HAL
open science

Étude de l'hypersensibilité électromagnétique : effets génotoxiques des ondes radiofréquences

Coline Mahé

To cite this version:

Coline Mahé. Étude de l'hypersensibilité électromagnétique : effets génotoxiques des ondes radiofréquences. Sciences du Vivant [q-bio]. 2019. dumas-02649427

HAL Id: dumas-02649427

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02649427

Submitted on 29 May 2020

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.

AGROCAMPUS OUEST

☐ CFR Angers

☐ CFR Rennes

Année universitaire : 2018 - 2019 Spécialité : Cursus Ingénieur Agronome Spécialisation (et option éventuelle) : Master BMC – Biologie Moléculaire et Cellulaire	**Mémoire de fin d'études** ☐ d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage ☐ de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage ☐ d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)

Étude de l'hypersensibilité électromagnétique : effets génotoxiques des ondes radiofréquences

Par : Coline MAHÉ

Soutenu à Rennes le 11 Juin 2019

Devant le jury composé de :

- *Frédéric Lecerf*
- *Stéphane Deschamps*
- *Orlando Musso*

Les analyses et les conclusions de ce travail n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST

SUMMARY

Radiofrequencies (10 MHz – 300 GHz) are electromagnetic fields massively used in telecommunications. Over the past few years, this widespread use has raised concerns about the potential effect of exposures to radiofrequencies on human health. This preoccupation is especially due to the outbreak of the "electromagnetic hypersensitivity", characterized by patients making their own diagnosis in which they attributed their multiple symptoms (headache, skin irritation …) to radiofrequencies exposure. In addition, some of these symptoms are similar to those described in radiosensitivity, an acute sensitivity to radiotherapies using ionizing radiations (gamma radiation). An exposure to these ionizing radiations can induce double-strand DNA breaks stimulating the repair system monitored by the phosphorylation and the nuclear transfer of the ATM protein. The radiofrequencies are unable to induce such damages owing to their low energy (non-ionizing radiations) but this kinase can also control the oxidative DNA damages' repair system. Therefore, we hypothesized that radiofrequencies activate ATM and the repair factors indirectly through oxidative stress.

This study aimed to evaluate if an exposure to millimeter waves (30 – 300 GHz) induces oxidative DNA damages leading to the activation of the repair system dependent on ATM. Then, we aimed to compare this response in cells from healthy and electrohypersensitive patients.

This work was conducted using commercial human skin fibroblasts (HDFA) as control and 8 samples of skin fibroblasts from patients suffering, or not, from electromagnetic hypersensitivity. The project was performed in blind manner and the information of these patients were not available. Before exposing the samples, some adjustments were carried out to analyze their proliferation and their sensitivity to oxidative stress. To do so, the samples were treated with several doses of potassium bromate ($KBrO_3$), a known oxidative agent. We noted a variability between the samples, but we were able to define two sublethal doses (0,1 and 1 mM) for the co-exposure experiment. All the cells were after irradiated at 1 mW/cm² (exposure limit for general public) at 60 GHz for 14 hours with or without $KBrO_3$. The number of nuclear ATM foci were then assessed by immunofluorescence. Millimeter waves seemed to impair the activation of ATM in 3 samples with the decrease of the number of foci after exposure. Biological relevance of this observation is not known but diverse hypothesis were proposed in the manuscript. In addition, we noticed that a co-exposure of millimeter waves and 1 mM of $KBrO_3$ impaired this activation also in 3 samples, attesting a possible co-genotoxic effect or an adaptative response. Indeed, the fibroblasts could be able to resist to the effects of a genotoxic agent after a pre-exposure to millimeter waves.

This mechanism is poorly understood so, in order to better understand the ATM response, we studied the activation of several repair factors (H2AX for double-strand DNA breaks, p53/Chk2 for cell cycle checkpoint and XRCC1 for oxidative DNA damage) by RT-qPCR and Western Blot after exposing the HDFA. We discovered that the expression of genes implicated in the ATM pathway was not modified but Chk2 and, above all, XRCC1, were phosphorylated during the exposure, demonstrating the activation of this pathway. The involvement of XRCC1 in the oxidative DNA damages' repair system may suggest that millimeter waves induce oxidative stress. H2AX was not activated during the exposure confirming that millimeter waves do not induce double-strand DNA breaks.

This study raises the question of the potential genotoxic effects of radiofrequencies and additional experiments need to be performed in order to validate these observations and conclusions. Moreover, some samples present an altered ATM response after exposures to millimeter waves so this work marks the first step of understanding the molecular mechanism implicated in the electromagnetic hypersensitivity.

Remerciements

Je tiens à remercier Farzad PAKDEL, Yves LE DREAN et toute l'équipe TREC de l'IRSET de m'avoir accueillie pendant ces 5 mois. Un énorme merci à Yves pour son encadrement, ses corrections, ses conseils et de m'avoir permis d'acquérir toutes ces connaissances.

Je tiens à particulièrement remercier Catherine MARTIN de m'avoir accompagnée tout au long de ces 5 mois. Merci pour ta bonne humeur, ta gentillesse et pour ces fous rires quotidiens. Merci d'avoir rendu ces 5 mois aussi agréable et surtout merci d'avoir réussi à me supporter.

Je remercie aussi Pénélope, Morgane et Hà pour leur soutien, leur présence et leurs conseils. Le stage n'aurait pas été possible sans vous.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION **1**

MATÉRIEL ET MÉTHODES **4**

Culture cellulaire 4
Comptage et évaluation de la sensibilité des échantillons au stress oxydant 4
Description du système d'exposition et méthodes expérimentales 5
Localisation et activation d'ATM par immunocytochimie 7
Évaluation de l'expression et de l'activation des facteurs de réparation par RT-qPCR et Western Blot 7

RÉSULTATS **9**

Étude de la prolifération et de la sensibilité au stress oxydant et aux expositions des échantillons 9
Activation et localisation d'ATM lors d'expositions des échantillons aux ondes millimétriques 12
Expression et activation de la voie ATM lors d'expositions des fibroblastes contrôles (HDFA) aux ondes millimétriques 15

DISCUSSION **17**

Liste des abréviations

ACTB = Beta Actin

ADN = Acide Désoxyribonucléique

ATM = Ataxia Telangiectasia Mutated

pATM = ATM phosphorylée

B2M = Beta-2-microglobulin

CHK2 = Checkpoint Kinase 2

pCHK2= CHK2 phosphorylée

CIRC = Centre International de la Recherche sur le Cancer

DMEM = Dulbecco's Modified Eagle Medium

EHS = Électrohypersensibles

GADPH = Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

HDFA = Human Dermal Fibroblast Adult (Fibroblastes contrôles)

HPRT1 = Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1

HSP70 = Heat Shock Protein 70 kDa

Hz = Hertz

MHz = Mega Hertz

GHz = Giga Hertz

PBS = Phosphate Buffered Saline (Tampon phosphate)

pH2AX = H2AX phosphorylée

PPC = Positive PCR Control

ROS = Reactive Oxygen Species

RPLP0 = Ribosomal Protein

RTC = Reverse Transcription Control

SVF = Sérum de Veau Fœtal

TBP = TATA Box-Binding Protein

TBS = Tris Buffered Saline (Tampon Tris)

XRCC1 = X-ray Repair Cross-Complementing Protein 1

pXRCC1 = XRCC1 phosphorylée

Introduction

Les champs électromagnétiques radiofréquences (10 MHz à 300 GHz) sont progressivement devenus des outils majeurs des communications sans fil et se sont rapidement répandus dans notre quotidien. Toutefois, le secteur des télécommunications est en perpétuelle évolution suite à la hausse exponentielle des besoins en très haut débit. Ainsi, la 5G, actuellement en développement, nécessitera des fréquences allant de 1 à 70 GHz. Le recours à de nouvelles fréquences plus élevées, comme les ondes millimétriques (30 à 300 GHz), est donc inéluctable, car elles permettent des débits plus élevés lors de la transmission des données. Les fréquences aux environs de 60 GHz connaissent déjà quelques applications comme les réseaux de communication intra-bâtiment à très haut débit, les scanners de sécurité aéroportuaire, le développement d'armes de contrôle non létal ou encore de méthodes thérapeutiques alternatives. Ces 2 dernières applications posent question quant à l'innocuité de ces ondes (Le Dréan *et al*., 2013).

Depuis plusieurs années, l'utilisation massive de ces technologies constitue un objet d'inquiétude pour une partie de la population. La principale crainte concerne le risque de cancer. En 2011, le Centre International de la Recherche sur le Cancer (CIRC) a classé les radiofréquences, sur la base d'études épidémiologiques, comme « peut-être cancérogène pour l'Homme » (Cardis *et al*., 2011) (The INTERPHONE Study Group, 2010). D'autre part, cette préoccupation grandissante est également associée au débat sur « l'hypersensibilité électromagnétique ». En effet, certaines personnes s'autodéclarent « électrohypersensibles (EHS) » et décrivent l'apparition d'une multitude de symptômes suite à une exposition électromagnétique. Si la réalité des symptômes (maux de têtes, trouble du sommeil, problème de concentration …) ne fait aucun doute, aucune étude scientifique n'a prouvé, à ce jour, un lien de cause à effet entre l'exposition et leur apparition (ANSES, 2018). Cette pathologie est très mal caractérisée et très complexe à étudier, car un aspect psychologique vient se greffer à une possible réalité biologique. Chez certaines personnes, la simple peur d'être exposé peut déclencher une réaction de mal-être appelé aussi effet « *nocebo* » (ANSES, 2018). Ce phénomène psychosomatique justifie l'intérêt de réaliser des études reposant sur l'identification des impacts moléculaires des radiofréquences, car on s'affranchit de cette dimension psychologique inhérente aux études réalisées sur des volontaires.

