

Titre du projet : **Impact sur la santé des rayonnements millimétriques**
 Acronyme : **HIMWR**

Coordonnateur du projet : Professeur Denis MICHEL. Equipe « Homéostasie Intracellulaire des Protéines ». UMR CNRS 6026 – Université de Rennes I

Responsable scientifique : Dr Yves LE DREAN. Equipe « Homéostasie Intracellulaire des Protéines ». UMR CNRS 6026 – Université de Rennes I.

Principaux membres de l'équipe 1, ayant participé au projet : Fabienne DESMOTS, Yves LE DREAN, Catherine LE QUEMENT, Sylvain LECOMTE, Denis MICHEL, Christophe NICOLAS NICOLAZ, Frédéric PERCEVAULT.

Equipe partenaire : Groupe « Antennes & hyperfréquences » Institut d'Electronique et de Télécommunications de Rennes (IETR), UMR CNRS 6164 – Université de Rennes I

Principaux membres de l'équipe 2, ayant participé au projet : Laurent LE COQ, Christophe NICOLAS NICOLAZ (doctorant partagé entre les deux équipes), Ronan SAULEAU, Daniel THOUROUDE, Maxim ZHADOBOV.

Les objectifs et la situation du projet :

Les systèmes de communication sans fil se sont considérablement développés durant la dernière décennie. En raison de la saturation de la partie basse du spectre micro-ondes et des besoins croissants en transmission haut débit, les nouvelles fréquences de fonctionnement sont décalées vers les fréquences millimétriques (figure 1A). Celles situées au voisinage de 60 GHz sont déterminées par les leaders mondiaux en télécommunications développant les futurs réseaux locaux sans fils (ex : réseaux multimédia WiHD™ - figure 1B), car elles présentent de nombreux avantages, notamment en termes de débit très élevés et de confidentialité.

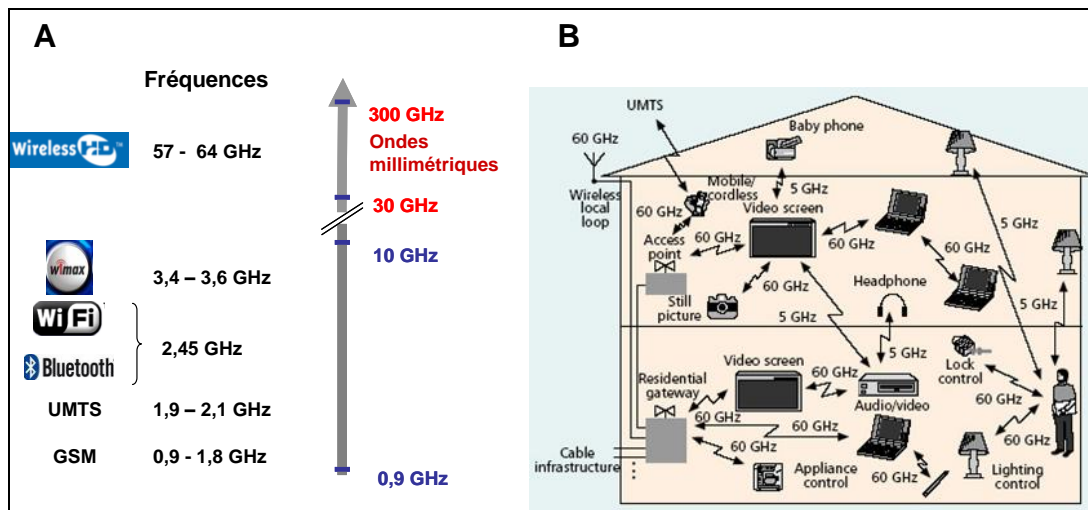


Figure 1 : Systèmes de télécommunications sans fil, **A)** Pour faire face à la saturation des systèmes de télécommunication actuels qui utilisent des fréquences allant de 0,8 à 5 GHz, les fabricants se décalent vers de nouvelles bandes de fréquences, notamment celles situées dans le domaine des ondes dites millimétriques, comprises entre 30 et 300 GHz. **B)** Les fréquences autour de 60 GHz seront utilisées dans des communications intra-bâtiment pour relier sans fil différents appareils électroniques.

