

**FSRF2009/19**

## **Programme MAPHYS : micropuce à ADN pour études physiologiques**

D. Roux<sup>a</sup>, S. Girard<sup>a</sup>, S. Lallechere<sup>a</sup>, P. Bonnet<sup>a</sup>, E. Davies<sup>b</sup>, F. Paladian<sup>a</sup> et A. Vian<sup>a</sup>

<sup>a</sup>LASMEA, 63177 AUBIERE, France

<sup>b</sup>North Carolina State University, 7612 Raleigh, United States of America  
david.roux@univ-bpclermont.fr

Fondation Santé et Radiofréquences 2èmes Rencontres scientifiques Les 20 & 21 octobre 2009

D Roux, S Girard, S Lalléchère, P Bonnet, E Davies, F Paladian, A Vian Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand.

Résumé pour appel à communications Thème : Mécanismes physiologiques et moléculaires

Programme MAPHYS : micropuce à ADN pour études physiologiques

**Contexte et Objectifs** Le programme MAPHYS s'intéresse aux mécanismes moléculaires impliqués chez les kératinocytes humains en réponse à de courtes expositions à un champ électromagnétique haute fréquence (CEM HF) de faible amplitude (puissance inférieure aux limites européennes en vigueur). Une attention particulière est portée sur l'établissement d'un lien formel univoque entre l'exposition au CEM et une éventuelle réponse biologique. Ce travail bénéficie de l'acquis obtenu très récemment par notre équipe sur le modèle végétal tomate [1,2,3]. Trois critères importants sont retenus : un modèle biologique simple (culture de kératinocytes normaux), une exposition courte, un environnement électromagnétique parfaitement maîtrisé (Chambre Réverbérante à Brassage de Modes - CRBM). L'objectif principal de ce travail est de tester, de la manière la plus exhaustive possible, le potentiel de réponse de peau humaine à l'exposition au CEM HF. La méthode utilisée consiste à cribler des biopuces à ADN (microarrays) permettant de tester la réponse de la quasi-totalité du génome humain. Un paramètre physiologique est également mesuré, à savoir la concentration moyenne en ATP (principale source énergétique cellulaire). Parallèlement, cette étude a donné lieu à la détermination des paramètres statistiques du CEM généré en CRBM au voisinage des cellules, ainsi qu'à l'évaluation numérique et expérimentale du DAS (Dose d'Absorption Spécifique).

**Retombées attendues** Le programme utilise un système biologique simplifié (cultures de kératinocytes) pour explorer, au travers de puissants outils d'analyses, les réponses biologiques survenant suite à une exposition à un CEM de faible amplitude. Les informations recueillies sont donc essentiellement qualitatives et alimentent une base de connaissances des gènes dont l'expression est induite ou réprimée par l'exposition. Elles concernent les principales voies cellulaires (perception, métabolisme, réparation - protection) impliquées dans la réponse des kératinocytes humains à l'exposition au CEM HF. Des informations complémentaires sont également obtenues grâce à l'analyse en cinétique de réponse des cellules, ainsi que par leur sensibilité à la dose de CEM perçue (effet seuil par exemple). L'ATP constitue un autre marqueur, rendant compte de l'état énergétique cellulaire. La possibilité de pouvoir comparer les résultats obtenus pour deux conditions d'exposition différentes (durées et amplitudes de champs) ouvre des perspectives nouvelles d'analyses différentielles. Les aspects " physiques ", les mesures expérimentales et les simulations numériques permettront de préciser les caractéristiques d'exposition biologique maîtrisée pour une puissance et une fréquence donnée. Ce travail combine une approche novatrice sur le plan de l'analyse biologique (kératinocytes normaux / biopuces) et des moyens d'exposition (CRBM).

**Méthodes** Le programme MAPHYS est basé sur l'étude de cellules normales, c'est-à-dire non transformées. Notre choix s'est porté sur des kératinocytes (lignée NHEK - Promocell), cellules qui constituent l'épiderme et donc l'interface directe entre l'organisme humain et son environnement. De surcroît, ces cellules se développent en surface ce qui a permis la transposition des concepts expérimentaux développés par notre équipe pour la plante de tomate, notamment la proportion relative de cellules d'interface [4].

