



CHAMPS ÉLECTROMAGNÉTIQUES : DE LA DOSIMÉTRIE À LA SANTÉ HUMAINE

Etude au niveau cellulaire, des effets biologiques des champs radiofréquences pulsés utilisés en IRM à haute résolution.

Study at the cellular level, of potential biological effects trigger by pulsed radiofrequency fields used in high-field MRI.

Yonis Soubere Mahamoud¹, Catherine Le Quément¹, Maxim Zhadobov², Guillaume Ferrand³, Rémy Le Guevel⁴, Pierre-Henri Carton³, Michel Luong³, Ronan Sauleau² & Yves Le Dréan¹

¹ Institut de Recherche sur la Santé, l'Environnement et le Travail (IRSET), Inserm U1085, Université de Rennes 1, Rennes, France (yves.le-drean@univ-rennes1.fr)

² Institut d'Électronique et de Télécommunications de Rennes (IETR), UMR CNRS 6164, Université de Rennes 1, Rennes, France (maxim.zhadobov@univ-rennes1.fr)

³ Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA), Direction des Sciences de la Matière, Institut de recherche les lois fondamentales de l'Univers, Gif-sur-Yvette, France (michel.luong@cea.fr)

⁴ Plate-forme ImPACcell (Imagerie Pour Analyse du Contenu cellulaire), Université de Rennes 1, UMS-3480, Rennes, France (remy.leguevel@univ-rennes1.fr)

Mots-clefs : IRM, champs pulsés, stress cellulaire.

Key words: MRI, pulsed field, cellular stress.

Résumé:

Les imageurs IRM à haute résolution utilisent des ondes radiofréquences en régime impulsionnel avec des puissances crêtes élevées (jusqu'à plusieurs kW). Or, il n'existe actuellement aucune donnée dans la littérature portant sur l'impact biologique éventuel de ce type de signaux. L'objectif de cette étude est de déterminer si l'exposition de cellules humaines à ces rayonnements impulsionnelles peut induire un stress cellulaire. Un système d'exposition pour cellules en culture a été mis au point. Puis une étude dosimétrique numérique (électromagnétique) et expérimentale (électromagnétique et thermique) a été effectuée pour déterminer le scénario d'exposition permettant d'utiliser la plus forte puissance crête, sans induire d'augmentation de température supérieure à 1°C. Des cellules gliales humaines (U251-MG) ont été exposées pendant 45 minutes ou 2 heures. Plusieurs analyses biologiques ont été réalisées. Quels que soient les tests utilisés, les résultats ont été les mêmes pour les cellules exposées et non-exposées (sham). Notre travail montre qu'aucun stress de type thermique, métabolique ou oxydatif n'a eu lieu lors de l'exposition des cellules. De même, l'état de prolifération, la morphologie cellulaire, la perméabilité membranaire et l'intégrité des organites cellulaires n'ont pas été modifiés.

Introduction

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une technique d'imagerie médicale permettant d'obtenir, de façon non invasive, des vues de l'intérieur du corps. Afin de gagner en résolution, une nouvelle génération d'imageurs IRM sont actuellement en cours de développement au Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA Saclay) et au centre NeuroSpin. Ces imageurs à haute résolution utilisent un fort champ magnétique statique (11,7 T), associé à des ondes radiofréquences en régime impulsionnel. Les fréquences porteuses de ces imageurs IRM sont comprises entre 300 et 500 MHz, avec des impulsions de l'ordre de la milliseconde. Les impulsions électromagnétiques peuvent être très intenses, et les puissances crêtes mises en jeu peuvent atteindre 8 kW. Or, il n'existe actuellement aucune donnée dans la littérature ouverte sur l'impact biologique éventuel de ce type de signaux. Par conséquent, il est important d'étudier expérimentalement les éventuels risques biologiques et sanitaires associés à l'utilisation d'antennes IRM à haute fréquence. Dans le cadre d'une coopération entre le CEA Saclay, l'Institut d'Électronique et de Télécommunications de Rennes (IETR) et l'Institut de Recherche sur la Santé, l'Environnement et

le Travail (IRSET) de Rennes, nous avons étudié les réponses cellulaires suite à l'exposition de culture de cellules humaines à ce type de signal.