L'utilisation de rayonnements électromagnétiques aux alentours de 60 GHz soulève cependant quelques inquiétudes. Par exemple, ces radiations sont absentes du spectre naturel

et les organismes vivants n'y ont encore jamais été exposés dans les conditions naturelles, suggérant qu'aucun mécanisme d'adaptation n'a jamais été sélectionné au cours de l'évolution. De plus, ces ondes sont utilisées en thérapie dans certains pays d'Europe de l'est, ce qui laisse supposer que des interactions entre ces ondes et les organismes vivants sont possibles. L'utilisation de nouveaux systèmes de communication sans fil à 60 GHz pourrait donc avoir des conséquences imprévues sur la population et la connaissance de l'impact potentiel des ondes millimétriques (OMM) de faible puissance sur la santé est de la plus haute importance.

Les objectifs majeurs de notre projet consistaient à déterminer *in vitro* les effets potentiels des OMM de faible puissance sur les processus cellulaires liés aux stress. L'originalité de ce projet tient principalement à son caractère anticipateur et préventif. En effet, il est important de noter que notre étude s'est placée en amont et que son but était de vérifier l'innocuité des OMM avant que ces dernières ne soient mises sur le marché. A notre connaissance, ce fût le premier projet en Europe se proposant d'étudier à grande échelle, les effets biologiques potentiels des OMM.

Les matériels et méthodes :

Le système d'exposition que nous avons développé est adapté pour des études *in vitro*, sur des cellules en culture. Les OMM pénètrent très peu dans l'organisme. De ce fait, la peau est l'organe principal soumis à l'action de ces ondes. C'est pourquoi nous avons privilégié les kératinocytes d'origine humaine comme modèle. Les conditions de culture dans l'étuve contenant le système d'exposition ont été optimisées de façon à ce qu'elles affectent le moins possible la croissance et l'homéostasie des cellules.

