



HAL
open science

ÉTUDE DES EFFETS BIOLOGIQUES DES CHAMPS ÉLECTROMAGNÉTIQUES NON INVASIFS

I. Lagroye

► **To cite this version:**

I. Lagroye. ÉTUDE DES EFFETS BIOLOGIQUES DES CHAMPS ÉLECTROMAGNÉTIQUES NON INVASIFS. Sciences du Vivant [q-bio]. Ecole pratique des hautes études - EPHE PARIS, 2009. tel-00977980

HAL Id: tel-00977980

<https://theses.hal.science/tel-00977980>

Submitted on 5 May 2014

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.

Diplôme d'Habilitation à Diriger les Recherches

Présenté à
L'ECOLE DOCTORALE DE L'ECOLE PRATIQUE DES HAUTES
ETUDES N°472

par

Isabelle LAGROYE

**Étude des effets biologiques des champs électromagnétiques
non invasifs**

Soutenue le 18 décembre 2009 devant le jury d'examen :

Mme Marie-Christine LOMBARD, DE EPHE, Université Bordeaux 2	Directeur d'habilitation
Mme Francelyne MARANO, Professeur, EA 1553, Université Paris Diderot – Paris 7	Rapporteur
M. Paolo Vecchia, DR, Institut National de la Santé, Rome	Rapporteur
M. Sylvie Renaud, Professeur, UMR 5218, Université Bordeaux 1	Examineur
M. Roland MASSE, membre de l'Académie des sciences	Examineur
M. Jean-Michel VERDIER, DE EPHE, INSERM U710, Université Montpellier 2	Examineur
M. Bernard Veyret, DR CNRS, DECU EPHE, UMR 5218 Université Bordeaux 1	Examineur

Étude des effets biologiques des champs électromagnétiques non invasifs

INTRODUCTION	2
A- RAPPELS.....	5
1- Physique des champs électromagnétiques.....	5
2- Risques connus liés à l'exposition aux champs électromagnétiques.....	6
B- RECHERCHE.....	8
1- Systèmes d'exposition, dosimétrie et exposition	8
2- Études de confirmation d'effets biologiques des champs magnétiques et des champs radiofréquences.....	9
3- Etude d'effets biologiques des champs radiofréquences.....	13
4- Étude des effets des champs magnétiques EBF.....	18
C- EXPERTISE	21
D- RESUME DE LA PRODUCTION SCIENTIFIQUE.....	22
E- PERSPECTIVES.....	23
1- Champs électromagnétiques non invasifs et toxicologie	23
2- Champs électromagnétiques non invasifs et effets thérapeutiques	28
3- Mécanismes d'action des champs électromagnétiques non invasifs.....	31
BIBLIOGRAPHIE.....	33
ABREVIATIONS	36

Étude des effets biologiques des champs électromagnétiques non invasifs

Introduction

Depuis plus de dix ans, ma recherche porte sur les effets biologiques des champs électromagnétiques non invasifs. Pourtant, je suis venue au bioélectromagnétisme « par hasard ». Après mes études de pharmacie et mon DEA, le sujet de thèse sur lequel je postulai au CEA en 1992, concernait la recherche des marqueurs précoces de la cancérogenèse pulmonaire, avec des modèles utilisant le ^{238}Pu . Quelques semaines avant le dépôt du dossier, le sujet a été transformé en l'étude, sur des modèles cellulaires, des effets cancérogènes des champs électromagnétiques de 50 Hz. Il me fallait donner mon accord pour travailler pendant trois ans sur ce thème nouveau. Une rapide réflexion sur ce que j'avais pu entendre sur les dangers sanitaires des lignes à haute tension et la saga de la lutte contre EDF (le pot de terre contre le pot de fer) m'a fait accepter de me lancer dans cette aventure, car je pourrais, à travers mes recherches, avoir une approche scientifique.

Le domaine du bioélectromagnétisme m'était tout à fait inconnu, mais était également nouveau au CEA. Je devais donc, pour ma thèse, donner les spécifications d'un système d'exposition pour des cellules en culture. J'ai donc décortiqué les publications expliquant les notions nécessaires pour la conception et la caractérisation d'un système d'exposition : la configuration serait-elle verticale ou horizontale ? Les cellules devaient-elles être exposées en présence du champ géomagnétique ? Comment allait-on contrôler l'exposition ? De quels échantillons contrôles avions-nous besoin ? Bien que cette étape de conception ait pris une année entière de ma thèse, avec le recul, je pense qu'il s'agissait des meilleures conditions de travail pour appréhender ces notions de physique, si abstraites *a priori* pour une biologiste. Je ne serai jamais une physicienne, mais j'ai acquis une culture suffisante pour pouvoir discuter avec des physiciens et savoir détecter un problème dans un système d'exposition.

Dans le même temps, je bénéficiais de la culture et de l'outil « rayonnement ionisant », très utile pour palper la différence fondamentale dans la nature et l'amplitude des effets biologiques des ondes en fonction de l'énergie véhiculée. Par ailleurs, j'introduisis dans mes expériences la notion, qui me paraissait indispensable, d'expérimentation en aveugle par le codage des échantillons alors que mes collègues issus du monde « ionisant » n'en voyaient que peu l'utilité.

Au long des années, deux gammes de fréquences m'ont plus particulièrement intéressée : les champs magnétiques d'extrêmement basse fréquence (EBF) et les champs radiofréquences (RF). Le spectre électromagnétique est large et chaque gamme de champs électromagnétiques présentant des mécanismes d'action prépondérants différents et des problématiques différentes, mon intérêt pour le bioélectromagnétisme est sans cesse renouvelé.

L'environnement électromagnétique, et donc l'exposition aux champs électromagnétiques, existe depuis toujours. En revanche, le nombre de sources d'exposition a augmenté de façon inégale au cours de l'histoire humaine. La source primaire principale et omniprésente est le champ magnétique statique terrestre, appelé champ géomagnétique. Sa valeur moyenne est de 50 μT , le Tesla étant l'unité internationale de densité de flux magnétique. Dans l'antiquité, le savant grec Thalès fut le premier à s'intéresser à l'électricité, mais c'est à la fin du 18^{ème} siècle et surtout au 19^{ème} siècle que l'électricité artificielle fit son apparition et devint indispensable aux sociétés dites modernes.

Les télécommunications se développent également à partir du 19^{ème} siècle et trouvent une extension avec les nouvelles technologies de communication sans fil au siècle dernier. Des applications industrielles et médicales non invasives ont également été développées au cours des dernières décennies, comme l'imagerie par résonance magnétique (IRM), la stimulation magnétique transcrânienne et d'autres signaux électromagnétiques complexes. Au total, le nombre de sources d'exposition, généralement de faible puissance, ne cesse de croître et les développements technologiques se poursuivent, avec éventuellement de nouveaux usages qui peuvent parfois être à l'origine de nouveaux types d'exposition (Figure 1).

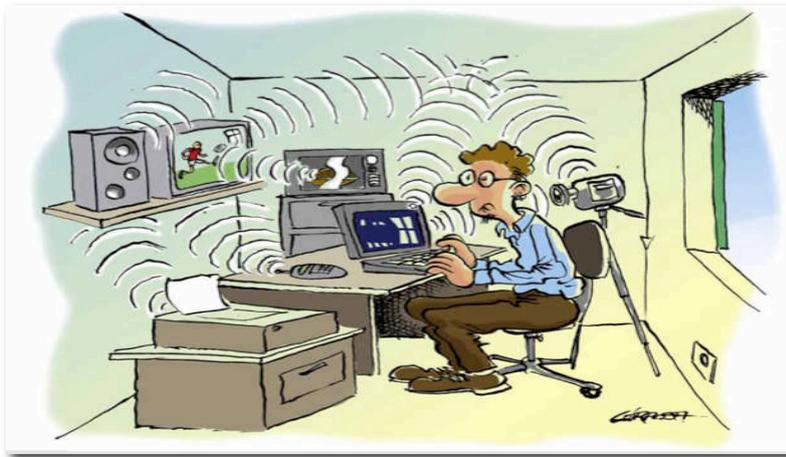


Figure 1 : L'environnement électromagnétique au 21^{ème} siècle.

Les sources de champs électromagnétiques se multiplient, mais leur puissance nominale est faible.

L'évaluation des risques liés à l'exposition aux champs électromagnétiques date du 20^{ème} siècle avec la notion de radioprotection et l'apparition des organismes dédiés à la radioprotection. Une distinction entre la radioprotection stricte (protection contre la radioactivité) et la protection contre les rayonnements non-ionisants ou champs électromagnétiques est intervenue dans les années 1960. En France, la Société Française de Radio Protection comporte une section « ionisant » et une section « non-ionisant ». Au plan international, à l'instar de la CIPR¹ pour les rayonnements ionisants, l'ICNIRP² est l'organisme qui propose les normes d'exposition aux rayonnements non-ionisants. Ces normes sont établies à partir de l'analyse collective des articles scientifiques parus dans des journaux à comité de lecture. C'est donc sur les connaissances scientifiques que se fait l'évaluation des risques liés à l'exposition aux champs électromagnétiques, et les propositions de limites d'exposition peuvent évoluer si les résultats des évaluations périodiques du risque le nécessitent.

Cependant, le développement de nouvelles technologies et/ou de nouveaux usages, la question des faibles doses et des expositions à long terme ont généré une demande sociétale forte et incité les industriels et/ou les autorités à financer de nouvelles recherches. Classiquement en toxicologie, le risque caractérisé est directement lié à la « dose » de l'agent en cause et c'est le cas ici des champs électromagnétiques. Aussi, généralement, les pathologies associées se développent rapidement et apparaissent de façon aiguë, exception faite du cancer. Implicitement, des expositions à des intensités ou puissances faibles, comme celles générées par les nouvelles technologies de communication sans fil par exemple, ne peuvent pas générer ces manifestations physiopathologiques. Pourtant, avec la téléphonie mobile, force est de constater que l'on approche, pour la première fois, une source RF près du cerveau. En revanche, les techniques d'IRM évoluent vers l'utilisation de champs magnétiques statiques intenses. Or, peu de

¹ CIPR : Commission Internationale de Protection contre les Radiations

² ICNIRP : International Commission on Non-Ionising Radiation Protection

recherches ont été menées avec des champs statiques intenses. Des questions sanitaires légitimes se posent alors quant aux effets sanitaires liés aux nouvelles technologies utilisant des champs électromagnétiques, et la recherche fournit des éléments de réponse.

Dans les années 1990, la thématique « santé-environnement » émerge avec, notamment, la question des enfants et leur possible plus grande sensibilité aux toxiques de l'environnement³. Les champs électromagnétiques ne sont pas toujours cités dans ces documents. En 1996, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) établit le Projet International pour l'étude des champs électromagnétiques (International EMF project). Ce projet se propose « d'évaluer les effets sanitaires et environnementaux provoqués par des champs électriques et magnétiques statiques ou variables dans les fréquences allant de 0 à 300 GHz ». Ainsi, l'OMS publie régulièrement des recommandations de recherche qui sont une référence incontournable pour les instituts de recherche. L'OMS justifie ce programme « au titre de sa Charte pour la protection de la santé publique et en réponse à la préoccupation suscitée par la possibilité d'effets sanitaires imputables à l'exposition à des sources de champs électromagnétiques ». Ainsi, des aspects sociétaux justifient également notre recherche.

En parallèle, la notion de principe de précaution s'est développée jusqu'à l'addition de la charte de l'environnement, et donc du Principe de Précaution, dans le préambule de la constitution française en 2005. Consacré dans le champ de la protection de l'environnement – il s'agit de ne pas attendre de disposer de toutes les certitudes scientifiques sur l'existence d'un risque de dommage grave et irréversible pour agir – ce principe demande « la mise en œuvre de procédures d'évaluation des risques » et la recherche doit être considérée comme un élément à part entière de ce principe.

Je présente dans ce document mes activités de recherche depuis ma soutenance de thèse en 1997. Mes recherches incluent des études de confirmation et des études originales dans une approche toxicologique qui s'inscrit pleinement dans la démarche d'évaluation du risque, processus dynamique qui tient compte des nouvelles données scientifiques. Je contribue ainsi à l'évaluation du risque à la fois par mes recherches et par l'activité d'expertise que j'exerce en parallèle, laquelle vise à recenser et évaluer les données scientifiques disponibles. Ce document présente un rappel succinct de la notion de champs électromagnétiques et des mécanismes d'action pour les interactions avec le vivant, puis une synthèse des travaux réalisés en cinq sections : (i) Systèmes d'exposition, dosimétrie et expositions ; (ii) Études de confirmation d'effets biologiques des champs magnétiques et des champs RF ; (iii) Étude d'effets biologiques des champs RF ; (iv) Étude d'effets biologiques des champs magnétiques et (v) Expertise. Viennent ensuite mes perspectives de recherche, pour les quatre prochaines années.

³ 1998 : création d'une mission interministérielle sur les questions « environnement-santé », 2004-2008 : Premier Plan National Santé-Environnement (PNSE), 2004 : L'OMS publie le premier atlas sur la santé de l'enfant et l'environnement.

A- Rappels

1- Physique des champs électromagnétiques

Les champs électromagnétiques qui sont considérés ici ont une fréquence inférieure à 300 GHz (Figure 2).

Toute onde est définie par sa fréquence ν (hertz, Hz) ou sa longueur d'onde λ (mètre, m).

Ma recherche actuelle porte particulièrement sur les champs électromagnétiques d'extrêmement basse fréquence (EBF) dans la gamme de 0,8 à 50 Hz et sur les champs radiofréquences (RF) dans la gamme de 800 à 2450 MHz.

Dans la gamme EBF, les applications technologiques auxquelles je me suis intéressée sont la production d'électricité (50 Hz en Europe) et la stimulation magnétique transcrânienne (TMS en Anglais).

Dans la gamme RF, les applications technologiques qui ont fait l'objet de mes recherches sont les signaux de la téléphonie mobile et des communications sans fil. La téléphonie 2G utilise les signaux GSM à 900 et 1800 MHz, la téléphonie 2,5 et 3 G utilise les signaux EDGE à 900 MHz et 1800 MHz et UMTS à 2000 MHz. En dehors de la téléphonie mobile, les communications sans fil utilisent majoritairement le signal Wi-Fi à 2450 MHz et le Wi-MAX en développement, dont la fréquence pourra aller de 2 à 5 GHz.