Parmi les symptômes décrits par les patients EHS, certains, comme l'apparition de rougeurs ou d'irritations cutanées, sont similaires à ceux des personnes radiosensibles qui présentent une sensibilité accrue aux radiothérapies (traitements anti-cancéreux) utilisant des rayonnements ionisants (rayons γ) (Foray *et al.*, 2016). Les radiations ionisantes utilisées dans les traitements anti-cancéreux sont capables d'induire des cassures double-brin de l'ADN, ce qui en retour active le système de réparation, contrôlé par la phosphorylation et le transfert de la protéine ATM dans le noyau (Bakkenist & Kastan, 2003) (Bodgi & Foray, 2016) . Les travaux de l'équipe partenaire du projet (UMR1052, INSERM, Université de Lyon 1) prouvent que pour beaucoup de patients, la radiosensibilité est liée à un retard de ce transfert d'ATM (Granzotto *et al*., 2016). Cette kinase intervenant dans des processus tels que la réparation des cassures double-brin (Shiloh, 2003) ou encore des dommages oxydatifs (Guo *et al*., 2010), est connue des radiobiologistes mais, peu d'études se sont intéressées à ATM lors d'expositions aux radiofréquences. Ceci s'explique sans aucun doute par le fait que l'énergie associée aux radiofréquences n'est pas suffisante pour provoquer des cassures d'ADN. Cependant, des études préliminaires de l'équipe partenaire à Lyon, indiquent que le transfert d'ATM pourrait être altéré chez plusieurs personnes s'auto-déclarant électrohypersensibles, suggérant ainsi que certains EHS seraient des personnes radiosensibles qui s'ignorent.

C'est pourquoi, l'équipe d'accueil s'est intéressée à la réparation de dommages génotoxiques dépendant de la voie ATM (cassures, oxydations de l'ADN) suite à une exposition aux ondes millimétriques. Ces ondes comme les radiofréquences agiraient sur le stress oxydant qui pourrait être à l'origine d'un stress génotoxique (Xu *et al.*, 2010), ou pour les EHS, à l'origine de leurs symptômes. Le but de ce travail est de vérifier si une exposition à 60 GHz peut induire des dommages oxydatifs de l'ADN, conduisant à l'activation d'ATM et des facteurs de réparation (Figure 1), et de comparer la situation entre des cellules issues de personnes saines et des cellules issues de patients EHS. Afin d'étudier cela, des fibroblastes de peau de personnes EHS, ou non, ont été choisis comme modèle car la majorité de l'énergie des ondes est absorbée par la peau (Le Dréan *et al*., 2013). La démarche expérimentale sera tout d'abord explicitée et les résultats seront ensuite analysés et discutés

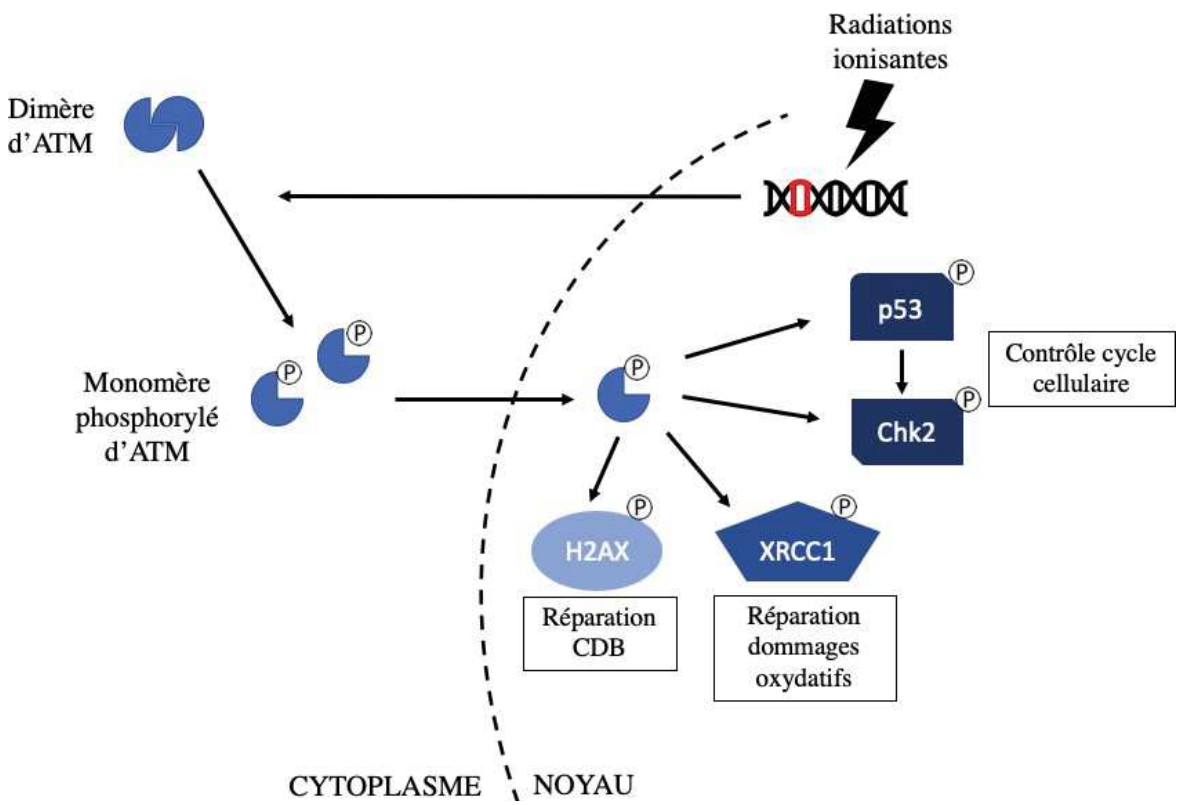

Figure 1 : Schéma de l'activation d'ATM et des facteurs de réparation suite à une exposition aux radiations ionisantes. La protéine ATM peut être activée sous exposition aux radiations ionisantes par monomérisation et autophosphorylation menant à son transfert dans le noyau (Bodgi & Foray, 2016). Cette activation conduit à la phosphorylation de facteurs dépendant du type de dommages causés par les radiations. L'histone H2AX est impliquée dans la réparation des cassures double-brin (Burma *et al.*, 2001) (Downs *et al.*, 2000), XRCC1 dans la réparation des dommages oxydatifs (Chou *et al.*, 2008) et Chk2 et p53 dans le contrôle du cycle cellulaire (Marsin *et al.*, 2003) (Shiloh, 2001)

I. MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. Culture cellulaire

Pour cette étude, deux lots commerciaux de fibroblastes témoins ou « *Human Dermal Fibroblasts, Adult* » (HDFA, lot n°1813884 et lot n°1813885, ThermoFisher) sont utilisés et seuls les résultats du lot n°1813885 seront présentés dans ce rapport. 8 échantillons de fibroblastes prélevés sur des volontaires (fibroblastes E1 à E8) sont également utilisés. Les prélèvements de peau ont été réalisés par un médecin de l'équipe partenaire de Lyon (UMR1052 INSERM) sur des personnes recrutées par le Collectif des Électrosensibles de France. Chaque volontaire a également rempli un questionnaire spécifique élaboré par un médecin épidémiologiste en santé au travail et en santé environnementale (Unité mixte Ifsttar/UCB, Lyon). Les informations relatives à ces personnes n'étant pas connues, le travail d'exposition des échantillons s'est donc fait en aveugle. De plus, il était prévu dans le projet que l'équipe de Lyon insère de façon aléatoire des fibroblastes contrôles issus de personnes non EHS. La levée de l'anonymat se fera une fois que les 20 échantillons auront été étudiés. L'ensemble des fibroblastes sont cultivés sur milieu DMEM (Gibco) supplémenté avec des antibiotiques (Life Technologies) et de sérum de veau fœtal (SVF) à 8 % (Biowest) et maintenus jusqu'à confluence dans une atmosphère adaptée (37°, 95% d'humidité, 5% de CO_2). Les échantillons reçus, le milieu de culture est prélevé et testé pour les mycoplasmes avec le kit « MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit » (Lonza). Certains échantillons étant contaminés, il a été décidé de traiter systématiquement l'ensemble des échantillons avec 4 µL/mL de BM Cycline (Merck) pendant 3 semaines.

B. Comptage et évaluation de la sensibilité des échantillons au stress oxydant

Les expériences se faisant en aveugle, aucune information sur les échantillons n'est disponible. Notre équipe a donc décidé de vérifier si tous les échantillons de fibroblastes reçus étaient comparables en termes de prolifération et de sensibilité au stress oxydatif.

Comptage des échantillons

Lors de la culture des cellules, des repiquages réguliers sont effectués. Ainsi, 3 à 5 comptages ont été réalisés sur les 8 échantillons de fibroblastes et le nombre de jours pour réaliser un cycle cellulaire a ainsi été calculé :

$$\text{Nombre de jours pour faire un cycle cellulaire} = 2 / \left\{ \frac{\dfrac{\text{Nombre de cellules à t+j}}{\text{Nombre de cellules à t}}}{\text{Nombre de jours j}} \right\}$$

Traitement à l'eau oxygénée (H_2O_2) et au bromate de potassium ($KBrO_3$)

En se basant sur la littérature et des expériences préliminaires de cinétique menées au laboratoire, les fibroblastes sont traités avec des doses croissantes d'H_2O_2 (0 à 25 mM) pendant 6 h (Guo *et al.*, 2010) (Chen & Ames 1994). Les fibroblastes sont incubés 20 min avec de l'H_2O_2 (Laboratoires Gilbert) dilué dans du tampon phosphate (PBS) (1X - Gibco) puis sont laissés au repos 6 h dans du milieu de culture. Le $KBrO_3$ perturbe le métabolisme mitochondrial, ce qui augmente la production de ROS intracellulaire et induit la formation de bases guanine oxydées (Mangal *et al.*, 2009). Afin de tester son aptitude à provoquer des dommages lors des expositions, les fibroblastes sont incubés 14 h avec des doses allant de 0 à 10 mM de $KBrO_3$ dilué dans du milieu de culture. Après chaque traitement, les fibroblastes sont fixés dans du paraformaldéhyde à 4 % pendant 10 min et sont incubés 1 h avec du Hoechst dilué au 1/1000e dans du PBS supplémenté avec du SVF à 3 %. Après analyse par immunocytochimie (plateforme ImPACcell de Rennes), le pourcentage de cellules résiduelles pour chaque condition est déterminé.