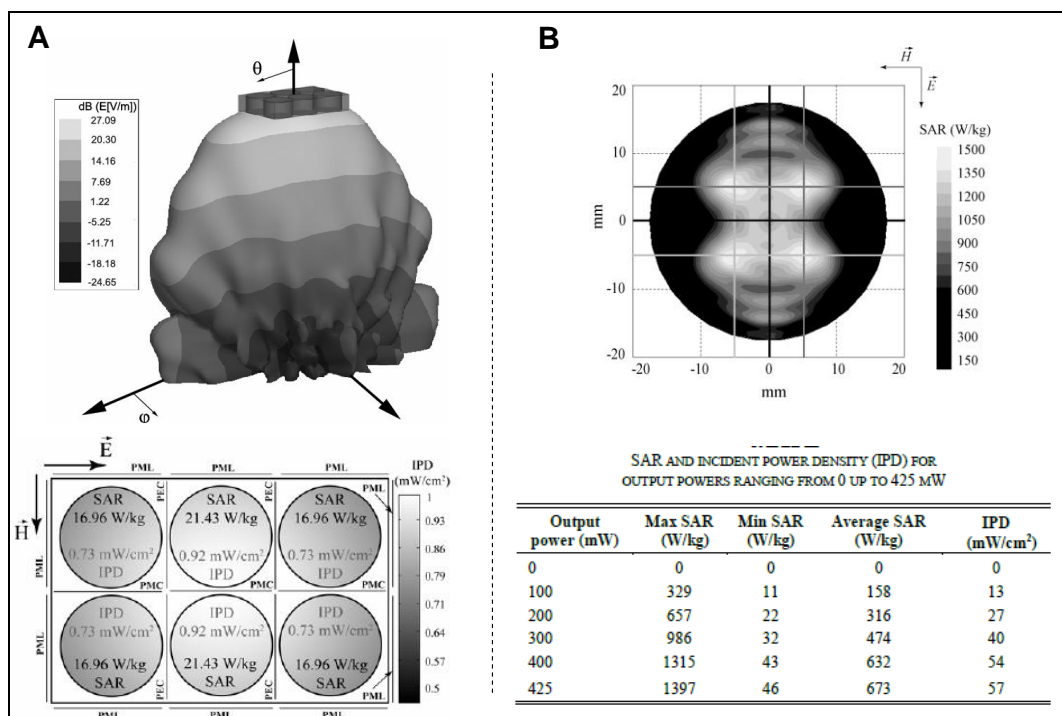


Figure 2 : Diagramme de rayonnement représentant la quantité de densité de puissance incidente et du DAS (SAR en anglais) au niveau des cellules, dans nos systèmes d'exposition (A) en champ lointain, (B) en champ proche.

Les expositions de culture de cellules aux OMM ont été réalisées avec deux types de générateurs différents, qui possèdent chacun leurs caractéristiques propres. Le premier

(Siemens RWON 14) fonctionne dans une bande de fréquence comprise entre 50 et 75 GHz mais il est limité en puissance (puissance maximale ($P_{max} = 50 \text{ mW}$). Le deuxième appareil utilisé (QuinStar Technology) ne permet de travailler qu'à une seule fréquence précise (60,4 GHz, ce qui correspond à la fréquence de résonance maximale de l'oxygène moléculaire), mais avec une puissance 20 fois plus forte (jusqu'à 1 W). Ainsi, en champ lointain, nous avons pu atteindre une densité de puissance de 1 mW/cm^2 (ce qui correspond à la limite actuelle pour le grand public, établis par l'ICNIRP – *International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection*). De plus, le passage en zone de champ proche nous a par la suite permis de monter en puissance jusqu'à dépasser les valeurs limites autorisées pour les travailleurs, c'est à dire 5 mW/cm^2 .

Une étude dosimétrique a été réalisée pour optimiser notre système et les conditions d'exposition. Ceci nous a notamment permis d'obtenir une répartition du débit d'absorption spécifique (DAS) (ou *specific absorption rate*, SAR en anglais) la plus uniforme possible dans la monocouche cellulaire (notamment lors d'exposition en champ proche). Une partie de ce travail a été fait en collaboration avec le Centre de Physique Biomédicale (Temple University, Philadelphia, USA). La Figure. 2 montre un exemple de distribution de la densité superficielle de puissance et du DAS en champ lointain (A), ou en champ proche (B).

Les principaux résultats scientifiques :

Plusieurs types de stress cellulaires ont d'abord été examinés lors d'expériences pilotes. Ces résultats préliminaires nous ont incités à concentrer nos efforts sur le stress du réticulum. Le réticulum endoplasmique (RE) assure un certain nombre de fonctions cruciales pour l'homéostasie et la survie cellulaire. Ce compartiment cellulaire est vulnérable à plusieurs perturbations : flux ioniques, modifications de membrane ; autant de paramètres potentiellement influençables, d'après la bibliographie, par des expositions aux OMM.

De façon à avoir une approche la plus complète possible, plusieurs niveaux de réponse (promoteur, ARN, protéines) ont été analysés. D'abord, nous avons vérifié si l'exposition aux OMM n'entraînait pas de dénaturation massive des protéines au sein du réticulum. Pour cela, la phosphatase alcaline SEAP (pour *Secreted-Embryonic Alkaline Phosphatase*) a été utilisée comme rapporteur (test 1 – figure 3). En complément, nous avons également vérifié si l'exposition aux ondes à 60,4 GHz n'induisait pas l'épissage du messager codant le facteur XBP1 (test 2 – figure 3). En utilisant un gène rapporteur contenant le gène luciférase sous contrôle d'un promoteur contenant des éléments de réponse ERSE (*ER-stress element*), nous avons ensuite regardé si l'exposition aux OMM n'activait pas le facteur de transcription ATF6 (test 3 – figure 3). Enfin, nous avons vérifié si l'exposition n'induisait pas l'expression des gènes codant pour les chaperons du réticulum (BiP/Grp78, ORP150 – test 4, figure 3). Nous avons mesuré les niveaux d'expression dans les cellules irradiées et dans les cellules contrôles (*sham*), et comparé ces niveaux à ceux obtenus après traitement avec des drogues telles que la thapsigargine et la bréfeldine A, connues pour induire un stress réticulaire aigu.