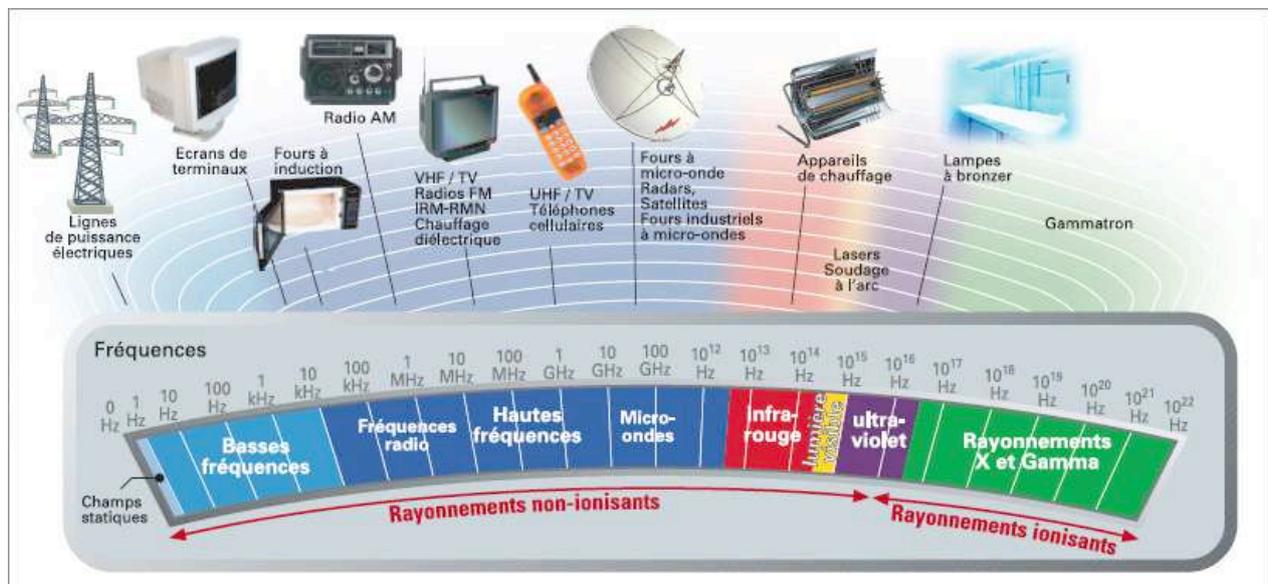


Figure 2 : Le spectre électromagnétique et ses applications technologiques. Les rayonnements non-ionisants sont souvent appelés champs électromagnétiques.

Les champs électromagnétiques sont des rayonnements non-ionisants. Les particules associées (photons) sont peu énergétiques, avec une énergie maximale de 10^{-4} electron-volt (eV), énergie largement insuffisante pour rompre les liaisons chimiques ou ioniser la matière vivante. Par exemple, l'énergie d'une des plus faibles liaisons chimiques, la liaison hydrogène, est de 0,2 eV. D'autres mécanismes d'interactions régissent l'existence d'effets biologiques et sanitaires⁴

⁴ Effet sanitaire : Par effet sanitaire, on entend danger sanitaire ou effet délétère pour la santé. Aussi, un effet biologique n'est pas obligatoirement un effet sanitaire.

caractérisés. En fonction de la gamme de champs électromagnétiques (champs EBF, champs RF, champs millimétriques, etc.) les mécanismes biophysiques d'interaction avec la matière vivante varient.

On peut noter que les champs électromagnétiques ne sont pas visibles à l'œil ce qui contribue probablement à la perception négative du risque lié à l'exposition aux champs électromagnétiques.

2- Risques connus liés à l'exposition aux champs électromagnétiques

Dans la gamme des champs électromagnétiques EBF, qui sont des champs variables dans le temps, l'interaction avec les systèmes biologiques est principalement le fait de l'induction de courants électriques internes (appelés courants de Foucault).

Le risque sanitaire caractérisé est lié aux courants induits dans les tissus qui provoquent l'excitation des muscles et des nerfs. À partir d'une intensité de densité de courant de 100 mA/m^2 , l'excitation devient délétère avec apparition de tétanie et de fibrillation ventriculaire pouvant entraîner un arrêt cardiaque.

Dans la gamme des champs RF, l'interaction avec les systèmes biologiques est principalement le fait d'un échauffement des objets par relaxation diélectrique.

Le risque sanitaire caractérisé est lié à l'échauffement excessif des tissus. Pour une même puissance incidente, l'absorption des RF par le corps entier est plus critique que l'absorption locale (au niveau d'une main par exemple). Le risque sanitaire est celui de l'hyperthermie : risque de brûlures, d'altération des fonctions cognitives, d'œdème cérébral, de tératologie, etc. Pour une exposition corps entier, le niveau d'énergie absorbée traduit en débit d'absorption spécifique (DAS) et entraînant des effets délétères, est de 4 W/kg . Pour une exposition locale, il est de 100 W/kg .

Ces niveaux de densité de courant et de DAS, appelés niveaux critiques par l'ICNIRP, servent de base pour les limites d'exposition des professionnels et du grand public (ICNIRP, 1998). Les recommandations et normes d'exposition européennes actuelles sont basées sur les limites d'exposition proposées par l'ICNIRP (Directive 1999/5/EC). Elles donnent, en fonction de la fréquence, (i) la restriction de base qui est la valeur à ne pas dépasser dans l'organisme pour prévenir tout effet délétère et (ii) les niveaux de référence qui sont les valeurs limites de grandeurs physiques qui garantissent que la restriction de base est respectée. Ces valeurs mesurables sont le champ électrique (V/m), la densité de flux magnétique ou induction magnétique (T), le champ magnétique (A/m) et la densité de puissance (W/m^2).

B- Recherche

1- Systèmes d'exposition, dosimétrie et exposition

Permanents: I. Lagroye, B. Billaudel, E. Haro (Biologie) B. Veyret, G. Ruffié, R. Charlet de Sauvage (Physique)
Contractuels : P.E. Dulou (Doctorant, Physique)
Collaborations : X-LIM (France), France-Telecom R&D (France), ITIS (Suisse)

L'étude des effets biologiques et sanitaires des champs électromagnétiques sur des modèles cellulaires ou animaux passe par la mise à disposition et l'utilisation de systèmes d'exposition. La recherche en bioélectromagnétisme requiert donc une collaboration active entre physiciens et biologistes.

Cette collaboration implique une concertation continue qui permet d'une part d'exprimer les besoins des biologistes, et d'autre part de comprendre et *in fine* de gérer les contraintes imposées par la physique. En effet, un système d'exposition et sa caractérisation dosimétrique doivent aujourd'hui répondre à des requis de qualité incontournables. Ces mêmes requis impliquent pour les biologistes des contraintes à gérer au quotidien. Dans ce contexte, l'interface avec les physiciens du laboratoire permet cette adéquation, et lisse les nombreuses sources possibles d'incompréhension entre nous, biologistes, et les physiciens extérieurs avec lesquels nous collaborons pour la conception des systèmes d'exposition.

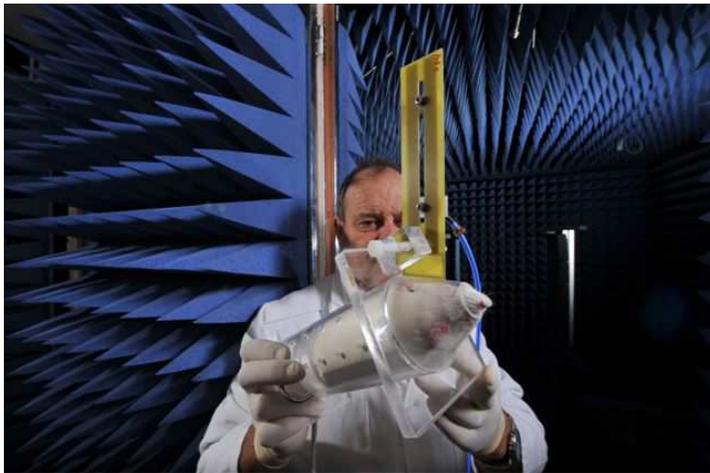
Mon premier travail de thèse a été de déterminer les paramètres physiques des expositions que je souhaitais effectuer. M'intéressant à l'effet du champ magnétique à 50 Hz sur les cellules épithéliales de trachée de rat, j'ai opté pour une configuration en champs parallèles à l'échantillon. Des physiciens ont élaboré un système d'exposition respectant cette configuration. La nécessité de caractériser l'exposition m'est vite apparue cruciale et j'ai pour cela effectué des mesures de champ pendant l'exposition. Plus tard, lorsque j'ai commencé à exposer des cellules aux RF au moyen d'un système d'exposition nouvellement développé, une des premières étapes de caractérisation a été d'inclure une boîte de pétri dans laquelle était placée une sonde de température pour une mesure en temps réel dans le milieu de culture. En effet, le contrôle de la température est particulièrement important pour les expositions aux RF et nombre d'effets biologiques des radiofréquences de bas niveau ont été obtenus en l'absence de ce type de contrôle.

Ce n'est qu'à partir de mon post-doctorat aux USA que j'ai commencé à travailler *in vivo*. Pour éviter ou limiter les problèmes d'échauffement chez l'animal, nous veillions à la présence de trous d'aération et de ventilation dans les systèmes d'exposition. Si des techniques automatisées de mesure de température et de niveau d'exposition sont maintenant disponibles, la caractérisation de l'exposition est à mes yeux de la première importance et c'est un aspect auquel je veille particulièrement.

Pour les nouveaux systèmes d'exposition, je demande toujours la possibilité d'exposer les échantillons en aveugle. C'est ce que nous avons obtenu dans les programmes PerformB, ERYA et ELEYAR décrits plus loin. Lorsque le système d'exposition ne permet d'exposer en aveugle, une personne est alors en charge de l'exposition et du codage des échantillons, et d'autres collègues en charge des tests biologiques. Travailler en aveugle est particulièrement important au vu des faibles amplitudes des effets généralement rapportés.

Les aspects dosimétriques tels que l'homogénéité de l'exposition représente également une contrainte importante pour les biologistes. Il s'agit par exemple :

- (i) de l'utilisation imposée de boîtes de culture de diamètre réduit, réduisant ainsi la surface de culture cellulaire et donc la taille des échantillons cellulaires,
- (ii) de la nécessité d'immobiliser les animaux dont on veut exposer la tête seulement (Figure 4) et donc d'introduire un facteur de stress que l'on limite par une période d'habituation au système de contention et une durée d'exposition journalière inférieure à deux heures, ou encore
- (iii) de la nécessité de limiter le poids d'animaux exposés et donc d'augmenter la période dédiée aux expositions pour obtenir un échantillonnage satisfaisant.



*Figure 4 : Système d'exposition dit «antenne boucle »
Ce système permet d'obtenir chez le rat une exposition du cerveau similaire à celle du cerveau humain au cours d'une conversation téléphonique. Son utilisation nécessite une immobilisation du rat.*

En conclusion, chaque type de champ électromagnétique présente des caractéristiques physiques clés que je dois identifier, grâce à mes recherches bibliographiques et à mes collègues physiciens, pour rédiger des programmes concrets et lucides par rapport aux contraintes afférentes à l'exposition et à la dosimétrie.

Ce sont ces aspects physiques des expositions aux champs électromagnétiques qui ont amené la biologiste que je suis, à communiquer avec des physiciens, ce qui représente un apprentissage de langage pour ces deux communautés scientifiques.

2- Études de confirmation d'effets biologiques des champs magnétiques et des champs radiofréquences

Permanents : I. Lagroye, B. Billaudel, E. Haro, B. Veyret

J'ai initié et contribué à plusieurs études dites de "réplication ou de confirmation"⁶ à partir de résultats publiés antérieurement par d'autres équipes sur des effets biologiques de RF de faible puissance, en particulier de signaux de téléphonie mobile. Cette activité est importante en bioélectromagnétisme car de nombreux effets biologiques rapportés, notamment *in vitro*, ont amené à des hypothèses et extrapolations en termes de santé publique alors que ces résultats étaient dus à des artefacts. Ainsi, l'OMS a estimé en 1997 que la démonstration de la reproductibilité d'effets biologiques dans des laboratoires indépendants constituait une priorité de recherche.

Plusieurs thèmes ont été choisis pour confirmation du fait de leur importance potentielle en santé publique. Ces études ont été réalisées dans le cadre de collaborations internationales.

⁶ Les études de confirmation ont pour but de tester des conditions similaires à celles utilisés dans des publications montrant des effets biologiques potentiellement toxiques. Elles peuvent effectivement confirmer ou infirmer les études précédentes, le second étant largement le plus fréquent.

Les programmes rédigés ont visé non seulement à reproduire les expériences en utilisant les conditions les plus proches des conditions expérimentales initiales, mais aussi à améliorer le protocole et étendre l'étude (autres signaux RF, autres types cellulaires ou autres tests biologiques).

2-1 Barrière hémato-encéphalique et neurones sombres

Publications : Poulletier de Gannes et al. 2009, 2 communications en congrès

Encadrement : M. Taxile (diplôme EPHE puis IE contractuelle), F. Poulletier-de-Gannes (post-doc puis IR contractuelle), E. Ladevèze (Tech. contractuelle), L. Mayeur (Tech. contractuelle)

Collaboration : Brooks Air-Force (USA), National Institute of Public Health (Japon), X-LIM, (Limoges, France)

Animation de la recherche: Responsable du programme

Contrat : France Telecom R&D, Bouygues Telecom

J'ai été l'initiatrice du programme dont le but était de confirmer les résultats publiés par Salford et al. (2003) montrant une altération de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et l'apparition de neurones dégénérés dits neurones sombres dans le cerveau de rats exposés corps-entier à 900 MHz et à des DAS faibles (0,02 à 0,2 W/kg).

La première étape a été une analyse critique de l'article avec l'identification de possibles biais. J'ai ainsi pu déterminer la nécessité d'harmoniser les groupes d'animaux en termes d'âge et de sexe par opposition à l'étude de référence. Ensuite, j'ai recherché une technique plus spécifique pour la mise en évidence de neurones dégénérés, le crésyl violet utilisé dans l'étude originale étant considéré comme peu spécifique de ce type de dommage. Le Fluoro-Jade et plus particulièrement son dérivé Fluoro-Jade B a été sélectionné à cet effet. Enfin, la cause exacte de la dégénérescence donnant naissance aux neurones sombres est encore inconnue, mais l'apoptose est une des pistes les plus intéressantes. Nous avons donc recherché en parallèle la présence de neurones sombres et la présence de neurones en apoptose pour tester cette hypothèse, Afin de donner une pertinence renforcée à ce programme et aux résultats qui en découleraient, nous l'avons intégré dans une collaboration avec des équipes Américaine et Japonaise sur un protocole que j'ai rédigé et qui a été discuté puis validé de façon collégiale.