C. Description du système d'exposition et méthodes expérimentales

Système d'exposition

Le système d'exposition (Figure 2) se compose d'un incubateur (MEMMERT UE400^{TM}) comprenant une antenne pyramidale (base de 22,2 x 16.7 mm) reliée à un générateur (QuinStar Technology) qui génère un signal stabilisé à une fréquence de 60,4 GHz (Zhadobov *et al.*, 2009). La température dans le milieu et l'incubateur est contrôlée durant les expositions par un thermomètre à fibres optiques (NEOPTIX). Les radiofréquences étant connues pour générer des effets thermiques, il est important de contrôler ce paramètre (Habauzit *et al.*, 2014).

Modalités d'exposition

D'après la Commission Internationale de Protection contre les Rayonnements Non-Ionisants, la limite d'exposition du grand public s'élève à 1 mW/cm² (ICNIRP, 1999). C'est à cette puissance limite que nous avons choisi d'exposer les fibroblastes, sachant que les personnes EHS ne seront pas exposées à des doses plus élevées dans l'environnement. En ce qui concerne la durée de l'exposition, les conditions expérimentales de notre partenaire lyonnais ne pouvaient pas être répétées dans le laboratoire. En effet, cette équipe utilise des rayonnements ionisants qui provoquent des cassures instantanées, ce qui n'est absolument pas le cas des radiofréquences (Bodgi & Foray, 2016).

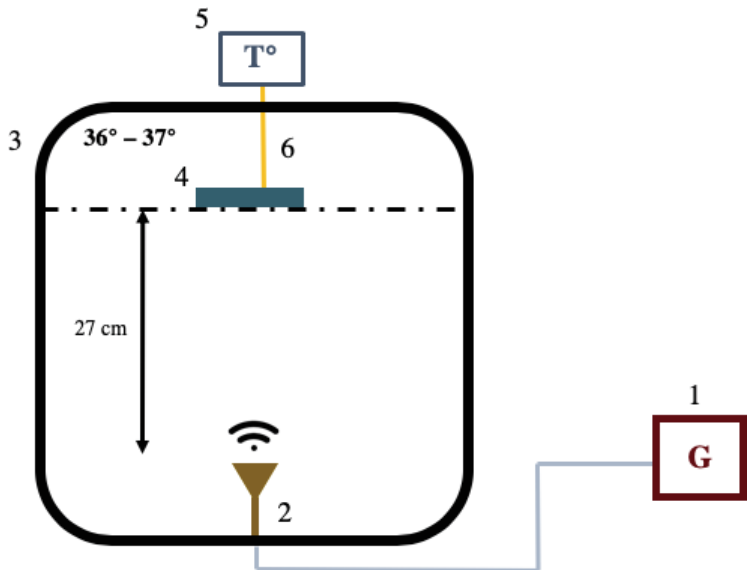

Figure 2 : Schéma du système d'exposition des fibroblastes contrôles (HDFA) et des échantillons. **(1)** Générateur (QuinStar Technology) **(2)** Antenne (base de 22,2 x 16.7 mm) **(3)** Incubateur (MEMMERT UE400™) **(4)** Plaque de 6 ou 96 puits **(5)** Thermomètre à **(6)** fibres optiques (NEOPTIX)

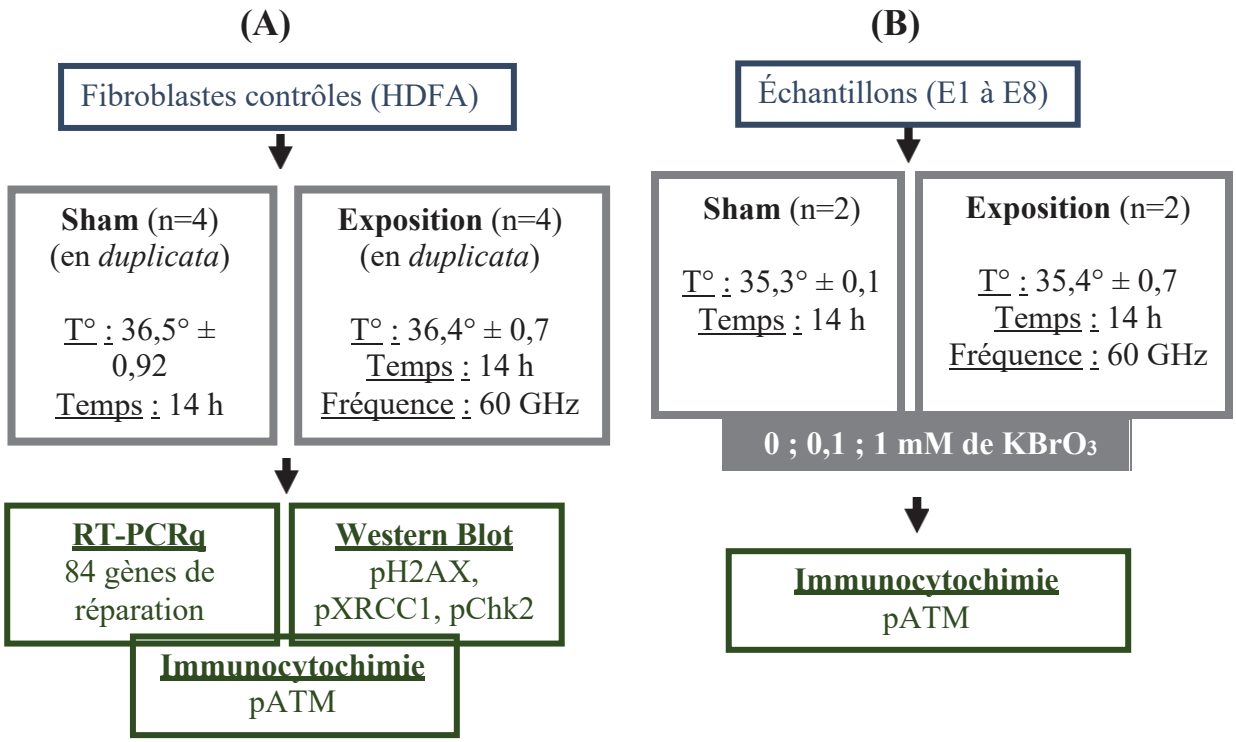

Figure 3 : Schéma du protocole expérimental des expositions et des analyses des **(A)** fibroblastes témoins (HDFA) et **(B)** des échantillons. Les valeurs de températures dans le milieu de culture (T°) sont obtenues après les différentes séries de sham (cellules non exposées) et d'expositions. *Abréviations : $KBrO_3$ = bromate de potassium ; pATM = ATM phosphorylée ; pChk2 = Chk2 phosphorylée ; pH2AX = H2AX phosphorylée ; pXRCC1 = XRCC1 phosphorylée*

Une cinétique réalisée au préalable au laboratoire n'ayant pas apporté d'information particulière, nous nous sommes donc basés sur les travaux d'une équipe chinoise qui a démontré en 2016 que les radiofréquences induisaient des cassures de l'ADN à partir de 12h d'exposition de fibroblastes embryonnaires de souris $ATM^{-/-}$ (Sun *et al.*, 2016). Les cellules sont donc exposées à 60 GHz [Expo] ou non [Sham] 14 h à 1 mW/cm² avec 0 ; 0.1 ou 1 mM de $KBrO_3$.

Le protocole expérimental est présenté en figure 3. Afin de comparer les différents résultats, l'activation d'ATM des échantillons est évaluée par la même technique que celle utilisée par l'équipe de Lyon, l'immunocytochimie. Elle est principalement utilisée par cette équipe pour sa précision et sa spécificité pour ce type d'analyse (Foray *et al.*, 2016).

D. Localisation et activation d'ATM par immunocytochimie

Les échantillons sont ensemencés dans des plaques 96 puits (Falcon) avec 4000 cellules par puits et sont directement fixés dans du paraformaldéhyde 4 % pendant 10 min après chaque exposition. Les membranes cellulaires sont ensuite perméabilisées dans 150 µL de PBS à 0.3 % Triton-X100 pendant 45 min à température ambiante. Après lavages au PBS (3 x 10 min), les fibroblastes sont incubés toute la nuit à 4° avec l'anticorps anti-phospho-ATM (Ser1981) (Merck) dilué au 1/1000e dans du PBS-SVF à 3 %. Après lavages au PBS (3 x 10 min), les fibroblastes sont incubés 1 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire anti-souris conjugué à l'Alexa Fluor® 488 (Abcam – ab150109) et du Hoechst dilués tout 2 au 1/1000e dans du PBS-SVF à 3 %. Après lavages au PBS (3x10 min), les images de fluorescences et analyses sont obtenues en collaboration avec la plateforme ImPACcell de Rennes. Les paramètres évalués sont le nombre de cellules par puits, la morphologie des noyaux (forme, aire, intensité du Hoechst) et les foci nucléaire d'ATM phosphorylée (pATM) (nombre et intensité des spots) par cellule. Pour chaque échantillon, le nombre, l'intensité moyenne des *foci* pATM par cellule et le pourcentage de cellules positives (intensité des foci > 20000) sont calculés.

