

Projet H2AMONO

Co-génotoxicité d'un champ électromagnétique 1,8 GHz de type GSM sur des cellules humaines

Responsable : Anne PERRIN



*Institut de Recherches Biomédicales des Armées (IRBA) – Antenne CRSSA
Direction Générale de l'Armement (DGA)*

Objectif

À partir de quel niveau de puissance une exposition de type téléphonie mobile peut-elle modifier l'action d'un agent mutagène connu sur l'ADN ?

**Cet effet est-il d'origine thermique ou non ?
=> À comparer avec un effet d'origine thermique**

Seuils d'exposition

- *Seuils définis par l'ICNIRP (1998)*
- *Recommandation du conseil Européen du 12 juillet 1999*
- *Décret n° 2002-775 du 3 mai 2002*
- *Instruction D302143/DEF/DSP du 18 août 2003 pour équipements relevant du Ministère de la Défense*

	<u>Public*</u>	x 5 →	<u>Professionnel</u>
Corps entier :	0,08 W/kg		0,4 W/kg
Tête* :	2 W/kg		10 W/kg
Extrémités* :	4 W/kg		20 W/kg

** 50x inférieures aux seuils d'apparition d'effets avérés sur la santé*

Planning H2AMONO

Phase 1 :

- A. **Expériences préliminaires** : prise en main, mise au point et validation de la technique H2AX dans le contexte de l'étude (vérifier effets à 2,45 GHz)
- B. **Dosimétrie** : calculs pour définir des conditions d'expositions à utiliser (correspondant au DAS souhaité).
→ en collaboration avec XLIM (CNRS Limoges)
- C. **Dosimétrie** : Mesures physiques précises de la température en fonction de l'exposition

Phase 2 :

- A. **Mesure des altérations de l'ADN induites par le 4-NQO en présence et en absence d'exposition au champ EM à 1.8 GHz par deux méthodes**
- B. **Mesure des altérations de l'ADN induites par le 4-NQO en fonction de la température**

Phase 3 :

Synthèse des résultats

Méthodologie

Exposition

- Fréquence : 1,8 GHz champ lointain,
- Modulation : GSM (fréquence de répétition 217 Hz, DC1/8), générateur RFPA
- 4 valeurs de DAS : **2 ; 4 ; 8 et 16 W/kg**

Modèle biologique

- Cellules THP1 : lignées de cellules immunitaires humaines immatures (monocytes indifférenciés) cultivés en suspension (boîtes de petri, Ø 35 mm)
- Agent mutagène : 4-nitroquinoline-N-oxide (4-NQO, 1,8 µM)

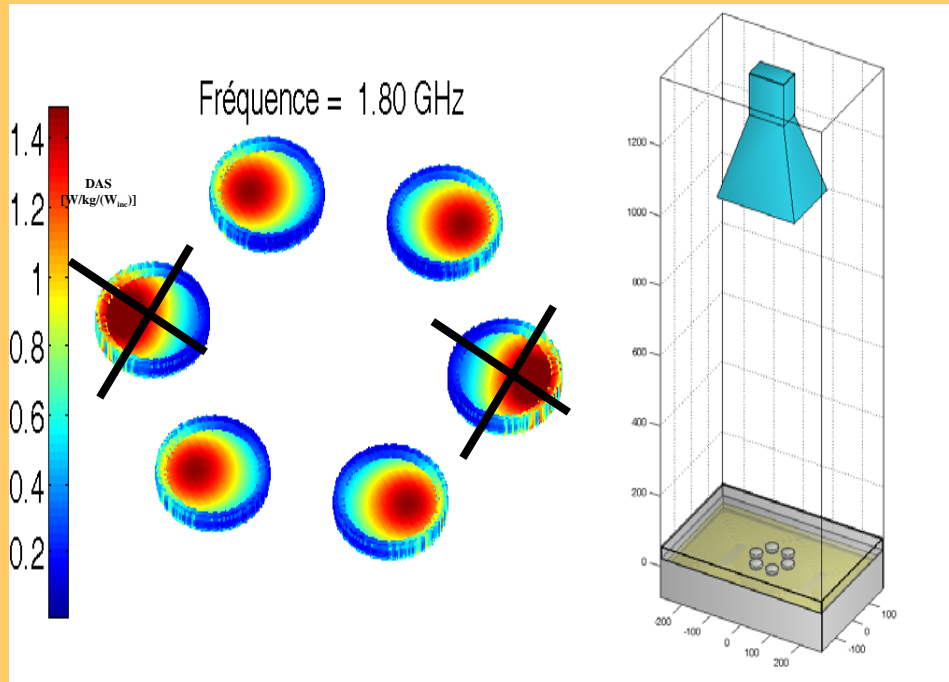
Les cellules exposées et non exposées sont incubées simultanément en présence de 4-NQO, pendant 2h à 37°C sous agitation douce. Chaque expérience est faite sur 3 ou 4 boîtes de culture /condition et répétée 6 fois.