Le programme a fourni, à ce jour et dans tous les laboratoires impliqués, des résultats qui ne confirment pas les effets publiés originellement (Figure 5).

Ce travail a trouvé une extension avec un programme qui a utilisé des signaux plus récents de communication sans fil, les signaux GSM-1800 et UMTS (voir chapitre 3-2).

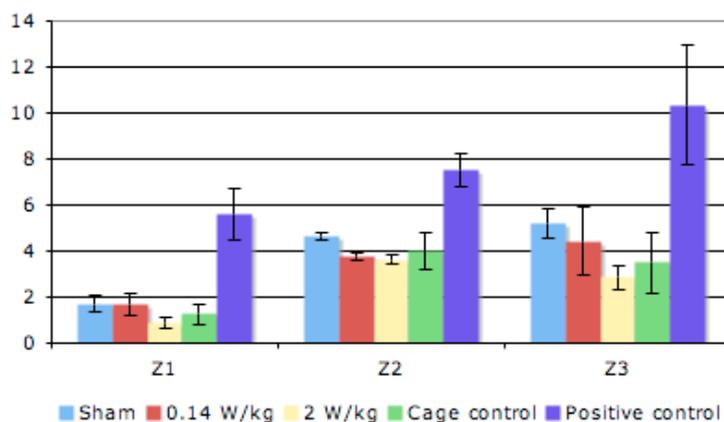


Figure 5 : Effet du GSM-900 sur la BHE

Absence de fuite d'albumine dans le cerveau de rats 50 jours après une exposition tête-seule au GSM-900, pendant 2 heures et à différents DAS; résultats sur 8 animaux par groupe dans trois zones du cerveau (Z1 : frontale, Z2 : médiane, Z3 : postérieure).

2-2 Génotoxicité

Publications : I. Lagroye et al. 2004, 6 communications en congrès, Rapports aux sponsors

Encadrement : S. Sanchez (diplôme EPHE, thèse Bordeaux I)

Collaboration : IMS-MCM-BioEM (ex PIOM), Pessac, France (post-doctorat), X-LIM, Limoges, France

Contrat : Motorola

Mon post-doctorat au Mallinckrodt Institute of Radiology (Washington University, Saint Louis, Missouri, USA) a consisté en partie à confirmer les données montrant qu'un signal radiofréquence à 2450 MHz (type radar) pouvait induire des lésions de l'ADN dans les cellules du cerveau de rats. Dans un premier temps, j'ai réalisé une étude de confirmation avec un test biologique appelé test des comètes, accepté en toxicologie pour sa sensibilité et largement utilisé en toxicologie générale, environnementale et industrielle. Cependant, il n'existe pas de protocole standard pour ce test et de multiples adaptations sont réalisées dans les laboratoires. Le principe consiste en une électrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN de cellules isolées qui permet *in fine* de visualiser une image de comète : la « tête » de la comète représente l'ADN intact qui n'a pas migré et la « queue » de la comète représente l'ADN lésé qui a migré.

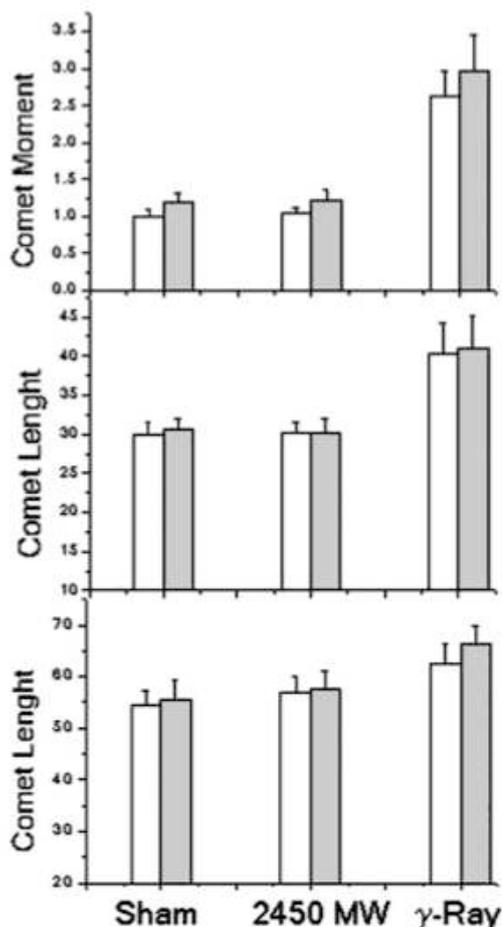


Figure 6 : Effets d'un signal à 2450 MHz sur les lésions de l'ADN.

Lésions de l'ADN dans les cellules du cerveau de rats exposés à un signal micro-onde pulsé à 2450 MHz. Sham : animaux exposés facticement ; 2450 MW : animaux exposés corps entier à 1,2 W/kg pendant 2 heures ; γ-rays : animaux exposés corps-entier à 1 Gy de rayonnement gamma. La longueur moyenne de comète (μm) et le moment moyen des comètes sont donnés pour 11 animaux par groupe. Les résultats obtenus avec la version de Singh (graphe du bas) et la version d'Olive (deux graphes du haut) sont montrés. Les barres blanches représentent les données obtenues sans protéinase K (PK), tandis que les barres grises représentent celles obtenues avec un traitement à la PK, typique de la version de Singh.

Je n'ai pas retrouvé la présence de lésions dans l'ADN cellulaire dans mes expériences, différence qui pouvait être attribuée aux différences techniques dans les tests utilisés dans chaque laboratoire. J'ai donc entrepris une collaboration avec l'équipe de Bernard Veyret afin de réaliser sur les cellules du cerveau d'un même animal, les deux versions du test des comètes (version de « Singh » et version « d'Olive »). Les résultats n'ont pas révélé de lésions de l'ADN quelle que

soit la technique utilisée (Figure 6)⁷. Les effets observés précédemment pouvaient donc être attribués à un biais dans le mode d'euthanasie des animaux et/ou dans la phase d'analyse d'images. De plus, le paramètre choisi (longueur de la queue de la comète) s'est révélé le plus subjectif parmi les différents paramètres maintenant disponibles pour l'analyse des images de « comètes ».

Plus récemment, un groupe autrichien a montré l'induction de lésions de l'ADN cellulaire après exposition au signal GSM-1800 (Rapport REFLEX, 2004; Diem *et al.*, 2005). Dans cet article, certains types de cellules, comme les fibroblastes de peau humains, se révèlent sensibles, tandis que d'autres, en particulier les lymphocytes humains – les cellules les plus fréquemment testées en génotoxicité – ne répondent pas à l'exposition aux RF. De plus, une exposition intermittente (ON/OFF) génère plus de lésions qu'une exposition continue dans le temps.

Mon expérience de l'étude de la génotoxicité de signaux RF à 900 et 2450 MHz et mes activités d'expertise sur les effets *in vitro* des champs électromagnétiques m'ont amenée à me poser la question de la réalité d'une sensibilité cellulaire différentielle à l'exposition au signal GSM-1800. Des cellules de peau humaine et des cellules nerveuses ont été utilisées comme modèles cellulaires. Sur le plan technique, nous avons utilisé, dans ce programme, un logiciel d'analyse d'images pour quantifier les lésions de l'ADN et non une évaluation visuelle comme dans l'article initial. Ce travail de confirmation a été inclus dans un projet plus vaste de l'étude des effets biologiques des nouveaux signaux de communication sans fil. Les résultats obtenus n'ont pas confirmé les données publiées par le groupe autrichien. Il s'avère aujourd'hui que ces données pourraient être issues d'une fraude scientifique (Vogel, 2008).

2-3 Autres travaux de confirmation

J'ai contribué à d'autres travaux de confirmation, en particulier sur l'activité de l'enzyme Ornithine Décarboxylase (ODC) et l'affinité du récepteur 5-HT1B à la sérotonine.

Ornithine décarboxylase

Publications : Billaudel *et al.*, 2009a, Billaudel *et al.*, 2009b, 2 communications en congrès

Encadrement : M. Taxile (diplôme EPHE)

Contrat : Mobile Manufacturing Forum, GSM Association

Collaboration : Université de Kuopio (Finlande), IT'IS (Zürich, Suisse)

Animation de la recherche: Responsable du volet *in vitro* de PerformB

Ce travail s'inscrit dans le cadre du projet européen PerformB, coordonné par notre laboratoire et qui rassemblait sept équipes de recherche européennes. Responsable du volet *in vitro*, j'ai identifié, pour écrire ce projet, les résultats obtenus sur des modèles cellulaires et méritant confirmation. J'ai contribué au montage des phases (« livrables ») du projet qui devait fournir un maximum d'informations scientifiques (confirmation, extension à des signaux et des types cellulaires différents) et permettre, le cas échéant, une confirmation des résultats « positifs » dans le laboratoire partenaire. Enfin, j'ai réalisé un travail de recueil des données des différents laboratoires et d'harmonisation pour la rédaction des rapports scientifiques.

Les effets publiés sur l'ODC (Penafiel *et al.*, 1997) étaient intéressants à deux titres : (i) plusieurs publications d'un même groupe procuraient un faisceau de résultats cohérents, (ii) le système

⁷ Ces résultats obtenus pendant mon post-doctorat en 1998-1999 ont été publiés en 2004.

d'exposition n'était pas caractérisé. Les travaux montraient une augmentation d'un facteur 2,5 de l'activité de l'ODC, enzyme impliquée dans la synthèse des polyamines et donc dans la prolifération cellulaire, dans des fibroblastes L929 exposés à un signal américain (DAMPS-835 MHz, 2,5 W/kg, 8 heures). La dosimétrie a montré que l'exposition avait, en fait, été réalisée à 6 W/kg avec un échauffement probable des cellules. Nous n'avons pas pu reproduire ces résultats, à l'instar de deux autres groupes de recherche (Desta et al., 2003 ; Höytö et al., 2007).

Récepteurs 5 HT-1B

Publication : Espinosa et al. 2005, 2 communications en congrès

Encadrement : J. Espinosa (doctorant, Bordeaux I)

Contrat : EDF

Collaboration : RTE (système d'exposition), ENEA (Italie)

Dans la gamme des champs magnétiques EBF, un résultat publié par un groupe de l'Institut Pasteur a attiré mon attention : il s'agissait de la diminution de l'affinité du récepteur 5-HT1B pour la sérotonine, neuro-méiateur majeur, sous exposition à un champ magnétique 50 Hz et 0,6 mT (Massot et al., 2000).

J'ai suivi le déroulement de ce programme en co-encadrant les travaux de thèse de J. Espinosa. Dans ce cadre, les résultats ont confirmé les données publiées. L'étude de l'influence des paramètres physiques du champ magnétique avait même montré le rôle de l'intensité du flux magnétique puisque la diminution d'affinité était observée à 1100 μ T mais pas à 500 μ T. Cependant, lorsque des études de fonctionnalité (diminution de l'inhibition de la synthèse d'AMPC) ont été réalisées dans le cadre d'un post-doctorat (H. Masuda), aucun effet n'a été observé. Ce fait a été corrélé à l'impossibilité de retrouver l'effet initial par ce chercheur. L'absence d'effet fonctionnel, méticuleusement vérifiée, indique que l'effet initial observé sur l'affinité de la sérotonine pour son récepteur 5HT1B serait soit insuffisant pour provoquer un effet fonctionnel, soit du à un artefact que nous n'avons pas pu identifier à ce jour.

Ceci montre encore combien il est difficile de détecter un effet biologique des champs magnétiques 50 Hz en dessous de 5 mT.

3- Etude d'effets biologiques des champs radiofréquences

Une application technologique majeure des champs RF est représentée par les communications sans fil. Les fréquences utilisées vont de 800 à 2450 MHz. De nombreuses études ont été réalisées sur les effets biologiques des RF, en particulier autour de 2450 MHz, fréquence des fours micro-ondes, et à des niveaux de puissance allant jusqu'à 240 W/kg.

En ce qui concerne plus spécifiquement la téléphonie mobile, un nouvel usage a été introduit en plaçant une source RF près de la tête. Ceci a engendré des questionnements légitimes sur les effets sanitaires éventuels. Ces interrogations apparaissent légitimes en termes de santé publique, dans la mesure où près de quatre milliards de personnes utilisent un téléphone portable dans le monde.

J'ai initié plusieurs projets scientifiques inscrits dans des programmes nationaux et internationaux, industriels et/ou publics. Le thème est la recherche d'effets toxicologiques au niveau des deux organes absorbant majoritairement les RF émises par un téléphone mobile, le cerveau et la peau. Les études sont menées sur des modèles cellulaires et animaux.

L'hypothèse testée est qu'une exposition à des RF entraîne une réponse de stress cellulaire. Les marqueurs de stress étudiés *in vitro* et *in vivo* sont la présence de lésions dans l'ADN cellulaire, la mort cellulaire programmée, l'expression de protéines de choc thermique et de la protéine NOS2,

et la réaction inflammatoire cellulaire. Une approche génomique a également pu être mise en œuvre *in vitro*. L'approche *in vivo* a permis de rechercher la mise en place de processus physiopathologiques comme des altérations structurales au niveau de la peau, une perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique et la présence de neurones dégénérésents. De plus, cette approche a permis de réaliser des études comparatives entre exposition unique et expositions répétées aux RF.

3-1 Études sur la peau

Publications : Sanchez et al. 2006a, Sanchez et al. 2006b, Sanchez et al. 2007, Sanchez et al. 2008, 7 communications en congrès, Rapports aux sponsors.

