

EVALUATION DES EFFETS D'UNE EXPOSITION A UN SIGNAL DE TELEPHONIE MOBILE GSM-900 SUR LA PEAU

Sanchez S., Milochau A.*, Billaudel B., Surlève-Bazeille J.E.*, Lagroye I., Poulletier de
Gannes F., Haro E., Dulou P.E., Lassegues M.*, Veyret B.

Laboratoire de Bioélectromagnétisme/EPHE, UMR 5501/PIOM-ENSCP, Pessac
France ; *Laboratoire des Facteurs de Défense et de Régulation Cellulaires, EA 1915,
Talence, France

INTRODUCTION:

La téléphonie mobile s'est répandue dans le public d'une manière très rapide. Actuellement, deux cents millions de personnes en Europe utilisent ce moyen de communication. Parallèlement, des craintes sont exprimées auprès des différentes instances publiques ou industrielles quant aux éventuels effets des radiofréquences (RF). Face à ces questions pressantes, de nombreux programmes de recherche ont démarré à l'échelle nationale et internationale, en particulier sur le cancer. Ces recherches n'ont pas encore permis de donner des réponses définitives.¹. Cependant, peu d'études sont disponibles sur l'évaluation de l'action des RF sur la peau, qui est pourtant le premier organe à être irradié par le radiotéléphone. Ainsi, il a été montré que les champs radiofréquences émis par les téléphones mobiles modifient l'expression de certains gènes et la prolifération cellulaire (Pacini *et al.* 2002, *Oncol. Res.*, 13:19-24). Parmi les gènes dont l'expression est modifiée après exposition figure le gène pro-apoptotique *bax*. On peut noter cependant la faiblesse de la dosimétrie dans cette étude.

Dans le cadre d'un programme d'étude des effets des signaux radiofréquences GSM-900 sur la peau, nous avons effectué (i) des expérimentations *in vivo* : nous avons recherché l'expression de protéines de choc thermique (HSP70, HSP27 et HSC70) dans la peau de rats exposés et (ii) des expérimentations *in vitro* : l'apoptose ou mort cellulaire programmée a été évaluée sur des cellules de peau humaine (kératinocytes, fibroblastes et mélanocytes primaires).

STRATEGIE EXPERIMENTALE:

Cultures cellulaires : Les cellules primaires humaines sont obtenues à partir d'explants mammaires (chirurgie plastique). Les kératinocytes sont cultivés dans du milieu MCDB 153 supplémenté par de l'insuline (5 µg/ml), de l'hydrocortisone (1,4 µM), des extraits pituitaires bovins (70 µg/ml), de facteur de croissance épidermique (10 ng/ml) et des antibiotiques. Les

¹ R. de Seze, and B. Veyret (1996), 'Biological effects of electromagnetic fields'. in: *Review of Radio Science 1993-95*, W.R. Stone Ed., Oxford University Press (1996), 955-994.

- M. Repacholi et al. (1998), 'Low-level exposure to RF fields: health effects and research needs'. *Bioelectromagnetics*, 19, 1-19

mélanocytes sont cultivés dans ce même milieu MCDB 153 additionné de 20 µg/ml d'insuline, 1,4 µM d'hydrocortisone, 180 µg/ml d'extraits pituitaires bovins, 3% de sérum de cheval et des antibiotiques. Enfin, les fibroblastes sont cultivés dans du milieu DMEM supplémenté de 10% de sérum de veau foetal et des antibiotiques. Pour les différents types cellulaires, les passages 1 à 4 ont été utilisés pour les expositions.

Exposition au signal GSM-900

Pour les expositions *in vitro*, le signal GSM-900 est généré dans une antenne fil-plaque. Le signal est modulé en amplitude par des pulses rectangulaires avec une fréquence de répétition de 217 Hz et de rapport cyclique de 1:8 (largeur de pulse : 0,576 ms).

Les cellules de peau humaine ont été exposées au signal GSM-900 pendant 48 heures à un débit d'absorption spécifique (DAS) de 2 W/kg. La température au cours de l'exposition est maintenue à 37°C±0,3°C.

Pour les expositions *in vivo*, les animaux doivent être maintenus dans des systèmes de contention (ou fusées), afin d'obtenir une dosimétrie correcte. L'exposition locale au GSM-900 a été réalisée au moyen d'une antenne-boucle localisée sur la zone sélectionnée. Des rates « hairless » (250-300g, Iffa Credo) ont été progressivement habitués aux fusées pendant 2 semaines puis le côté droit des rates a été exposé 2 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 4 semaines à des DAS de 2 et 4 W/kg, le côté opposé servant de contrôle interne. De plus, des contrôles-cage (rats libres de leurs mouvements) et des contrôles-sham (rats placés dans une fusée sans antenne-boucle) sont inclus dans le protocole.