Pour compléter notre étude, nous avons regardé si les caractéristiques physiques des ondes pouvaient ou non avoir une influence sur l'induction du stress réticulaire. Autrement dit, nous avons étudié le rôle des principaux paramètres de rayonnement : fréquence, densité de puissance et régime d'exposition (figure 3). Nous avons commencé par analyser le rôle de la fréquence en nous plaçant dans la bande de fréquences 57-64 GHz (norme IEEE 802.15.3c). Le choix des longueurs d'ondes testées s'est fait selon les données de spectroscopie micro-ondes. En chimie analytique, l'interaction ondes-matière est utilisée pour caractériser certaines molécules diélectriques. Au sein des données disponibles, nous avons sélectionné 8 fréquences spécifiques de groupements moléculaires contenant du carbone, de l'oxygène ou de l'azote, trois atomes fortement présents dans les macromolécules

biologiques. De plus, nous avons analysé l'effet de la puissance des OMM sur la réponse au stress réticulaire. Pour cela, le système d'exposition a été modifié afin de pouvoir exposer les cellules en champs proche et ainsi monter en puissance, jusqu'à des niveaux dépassant les normes requises pour le grand public ou les travailleurs et atteindre les niveaux utilisés en thérapie dans les pays d'Europe de l'est.

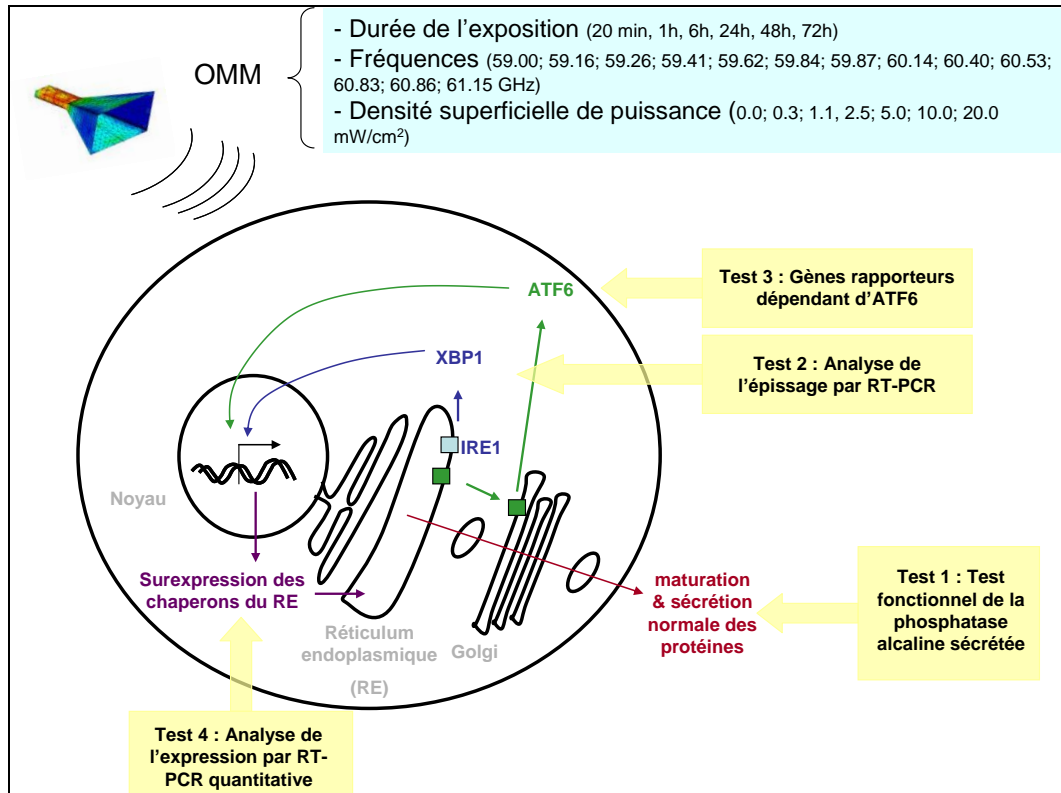


Figure 3 : Effet des ondes millimétriques (OMM) sur le stress du réticulum Plusieurs paramètres d'exposition (surlignés en bleu) ont été analysés. Le réticulum est impliqué dans la maturation des protéines devant emprunter le système sécrétoire. En cas de stress protéotoxique dans ce compartiment cellulaire, plusieurs voies de signalisation sont activées. L'une conduit à la maturation d'ATF6 et la seconde induit la synthèse du facteur XBP1. Ces facteurs de transcription permettent la surexpression de protéines chaperons spécifiques au réticulum. Plusieurs tests (surlignés en jaune) ont été utilisés pour évaluer l'état du stress du réticulum après exposition des cellules.