Permanents : B. Billaudel, I. Lagroye, E. Haro, B. Veyret

Contractuels : H. Masuda (post-doctorant)

Encadrement : S. Sanchez (Diplôme EPHE, thèse Bdx 1), M. Taxile (Diplôme EPHE)

Contrats : France Telecom R&D, Bouygues Telecom

Collaboration : X-LIM, Limoges, France, IT'IS (Zürich, Suisse), Laboratoire de défense cellulaire et des facteurs de régulation, EA1915, (Université Bordeaux1, France)

Animation de la recherche: Co-Responsable (avec Bernard Billaudel) du programme « nouveaux signaux » France Telecom R&D / Bouygues Telecom

La peau est le premier organe exposé et absorbe 25% des ondes émises par un téléphone mobile. Nous avons été l'un des premiers laboratoires à nous intéresser à la peau comme cible potentielle des champs RF de la téléphonie mobile.

Un travail global a été entrepris et ma contribution s'est située majoritairement au niveau de l'approche *in vitro*. Pour déterminer si des cellules humaines de la peau (fibroblastes et kératinocytes) présentent une réponse de stress sous exposition à des signaux de type GSM-900 et GSM-1800, les modèles de cellules humaines normales et d'épiderme reconstruit humain normal ont été choisis afin de respecter au mieux la situation réelle. Ce sont des modèles lourds à mettre en œuvre par rapport aux lignées cellulaires transformées, qui ont été mis en place dans le cadre de la thèse de S. Sanchez. Les modèles cellulaires ont été exposés au GSM-900 ou au GSM-1800 à un DAS de 2 W/kg, jusqu'à 48 heures pour les cellules et jusqu'à 5 semaines pour les épidermes reconstruits. Les systèmes d'exposition étaient l'antenne fil-plaque (900 MHz) et le guide d'onde (1800 MHz).

In vivo, des rats ont été exposés aux mêmes signaux. Ils ont été soumis à une exposition unique de 2 heures ou à des expositions répétées de 2 heures par jour, 5 jours par semaine, pendant 12 semaines. Un niveau de puissance élevé, 5 W/kg, a été testé pour les expositions uniques, et deux niveaux 2,5 W/kg et 5 W/kg ont été utilisés pour les expositions répétées. La peau des animaux était exposée au moyen d'une antenne-boucle au niveau d'un des flancs. Des biopsies de peau ont été prélevées sur le flanc exposé et le flanc contra-latéral servant de contrôle interne. Les paramètres étudiés étaient l'épaisseur de l'épiderme, la prolifération cellulaire au niveau de l'épiderme et du derme, de même que la densité de filagrine, de collagène et d'élastine. L'expression des protéines Hsc70, Hsp70 et HSP25/27 a également été recherchée.

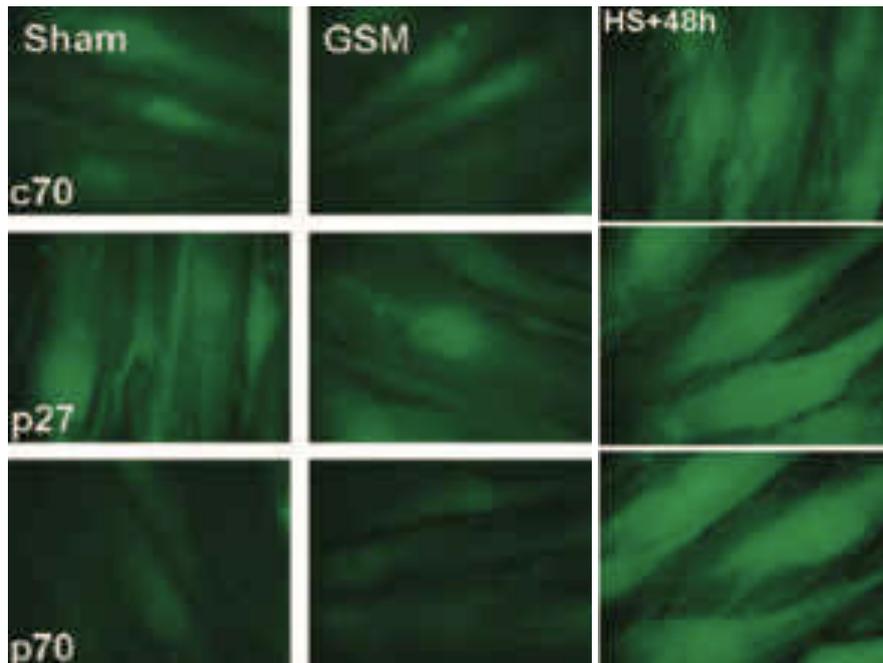


Figure 7 : Effet du GSM-1800 sur les cellules de la peau. Effet d'une exposition de 48 heures au GSM-1800 (2 W/kg) sur l'expression d'Hsc70 (c70), Hsp27 (p27) et Hsp70 (p70) dans les fibroblastes primaires humains.
 Sham : exposition factice ; GSM : GSM-1800 ; HS+48 h : Choc thermique (45°C dans un bain-marie, 20 min) plus 48 heures de repos.

Nos résultats ne montrent aucun effet du GSM-1800 sur la peau *in vitro* (Figure 7) et *in vivo*. Après exposition au GSM-900, les seuls effets détectés sont une diminution d'Hsc70 dans les fibroblastes en culture et une augmentation d'Hsp70 dans les épidermes reconstruits humains cultivés pendant plusieurs semaines. Les effets observés *in vitro* suggèrent, en l'absence d'effets sur les autres paramètres cellulaires et chez l'animal, que les interactions cellulaires et/ou la thermorégulation *in vivo* préviennent toute réponse de stress cellulaire.

3-2 Études sur le cerveau

Publications : 26 communications en congrès, Rapports aux sponsors

Permanents : I. Lagroye, B. Billaudel, E. Haro, B. Veyret

Contractuels : M. Taxile (Tech puis IE), E. Ladevèze (Tech), L. Mayeur (Tech)

Encadrement : M. Laclau (Post-doctorante), F. Poulletier de Gannes (Post-doctorante puis IR)

Contrats: Ministère français (ACI), Ministère allemand BfS, Research Foundation Mobile Communication (Suisse), Union Européenne (Reflex, 5° PCRD)

Animation de la recherche: Responsable des programmes.

La tête absorbe 50% des ondes émises par un téléphone mobile et le cerveau qui absorbe une partie de cette énergie représente une cible potentielle sensible.

In vitro, des cellules nerveuses primaires de rongeurs (neurones) et des cellules tumorales humaines (neuroblastome SH-SY-5Y, gliome U87, microglie CHME 5) ont été testées. Les temps d'exposition variaient entre 1 heure et 48 heures, à des niveaux de DAS allant de 0,7 à 6 W/kg. Les paramètres biologiques ont été recherchés immédiatement et à différents temps après l'exposition, de façon à obtenir une cinétique temporelle. Globalement, aucune réponse de stress n'a été mise en évidence.

In vivo, des rats ont été exposés en configuration locale (dite tête-seule) à des niveaux de DAS moyennés sur le cerveau allant de 0,026 à 13 W/kg. Les animaux ont été exposés soit une fois pendant 2 heures (exposition unique), soit 2 heures par jour, 5 jours par semaine, pendant 4 semaines (expositions répétées). Les marqueurs biologiques étaient recherchés soit

immédiatement après l'exposition, soit à différents temps, et jusqu'à 50 jours, après la fin de l'exposition ; ceci dans le but d'identifier l'aspect cumulatif et persistant des effets éventuels.

Les résultats montrent qu'une exposition unique n'entraîne pas de réponse de stress chez l'animal. A 13 W/kg, le signal UMTS augmente les lésions de l'ADN dans les cellules du cerveau, mais pas de façon significative.

En revanche, des expositions répétées aux signaux GSM-1800 et UMTS à 2,6 W/kg semblent entraîner dans le cerveau des rats des réponses cellulaires. Une augmentation de l'expression des protéines de stress Hsp27 et Hsp70 et une activation microgliale significatives ont été observées. Il est décrit qu'une surexpression d'Hsp70 peut être liée à un stress oxydatif. Or, l'implication du stress radicalaire, plus particulièrement oxydatif, a été suggéré dans certains effets biologiques des RF de bas niveau de puissance, sans qu'aucune preuve directe n'ait été apportée au niveau du cerveau. Nous avons donc recherché chez les mêmes animaux des marqueurs de stress radicalaire dans le cerveau au niveau de l'ADN (8-OH guanosine), des lipides (4-hydroxynonanal) et des protéines (NO-tyrosine). Nous avons observé une diminution du stress radicalaire après des expositions répétées à l'UMTS, significative pour la lipoperoxydation dans toutes les zones étudiées et pour l'oxydation de l'ADN dans l'hippocampe. S'il était confirmé, cet effet pourrait être considéré comme bénéfique.

Les modifications physiopathologiques, comme la perméabilisation de la BHE, n'apparaissent pas à ce niveau, mais au DAS maximum testé de 13 W/kg. L'effet est significatif uniquement pour le GSM-1800, 50 jours après la fin des expositions répétées (Figure 8).

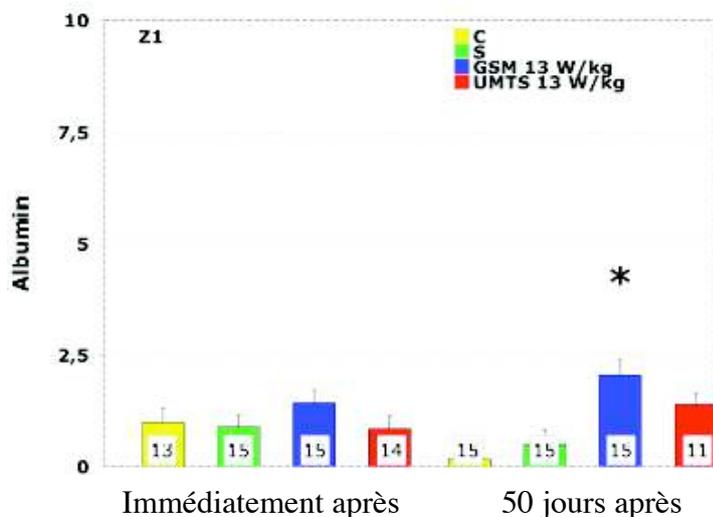


Figure 8: Effet des signaux GSM-1800 et UMTS sur la BHE

*Effet d'une exposition répétée (2 h/j, 5j/sem, 4 sem) aux signaux GSM-1800 ou UMTS à 13 W/kg sur le nombre de fuites d'albumine endogène dans le cerveau des rats (région frontale dite Z1) immédiatement ou 50 jours après la dernière exposition. C : rats contrôles cage, S : rats sham-exposés. Les nombres dans les barres correspondent au nombre d'animaux pour la condition donnée. * $p < 0,05$.*

Des différences sont donc observées entre les expositions répétées au signal GSM-1800 et au signal UMTS, sans que des explications simples puissent être avancées. Dans le cas de la BHE, la différence entre GSM-1800 (signal découpé) et UMTS (signal non découpé) pourrait être le fait de l'onde thermo-élastique qui pourrait résulter d'un signal découpé. En effet, la puissance crête développée à 13 W/kg moyennés sur le cerveau est de 208 W/kg pour le GSM-1800 contre 26 W/kg pour l'UMTS. Notre hypothèse est qu'un stress mécanique pourrait résulter de l'apparition de cette onde thermoélastique⁸ et altérer alors la BHE.

⁸ Les ondes électromagnétiques pulsées de forte intensité (type radars) peuvent provoquer des sensations auditives (appelées clic micro-onde) car les cellules auditives de l'oreille interne sont directement excitées mécaniquement par les ondes du fait de l'expansion thermoélastique transitoire.

En résumé, chez l'animal, ni la peau, ni le cerveau ne répondent au plan moléculaire et cellulaire à une exposition unique aux signaux testés. En revanche, nous avons mis en évidence des réponses après des expositions répétées, au niveau du cerveau seulement. Autour de 2 W/kg, l'expression des HSP semble corrélée avec la diminution du stress oxydant dans le cerveau. Ceci suggère que l'effet biologique global ne serait pas toxique, voire plutôt protecteur. Des effets suggérant un effet sanitaire ont été observés sur la BHE à 13 W/kg. Des calculs ont estimé que ce DAS dans le cerveau du rat serait équivalent chez l'Homme à un DAS de 50 W/kg, donc bien supérieur à la limite d'exposition locale. Ceci suggère cependant que le seuil de DAS auquel des effets délétères interviennent pourrait être inférieur au seuil de 100 W/kg considéré comme base des limites d'exposition locale. Cette hypothèse demande à être testée.

3-3 Autres études *in vitro*

Publications: Remondini et al. 2005, 14 communications en congrès

Contrats : Union Européenne (5° PCRD)

Collaboration : RZPD German Resource Center for Genome Research (Heidelberg, Allemagne)

J'ai utilisé d'autres modèles cellulaires pour des raisons diverses : soit les cellules sont connues pour leur réponse de stress aux agents chimiques (lignées de cellules Molt4 et U937), soit elles sont plus adaptées pour rechercher des marqueurs de stress particuliers comme l'expression de la NOS2 (lignées de cellules C6), soit enfin elles représentent des cellules utilisées classiquement en toxicologie (lignées de cellules C3H10T1/2).

Des réponses de synergie avec des agents chimiques ont également été recherchées pour tester l'hypothèse selon laquelle les champs RF pourraient interférer avec des systèmes biologiques « perturbés » par un premier traitement.

Ainsi, j'ai testé l'effet d'une exposition au GSM-900 sur l'apoptose induite par la camptothécine dans les cellules U937 (Figure 9) et sur l'expression de la NOS2 induite par des LPS dans les cellules C6.

L'effet de signaux EDGE-1800 et UMTS sur l'apoptose des neurones primaires de rat a été recherché. Nous avons étudié en parallèle le stress oxydatif sous exposition RF. Pour cela, le modèle de choix est celui des cellules immunitaires du cerveau, les cellules microgliales. La recherche du stress oxydatif a été réalisée par cytométrie en flux au moyen du fluorochrome diacétate de dichlorofluorescéine qui détecte globalement les espèces oxygénées réactives.

Nous n'avons observé aucun effet de l'exposition à ces signaux, jusqu'à un niveau de puissance de 10 W/kg.

En conclusion, au niveau cellulaire, aucune influence de l'exposition aux RF de différents signaux de communication sans fil (jusqu'à 10 W/kg et 48 heures) n'a été mise en évidence.