Paramètres étudiés

L'analyse des résultats est réalisée en aveugle (codes des échantillons tissulaires ou cellulaires révélés après analyse complète).

Détection de l'apoptose: Une irradiation UV (50 mJ/cm²) est utilisée comme contrôle positif de l'apoptose. L'entrée des cellules en apoptose est mesurée immédiatement après l'exposition au GSM-900 en utilisant deux marqueurs précoces de l'apoptose :

(i) *Annexine V* : La perte de l'asymétrie membranaire, mesurée par la liaison de l'Annexine V aux phosphatidylsérines, est détectée au moyen du kit APOPTEST™-Fluos (Dako, France). Après exposition, 10⁶ cellules sont incubées (10-15 min.) dans 100 µl de solution de marquage froide (1 µl d'Annexine-V/FITC et 2,5 µl d'iodure de propidium (IP) 250 µg/ml) dans 96 µl de tampon de marquage. Ensuite, 250 µl de tampon de marquage sont ajoutés et les échantillons sont analysés sur un cytomètre de flux FacsCan®.

(ii) *DiOC₆(3)* : La diminution du potentiel transmembranaire mitochondrial (PTM) qui survient précocement au cours du processus apoptotique est mesuré au moyen de la carbocyanine

DiOC₆(3). Après l'exposition, environ 10⁶ cellules sont incubées (15 min.) dans 500 µl de PBS contenant 40 nM de DiOC₆(3). De l'IP (50 µg/ml) est ajouté avant l'analyse des échantillons par cytométrie de flux.

La nécrose cellulaire est détectée dans chaque échantillon par incorporation d'IP.

Détection des protéines de choc thermique HSP :

Des contrôles positifs d'expression de protéines de choc thermique ont été réalisés en exposant à une irradiation UVB les cellules (50 mJ/cm²) ou les animaux (400 mJ/cm²).

Après exposition, les cellules et les prélèvements de peau (issus de biopsies sur chaque flan après sacrifice des animaux), ont été fixées dans le para-formaldéhyde (4 %) et traités pour le marquage immunochimique.

Les protéines HSP27, HSC70 et HSP70 sont détectées au moyen d'anticorps spécifiques anti-rat ou anti-humain (Stressgen[®]) qui sont révélés par des anticorps secondaires marqués au FITC. Le niveau d'expression des protéines HSP a été évalué sous microscope à fluorescence par analyse image (Logiciel Aphelion[®]).

RESULTATS:

Apoptose : Les résultats de 5 expérimentations « en aveugle » montrent qu'une exposition au signal GSM-900 n'induit pas significativement d'apoptose dans les kératinocytes humains normaux, comme le montre la figure 1. Par ailleurs, les résultats préliminaires obtenus avec les autres types de cellules de la peau n'indiquent pas d'effets de ce signal de téléphonie mobile sur le processus apoptotique. Ces dernières données doivent être confirmées pour permettre de conclure. La totalité des expérimentations sera présentée au cours du congrès.