E. Évaluation de l'expression et de l'activation des facteurs de réparation par RT-qPCR et Western Blot

Extraction et dosage des ARN

Les HDFA sont ensemencés dans 2 puits d'une plaque 6 puits (expérience faite en duplicata) avec 100 000 cellules par puits. Les ARN sont extraits directement après chaque exposition (n=4) à l'aide du kit « *NucleoSpin® RNA* » (MACHEREY-NAGEL) et dosés avec le spectrophotomètre « *Nanodrop 8000* » (Thermo Fisher). Les protéines sont extraites avec du tampon Laemmli 2X. Tous les extraits sont conservés à -20 °.

RT-qPCR

La RT-qPCR est réalisée à l'aide du kit « *RT² Profiler PCR Array Human DNA Damage Signaling Pathway* » (Qiagen) qui permet d'évaluer l'expression de 84 gènes impliqués dans la réparation des dommages de l'ADN. 400 ng d'ARN sont rétro-transcrits à l'aide du kit « *RT² First Strand Kit* » (Qiagen) dans le thermocycleur « *MJ Mini™* » (Bio-Rad). Les ADNc sont ensuite amplifiés avec le « *RT² SYBR Green qPCR Mastermix* » (Qiagen) sur une plaque 4x96 puits dans le « *CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System* » (Bio-Rad). 8 gènes de références sont utilisés pour normaliser les données (ACTB, B2M, GADPH, HPRT1, RPLP0, RTC, PPC et TBP). Celles-ci sont traitées avec le logiciel « *Bio Rad CFX Manager* » et la méthode des ΔΔCt est utilisée pour analyser la différence d'expression des gènes entre les expositions et les sham (Livak & Schmittgen, 2001). Parallèlement, l'expression d'HSP70 par RT-PCR en temps réel (« *CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System* » - Bio-Rad) est quantifiée et les primers utilisés sont décrits dans le tableau 1.

Western blot

15 µL d'extraits protéiques de fibroblastes contrôles sont disposés dans les puits de gel pré-coulé « *Mini-PROTEAN® TGX™ Stain Free* » (4-15% - Bio-Rad) et sont séparés par électrophorèse SDS-PAGE. Les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (ThermoFisher) et, après incubation avec du rouge ponceau, sont saturées dans du tampon Tris (TBS) avec 0.1 % de Tween et 5 % de lait écrémé toute la nuit à 4 °. Les membranes sont incubées 2 h à température ambiante avec différents anticorps primaires (Tableau 2) dilués dans le même tampon que précédemment. Après lavages au TBS-Tween à 0.1 % (3 x 10 min), les membranes sont incubées 2 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire anti-lapin (GE healthcare – NA934V) dilués au 5000e dans le même tampon. La révélation est réalisée à l'aide du kit « *Immobilon ® Western* » (Millipore) et du logiciel « *Image Lab* ».

Analyse de données

Les valeurs présentées sont des moyennes des séries de sham et d'expositions avec les écarts-types correspondants. L'analyse statistique sur les données de RT-qPCR a été réalisée avec le test non paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney avec le logiciel « *GraphPad* ». Les valeurs sont considérées comme statistiquement significatives pour une p-value<0.05. Pour les foci d'ATM des échantillons, le nombre limité de répétitions des expositions (deux séries) ne permet pas de réaliser des analyses fiables. Les expositions se poursuivent au laboratoire pour obtenir un nombre n (n=4) compatible avec un test statistique non paramétrique.

Tableau 1 : Liste des primers utilisés pour l'analyse en RT-qPCR de l'expression d'HSP70

Nom des gènes	Forward primer	Reverse primer
Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GADPH)	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
TATA-box Binding Protein (TBP)	TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA	CACATCACAGCTCCCCACCA
Heat Shock Protein 70 kDa (HSP 70)	AGGCCGACAAGAAGAAGGTGCT	TGGTACAGTCCGCTGATGATGG

Tableau 2 : Référence des anticorps utilisés en Western Blot

Nom	Description	Dilution
Anti-γ-H2AX (phospho S139)	Rabbit polyclonal (Abcam – ab11174)	1/1000e
Anti-Chk2 (phospho T68)	Rabbit polyclonal (Abcam – ab85743)	1/1000e
Phospho XRCC1 (S485/T488)	Rabbit Polyclonal (Bethyl laboratories – A300-231A-T)	1/1000e

II. Résultats

A. Étude de la prolifération et de la sensibilité au stress oxydant et aux expositions des échantillons

Avant d'exposer les échantillons pour étudier l'activation d'ATM, quelques mises au point ont été effectuées afin de déterminer les propriétés des échantillons et leur réaction face aux expositions. L'objectif est de décrire la réponse thermique des échantillons après expositions puis d'évaluer leur caractéristique proliférative et leur sensibilité stress oxydant.

Réponse thermique des échantillons après expositions

Afin de vérifier que les fibroblastes ne sont pas soumis à un stress thermique durant les expositions, la température est contrôlée tout au long des expositions et l'expression d'HSP70 est quantifiée (Figure 4). Les mesures pendant les expositions montrent une légère élévation de température (35,3 ° ± 0,1 sous sham et 35,4 ° ± 0,7 sous expositions) mais celle-ci n'est pas significative et reste aux environs de 35 à 36 °. L'analyse de l'expression d'HSP70, un gène thermosensible, montre une légère augmentation non significative de leur expression et elle reste sans commune mesure avec les inductions observées lors de choc thermique (Figure 4). Dans les cellules contrôles, HSP70 n'est donc pas surexprimée sous exposition et il n'y a donc pas de choc thermique. Les conditions d'exposition choisies (1 mW/cm² correspondant à la limite autorisée) permettent donc de s'affranchir des effets thermiques de ces ondes.

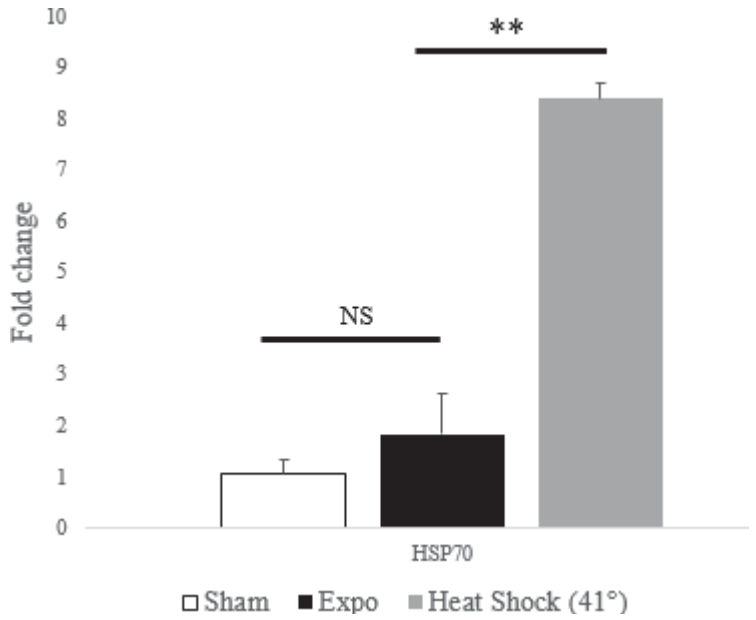

Figure 4 : Niveaux d'expression des ARN messagers d'HSP70 évalués par RT-qPCR après des séries de sham et d'expositions (n=4) et après un stress thermique [Heat Shock (41 °)] des fibroblastes HDFA contrôles. **p-value = 0,001, ^{NS}p-value = 0,1 d'après le test non paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney. *Abréviation : NS = Non Significatif.*

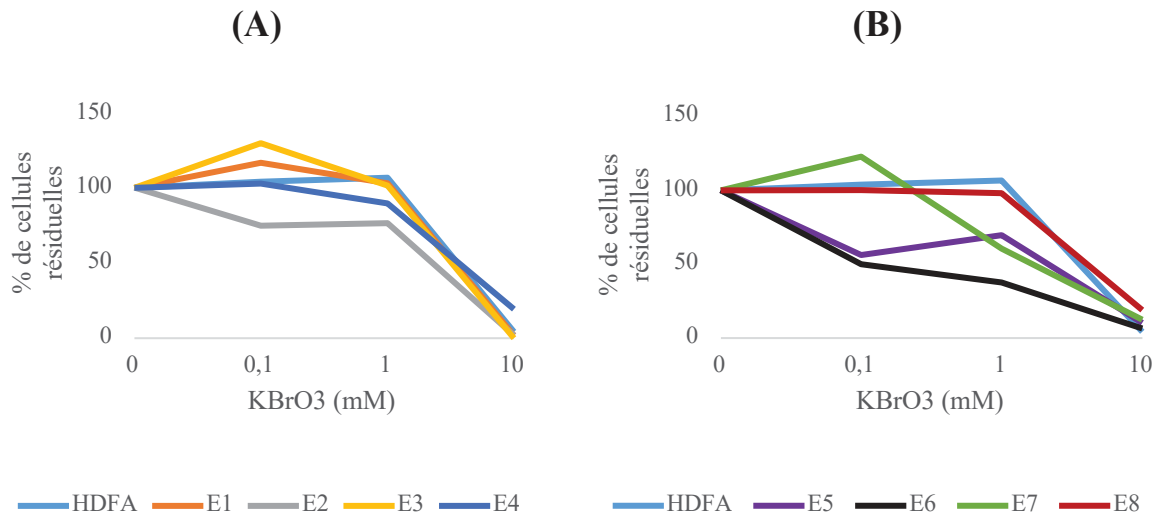

Figure 5 : **(A)** Pourcentage de cellules résiduelles par puits après 14h de traitement au bromate de potassium ($KBrO_3$) (0 à 10 mM) des fibroblastes HDFA contrôles et des échantillons E1 à E4 (n=2) et **(B)** E5 à E8 (n=2).