Au niveau moléculaire, les études de génomique sur deux types cellulaires (U937 et CHME5) ont révélé des modifications d'expression de gènes, après exposition au GSM-900 à 2 W/kg pendant 1 heure, uniquement dans les cellules U937. Trente-deux gènes étaient surexprimés et deux gènes étaient réprimés. Le facteur maximal des variations observées est de 2,8 et les gènes surexprimés appartiennent majoritairement à la classe des gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire. Les conséquences physiologiques de ces modifications sont difficiles à évaluer. Dans notre pratique expérimentale, nous n'avons jamais observé de différences significatives dans le

poinds des animaux exposés aux signaux RF et des animaux exposés factivement. Or, une modification importante du métabolisme devrait se répercuter sur le poids des animaux⁹.

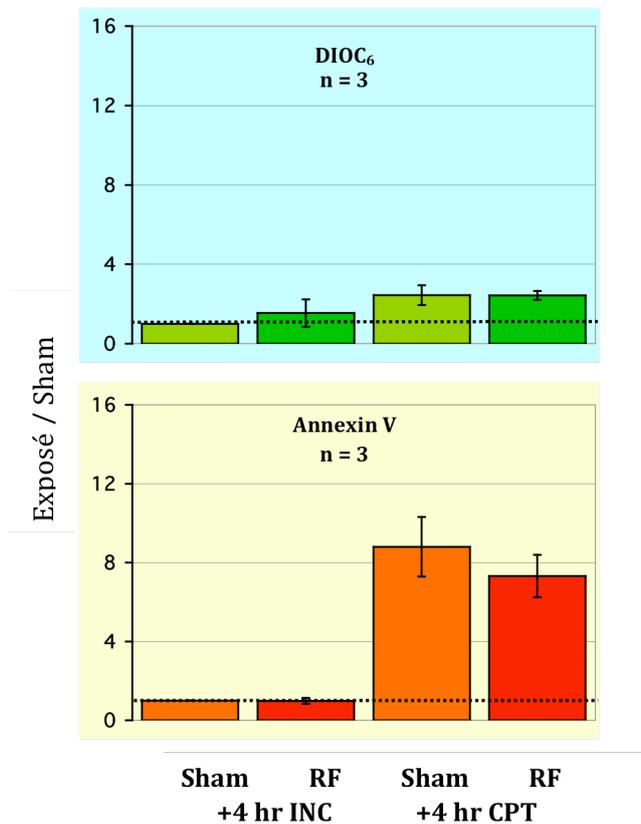


Figure 9 : Effets du GSM-900 sur l'apoptose

Ratio de cellules U937 avec un $\Delta\Phi_m$ dépolarisé DIOC6(3)/PI et de cellules U937 apoptotiques ANX⁺/PI après exposition au signal GSM-900 (2 W/kg, 1 h) et traitement consécutif à la camptothécine (4 μ g/ml, 4 h). L'apoptose est mesurée après les 4 h de traitement avec le chimique.

Les moyennes \pm SEM sont données.

4 hr INC : 4 heures dans l'incubateur

4 hr CPT: 4 heures de traitement avec la camptothécine

4- Étude des effets des champs magnétiques EBF

Les effets biologiques des champs magnétiques EBF sont étudiés depuis plus de vingt ans, aussi bien les effets thérapeutiques que les effets toxiques. Les recherches thérapeutiques concernent des signaux magnétiques EBF très divers, parmi lesquels les signaux de la stimulation magnétique transcrânienne (TMS) nous ont plus particulièrement intéressé, tandis que les recherches toxicologiques concernent les champs magnétiques EBF de l'environnement qui sont des champs sinusoïdaux de 50/60 Hz.

⁹ En général, une augmentation du métabolisme entraîne une perte de poids et inversement.

4-1 Stimulation magnétique transcrânienne répétitive (rTMS)

Permanents: R. Charlet de Sauvage, I. Lagroye, B. Veyret

Publications : Charlet de Sauvage et al., 2007, Charlet de Sauvage et al., 2009, 4 communications en congrès

Contrat : Conseil Régional Aquitaine

Collaboration : Dr Dodet, Hôpital C. Perrens (Équipe ECT, Bordeaux)

La stimulation magnétique transcrânienne répétitive (rTMS) permet, à partir d'impulsions magnétiques appliquées près du scalp, d'induire un courant électrique dans le cerveau et de modifier ainsi l'activité cérébrale. En une douzaine d'années, son champ clinique s'est fort développé (maladie de Parkinson, dépressions chimio-résistantes, hallucinations auditives, manies). Malgré la bonne tolérance apparente du traitement, peu d'études ont évalué l'innocuité de la rTMS. Notre objectif a donc été d'évaluer l'innocuité de signaux rTMS chez l'animal. Nous disposons d'un appareillage de rTMS qui a permis de montrer l'absence d'effet mutagène sur des bactéries et des virus (Charlet de Sauvage et al., 2003; Grattepanche et al., 2004). Je me suis intéressée aux mammifères en évaluant la génotoxicité d'un signal rTMS (2000 impulsions de 340 μ s réparties en 20 trains de 100 impulsions de 10 s, à 10 Hz, espacés de 50 s, densité de flux crête 1 T) sur le cerveau de rats. Les caractéristiques du signal sont inspirées du protocole ayant montré un effet antidépresseur comparable à l'électro-convulsivothérapie (électrochocs).

Le développement d'un logiciel de cartographie 3-D a permis de déterminer la densité du courant induit dans le cerveau par chaque stimulation magnétique. Notre étude montre, sur 3 à 4 animaux par groupe, qu'une session unique de 2000 impulsions ne produit pas d'altération de l'ADN dans le cerveau de rats exposés à une densité crête de courant de 4,5 A/m² (moyenne pour le cerveau), en comparaison à des animaux exposés factivement ou contrôles cage.

4-2 Sclérose latérale amyotrophique

Permanents: I. Lagroye, M. Geffard, E. Haro, B. Veyret

Contractuels: F. Poullietier de Gannes (IR), M. Taxile (IE), L. Mayeur (Tech), E. Ladevèze (Tech)

Publications : Poullietier de Gannes et al., 2008, 5 communications en congrès, rapport au sponsor

Contrat: ANR SEST

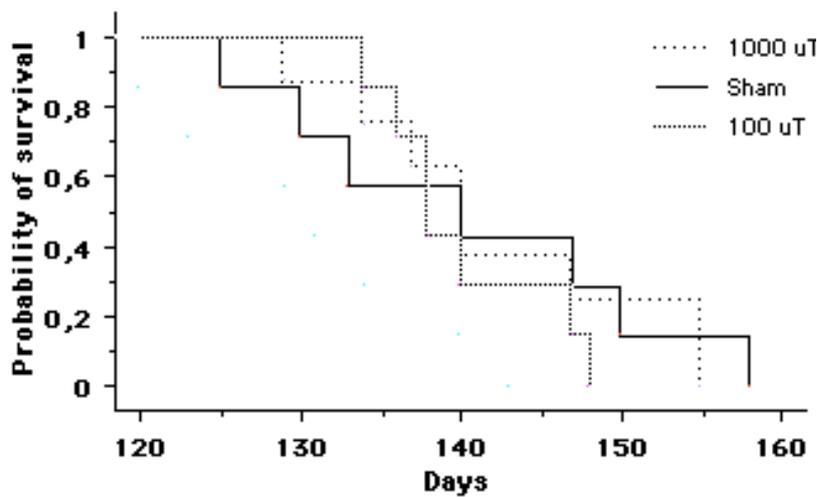
Collaboration : Société GémacBio, Association IDRPH, EDF (système d'exposition)

La question d'une relation entre l'exposition professionnelle aux champs magnétiques 50 Hz et la survenue d'une sclérose latérale amyotrophique (SLA) a été posée par certaines études épidémiologiques. La SLA est une maladie neurodégénérative qui se caractérise par une atteinte dégénérative des motoneurons du tronc cérébral et de la corne antérieure de la moelle épinière. Une forme sporadique affectant 90-95% des patients et une forme familiale avec une origine héréditaire (5-10% des cas) ont été décrites. Si l'étiologie de la SLA est encore inconnue, plusieurs hypothèses sont envisagées comme l'excitotoxicité au glutamate, le stress oxydatif, un dysfonctionnement mitochondrial, une agrégation du cytosquelette, une origine virale, bactérienne et, plus récemment, les champs électromagnétiques EBF (Ahlbom, 2001 ; Håkansson et al., 2003).

Dans le cadre du programme MAALS financé par l'ANR-programme Santé- environnement et Santé-travail, nous avons étudié le rôle des champs magnétiques EBF sur l'amplification ou l'accélération de l'apparition des symptômes SLA en utilisant le modèle de souris SOD-1. Les souris ont été exposées 2 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 7 semaines à un champ magnétique 50 Hz à deux densités de flux magnétiques: 100 et 1000 μ T. Les contrôles étaient représentés par des souris exposées factivement (sham). Les signes de SLA ont été suivis en

surveillant le poids, la survie et l'activité motrice à l'aide du test du rotarod. Nous n'avons identifié aucune différence entre animaux sham et animaux exposés. Les champs magnétiques EBF n'accélèrent donc pas la progression des symptômes dans un modèle animal de SLA (Figure 10).

Le rôle des chocs électriques (micro-chocs) dont la fréquence n'est pas rare dans le cadre professionnel, reste à élucider.



*Figure 10 : Champs magnétiques 50 Hz et SLA
Temps de survie des souris SOD-1 sham-exposées ou exposées à 100 ou 1000 μ T pendant 7 semaines à partir de la 10^e semaine.*

Groupe	Survie Moyenne (jours)
Sham	140,4 \pm 4,5
100 μ T	140,1 \pm 2,0
1000 μ T	142,12 \pm 3,3

C- Expertise

Intervenants : I. Lagroye, B. Veyret, M. Le Diraison (Tech)

Publications : Rapports d'expertise français et étrangers, Livres bleus ICNIRP, Environment Health Criteria OMS

Contrats : INERIS, Alcatel, Bouygues Telecom, France Telecom, EMF-NET (6^{ème} PCRD), EPHRAN (DG SANCO)

Groupes d'experts: AFSSET, CSHPF, DGS, ICNIRP, OMS.

Evaluation scientifique: Journaux scientifiques, ANR, OSEO-ANVAR, Organismes étrangers (The Netherlands Organisation for Health Research and Development, gouvernement autrichien, Ministère Canadien)

Vulgarisation des connaissances: Interviews pour journaux de vulgarisation scientifique, documentaires télévisés, Fête de la science

Dès la fin de ma thèse, j'ai été contactée par la revue International Journal of Radiation Biology pour évaluer un article soumis à ce journal. Mon expertise sur les études *in vitro* des effets biologiques des champs électromagnétiques intéresse plus particulièrement les éditeurs des journaux scientifiques. Cette activité n'a cessé de croître pour atteindre aujourd'hui une dizaine d'articles évalués par an.

Par ailleurs, sous l'impulsion de mon directeur de laboratoire, j'ai rapidement été impliquée dans l'évaluation du risque lié à l'exposition environnementale aux champs électromagnétiques. Le développement des applications de l'électricité pour l'énergie et surtout des ondes électromagnétiques pour les télécommunications ont en effet engendré des questions et des craintes dans la population et entraîné une prise de conscience sur l'exposition aux champs électromagnétiques. Les instances gouvernementales françaises comme l'AFSSET, la DGS ou le CSHPF, et internationales telles que l'OMS, ont ainsi fait appel à moi pour participer à des groupes d'experts, pour rédiger ou présenter des rapports collégiaux sur ces questions et donner des recommandations de recherche¹⁰. Après avoir été correspondante scientifique pour l'ICNIRP, je viens d'être nommée membre du sous-comité biologie et participe à l'évaluation scientifique des travaux scientifiques publiés (section biologie).

Au long des années, j'ai rédigé des rapports d'évaluation de projets scientifiques pour différents organismes dont l'Agence Nationale pour la Recherche, en France et l'Organisation Hollandaise de recherche et développement, à l'étranger.

De plus, j'interviens dans des formations ponctuelles à l'intention de professionnels de la santé à la demande principalement de la DGS, des Observatoires Régionaux de la Santé et de l'INERIS.

Enfin, je participe à la rédaction de rapports de veille scientifique pour des entreprises des télécoms, en particulier à la suite de congrès internationaux.

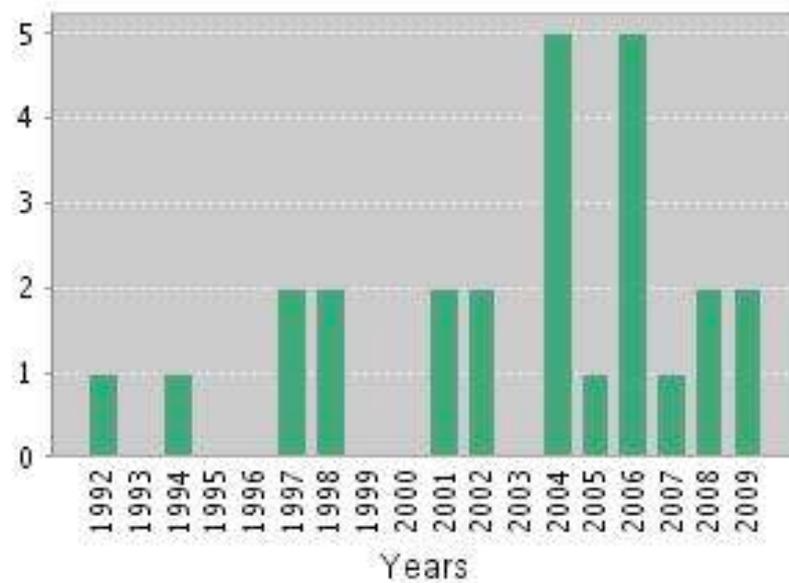
Cette activité d'expertise tient donc une place importante dans mon activité scientifique et me permet de suivre au mieux les avancées scientifiques et les besoins de recherche dans mon domaine de recherche.

