

N° d'ordre: 3272

THESE

Présentée à

L'Université BORDEAUX I

Ecole Doctorale des Sciences du Vivant, Geosciences et Sciences de l'Environnement

Par Sandrine SANCHEZ

Pour obtenir le grade de

Docteur

Spécialité :

Biologie Cellulaire et Moléculaire



**Etude de l'induction de stress cellulaire PAR Les nouveaux signaux de communication
issus de la téléphonie mobile sur la peau et le système nerveux central.**



Soutenue le : 06 Décembre 2006

Après avis de :

Mme YARDIN Catherine, Professeur, Université de Limoges

Rapporteur

Mme BEUTER Anne, Professeur, Université Bordeaux 2

Rapporteur

Devant le jury composé de :

Mme RENAUD Sylvie, Professeur, Université Bordeaux 1

Présidente

Mme YARDIN Catherine, Professeur, Université de Limoges

Rapporteur

Mme BEUTER Anne, Professeur, Université Bordeaux 2

Rapporteur

M. VEYRET Bernard , Directeur de Recherche, UMR 5501, EPHE

Examineur

Melle LAGROYE Isabelle, Maître de Conférences, UMR 5501, EPHE

Examineur

M. BILLAUDEL Bernard, Chargé de Recherche, UMR 5501, Université Bordeaux 1

Examineur

M. SURLEVE-BAZEILLE Jean-Etienne, Maître de Conférences, Université Bordeaux 1

Invité

M. CESARINI Jean-Pierre, Docteur en Médecine

Invité

*A mon Grand-Père que j'ai perdu
A mes Parents
A mon Amour...*

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Jean Paul Parneix, directeur du laboratoire de Physique des Interactions Ondes-Matières (PIOM), UMR 5501 CNRS, pour m'avoir accueillie et permise d'effectuer cette thèse au sein de son laboratoire.

Je tiens à manifester au Pr Sylvie Renaud du laboratoire IXL, Université Bordeaux1, mon plus profond respect et la remercie de l'honneur qu'elle m'a fait de présider ce jury.

Je tiens à témoigner au Pr Catherine Yardin de la faculté de médecine de Limoges et au Pr Anne Beuter de l'Institut de Cognitique, Université Bordeaux 2, tout l'honneur qu'elles m'ont fait de juger ce travail en tant que rapporteurs.

Je souhaite exprimer, au Dr Jean-Etienne Surlève-Bazeille, Maître de Conférences, Université Bordeaux 1 et au Dr Jean-Pierre Césarini, Docteur en médecine, toute ma reconnaissance d'apporter leur jugement en tant que membres invités et leurs compétences en dermatologie et en photobiologie. Merci Jean-Etienne pour m'avoir permise de collaborer avec le laboratoire FDRC, Université Bordeaux 1, et ainsi d'apprendre les techniques de cultures de cellules cutanées et de reconstruction épidermique.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Bernard Veyret, directeur de recherche CNRS et directeur cumulant de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes (EPHE) du groupe de Bioélectromagnétisme, pour avoir encadré cette thèse et pour m'avoir soutenue tout au long de ces 5 années. Vous avez su me témoigner votre confiance et surtout vous avez su m'écouter lors de moments de craquage...

Merci de m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury en tant qu'examineur.

Je voudrais exprimer toute ma reconnaissance au Dr Isabelle Lagroye, Maître de Conférences EPHE, pour m'avoir co-dirigée et soutenue depuis le début. Merci « Chéfounette » pour ce suivi constant et ta disponibilité surtout en fin de thèse malgré la surcharge de travail... Tout comme Bernard, tu as su me faire confiance et me soutenir dans les moments difficiles, merci, merci, merci...

Et merci de m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury en tant qu'examineur.

Je témoigne, au Dr Bernard Billaudel, chargé de recherche CNRS, toute ma gratitude pour m'avoir co-dirigée et soutenue. Merci Bibi pour toute l'aide expérimentale et statistique que tu m'as apportée avec ta bonne humeur, tes blagues et jeux de mots me manqueront...

Merci de m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury en tant qu'examineur.

Je souhaite adresser mes sincères remerciements à Maguy Lassègues, directrice du laboratoire FRDC, Université Bordeaux1, pour m'avoir accueillie dans son équipe avec toute sa sympathie, gentillesse et bonne humeur.

Je voudrais exprimer ma très grande reconnaissance à Alexandra Milochau, Ingénieur d'Etudes, Toulouse, pour m'avoir appris toutes les techniques de cultures de cellules cutanées humaines et de reconstruction d'épidermes. Merci Alexandra pour ta sympathie, ton amitié et ton soutien. Je te souhaite tout plein de bonnes choses dans ta vie professionnelle et personnelle !

Je tiens à remercier Catherine Pain et Murielle Cario-André de l'Unité de Dermatologie, Université Bordeaux 2, pour leur gentillesse et l'apport de biopsies de peau qu'elles m'ont fournies malgré les temps difficiles...

私は Hiroshi Masuda への私のより誠実な感謝に演説する、公衆衛生を離れた国民の協会との PhD、日本。あなたなし、実験は生体内で単調であろう Arigatô

Je voudrais exprimer toute mon amitié et ma reconnaissance à Emmanuelle Haro, Ingénieur d'Etudes au laboratoire PIOM. Merci ma poulette pour ton amitié, ton soutien, ta bonne humeur... Je te suis reconnaissante de tellement de choses que je ne trouve pas les mots suffisants à cette reconnaissance. Je t'adore, il me sera très difficile de quitter ce bureau où nous avons tant partagé... J'espère que tout se passera bien et dans le meilleur des mondes ! Merci pour tout...

Je tiens à témoigner également toute mon amitié et ma reconnaissance à Nolwenn Huby, post-doctorante à Milan. Quelle chance j'ai eu de te connaître, tu es malheureusement partie travailler à l'étranger trop tôt... Mais ton soutien (même distant physiquement) en cette fin de thèse a été très important pour moi. Merci pour tout ma Nono, je t'adore... Bon vent pour la suite !

J'adresse mes plus vifs remerciements à Gilles Ruffié, Ingénieur de Recherche au laboratoire PIOM. Merci Gilou, notre MacGyver préféré, pour ton aide précieuse en matière de systèmes d'exposition, je ne comprendrai jamais pourquoi tu ne fais pas partie intégrante du groupe de bioélectromagnétisme... En tout cas, sans toi, il y a certaines manips qui auraient tardé à démarrer !! Merci également pour ta bonne humeur et ton soutien...

A mes collègues de l'équipe de Bioélectromagnétisme :

- tout d'abord Laëtitia M. un grand merci pour ton soutien précieux en cette fin de thèse, je te souhaite tout plein de bonheur pour la suite des événements !!
- Florence, merci pour tes lumières sur les protéines de choc thermique et le système nerveux central. Que la force soit avec toi pour décrocher un poste !
- Michèle, merci pour ton soutien et tes nombreuses références bibliographiques
- Renaud, merci pour ton aide précieuse et ton soutien concernant les galères de comètes...
- Annabelle, jeune recrue depuis peu et très sympathique, qui détient le record de cerveaux coupés par jour : 9 !!! à qui je voudrais exprimer tout mes vœux de réussite dans ce poste que tu as bien mérité !

Je tiens à manifester toute ma gratitude aux secrétaires du laboratoire PIOM. Tout d'abord Corinne et Patricia, puis Valérie et Nathalie dans l'ordre de leur arrivée mais aussi de leur départ enfin pas toute...snif... Merci de votre patience, de votre travail et de votre disponibilité... Votre travail est bien trop souvent critiqué à mon goût, alors qu'on a tant à vous devoir...

Je remercie aussi tous les autres membres du laboratoire PIOM : Fabrice, François, Julien, Yannick, Habiba, Matthieu, Laurence, Guillaume, Lionel, etc... pour leur sympathie et leur bonne humeur !

Je voudrais adresser mon plus sincère amour à Loulou. Tu as fait parti de ma vie pendant cette thèse et tu m'as soutenue du mieux que t'as pu... malgré des moments difficiles. Merci d'avoir été là pour moi. La libération de cette vie d'étudiant nous l'avons vécu ensemble, non sans douleur... C'est une période qui restera gravée dans mon cœur... Je te souhaite de réussir dans tout ce que tu entreprendras.

Je voudrais adresser mon plus sincère amour à Loulou. Tu as fait parti de ma vie pendant cette thèse et tu m'as soutenue du mieux que tu as pu... malgré des moments difficiles. Merci d'avoir été là pour moi. La libération de cette vie d'étudiant nous l'avons vécu ensemble, non sans douleur... C'est une période qui restera gravée dans mon cœur... Je te souhaite de réussir dans tout ce que tu entreprendras.

Mes derniers remerciements et non les moindres vont à ceux qui me sont chers : mes parents tout d'abord, puis Corinne, Frédérique, ma nièce tant aimée Marylou et toute ma famille, qui m'ont toujours soutenu dans mes choix quels qu'ils soient. Cette thèse est aussi la leur ! Merci pour vos encouragements et pour votre amour... Je ne manquerai pas de remercier également tous mes amis, Audrey, Fleur, Stéphanie P., Stéphane S., Béatrice et Frédéric, Carole, Carine, Marie-Noëlle, Gaël, Florian, Laurent et Matteo G. pour leur soutien. Je les associe à cette réussite qui est aussi la leur.