Équipement pour exposition *in vitro*



- 3 chambres anéchoïques équipées avec des incubateurs thermostatés (prototypes). La température des cultures cellulaires, maintenue par circulation d'eau est contrôlée par un cryothermostat (± 0.1 °C).
- Une agitation des cellules par rotation se fait par un système mécanique relié à un moteur externe
→ Exposition homogène, répartition homogène + dissipation importante de la chaleur => élévation moindre de la température.
- L'ensemble totalement dépourvu de parties métalliques dans la zone exposée est relié à un système d'émission large bande
- Un dispositif peut être mis en place en chambre anéchoïque pour simuler les variations de température occasionnées par l'exposition (profil similaire de la courbe) en l'absence de rayonnement.

Dosimétrie par simulation numérique



Pour 1 W/m ² incident	Moyenne DAS	Ecart type
Boîtes 1, 2, 3, 4	0,82	0,40
Boîtes 5, 6	0,90	0,48

Valeurs de DAS moyen et écart-type dans les boîtes de Pétri exposées à 1.8GHz.

Distribution de DAS dans les boîtes de Pétri exposées à 1,8 GHz.

Le DAS est calculé de façon numérique (FDTD) + confirmé expérimentalement (mesures de champ électrique avec une sonde isotrope, mesures de température du milieu de culture avec un thermomètre à fibres optiques)

Mesures de température

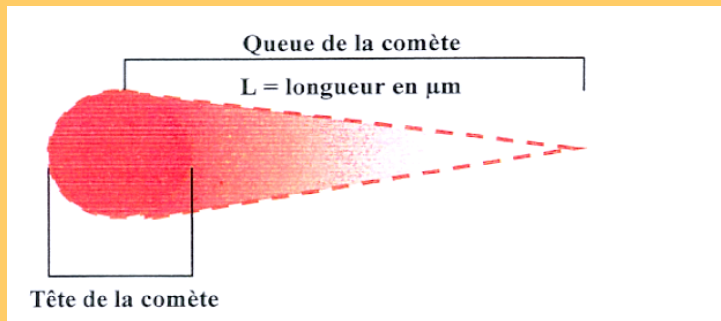
Mesure de température dans les boîtes de culture après 2h d'incubation sous exposition et dans les contrôles sans exposition (shams).

SAR (W/kg)	Sham	GSM
2	36,50 +/- 0,23	36,49 +/- 0,40
4	36,59 +/- 0,45	36,66 +/- 0,31
8	37,24 +/- 0,22	37,46 +/- 0,22
16	36,74 +/- 0,59	37,25 +/- 0,20

→ pas de variation de température due à l'exposition, quel que soit le DAS.

Test des comètes

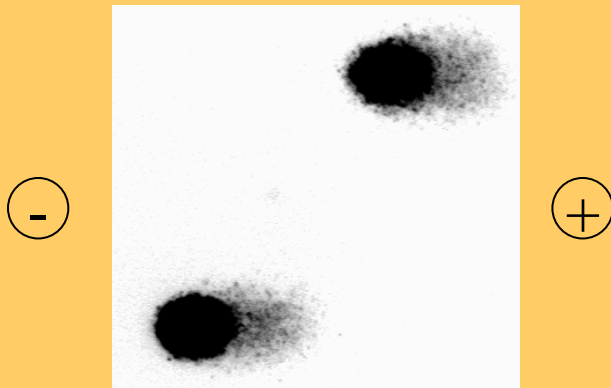
Les cellules sont incluses dans une fine couche de gel d'agarose sur une lame de microscope et incubées dans un tampon de lyse avant électrophorèse, coloration et analyse d'images.