¹⁰ DGS rapport Zmirou, 2001 ; AFSSET téléphone mobile et santé, 2003 ; AFSSET téléphone mobile et santé, 2005 ; OMS static fields, 2004 ; OMS ELF fields, 2005

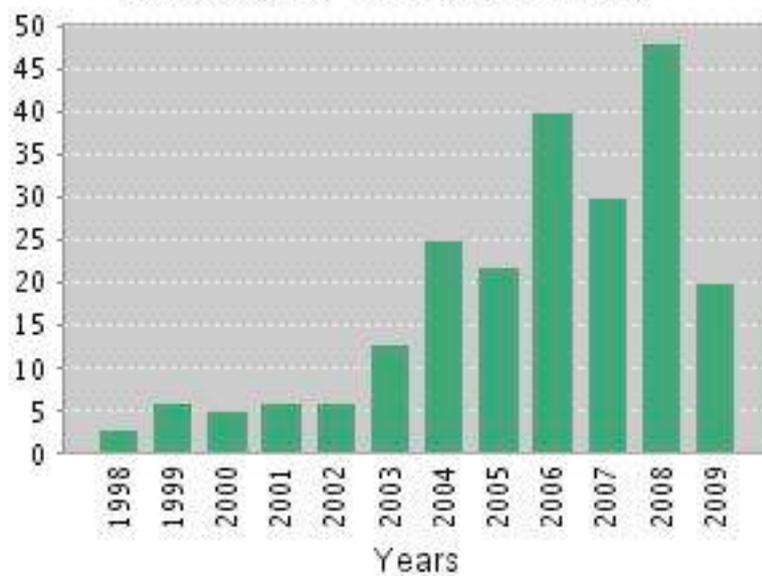
D- Résumé de la production scientifique

Ci-dessous, en résumé de ma production scientifique, le graphe des articles publiés par années depuis 1992 et le graphe des citations de mes articles depuis 1998.

Published Items in Each Year



Citations in Each Year



E- Perspectives

Les développements technologiques liés aux champs électromagnétiques se poursuivent et le besoin de données expérimentales pour l'évaluation du risque lié à l'exposition à ces champs non invasifs reste présent, en particulier certains aspects que je développe ci-dessous.

Par ailleurs, je souhaite développer une recherche sur les applications thérapeutiques des champs électromagnétiques non invasifs, l'arrivée d'un jeune chercheur CNRS faisant office de catalyseur.

Enfin, je souhaite maintenir une activité de recherche de mécanismes d'action des champs électromagnétiques non invasifs.

Ainsi, mes perspectives de recherche peuvent se décliner suivant trois axes : un axe « toxicologie », un axe « thérapeutique » et un axe « mécanismes ».

1- Champs électromagnétiques non invasifs et toxicologie

1.1- Champs radiofréquences et sensibilité des jeunes organismes»

Permanents : I. Lagroye, B. Billaudel, M. Geffard, E. Haro, A. Hurtier, B. Veyret

Contractuels : F. Poullietier de Gannes (IR), M. Taxile (IE)

Encadrement : A. Athané (Master EPHE), Saliha Aït Aïssa (Doctorante EPHE)

Publications : 4 communications en congrès (présentation des projets et/ou résultats préliminaires), rapport au sponsor

Contrat : Fondation Radiofréquences et santé, Orange Labs, ANR-CES

Collaboration : Société GémacBio, Association IDRPHT, EDF (système d'exposition)

Malgré des efforts de recherche conséquents, il reste des questions en suspens quant aux effets toxiques éventuels de l'exposition aux champs RF.

La première question concerne la **potentielle sensibilité accrue des enfants** aux facteurs de l'environnement comme les métaux lourds, chimiques, radiations ionisantes, mais également les champs électromagnétiques environnementaux. Dans le cas des champs RF, la population actuelle des jeunes est la première à expérimenter une exposition permanente aux RF de la téléphonie mobile et autres systèmes de communications sans fil. Chez les jeunes, les systèmes immunitaires et nerveux continuent à se développer après la naissance et l'on sait que l'exposition à des toxiques de l'environnement durant l'enfance est susceptible d'interférer avec leur développement ou leur capacité future de réponse à l'agression par des agents extérieurs.

Sur le plan scientifique, les études de tératogenèse et de développement n'ont pas montré d'effets délétères en dessous des normes d'exposition aux RF (Pour revue : Heynick et Merritt, 2003), mais aucune étude de tératogenèse n'a utilisé des expositions répétées à faible DAS, au cours de la gestation. Parmi les résultats disponibles sur les effets des RF sur les jeunes animaux, en post-natal, aucun effet n'a été trouvé sur la barrière hémato-encéphalique, la dégénérescence et l'activation neuronale, ou le comportement. Deux études qui ont utilisé des expositions *in utero* chez l'animal (Bornhausen et al., 2000 ; Ferreira et al., 2006) ne montrent pas de déficit cognitif mais la présence de micronoyaux dans les érythrocytes de jeunes rats, qui témoigne de la

présence de lésions résiduelles dans l'ADN des érythroblastes en prolifération (Krishna et Hayashi, 2000).

La deuxième question concerne les *effets reprotoxiques* potentiels des RF. Plusieurs études ont indiqué que la qualité du sperme humain était altérée chez les hommes utilisant de façon importante leur téléphone portable. Une revue récente sur le sujet conclut ainsi que les effets sur la stérilité humaine révélés par la littérature allaient d'effets insignifiants à des lésions testiculaires de degrés variables (Deepinder et al., 2007). *In vitro*, une étude suggère qu'une exposition à un signal GSM-900 perturbait significativement la motilité de spermatozoïdes humains sans altérer le potentiel transmembranaire mitochondrial, à 5,7 W/kg mais pas à 2 W/kg, plus proche des niveaux d'exposition réels (Falzone et al., 2008). Ainsi, au vu de ces études contradictoires, il est aujourd'hui difficile d'évaluer l'impact de l'exposition aux RF des communications sans fil sur la fertilité.

Sur ces thèmes, je suis porteuse de quatre projets en cours : ERYA et INUTER (fondation Santé et Radiofréquences), ELEYAR (Orange labs) et EROPS (ANR CES). Pour ces recherches, un système d'exposition corps-entier sans contrainte d'immobilisation pour les animaux (chambre réverbérante) a été conçu, réalisé et caractérisé (Figure 11). Les expérimentations sont en cours, avec quelques résultats préliminaires pour le cerveau. Il s'agit d'évaluer chez le rongeur, l'influence de l'exposition au signal Wi-Fi, signal de communication sans fil à 2450 MHz, qui est omniprésent sur les lieux de vie, à l'école ou au travail.



Figure 11 : *Chambre réverbérante, placement des cages et exposition des rats à différents âges.*

L'effet d'expositions *in utero* seulement ou *in utero* et durant le premier mois de vie sur le système immunitaire de la souris est étudié par phénotypage des cellules spléniques, par évaluation de la réponse aux mitogènes et de l'activité des cellules Natural Killer. L'étude

immunologique est réalisée en collaboration avec une équipe italienne¹¹ qui utilise un signal Wi-Fi et un système d'exposition différent, et les résultats de nos deux équipes seront comparés et discutés. L'effet sur le cerveau sera exploré chez le rat en recherchant l'apoptose neuronale, l'expression des HSP majoritaires, la présence d'un stress radicalaire ou de lésions de l'ADN et une réaction de gliose. La recherche d'anticorps dirigés contre certains néoantigènes et antigènes du soi démasqués, marqueurs de diverses pathologies cérébrales, sera effectuée en parallèle dans le sérum des rats.

La tératologie et la reprotoxicité seront évaluées en collaboration avec la société EVIC France¹². Dans le premier cas, les rats seront exposés *in utero* et l'implantation, les résorptions et les altérations morphologiques évaluées. Le développement sera suivi pendant un mois. Dans le second cas, de jeunes mâles et femelles seront accouplés et les altérations des organes reproducteurs, ainsi que le nombre et le sexe des petits pour chaque portée seront évalués.

1.2- Champs électromagnétiques EBF et leucémie lymphoblastique aiguë

Les champs magnétiques de fréquence extrêmement basse (EBF) sont classés par le Centre International de Recherche sur le Cancer comme « cancérigènes possibles (2B) » et seulement sur la base des résultats sur la leucémie de l'enfant. Cette classification repose sur l'existence d'une association épidémiologique entre exposition et leucémie lymphoblastique aiguë (LLA), sans preuve de relation causale, sans support de l'expérimentation et sans mécanisme biophysique identifié à des niveaux de champs aussi faibles. En effet, l'association existe pour les expositions environnementales les plus fortes, supérieures à 0,3 ou 0,4 μT (en fonction des études). Une limitation majeure de l'expérimentation est qu'il n'existe pas de modèle animal de LLA bien caractérisé et il semblerait donc que l'on soit arrivé à une impasse.

Cependant, nous avons une nouvelle hypothèse à tester. Elle émane de nos recherches bibliographiques qui indiquent un lien entre angiogenèse et leucémie et un lien entre champs magnétiques EBF et angiogenèse. En effet, une vasculogenèse et une angiogenèse importantes ont été observées dans la moelle osseuse des patients LLA. D'autre part, l'angiogenèse étant un facteur de cicatrisation, ce phénomène expliquerait, au moins en partie, les effets thérapeutiques de certains types de champs magnétiques EBF dans la cicatrisation de la peau notamment: en effet, certaines données suggèrent un effet pro-angiogénique de certains signaux EBF (McKay et al., 2006). Il a par exemple été mis en évidence que des champs pulsés (trains d'impulsion de 4,5 msec répétées à 15 Hz, impulsions asymétriques), augmentaient l'angiogenèse de façon dépendante de FGF2 dans des modèles cellulaires et animaux (Tepper et al., 2004). Bien que s'intéressant aux effets thérapeutiques, les auteurs évoquaient l'hypothèse d'une relation entre cet effet pro-angiogénique et les données épidémiologiques sur la LLA, mais sans retentissement particulier, peut-être parce que ces signaux n'étaient pas de type environnemental. Plus récemment, une étude a montré que des champs magnétiques sinusoïdaux de 50 Hz et 1 mT étaient capables également de favoriser l'angiogenèse de cellules endothéliales humaines (Delle Monache et al. 2008). On note que cet effet pro-angiogénique est observé à des intensités de flux magnétique de l'ordre du millitesla et que l'effet est probablement dû aux courants induits.

Nous chercherons donc à mettre en évidence un effet pro-angiogénique de champs magnétiques à 50 Hz de faible densité de flux, en partant d'une intensité de 1 mT qui devrait nous

¹¹ Italian Agency for New Technologies, Energy and Environment (ENEA), Section of Toxicology and Biomedicine, Rome

¹² Evic France est une entreprise reconnue dans la recherche pharmacologique et toxicologique et travaille avec des partenaires d'horizons variés (chimie, pharmacie, vétérinaire, cosmétique, etc).

permettre de détecter une augmentation de l'angiogenèse dans des modèles d'angiogenèse qui vont être mis au point au laboratoire dans le cadre d'un projet thérapeutique (voir chapitre correspondant).

1.3- Champs électromagnétiques non invasifs et expositions multiples

La question des expositions multiples est liée à la présence de multiples facteurs, potentiellement toxiques, dans l'environnement et à la multiplication des sources d'exposition aux champs électromagnétiques, notamment des signaux de communication sans fil. Les expositions multiples comprennent donc à la fois des expositions à différents types de champs électromagnétiques et des expositions à des champs électromagnétiques et d'autres agents chimiques ou physiques.

Champs EBF

Dans sa dernière monographie sur les champs EBF¹³, l'OMS a attribué une haute priorité au thème de recherche suivant : « Evaluation of co-carcinogenic effects using *in vitro* and animal studies ». Il s'agit d'une hypothèse qui pourrait étayer expérimentalement les observations épidémiologiques sur la relation entre champs magnétiques et LLA, cette relation étant à ce jour reconnue comme non causale.

Au cours de ma thèse, j'ai mis en évidence des interactions entre champs magnétiques de 50 Hz et des rayonnements gamma ou alpha. Une étude de méta-analyse originale vient de conclure que les champs magnétiques EBF interagissent avec des agents cancérigènes connus, avec un effet plus marqué si l'exposition aux champs magnétiques précède l'exposition à l'agent toxique connu (Juutilainen et al., 2006).

J'ai initié une collaboration avec Isabelle Baldi de l'ISPED (Bordeaux) qui s'intéresse aux interactions possibles entre champs électromagnétiques et pesticides dans le cadre d'une étude épidémiologique en cours. Nous étudions la possibilité de présenter un projet commun avec un aspect expérimental où l'interaction pesticides/champs magnétiques 50 Hz serait testée sur des paramètres tels que les lésions de l'ADN, l'apoptose et le stress radicalaire. L'étude épidémiologique s'intéressant aux tumeurs du cerveau, des modèles de cellules nerveuses humaines, déjà disponibles au laboratoire, seront utilisés. Pour l'aspect épidémiologique, les réponses au questionnaire ont été récoltées, leur analyse demande à présent des moyens humains supplémentaires.

En parallèle, j'envisage de rechercher la présence de micronoyaux dans la moelle osseuse de rats exposés *in utero* à des champs magnétiques 50 Hz et/ou à un agent génotoxique connu (par exemple la mitomycine C), ce type d'expérience n'ayant jamais été réalisé. On peut noter que si cette hypothèse d'un effet co-cancérigène des champs EBF est vérifiée par une augmentation des effets génotoxiques, cela serait un argument de l'implication des champs magnétiques dans le modèle « two hits » (deux coups) de la LLA, le second coup intervenant alors sous l'effet des champs.

Champs RF

Une deuxième question relative à des expositions multiples relève des interrogations du public quant aux effets sanitaires d'expositions à des sources RF multiples. Pour preuve, le récent appel à projet de l'Union Européenne (UE) intitulé « ENV.2009.1.2.2.2 Health effects from

¹³ WHO-Environmental Health Criteria 238 (2007): Extremely Low Frequency (ELF) Fields

electromagnetic fields (EMF): improved exposure assessment to wireless communication devices ». Dans cet appel, la prise en compte de sources d'exposition multiples et l'évaluation des risques sanitaires potentiels associés sont demandées.

Ce projet vise à une meilleure connaissance des niveaux d'expositions des citoyens européens aux différents signaux de communication sans fil. Sur le plan physique, il est peu probable que des expositions cumulées de différentes sources présentent un danger pour la santé tant que le niveau d'exposition reste au-dessous des normes. *A contrario*, les données expérimentales sur les effets biologiques de différents champs RF cumulés sont quasi inexistantes (il en existe une seule à ma connaissance), et il apparaît donc important de fournir au public et aux décideurs des données expérimentales pour s'assurer de l'absence d'interactions particulières entre différents signaux.