Abréviations	xiii
Introduction	- 1 -
Chapitre 1 : Généralités	- 7 -
• Partie 1 : La peau	- 7 -
Structure	- 7 -
Epiderme	- 8 -
Derme/Hypoderme	- 9 -
Fonctions	- 11 -
Fonction de barrière	- 11 -
Fonction immunitaire	- 11 -
La peau et le stress cellulaire	- 12 -
Le rayonnement solaire, les ultraviolets.	- 12 -
Peau et Stress Cellulaire	- 13 -
• Partie 2 : Neurobiologie du Système Nerveux Central	- 17 -
Structure	- 17 -
La macroglie	- 17 -
Les oligodendrocytes au niveau central	- 17 -
Les astrocytes.	- 18 -
La microglie.	- 20 -
Principales fonctions	- 21 -
Le système nerveux central et le stress cellulaire	- 22 -
• Partie 3 : Le Stress Cellulaire et les HSPs	- 25 -
Les protéines de choc thermique ou HSPs	- 25 -
HSP de petite taille moléculaire 12-43 kDa	- 27 -
Structure	- 27 -
Localisation	- 27 -
Modulation de l'expression	- 28 -
Rôle biologique face au stress	- 29 -
HSP 70 et protéines associées	- 31 -
Structure	- 31 -
Localisations	- 31 -
Modulation de l'expression	- 32 -
Rôles biologiques face au stress	- 32 -
Les HSPs dans la peau	- 34 -
Les HSPs dans le SNC	- 34 -
• Partie 4 : Le Stress Cellulaire et la mort cellulaire	- 37 -
Notions de mort cellulaire.	- 37 -
La Nécrose	- 38 -
L'Apoptose	- 38 -
• Partie 5 : La téléphonie mobile et la santé	- 43 -
Le réseau de communication de téléphonie mobile	- 43 -
Un peu d'histoire...	- 43 -
Le réseau de communication	- 44 -
La station de base (ou antenne relais)	- 45 -
Le téléphone mobile	- 46 -
Notion de Débit d'Absorption Spécifique (DAS)	- 46 -
Les signaux	- 47 -
Le GSM	- 48 -
Le signal UMTS	- 48 -
Les radiofréquences et la santé : état des lieux au début du projet.	- 49 -
Etudes <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> sur la peau	- 49 -
Etudes <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> sur le SNC	- 50 -
Stratégie d'étude	- 51 -
Chapitre 2 : Conditions expérimentales d'exposition et interprétation des résultats	- 53 -

• Partie 1 : Systèmes d'exposition et conditions d'expérimentation	- 53 -
Les expérimentations <i>in vitro</i>	- 53 -
Le système d'exposition pour le signal GSM-900.	- 53 -
Protocole expérimental à 900 MHz	- 57 -
Le système d'exposition pour le signal GSM-1800.	- 57 -
Protocole expérimental à 1800 MHz	- 59 -
Conditions d'exposition aux rayonnements UVB	- 60 -
Les expérimentations <i>in vivo</i>	- 61 -
Le système d'exposition	- 61 -
Protocole expérimental à 900 et 1800 MHz	- 62 -
Protocole expérimental au signal UMTS	- 63 -
• Partie 2 : Interprétation des résultats : importance du choix du test statistique? (issu de www.cons-dev.org)	- 65 -
Chapitre 3 : Travaux Personnels	- 71 -
• Partie 1 : Approches <i>in vitro</i>	- 71 -
Articles	- 71 -
ARTICLE 1 : Human skin cell stress response to GSM-900 mobile phone signals : an <i>in vitro</i> study on isolated primary cells and on reconstructed epidermis.	- 73 -
ARTICLE 2 : <i>In vitro</i> study of the stress response of human skin cells to GSM-1800 mobile phone signals in comparison to UVB and heat shock	- 93 -
Résultats complémentaires	- 125 -
Kératinocytes primaires humains épidermiques	- 125 -
Fibroblastes primaires humains dermiques et lignées de cellules nerveuses	- 126 -
Résumé	- 129 -
• Partie 2 : Approches <i>in vivo</i>	- 133 -
Articles	- 133 -
ARTICLE 4 : Effect of a 2-hour acute exposure to GSM-900 or -1800 microwaves on the skin of "hairless" rats.	135
ARTICLE 5 : Effect of chronic exposure to GSM-900 or -1800 microwaves on the skin of "hairless" rats	143
ARTICLE 6 : No effect of single or chronic exposure to GSM-900 and -1800 mobile phone signals on HSP expression in the skin of hairless rat	151
ARTICLE 7 : No genotoxic effects of UMTS mobile phone signals on Sprague-Dawley rat brains	- 175
-	
Résumé	- 195 -
Chapitre 4 : Discussion et conclusion générale – Perspectives	- 197 -
• Partie 1- Discussion	- 197 -
Etat des lieux en fin de projet :	- 197 -
La peau : cible des radiofréquences issues de la téléphonie mobile ?	- 197 -
Le système nerveux central: cible des radiofréquences issues de la téléphonie sans fil ?	- 200 -
Les HSPs et les RF	- 203 -
Méthodes de toxicologie en bio-électromagnétisme	- 204 -
Choix des modèles cellulaires	- 205 -
Choix des modèles animaux	- 211 -
Choix des techniques de détection	- 213 -
Choix des tests statistiques	- 214 -
• Partie 2 - Conclusion-Perspectives	- 215 -
Chapitre 5 : Valorisation des compétences	- 219 -
• Partie 1 : Cadre général et enjeux de la thèse	- 219 -
Présentation succincte	- 219 -
Thèse dans son contexte	- 220 -
Pourquoi une thèse ?	- 221 -
• Partie 2 : Déroulement, gestion et coût du projet	- 221 -

Préparation et cadrage du projet. _____	- 221 -
L'évaluation et la prise en charge de ce projet _____	- 224 -
Compétences, savoir-faire, qualités professionnelles et personnelles _____	- 225 -
• Partie 3 : Résultats, impact de la thèse _____	- 226 -
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i> _____	- 229 -
<i>COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES</i> _____	- 253 -

Abréviations

ADN : Acide DesoxyriboNucléotide
ADP : Adenosine Di-Phosphate
AMRT: Accès multiple à répartition dans le temps
AMRF: Accès Multiple à Répartition en fréquence
AMRC: Accès Multiple à Répartition par Code
ANX : Annexine V
ARNm : Acide Ribonucléique messenger
ATP : Adenosine Tri-Phosphate
AVC : Accident Vasculaire Cérébral
BHE : Barrière Hémato Encéphalique
BPE : Extrait Bovin Pituitaire
CDMA : Code Division Multiple Access
CHBF : Constitutive Heat shock element Binding Factor
CNTF : Ciliary Neurotrophic Factor
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigènes
DAMPS : Digital Advanced Mobile Phone System
DAS ou SAR : Débit d'Absorption Spécifique ou Specific Absorption Rate
DCS : Digital Communication system
DDD : Dead De-epidermised Dermis
DMEM : Dulbecco 's Modified Eagle's Medium
EDGE : Enhanced Data rates for GSM Evolution
EDTA : EthyleneDiamine-Tetraacetic Acid
EGF : Epidermal Growth Factor
ER : Épiderme Reconstruit
FDMA : Frequency Division Multiple Access
FGF : Fibroblast Growth Factor
FITC : Fluorescein IsoThioCyanate
GFAP: Glial Fibrillary acidic protein
GRP: Glial Restricted Precursor
GSM : Global System for Mobile Communication
HE : Hématoxyline - Eosine
HES : Hématoxyline – Eosine – Safran
HO: Hème Oxygenase
HPS : Hématoxyline – Phloxine - Safran
Hsp : désigne une protéine de choc thermique
HSP : désigne une famille de Hsps
sHSP : small HSP
hsp : désigne un gène codant pour une Hsp
HSF : désigne un facteur de transcription de la " réponse au choc thermique "
HRP : Horse-Radish Peroxydase
HSE : Heat Shock Element
HSF : Heat Shock Factor
ICNIRP : International Commission on Non-Ionising Radiation Protection
ICT: Ischémie Cérébrale Transitoire
IEEE : Institute of Electrical and Electronics Engineers
IR : InfraRouges
IL : Interleukine

IMDM : Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IP : Iodure de Propidium
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase
NAD : Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NGF : Nerve Growth Factor
NHEK : Normal Human Epidermal Keratinocytes
NHDFc : Normal Human Dermal Fibroblasts, fournis par Cambrex
NHDFe : Normal Human Dermal Fibroblasts, isolés au laboratoire
OECD : Organisation for Economic co-operation and development
PARP : Poly(ADP-Ribose) Ploymerase
PBS : Phosphate Buffer Saline
PDGF : Platelet Derived Growth Factor
pH : potentiel d'Hydrogène
PGE 2 : Prostaglandine 2
PT : pores mitochondriaux de Transition de Perméabilité
RE : Réticulum Endoplasmique
RF : RadioFréquences
SC : Sunburn Cell
SNC : Système Nerveux Central
SVF : Sérum de Veau Fœtal
TDMA : Time division multiple access
TGF : Tumor Growth Factor
TNF : Tumor Necrosis Factor
UEM : Unité Epidermique Mélanique
UMTS : Universal Mobile Telecommunications System
UV A, B, C : Ultraviolet A, B, C.
WiFi : *Wireless Fidelity*™

3-D : 3 dimensions

$\Delta\Phi_m$: différence de potentiel membranaire mitochondrial

Introduction

On appelle stress, tout événement qui entraîne un comportement, une réaction d'adaptation de l'organisme. Ainsi, depuis la nuit des temps, face à l'environnement changeant, les êtres vivants ont été amenés à s'adapter ou à mourir. Le stress existe donc depuis bien longtemps, mais le concept de « stress » n'est réellement apparu qu'en 1950 grâce au célèbre endocrinologue canadien d'origine autrichienne Hans Selye (Vienne 1907 - Montréal 1982) qui a défini le stress comme « toute réponse de l'organisme consécutive à toute demande ou sollicitation exercées sur cet organisme ».

Dans cette théorie, il mit en évidence la réponse du système neuro-glandulaire de l'organisme pour survivre et s'adapter face à des tensions de toutes sortes.

Ainsi, il identifia trois phases en réponse à l'agression :

- (i) A la première phase, appelée **réaction d'alarme**, l'organisme reconnaît l'agression, se prépare à agir : combattre ou fuir, puis il met en œuvre la défense. Le délai minimal de réponse est de quelques minutes. Les glandes endocrines libèrent des hormones qui accélèrent les rythmes cardiaque et respiratoire, élèvent la glycémie, augmentent la sudation, dilatent les pupilles et ralentissent la digestion,
- (ii) A la deuxième phase, appelée **résistance**, l'organisme s'adapte à un agent agresseur persistant, et régule les perturbations provoquées par la réaction d'alarme. Si l'agression ne s'arrête pas, le corps demeure en alerte et ne peut plus compenser les lésions provoquées par cette alerte.
- (iii) la phase de résistance se poursuit, puis cède la place à la **phase d'épuisement**. Une agression prolongée affaiblit notamment les réserves énergétiques de l'organisme, du fait de la dépense occasionnée par la réponse à l'agression.

Le stress est donc assimilé à une réponse comportementale et biologique associée à un phénomène social.