Paramètre retenu
= Tail extent moment

$$TEM = L \times Q$$

(Q = quantité (%) d'ADN dans la queue)



Cellules THP1 traitées par 4-NQO

Pour chaque condition d'exposition:

- 3 boîtes de pétri,
- 2 lames par boîte - 100 cellules analysées par lame
- 6 répétitions
- (soit 18 boîtes, 3600 cellules observées)

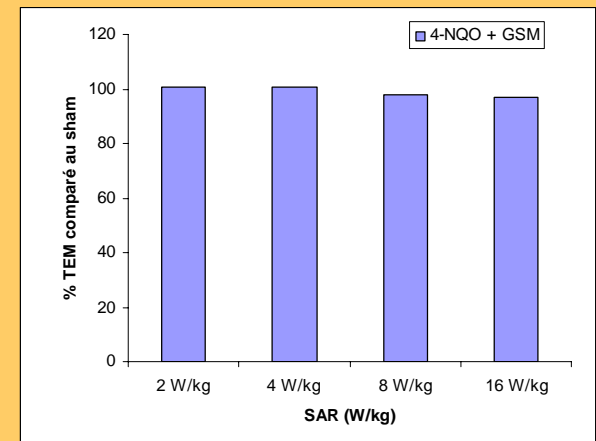
Cassures de l'ADN induites par 4-NQO + exposition à 1,8 GHz

COMETES

Valeurs de TEM des cellules exposées comparées aux cellules non exposées

Condition d'exposition	2 W/kg	4 W/kg	8 W/kg	16 W/kg
4-NQO + GSM	5,27 +/- 0,46	5,10 +/- 0,55	5,77 +/- 0,38	6,30 +/- 0,40
4-NQO - Sham	5,24 +/- 0,47	5,07 +/- 0,39	5,90 +/- 0,34	6,51 +/- 0,43

Statistical analysis of the data was performed with the Newman-Keuls *t* test.
Values are means \pm SD, data significant for *p* values ≤ 0.05 (sham versus exposed)



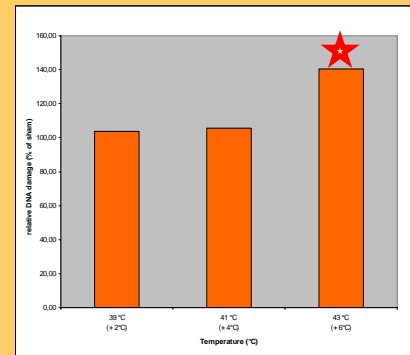
→ Pas d'effet combiné pour les DAS 4 et 8 W/kg

Effet de la température sur les cassures d'ADN induites par le mutagène



TEM moyen en fonction de la température

	39 °C	41 °C	43 °C
4-NQO	5,96 ± 1,01	6,92 ± 0,67	9,14 ± 1,75*
4-NQO (corresponding control, 37°C)	5,76 ± 0,82	6,55 ± 0,4	6,51 ± 0,54



→ augmentation de température supérieure à 4°C nécessaire détecter une augmentation du taux d'altération de l'ADN induit par le mutagène avec le test des comètes.

Utilisation d'un autre mode de détection des altérations du génome
moins fastidieux et sensible