En collaboration avec des équipes Françaises, Suisses, Anglaise, Italiennes, Autrichienne et Suédoise, nous avons soumis le projet MUSE (Multiple Source Exposure) qui comprend des experts en dosimétrie, mesurage, biologie, évaluation du risque et communication. Notre contribution est la coordination du projet par notre groupe et la proposition d'expériences *in vitro* et *in vivo* avec une co-exposition à deux signaux de communication sans fil. *In vivo*, des expositions *in utero* ont été proposées, avec la recherche de marqueurs de stress dans le cerveau des rats (activation microgliale, expression de Hsp27, Hsp70 et de GFAP, apoptose *in situ*). Après une exposition locale unique ou des expositions locales répétées de la tête, nous chercherons à mettre en évidence des altérations de la barrière hémato-encéphalique et l'induction de lésions dans l'ADN des cellules cérébrales. *In vitro*, nous avons proposé d'étudier le stress cellulaire dans des cellules fibroblastiques et nerveuses normales ou déficientes pour certains gènes, comme les gènes de réparation des lésions de l'ADN. Les marqueurs de stress à étudier sont l'apoptose (expression des protéines caspase 3 activée, cytochrome c, AIF, BCL2, P53), le cycle cellulaire, le stress oxydatif et les lésions de l'ADN.

Nous attendons la décision finale pour ce programme MUSE.

Nous avons une nouvelle opportunité pour réaliser ce type d'étude dans le cadre d'une collaboration avec une Université Saoudienne à Riyad. Le projet que nous avons soumis concerne des expositions à deux types de signaux de communications sans fil et des expositions à un signal RF et aux UV qui représentent un facteur environnemental d'impact sanitaire significatif et omniprésent dans ce pays. Brièvement, nous proposons (i) de déterminer le seuil d'exposition pour la détection de lésions de l'ADN des cellules corticales et hippocampales de rats exposés tête-seule au GSM-900, GSM-1800, ou une combinaison des deux signaux ; (ii) de rechercher une immunosuppression chez des souris exposées corps-entier à un signal Wi-Fi, à des UV ou à une combinaison des deux agents et (iii) de déterminer l'impact d'expositions *in utero* (corps-entier) au signal Wi-Fi ou au signal WiMax, ou une combinaison des deux signaux sur le cerveau des nouveaux-nés.

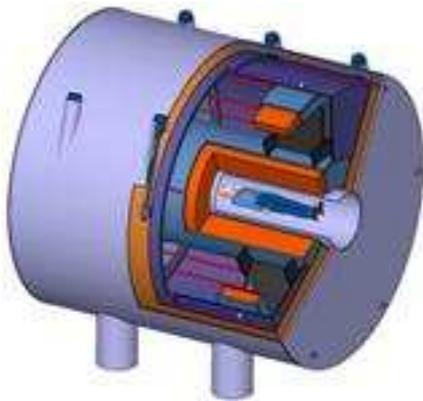
On peut noter dans le point i) de ce projet, une tentative pour trouver le seuil d'induction de lésions de l'ADN dans les cellules de cerveau de rat après exposition locale. Ce type d'expérimentation sera utile car les données expérimentales d'exposition locale du cerveau, à forte puissance, sont peu nombreuses en dehors des données sur la barrière hémato-encéphalique.

1.4 Champs magnétiques statiques de forte intensité

Le développement de l'IRM passe par l'utilisation de champs magnétiques statiques très intenses (au-delà de 3 T, avec une limite supérieure de 14 T environ), permettant entre autres d'obtenir des images de très haute résolution. Jusqu'à présent, la limite d'exposition pour le

personnel était fixée à 2 T. La révision actuelle des normes par l'ICNIRP et la publication prochaine de la directive européenne pour les travailleurs exposés aux champs électromagnétiques rendent le problème très urgent : il est nécessaire de connaître les effets biologiques et sanitaires éventuels pour permettre l'utilisation sans danger de l'IRM à haut champ et ne pas entraver son développement. L'Union Européenne est consciente du problème et il est probable que les appels d'offres prochains dans le cadre du 7^{ème} PCRD comporteront des financements pour ce type de recherche.

Notre laboratoire est particulièrement bien placé pour répondre à de tels appels d'offre en raison de son expérience dans l'exposition de cellules et d'animaux à des champs électromagnétiques et dans la réalisation de tests immunitaires et toxicologiques. De plus, sur le pôle Bordelais, nous avons initié des contacts avec le laboratoire d'imagerie des systèmes biologiques de J.-M. Franconi à Bordeaux 2, qui dispose d'aimants à 7 et 9 T. En parallèle, nous avons rencontré D. Le Bihan, responsable de Neurospin à Orsay, qui abrite l'IRM la plus puissante au monde à la fois pour la clinique (11,7 T, Figure 12) et l'expérimentation animale (17 T). Ce réseau français devrait nous permettre de présenter un projet à l'ANR.



*Figure 12 : Aimant de 11,7 T.
Cet aimant, destiné à la clinique, va être installé sur le site Neurospin à Saclay. Son installation est prévue en 2011. Cet aimant n'a pour l'instant pas obtenu d'agrément pour son utilisation clinique en raison du manque de données*

Par ailleurs, dans le cadre du programme COST BM0704, je pilote le Working Group « biological studies » pour lequel j'ai défini l'IRM à haut champ comme l'une des priorités. La première étape sera de mettre à jour le document de l'OMS édité en 2005 sur les effets biologiques des champs magnétiques statiques¹⁴. Ce programme ne finance pas de recherche mais vise à développer des réseaux au niveau Européen sur le thème général des technologies émergentes utilisant des champs électromagnétiques. Un réseau européen va être identifié qui, je l'espère, pourra permettre le montage d'un projet.

2- Champs électromagnétiques non invasifs et effets thérapeutiques

Il apparaît de plus en plus possible que certains signaux électromagnétiques non invasifs et non environnementaux pourraient avoir des effets thérapeutiques. Ces approches alternatives peuvent trouver leur place dans la panoplie thérapeutique de différentes pathologies.

¹⁴ WHO-Environmental Health Criteria 232 (2006) : Static Fields

2.1 Champs EBF et cancer

Avec l'arrivée de Yann Percherancier (CR CNRS) dans le groupe, je souhaite développer dans le laboratoire les recherches sur les effets thérapeutiques des champs magnétiques. Il s'agit de signaux différents de ceux de l'environnement et la littérature suggère des effets antitumoraux de certains champs magnétiques, en particulier EBF pulsés (Pilla 2006).

On trouve dans la littérature des études montrant que certains champs électromagnétiques peuvent avoir un impact sur la croissance tumorale. Dès 1963, McLean a montré que l'exposition à un champ magnétique pulsé (350 mT, 15 T/s) inhibait la croissance de carcinomes mammaires chez la souris C3H (Mc Lean, 1963). Au sein même de notre laboratoire, il a été montré que l'exposition à un champ de 100 mT avec un signal carré de 0,8 Hz entraînait une augmentation de l'activité des cellules NK de la rate de souris exposées (8-10 h par jour et 5 jours par semaine), une diminution de la prolifération des cellules HELA en culture et une diminution significative de la croissance des tumeurs induite chimiquement par le benzo(a)pyrene chez des souris Balb/c et C3H (de Seze et al., 1993 ; Tuffet et al., 1993 ; de Seze et al., 2000).

Par ailleurs, des effets anti-angiogéniques ont été décrits après exposition à certains signaux, par exemple un signal à 120 Hz (60 Hz redressé), 15 mT (Williams et al., 2001). Chez des souris porteuses de tumeurs, une diminution du diamètre des vaisseaux intratumoraux a été détectée sous exposition à ce type de champs magnétiques seuls (10 minutes par jour, 3 semaines), et sous irradiation gamma seule, et un traitement combiné potentialise cet effet (Cameron et al., 2005). Il semble donc intéressant de tester plus avant l'hypothèse que l'effet anti-tumoral décrit avec certains champs magnétiques soit lié à un effet anti-angiogénique.

Avec Yann Percherancier, nous proposons de reprendre ces deux signaux décrits dans la littérature pour retrouver les effets décrits sur un modèle de cancer chimio-induit chez la souris et étoffer les données expérimentales par des approches *in vitro* et *ex vivo* complémentaires, en collaboration avec Michel Moenner de l'unité INSERM U920 (Université Bordeaux I).

In vitro, nous proposons d'utiliser un modèle tridimensionnel d'angiogenèse permettant l'étude de la formation de réseaux capillaires dans des matrices de collagène ou dans le Matrigel. L'effet des champs magnétiques sur la formation des tubules endothéliaux sera observé par microscopie optique. L'action sur la prolifération, migration et différenciation endothéliales pourra ensuite être analysée par des approches conventionnelles en culture cellulaire. Enfin, une étude de l'effet des champs magnétiques sur l'activité paracrine des cellules tumorales sur les cellules endothéliales sera entreprise par des approches similaires.

Nous proposons également une approche *ex vivo* : des cellules tumorales seront prélevées sur des souris traitées au benzo(a)pyrène et déposées à la surface de la membrane chorioallantoïde d'œuf de poule. Les cellules tumorales ainsi cultivées *ex vivo* seront immédiatement et quotidiennement exposées aux champs magnétiques tels que décrits précédemment. La progression de la tumeur et de sa vascularisation sera observée chaque jour au microscope et comparée à celle de tumeurs non exposées aux champs magnétiques. La vascularisation sera quantifiée par la réalisation de coupes histologiques des tumeurs prélevées au cours du temps et par l'utilisation d'anticorps anti-CD31 qui permet un immuno-marquage spécifique des capillaires de la tumeur. Dans ce projet, je souhaite développer la détection en temps réel de l'effet des champs magnétiques. Pour cela, nous utiliserons des cellules tumorales fluorescentes (cellules transduites avec le gène de la GFP), les vaisseaux sanguins pouvant être aisément visualisés du fait de leur contraste avec la fluorescence des cellules néoplasiques (Hoffman, 2005). Cette technique doit être mise au point.

Ce projet fera l'objet d'une demande de financement dans la prochaine campagne d'appels d'offre de l'ANR.

Il apparaît ici que l'angiogenèse est un phénomène pour lequel sont décrits des effets des

champs magnétiques à la fois pro-angiogéniques et anti-angiogéniques. Pour l'étude sur « champs magnétiques non invasifs et LLA », c'est un effet pro-angiogénique qui est pressenti. C'est pourquoi il est indispensable de reprendre toute la littérature existante afin de répertorier les paramètres physiques et temporel de l'exposition aux champs (nature et intensité du champ, fréquence, temps d'exposition, forme du signal, intensité des courants induits, etc.) et leurs effets sur l'angiogenèse, afin de savoir s'il se dégage un profil spécifique ou du moins typique des signaux magnétiques pour un effet inhibiteur ou stimulateur de l'angiogenèse.

Il faut noter qu'un effet inhibiteur sur l'angiogenèse a également été décrit avec des champs magnétiques statiques (Ruggiero et al., 2004), ce qui serait en faveur d'un effet magnétique.

2.2 rTMS et algie vasculaire de la face

La stimulation magnétique transcrânienne utilise l'induction, dans le cerveau, de courants induits par un champ magnétique de très forte amplitude de champ, autour du tesla en valeur crête, répété à fréquence extrêmement basse. La stimulation transcrânienne répétitive (rTMS) est une technique indolore actuellement en essai clinique comme outil thérapeutique potentiel dans divers troubles neurologiques ou psychiatriques, comme la dépression, la maladie de Parkinson, l'épilepsie ou les céphalées, AVC, douleurs chroniques, acouphènes, ...

Avec mes collègues Bernard Veyret, Renaud Charlet de Sauvage et Anne Beuter, nous avons initié très récemment une collaboration avec le professeur Virginie Dousset du Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux. Il s'agit de tester l'effet de la rTMS sur les douleurs de l'algie vasculaire de la face (AVF). L'AVF est une forme aiguë de céphalée unilatérale (Leroux et Ducros, 2008). Il s'agit d'une affection rare qui concerne environ 0,1 % de la population. Elle est extrêmement douloureuse et invalidante et on la surnomme « la céphalée suicidaire » (Figure 13).

Cette pathologie ne bénéficie que de peu de ressources thérapeutiques : oxygénothérapie, sumatriptan et interventions chirurgicales ablatives (nerf trijumeau notamment) pour l'essentiel (Bussone, 2008).



*Figure 13 : Illustration de l'algie vasculaire de la face
Dessin illustrant l'intensité et la particularité des douleurs des sujets souffrant d'AVF.*

Plus récemment, la stimulation électrique cérébrale profonde a donné des résultats allant de l'absence d'effet à la disparition totale des douleurs. Cette technique a pu être utilisée grâce à la neuroimagerie qui a localisé des anomalies dans la matière grise de l'hypothalamus postérieur inférieur ipsilatéral (Grover et al., 2009).

Cependant, la stimulation cérébrale profonde reste invasive. Aussi, la rTMS apparaît être une approche intéressante mais demande à être évaluée, même si l'hypothalamus est une structure

profonde qui n'est pas atteinte par les courants induits de la TMS. L'étiologie et les mécanismes de l'AVF restent cependant largement méconnus, ce qui laisse la possibilité de tester ce type d'approche. Nous allons monter un projet pour un essai clinique dans les prochains mois. Ce projet nous permettra de développer des collaborations avec des cliniciens, ce qui est très favorable au développement de la thématique « thérapeutique » dans le laboratoire.

3- Mécanismes d'action des champs électromagnétiques non invasifs

Pour ce thème, je mettrai mes connaissances en biologie à la disposition de mes collègues physiciens et biophysiciens pour tester expérimentalement certaines théories.

La question centrale qui demeure, dans l'étude des effets biologiques des micro-ondes, est celle de l'existence d'effets spécifiques à bas niveau de puissance incidente sur le SNC. Quelques observations de qualité ont montré la possibilité de tels effets (Adair et al., 2001) et des hypothèses théoriques de mécanismes ont été proposées (Adair, 2001). Ainsi, les réseaux neuronaux, contrairement à des cellules nerveuses isolées, pourraient être sensibles à une exposition à des champs RF. De plus, une publication allemande récente a montré l'intérêt et la faisabilité du projet (Koester et al., 2007) : un système d'exposition a été construit, qui associe la mise en œuvre de « culture de cellules sur électrodes » et l'exposition micro-onde.