Le stress peut donc être représenté selon la figure 1 avec une phase ultime consécutive à l'épuisement : la mort. L'évolution du stress est régie par des bio-marqueurs (B1 à B4) qui, selon l'ordre de leur apparition, font progresser l'état physiologique ou cellulaire.

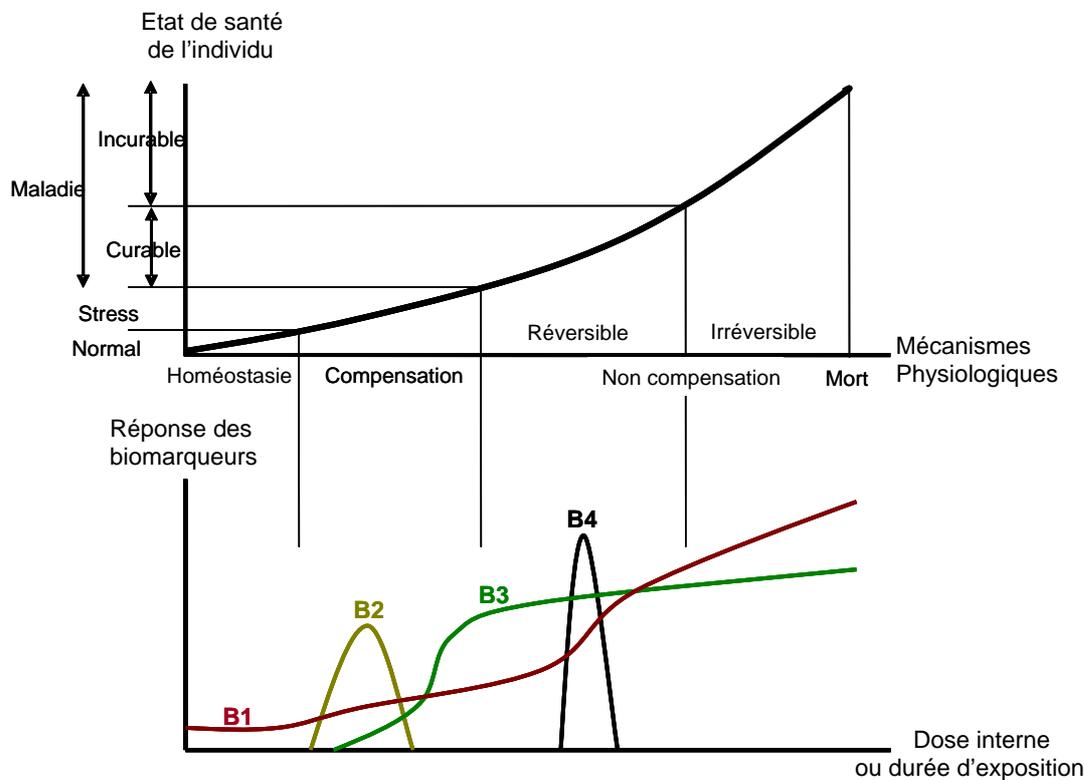


Figure 1 : Représentation schématique de l'évolution du rôle des biomarqueurs en fonction de la concentration en agent toxique ou de la durée d'exposition d'après Depledge (Depledge, 1994). B1 à B4 représentent des biomarqueurs spécifiquement exprimés aux différentes phases de réponse. Ils peuvent être des protéines, des anticorps, etc

Les cellules d'un organisme vivent dans des conditions environnementales physiologiques stables, c'est l'homéostasie cellulaire. Elles sont cependant également soumises à des agressions aiguës ou chroniques. Cette situation impose une faculté d'adaptation de l'organisme entier, indispensable pour la survie, impliquant la mise en œuvre de mécanismes permettant la détection de l'agent stressant et les réponses adéquates visant à en moduler les effets. Ainsi, le stress cellulaire proprement dit a été décrit en 1962 par Ritossa (revue par Ritossa, 1996) qui décrivait des manifestations cellulaires de la réponse au choc thermique ("heat-shock response"). Il observa une série d'élargissements ou renflements ("puffs") au niveau de certains des chromosomes géants des glandes salivaires de drosophiles soumises à un choc thermique. Depuis, cette réponse a été très largement étudiée et a été associée à d'autres stress que l'hyperthermie, à d'autres types cellulaires que les cellules de la drosophile.

Elle a, entre autres, été caractérisée par l'induction de "heat shock genes" et la régression d'autres gènes, expliquant ainsi les renflements observés sur les chromosomes (Berendes, 1969; Leenders, 1972).

Dans tous les cas de stress, un processus commun est cependant proposé allant du stress aigu avec des réponses permettant la survie au stress chronique qui devient fortement délétère pour l'organisme ou la cellule qui le subit, puisque l'échéance finale peut être la mort.

Depuis le changement climatique qui extermina les dinosaures jusqu'au siècle précédent de révolution industrielle, l'environnement n'a fait que se modifier et se complexifier, majoritairement sous l'action de l'Humanité elle-même. Aujourd'hui, la question de l'impact de l'action de l'Homme sur la nature et sur l'Homme lui-même se pose de façon aiguë

Parmi les avancées technologiques apparues durant le siècle dernier, la communication sans fil est l'une de celles qui auront le plus progressé : d'une génération de téléphones sans fil, uniquement adaptés aux armées, les téléphones sans fil, dit téléphones mobiles ou bien encore portables, ont fait leur apparition dans le monde civil, jusqu'à la troisième génération de téléphones dans lesquels l'interlocuteur voit son correspondant sur l'écran plutôt que d'avoir une simple communication à l'oreille. Cette progression a cependant inquiété certaines personnes qui craignent un impact délétère sur la santé des ondes issues de ces téléphones, ainsi que de leurs stations de base qui sont de plus en plus nombreuses dans l'environnement.

Depuis une quarantaine d'années, les recherches ont été actives sur les effets des ondes électromagnétiques sur le vivant, ondes dont la fréquence s'échelonne de quelques MHz à la limite des infrarouges (300 GHz). À ce jour, et malgré un grand nombre de publications, aucune conclusion ferme n'existe sur l'innocuité des téléphones mobiles. En effet, trop de controverses perdurent. Sur la base des résultats disponibles, l'application du principe de précaution, bien qu'il n'y ait pas de définition universellement admise de ce principe, est recommandé. Il s'agit de prendre des mesures réglementaires lorsqu'il n'existe pas de preuves suffisantes pour conclure qu'une activité ou un produit ne risque pas de causer des lésions graves et irréversibles à la santé ou à l'environnement.

À ce jour, des commissions internationales ont publié des limites d'exposition concernant les niveaux d'émission des téléphones portables (ICNIRP, IEEE). Ces limites tiennent compte des effets sanitaires connus, qui sont de nature thermique, c'est-à-dire

provoqués par un échauffement. Or, les appareillages de téléphonie mobile ne provoquent pas d'échauffement. C'est donc l'existence d'effets non-thermiques, beaucoup plus complexes à étudier, qui est au cœur des débats concernant les éventuels risques sur la santé des ondes émises dans les communications sans fil.

Les recherches actuelles sur les effets biologiques des radiofréquences issues de la téléphonie mobile concernent les pathologies du cerveau, de l'oreille interne ou encore du système immunitaire, mais peu d'entre elles se sont intéressées à la peau. Pourtant, lors d'une communication téléphonique, le premier organe touché est la peau. En effet, elle est en contact avec l'appareil et très proche de l'antenne. D'où l'intérêt d'étudier les réactions physiologiques que pourrait avoir la peau et en particulier l'épiderme, première barrière de protection du corps humain, à ce type d'agression environnementale.

La peau a subi de fortes évolutions au cours du temps pour transformer l'homme préhistorique, très pileux, en l'*Homo sapiens sapiens*, imberbe en comparaison. Cette perte de pilosité a ainsi rendu l'Homme plus sensible aux variations, en particulier climatiques, de son environnement. La peau, avec ses éléments constitutifs, est capable de se défendre face à son agresseur principal que sont les ultraviolets, en utilisant de nombreux mécanismes identifiables à une réponse au stress.

Le cerveau, tout comme la peau, a subi de nombreuses modifications au cours du temps pour donner à l'Homme de nouvelles fonctions, telles que le langage ou bien encore la capacité de créer et de construire. Il est aussi la cible de stress majoritairement lié aux émotions de l'individu, mais aussi provenant d'agents de l'environnement tels les bactéries et les virus, véhiculés accidentellement par l'organisme. Le cerveau est donc lui aussi capable de se défendre face à un stress.

Par la position du téléphone portable accolé à l'oreille, la peau est directement touchée et le cerveau est aussi une cible potentielle des ondes, mais de second ordre par rapport à la peau. Comme Keshvari et al l'ont montré, autant sur une tête d'enfant que d'adulte (Keshvari and Lang, 2005), l'absorption de l'énergie transmise par un téléphone décroît avec la profondeur des tissus et l'augmentation en fréquence des signaux.

En conséquence, il est important de réaliser des travaux de recherche pour tester les hypothèses impliquant les radiofréquences issues de la communication sans fil comme source d'éventuels effets délétères sur la peau et le cerveau. Dans ce travail de thèse, nous avons étudié l'induction de stress par les nouveaux signaux de communication sans fil (du signal

Global System for Mobile communication GSM à 900 MHz, à l'Universal Mobile Telecommunications System, UMTS à 2000 MHz) sur différents modèles : peau et système nerveux central.

Nous présentons, dans un premier chapitre, les notions de physiologie et physiopathologie de la peau et du cerveau. Les réponses de stress sont également présentées, en particulier les protéines de choc thermiques Hsp25, Hsc70 et Hsp70 majoritairement exprimées dans la peau et le cerveau, et les réponses de stress amenant à la mort cellulaire. Puis l'état des connaissances sur les effets sanitaires liés à l'exposition aux signaux de communication mobile est exposé.

Le second chapitre est consacré à la description des matériels et des méthodes utilisés dans ce travail de thèse.

Les résultats, dans un troisième chapitre, sont présentés sous forme de 7 publications scientifiques, publiées, acceptées ou soumises. Ces articles présentent les résultats obtenus *in vitro* sur des cellules de la peau et du cerveau, et *in vivo* sur la peau et le cerveau de rats. Une discussion des résultats figure dans chacun des articles.

Enfin, les différents résultats sont discutés globalement dans le quatrième chapitre. Suivent des considérations sur certains points qui nous sont apparus importants au cours de ce travail de thèse, notamment le choix des modèles d'étude en toxicologie.