Caractérisation de la prolifération des échantillons

Le nombre de jours nécessaires pour effectuer un cycle cellulaire complet est présenté pour chaque échantillon et les HDFA dans le tableau 3. Les HDFA réalisent leur cycle cellulaire en environ 3 jours, comme les échantillons E4 et E8. Pour E1 à E3, E5 et E6, le cycle cellulaire est plus long et peut durer jusqu'à 4 à 5 jours. En revanche, pour E7, le cycle cellulaire est plus court (environ 2 jours). Il y a donc une variabilité entre les différents échantillons qui adoptent un comportement proliférative soit similaire soit différent de celui des cellules contrôles (HDFA).

Tableau 3 : Nombre de jours nécessaires aux HDFA et aux 8 échantillons pour réaliser un cycle cellulaire complet

Fibroblastes	HDFA	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8
Jours pour réaliser un cycle cellulaire	3,04 ± 0,9	4,74 ± 0,5	4,84 ± 0,8	4,3 ± 0,6	3,29 ± 0,6	3,82 ± 0,8	3,9 ± 0,8	2,33 ± 0,2	2,95 ± 0,5

Sensibilité à l'eau oxygénée (H_2O_2) et au bromate de potassium ($KBrO_3$) des échantillons

Le but est à la fois de vérifier si certains échantillons venant de personnes EHS ne présentent pas une sensibilité accrue au stress oxydant et de trouver un traitement susceptible de créer un stress oxydant durant les expositions aux ondes millimétriques (14h de co-exposition).

Des expériences préliminaires (résultats non montrés) démontrent que H_2O_2 a une action limitée dans le temps, ce qui n'est pas compatible avec les 14h d'expositions. Notre choix s'est donc porté vers le bromate de potassium ($KBrO_3$). Les effets doses réalisés montrent que les échantillons E1 à E4, E7 et E8 ne présentent pas de sensibilité particulière comparée aux HDFA (Figure 5A et 5B). Seuls E5 et E6 montrent une sensibilité plus importante à 0.1 et 1 mM de $KBrO_3$ (Figure 5B). Néanmoins, l'ensemble des cellules semble très sensible à une dose de 10 mM (Figure 5A et 5B). Face à ses résultats, des doses inférieures à 10 mM (0,1 et 1 mM) sont choisies pour le co-traitement des cellules lors des expositions électromagnétiques.

B. Activation et localisation d'ATM lors d'expositions des échantillons aux ondes millimétriques

L'objectif est de déterminer si la protéine ATM est activée par d'éventuels dommages oxydatifs de l'ADN provoqués lors d'expositions des échantillons aux ondes millimétriques et si les échantillons EHS présentent des particularités par rapport à cette réponse.

L'exposition aux ondes millimétriques et/ou le traitement au $KBrO_3$ (0,1 ou 1 mM) ne modifie pas le nombre de cellules et la morphologie des noyaux (résultats non montrés). Les expositions à ces ondes et/ou les doses de $KBrO_3$ n'entraînent donc pas la mort des cellules.

Effet du traitement au $KBrO_3$ des échantillons sur l'activation d'ATM

Le nombre, l'intensité de la fluorescence des foci pATM, et le pourcentage de cellules positives (intensité des foci > 20000) ne sont pas modifiés après un traitement à 0,1 mM des HDFA (Figure 6A, 6B et 6C). Le traitement à 0,1 mM de $KBrO_3$ n'est donc pas suffisant pour activer ATM. Néanmoins, tous ces paramètres liés à l'apparition de ces foci sont augmentés d'un facteur 2 à 3 après un traitement à 1 mM. Cette augmentation est illustrée par les images de fluorescences des HDFA (Figure 6D et 6E). Le traitement à 1 mM de $KBrO_3$ est donc suffisant pour activer ATM et peut donc être considéré comme un contrôle positif validant notre approche pour visualiser les effets oxydatifs des expositions. De plus, les résultats de tous ces paramètres sont sensiblement identiques. Pour la suite de l'analyse, nous avons donc choisi de ne présenter que les résultats du nombre de foci par cellule.

Effet des expositions à 60 GHz des échantillons sur l'activation d'ATM

Sous exposition à 60 GHz, le niveau basal (sans traitement au $KBrO_3$) ne varie pas, sauf pour E1, E2 et E3 où le nombre de foci pATM diminue d'un facteur 2 à 3 (Figure 7). Il y a donc une variabilité individuelle importante quant à la réaction des échantillons aux ondes millimétriques. Après traitement à 1 mM de $KBrO_3$, l'ensemble des échantillons présente une augmentation du nombre de foci. Cependant, sous exposition, les échantillons E2, E3 et E4 montrent un nombre de foci pATM 2 à 4 fois moins important. Par contre, ce nombre de foci n'est pas modifié sous exposition pour les cellules HDFA, E1 et E5 à 8. Il existe également ici une variabilité individuelle. Donc, sur les 8 échantillons testés, deux d'entre eux (E2 et E3) présentent un profil particulier sous exposition électromagnétique, que ce soit en condition basale, ou après un co-traitement au $KBrO_3$.

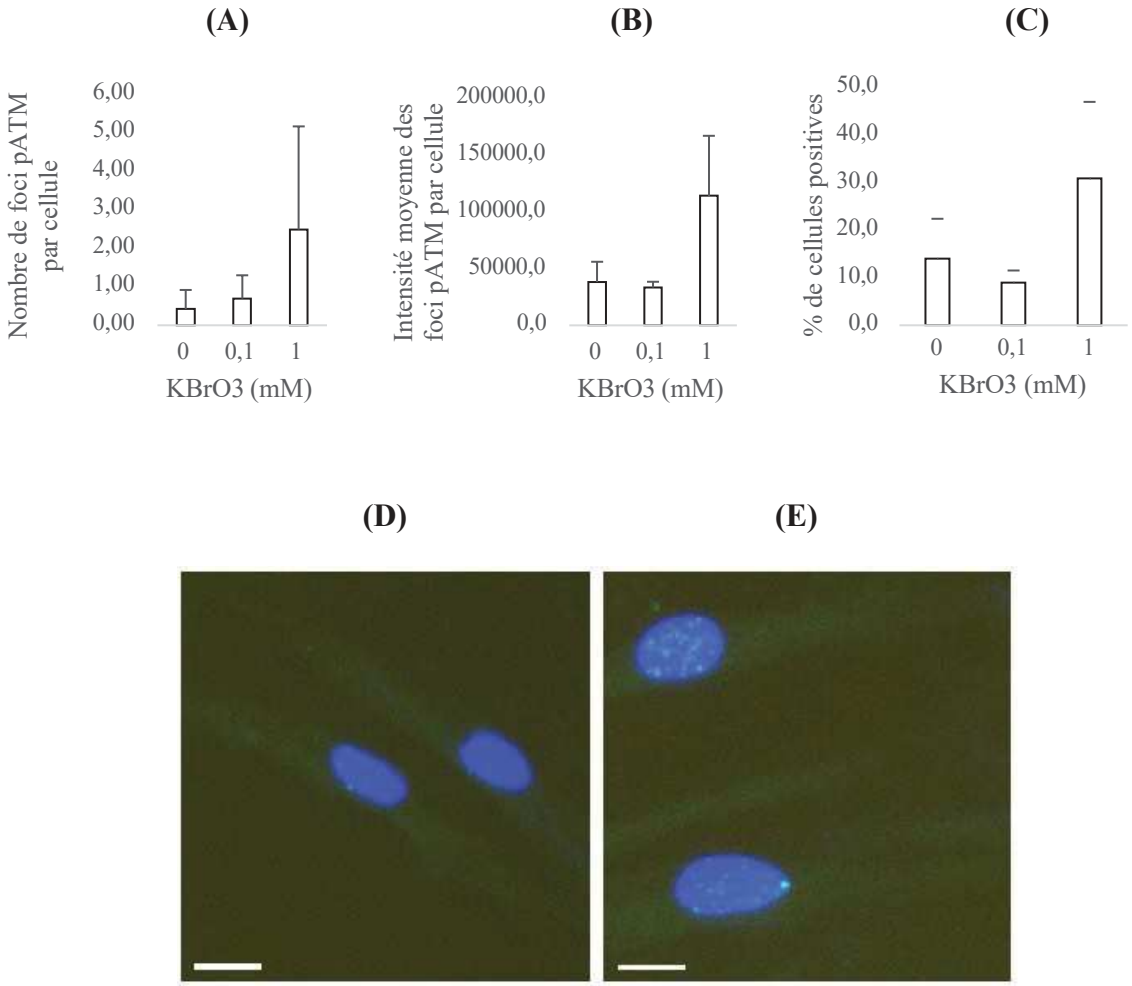

Figure 6: Description et localisation des foci nucléaire d'ATM phosphorylée (pATM) des HDFA analysées par immunocytochimie (plateforme ImPACcell de Rennes) après marquage contre l'anticorps anti-phospho-ATM (Merck) (vert) et du Hoechst (bleu). **(A)** Nombre, **(B)** intensité moyenne des foci pATM par cellule et **(C)** pourcentage de cellules positives (intensité des foci > 20000) après un traitement à 0,1 et 1 mM des HDFA au $KBrO_3$. Les analyses statistiques données par le test de Wilcoxon-Mann-Whitney n'ont pas apporté de résultats significatifs. **(D)** Localisation des foci pATM après un traitement des HDFA à 0 et **(E)** 1 mM de $KBrO_3$. Les barres d'échelles blanches représentent 5 µm.

