of their safety. The majority of studies carried out on this topic have examined the effects of radiofrequencies used in telecommunications. One of the main complaints against radiofrequencies are their potential oxidative effects. The literature on this topic is abundant but contradictory. The use of various frequencies and power levels across different studies complicates the analysis of the potential effects of electromagnetic field. Moreover, the impact of exposure seems to depend on the cell type and the model used [Dasdag and Akdag, 2016]. Regarding specific MMW frequencies, very few articles have reported their effect on oxidative stress and the few published results available are contradictory. While some studies show an increase in ROS production for electromagnetic fields with wavelengths close to millimeter ranges [Safronova et al. 2002, Vlasova et al. 2018], others do not detect any direct effect on free radical production [Lantow et al. 2006a; Lantow et al. 2006b; Zeni et al. 2007; Sannino et al. 2009] or impact on the macromolecules of the cells, in particular lipid oxidation [Logani and Ziskin, 1996]. Some studies even found that electromagnetic wave exposure caused a decrease in ROS production in some cases [Gapeyev et al, 1997].

Given the increase in medical applications of MMW and the potential for novel biomedical utilizations, it has become essential to study the impact of MMW on oxidative stress and its consequences on human keratinocytes, which are the main cellular target of these treatments. Note that MMW are not only used for their analgesic effect, but other biomedical applications are in progress such as breast and skin cancer detection [Iliououlos et al 2020; Mansutti et al 2020]. In the present work, we studied the impact of MMW (60 GHz, 15 mW/cm²) for a short (1 hour) or a prolonged (24 hours) exposure on oxidative stress induction. In this context, we first assessed the increase in ROS production, then we analyzed the impact of ROS on different cellular macromolecules.

Results

Analysis of the thermal effect

We first studied whether MMW exposure at 15 mW/cm² caused any increase in temperature. The cells were grown in an incubator with the temperature set at 33.5 (+/- 0.4) °C, which corresponds to the typical temperature at the skin surface. As measured in 4 independent experiments, a temperature increase of 3.4°C was recorded in the culture medium within 30 minutes of exposure (36.9 +/- 0.4°C – Fig 1A and 1B). We therefore included a thermal control (TC), in which the temperature of the incubator was increased in order for the cell culture medium to reach 36.9°C, but without MMW exposure (Fig 1A and 1B). Although this temperature increase remains within a physiological range, we checked if it could induce a cellular heat shock response. To that end, RNA expression of the stress-inducible chaperone HSP70 (heat shock protein 70 kiloDalton) was assessed by RT-qPCR. As a positive control, cells were incubated at 43°C which induced a significant increase in the expression of this gene. However, we did not observe any difference in HSP70 messenger expression between SHAM (no MMW exposure, cells at 33.5°C), EXPO (MMW exposure, cells at 36.9°C) and TC (no MMW exposure, cells at 36.9°C) conditions, after 1 hour (Fig. 1C) or 24 hours (Fig. 1D). These data indicate that the slight temperature increase under MMW exposure is not strong enough to induce a proteotoxic stress at cellular level.

Impact of MMW on ROS and H₂O₂ production

We analyzed the intracellular ROS production after 1 hour or 24 hours of MMW exposure. Using a ROS-specific fluorescent labelling coupled with microscopy analysis, we did not find any statistically significant increase in the production of intracellular ROS between sham, thermal control and MMW exposed cells (Fig. 2A and 2B). However, positive controls using cells treated with hydrogen peroxide (H₂O₂, 0.5 mM for 2h) or glucose oxidase (GO 0.005 UI/mL for 24h) showed clear increases in intracellular ROS, thus validating our protocol (Fig. 2C). However, ROS production is a very dynamic process; ROS have a very short half-life and can either be quickly removed or altered by reacting with other molecules.

As H₂O₂ can be produced by cells with impaired redox balance, we quantified its production following MMW exposure. H₂O₂ is one of the ROS with the longest half-life which facilitates its dosage using an assay based on peroxidase activity. Since this molecule passes through biological membranes [Bienert et al. 2006], we quantified its presence within two compartments: the intracellular compartment where H₂O₂ is produced (intracellular H₂O₂ in Fig. 3 left panel) and the extracellular compartment, i.e. the culture medium where H₂O₂ is excreted and could accumulate in our *in vitro* model (extracellular H₂O₂ in Fig. 3 right panel). HaCaT cells were exposed to MMW using the same conditions than those used to measure ROS (Fig2). For short (1 hour) and long (24 hours) exposures, we did not find any statistically significant increase in the concentration of intracellular (Fig. 3A, 1 hour, Fig. 3C, 24 hours), or extracellular (Fig. 3B, 1 hour, and Fig.3 D, 24 hours) H₂O₂, compared to the sham or the thermal control. As a positive control, we exposed the cells to glucose oxidase (GO) for 6 hours. ; GO leads to the oxidation of glucose which indirectly produce hydrogen peroxide. GO treatment induced a significant increase in extracellular H₂O₂ concentration (Fig. 3F), which validates our H₂O₂ detection protocol. Interestingly, GO treatment caused a significant decrease in the intracellular H₂O₂ concentration (Fig. 3E). It is possible that GO activates the intracellular antioxidant system of the cell to a greater extent than basal level [Cholia et al, 2017].

Impact of MMW exposure on protein oxidation

Protein oxidation is defined as chemical modifications (mainly on the amino acid side chains) induced either directly by ROS, or indirectly by reaction with secondary by-products of oxidative stress. The most common products of protein oxidation in biological samples are protein carbonyl derivatives. Therefore, we quantified protein carbonyl intracellular concentrations after MMW exposure of cells. As shown in Fig. 4A, an acute and short exposure (1 hour) has no impact on the level of carbonyl proteins produced. Following a 24 hour-exposure, we did not notice a significant effect with either of the different conditions (Fig. 4B). We recorded a slight decrease after 24 hours of MMW exposure, but the difference compared to the SHAM was not significant (Mann-Whitney test, N = 4, p-value = 0.057). As described above, positive controls were included to validate the methodology used. Cells treated with hydrogen peroxide (0.5mM, during 2 hours) or glucose oxidase (0.05 U/mL, 24h), displayed an important and significant increase in protein carbonyl concentration (Fig. 4C).

Impact of MMW exposure on lipid oxidation

As a result of oxidation, fatty acids are peroxidized and break down into reactive compounds such as malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal (4-HNE). Therefore, we quantified the level of these products after 1 or 24 hours of exposure to MMW. Using immunofluorescence to detect 4-HNE, we did not observe any differences in the production of 4-HNE after 1 hour of exposure (Fig. 5A). However, after 24 hours, a decrease in the concentration of 4-HNE was found in the exposed cells. This effect was not caused by heating alone (Fig. 5B). We also observed a significant increase of 4-HNE levels in response to exposure to the oxidizing agents H₂O₂ (0.5 mM, 2h) or GO (0.05 UI/mL for 6h) (Fig. 5C).

Finally, lipid peroxidation was studied by measuring the level of malondialdehyde (MDA) concentration. MDA was quantified with the TBARS kit which allows visualization of both intracellular and extracellular levels. After 1 hour of exposure, the concentration of intracellular MDA remained stable, at approximately 70 nM for the different conditions (SHAM, EXPO and TC; Fig. 6A). However, after 24 hours of exposure to MMW, a significant decrease in the intracellular concentration of MDA was found compared to the untreated cells with 96.8 nM \pm 13.2 compared to 170.7 nM \pm 20.9 for EXPO and SHAM, respectively, i.e. a decrease by a factor of 0.56. This difference was not found by heating alone (TC; Fig. 6B). The use of chemical treatments, namely H₂O₂ at 0.5 mM for 2 hours and GO at 0.05 U/mL for 24 hours, induced a significant increase in the intracellular concentration of MDA (Fig. 6CD). The effect of MMW on extracellular MDA content was also assayed. After 1 hour of exposure, there were no significant differences in the concentration of extracellular MDA between the different conditions (Figure 7A). After 24 hours of exposure, a significant increase (1.3-fold) in the concentration of extracellular MDA was observed in the MMW exposed condition compared to the SHAM control. This increase was not found in the thermal control (TC, Figure 7B). Moreover, extracellular MDA concentrations were 4.8 times higher than intracellular levels suggesting that MDA detoxification occurs by excretion. Together, these results suggest that sustained MMW exposure induces efficient export of MDA out of the cells. Treatment with 0.5 mM H₂O₂ for 2 hours and with 0.05 U/mL GO for 24 hours induced significant increases in the extracellular concentration of MDA (2.1- and 2.5-fold, respectively).

The total MDA amounts after 1 hour and 24 hours of exposure were calculated. The average total MDA concentrations did not differ across all conditions after 1 hour (Fig. 8A 14.94 \pm 1.89 pmol, 16.27 \pm 0.75 pmole and 14.87 \pm 1.05 pmole for SHAM, EXPO and TC, respectively) or 24 hours (Fig. 8B 97,07 \pm 18,94 pmol, 116,92 \pm 12,53 pmole and 97,47 \pm 24,35 pmole for SHAM, EXPO and TC, respectively). While, the total MDA amounts after chemical treatments (H₂O₂ or GO) were multiplied by a factor of 2.25 (Fig. 8C and 8D). These results suggest that MMW do not increase the concentration of MDA and therefore do not increase the lipid oxidation, but rather promote the elimination of the peroxidized lipids, maybe by a phenomenon of excretion.