Chapitre 1 : Généralités

- *Partie 1 : La peau*

Enveloppe extérieure des mammifères, la peau confère, en coordination avec la fourrure pour certains, une protection contre les agressions environnementales. Chez l'Homme, il ne reste plus que des vestiges de fourrure (poils et cheveux) ; la peau a donc dû s'adapter pour développer une meilleure protection, notamment en ce qui concerne les rayonnements ultraviolets, grâce à la pigmentation. Elle permet également des échanges entre milieux extérieur et intérieur qui modulent les nombreux processus métaboliques de cet organe. Elle représente une surface d'environ 2 m² chez l'adulte, avec une épaisseur moyenne de 2 mm et un poids total d'environ 4 kg.

Structure

La peau est constituée de trois couches (Figure 2), de l'extérieur vers l'intérieur : l'épiderme, le derme puis l'hypoderme ; ainsi que de nombreuses annexes cutanées (Kanitakis, 2002).

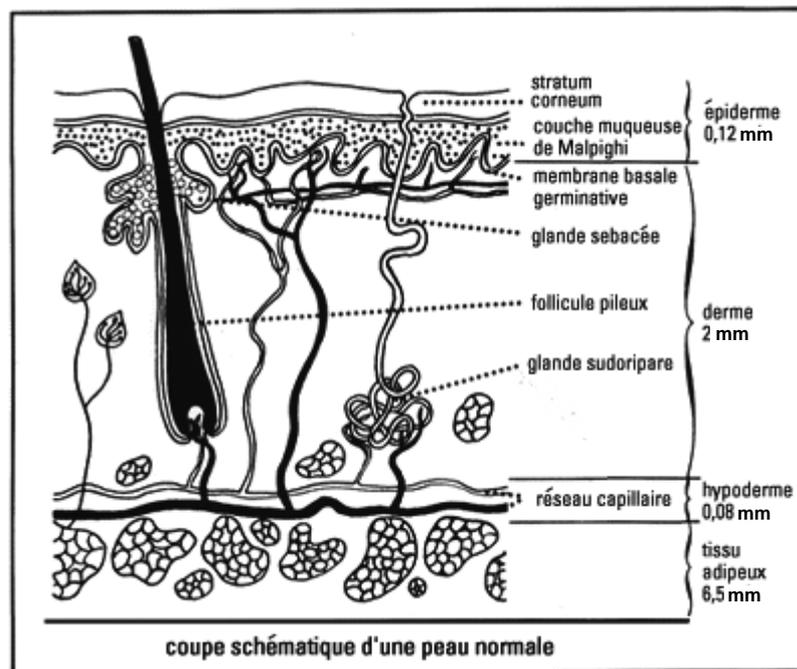


Figure 2 : Structure de la peau. Coupe schématique d'une peau normale du tissu adipeux à l'épiderme. Source : www.laphi-ppdh.com

Epiderme

L'épiderme constitue la face superficielle de la peau et la principale barrière de protection contre les atteintes extérieures. Il se compose de quatre couches, la plus interne étant la couche basale, puis vient la couche malpighienne (ou couche épineuse ou encore stratum spinosum), la couche granuleuse (ou stratum granulosum) et enfin, en surface, la couche cornée (ou stratum corneum). L'importance de la couche basale est majeure car, si le matériel génétique fait l'objet d'agressions, les défauts de réparation entraînent des mutations intéressant le contrôle du cycle cellulaire et les processus de cancérisation.

Cet épithélium pluristratifié, kératinisé, d'origine ectodermique, renferme différents types cellulaires :

- Les kératinocytes, population épidermique majoritaire (90 %), représentée par des cellules épithéliales différenciées pour la synthèse des kératines (95 % des protéines totales de l'épiderme). La différenciation kératinocytaire s'accompagne d'un ensemble de transformations morphologiques et biochimiques et finalement de mort cellulaire programmée similaire à l'apoptose, aboutissant à la formation des cornéocytes (Gandarillas et al, 1999; Gandarillas, 2000), cellules anucléées et aplaties qui desquament à la surface de la peau (couche cornée). Ainsi, en 30 jours en moyenne chez l'Homme, la maturation des kératinocytes, de la profondeur vers la surface de l'épiderme, permet la répartition en quatre couches de l'épiderme.
- Les mélanocytes (5 %), situés dans la couche basale, sont des cellules de grande taille prolongées de dendrites. Ces cellules sont localisées dans la lame basale où elles ne prolifèrent quasiment pas. Leur rôle principal est de produire la mélanine, pigment naturel, protecteur cellulaire contre les rayonnements ultraviolets (UV). Ces mélanocytes s'organisent avec les kératinocytes en Unité Epidermique de Mélanisation (UEM, composée d'un mélanocyte pour trente-six kératinocytes) qui permet aux mélanocytes de transférer les mélanosomes (vésicules de mélanines) aux kératinocytes voisins, et ainsi de protéger leur matériel nucléaire des agressions UV.

Les autres types cellulaires (5 %) sont représentés par :

- 1) Les cellules de Langerhans, d'origine monocyttaire, qui sont localisées en parties profondes et moyennes de l'épiderme (au niveau de la couche épineuse). Leur morphologie particulière constituée de dendrites longues s'étendant aux kératinocytes voisins, leur confère des

propriétés de capture et ainsi leur permet de traiter les informations antigéniques (Elmets et al, 1982; Braathen, 1987). Ces cellules sentinelles, après migration jusqu'aux ganglions lymphatiques, seront capables de présenter les antigènes aux lymphocytes permettant l'induction d'une réponse immunitaire de type cellulaire et humoral.

- 2) Les cellules de Merkel, d'origine neuroendocrine, qui sont localisées au niveau de la couche basale. Elles sembleraient jouer un rôle de mécanorécepteurs et sont généralement associées à une terminaison nerveuse périphérique (Narisawa, 1992).

Derme/Hypoderme

Située entre l'épiderme et le derme, comme son nom l'indique, la jonction dermo-épidermique (de 50 à 80 nm d'épaisseur) est caractérisée par les nombreuses interactions cellulaires et matricielles. Elle est élaborée à la fois par les kératinocytes de l'épiderme basal et les fibroblastes dermiques. En effet, la couche basale repose sur une membrane basale (basal lamina), acellulaire formée de fibrilles de collagène à laquelle s'attachent les kératinocytes de la couche basale par des hémidesmosomes d'une part et des fibres oxytalanes élastiques responsables de l'élasticité et de la formation des ondulations caractéristiques de l'épiderme jeune. Ces fibres oxytalanes sont les premières altérées lorsque le processus du vieillissement du tégument est engagé. Elle a pour rôle de supporter mécaniquement l'adhésion épiderme-derme et également de contrôler les échanges moléculaires et cellulaires entre ces deux compartiments.

Vient ensuite le derme, tissu fibreux, élastique, conjonctif dense, issu du mésoderme, qui constitue le support solide de la peau et le protecteur de l'épiderme (protection et nutrition). Il est constitué de fibres de collagène, d'élastine et de protéoglycanes, constituants élaborés par les fibroblastes et représentant la matrice extracellulaire. Le derme se structure sur deux niveaux : (i) le derme papillaire qui s'insinue dans l'épiderme, il est très vascularisé et riche en fines fibres de collagène entrelacées et orientées perpendiculairement à l'épiderme et (ii) le derme réticulaire en profondeur quant à lui est constitué de fibres de collagène grossières et disposées en faisceaux épais et irréguliers en vagues, qui s'entrecroisent horizontalement par rapport à la surface de la peau.

Les principaux constituants cellulaires du derme sont les fibroblastes, cellules fusiformes, responsables de la synthèse et de l'entretien du matériel extracellulaire. Ils synthétisent le collagène (Dhawan and Farmer, 1990 ; Tajima et al, 2000), l'élastine (Fazio et al, 1988 ; Rosenbloom et al, 1991) ainsi que les glycoprotéines de structure (i.e. fibronectine, laminine) (Labat-Robert, 2003). Leur activité est essentielle et intense au cours des phénomènes de cicatrisation (Moulin et al, 1998 ; Ferguson et al, 1999) et participent fortement à la croissance et à la différenciation des kératinocytes (Goulet et al, 1996). Certains facteurs, comme les facteurs de croissance et les cytokines (IL-10, TGF- β , etc) sont capables de contrôler la prolifération des fibroblastes ainsi que leur capacité de synthèse des molécules de la matrice extracellulaire (Yamamoto et al, 2001 ; Perfetto et al, 2003). D'autres cellules sont présentes dans le derme, il s'agit de cellules impliquées dans la défense non spécifique et la surveillance immunitaire : mastocytes et macrophages, qui participent également à la prolifération fibroblastique ainsi qu'à la production collagénique (Sasaki et al, 1996 ; Abe et al, 2000).

Les composants fibreux du derme sont les collagènes I et III, protéines très abondantes dans le corps humain et capables de stocker les forces de tension. Le deuxième groupe de composants dermiques est représenté par les fibres élastiques constituées d'élastine dont la principale caractéristique est la résistance physique aux attaques physiques et chimiques.

L'hypoderme sépare le derme des muscles sous-jacents. Il est constitué d'adipocytes, lieu de stockage des lipides, concentrés dans des septums fibreux conjonctivo-vasculaires. Il a donc pour principal rôle d'être une réserve nutritionnelle, mais protège aussi des variations thermiques (froid notamment), et amortit les chocs mécaniques.

On peut enfin citer la présence des annexes cutanées, composées des glandes sudoripares et sébacées, des ongles et des poils, qui prennent naissance dans le derme.

Fonctions

Fonction de barrière

La peau a pour principale fonction de protéger l'organisme contre les agressions extérieures. Cette fonction est la résultante des trois éléments présents dans la peau : la couche cornée, le derme et l'hypoderme.

La couche cornée, tout d'abord, possède de nombreuses caractéristiques qui lui confèrent une résistance mécanique et chimique. Grâce aux cellules mortes kératinisées baignant dans un mortier gras (lipides), la couche cornée se comporte comme un tissu imperméable. La kératine de ces cellules est une protéine très résistante qui confère une résistance aux produits chimiques, aux étirements mécaniques... La couche cornée est également résistante aux variations de température puisqu'elle présente une conductivité thermique identique à celle du tissu adipeux. Enfin, cette couche représente une barrière antimicrobienne de par la desquamation mais aussi son pH (acide) (Hachem et al. 2003; Schmid-Wendtner and Korting 2006), le film hydrolipidique (sébum) et la flore microbienne résidente naturelle de la peau.

