

EXPOSITIONS AUX BASSES FREQUENCES ET LEUCEMIES CHEZ L'ENFANT : L'EPIGENETIQUE EST-ELLE LA CLE ?

Florence Poulletier de Gannes¹, Emmanuelle Poque-Haro¹, Annabelle Hurtier¹, Remy Renom¹, Yann Percherancier¹, Denis Habauzit², Catherine Martin², Yves Le Dréan² & Isabelle Lagroye¹.

¹ Equipe Bioélectromagnétisme. Laboratoire d'Intégration du Matériau au Système (IMS), UMR CNRS 5218. Université de Bordeaux, Talence, France

² Equipe Transcription, Environnement et Cancer. Institut de Recherche sur la Santé, l'Environnement et le Travail (IRSET), Inserm UMR1085. Université de Rennes 1, France.

florence.poulletier@ims-bordeaux.fr

INTRODUCTION

En l'absence d'un lien de causalité démontré entre l'exposition aux champs magnétiques de fréquence extrêmement basse 50/60 Hz (EBF) et la leucémie infantile, la classification des EBF par le Centre International de Recherche contre le Cancer (CIRC) comme "cancérogène possible pour l'homme" n'a pas évolué depuis 2002.

L'objectif du projet Cleman (*Childhood Leukaemia and Magnetic Fields*) est d'étudier, chez la souris, le rôle des EBF sur l'ADN des cellules de la moelle osseuse (MO), le tissu cible dans la leucémie infantile, et du sang. Nous recherchons la présence de lésions de l'ADN et de modifications épigénétiques des histones et de l'ADN, notamment la méthylation du promoteur de certains gènes cibles de la leucémie infantile. De plus, la leucémie infantile étant un phénomène bimodal (un événement initiateur *in utero* suivi d'un événement dans l'enfance), l'exposition aux EBF débute dès l'accouplement des souris et est associée à deux traitements supplémentaires (irradiation des pères et traitement des petits par un chimique génotoxique, le MéthylNitrosoUrée MNU).

MATERIELS ET METHODES

Des souris hybrides, issues du croisement de mâles DBA2 et de femelles C57Bl/6, ont été utilisées lors de cette étude. Les animaux ont été élevés et manipulés suivant les procédures éthiques recommandées par la législation française et le projet a été approuvé par le comité d'éthique de l'Université de Bordeaux (DIR 1371).

Le système d'exposition est composé de 2 bobines de Merritt qui génèrent un champ magnétique vertical uniforme de 1 mT et 50 Hz à l'intérieur des cages. Les animaux ont été exposés 8 heures/jour, 5 jours/semaine, de la conception à la maturité sexuelle (de E 0,5 à 8 semaines post-natales). Un groupe de souris exposées de manière factice (Sham) sert de contrôle. Après leur naissance, les souriceaux sont exposés avec leur mère jusqu'au sevrage. Dans tous les cas, les animaux ont été laissés libres de leur mouvement.

En guise de contrôle positif, 2 conditions expérimentales ont été ajoutées à l'étude. Certains souriceaux ont été traités au N-méthyl-N-nitrosourée (MNU, 10 mg/kg), un produit mutagène et cancérogène connu, alors que d'autres animaux sont issus du croisement de femelles C57Bl/6 classiques et de mâles DBA2 préalablement irradiés aux rayons X (1 Gy), ce traitement devant favoriser l'instabilité génomique de la descendance.

Après exposition, les souris ont été sacrifiées et leur sang et les cellules de moelle osseuse ont été prélevés.

Les lésions de l'ADN sont suivies par deux tests :

- Comètes (alcalin) adapté d'Olive (1999)
 - Détection des lésions simples brin de l'ADN dans les cellules de la moelle osseuse et les cellules mononucléées du sang périphérique.
 - 100 images analysées (2 puits /condition).
 - L'Olive tail moment (OTM) est choisi comme paramètre.
- Micronoyaux
 - Détection de micronoyaux issus de cassures double-brin de l'ADN ou de la perte d'un chromosome (non réparables) dans les érythrocytes polychromatiques immatures en cytométrie de flux (Microflow kit, Litron®)

La méthylation de gènes cibles

- Promoteur du gène CDK1nC
 - Sélectionné pour sa surexpression dans la leucémie infantile via la méthylation des îlots CpG dans son promoteur
 - ADN isolé des cellules de MO et conversion au bisulfite
 - Technique High Resolution Melting (HRM) réalisée après amplification, avec le test de méthylation du promoteur de CDK1nC de souris comprenant 8 CpG sites (EpigenDX®)

Recherche de marqueurs épigénétiques

- Immunocytochimies (ICC) réalisées en utilisant des anticorps primaires reconnaissant spécifiquement certaines modifications post-traductionnelles de l'histone-3 (H3K4me3, H3K9me3, H3K9ac, ...), ou des méthylations ou oxydation de l'ADN (8-OxodG).
- Analyse d'images en semi-haut débit (Cellomics® arrayscan HSC)

RESULTATS

Les expositions ont été réalisées sur 6 séries pour obtenir un total de 9 à 12 portées par condition.

Les résultats de 5 séries d'exposition montrent une tendance non significative des EBF à augmenter des lésions de l'ADN (réparables) spontanées ou induites par le MNU dans les cellules de MO. D'autre part, les EBF ne modifient pas la méthylation du promoteur du gène CDK1Nc dans ces cellules. Dans les cellules mononucléées du sang périphérique, les EBF n'influencent pas les lésions de l'ADN (réparables) spontanées ou induites ni les lésions de l'ADN (non réparables) dans les érythroblastes.

L'irradiation des pères DBA2 avec 1 Gy de rayonnements X n'a pas induit une instabilité génomique détectable. En revanche, les résultats montrent qu'elle abolit l'effet génotoxique du MNU chez les hybrides BDF1, ce qui évoque une réponse adaptative.

Les résultats préliminaires (trois séries d'exposition) ne montrent pas d'effets des EBF sur la majorité des marqueurs épigénétiques sauf sur le marqueur d'oxydation de l'ADN 8-oxodG.

L'ensemble des résultats sera présenté lors du congrès.

Ce projet est financé par le programme ITMO Cancer (Projet CLeMan, convention n° ENV201310)