Discussion

In this study, we investigated the oxidizing potential of MMW on keratinocytes. We found that MMW at 60 GHz and at a power density of 15 mW / cm² induce an increase of temperature (3.4 \pm 0.4 ° C). Since this temperature increase can impact cell metabolism, we included a thermal control (TC) in all the experiments to tease out the impact of temperature. We have shown that the increase in temperature caused by MMW exposure or sole heating is not sufficient to induce overexpression of the HSP70 gene involved in heat stress. This suggests that the increase in temperature caused by MMW exposure remains within physiological range and does not stress the cells. This result is in agreement with the literature which shows that, in absence of heat shock, MMW do not induce proteotoxic stress [Szabo et al. 2003, Habauzit et al. 2014]. We then analyzed the effect of MMW on the overproduction of ROS and H₂O₂. As the impact of electromagnetic exposure on the balance of ROS production and

elimination can be a very dynamic process (Vlasiva et al. 2018), we performed the analyses after a short (1 hour) or longer (24 hours) exposure. At both time points the production of ROS and H₂O₂ was unchanged. Due to their high reactivity, ROS can attack several biological targets such as DNA, lipids or proteins. Therefore, we analyzed the potential damage caused by ROS by studying oxidized cellular macromolecules.

The analysis of carbonylated proteins after 24 hours of exposure to MMW, revealed a decrease in the intracellular concentration of protein oxidation, although this did not reach statistical significance. This effect was not reproduced by heating alone. To our knowledge, no prior studies have been performed on the effect of MMW on protein oxidation. In the field of radiofrequencies, Marjanovic Cermak and his team [2018] showed an increase (1.38-fold) in carbonyl proteins after 30 minutes of exposure at 1.8 GHz, in SH-SY5Y neural cells. After 60 minutes of exposure, the effect was less pronounced (1.15-fold increase). However, the same experiments performed on mouse fibroblasts, by the same group, did not show a significant increase in carbonyl proteins [Marjanovic Cermak et al. 2017]. The biological effects thus seem to depend on the cell model used and on the ability of cells to detect and eliminate oxidized proteins formed. A similar phenomenon could be happening in our experimental conditions, naturally oxidized proteins may be eliminated more efficiently in response to MMWMMW exposure. Further experiments are required to explore this hypothesis.

To assay lipid oxidation, we analyzed intracellular 4-HNE and MDA concentrations and did not find any changes after 1 hour of MMW exposure. This observation is in accordance with the study of Logani et al [1996] that did not find any alteration in the oxidation of lipids after 1 hour of exposure at frequencies of 53.6, 61.2 and 78.2 GHz. However, after 24 hours, we found significant decreases in the intracellular concentrations of 4-HNE and MDA. This effect was not observed in the heated control, suggesting that it is specific to electromagnetic exposure. In addition, we found a significant increase in extracellular MDA concentration in cells exposed to MMW for 24 hours, this was not seen in the thermal control. The MDA increase measured in the medium corresponds exactly to the reduction observed inside the cells, suggesting that the net amount of oxidized lipids after 24 hours of MMW exposure is unchanged. This suggests that MMW induce a difference in the distribution between intra and extracellular pools of oxidized lipids. This situation is very different from that observed with oxidative stress induced by treatments with glucose oxidase or H₂O₂ which generate a greater level of total MDA. The effect of MMW may be explained by changes in the permeability of the plasma membrane. Indeed, several studies have reported that exposure to MMW can affect the cell membrane, in particular leading to changes in fluidity and permeability; the underlying mechanism has not been determined [Zhadobov et al. 2015; Ramundo-Orlando 2007 and 2009, Phelan et al 1992]. We hypothesize that MMW exposure alters the permeability of the plasma membrane and consequently facilitates the elimination of oxidized lipids through excretion into the extracellular environment. This observation is consistent with the study of Le Pogam et al., (2019), showing a unique modification of the extracellular metabolome profile upon MMW exposure.

In summary, our experiments demonstrated that MMW exposure does not cause an increase in the production of ROS, or of the amounts of oxidized proteins or lipids. These results suggest that an acute exposure of less than 24 hours, without an important rise in temperature, does not induce significant oxidative stress in the cells. If MMW can trigger an oxidative insult, it is likely minimal and does not exceed the cellular capacity to repair and maintain homeostasis. In addition, our data show a slight decrease in the level of oxidized proteins and lipids within the cell. Exposure to MMW may potentiate the elimination of oxidized molecules by dedicated repair systems. Additional experiments are needed to confirm these observations and elucidate their underlying mechanisms.

Materials and methods

Cell culture

Due to the low penetration of MMW into biological tissues, we used skin cells as a model. The HaCat human keratinocyte cell line was cultured as previously described [Le Pogam et al., 2019]. The cells were cultured at 33.5 °C, which corresponds to the temperature at the surface of human skin [Bierman, 1936]

In order to be as reproducible as possible, the cells were seeded the day before the experiments. 7,000 and 5,000 cells were seeded in a 96-well plate, for 1 hour and 24 hours of treatment, respectively. When using a 6-well plate, 200,000 and 100,000 cells were seeded for 1 hour and 24 hours of treatment, respectively. Thus, the cells reached about 70-80% confluence at the end of each experiment.

Exposure system and dosimetry

The MMW exposure system used was described in detail in [Zhadobov et al., 2009]. Briefly, the cell culture plate was placed directly in a Memmert UN55 incubator containing a pyramidal horn antenna. The antenna was linked to a Quinstar generator operating at 60.4 GHz. Cells were irradiated (EXPO) or not (SHAM) from 1 to 24 hours, with an incident power density of 15 mW/cm², according to dosimetry described in [Zhadobov et al., 2009]. To avoid variability due to culture conditions, SHAM and exposed plates were placed in the same incubator in the exact same position, on the same day, or one day apart depending on the exposure time (1h or 24 h). To this general exposure protocol, only one exception was made. Indeed for ROS detection, timing is crucial, so it is important to perform SHAM and EXPO at the very same time. So in this case, we performed SHAM and exposure experiments in two different incubators set at the same temperature. To monitor the thermal effects caused by the 15 mW/cm² exposures, temperature measurements were made in the medium in direct contact with the cells as well as in the incubator during the exposures, using a fiber optic thermometer (NEOPTIX).

RNA extraction and RT-qPCR

Total RNA was extracted using the "NucleoSpin® RNA" kit (MACHEREY-NAGEL), according to the manufacturer's protocol. The amount and quality of RNA was estimated by the "Nanodrop 8000" spectrophotometer (Thermo Fisher). Reverse transcription was performed using QuantiTect reverse transcription (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Quantitative PCR was performed using the "CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System" (Bio-Rad). The relative expression values were calculated based on the CT values and the $\Delta\Delta C_t$ method was used to analyze the difference in gene expression between different conditions [Livak and Schmittgen, 2001]. The primer sequences used in this study are indicated below (table 1). The expression of HSP70 was determined relative to that of the reference genes Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase and TATA-box Binding Protein.

Genes	Forward primers	Reverse primers
Heat Shock Protein 70 kDa (HSP 70)	AGGCCGACAAGAAGAAGGTGCT	TGGTACAGTCCGCTGATGATGG
Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
TATA-box Binding Protein	TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA	CACATCACAGCTCCCCACCA

TABLE 1. PRIMERS USED FOR RT-QPCR ANALYSIS OF HSP70 EXPRESSION

Intracellular ROS Detection

To quantify the production of intracellular ROS in our samples, the CellROX® Oxidative Stress Reagents kit (C10444, molecular probes®) was used in accordance with the manufacturer's instructions. Briefly, HaCaT cells were seeded in a 96-well plate, cells exposed to MMW and sham-exposed cells were cultured over the same period (1 hour or 24 hours), in two different incubators, at 33.5 °C. After treatment, the cells were incubated with the CellROX® Reagent at a final concentration of 5 µM, 30 minutes at 37 °C in the dark. The CellROX® Reagent is a DNA dye that binds to DNA upon oxidation. Cells were then washed 3 times with PBS and fixed with 4% formaldehyde during 15 minutes, and stained with Hoechst-33342 (1:1,000, Sigma). As a positive control, cells were treated with an oxidizing agent: H₂O₂ (0.5 mM, Laboratoire Gilbert, France) for 2 hours. Pictures and high-content fluorescence microscopy analyses were performed in a blind-manner with a Cellomics ArrayScan VTI HCS Reader (Thermo Fisher Scientific) at the ImPACcell technological platform (Biosit, University of Rennes 1, France). Ten fields were imaged per well and each cell photographed was analysed. A total of (at least) 450 cells were analyzed for each condition. The same operation was repeated for 4 independent experiments involving each time 4 wells per condition.

Extra- and Intracellular H₂O₂ concentration

To quantify the concentration of hydrogen peroxide (H₂O₂) in the samples, Amplex® Red reagent (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine, A22188 Invitrogen) was used, according to the

manufacturer's instructions. Briefly, HaCaT cells were seeded in a 6-well plate. Before exposure, the cells were washed once with PBS and then incubated with 1 mL of fresh medium, as described in [Le Pogam et al., 2019]. Then the plates were directly exposed for 1 hour or 24 hours to MMW (60.4 GHz, 15 mW/cm²). After exposure, the medium was collected in order to measure the amount of H₂O₂ excreted and the cells were lysed with 500 µL of 1X lysis buffer (Reporter Lysis 5X buffer, E397A Promega). In the presence of peroxidase, Amplex[®] Red reagent reacts with H₂O₂ producing a red-fluorescent oxidation product, resorufin. It was quantified using an excitation length of 544nm and emission of 590nm with a fluorimeter (Enspire). The Glucose oxidase (GO, 0.05 UI/mL- G2133 Sigma)-treated cells were used as a positive control. GO catalyses the oxidation of glucose which produces hydrogen peroxide. H₂O₂ supplied in the kit was used to establish standards ranging from 10 nM to 1 µM to convert fluorescence values into H₂O₂ concentrations (nM).