Le derme, quant à lui, maintient la tension de la peau et protège les réseaux vasculaires et nerveux grâce à ses propriétés extensibles et élastiques.

Enfin, l'hypoderme, dont la constitution est essentiellement adipeuse, est un isolant thermique et mécanique.

Fonction immunitaire

La peau est un organe doué de propriétés immunologiques propres qui se conjuguent en deux lignes de défense.

La première ligne défensive est représentée par l'épiderme et plus précisément par les kératinocytes et les cellules de Langerhans.

Les kératinocytes agissent selon trois modalités. La première est la sécrétion de cytokines (IL-1, TNFalpha...) (Ansel et al. 1990), médiateurs solubles de la communication cellulaire attirant les lymphocytes T et qui déclenchent une réponse inflammatoire, en l'absence de pénétration de substance antigénique - par exemple sous exposition ultraviolette .

Les deuxième et troisième modalités sont, respectivement, la présentation de l'antigène (cellules présentatrices d'antigènes, CPA) (Li et al. 1996; Fan et al. 2003) et la lyse

cytotoxique dans les cas, par exemple, d'infection virale, de maladies cancéreuses ou auto-immunes où les kératinocytes sont les cibles de la réponse immunitaire.

Les cellules de Langerhans, issues de la moelle osseuse, peuvent être considérées comme des macrophages. Elles sont représentées par deux formes fonctionnelles (Steinman et al. 1995) : (i) la forme immature qui capte les molécules étrangères et les métabolise (CPA) et (ii) la forme mature (ou dendritique) qui migre jusqu'aux ganglions lymphatiques et présente l'antigène aux lymphocytes T naïfs.

La deuxième ligne défensive est représentée par les macrophages du derme, qui éliminent les virus et bactéries qui auraient réussi à passer au travers de l'épiderme. Ce sont des CPA, donc des activateurs des lymphocytes.

La peau et le stress cellulaire

Le rayonnement solaire, les ultraviolets.

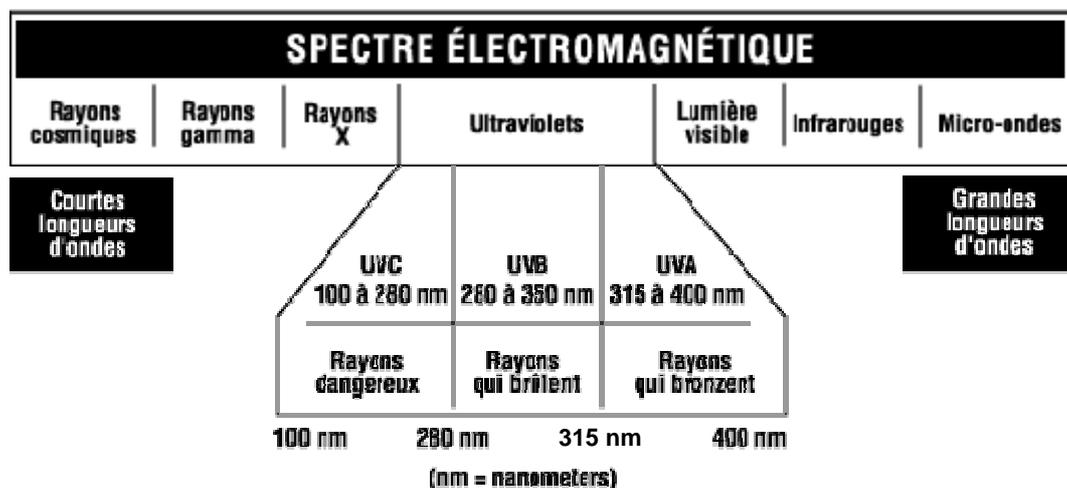


Figure 3 : Spectre électromagnétique partiel (des microondes aux rayons cosmiques)

Le soleil émet des radiations électromagnétiques en un spectre continu allant de 1 pm (rayons cosmiques) à 10 m (ondes radio) (Figure 3). La lumière se situe entre 190 et 1000 nm.

Si l'on considère la lumière visible (par l'oeil), alors on se limite à un spectre allant de 380 à 700 nm, spectre bordé par les ultraviolets (UV, partie inférieure) et l'infrarouge (IR, partie supérieure).

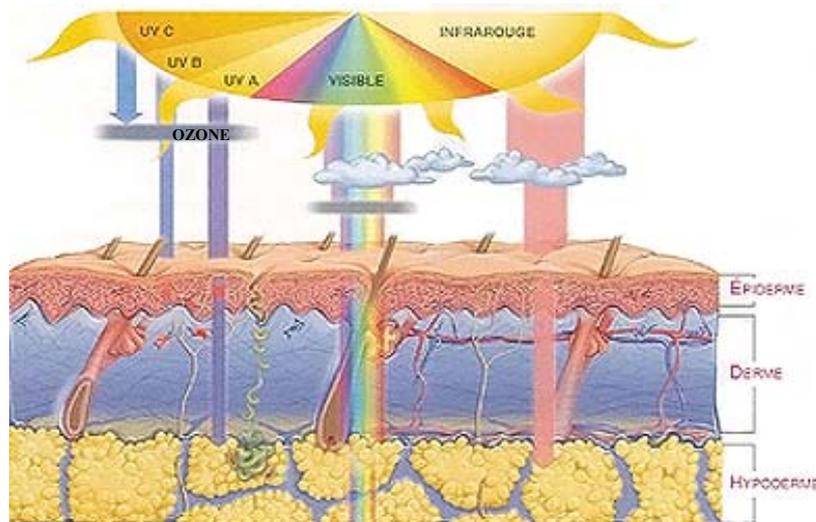


Figure 4 : Pénétration du spectre solaire sur la peau. Les UVB sont bien atténués par les couches les plus superficielles de l'épiderme, mais atteignent néanmoins la couche basale.
Source : www.skin-science.com

Les rayonnements UV possèdent de courtes longueurs d'ondes (100 à 380 nm) et sont les rayonnements non-ionisants les plus énergétiques. On peut distinguer trois catégories d'UV :

Les UVC de 100 à 280 nm, qui sont arrêtés par la couche d'ozone,

Les UVB de 280 à 315 nm, qui sont, en partie seulement, arrêtés par la couche d'ozone, les nuages et l'air,

Les UVA de 315 à 380 nm qui ne sont pas du tout filtrés.

Les rayonnements UV incidents sur la peau sont réfléchis, diffractés et absorbés. En ce qui concerne l'absorption (Figure 4), elle se fait à tous les niveaux de la peau et est fonction de la longueur d'onde. Ainsi, les UVB sont quasiment tous absorbés pas la couche cornée et seuls 10 % atteignent la couche basale de l'épiderme, tandis que les UVA pénètrent plus en profondeur : 50% sont absorbés par l'épiderme et 50 % par le derme.

Enfin, les IR parviennent jusqu'à l'hypoderme et sont responsables de la sensation de chaleur.

Peau et Stress Cellulaire

Les UV ont des effets biologiques bien caractérisés aujourd'hui. L'exposition aux UV présente des effets bénéfiques ou délétères en fonction de la dose.

Parmi les effets bénéfiques, on peut citer la synthèse de la vitamine D dans les kératinocytes (Holick 1981) par action sur la différenciation de ces cellules (Chen et al. 1995), nécessaire à la prévention du rachitisme. On peut également citer l'utilisation, en thérapeutique, des UVB ou UVA en traitement du psoriasis, de l'eczéma (Krutmann 2000). Enfin, du point de vue psychologique, la lumière du soleil est bénéfique contre le désordre affectif saisonnier (Miller 2005).

Les effets délétères les plus marqués sont observés chez les individus caucasiens à la peau blanche qui bronzent peu et dont la peau brûle facilement et fréquemment (brûlures différentes de celles pouvant être causées par un échauffement thermique ou encore par un agent chimique tel que la soude). Les premiers effets sont l'échauffement, l'érythème et l'inconfort qui en résulte. Ensuite, suivant l'intensité de la dose, cela peut progresser vers la formation de cloques et la desquamation et, dans les cas sévères, des effets systémiques dus à la sécrétion par les kératinocytes épidermiques d'interleukine 1beta et d'autres cytokines impliquées dans la réaction inflammatoire (Schwarz and Luger 1989; Luger et al. 1996; Grandjean-Laquerriere et al. 2003). L'exposition chronique et excessive aux radiations UV conduit au photo-vieillessement (photoageing) caractérisé par une certaine sécheresse de la peau, ainsi que par un épiderme plus mince, ridé, avec des variations de pigmentation (taches ; zones de dépigmentation). Enfin, la répétition de ces expositions est en relation avec des conditions cutanées pré-malignes, comme les kératoses actiniques (lésions érythémateuses, état précancéreux) qui peuvent progresser en forme invasive de carcinome cellulaire squameux (Ortonne 2002). La principale cause des cancers induits par les rayonnements UV est la formation de lésions au niveau des acides nucléiques constituant de l'ADN et des ARNm des cellules touchées. Ces lésions peuvent être des cassures nettes simples brins de l'ADN, de telles lésions ont été mises en évidence autant dans des kératinocytes que des fibroblastes (Schmidt-Rose et al, 1999 ; Morley et al, 2003). Mais la plupart du temps, ces lésions sont caractérisées, par des dimères de pyrimidine (Schothorst et al. 1991), de dipyrimidine cyclobutane (Bykov et al. 1998) ou autres dimères de thymines (Noz et al. 1994; Young et al. 1998) touchant des gènes essentiels à la cellule comme p53 (impliqué dans l'apoptose cellulaire) (Drouin and Therrien 1997). Des défauts de réparation ou bien une trop grande quantité de ces lésions transforment les cellules, qui finissent par proliférer de façon anarchique, une caractéristique du processus de cancérisation.