**Mise en place expérimentale** : il a tout d'abord été construit une enceinte de culture cellulaire thermo-régulée en tenant compte des contraintes de compatibilité électromagnétique. Son comportement vis-à-vis du champ électromagnétique généré en CRBM a été testé de manière intensive (transparence électromagnétique, conservation des propriétés d'isotropie et d'homogénéité), de même que la détermination des paramètres dosimétriques associés aux cultures de kératinocytes (adéquation du CEM aux normes en vigueur et lois de distributions, détermination du DAS, stabilité, mesures de températures...).

Cultures cellulaires : des échantillons de kératinocytes ont été produits pour l'approche gène-candidat ainsi que pour l'interrogation des biopuces. Les cellules sont produites par sous-culture (boîte de 35 mm de diamètre, 37°C, 5 % de CO<sub>2</sub>, en présence d'antibiotique et d'antifongique) et exposées au CEM HF lorsqu'elles atteignent 70-80 % de confluence (4 à 6 jours de culture, environ 2 millions de cellules par boîte).

Exposition électromagnétique : 1 heure avant l'exposition, les boîtes de culture (35 mm) sont placées dans des petits contenants en plastique de manière à piéger l'atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub>. Ces boîtes sont ensuite transférées dans le caisson thermo-régulé au sein de la CRBM. L'ensemble est alors exposé au CEM HF pendant 10 ou 30 minutes, DAS : 0.04 ou 0.25 W/kg, fréquence : 900 MHz.

Aspects dosimétriques : la caractérisation précise de l'environnement électromagnétique de test a permis d'établir les niveaux de DAS induits par les milieux de culture. Le cas d'un environnement réverbérant représentant un sujet peu ou pas abordé, les principales avancées dosimétriques réalisées cette année se sont appuyées sur des approches novatrices, à la fois expérimentales et numériques. Ainsi, les mesures ont été effectuées à partir d'une sonde de température : la valeur moyenne du DAS sur une rotation complète du brasseur a été obtenue à partir de 60 valeurs temporelles (à l'aide de trois séries différentes de mesures). Numériquement, l'estimation du DAS à l'intérieur même du milieu de culture a été obtenue à partir de la résolution des équations de Maxwell par la méthode des Différences Finies dans le Domaine Temporel (DFDT, FDTD en anglais). La difficulté posée par l'important facteur d'échelle existant entre les dimensions de la CRBM (200 m<sup>3</sup>) et le volume d'un milieu de culture (2 mL) a pu être résolue par une approche innovante pour des applications en bio-électromagnétisme (analogie entre le comportement CRBM et une sommation finie d'ondes planes en espace libre).

Approche gène-candidat et dosage d'ATP : immédiatement avant et après l'exposition électromagnétique (étude en cinétique), des échantillons sont prélevés et traités pour extraire l'ARN total (méthode tri-reagent) ou l'ATP (méthode acide perchlorique et dosage des protéines). L'ARN est utilisé en PCR quantitative en temps réel afin d'analyser les variations des gène-candidats choisis.

Biopuces : les échantillons sont prélevés 90 et 120 minutes après l'exposition au CEM puis l'ARN total est extrait avant d'être dosé. Après vérification de leur qualité, les échantillons sont envoyés à l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC, Strasbourg) pour le criblage de 8 biopuces : 4 par lot d'échantillons " exposés " / " témoins ". Le traitement statistique des données brutes et la validation par PCR quantitative des résultats sont ensuite réalisés par nos soins.

Avancement et Résultats Le projet MAPHYS est en cours de finalisation, il s'est décomposé en trois étapes successives :

1- Installation des conditions expérimentales, dosimétrie, mesure du taux d'ATP et développement d'une approche gène candidat nécessaire à la détermination des points chronologiques de la réponse des cellules pour la réalisation des biopuces. Les kératinocytes ont été exposés à un champ électromagnétique de 900 MHz, 8 V/m (valeur moyenne sur les points de mesure des valeurs maximales des composantes du champ électrique sur une révolution du brasseur), pendant 10 minutes. La valeur moyenne de DAS estimée à 0.04W/kg, a été normalisée à la valeur normative observée du champ électrique dans le caisson de culture pour une fréquence de 900MHz. D'un point de vue numérique, l'uniformité du DAS moyen à l'intérieur du milieu de culture a été illustrée (3/4 des cellules de calcul étant caractérisées par des données en DAS comprises entre 50 et 100% de la valeur maximale observée). Enfin, des expériences numériques supplémentaires ont permis d'estimer précisément la part extrêmement réduite des effets de couplages entre milieux de culture sur la détermination du DAS. Cette étape d'une durée de 10 mois s'est achevée avec succès, les résultats significatifs obtenus, bien que faibles, nous ont permis de sélectionner (pour la biopuce) les échantillons de cellules correspondant au temps 90 et 120 minutes après l'exposition électromagnétique.