Quantification of Protein carbonyls

The quantification of protein carbonyls was performed with the Oxiselect[™] Protein Carbonyl ELISA kit (STA-310 Cell Biolabs). The cells were treated (H₂O₂ control or EXPO /SHAM N=5) in a 6-well plate, scraped in 1 mL of PBS, and centrifuged for 5 min at 2000 g. The dry pellets were stored at -80°C and were resuspended in 500 µL of PBS before sonication. The protein concentration was determined by the Bradford assay and diluted to achieve a protein concentration of 10 µg/mL in PBS. In parallel, a series of protein carbonyl standards (0-7.5 nmol/mg proteins) supplied by the manufacturer were assayed. Each 10 µg/mL protein sample was distributed in duplicates in a 96-well Protein Binding Plate supplied in the kit and incubated during 2 hours at 37 °C. Then, 100 µL of dinitrophenylhydrazine (DNPH) was added (45 min, room temperature). DNPH reacts with carbonyl groups in proteins to produce a protein-di-nitro-phenyl hydrazone (DNP). Cells were then washed and 100 µL of anti-dinitrophenylhydrazone antibody was added (1 hour). 100 µL of Horseradish peroxidase conjugated secondary antibody was added to all wells (1 hour). Finally, cells were incubated with 100 µL of substrate solution (30 min). The reaction was stopped with 100 µL of « STOP enzyme » and the absorbance was read at 450 nm with a spectrophotometer (Biorad). The fluorescence was determined for protein carbonyl standards in order to determine the concentration in protein carbonyl in the experimental samples.

Measurement of 4-hydroxynonenal (4-HNE)

HaCaT cells were seeded in 96-well plates and exposed to either MMW, heat or H₂O₂ (0.5 mM for 2 hours). Cells were then fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min and the cell membranes were permeabilized with 0.3% Triton-X100 in PBS (150 µL) for 45 min at room temperature. After 3 washes with PBS, the keratinocytes were incubated overnight at 4 ° with the rabbit 4-HNE antibody (abcam ab46545, 1: 200) diluted in PBS with 3% Fetal Bovine Serum (FBS, Biowest, France). After washing with PBS, the cells were incubated for 1 hour at room temperature with the anti-rabbit antibody conjugated with Alexa Fluor[®] 594 (ab 150080 1: 1000) and Hoechst 33342 (Sigma, 20 µM) in PBS with 3% FBS. After washing with PBS, the

images and fluorescence levels were measured in a blind manner using the ImPACcell platform in Rennes. The same method as that described for intracellular ROS detection was used for data analysis.

Measurement of intracellular and extracellular MDA

We quantified the production of Malondialdehyde (MDA), a natural product of lipid peroxidation, with the Oxiselect™ TBARS Assay Kit (STA-330 Cell Biolabs). Briefly, 10^7 cells were seeded in a 75cm² flask in order to have a sufficient number of cells to perform the test. After exposure to either treatment (GO 0.05 UI/mL), heat or MMW (EXPO and SHAM), the cells were harvested by scratching, and the culture medium were separately collected for analyses. The cells were pelleted and resuspended in 100 µL butylated hydroxytoluene 1X and sonicated on ice; the culture medium was directly processed. A series of MDA standards (0-400 nM) supplied by the manufacturer were assayed in parallel. Each MDA-standard and sample was measured in duplicate. 100 µL of lysis solution supplied by the manufacturer was mixed with 100 µL of samples and incubated for 5 minutes at room temperature. Then 250 µL of thiobarbituric acid reagent was added to each sample and incubated at 95°C for 1 hour; MDA forms a fluorescent 1: 2 adduct with thiobarbituric acid. The samples were then cooled on ice for 5 minutes, centrifuged for 15 minutes at 3500 rpm and 100 µL of the supernatant was measured by fluorimetry in a 96-well plate spectrophotometer (540 nm excitation and 590 nm emission, Biorad).

Statistical analyses

Each biological experiment was carried out independently 4 to 8 times for each MMW exposure. Results were analyzed using the Mann-Whitney Non-Parameter Test. A p-value inferior to 0.05 was considered statistically significant.

References

- A. Crastes de Paulet, L. Douste-Blazy, Rodolfo Paoletti. (2012). *Free Radicals, Lipoproteins, and Membrane Lipids*.
- Akdag, M. Z., Dasdag, S., Canturk, F., Karabulut, D., Caner, Y., & Adalier, N. (2016). Does prolonged radiofrequency radiation emitted from Wi-Fi devices induce DNA damage in various tissues of rats, *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 75, 116-122.
<https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2016.01.003>
- Alekseev, S. I., & Ziskin, M. C. (2011). Enhanced absorption of millimeter wave energy in murine subcutaneous blood vessels. *Bioelectromagnetics*, 32(6), 423-433.

<https://doi.org/10.1002/bem.20658>

- Alzayed, K. A., & Alsaadi, S. M. (2020). Efficacy of Pulsed Low-Frequency Magnetic Field Therapy on Patients with Chronic Low Back Pain : A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Trial. *Asian Spine Journal*, 14(1), 33-42. <https://doi.org/10.31616/asj.2019.0043>
- Bienert, G. P., Schjoerring, J. K., & Jahn, T. P. (2006a). Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(8), 994-1003. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.02.015>
- Bierman, W. (1936). THE TEMPERATURE OF THE SKIN SURFACE. *Journal of the American Medical Association*, 106(14), 1158. <https://doi.org/10.1001/jama.1936.02770140020007>
- Cermak, A. M. M., Pavicic, I., Lovakovic, B. T., Pizent, A., & Trosic, I. (2017). In vitro non-thermal oxidative stress response after 1800 MHz radiofrequency radiation. *General physiology and biophysics*, 36(04), 407-414. https://doi.org/10.4149/gpb_2017007
- Cholia, R. P., Kumari, S., Kumar, S., Kaur, M., Kaur, M., Kumar, R., Dhiman, M., & Mantha, A. K. (2017). An in vitro study ascertaining the role of H₂O₂ and glucose oxidase in modulation of antioxidant potential and cancer cell survival mechanisms in glioblastoma U-87 MG cells. *Metabolic Brain Disease*, 32(5), 1705-1716. <https://doi.org/10.1007/s11011-017-0057-6>
- Dardalhon, M., Averbeck, D., & Berteaud, A. J. (1981). Studies on possible genetic effects of microwaves in procaryotic and eucaryotic cells. *Radiation and Environmental Biophysics*, 20(1), 37-51. <https://doi.org/10.1007/BF01323925>
- Gapeyev, A. B., Safronova, V. G., Chemeris, N. K., & Fesenko, E. E. (1997). Inhibition of the production of reactive oxygen species in mouse peritoneal neutrophils by millimeter wave radiation in the near and far field zones of the radiator. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 43(2), 217-220. [https://doi.org/10.1016/S0302-4598\(96\)05155-0](https://doi.org/10.1016/S0302-4598(96)05155-0)
- Ghonaime, E. A., Craig, W. F., White, P. F., Ahmed, H. E., Hamza, M. A., Henderson, B. N., Gajraj, N. M., Huber, P. J., & Gatchel, R. J. (1999). Percutaneous Electrical Nerve Stimulation for Low Back Pain : A Randomized Crossover Study. *JAMA*, 281(9), 818.

<https://doi.org/10.1001/jama.281.9.818>

Habauzit, D., Le Quément, C., Zhadobov, M., Martin, C., Aubry, M., Sauleau, R., & Le Dréan, Y. (2014).

Transcriptome Analysis Reveals the Contribution of Thermal and the Specific Effects in Cellular Response to Millimeter Wave Exposure. *PLoS ONE*, *9*(10), e109435.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109435>

Iliopoulos, I., Meo, S. D., Pasion, M., Zhadobov, M., Pouliguen, P., Potier, P., Perregrini, L., Sauleau, R.,

& Ettorre, M. (2021). Enhancement of Penetration of Millimeter Waves by Field Focusing Applied to Breast Cancer Detection. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, *68*(3),

959-966. <https://doi.org/10.1109/TBME.2020.3014277>

Lantow, M., Lupke, M., Frahm, J., Mattsson, M. O., Kuster, N., & Simko, M. (2006). ROS release and

Hsp70 expression after exposure to 1,800 MHz radiofrequency electromagnetic fields in primary human monocytes and lymphocytes. *Radiation and Environmental Biophysics*, *45*(1),

55-62. <https://doi.org/10.1007/s00411-006-0038-3>

Lantow, M., Schuderer, J., Hartwig, C., & Simkó, M. (2006). Free Radical Release and HSP70

Expression in Two Human Immune-Relevant Cell Lines after Exposure to 1800 MHz Radiofrequency Radiation. *Radiation Research*, *165*(1), 88-94.

<https://doi.org/10.1667/RR3476.1>

Le Pogam, P., Le Page, Y., Habauzit, D., Doué, M., Zhadobov, M., Sauleau, R., Le Dréan, Y., & Rondeau,

D. (2019). Untargeted metabolomics unveil alterations of biomembranes permeability in human HaCaT keratinocytes upon 60 GHz millimeter-wave exposure. *Scientific Reports*, *9*(1),

9343. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45662-6>

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time

Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, *25*(4), 402-408.

<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

Logani, M. K., & Ziskin, M. C. (1996). Continuous Millimeter-Wave Radiation Has No Effect on Lipid

Peroxidation in Liposomes. *Radiation Research*, *145*(2), 231.

<https://doi.org/10.2307/3579179>

Manna, D., & Ghosh, R. (2016). Effect of radiofrequency radiation in cultured mammalian cells : A review. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 35(3), 265-301.

<https://doi.org/10.3109/15368378.2015.1092158>

Mansutti, G., Mobashsher, A. T., Bialkowski, K., Mohammed, B., & Abbosh, A. (2020). Millimeter-Wave Substrate Integrated Waveguide Probe for Skin Cancer Detection. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 67(9), 2462-2472. <https://doi.org/10.1109/TBME.2019.2963104>

Marjanovic Cermak, A. M., Pavicic, I., & Trosic, I. (2018). Oxidative stress response in SH-SY5Y cells exposed to short-term 1800 MHz radiofrequency radiation. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 53(2), 132-138. <https://doi.org/10.1080/10934529.2017.1383124>

Obeid, D., Sadek, S., Zaharia, G., & El Zein, G. (2010). Touch-less heartbeat detection and measurement-based cardiopulmonary modeling. *2010 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology*, 658-661.