En dehors de ces phénomènes malins (défauts de réparation de l'ADN, cancérisation...) dus à une exposition excessive en général, les UV induisent, au niveau moléculaire, la production de protéines de choc thermique (Edwards et al. 1991; Maytin 1992; Trautinger et al. 1995;

Merwald et al. 2006), telle Hsp70 qui intervient dans la protection cellulaire. D'autres réponses telle la sécrétion de cytokines spécifiques de l'inflammation (Nishigori et al. 1996; Avalos-Diaz et al. 1999) peut entraîner des réactions de photosensibilisation ou de phototoxicité en présence d'un agent chimique, voire évoluer vers la mort cellulaire par apoptose. Les kératinocytes en apoptose sont appelés "sunburn cells" (SC) (Sheehan and Young 2002) et ont été décrits *in vivo* chez l'Homme, le rat et la souris mais également *in vitro* en culture cellulaire. La principale conséquence d'une exposition excessive aux stress ultraviolet au niveau dermique est le vieillissement des fibroblastes, entraînant un affaiblissement du métabolisme cellulaire, de la prolifération cellulaire et donc une perte en élasticité et en résistance dermique (Robert et al, 1988).

Comme nous le montrerons plus loin, ces derniers phénomènes sont considérés comme des réactions de défense à l'agression. C'est donc sur ces mécanismes de protection cellulaire, mis en place lors de stress UV, que nous allons porter notre intérêt. En effet, les radiofréquences utilisées dans les technologies de communication sans fil sont soupçonnées d'être des agents d'agression dans l'environnement et, comme nous l'avons évoqué, la peau est le premier organe à absorber ces ondes.

- *Partie 2 : Neurobiologie du Système Nerveux Central*

Le système nerveux est composé du système nerveux périphérique et du système nerveux central. L'utilisation du téléphone portable expose partiellement la tête et les tissus cérébraux. Il nous a donc paru important de présenter le système nerveux central et, plus précisément, sa structure cellulaire.

Lors du développement cérébral, les cellules précurseurs GRP (glial restricted precursor) donnent naissance aux oligodendrocytes et aux deux types astrocytaires I et II. A ces types cellulaires représentant la macroglie cérébrale, s'ajoute la microglie, une structure cérébrale au rôle majoritairement immunitaire (Figure 5).

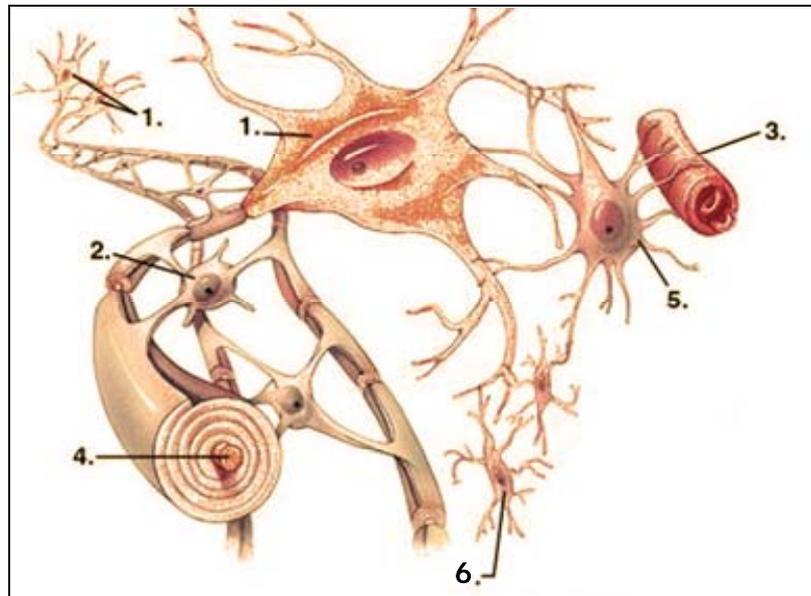


Figure 5 : composition cellulaire du système nerveux central. 1 : neurone, 2 : oligodendrocyte, 3 : vaisseau sanguin, 4 : neurite, 5 : astrocyte, 6 : microglie. Source : www.mhhe.com

Structure

La macroglie

Les oligodendrocytes au niveau central

Tout comme les cellules de Schwann au niveau périphérique, les oligodendrocytes produisent de la myéline (70% de lipides et 30% de protéines) et s'entourent autour des axones (jusqu'à

50 axones) pour augmenter le transfert d'information (Figure 6).

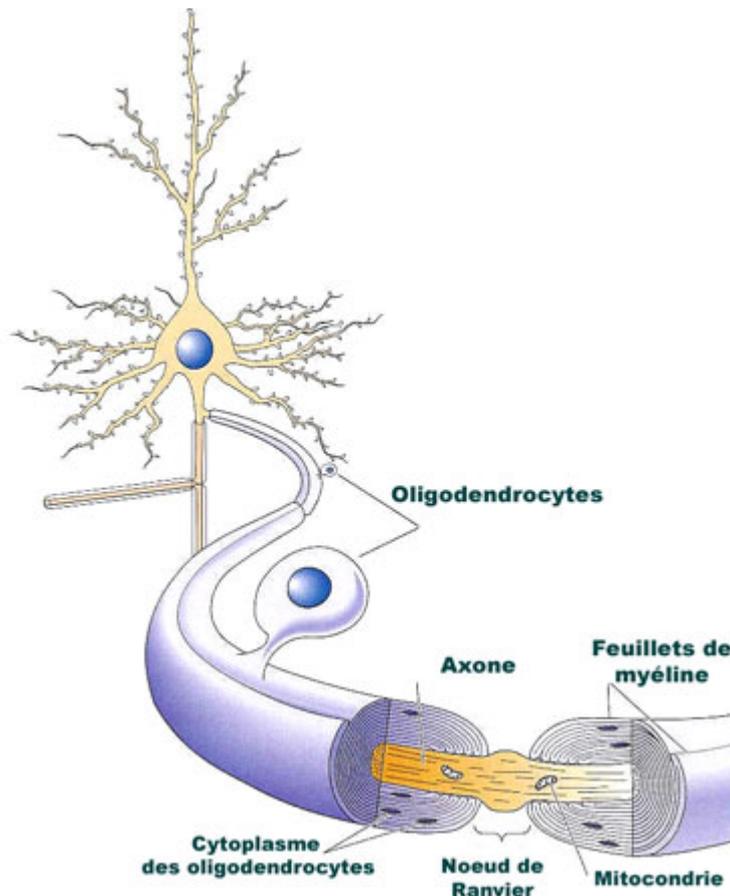


Figure 6 : Localisation et structure d'un oligodendrocyte. Source : www.futura-sciences.com

La multiplication de ces cellules dépend de signaux envoyés par le neurone et réceptionnés par le biais de canaux sodium voltage dépendants au sein même des oligodendrocytes. Si ces signaux sont absents, les oligodendrocytes dégèrent puis meurent par apoptose.

Les astrocytes.

Au niveau du système nerveux central, les cellules de la névroglie sont deux fois plus nombreuses que les neurones et sont majoritairement astrocytaires. Les astrocytes sont de petites cellules étoilées (Figure 7) dont les prolongements cellulaires s'étendent de façon radiée et présentent 3 principales caractéristiques. Ce sont :

- (i) la présence de filaments intermédiaires particuliers, les gliofilaments, groupés en faisceaux et composés d'une protéine spécifique : la protéine acide gliofibrillaire ou GFAP pour "glial fibrillary acidic protein" (Baba et al. 1997).
- (ii) la présence de grains de glycogène qui sont disséminés dans le corps cellulaire et les prolongements astrocytaires. Les grains de glycogène sont particulièrement abondants au

niveau des extrémités distales des prolongements ou pieds astrocytaires pour nourrir les neurones environnants (Cambray-Deakin et al. 1988).

(iii) la présence de jonctions inter-astrocytaires de type "gap" qui permettent la signalisation intercellulaire via des canaux jonctionnels constitués de molécules de connexine (Nagy et al. 1997). Ces jonctions sont le support anatomique des réseaux astrocytaires.

Il existe deux types de classification, morphologique et fonctionnelle, des astrocytes.

Sur le plan morphologique, on distingue les astrocytes **fibrillaires** (ou fibreux) présentant de longs prolongements radiaires, riches en gliofilaments et localisés préférentiellement au niveau de la substance blanche¹, des astrocytes **protoplasmiques** présentant des prolongements courts, contenant peu de gliofilaments et localisés préférentiellement au niveau de la substance grise².

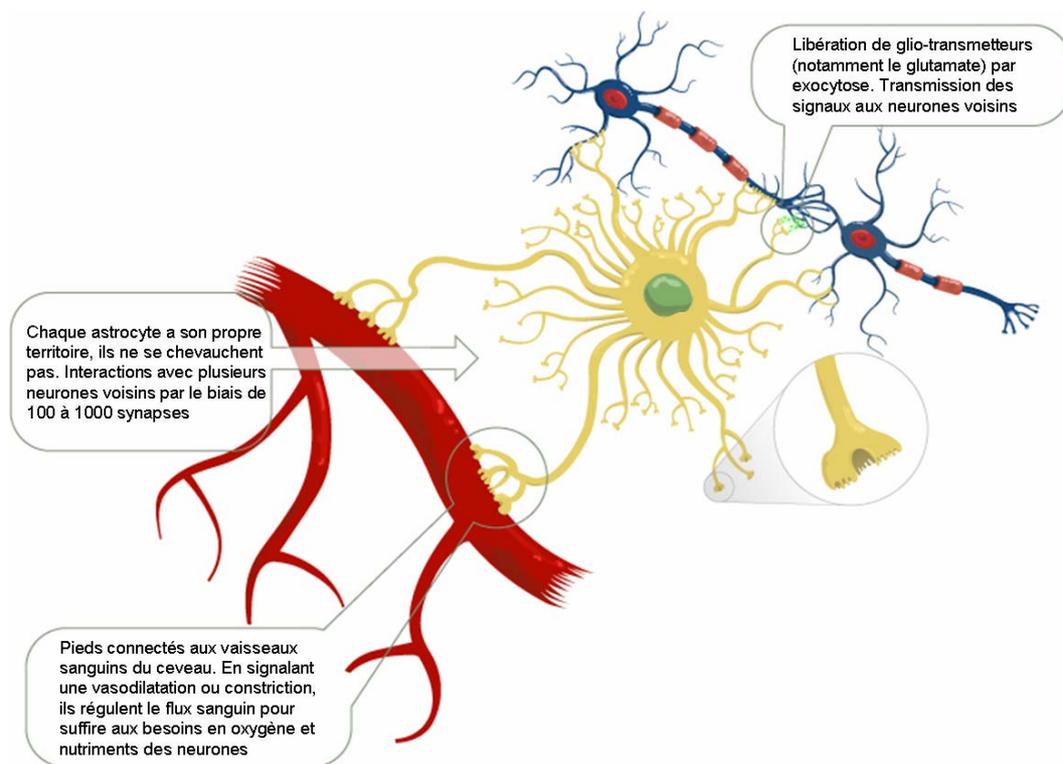


Figure 7 : Les différentes fonctions astrocytaires. Source : <http://learn.genetics.utah.edu>

Sur le plan fonctionnel, on distingue les astrocytes de type 1 et 2, et il faut noter que cette

¹ la substance blanche correspond aux zones riches en myéline et donc en axones myélinisés

² la substance grise correspond aux zones riches en corps cellulaires neuronaux ; à ne pas confondre avec les noyaux gris centraux.

classification ne recoupe pas la classification morphologique (Figure 7).