Ce travail a demandé beaucoup de temps, car nous avons analysé de façon systématique, de nombreux paramètres. De plus, afin de générer assez de données pour réaliser des tests statistiques robustes, des dizaines d'expositions et des centaines de PCR ont été réalisées et plusieurs gènes sentinelles spécifiques du stress du réticulum ont été étudiés puis comparés à plusieurs gènes référents. Nos résultats montrent que les OMM de faibles puissances (moins de 20 mW/cm²), quelles que soient les fréquences utilisées (entre 59 et 61 GHz) et le temps d'exposition (de 20 min à 3 jours), n'induisent pas l'expression des protéines chaperons spécialisées dans la réponse au stress réticulaire.

Nous avons ensuite mené une approche à haut débit sur des cultures primaires de kératinocytes humains. En utilisant des puces à ADN, nous avons recherché à l'échelle du génome entier, l'existence de gènes cibles. Les expositions ont été réalisées à la fréquence de 60,4 GHz, à une densité superficielle de puissance moyenne de 1.8 mW/cm². Les expositions (n = 4) ont été réalisées durant différents temps (1h, 6h, 24h), afin de déterminer si les effets potentiels provoqués par les ondes pouvaient être de nature précoce (1h), intermédiaire (6h)

ou tardive (24h). Parmi les 41000 entités géniques présentes sur les puces, 26301 « spots » positifs, correspondant aux gènes exprimés dans la cellule ont été obtenus. Plusieurs analyses comparatives ont été effectuées (0h vs 1h ; 0h vs 6h ou 0h vs 24h). De façon à renforcer la robustesse du test statistique utilisé par le logiciel GeneSpring (test t), des corrections statistiques supplémentaires peuvent être appliquées. Dans les conditions statistiques les plus strictes (test t avec les corrections de Bonferroni, Wetsfall-Young ou de Benjamini-Hochberg), aucun gène n'est trouvé différentiellement exprimé. Ce n'est qu'en absence de correction statistique supplémentaire que 130 gènes cibles potentiels ont pu être sélectionnés (Tableau 1). Curieusement, on peut remarquer que les expositions aux OMM semblent être marquées majoritairement par des phénomènes de répression de niveaux d'expression des gènes (figure 4A et 4B)