<https://doi.org/10.1109/IEMBS.2010.5627214>

Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnad, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., & Mann, M. (2006). Global, In Vivo, and Site-Specific Phosphorylation Dynamics in Signaling Networks. *Cell*, 127(3), 635-648. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.026>

Phelan, A. M., Lange, D. G., Kues, H. A., & Lutty, G. A. (1992). Modification of membrane fluidity in melanin-containing cells by low-level microwave radiation. *Bioelectromagnetics*, 13(2), 131-146. <https://doi.org/10.1002/bem.2250130207>

Radzievsky, A. A., Gordiienko, O. V., Alekseev, S., Szabo, I., Cowan, A., & Ziskin, M. C. (2008). Electromagnetic millimeter wave induced hypoalgesia : Frequency dependence and involvement of endogenous opioids. *Bioelectromagnetics*, 29(4), 284-295.

<https://doi.org/10.1002/bem.20389>

Radzievsky, A. A., Gordiienko, O. V., Szabo, I., Alekseev, S. I., & Ziskin, M. C. (2004). Millimeter wave-induced suppression of B16 F10 melanoma growth in mice : Involvement of endogenous

- opioids. *Bioelectromagnetics*, 25(6), 466-473. <https://doi.org/10.1002/bem.20018>
- Radziewsky, A. A., Rojavin, M. A., Cowan, A., Alekseev, S. I., Radziewsky, A. A., & Ziskin, M. C. (2001). Peripheral neural system involvement in hypoalgesic effect of electromagnetic millimeter waves. *Life Sciences*, 68(10), 1143-1151. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(00\)01016-X](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(00)01016-X)
- Ramundo-Orlando, A., Gallerano, G. P., Stano, P., Doria, A., Giovenale, E., Messina, G., Cappelli, M., D'Arienza, M., & Spassovsky, I. (2007). Permeability changes induced by 130 GHz pulsed radiation on cationic liposomes loaded with carbonic anhydrase. *Bioelectromagnetics*, 28(8), 587-598. <https://doi.org/10.1002/bem.20343>
- Ramundo-Orlando, A., Longo, G., Cappelli, M., Girasole, M., Tarricone, L., Beneduci, A., & Massa, R. (2009). The response of giant phospholipid vesicles to millimeter waves radiation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1788(7), 1497-1507. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.04.006>
- Rojavin, M. (1998). Medical application of millimetre waves. *QJM*, 91(1), 57-66. <https://doi.org/10.1093/qjmed/91.1.57>
- Rojavin, M. A., Cowan, A., Radziewsky, A. A., & Ziskin, M. C. (1998). Antipruritic effect of millimeter waves in mice : Evidence for opioid involvement. *Life Sciences*, 63(18), PL251-PL257. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(98\)00436-6](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(98)00436-6)
- Safronova, V. G., Gabdoulkhakova, A. G., & Santalov, B. F. (2002). Immunomodulating action of low intensity millimeter waves on primed neutrophils. *Bioelectromagnetics*, 23(8), 599-606. <https://doi.org/10.1002/bem.10056>
- Sannino, A., Di Costanzo, G., Brescia, F., Sarti, M., Zeni, O., Juutilainen, J., & Scarfi, M. R. (2009). Human Fibroblasts and 900 MHz Radiofrequency Radiation : Evaluation of DNA Damage after Exposure and Co-exposure to 3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-Hydroxy-2(5h)-furanone (MX). *Radiation Research*, 171(6), 743-751. <https://doi.org/10.1667/RR1642.1>
- Sluka, K. A., & Walsh, D. (2003). Transcutaneous electrical nerve stimulation : Basic science mechanisms and clinical effectiveness. *The Journal of Pain*, 4(3), 109-121.

<https://doi.org/10.1054/jpai.2003.434>

Szabo, I., Manning, M. R., Radziewsky, A. A., Wetzell, M. A., Rogers, T. J., & Ziskin, M. C. (2003). Low power millimeter wave irradiation exerts no harmful effect on human keratinocytes in vitro.

Bioelectromagnetics, 24(3), 165-173. <https://doi.org/10.1002/bem.10077>

Vlasova, I. I., Mikhalchik, E. V., Gusev, A. A., Balabushevich, N. G., Gusev, S. A., & Kazarinov, K. D.

(2018). Extremely high-frequency electromagnetic radiation enhances neutrophil response to particulate agonists : MMWs Enhance Neutrophil Response to Agonists. *Bioelectromagnetics*,

39(2), 144-155. <https://doi.org/10.1002/bem.22103>

Wong-ekkabut, J., Xu, Z., Triampo, W., Tang, I.-M., Peter Tieleman, D., & Monticelli, L. (2007). Effect of Lipid Peroxidation on the Properties of Lipid Bilayers : A Molecular Dynamics Study.

Biophysical Journal, 93(12), 4225-4236. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.112565>

Zeni, O., Di Pietro, R., d'Ambrosio, G., Massa, R., Capri, M., Naarala, J., Juutilainen, J., & Scarfi, M. R.

(2007). Formation of Reactive Oxygen Species in L929 Cells after Exposure to 900 MHz RF Radiation with and without Co-exposure to 3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone. *Radiation Research*, 167(3), 306-311. <https://doi.org/10.1667/RR0595.1>

Zhadobov, M., Alekseev, S. I., Le Dréan, Y., Sauleau, R., & Fesenko, E. E. (2015). Millimeter waves as a source of selective heating of skin : MMW as a Source of Selective Heating of Skin.

Bioelectromagnetics, 36(6), 464-475. <https://doi.org/10.1002/bem.21929>

Zhadobov, M., Nicolaz, C. N., Sauleau, R., Desmots, F., Thouroude, D., Michel, D., & Le Drean, Y.

(2009). Evaluation of the Potential Biological Effects of the 60-GHz Millimeter Waves Upon Human Cells. *IEEE Transactions on Antennas and Propagation*, 57(10), 2949-2956.

<https://doi.org/10.1109/TAP.2009.2029308>

Ziskin, M. C. (2013). Millimeter waves : Acoustic and electromagnetic. *Bioelectromagnetics*, 34(1),

3-14. <https://doi.org/10.1002/bem.21750>

Acknowledgements

Morgane Lebosq is a recipient of a CIFRE grant (CIFRE n°2018/1238). from the French “Association Nationale de la Recherche et de la Technologie”, in collaboration with the society Remedee labs (France). The authors thank Dr C. Lavau for her critical review of the manuscript.

Author contributions

Conceptualization: YLD, M.L., Data Curation: M.L., R.L.G, Formal analysis: M.L., Investigation: M.L., C.M. Methodology: M.L., M.Z. Project administration: Y.L.D, Supervision: Y.L.D., Writing, original draf: M.L, Y.L.D.,

Competing interests

M.L. is funded by the society Remedee labs through a CIFRE project

Correspondence and requests for materials should be addressed to Yves Le Dréan (yves.le-drean@univ-rennes1.fr)