Les astrocytes **de type 1** jouent un rôle de barrière et leurs pieds établissent des contacts soit avec la paroi des capillaires cérébraux au niveau de la barrière hémato-encéphalique, soit avec les méninges au niveau de la barrière gliale localisée à la surface externe du cerveau et de la moelle épinière (glia limitans).

Les astrocytes **de type 2** jouent un rôle de soutien métabolique et trophique vis-à-vis des neurones et des oligodendrocytes. Leurs pieds astrocytaires établissent des contacts avec la synapse, l'axone, ou le corps cellulaire neuronal.

La microglie.

Les cellules microgliales représentent environ 5% de l'ensemble des cellules du système nerveux central. À la différence des autres cellules nerveuses qui dérivent du neur ectoderme, les cellules microgliales dérivent du mésoderme et par conséquent, appartiennent au système immunitaire. La microglie constitue la population de macrophages tissulaires spécifiques du système nerveux central. La morphologie des cellules microgliales varie en fonction de leur état d'activation (Figure 8) (Kreutzberg, 1996). Au cours du développement cérébral, la microglie est activée et présente une morphologie améboïde (ou amiboïde) car elle est globalement ovale avec de très courts prolongements cytoplasmiques. Elle participe alors essentiellement à l'élimination des débris cellulaires mais également à l'élimination ciblée de populations neuronales.

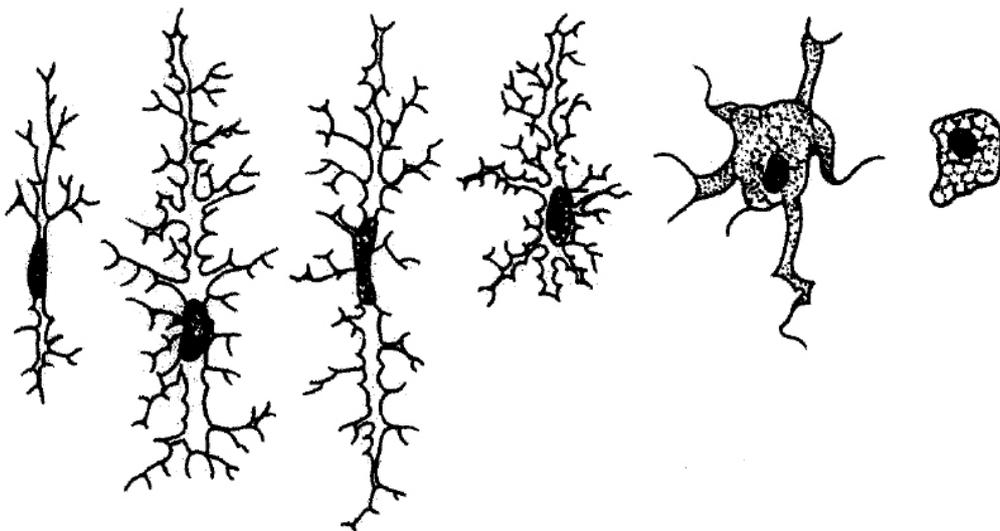


Figure 8 : Evolution morphologique au cours de l'activation des cellules microgliales du cerveau. De gauche à droite, transformation de la microglie quiescente en microglie activée dont le stade final est similaire aux cellules phagocytaires. D'après Kreutzberg (Kreutzberg, 1996).

Ultérieurement, au cours de la maturation du système nerveux central, la microglie activée se différencie en microglie quiescente (microglie au repos). Elle adopte progressivement une morphologie ramifiée avec un corps cellulaire qui devient petit et ovoïde (Leong and Ling 1992; Cuadros et al. 1997). Des données montrent que les ramifications de la microglie quiescente sont en mouvement constant, alors que le corps cellulaire reste fixe. Ces mouvements permettraient une immunosurveillance de l'ensemble du périmètre couvert par les ramifications microgliales (Kreutzberg 1996). En situation inflammatoire, on observe une activation des cellules microgliales caractérisée au plan morphologique par une rétraction des ramifications et une hypertrophie du corps cellulaire. L'activation microgliale est progressive en termes de prolifération, de migration au site d'inflammation, de caractéristiques morphologiques, et de changements fonctionnels et immunophénotypiques. L'activation est un phénomène réversible.

Principales fonctions

Les principales fonctions des cellules nerveuses sont donc :

- (i) des fonctions de barrière par les astrocytes de type 1 (BHE) et de type 2 (glia limitans), des fonctions métaboliques avec les astrocytes de type 2 dont la principale fonction est de moduler l'activité synaptique. Ainsi ils participent à la concentration de certains neurotransmetteurs comme la noradrénaline, ou encore le VIP pour "vasoactive intestinal peptide" par le processus de captation (Magistretti et al. 1993; Magistretti and Pellerin 1996). Ils ont également un rôle important dans le métabolisme énergétique cérébral par la captation de glucose et le processus de glycolyse (relargage de lactate essentiel aux neurones). De plus cette machinerie énergétique astrocytaire dépend d'une régulation ionique maintenue par la présence de pompes et transport ioniques sodium et potassium (Magistretti 2006).

- (ii) des fonctions d'homéostasie de par les fonctions de phagocytose des cellules microgliales (Marin-Teva et al, 2004) et enfin des fonctions immunologiques médiées par ces mêmes cellules microgliales en situation pathologique (Benveniste 1992; Aloisi 2001).

Le système nerveux central et le stress cellulaire

Parmi les stress les plus rencontrés au sein du système nerveux central, l'ischémie cérébrale est un des plus fréquents et représente un risque majeur pour les fonctions cérébrales puisque la première conséquence est l'hypoxie cérébrale entraînant donc de fortes séquelles. L'ischémie cérébrale transitoire ou ICT est une diminution momentanée du flux sanguin vers le cerveau. On la qualifie souvent de mini-accident vasculaire cérébral. Une ICT est un avertissement sérieux d'un risque accru d'accident vasculaire cérébral (AVC), sa survenue étant accompagnée d'un fort risque de récurrence.

Au niveau moléculaire, l'ischémie cérébrale induit une cascade complexe d'événements métaboliques dont l'induction de lésions protéiques impliquant la sur-expression de protéines de stress chaperones. L'activité chaperone de ces protéines de stress ou de choc thermique (Heat Shock Protein, HSP) consiste en la protection de la malformation et de l'aggrégation des protéines fraîchement produites. L'ischémie cérébrale induit notamment l'expression ou la sur-expression des formes induites et constitutives de Hsp70 (Kawagoe et al. 1992). L'expression de gènes codant pour les HSPs a été mise en évidence dans plusieurs populations cellulaires incluant les neurones, les cellules gliales et les cellules endothéliales (Kelly et al, 2002). Plusieurs études *in vitro* ont montré que la sur-production d'HSPs protégeait les cellules du SNC, de la nécrose et de l'apoptose. Ainsi, la transfection d'astrocytes avec le gène Hsp70 les protège de l'ischémie et de la privation en glucose (Fink et al, 1997). De plus, Hsp70 semble inhiber l'activation de la voie des caspases par les céramides, de même que la voie des MAP kinases (Mosser et al, 1997). De même, Hsp70 en se liant à BAG-1, facteur de transcription du gène bcl-2, régule sa fonction et par ce biais régule la mort cellulaire par apoptose (McLaughlin et al, 2003). D'autres protéines de choc thermique sont exprimées dans le cerveau en réponse à l'ischémie. C'est le cas de l'ubiquitine, une petite Hsp, impliquée dans le transport des protéines endommagées vers le protéasome (Valentim et al, 2001). Classée dans la même famille, Hsp27 a été mise en évidence dans les astrocytes lors de stress ischémique (Turner et al, 1999), avec une action principalement de chaperone pour les protéines du cytosquelette (i.e. actine). La présence des protéines Hsp47, Hsp60, Hsp10 et Hsp32 (appelée également hème-oxygénase, HO) consécutivement au stress a également été mise en évidence et impliquée dans la protection cérébrale. On notera par exemple dans le cerveau atteint de la maladie d'Alzheimer, une augmentation d'HO-1 colocalisée avec les plaques séniles (Schipper, 2000).

L'ICT génère aussi des radicaux libres oxygène et nitrogène (pour revue, Love 1999) dont le monoxyde d'azote (NO) et certains superoxydes. Ce stress radicalaire est en partie responsable de la modification structurale des macromolécules telles que des cassures de l'ADN pouvant engendrer l'apoptose voire la nécrose cellulaire. Des cassures double et simples brins apparaissent dans l'heure consécutive à la reperfusion après une ischémie transitoire (Szabo et al, 1996).

Le mode de mort cellulaire dépend de la gravité des lésions et par conséquent précise la l'importance de l'ischémie. Des études récentes ont souligné le rôle du peroxyde d'azote dans les lésions simples brins de l'ADN activant la réparation de l'ADN par la polymérase PARP (poly(ADP-ribose) polymerase) (Narasimhan et al. 2003; Kaundal et al. 2006). Cette activité enzymatique est très consommatrice en NAD⁺. Par conséquent, la sur-activité de cette polymérase induite lors de l'ischémie entraîne une diminution considérable du stock en NAD⁺ contribuant à l'importance des lésions cérébrales (Narasimhan et al. 2003). De telles lésions induites par ce stress oxydatif consécutif à l'ischémie sont difficilement réparables. De nombreuses stratégies thérapeutiques sont utilisées pour prévenir ces lésions oxydatives, mais la plupart sont inefficaces et suivies de nombreux effets secondaires inacceptables. Parmi les thérapies de prévention, on notera l'utilisation de thrombolytiques (activateur tissulaire du plasminogène (tPA), la streptokinase (SK) ou encore l'urokinase) dont le principal effet secondaire est le risque d'hémorragie intracérébrale (Albers et al 2004).