1. Le système d'exposition

Un système d'exposition a été mis au point afin de pouvoir soumettre une culture de cellules humaines aux rayonnements radiofréquences. Ce système comprend un incubateur Memmert 400, associé à une instrumentation complète intégrant un élément émetteur de type dipôle alimenté par un signal pulsé d'une durée maximale de 10 ms, répété à un cycle utile maximal de 1%. La puissance crête du signal peut atteindre 1 kW. Il a par conséquent été nécessaire de confiner l'expérience afin de ne pas perturber les équipements électroniques avoisinants. Par ailleurs, la température de l'échantillon, maintenue à 37 °C, a été surveillée avec une grande précision ($\pm 0,25^\circ\text{C}$) afin de détecter d'éventuels effets thermiques.

Une étude dosimétrique électromagnétique numérique et expérimentale a été réalisée pour obtenir la cartographie du champ à l'intérieur de l'incubateur et optimiser le positionnement des échantillons. Ensuite, des mesures de la température à l'aide d'un thermomètre à fibre optique ont été effectuées pour déterminer les caractéristiques des impulsions (durée, rapport cyclique, puissance) permettant d'utiliser la plus forte puissance crête, sans induire d'augmentation de température supérieure à 1°C. Deux antennes de type dipôles adaptées à 300 MHz et 500 MHz ont été utilisées ; les paramètres suivants ont été retenus : 1) à 300 MHz : durée de pulse 1ms, rapport cyclique 1/1000, puissance crête 1,67 kW et puissance moyenne 1,67 W ; 2) à 500 MHz : durée de pulse 1ms, rapport cyclique 1/1000, puissance crête 1,0 kW et puissance moyenne 1,0 W.

2. Le modèle biologique

Chez les mammifères, le système nerveux est constitué de deux types de cellules : les neurones et les cellules gliales. Ces dernières sont majoritaires dans le cerveau ; elles remplissent différentes fonctions : guide de migration, développement neuronal, myélinisation, compartimentalisation, soutien, homéostasie, recyclage des neurotransmetteurs, défense immunitaire, plasticité synaptique, etc. Ces cellules ont également pour rôle de sentir et réagir aux variations de l'environnement cellulaire, afin de sécréter des facteurs de survie qui aideront les neurones à survivre en cas de stress aigu. En résumé, ces cellules jouent le rôle d'agents de maintenance et de protection pour les neurones. Nous utilisons la lignée cellulaire U-251 MG comme modèle représentatif des cellules gliales. Cette lignée d'origine humaine est issue d'une tumeur astrocytaire (référence IFO 50288 – Institute for Fermentation, Osaka, Japon). Ces cellules ont été exposées aux ondes radiofréquences pulsées pendant 0h (sham), 45 minutes ou 2 heures. Afin d'éviter tout biais lié à la culture, les cellules plus ou moins exposées ont été cultivées dans les mêmes conditions et ont passé le même temps (6h au total) dans le système d'exposition. Trois à quatre séries d'expositions indépendantes ont été réalisées pour chaque test biologique.

3. Analyse du stress thermique.

L'expression génétique étant un processus multi-étapes, nous avons multiplié les tests de façon à pouvoir analyser le degré de réponse à chaque étape. Ainsi, la réponse au choc thermique a été analysée via trois techniques : transfection de gènes rapporteurs, RT-PCR quantitative et Western-blot. Il ressort de cette série d'expérience que, quel que soit le test utilisé (transfection de gènes rapporteurs, analyse des niveaux d'ARNm par RT-PCR, ou analyse des niveaux de protéines par Western-blot), aucune augmentation significative de la synthèse d'HSP70 n'a pu être détectée après avoir exposé les cellules. L'augmentation de température de 0,9 à 1,0°C enregistrée dans nos conditions n'est pas suffisante pour induire un stress biologique enregistrable.

4. Analyse de l'intégrité cellulaire.

Une analyse par microscopie à fluorescence nous a permis d'étudier l'effet potentiel de l'exposition sur un grand nombre de paramètres cellulaires (morphologie et/ou accumulation de protéines cibles). Pour cela, nous avons utilisé la technologie « Cellomics » développée par Thermo Scientific. Cette technologie comprend des microscopes automatisés, ainsi que des logiciels de prises et d'analyse d'images très performants qui permettent de quantifier les niveaux de fluorescence émise par les marqueurs. Le logiciel permet également de distinguer et de localiser de nombreux organites cellulaires. Ceci permet de générer des données sur la morphologie ou le trafic cellulaire. Tous ces paramètres peuvent être utilisés pour faciliter la distinction entre cellules saines et cellules stressées. Nous avons ainsi analysé l'impact des rayonnements radiofréquences pulsés sur le cycle cellulaire, la perméabilité membranaire, la morphologie nucléaire, l'intégrité des lysosomes et des mitochondries et l'expression des protéines chaperons HSP70 et

HSP90-alpha. Après marquage des cellules par des fluorochromes spécifiques, plus de 16 000 photos ont été prises et analysées en aveugle à la plateforme automatisée « ImPACcell » de l'université de Rennes 1. Il ressort de cette analyse, que mise à part une légère augmentation d'HSP90 α , aucune modification significative n'a été observée, quel que soit le temps d'exposition (45 min ou 2h) ou le type d'onde porteuse (300 ou 500 MHz).