Figures

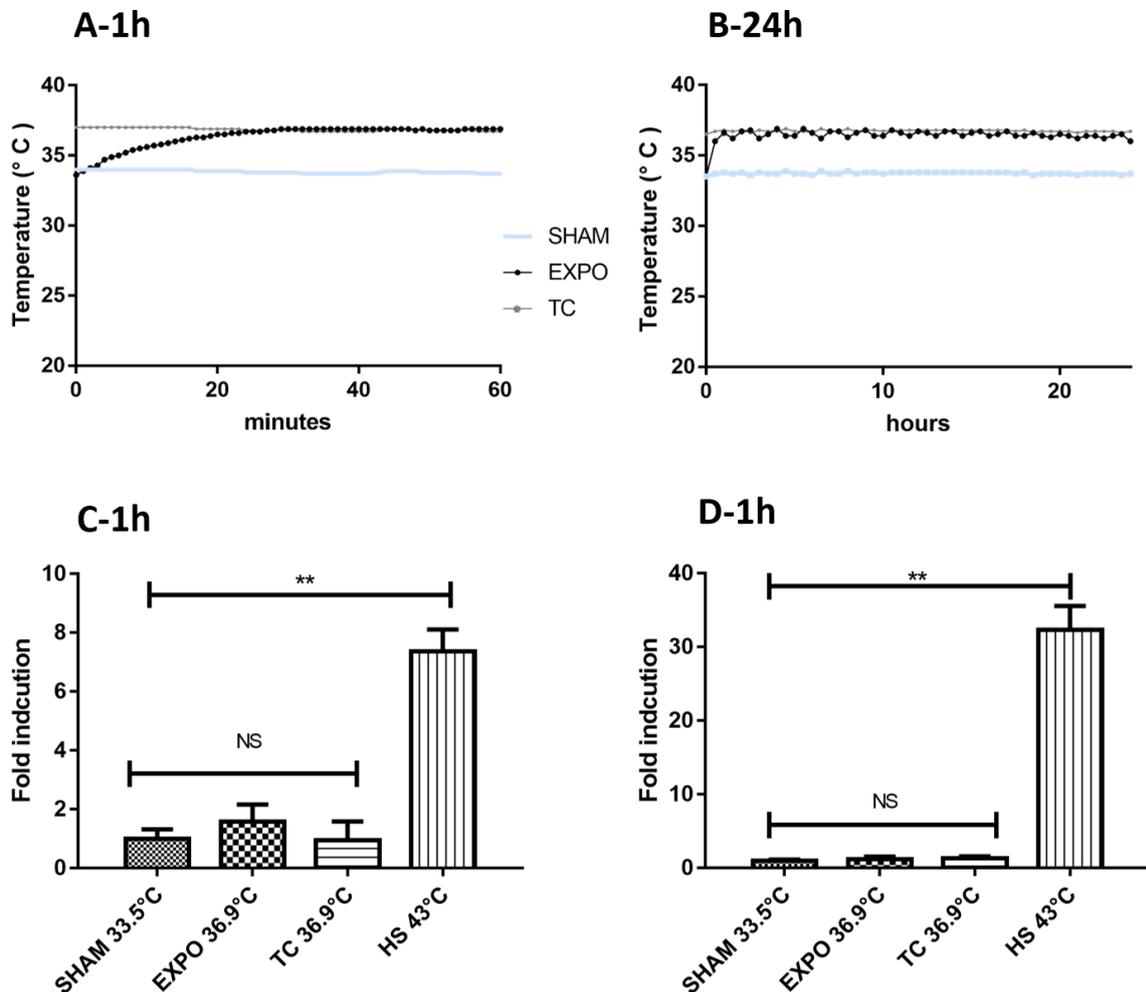


Figure 1. Temperature assessment and thermal stress Response

Temperature curves carried out for 1 hour (A) and 24 hours (B) on HaCaT cells exposed to 60 GHz at 15 mW/cm² (EXPO), or unexposed (SHAM). As thermal control (TC), cells were cultured at a temperature equivalent to MMW exposure (mean of temperatures of replicates, N = 4)). Induction level of HSP70 RNA in HaCaT cells analyzed by RT-qPCR after 1 hour (C) and 24 hours (D) of exposure. Different experimental conditions: cells exposed to MMW (EXPO 36.9 °C) or to an increase of 3 °C (TC 36.9°C) were compared to unexposed cells (SHAM 33.5°C) and heat shock control (HS) corresponding to cells grown at 43°C. The histograms represent 2^{-ΔΔCt} values, calculated according to Livak et Schmittgen method of the different conditions +/- the standard deviation of biological replicates, N = 8. Mann Whitney nonparametric tests were used (** <0.005; NS: not significant).

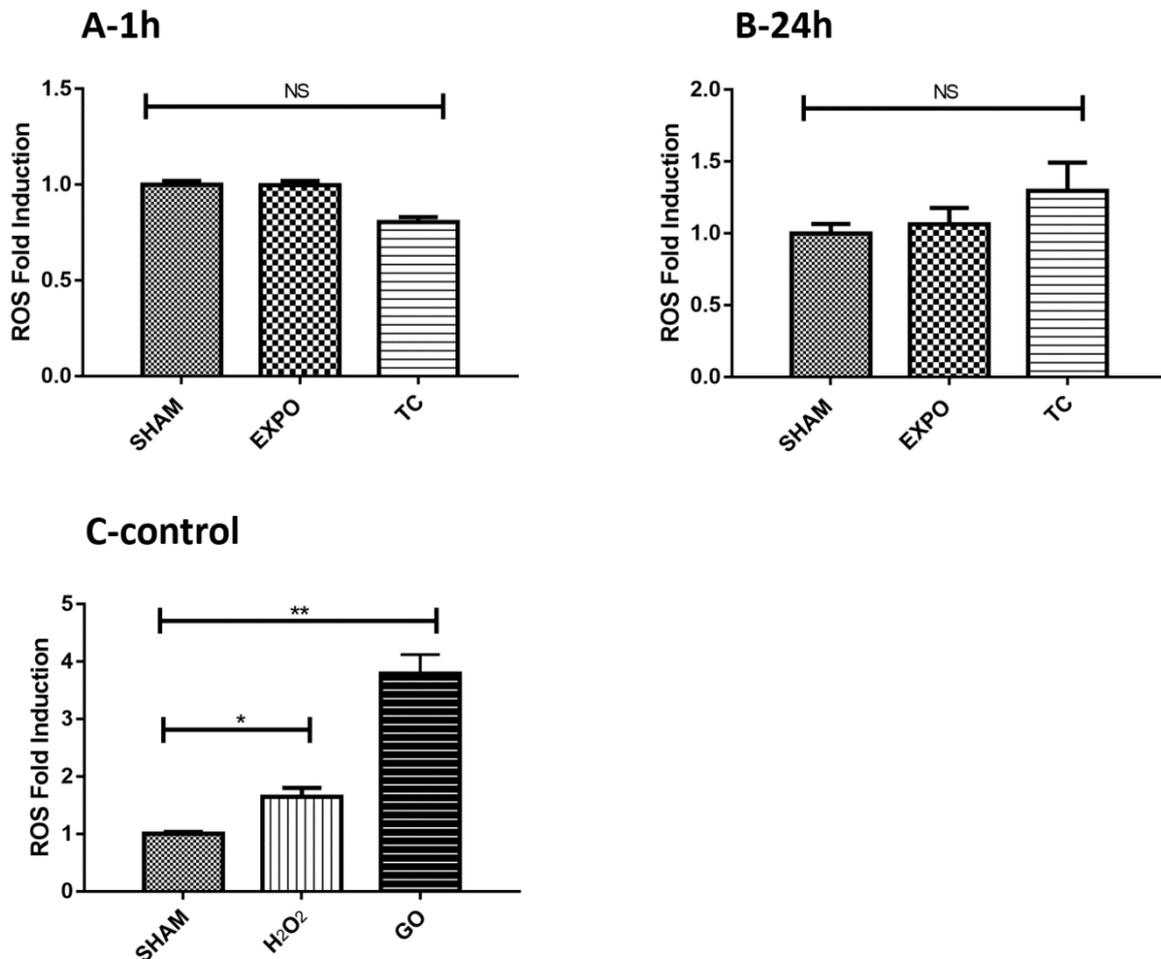


Figure 2. Intracellular ROS

ROS expression levels analyzed by immunofluorescence in control cells (SHAM) or cells exposed to MMW (EXPO) or to heat (thermal control, TC) during 1 hour (A) and 24 hours (B). Hydrogen peroxide (H₂O₂) at 0.5 mM for 2 hours, and glucose oxidase (GO) at 0.05 U / mL for 24 hours were used as positive controls. The histograms represent the mean of the fold induction of the ROS fluorescence intensity of the different conditions compared to the SHAM +/- the standard deviation, N = 4 biological replicates. Mann Whitney nonparametric tests were used (* <0.05; NS: not significant)

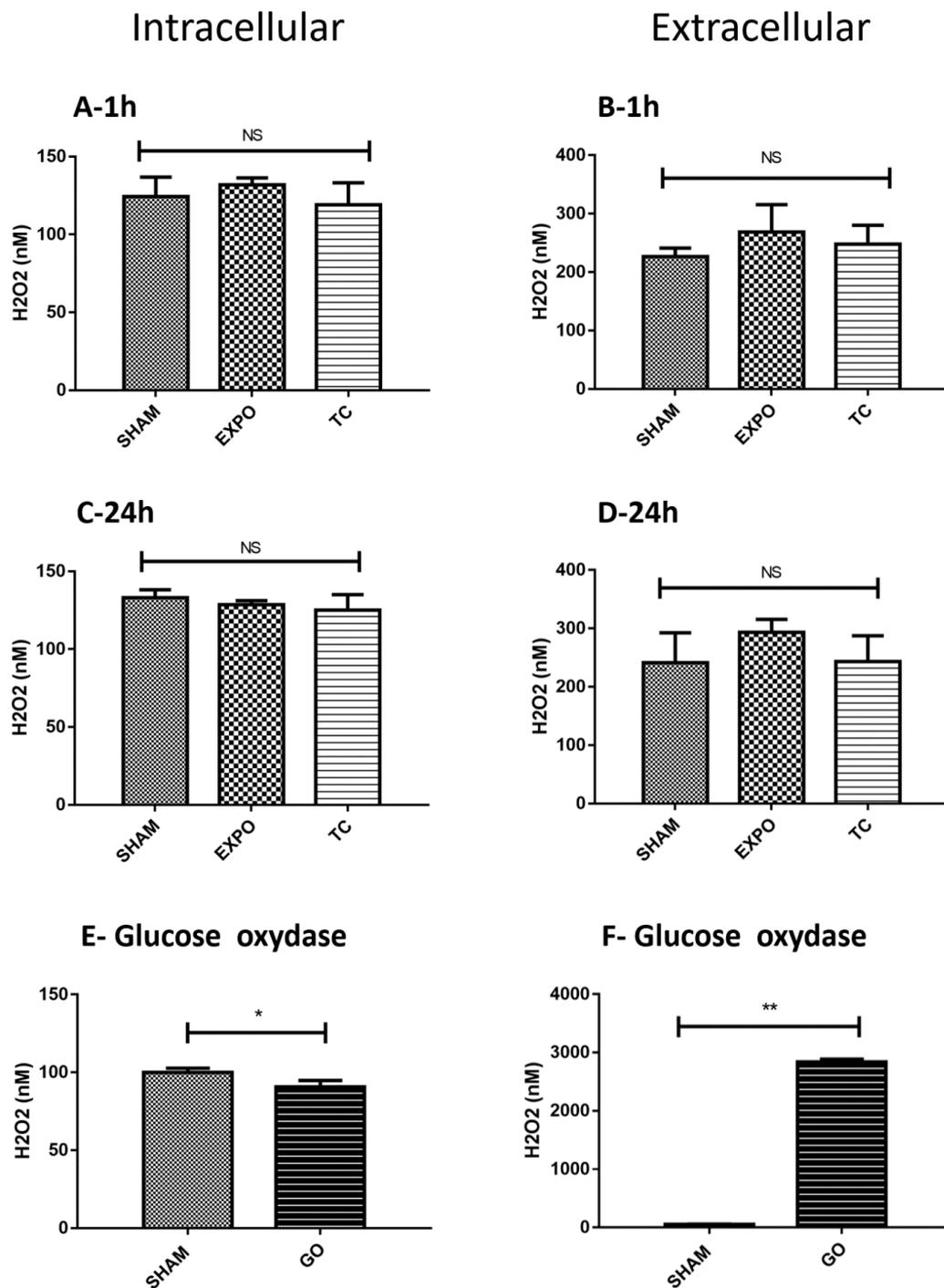


Figure 3. Intra and Extracellular H₂O₂ concentration

Intracellular H₂O₂ concentrations (**left panel**) and extracellular H₂O₂ concentrations (**right panel**) assayed with the Amplex[®] Red reagent in control cells (SHAM) or cells exposed to MMW (EXPO) or to heat (thermal control, TC) for 1 hour (**A,B**) and 24 hours (**C,D**). Cells treated with glucose oxidase (GO, 0.05 U/mL during 6 hours) (**E,F**) were used as positive controls. The histograms represent the mean concentration of H₂O₂ in nM under the different conditions +/- the standard deviation, N = 4 biological replicates. Mann Whitney nonparametric tests were used (* <0.05; ** <0.005; NS: not significant)