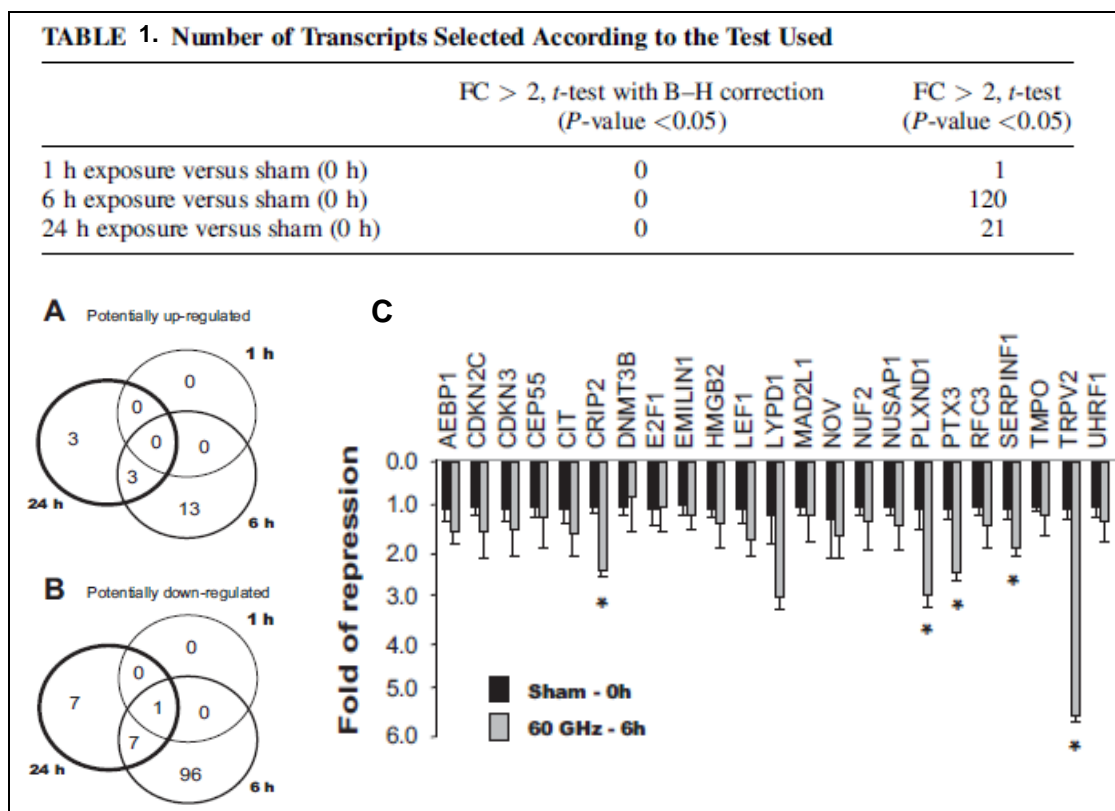


Figure 4 : Diagrammes deVenn montrant la répartition des gènes potentiellement sur- (A) ou sous-exprimés (B) après 1h, 6h ou 24h d'exposition à 60,4 GHz. C) Validation des résultats de microarray par RT-PCR quantitative. Chaque valeur est la moyenne +/- l'écart type de 4 expériences indépendantes. * $P < 0.05$ comparé au contrôle (sham).

L'absence de correction statistique lors de la sélection implique que sur les 130 gènes trouvés, nombre d'entre eux doivent correspondre à des faux positifs. C'est pourquoi nous avons effectué une validation par RT-PCR en temps réel. Nous avons sélectionné les 24 gènes qui présentaient la meilleure combinaison par rapport : 1) à leur niveau d'expression différentielle enregistrée par les puces à ADN ; 2) à leur valeur p lors des tests statistique sans correction, 3) à leur niveau d'expression (pas trop proche du bruit de fond, afin d'éviter toute source de faux positif). Notre analyse par PCR (figure 4C) a mis en évidence 5 gènes qui sont confirmés comme étant réellement différentiellement exprimés en cas d'exposition. Ces gènes sont :

- CRIP2 (CYSTEINE-RICH PROTEIN 2) – Code une “zinc ion binding protein”, ayant un rôle dans la prolifération cellulaire et l'hémopoïèse

- PLXND1 (PLEXIN D1) – Récepteur membranaire ayant un rôle dans le développement ; les plexines ont un rôle dans la prolifération et l'adhésion cellulaire
- PTX3 (PENTRAXIN-RELATED GENE, RAPIDLY INDUCED BY IL-1 BETA) – Rôle dans la réponse inflammatoire.
- SERPINF1 (SERPIN PEPTIDASE INHIBITOR, CLADE F (ALPHA-2 ANTIPLASMIN, PIGMENT EPITHELIUM DERIVED FACTOR, MEMBER 1) – C'est un inhibiteur d'endopeptidase. Facteur sécrété qui aurait un rôle dans l'angiogénèse.
- TRPV2 (VANILLOID RECEPTOR-LIKE PROTEIN 1) – C'est un canal à calcium qui aurait un rôle dans la perception sensorielle

Les gènes PTX3 et TRPV2 présentent un intérêt particulier au regard de la littérature. En effet l'utilisation des OMM en thérapie suggère une interférence possible avec la réponse inflammatoire (rôle de PTX3) ou un effet analgésique (implication potentielle de TRPV2).