Lors de la création de l'IMS, la thématique « Bio-ST2I¹⁵ » des sciences et technologies de l'information et de l'ingénierie -STIC était identifiée comme distribuée sur différentes équipes avec une volonté forte de pérenniser cette thématique qui se situe à l'interface physique-biologie. Avec l'équipe ISN¹⁶ de l'IMS, nous formons le groupe de bioélectronique depuis le 1^{er} janvier 2009 et nous avons décidé d'exploiter nos expertises complémentaires sur un projet commun. L'équipe ISN a en effet développé un système d'instrumentation dans le cadre du projet européen NEUROBIT (6^{ème} PCRD), qui réalise une boucle fermée en temps réel permettant la communication bi-directionnelle entre un réseau de cellules neuronales maintenues en activité *in vitro* et un élément artificiel (logiciel ou matériel). Comparé à des systèmes existants, il est optimisé pour le traitement et l'analyse en temps réel des signaux neuronaux. L'équipe ISN finit la conception d'un système de même architecture matérielle et logicielle, dont les algorithmes de traitement et de contrôle des signaux neuronaux seront adaptés à l'étude des effets des RF sur les cellules nerveuses.

Le système d'exposition est construit sur la base de la publication existante et de l'expérience des physiciens du laboratoire Bio-EM et de celle de nos collaborateurs (X-LIM à Limoges en particulier). Il s'agit d'une cellule triplaque dans laquelle sera placée un réseau d'électrodes multiples. Les moyens de calcul et de mesure sont disponibles pour caractériser le système. Le laboratoire Bio-EM a la charge de préparer les cultures primaires de neurones de rongeur puisque nous avons une bonne expérience de ce type de préparation et nous possédons l'équipement nécessaire (salles de culture, animalerie).

De nombreux protocoles expérimentaux peuvent être envisagés ; ils viseront à évaluer et contrôler les effets des ondes électromagnétiques sur les réseaux neuronaux, ainsi que sur la

¹⁵ Bio-ST2I : Biologie du département des "sciences et technologies de l'information et de l'ingénierie" du CNRS. ST2I intègre les domaines disciplinaires des "Sciences et Technologies de l'Information et de la Communication" (STIC) et "Sciences pour l'Ingénieur" (SPI).

¹⁶ ISN : Ingénierie des Systèmes Neuromorphiques

dynamique d'évolution de ces réseaux (altération des fonctions d'apprentissage par exemple). Un des intérêts de cette approche est de pouvoir suivre en temps réel les effets d'une exposition RF sur des cellules en culture. Nous sommes conscients que la collaboration de neurobiologistes sera nécessaire pour ce projet.

Cette recherche bénéficie d'un financement CNRS pour l'aide à la prise de risque (PEPS).

Bibliographie

- Adair ER, Mylacraine KS, Cobb BL, 2001, Partial-body exposure of human volunteers to 2450 MHz pulsed or CW fields provokes similar thermoregulatory responses. *Bioelectromagnetics* 22: 246-259.
- Adair RK, 2001, Simple neural networks for the amplification and utilization of small changes in neuron firing rates. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 7253-7258.
- Adlkofer F, Tauber R, Rüdiger HW, Wobus AM, Trillo A, Leszczynski D, Kolb HA, Lagroye I, Bersani F, Kuster N, Clementi F, Maercker C, 2004, Final Report to EU: Risk Evaluation of Potential Environmental Hazards From Low Frequency Electromagnetic Field Exposure Using Sensitive *in vitro* Methods (REFLEX).
- Ahlbom A, 2001, Neurodegenerative diseases, suicide and depressive symptoms in relation to EMF. *Bioelectromagnetics*. S132-S143.
- Bornhausen M, Scheingraber H, 2000, Prenatal exposure to 900 MHz, cell-phone electromagnetic fields had no effect on operant-behavior performances of adult rats. *Bioelectromagnetics*. 21:566-574.
- Bussone G, 2008, Cluster headache: from treatment to pathophysiology. *Neurol Sci*, 29 :S1-S6.
- Cameron IL, Sun LZ, Short N, Hardman WE, Williams CD. 2005, Therapeutic Electromagnetic Field (TEMF) and gamma irradiation on human breast cancer xenograft growth, angiogenesis and metastasis. *Cancer Cell Int.*, 5:23.
- Charlet de Sauvage R, Grattepanche F, Cassand P, Caubet R, Moreau JM. 2003, Safety of the magnetic field generated by a neuronal magnetic stimulator: evaluation of possible mutagenic effects. *Clin Neurophysiol*, 114 : 581-588.
- De Seze R, Bouthet C, Tuffet S, Deschaux P, Caristan A, Moreau JM, Veyret B, 1993, Effects of time-varying uniform magnetic fields on natural killer cell activity and antibody response in mice. *Bioelectromagnetics*, 14: 405-412.
- De Seze R, Tuffet S, Moreau JM, Veyret B, 2000, Effects of 100 mT time varying magnetic fields on the growth of tumors in mice. *Bioelectromagnetics*, 21 : 107-111.
- Deepinder F, Makker K, Agarwal A, 2007, Cell phones and male infertility: dissecting the relationship. *Reprod Biomed Online*, 15 : 266-270.
- Delle Monache S, Alessandro R, Iorio R, Gualtieri G, Colonna R. et al. 2008, Extremely low frequency electromagnetic fields (ELF-EMFs) induce *in vitro* angiogenesis process in human endothelial cells. *Bioelectromagnetics*, 29 : 640-648.
- Desta AB, Owen RD, Cress LW., 2003, Non-thermal exposure to radiofrequency energy from digital wireless phones does not affect ornithine decarboxylase activity in L929 cells. *Radiation Research*, 160 : 488-491.

Diem E, Schwarz C, Adlkofer F, Jahn O, Rüdiger H., 2005, Non-thermal DNA breakage by mobile-phone radiation (1800 MHz) in human fibroblasts and in transformed GFSH-R17 rat granulosa cells *in vitro*. *Mutation Research*, 583:178-83.

Directive 1999/5/EC of the European Parliament and of the Council of 9 March 1999 on radioequipment and telecommunications terminal equipment and the mutual recognition of their conformity. *Official Journal L 091*, 07/04/1999, p. 0010 – 0028

Falzone N, Huyser C, Fourie F, Toivo T, Leszczynski D, Franken D, 2008, *In vitro* effect of pulsed 900 MHz GSM radiation on mitochondrial membrane potential and motility of human spermatozoa. *Bioelectromagnetics*. 29 : 268-276.

Ferreira AR, Knakievicz T, Pasquali MA, Gelain DP, Dal-Pizzol F, Fernández CE, de Salles AA, Ferreira HB, Moreira JC, 2006, Ultra high frequency-electromagnetic field irradiation during pregnancy leads to an increase in erythrocytes micronuclei incidence in rat offspring. *Life Sciences*, 80 : 43-50.

Grattepanche F, Le Marrec C, Caubet R, Charlet de Sauvage R, Audet P, Moreau J, 2004, Pulsed Magnetic Field Inactivation of Microorganisms. *Encyclopedia of Agricultural, Food, and Biological Engineering* (4 pages).

Grover PJ, Pereira EA, Green AL, Brittain JS, Owen SL, Schweder P, Kringelbach ML, Davies PT, Aziz TZ, 2009, Deep brain stimulation for cluster headache. *J. Clin. Neurosci.*, 16 : 861–866.

Håkansson N, Gustavsson P, Johansen C, Floderus B, 2003, Neurodegenerative diseases in welders and other workers exposed to high levels of magnetic fields. *Epidemiology*, 14(4):420-426; discussion 427-428.

Heynick LN, Merritt JH, 2003, Radiofrequency fields and teratogenesis. *Bioelectromagnetics*, Suppl 6 : S174- S186.

Hoffman RM, 2005, *In vivo* cell biology of cancer cells visualized with fluorescent proteins. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 70 : 121-144.

Höytö A, Juutilainen J, Naarala J., 2007, Ornithine decarboxylase activity of L929 cells after exposure to continuous wave or 50 Hz modulated radiofrequency radiation--a replication study. *Bioelectromagnetics*, 28:501-508.

ICNIRP, 1998. Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic, and electromagnetic fields (up to 300 GHz). *Health Physics*, 74 (4):494-522.

Juutilainen J, Kumlin T, Naarala J, 2006, Do extremely low frequency magnetic fields enhance the effects of environmental carcinogens? A meta-analysis of experimental studies. *Int. J. Radiat. Biol.*, 82 : 1 – 12.

Koester P, Sakowski J, Baumann W, Glock HW, Gimsa J, 2007, A new exposure system for the *in vitro* detection of GHz field effects on neuronal networks. *Bioelectrochemistry* 70 : 104–114.

- Krishna G, Hayashi M, 2000, *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research*, 455 : 155–166.
- Leroux E, Ducros A, 2008, Cluster headache. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 3:20
- Mac Lean K, 1963, High Magnetic fields in terminal cancer and other illness. 3rd International Biometeorological Congress, Pau, France
- Massot O, Grimaldi B, Bailly JM, Kochanek M, Deschamps F, Lambrozo J, Fillion G., 2000, Magnetic field desensitizes 5-HT(1B) receptor in brain: pharmacological and functional studies. *Brain Research*, 858:143–150.
- McKay JC, Prato FS, Thomas AW, 2006, A literature review: the effects of magnetic field exposure on blood flow and blood vessels in the microvasculature. *Bioelectromagnetics*, 28 : 81-98.
- Penafiel LM, Litovitz T, Krause D, Desta A, Mullins JM, 1997, Role of modulation on the effect of microwaves on ornithine decarboxylase activity in L929 cells. *Bioelectromagnetics*, 18 : 132-141.
- Pilla AA, 2006, Mechanisms and therapeutic applications of time-varying and static magnetic fields. In: *Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields*, 3rd Edition. Barnes F, Greenebaum B, eds, CRC Press,
- Repacholi, 1998, Low-level exposure to radiofrequency electromagnetic fields: health effects and research needs. *Bioelectromagnetics* 19:1–19.
- Ruggiero M, Bottaro DP, Liguri G, Gulisano M, Peruzzi B, Pacini S. 2004, 0.2 T magnetic field inhibits angiogenesis in chick embryo chorioallantoic membrane. *Bioelectromagnetics*, 25 : 390-396.
- Salford LG, Brun AE, Eberhardt JL, Malmgren L, Persson BR. 2003, Nerve cell damage in mammalian brain after exposure to microwaves from GSM mobile phones. *Environmental Health Perspectives*, 111:881-883.
- Tepper OM, Callaghan MJ, Chang EI, Galiano RD, Bhatt KA, Baharestani S, Gan J, Simon B, Hopper RA, Levine JP, Gurtner GC, 2004, Electromagnetic fields increase *in vitro* and *in vivo* angiogenesis through endothelial release of FGF-2. *The FASEB Journal*, 18 : 1231-1233.
- Tuffet S, de Seze R, Moreau JM, Veyret B, 1993, Effects of a strong pulsed magnetic field on the proliferation of tumor cells *in vitro*. *Bioelectrochemistry and bioenergetics*, 30, 151-160.
- Vogel G, 2008, Scientific misconduct. Fraud charges cast doubt on claims of DNA damage from cell phone fields. *Science*, 321 : 1144-1145.
- Williams CD, Markov MS, Hardman WE, Cameron IL, 2001, Therapeutic electromagnetic field effects on angiogenesis and tumor growth. *Anticancer Res.*, 21 : 3887-3892.

Abréviations

ADN : Acide DesoxyriboNucléotide
ACI : Action Concertée Incitative
AFSSET : Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail
AIF : Apoptosis-inducing factor
ANR : Agence Nationale de la Recherche
ANX : Annexine V
AVF : Algie Vasculaire de la Face
BCL2 : B-cell lymphoma 2
BfS : Ministère allemand de l'environnement et office fédéral allemand de protection contre les radiations
BHE : Barrière Hémato Encéphalique
Bio-EM : Bio-Électromagnétisme
CDMA : Code Division Multiple Access
CEA : Commissariat à l'Énergie Atomique
CIPR : Commission Internationale de Protection contre les Radiations
CNRS : Centre national de la recherche scientifique
CSHPF : Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France
DAMPS : Digital Advanced Mobile Phone System
DAS: Débit d'Absorption Spécifique (SAR en Anglais)
DEA : Diplôme d'Études Approfondies
DGS : Direction générale de la Santé
DIOC, DIOC6 : [3,3' - Dihexyloxacarbo-cyanine iodide]
EBF : Extrêmement Basse Fréquence
EDGE : Enhanced Data rates for GSM Evolution
eV : Électron Volt
FDMA : Frequency Division Multiple Access
FGF ; FGF2 : Fibroblast Growth Factor ; Fibroblast Growth Factor 2
GFAP: Glial Fibrillary acidic protein
GFP : Green Fluorescent Protein
GSM : Global System for Mobile Communication
Hsp : désigne une protéine de choc thermique
HSP : désigne une famille de Hsps
hsp : désigne un gène codant pour une Hsp
ICNIRP : International Commission on Non-Ionising Radiation Protection
INC : incubateur
INERIS : Institut National de l'ENvironnement Industriel et des RISques
IP : Iodure de Propidium
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
ISM : Ingénierie des Systèmes Neuromorphiques
ISPED : Institut de Santé Publique, d'Epidémiologie et de Développement
Hz, MHz, GHz : Hertz, MégaHertz, GigaHertz
LLA : Leucémie Lymphoïde Aiguë
NOS-2 : Nitric Oxide Synthase 2
ODC : Ornithine DeCarboxylase
PCRD : Programme Cadre de Recherche et Développement
PEPS : Projets Exploratoires Pluridisciplinaires (PEPS)
RF : RadioFréquences
SNC : Système Nerveux Central

SAR : Specific Absorption Rate (ou DAS en Français)

SEM : Erreur standard à la moyenne

SLA : Sclérose Latérale Amyotrophique

SOD-1 : SuperOxyde Dismutase 2

T, mT, μ T : Tesla, milliTesla, microTesla

TDMA : Time Division Multiple Access

TMS, rTMS : Transcranial Magnetic Stimulation ; repetitive Transcranial Magnetic Stimulation

TNF : Tumor Necrosis Factor

UE : Union Européenne

UMTS : Universal Mobile Telecommunications System

UV : Ultraviolet

WiFi : *Wireless Fidelity* TM

WiMAX : Worldwide Interoperability for Microwave Access :

$\Delta\Phi_m$: différence de potentiel membranaire mitochondrial

γ -rays : Gamma-rays

5HT-1B : 5-Hydroxy-Tryptamine 1B (récepteur 5HT1B)

²³⁸Pu : Plutonium 238