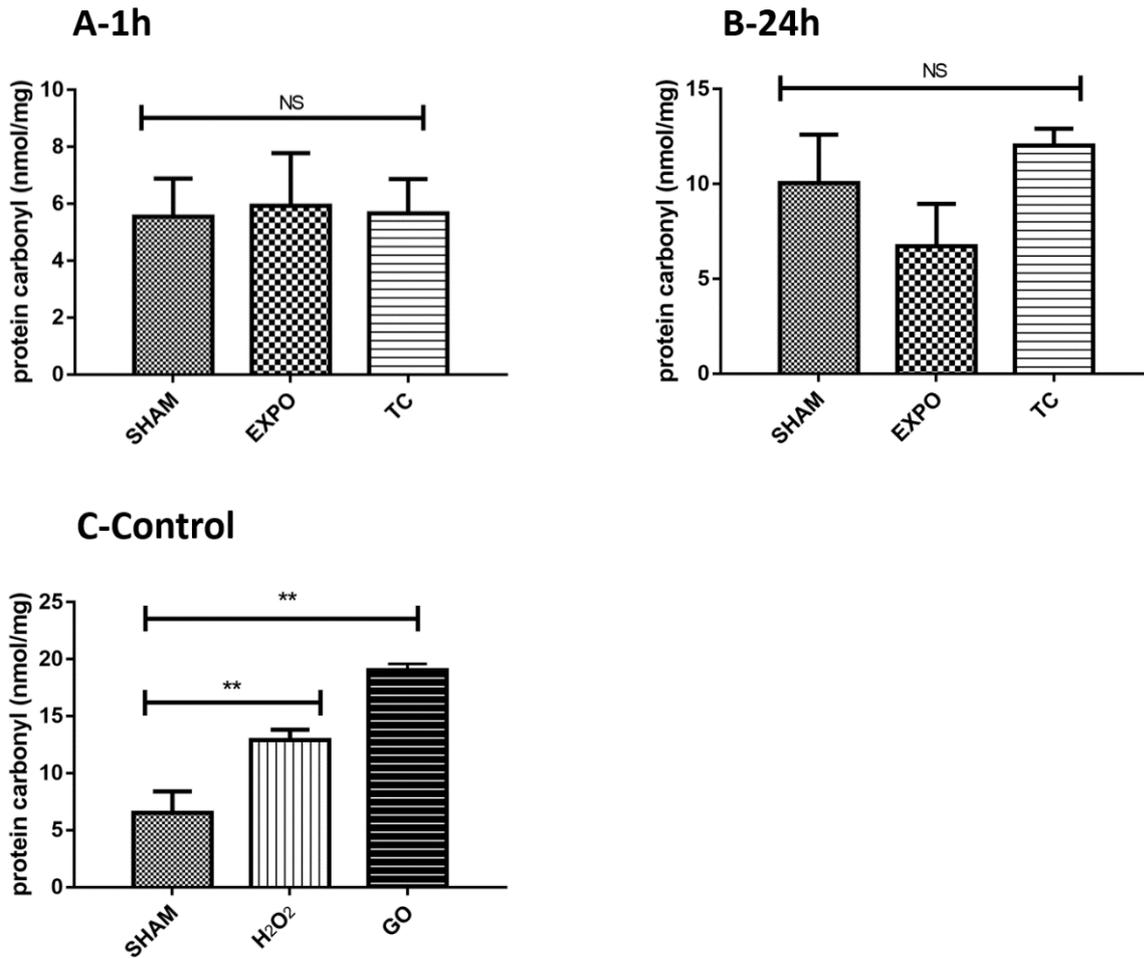


Figure 4. Protein Carbonyl Content

Intracellular concentrations of proteins carbonyl assayed with the Oxiselect™ Protein Carbonyl ELISA kit in control cells (SHAM) or cells exposed to MMW (EXPO) or to heat (thermal control, TC), for 1 hour (A) or 24 hours (B). Hydrogen peroxide (H₂O₂, 0.5mM, 2 hours) and glucose oxidase (GO, 0.05 U / mL, 24 hours) were used as positive controls (C). The histograms represent the means of the intracellular concentration of proteins carbonyl, in nmol / mg of proteins, under the different conditions +/- the standard deviation, N = 4 biological replicates. Mann Whitney nonparametric tests were used (** <0.005; NS: not significant)

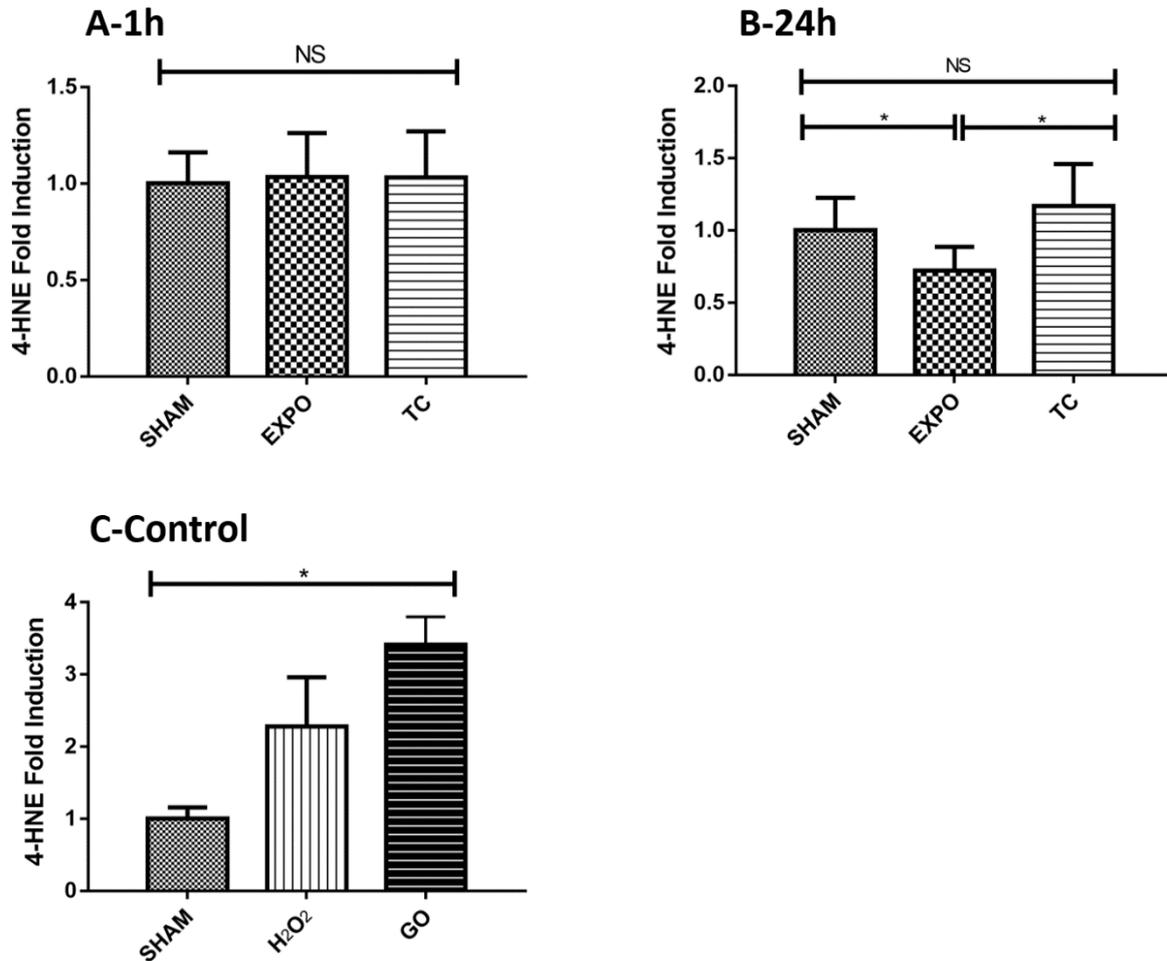


Figure 5. Intracellular 4-HNE concentration

4-HNE production levels analyzed by Immunofluorescence in control cells (SHAM) or cells exposed to MMW (EXPO) or to heat (thermal control, TC) for 1 hour (A) and 24 hours (B). Hydrogen peroxide (H₂O₂, 0.5 mM, for 2 hours) and glucose oxidase (GO, 0.05 U / mL, for 24 hours) were used as positive controls. Histograms represent the fold increase of fluorescence intensity of 4-HNE compared to control +/- the standard deviation, N = 4 biological replicates. Mann Whitney nonparametric tests were used (* <0.05; NS: not significant)