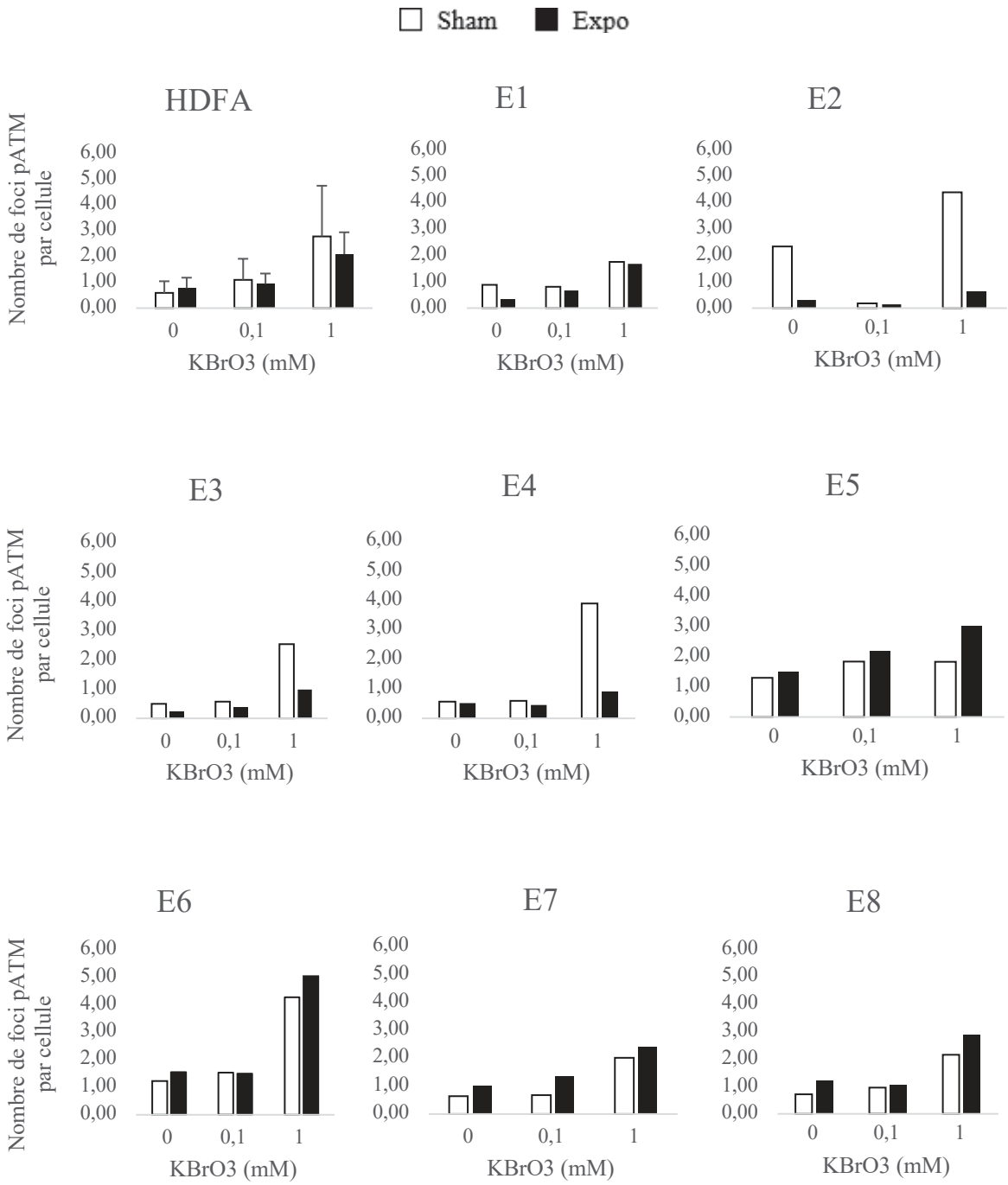

Figure 7 : Nombre de foci pATM par cellule évalué par immunocytochimie (plateforme ImPACcell de Rennes) après des co-expositions à 60 GHz et un traitement à 0 ; 0,1 et 1 mM de $KBrO_3$ des HDFA (n=4) et des échantillons (n=2). Les analyses statistiques des données des HDFA par le test de Wilcoxon-Mann-Whitney n'ont pas apporté de résultats significatifs. Les écarts-types des données de foci pATM des échantillons n'ont pas été présentés car seulement deux séries d'expositions ont été réalisées, ne permettant pas d'analyses fiables. Les expositions se poursuivent au laboratoire pour obtenir un nombre d'exposition compatible avec un test statistique non paramétrique.

C. Expression et activation de la voie ATM lors d'expositions des fibroblastes contrôles (HDFA) aux ondes millimétriques

L'objectif est de déterminer si les différentes cibles d'ATM présentés en Figure 1 sont activées lors des expositions des fibroblastes contrôles aux ondes millimétriques. Cette analyse est réalisée uniquement après des séries d'expositions des HDFA car le nombre important d'échantillons de fibroblastes EHS ne permet pas d'évaluer l'activation de la voie d'ATM de chacun par RT-PCRq et Western Blot.

Expression de gènes de la voie ATM après expositions des HDFA à 60 GHz

L'expression de 5 gènes de la voie ATM ne varie pas sous exposition à 60 GHz des HDFA (Figure 8). Les gènes impliqués dans les voies de contrôle cellulaire et de réparation ne sont donc pas sur ou sous-exprimés lors d'une exposition aux ondes millimétriques des HDFA. Les mêmes résultats ont été observés pour les autres gènes impliqués dans la voie de réparation de l'ADN dépendant d'ATM et pour différents systèmes de réparation comme la réparation post-réplicatif des mésappariements (MMR), la réparation par excision de base (BER), la réparation par excision de nucléotides (NER) ou encore le système de réparation par recombinaison ou par ligature des extrémités non homologues (résultats non montrés).

Activation des protéines de la voie ATM après expositions des HDFA à 60 GHz

Le niveau de phosphorylation d'H2AX ne semble pas être modifié sous exposition (Figure 9A et 9D). Cependant, une augmentation de la phosphorylation de Chk2 (Figure 9B et 9D) et surtout de XRCC1 est observée (Figure 9C et 9D).

La phosphorylation d'ATM n'a pas pu être évaluée par Western Blot car la faible abondance de cette protéine à haut poids moléculaire (autour de 370 kDa) ne permettait pas de la visualiser avec un transfert liquide. Des essais supplémentaires sont en cours au laboratoire, pour lever cet écueil technique.

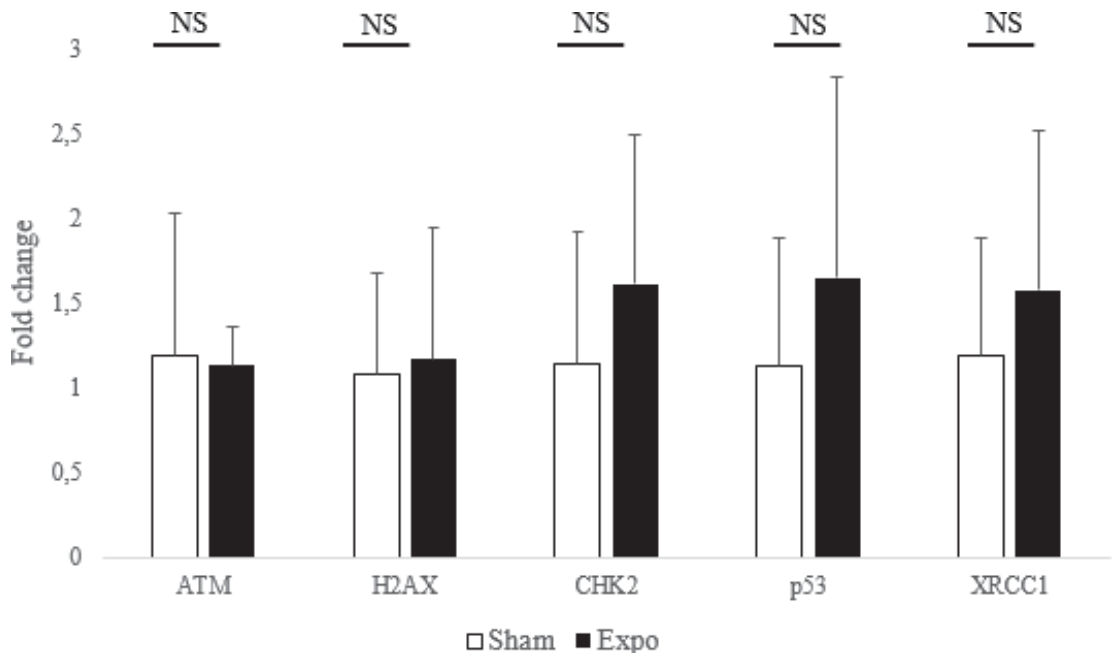

Figure 8 : Niveaux d'expression des ARN messagers d'ATM, H2AX, CHK2, p53 et XRCC1 analysés par RT-qPCR après des séries de sham et d'expositions (n=4) des fibroblastes contrôles (HDFA). p-value (ATM) = 0,45 ; p-value (H2AX) = 0,5 ; p-value (CHK2) = 0,49 ; p-value (p53) = 0,34 ; p-value (XRCC1) = 0,24 d'après le test non paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney. *Abréviation : NS = Non Significatif*