Les principales publications obtenues :

Ces résultats ont fait l'objet de 5 publications dans des journaux internationaux à comité de lecture, de 9 présentations dans des congrès internationaux et de 12 présentations dans des congrès nationaux ou locaux. Le soutien de l'ANR a été systématiquement indiqué dans toutes ces présentations. Ces travaux ont également constitué l'essentiel de la thèse de M. Nicolas Nicolaz (thèse réalisée à l'université de Rennes 1, en codirection entre l'IETR et l'UMR CNRS 6026).

Publications dans des revues internationales à comité de lecture :

- 1/ M. Zhadobov, R. Sauleau, Y. Le Dréan, S. I. Alekseev, M. C. Ziskin. (2008) « Numerical and experimental millimeter-wave dosimetry for *in vitro* experiments”. IEEE Microwave Theory and Techniques, 56(12):2998-3007.
- 2/ C. Nicolas Nicolaz, M. Zhadobov, F. Desmots, R. Sauleau, D. Thouroude, D. Michel and Y. Le Dréan. (2009) “Absence of direct effect of low-power millimeter-wave radiation at 60.4 GHz on endoplasmic reticulum stress” Cell Biology and Toxicology, 25(5):471-478.
- 3/ C. Nicolas Nicolaz, M. Zhadobov, F. Desmots, A. Ansart, R. Sauleau, D. Thouroude, D. Michel and Y. Le Dréan. (2009) “Study of Narrow Band Millimeter-wave Potential Interactions with Endoplasmic Reticulum Stress Sensor Genes” Bioelectromagnetics, 30(5):365-373
- 4/ M. Zhadobov,, C. Nicolas Nicolaz, R. Sauleau, F. Desmots, D. Thouroude, D. Michel, and Y. Le Dréan. (2009) « Evaluation of the Potential Biological Effects of the 60-GHz Millimeter Waves upon Human Cells” IEEE Antennas and propagation, 57(10):2949-56
- 5/ C. Le Quément, C. Nicolas Nicolaz, M. Zhadobov, F. Desmots, R. Sauleau, M. Aubry, D. Michel and Y. Le Dréan. (2011). « Whole-genome expression analysis in primary human keratinocyte cell culture exposed to 60 GHz radiations”. Bioelectromagnetics. 2011 Aug 3. doi: 10.1002/bem.20693. [Epub ahead of print]

Communications à des colloques internationaux :

- 1/ M Zhadobov, R Sauleau, Y Le Dréan, S. I. Alekseev, M. C. Ziskin. “Electromagnetic dosimetry for *in vitro* studies at millimeter waves: importance of natural physiological variations in cells”. 30th Annual Meeting of BEMS, San Diego, USA, June 8-12, 2008.
- 2/ C Nicolas-Nicolaz, M Zhadobov, R Sauleau, D Thouroude, D Michel and Y Le Dréan. ”Effect of low-power millimeter waves on endoplasmic reticulum stress”. 30th Annual Meeting of BEMS, San Diego, USA, June 8-12, 2008.
- 3/ M Zhadobov, R Sauleau, Y Le Dréan, S I. Alekseev, M C. Ziskin. “Numerical and Experimental Approaches to Millimeter-Wave Dosimetry for *in vitro* Experiments” 33rd International Conference on Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves. California Institute of Technology. Pasadena . California. USA September 15 – 19, 2008