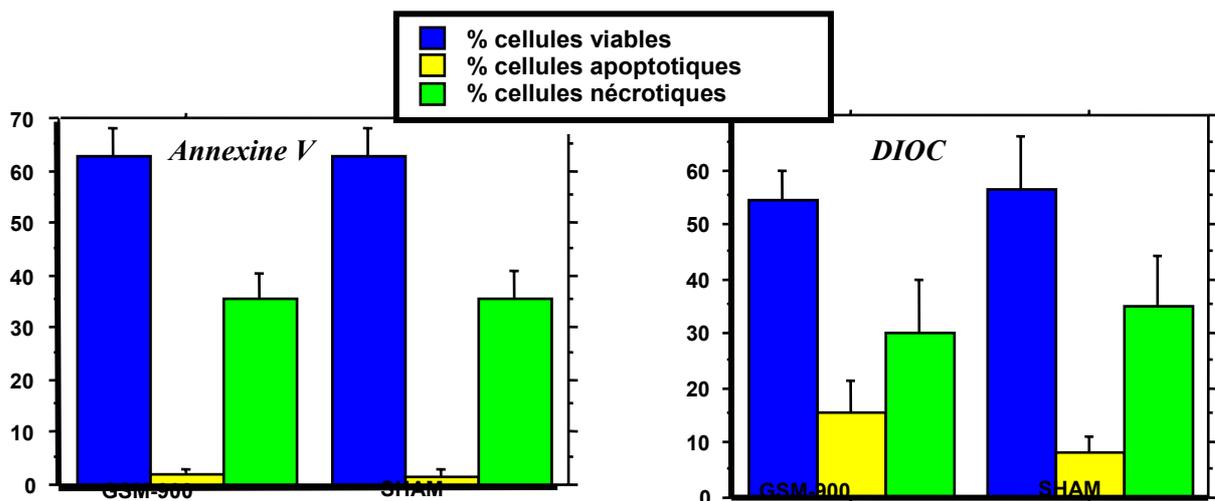


Figure 1: Pourcentage de kératinocytes viables, apoptotiques et nécrotiques mesuré par cytométrie de flux au moyen des marquages Annexine V /IP et DiOC /IP après exposition factice (sham) ou réelle au GSM-900 pendant 48 heures à 2 W/kg. La moyenne \pm SEM de 5 expériences indépendantes est présentée.

HSP: Bien que HSP27 seulement soit induite dans les fibroblastes, l'irradiation UVB augmente généralement l'expression des HSP recherchées dans les différents types

cellulaires *in vitro*. Les résultats préliminaires montrent qu'une exposition de 48 heures au signal GSM à 2 W/kg ne semble pas capable d'induire l'expression de ces protéines. La figure 2 montre le résultat de 3 expérimentations « en aveugle » sur les kératinocytes humains normaux.

Les analyses immunohistochimiques sont en cours sur les biopsies de peau.

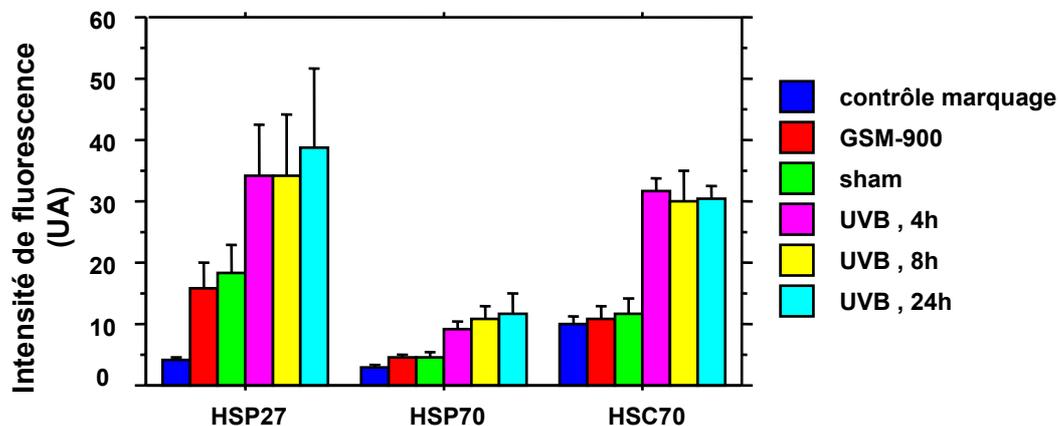


Figure 2: Expression des protéines de choc thermique HSP27, HSP70 et HSC70 dans des kératinocytes humains primaires après exposition factice (sham) ou réelle au GSM-900 pendant 48 heures à 2 W/kg. La dose d'irradiation UVB est de 0,05 J/cm² et l'expression des HSP est mesurée 4, 8 et 24 heures après irradiation. Les résultats sont exprimés en intensité de fluorescence (Unité Arbitraire) en fonction des conditions d'exposition. La moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes est présentée.

CONCLUSIONS: A notre connaissance, nous présentons la première étude sur les effets des radiofréquences des signaux de téléphonie mobile sur les différents types de cellules primaires de peau humaine, en particulier sur des kératinocytes. Nous montrons que ces cellules n'entrent pas en apoptose et ne voient pas leur niveau d'expression des protéines de choc thermique majoritaires de la peau (HSP27, HSP70 et HSC70) modifié sous exposition contrôlée à un signal GSM-900 (2 W/kg, 48 heures). De plus, les résultats préliminaires sur les autres cellules de la peau (fibroblastes et mélanocytes) ne suggèrent pas que ce type de radiofréquence puisse influencer le processus apoptotique ou l'expression des HSP dans ces cellules humaines. Des expériences de confirmation sont en cours. Nous cherchons actuellement à vérifier que l'absence d'effets biologiques de ce signal GSM-900 *in vitro* peut être corrélée à l'absence d'effets sur la peau *in vivo*.

REMERCIEMENTS:

Ce travail est soutenu par le CNRS, le Conseil Régional Aquitaine et France Telecom R&D.