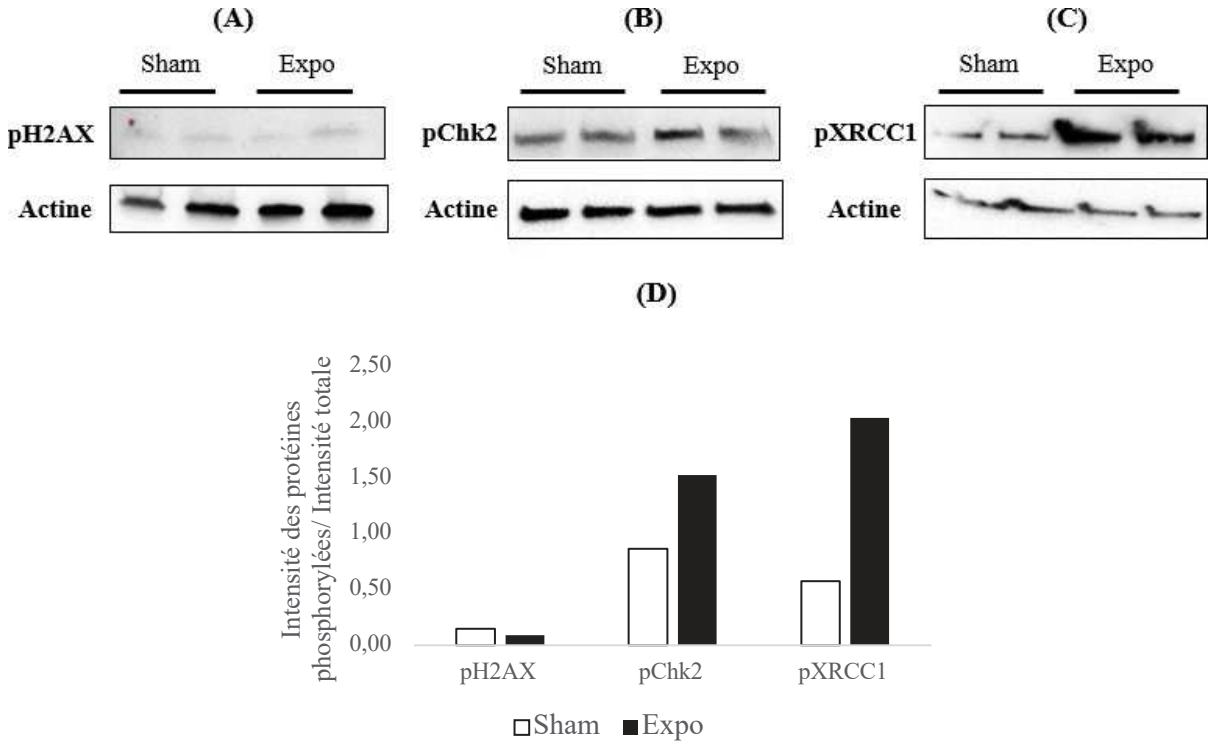

Figure 9 : Niveaux de phosphorylation de **(A)** H2AX, **(B)** Chk2 et **(C)** XRCC1 analysés par Western Blot et **(D)** rapport de l'intensité des protéines phosphorylées sur l'intensité totale des bandes après des séries de sham et d'expositions (n=2) des fibroblastes contrôles (HDFA)

III. Discussion

Dans cette étude, nous avons démontré que les ondes millimétriques avaient un effet très variable selon l'échantillon considéré. Cette variabilité inter-individuelle est illustrée par les différences observées en termes de prolifération et de sensibilité au stress oxydant. Hormis cette étude, ces propriétés n'ont pas encore été étudiées à ce jour et aucune comparaison avec d'autres travaux n'a donc été possible. De plus, l'exposition à 60 GHz n'est pas toxique pour les cellules et cela concorde avec les résultats de la littérature où aucune modification significative du taux de mortalité des cellules après expositions aux radiofréquences de fibroblastes embryonnaires n'a été observée (Sun *et al.*, 2016).

Le principal résultat de cette étude est que les ondes millimétriques altèrent l'activation d'ATM de 4 échantillons sur les 8 testés (E1, E2, E3 pour le basal et E2, E3, E4 pour le niveau induit avec 1 mM KBrO3). Cette expérience ayant été fait en duplicata seulement, il faudra naturellement reproduire cette observation avant publication. De plus, cette étude se faisant en aveugle, nous ne savons pas encore si ces échantillons sont issus de personnes EHS gravement atteintes et si l'équipe lyonnaise a également observé que ces 4 échantillons présentaient une anomalie du transfert nucléaire d'ATM lors d'une exposition aux rayonnements ionisants.

Trois hypothèses peuvent être émises pour expliquer la diminution du nombre de foci d'ATM sous exposition. Tout d'abord, il est possible que l'exposition inhibe le transfert nucléaire ou la phosphorylation d'ATM de ces échantillons mais, l'exposition pourrait également modifier la cinétique de formation des foci pATM. En effet, l'équipe de Lyon a observé une augmentation d'un facteur 2 du nombre de foci après 1 h d'exposition aux radiations ionisantes, puis une diminution d'un facteur 3 passée cette heure (Granzotto *et al.*, 2016). Donc, appliqué aux ondes millimétriques, ATM pourrait être activée pendant les premières heures d'exposition et, suite aux réparations des dommages, ne serait plus transférée dans le noyau au bout des 14 h. Cependant, cette réponse biphasique potentielle de l'activation d'ATM par ces ondes n'a pas été retrouvée au laboratoire lors d'expériences préliminaires de cinétique sur des fibroblastes HDFA contrôles. Enfin, la possibilité que les ondes millimétriques activent d'autres voies de réparation indépendantes d'ATM ne peut pas être écartée, ce qui aurait pour conséquence de ne plus nécessiter la mobilisation de ce facteur.

La diminution du nombre de foci pATM après une exposition et un traitement à 1 mM de $KBrO_3$ de 3 échantillons (E2, E3 et E4) pose question sur la co-génotoxicité potentielle de ces ondes pouvant altérer l'efficacité des protéines de réparation.

Néanmoins, de nombreux travaux menés jusqu'à présent ont échoué à démontrer un effet à la fois des radiofréquences et des agents génotoxiques connus (Luukkonen *et al.*, 2010) (Perrin *et al.*, 2010) (Sannino *et al.*, 2009). La littérature mentionne cependant un autre type de réponse possible appelé réponse adaptative où, suite à une pré-exposition aux radiofréquences, les cellules résisteraient à un stress causé par un agent génotoxique. Ainsi, il a été montré que des lymphocytes humains ou des leucocytes de souris étaient capables de résister aux effets génotoxiques des rayonnements ionisants, après avoir été pré-exposés aux radiofréquences (Jiang *et al.*, 2012) (Sannino *et al.*, 2014). La baisse du recrutement d'ATM dans le noyau pourrait donc être liée à un effet co-génotoxique ou à une réponse adaptative des radiofréquences. Ces mécanismes ayant été très peu étudiés, des études complémentaires ont été réalisées sur les fibroblastes contrôles (HDFA), afin de valider ces différentes hypothèses et de mieux comprendre l'action de ces ondes sur l'activation d'ATM. Nous avons observé que les ondes millimétriques n'induisaient pas de modification de l'expression de gènes impliqués dans les différentes voies de réparation dépendantes d'ATM. Cela concordent avec les résultats obtenus après des expositions à 60 GHz de kératinocytes où il avait été montré qu'en condition athermique, une exposition n'a pas, ou très peu d'impact sur l'expression génique (Habauzit *et al.*, 2014) (Le Quément *et al.*, 2012). La phosphorylation des protéines cibles d'ATM a ensuite été analysée après expositions des HDFA. Chk2 et XRCC1 sont phosphorylées sous exposition, ce qui laisse supposer que les voies de réparation sont activées. XRCC1, qui présente le plus fort différentiel, est impliquée dans la réparation de dommages oxydatifs de l'ADN et donc cette activation sous exposition confirme que les ondes millimétriques induisent des dommages oxydatifs de l'ADN, comme cela avait déjà été suggéré (Sun *et al.*, 2016) (Xu *et al.*, 2010). Il est important de relever le faible niveau de phosphorylation d'H2AX sous exposition confirmant que ces ondes n'induisent pas de cassures double-brin (Danese *et al.*, 2017) (Sun *et al.*, 2016).

L'ensemble de ces observations seront évidemment appuyées par des expériences complémentaires. L'activation des protéines impliquées dans la voie ATM sera notamment analysée par immunocytochimie et leur expression totale sera évaluée par Western Blot. Ces études seront menées sur les échantillons déjà testés mais aussi sur de nouveaux échantillons.

En définitive, l'ensemble de ce travail soulève des questions quant aux potentiels effets génotoxiques des radiofréquences et va permettre de mieux comprendre le mécanisme moléculaire impliqué dans la sensibilité aux ondes radiofréquences.

BIBLIOGRAPHIE

ANSES, Agence nationale de sécurité sanitaire, alimentaire, environnement, travail, 2018. Hypersensibilité électromagnétique ou intolérance environnementale idiopathique attribuée aux champs électromagnétiques: avis de l'ANSES, rapport d'expertise collective.

Bakkenist C. J. & Kastan M., 2003. DNA Damage Activates ATM through Intermolecular Autophosphorylation and Dimer Dissociation. *Nature* 421 (6922): 499-506.

Bodgi L. & Foray N., 2016. The Nucleo-Shuttling of the ATM Protein as a Basis for a Novel Theory of Radiation Response: Resolution of the Linear-Quadratic Model*. *International Journal of Radiation Biology* 92 (3): 117-31.

Burma S., Chen B. P., Murphy M., Kurimasa A. & Chen D. J., 2001. ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to DNA Double-Strand Breaks ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (45): 42462-67.

Cardis E., Armstrong B. K., Bowman J. D., Giles G. G., Hours M., Krewski D., McBride M., Parent M. E., Sadetzki S., Woodward A., *et al.*, 2011. Risk of Brain Tumours in Relation to Estimated RF Dose from Mobile Phones: Results from Five Interphone Countries. *Occupational and Environmental Medicine* 68 (9): 631-40.

Chen Q. & Ames B. N., 1994. Senescence-like Growth Arrest Induced by Hydrogen Peroxide in Human Diploid Fibroblast F65 Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (10): 4130-34.

Chou W-C., Wang H-C., Wong F-H., Ding S-L., Wu P-E., Shieh S-Y. & Shen C-Y., 2008. Chk2-dependent phosphorylation of XRCC1 in the DNA damage response promotes base excision repair. *The EMBO Journal* 27 (23): 3140-50.