5. Analyse du niveau d'expression de gènes marqueurs de stress cellulaire.

Dans un deuxième temps, nous avons analysé les niveaux d'expression génique de toute une batterie de gènes marqueurs de l'état physiologique des cellules. Par RT-PCR quantitative, nous avons effectué un large criblage (84 gènes marqueurs et 5 gènes invariants en contrôle) afin d'évaluer le stress cellulaire après exposition des cellules. Les gènes marqueurs utilisés sont les suivants :

- marqueurs du stress oxydatif ou métabolique [gènes CAT (catalase), CRYAB (a-Crystallin B), CYP1A1, CYP2E1, CYP7A1, EPHX2, FMO1, FMO5, GPX1 (glutathione peroxidase), GSR (glutathione reductase), GSTM3 (glutathione S-transferase M3), HMOX1, MT2A, POR, PRDX1, PRDX2, PTGS1, UGT1A4, SOD1, SOD2],
- marqueurs du stress protéotoxique [gènes DNAJA1, DNAJB4, HSF1 (tcf5), HSPA1A (hsp70 1A), HSPA1L (hsp70 1L), HSPA2 (hsp70 2), HSPA4 (hsp70), HSPA5 (grp78), HSPA6 (hsp70B), HSPA8, HSPB1 (hsp27), HSP90AA2 (hsp90), HSP90AB1 (hsp90 b), HSPD1 (chaperonin), HSPE1 (chaperonin 10), HSPH1 (hsp105)].
- Marqueurs de l'état de prolifération et d'avancée dans la carcinogenèse a également été analysé [gènes CCNC (cyclin C), CCND1 (cyclin D1), CCNG1 (cyclin G), E2F1, EGR1, PCNA].
- Marqueurs d'arrêt de la croissance et de la sénescence cellulaire [gènes CDKN1A (p21Waf1/p21Cip1), DDIT3 (GADD153/CHOP), GADD45A, GDF15 (PLAB), IGFBP6, MDM2, TP53].
- Marqueurs de stress génotoxique et réparation de l'ADN [gènes ATM, CHEK2 (RAD53), DDB1, ERCC1, ERCC3, RAD23A, RAD50, UNG, XRCC1, XRCC2).
- Marqueurs de la mort cellulaire ou de la signalisation liée à l'apoptose [gènes ANXA5 (annexin v), BAX, BCL2L1 (bcl-x), CASP1 (caspase1/ ICE), CASP8 (FLICE), CASP10 (mch4), FASLG (TNFSF6), NFKBIA (ikBa/mad3), TNF, TNFRSF1A (TNFR1), TNFSF10 (TRAIL)].
- Marqueurs de l'inflammation [gènes CCL3 (MIP-1a), CCL4 (MIP-1b), CCL21 (MIP-2), CXCL10 (IP10), CSF2 (GM-CSF), IL1A, IL1B, IL6, IL18, LTA (TNF b), MIF, NFKB1, NOS2A (iNOS), SERPINE1 (PAI-1)].

Nos mesures montrent des niveaux d'expression identiques entre les cellules contrôles et les cellules exposées pendant 45 minutes ou 2 heures.

6. Conclusion

En conclusion, quel que soit le test utilisé, les résultats ont toujours été négatifs. Ceci montre qu'aucun stress cellulaire n'a eu lieu lors de l'exposition des cellules en régime impulsif de forte puissance crête. Lors de ce travail, nous avons effectué de nombreux contrôles positifs afin de valider la solidité de notre démarche expérimentale. Ces contrôles démontrent que les résultats négatifs obtenus ne sont pas dus à un problème méthodologique, mais qu'ils sont bien le reflet d'une réalité biologique, à savoir, une absence de réponse de la part des cellules.

7. Remerciements.

Les auteurs tiennent à remercier l'Agence Nationale de la Recherche pour leur soutien (contrats ANR-09-RPDOC-003-01 & N° 10-CESA-017-01).