- 4/ C Le Quément, C Nicolas Nicolaz, M Zhadobov, R Sauleau, D Thouroude, D Michel, and Y Le Dréan. "Investigation of Potential Power-Dependent Effects of Millimeter-Wave Radiations on Various Aspects of Human Cell Functioning" BioEM 2009 - Davos, Switzerland, June 15-19, 2009.
- 5/ M Zhadobov, R Sauleau, C Nicolas Nicolaz, D Thouroude, D Michel, C Le Quément, and Y Le Dréan. "Millimeter-wave exposure setup and dosimetry for *in vitro* studies" BioEM 2009 - Davos, Switzerland, June 15-19, 2009.
- 6/ M Zhadobov, R Sauleau, D Thouroude, C Nicolas Nicolaz, C Le Quement, and Y Le Dréan. "Methodology for Local and Average SAR Evaluation at Millimeter Waves." Progress In Electromagnetics Research Symposium - PIERS 2009 in Moscow, RUSSIA, 18-21 August, 2009.
- 7/ M Zhadobov, R Sauleau, D Thouroude, C Nicolas Nicolaz, C Le Quément and Y Le Dréan. "NEAR-FIELD Electromagnetic dosimetry for *in vitro* studies at millimeter waves" European Conference on Antennas and Propagation, Barcelona, 12-16 April 2010
- 8/ M. Zhadobov, R. Sauleau, D. Thouroude, Ch. Nicolas Nicolaz, C. Le Quément, D. Michel, and Y. Le Dréan (2010). Numerical near-field dosimetry for in vitro experiments at millimeter waves. 32nd Annual Meeting of BEMS, Seoul, South Korea, June 14-18.
- 9/ C. Le Quément, C. Nicolas Nicolaz, M. Zhadobov, F. Desmots, R. Sauleau, D. Thouroude, D. Michel, Y. Le Dréan. Gene expression profiling of primary human keratinocyte cells exposed to 60-GHz millimeter waves. 32nd Annual Meeting of BEMS. Seoul, Korea. June 14-18, 2010

Thèse :

Thèse d'université, soutenue le 26 novembre 2009 à Rennes, par Christophe NICOLAS-NICOLAZ « Contribution à l'étude du stress cellulaire potentiellement induit par les ondes millimétriques ». 1^{er} prix de thèse de l'Université Européenne de Bretagne 2010, sur le thème de l'interdisciplinarité.

Conclusions et retombées :

La principale conclusion de ce projet est que, dans la limite de faibles puissances ne générant pas d'effets thermiques, l'exposition à des OMM n'induit pas de stress cellulaire, notamment de stress du réticulum. Cette hypothèse peut donc être écartée, ce qui est rassurant quant à l'utilisation future des OMM en télécommunication sans fil.

L'analyse par puces à ADN montre qu'à court terme, l'impact des OMM sur l'expression génétique est très limité. Seuls 5 gènes sur 26301 (0.02%) ont été trouvés comme ayant une expression modifiée après 6 h d'exposition, avec un retour à la normal après 24h. Ce résultat confirme que l'exposition aux OMM de faibles puissances a peu d'impact sur l'homéostasie cellulaire. Néanmoins la mise en évidence de quelques gènes cibles nous a mis sur de nouvelles pistes de travail et les perspectives à l'issue de ce projet sont multiples. Il faut noter que sur les cinq gènes confirmés par RT-PCR, deux sont impliqués dans la réponse immunitaire ou dans la perception sensorielle, ce qui confirme des observations antérieures, suggérant que les OMM, dans certaines conditions, pourrait avoir un impact potentiel sur les cellules. Des expériences seront nécessaires pour savoir si cette réponse biologique peut avoir des conséquences sur l'organisme.

Il faut souligner que nous avons diffusé nos travaux dans la société civile. Certains membres de notre consortium ont donné des séminaires grand public (conférences à l'Espace des Sciences de Rennes, Festivals des Sciences, Matinales Rennes Atalantes, etc.), afin de répondre localement à la forte demande sociétale concernant les effets des ondes sur la santé. De plus les résultats de ces travaux ont été largement cités dans le rapport d'expertise collective de l'AFSSET sur l'Évaluation des risques sanitaires liés à l'utilisation du scanner corporel à ondes « millimétriques » (Février 2010).