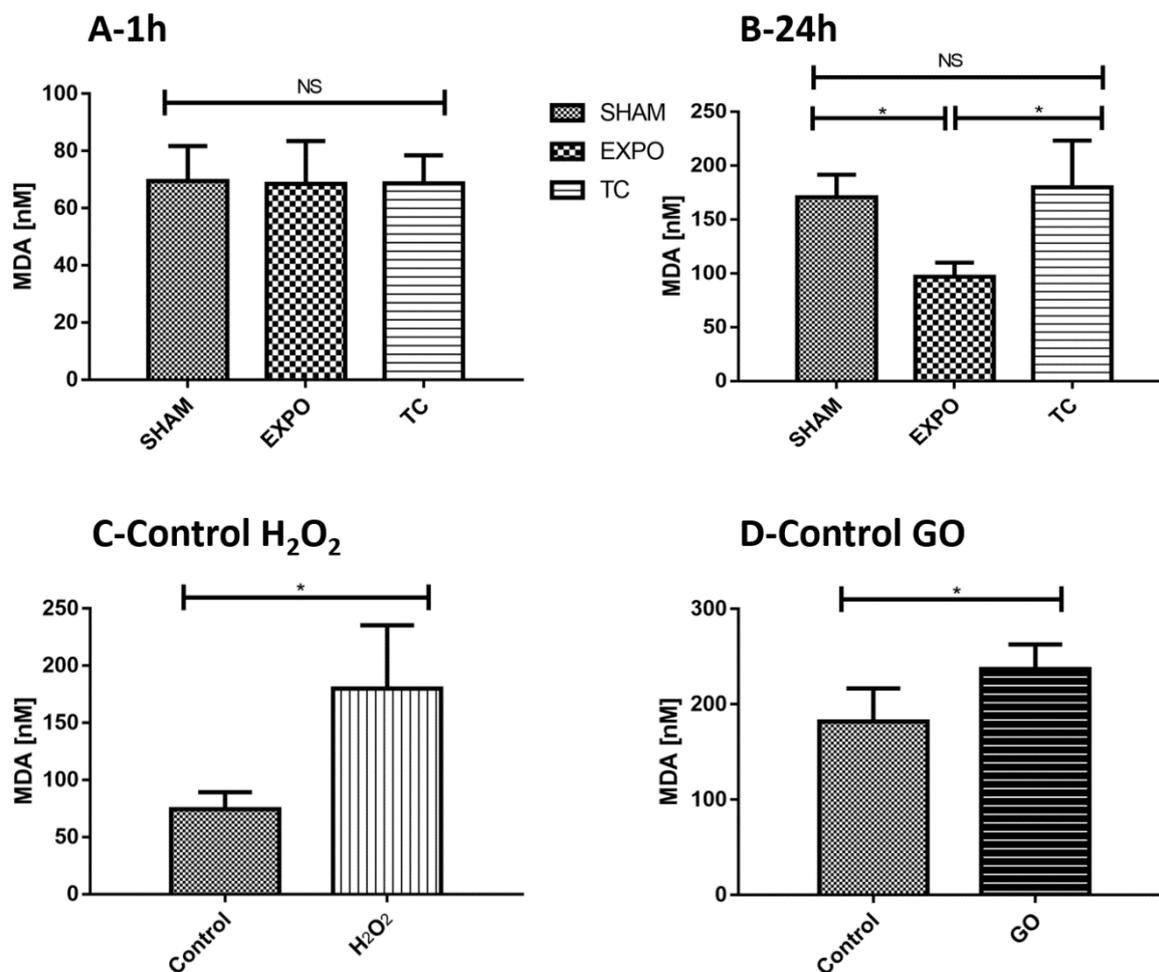


Figure 6. Intracellular malondialdehyde (MDA) concentration

Intracellular concentration of malondialdehyde (nM) assayed via the Oxiselect™ TBARS kit in control cells (SHAM) or cells exposed to MMW (EXPO) or to heat (thermal control, TC) for 1 hour (A) and 24 hours (B) of exposure. Hydrogen peroxide (H₂O₂, 0.5 mM, 2 hours) and glucose oxidase (GO, 0.05 U/mL, 24 hours) were used as technical controls (C,D). The histograms represent the mean intracellular concentration of MDA +/- the standard deviation, N = 4 biological replicates. Mann Whitney nonparametric tests were used (* <0.05; NS: not significant)

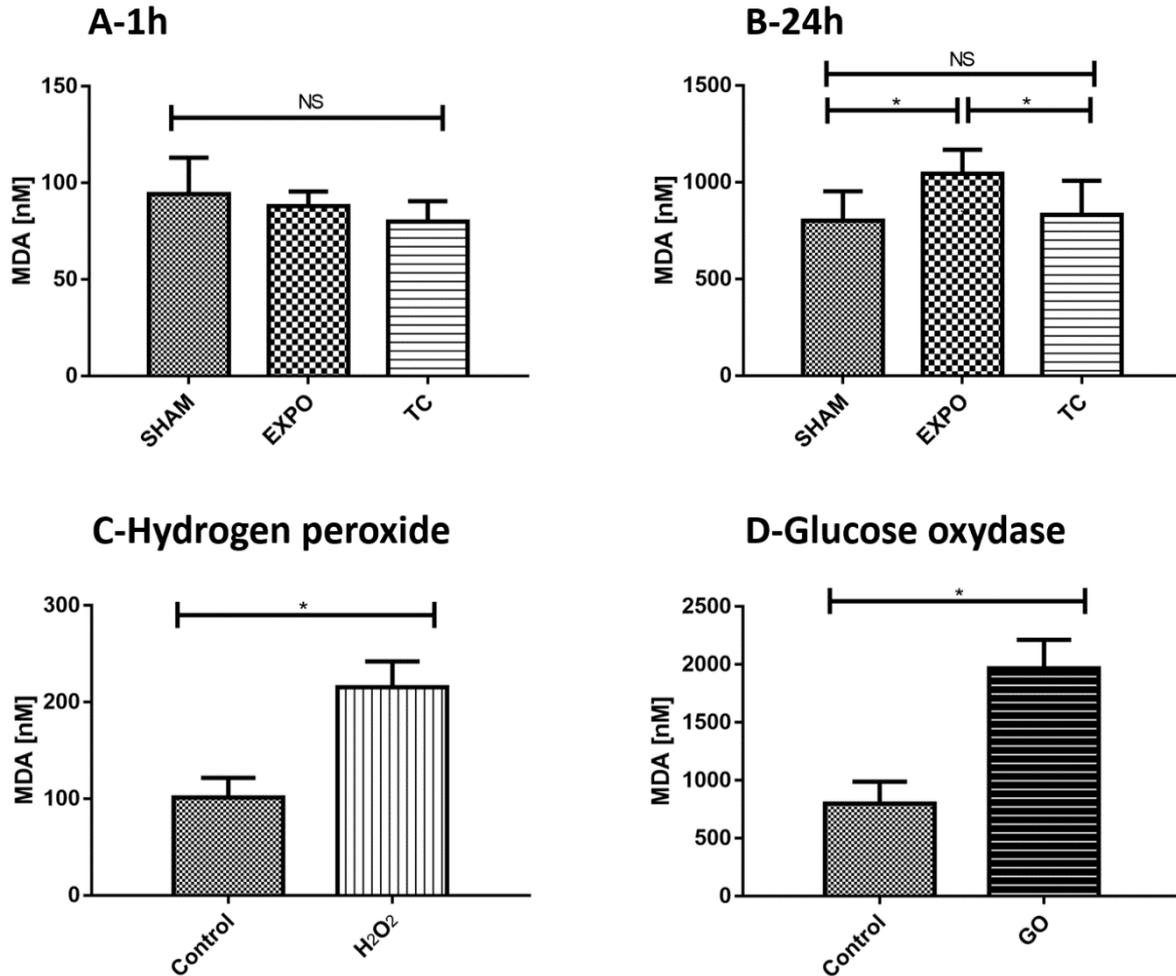


Figure 7. Extracellular malondialdehyde (MDA) concentration

Extracellular concentration of malondialdehyde (nM) assayed via the Oxiselect™ TBARS kit in control cells (SHAM) or cells exposed to MMW (EXPO) or to heat (thermal control, TC) for 1 hour (A) and 24 hours (B). Hydrogen peroxide (H₂O₂, 0.5 mM, 2h) and glucose oxidase (GO, 0.05 U/mL, 24h) were used as positive controls (C,D). The histograms represent the extracellular concentration of MDA in nM +/- the standard deviation, N = 4 biological replicates. Mann Whitney nonparametric tests were used (* <0.05; NS: not significant).