➔ méthode H2AX

Immunofluorescence H2AX

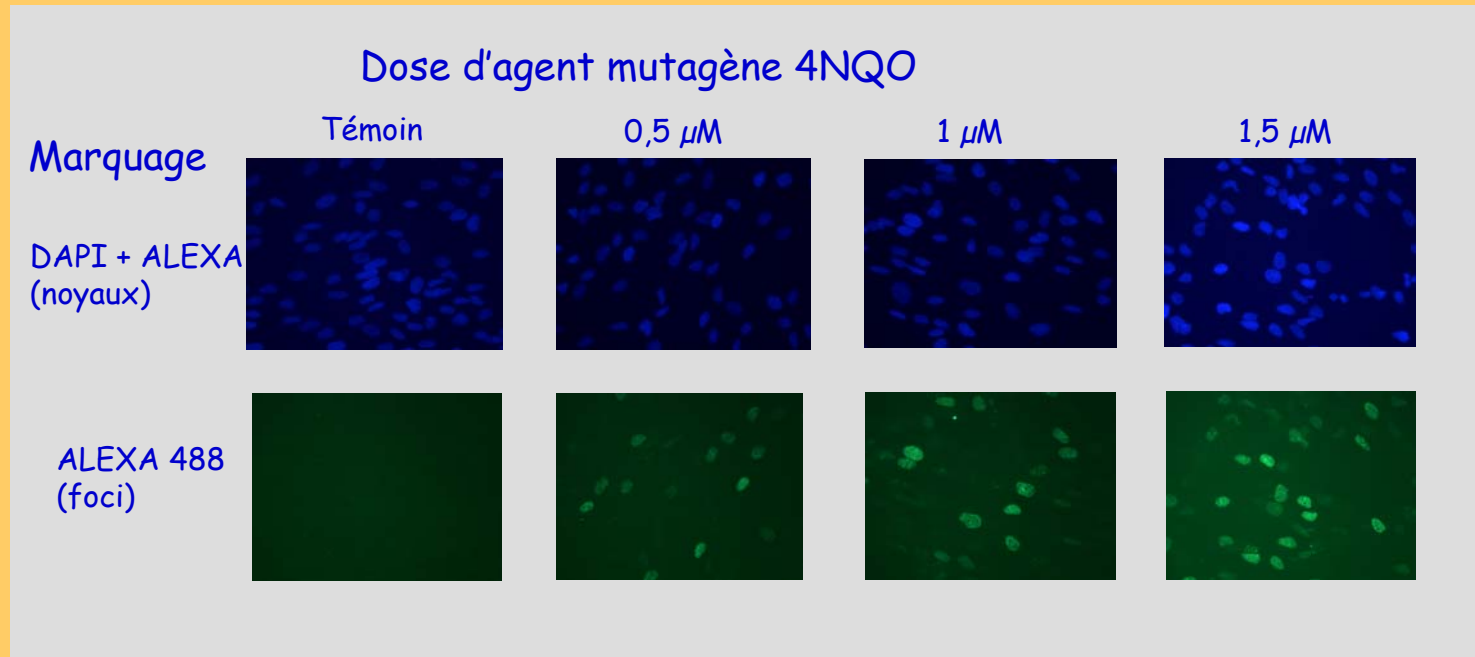
Technique permettant de repérer des dégradations minimales du matériel génétique par observation de phénomènes précoces liés à la réparation de l'ADN.

L'histone H2AX est une protéine connue pour être former des agrégats (foci) et être co-localisée très rapidement avec plusieurs types de protéines réparatrices au niveau des zones altérées.

La détection par immunofluorescence de ces protéines, activées en cascade en cas de dommage de l'ADN, permet d'amplifier les phénomènes observés, c'est une méthode récente et très sensible.

Validation de la technique

Le nombre de foci est proportionnel aux dommages du génome. L'activation a bien lieu sous l'effet du 4-NQO.



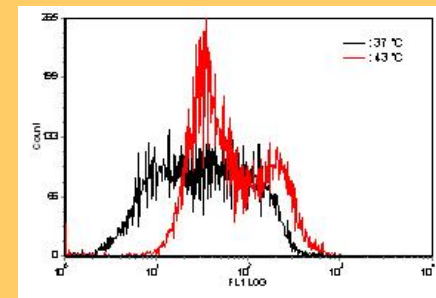
Détection quantitative par cytométrie en flux

Paramètre retenu : intensité de fluorescence

Pour chaque condition d'exposition:

4 boîtes de petri, 2 tubes/boîte, 20 000 évènements analysés/tube

6 répétitions (soit 28 boîtes, 960 000 cellules)

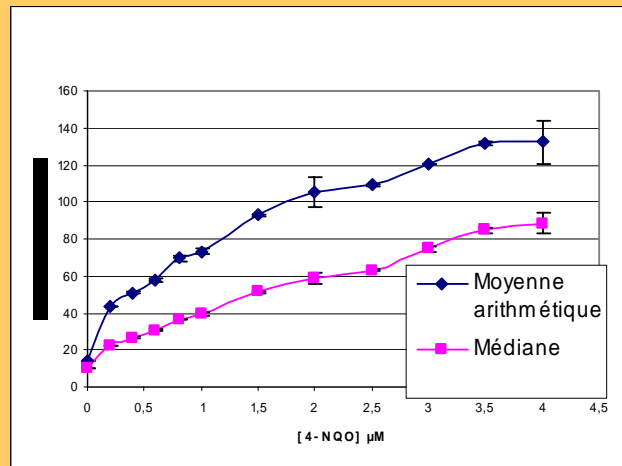


Pertinence du test H2AX

Vérification de la pertinence du test H2AX par cytométrie pour quantifier l'action du mutagène

Les cellules sont incubées avec le mutagène en concentration croissante pendant 2h à 37°C, le test H2AX est réalisé à l'issue de l'incubation.

D'autres expériences ont été faites pour vérifier s'il était préférable de faire le test juste après l'incubation ou plus tard, conformément à la littérature, l'activation H2AX est très rapide d'où un test dans la foulée de l'incubation.