2- Production des échantillons cellulaires, réalisation et interrogation des biopuces. La lecture et la production des données brutes issues des biopuces ont été sous-traitées à l'IGBMC de Strasbourg en raison de leur technicité et du matériel spécifique nécessaire. En revanche, le traitement statistique et l'analyse des données ont été réalisés par notre équipe. Cette étape de 8 mois est également achevée.

3- Validation expérimentale (3 mois). Le criblage des biopuces n'a fait ressortir que 16 différences significatives, correspondant à 13 gènes (0.3 à) parmi les 54000 séquences présentes. Neuf de ces marqueurs ont pu être testés par PCR quantitative, mais aucun d'entre eux ne montre de modification significative entre les conditions témoins et exposées. De surcroît, les différences repérées initialement via l'approche gène-candidat ne sont pas retrouvées parmi

les marqueurs différentiels de l'analyse des biopuces. Nous en concluons que les caractéristiques du CEM HF considéré dans cette étude n'ont pas d'influence (ou très peu) sur les kératinocytes humains normaux en culture.

Etape additionnelle (3 mois) : le même type d'expérimentation (mais à durée et puissance plus importantes : 30 minutes à un CEM HF de 41 V/m, DAS : 0.25 W/kg, 900 Mhz) est en cours de réalisation. L'objectif est d'étudier la réponse des kératinocytes à la suite d'une exposition proche des recommandations actuelles mais toujours en l'absence d'effets thermiques. Il sera alors intéressant de comparer les données issues de ce crible avec l'exposition à faible énergie. Ces travaux sont actuellement en cours de finalisation (production des échantillons cellulaires pour le criblage des biopuces). Conclusion L'avancement actuel du programme ne permet pas de conclure définitivement quant à la réalité de la réponse des kératinocytes humain à l'exposition au CEM HF. Il semble que les cellules de peau ne soient pas ou peu influencées par le rayonnement utilisé (900 Hz, 10 min, DAS : 0.04 W/kg). La comparaison de ces premiers résultats à l'expérimentation en cours permettra soit de confirmer cette conclusion soit de mettre en valeur des effets supplémentaires. Dans ce dernier cas, les recherches pourront se poursuivre sur les pistes métaboliques fournies.

Références 1. Roux D, Vian A, Girard S, Bonnet P, Paladian F, Davies E, Ledoigt G. (2008) High frequency (900 MHz) low amplitude (5 V m<sup>-1</sup>) electromagnetic field: a genuine environmental stimulus that affects transcription, translation, calcium and energy charge in tomato. *Planta*. 227:883-891.

2. Beaubois E, Girard S, Lallechere S, Davies E, Paladian F, Bonnet P, Ledoigt G, Vian A (2007) Intercellular communication in plants: evidence for two rapidly systemic signals generated in response to electromagnetic field stimulation in tomato. *Plant, Cell and Environment*. 30:834-844.

3. Roux D, Vian A, Girard S, Bonnet P, Paldian F, Davies E, Ledoigt G (2006) Electromagnetic fields (900 MHz) evoke consistent molecular responses in tomato plants. *Physiologia Plantarum*. 128(2):283-288.

4. Vian A, Faure C, Girard S, Davies E, Hallé F, Bonnet P, Ledoigt G, Paladian F (2007) Plants Respond to GSM-Like Radiations. *Plant Signaling and Behavior*. 2(6):522-524.

Nombre de mots du résumé: 1716

Mots-clé: Etude physiologique - micropuce ADN - Kératinocytes - CRBM

Thème: Mécanismes physiologiques et moléculaires

Session spéciale: Non spécifié(e)

Présentation: Pas de préférence

Équipement particulier: Vidéo-projecteur (beamer)