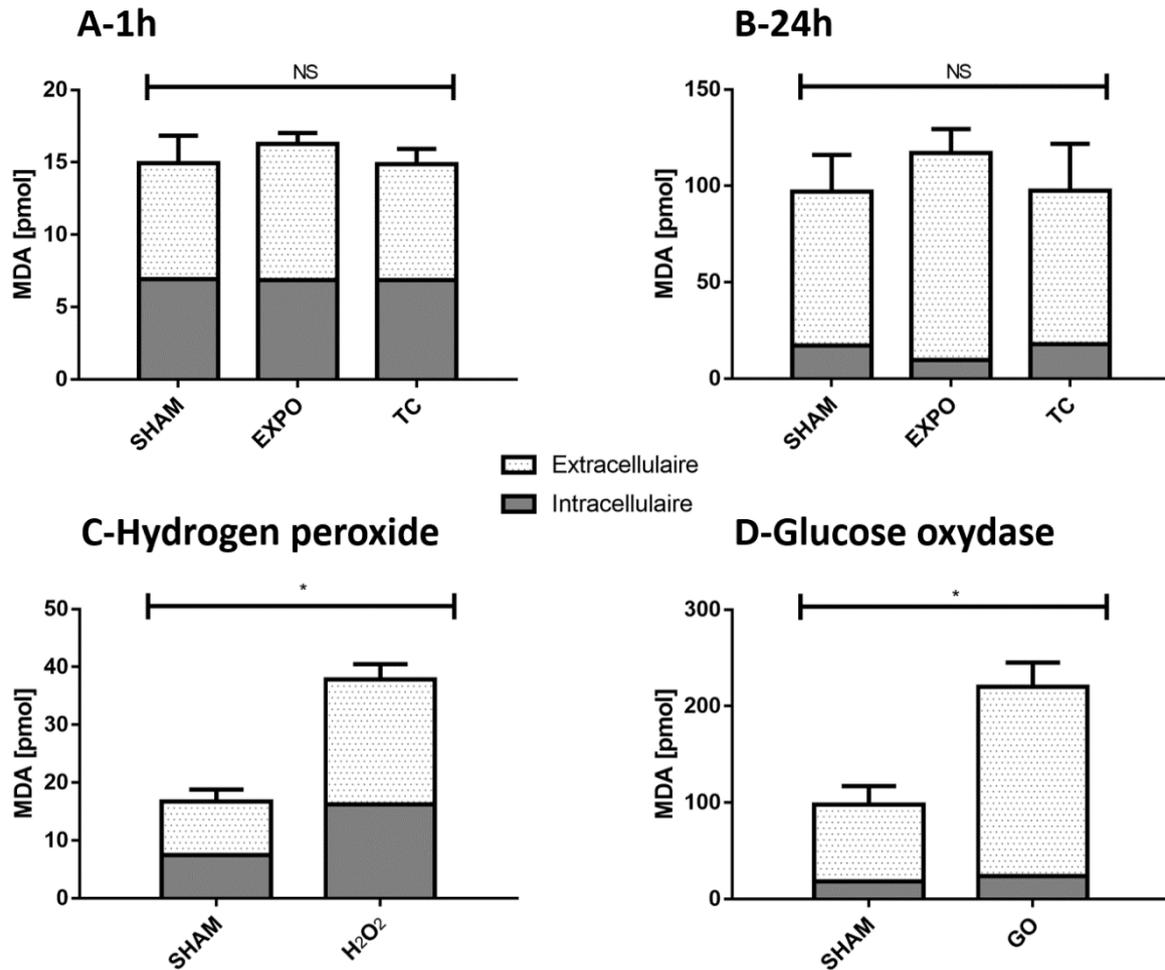


Figure 8. Global quantity of malondialdehyde (MDA)

Overall quantity of malondialdehyde (pmole) present in the intracellular (fill bar) and extracellular (dot bar) compartments, calculated via the Oxiselect™ TBARS kit with the IETR device in control cells (SHAM) or cells exposed to MMW (EXPO) or to heat (thermal control, TC) for 1 hour (A) and 24 hours (B). Hydrogen peroxide (H₂O₂) at 0.5 mM for 2 hours (C) and glucose oxidase (GO) at 0.05 U / mL for 24 hours (D) were used as positive controls. The histograms represent the overall amount of MDA in pmol +/- the standard deviation, N = 4 biological replicates. Mann Whitney nonparametric tests were used (* < 0.05; NS: not significant).

A propos de l'auteur



La curiosité est sans doute le Letmotiv de Morgane LEBOSQ. Intriguée depuis toujours sur le fonctionnement du monde, c'était tout naturellement que la recherche s'ouvrit à elle ;

Morgane est née le 30 Juillet 1992, à Saint Briuc, en Bretagne. Elle a réalisé son Master à l'Université de Rennes 1, en « Biologie cellulaire et moléculaire » Elle a commencé à préparer son doctorat chez REMEDEE LABS en collaboration avec le laboratoire IRSET. Son travail consiste à étudier une thérapie utilisant les ondes électromagnétiques (plus précisément millimétriques) comme nouveau dispositif médical. Elle se concentre sur l'innocuité de la thérapie ainsi que sur le mécanisme précis impliqué dans les effets analgésiques. Ce sujet multidisciplinaire mêle biologie, bioélectromagnétique, bio-informatique, chimie analytique, permettant de toucher à de nombreux domaines.

En plus de son goût pour la recherche, elle est directrice du club DOC'7 (club des doctorants et post-doctorants de l'IRSET), dans lequel elle organise des meetings scientifiques mais aussi des animations de vulgarisation scientifique. Ce club lui permet de montrer une toute une autre facette de sa personnalité : son intérêt pour la gestion d'équipe et surtout son engagement pour l'accessibilité de la science pour tous.

PRESENTATIONS

1. **REBORN**, Science en cour[t]s 2021-10-01, Rennes, 2^{ème} prix du jury, [vidéo](#)
2. **Electromagnetic Millimeter Waves for Pain Therapy**, Printemps de la Recherche PRI2021, Rennes, 2021-05-04, [Vidéo](#)
3. **Conseil scientifique REMEDEE labs**, Grenoble, 2021-03-04
4. **Etude du Dispositif « Remedee one » utilisant les ondes millimétriques dans la réponse analgésique**, le Lundi de l'IRSET, Visioconférence, 2021-02-08
5. **Ma thèse en 180s**, Rennes, 2021-01-12, qualifiée pour les régionales
6. **Remedee one: medical device using millimeter waves – Analysis of safety at cellular level** Journée des Jeunes chercheurs JJC-2020 ED, Rennes, 2020-12-10, [Video](#)
7. **Impact of exposure at 60 GHz on cellular metabolism of HaCaT keratinocytes**, Pierre Le Pogam, [Morgane Lebosq](#), Yann Le Page, Denis Habauzit, Maxim Zhadobov, Ronan Sauleau, Yves Le Dréan & David Rondeau, Bioelectromagnetics Society, 23-28 juin 2019, Poster

PUBLICATIONS

1. **Millimeter wave exposure on serotonin metabolism in epidermal and neural cells**, [Morgane Lebosq](#), Catherine Martin, Rémi Latour, Maxime Zhadabov, Yves Le Dréan, *en cours*
2. **Genotoxic risk assessment under millimeterwave in epidermal cells**, [Morgane Lebosq](#), Catherine Martin, Rémi Latour, Maxime Zhadabov, Yves Le Dréan, *en cours*
3. **Assessment of oxidative stress under millimeter waves in keratynocytes cells**, [Morgane Lebosq](#), Catherine Martin, Rémy Le Guevel, Maxime Zhadabov, Yves Le Dréan, *Scientific Report (soumis)*
4. **Les ondes électromagnétiques en médecine: le cas des ondes millimétriques**, [Morgane Lebosq](#), Yves Le Dréan, *Annales des Mines - Responsabilité et environnement 2021/3 (N° 103)*
5. **Assessment of keratinocyte epigenetic modification by 60 GHZ-millimeter wave exposure**. Meziane Aite, [Morgane Lebosq](#), Remy Le Guevel, Catherine Martin, Frederic Percevault, Louis Legoff, Shereen D'Cruz-Bernard, Jean-Christophe Le Cun, Maxim Zhadobov, Fatima Smagulova, Yves Le Dréan, Denis Habauzit, Abstract
6. **Effect of radiofrequency exposure on expression and activation of DNA repair factors**, [Morgane Lebosq](#), Coline Mahé, Catherine Martin, Denis Habauzit, Mohsen Koohestani, Maxim Zhadobov, Nicolas Foray, Gyorgy Thuroczy, Yves Le Dréan, 21-25 juin 2020, Abstract
7. **Remedee one : medical device using millimeters waves**, [Morgane Lebosq](#), Catherine Martin, Michael Foerster, Yann Lepage, Yves Le Dréan, David Cruzier, Bioelectromagnetics Society, 21-25 juin 2020, Abstract
8. **Developmental exposure to chlordecone induces transgenerational effects in somatic prostate tissue which are associated with epigenetic histone trimethylation changes**, Louis Legoff, Shereen Cynthia D'Cruz, [Morgane Lebosq](#), Aurore Gely-Pernot, Katia Boucheekhchoukha, Christine Monfort, Pierre-Yves Kernanec, Sergei Tevosian, LucMultigner, Fatima Smagulova, *Environment International*, Volume 152, July 2021, 106472



Etude du dispositif médical « Remedee one » utilisant les ondes millimétriques dans la réponse analgésique

Mots clés : onde millimétrique, stress oxydant, stress génotoxique, stress thermique, thérapie analgésie

Résumé : La gamme des ondes millimétriques (OMM) est riche en applications scientifiques et technologiques. Outre leurs rôles indéniables dans la communication, les OMM sont retrouvées également dans d'autres domaines comme le domaine médical, notamment pour des explorations diagnostiques superficielles et comme analgésique. C'est cette dernière utilisation qui a intéressé la société REMEDEE Labs en créant un dispositif médical utilisant les ondes millimétriques pour pallier la douleur, appelé Remedee one. Néanmoins, les mécanismes sous-jacents aux effets analgésiques ne sont toujours pas clairement compris. Durant ce projet de thèse, l'étude de ce dispositif a été effectuée.

Dans un premier temps, les travaux se sont concentrés sur l'innocuité de la thérapie, s'intéressant à plusieurs stress : le stress thermique, le stress oxydant et le stress génotoxique. Dans un second temps, l'étude des mécanismes dans la réponse analgésique a été investiguée, notamment en mettant l'accent sur le système sérotoninergique.

Study of the "Remedee one" medical device using millimeter waves in the analgesic response

Key words : millimeter wave, oxidative stress, genotoxic stress, heat stress, analgesia therapy

Abstract : The millimeter wave range (mmW) is rich in scientific and technological applications. In addition to their undeniable roles in communication, MMW are also found in other fields such as the medical field, in particular for superficial diagnostic explorations and as an analgesic. It is this last use that interested REMEDEE Labs by creating a medical device using millimeter waves to alleviate pain, called Remedee one. Nevertheless, the mechanisms underlying the analgesic effects are still not clearly understood. During this thesis project, the study of this device was carried out.

Initially, the work focused on the safety of the therapy, looking at several stresses : heat stress, oxidative stress and genotoxic stress. In a second step, the study of the precise mechanisms in the analgesic response was investigated, in particular by focusing on the serotonergic system.