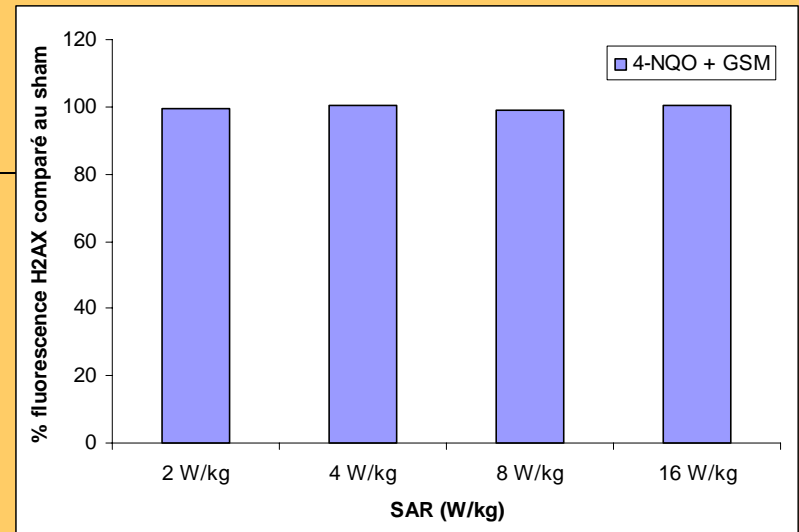
courbe effet/dose de l'effet du 4-NQO sur les cellules THP1 par la méthode H2AX

**1.8 µM 4-NQO donne une réponse modérée et pourra être utilisé
→ conditions similaires à celles employées pour le test des comètes.**

Immunofluorescence H2AX induite par 4-NQO + exposition à 1,8 GHz

Intensité de fluorescence des cellules exposées comparée à celle des cellules non exposées (sham)

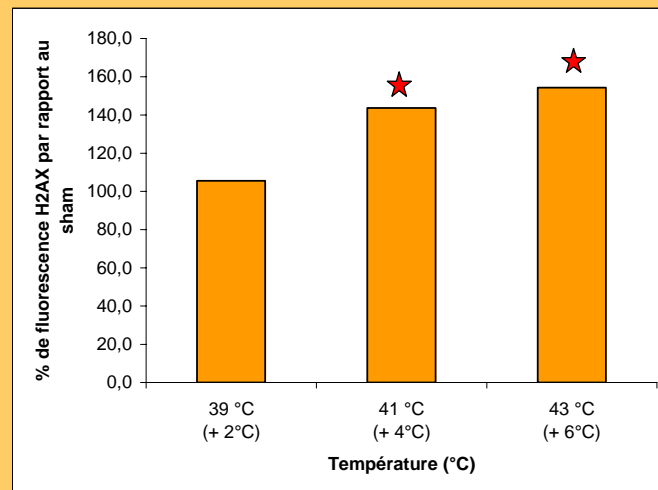
DAS	Sham	GSM
2 W/kg	36,50 +/- 0,23	36,49 +/- 0,40
4 W/kg	36,59 +/- 0,45	36,66 +/- 0,31
8 W/kg	37,24 +/- 0,22	37,46 +/- 0,22
16 W/kg	36,74 +/- 0,59	37,25 +/- 0,20



→ Aucun effet détectable par cette méthode, quel que soit le DAS

Effet de la température sur la détection H2AX

Condition d'exposition	39 °C	41 °C	43 °C
4-NQO	71,37 +/- 13,07	93,11 +/- 14,61	120,06 +/- 25,35
4-NQO Control 37 °C	67,61 +/- 17,83	64,78 +/- 13,61	77,82 +/- 18,07



➔ Foci détectables à partir de 41 °C

Conclusion

- *Un effet de la température apparaît à partir d'une élévation supérieure à 4°C lorsque la détection est faite avec le test des comètes.*

Par contre, il est détecté à partir d'une élévation de 4°C en utilisant la détection de l'H2AX.

- *Quelle que soit la méthode de détection des altérations du génome :*

l'effet induit par l'agent mutagène n'est pas significativement modifié par l'exposition à la fréquence 1,8 GHz-GSM pour des DAS variant de 2 à 16 W/kg.

➔ Poursuivre au-delà de 16 W/kg ?



IL VAUT MIEUX POMPER MÊME S'IL NE SE PASSE
RIEN QUE RISQUER QU'IL SE PASSE QUELQUE CHOSE
DE PIÈRE EN NE POMPANT PAS.

Contributions :

Maelle Freire
Christine Bachelet
Simon Pla
Alice Collin
Philippe Levêque
Jean-Claude Debouzy