Danese E., Lippi G., Buonocore R., Benati M., Bovo C., Bonaguri C., Salvagno G. L., Brocco G., Roggenbuck D. & Montagnana M., 2017. Mobile phone radiofrequency exposure has no effect on DNA double strand breaks (DSB) in human lymphocytes. *Annals of Translational Medicine* 5 (13): 272-272.

Downs J. A., Lowndes N. F. & Jackson S. P., 2000. A Role for Saccharomyces Cerevisiae Histone H2A in DNA Repair. *Nature* 408 (6815): 1001-4.

Foray N., Bourguignon M. & Hamada N., 2016. Individual Response to Ionizing Radiation. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 770 (Octobre): 369-86.

Granzotto A., Benadjaoud M. A., Vogin G., Devic C., Ferlazzo M. L., Bodgi L., Pereira S., Sonzogni L., Forcheron F., Viau M., *et al.*, 2016. Influence of Nucleoshuttling of the ATM Protein in the Healthy Tissues Response to Radiation Therapy: Toward a Molecular Classification of Human Radiosensitivity. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics* 94 (3): 450-60.

Guo Z., Deshpande R. & Paull T. T., 2010. ATM Activation in the Presence of Oxidative Stress. *Cell Cycle* 9 (24): 4805-11.

Habauzit D., Le Quément C., Zhadobov M., Martin C., Aubry M., Sauleau R. & Le Dréan Y., 2014. Transcriptome Analysis Reveals the Contribution of Thermal and the Specific Effects in Cellular Response to Millimeter Wave Exposure. *PLoS ONE* 9 (10): e109435.

ICNIRP, International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection, 1999. *Guidelines on Limiting Exposure to Non-Ionizing Radiation: A Reference Book Based on the Guidelines on Limiting Exposure to Non-Ionizing Radiation and Statements on Special Applications*.

Jiang B., Nie J., Zhou Z., Zhang J., Tong J. & Cao Y., 2012. Adaptive Response in Mice Exposed to 900 MHz Radiofrequency Fields: Primary DNA Damage. *PLoS ONE* 7 (2): e32040.

Le Dréan Y., Soubere Mahamoud Y., Le Page Y., Habauzit D., Le Quément C., Zhadobov M. & Sauleau R., 2013. State of Knowledge on Biological Effects at 40–60 GHz. *Comptes Rendus Physique* 14 (5): 402-11.

Le Quément C., Nicolaz C. N., Zhadobov M., Desmots F., Sauleau R., Aubry M., Michel D. & Le Dréan Y., 2012. Whole-Genome Expression Analysis in Primary Human Keratinocyte Cell Cultures Exposed to 60 GHz Radiation. *Bioelectromagnetics* 33 (2): 147-58.

Livak K. J., & Schmittgen T. D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method. *Methods* 25 (4): 402-8.

Luukkonen J., Juutilainen J. & Naarala J., 2010. Combined Effects of 872 MHz Radiofrequency Radiation and Ferrous Chloride on Reactive Oxygen Species Production and DNA Damage in Human SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. *Bioelectromagnetics*.

Mangal D., Vudathala D., Park J-H., Lee S. H., Penning T. M. & Blair I. A., 2009. Analysis of 7,8-Dihydro-8-Oxo-2′-Deoxyguanosine in Cellular DNA during Oxidative Stress. *Chemical Research in Toxicology* 22 (5): 788-97.

Marsin S., Vidal A. E., Sossou M., Ménissier-de Murcia J., Le Page F., Boiteux S., De Murcia G. & Pablo Radicella J. P., 2003. Role of XRCC1 in the Coordination and Stimulation of Oxidative DNA Damage Repair Initiated by the DNA Glycosylase HOGG1. *Journal of Biological Chemistry* 278 (45): 44068-74.

Perrin A., Freire M., Bachelet C., Collin A., Levêque P., Pla S., & Debouzy J-C., 2010. Evaluation of the Co-Genotoxic Effects of 1800 MHz GSM Radiofrequency Exposure and a Chemical Mutagen in Cultured Human Cells. *Comptes Rendus Physique* 11 (9-10): 613-21.

Sannino A., Di Costanzo G., Brescia F., Sarti M., Zeni O., Juutilainen J. & Scarfi M. R., 2009. Human Fibroblasts and 900 MHz Radiofrequency Radiation: Evaluation of DNA Damage after Exposure and Co-Exposure to 3-Chloro-4-(Dichloromethyl)-5-Hydroxy-2(5h)-Furanone (MX). *Radiation Research* 171 (6): 743-51.

Sannino A., Zeni O., Romeo S., Massa R., Gialanella G., Grossi G., Manti L., Vijayalaxmi, & Scarfi M. R., 2014. Adaptive Response in Human Blood Lymphocytes Exposed to Non-Ionizing Radiofrequency Fields: Resistance to Ionizing Radiation-Induced Damage. *Journal of Radiation Research* 55 (2): 210-17.

Shiloh Y., 2001. ATM and ATR: Networking Cellular Responses to DNA Damage. *Current Opinion in Genetics & Development* 11 (1): 71-77.

Shiloh Y., 2003. ATM and Related Protein Kinases: Safeguarding Genome Integrity. *Nature Reviews Cancer* 3 (3): 155-68.

Sun C., Wei X., Fei Y., Su L., Zhao X., Chen G. & Xu Z., 2016. Mobile Phone Signal Exposure Triggers a Hormesis-like Effect in Atm +/+ and Atm −/− Mouse Embryonic Fibroblasts. *Scientific Reports* 6 (1).

The INTERPHONE Study Group, 2010. Brain Tumour Risk in Relation to Mobile Telephone Use: Results of the INTERPHONE International Case–Control Study. *International Journal of Epidemiology* 39 (3): 675-94.

Xu S., Zhou Z., Zhang L., Yu Z., Zhang W., Wang Y., Wang X., Li M., Chen Y., Chen C., *et al.*, 2010. Exposure to 1800 MHz Radiofrequency Radiation Induces Oxidative Damage to Mitochondrial DNA in Primary Cultured Neurons. *Brain Research* 1311 (janvier): 189-96.

Zhadobov M., Nicolaz C. N., Sauleau R., Desmots F., Thouroude D., Michel D., & Le Dréan Y., 2009. Evaluation of the Potential Biological Effects of the 60-GHz Millimeter Waves upon Human Cells. *IEEE Transactions on Antennas and Propagation* 57 (10): 2949-56.

AGRO CAMPUS OUEST	Diplôme : Ingénieur Agronome Spécialité : Cursus Ingénieur Agronome Spécialisation / option : Master BMC – Biologie Moléculaire et Cellulaire Enseignant référent : Frédéric Lecerf

Auteur(s) : Coline MAHE Date de naissance* : 25/12/1995	Organisme d'accueil : IRSET Adresse : 9 avenue du professeur Léon Bernard 35000 Rennes
Nb pages : 18 Annexe(s) : 0	
Année de soutenance : 2019	Maître de stage : Yves Le Dréan

Titre français : Étude de l'hypersensibilité électromagnétique : effets génotoxiques des ondes radiofréquences

Titre anglais : Study of the electromagnetic hypersensitivity : genotoxic effects of radiofrequencies

Résumé (1600 caractères maximum) : Depuis quelques années, l'hypersensibilité électromagnétique (EHS) est devenue un sujet de controverse. Cette pathologie se caractérise par un autodiagnostic des patients qui attribuent leurs symptômes aux expositions aux ondes millimétriques (OM) (30 à 300 GHz), mais, à ce jour, aucun lien de cause à effet entre les expositions et ces symptômes n'a été démontré. Le but de ce stage est de déterminer si les OM génèrent un stress génotoxique et de comparer cette réponse sur des cellules issues de personnes saines et électrohypersensibles. Des fibroblastes de peau commercial (HDFA) et des échantillons issus de personnes électrohypersensbiles, ou non, sont exposés 14 h à 60 GHz avec ou sans bromate de potassium ($KBrO_3$), un agent oxydant connu. Le stress génotoxique est étudié via l'activation du système de réparation dépendant de la protéine ATM parimmunofluorescence et par RT-qPCR et Western Blot. Nous avons observé que l'activation d'ATM était altérée pour certains échantillons lors d'exposition aux OM. De plus, l'expression de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN n'était pas modifiée mais le niveau de phosphorylation de certaines protéines (XRCC1) augmentait sous exposition des HDFA. Cette étude, bien qu'inachevée, ouvre une piste sur le mécanisme impliqué dans l'EHS.

Abstract (1600 caractères maximum): In recent years, electromagnetic hypersensitivity (EHS) has become a subject of controversy. This pathology is characterized by a self-diagnosis of patients who attribute their symptoms to millimeter waves (OM) exposures (30 - 300 GHz), but, to date, no causal relationship between exposures and these symptoms has been demonstrated. The purpose of this internship is to determine if OM generate genotoxic stress and compare this response on cells from healthy and electrohypersensitive patients. Commercial skin fibroblasts (HDFA) and samples from electrohypersensible patients, or not, are exposed 14 h at 60 GHz with or without potassium bromate ($KBrO_3$), a known oxidizing agent. Genotoxic stress is studied through the activation of the ATM protein-dependent repair system by immunofluorescence and by RT-qPCR and Western Blot. We observed that ATM activation was impaired for some samples when exposed to OM. In addition, the expression of genes involved in DNA repair was not modified but the level of phosphorylation of certain proteins (XRCC1) increased after exposing the HDFA. This study, although incomplete, opens a trail on the mechanism involved in EHS.

Mots-clés : Radiofréquences ; ondes millimétriques ; hypersensibilité électromagnétique ; fibroblastes de peau ; génotoxicité ; système de réparation ; ATM

Key Words: Radiofrequencies ; millimeter waves ; skin fibroblasts ; genotoxicity ; repair system ; ATM

* *Elément qui permet d'enregistrer les notices auteurs dans le catalogue des bibliothèques universitaire*