- *Partie 3 : Le Stress Cellulaire et les HSPs*

L'organisme est constamment confronté aux stress qu'ils proviennent de l'environnement (i.e. variation de température) ou de conditions pathologiques (i.e. virus). La réponse cellulaire au stress est caractérisée par de nombreux processus relativement communs à tous les types cellulaires. La variation de protéines de choc thermique, l'induction de cassures à l'ADN et l'induction de mort cellulaire sont, parmi ces processus, ceux que nous avons choisi d'étudier dans la peau et le cerveau, sur la base de leurs réponses au stress.

Les protéines de choc thermique ou HSPs

L'induction de protéines en réponse à un stress cellulaire implique différentes protéines. Des cellules endothéliales du cerveau en hypoxie vont par exemple synthétiser des enzymes glycolytiques, de la calreticuline ou encore de la vimentine (Haseloff et al. 2006). Cependant, les protéines plus communément impliquées dans la réponse de stress sont les HSPs. Nous proposons donc de présenter plus en détail ces protéines ubiquitaires et plus particulièrement les HSPs exprimées dans la peau et le cerveau.

L'induction de protéines de choc thermique a été décrite pour la première fois en 1962 chez la drosophile (Ritossa 1996). Ces protéines sont synthétisées en réponse non seulement aux différents stress, mais aussi à des stimuli physiologiques ou physiopathologiques.

Ainsi, leur synthèse peut augmenter dans les cellules en culture par exposition aux analogues d'acides aminés (Kelley and Schlesinger 1978; Li and Laszlo 1985), à certains chimiques (Lee and Dewey 1987; Hatayama et al. 1991; Van Rijn et al. 2000), aux métaux lourds (Levinson et al. 1980; Wagner et al. 1999; Papaconstantinou et al. 2003) et aux agents qui augmentent le taux de calcium (Ding et al. 1996; Kiang et al. 2002). Leur synthèse augmente aussi en cas d'ischémie comme nous l'avons évoqué plus haut (Kawagoe et al. 1992; Van Why et al. 1992; Bardella and Comolli 1994).

Il existe cinq familles conservées de HSP classées selon leur poids moléculaire : les HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 et les petites HSP ou sHSP (pour small Heat Shock Protein) (de 12 à 43 kDa) (Ciocca et al. 1993; Csermely et al. 1998; Kiang and Tsokos 1998; Feder and Hofmann 1999; Jolly and Morimoto 2000 ; Ganea 2001), chaque classe étant elle-même

composée de plusieurs protéines de poids moléculaires différents. Les HSP sont le plus souvent localisées de façon constitutive ou induite dans le cytoplasme et le noyau de la cellule (Tableau 1).

Tableau 1 : Nomenclature, localisation et fonctions des différentes familles de HSP, d'après Jolly et Morimoto (Jolly and Morimoto 2000)

Famille	Organisme	Chaperones	Localisation	Fonctions
HSP100	<i>E. coli</i> <i>S. cerevisiae</i>	ClpA, B, C Hsp104	cytosol	Tolérance
HSP90	<i>E. coli</i> <i>S. cerevisiae</i> Mammals	HtpG Hsp83 Hsp90	cytosol	transduction du signal, cycle cellulaire et prolifération, remodelage protéique
		Grp94	RE	
HSP70	<i>E. coli</i> <i>S. cerevisiae</i>	DnaK Ssa 1- 4 Ssb 1,2 Kat2 Ssc1	Cytosol	Réplication phagique, autorégulation de la réponse HSP, remodelage protéique, transduction du signal, anti-apoptotique, CPA, cycle cellulaire et prolifération
			RE	
			Mitochondrie	
	Mammals	Hsc70 Hsp70	cytosol/ noyau	
Bip		RE		
		mHsp70	Mitochondrie	
HSP60	<i>E. coli</i>	groEL	cytosol	Remodelage protéique, cofacteurs du système protéolytique
	<i>S. cerevisiae</i>	Hsp60	Mitochondrie	
	Plants	Cpn60	chloroplastes	
	Mammals	Hsp60	Mitochondrie	
HSP40	<i>E. coli</i>	dnaJ	Cytosol	Activité co-chaperone avec Hsp70
	<i>S. cerevisiae</i>	Ydj1	cytosol/ noyau	
	Mammals	Hdj1 and Hdj2		
Small HSPs	<i>E. coli</i>	Ibp A and B	Cytosol	tolerance par stabilisation des microfilaments, anti- apoptotique, réprime l'aggrégation protéique
	<i>S. cerevisiae</i>	Hsp27		
	Mammals	alpha-a et alpha- b crystalline Hsp27		

E. coli = *Escherichia coli*, *S. cerevisiae* = *Saccharomyces cerevisiae*, et RE = réticulum endoplasmique

Deux familles de protéines de choc thermique, sHSP, et plus particulièrement Hsp27, et HSP70, sont présentées ci-dessous, avec une description synthétique de leur structure, leurs localisations, leurs fonctions physiologiques et leurs rôles dans la lutte contre le stress.

HSP de petite taille moléculaire 12-43 kDa

Structure

Les sHSP sont abondantes et ubiquitaires par nature et leur taille varie de 12 à 43 kDa. Les sHSP ont en commun une séquence de 100 résidus, homologue à la sHSP alpha-crystalline³ (de Jong et al. 1998) et appelée, par analogie, domaine alpha-crystalline ou domaine sHSP. Les sHSP peuvent former de larges complexes multimériques de 200 à 800 kDa (Arrigo and Welch 1987; Borrelli et al. 2002) qui sont combinées à l'alpha-b-crystalline (Zantema et al. 1992), leur conférant ainsi un large panel de fonctions cellulaires. Parmi ces fonctions, les plus remarquables (ou spécifiques) sont la dotation de thermo-tolérance aux cellules *in vivo* et *in vitro* (Lavoie et al. 1993b; Schirmer et al. 1994; van den et al. 1994; Carper et al. 1997; Doerwald et al. 2003; Doerwald et al. 2006), et la capacité à agir en tant que chaperones. Cette fonction de chaperone implique la formation de complexes stables avec des intermédiaires de substrats protéiques (Lindner et al. 1998; Lindner et al. 2000; Friedrich et al. 2004).

Localisation

Chez la drosophile, Hsp27 a été localisée dans le tube neural des embryons en fin de développement. Elle se trouve au niveau neuronal probablement en association avec des cellules aussi bien en mitose qu'en voie de différenciation (Arrigo et al. 1988). Les protéines associées Hsp26 et Hsp23 ont une localisation voisine, bien que Hsp26 soit surtout exprimée dans les gonades.

Au niveau tissulaire chez l'Homme, Hsp27 est exprimée dans les organes génitaux. Chez la femme, l'expression est élevée dans l'endomètre utérin, le vagin et le cervix, et plus faible dans le placenta (Ciocca et al. 1993; Tabibzadeh et al. 1996). Elle est également exprimée dans la peau où elle semble jouer un rôle important dans le développement cutané (Trautinger et al. 1995; Jantschitsch et al. 1998; Jonak et al. 2005; Monastirli et al. 2005). Hsp27 s'exprime aussi, mais plus faiblement, dans l'intestin, le coeur, le rein, les cellules sanguines et le muscle strié (Ciocca et al. 1993; Ciocca and Calderwood 2005).

³ L'alpha-crystalline empêche la formation, dans le cristallin, d'agrégats protéiques de grande taille qui conduirait à une dispersion de la lumière et à diminuer la transparence du cristallin (Xia et al. 2006).

Dans le tissu nerveux, en l'absence de stress, Hsp27 s'accumule dans les neurones spinaux et les cellules de Purkinje du cervelet (Gernold et al. 1993; Klemenz et al. 1993). Son expression cellulaire est localisée dans la région périnucléaire proche du complexe de Golgi, tandis qu'après choc thermique, elle est localisée dans le noyau (Arrigo et al. 1988; de Jong et al. 1998). Dans les cellules de drosophile ou les levures ayant subi un choc thermique, les protéines de stress sHSP sont localisées dans le noyau et autour de celui-ci (Arrigo and Ahmad-Zadeh 1981; Leicht et al. 1986), mais de façon variable selon l'état métabolique des cellules (Rossi and Lindquist 1989) et leur thermorésistance (Arrigo et al. 1988).

Modulation de l'expression

Chez les eucaryotes, les gènes codant pour des protéines de choc thermique sont sous le contrôle des « Heat Shock transcription Factors » (HSF) (Pirkkala et al. 2001) et des heat shock elements (HSE). Ces deux éléments, HSF et HSE ont une structure conservée depuis la levure jusqu'à l'Homme (Wu 1995; Morano and Thiele 1999; Pirkkala et al. 2001). Pour HSF et concernant les HSP de faible poids moléculaire, ces gènes comportent un motif ADN de régulation, nommé 'Heat Shock Element (HSE)', constitué de motifs répétés GAAn (Nover and Hightower 1991; Wu 1995; Liu et al. 1997). Les HSF sont au nombre de trois chez les mammifères, mais seule l'isoforme HSF1 et son homologue chez la drosophile HSF sont connues pour répondre au stress par l'activation de la transcription des gènes Hsp (Goodson and Sarge 1995; Mercier et al. 1999; Pirkkala et al. 2001). Quant aux autres HSF, leur rôle n'est pas clair, il semblerait que HSF2 serait impliquée dans la transcription des Hsp constitutives (Sistonen et al. 1994) et lors du développement embryonnaire chez la souris (Rallu et al. 1997).

L'HSF sous forme de trimère se lie au HSE (Fernandes et al, 1994). Ce passage de l'état de monomère à celui de trimère accroît l'affinité de liaison à l'ADN (Orosz et al. 1996). L'activité transcriptionnelle des HSF est également liée à la phosphorylation (Sorger and Pelham 1987; Hashikawa and Sakurai 2004). Il faut noter ici que la localisation de HSF est nucléaire et cytoplasmique pour HSF1 (Sarge et al. 1993; Orosz et al. 1996) et, pour HSF2, cytoplasmique dans les cellules non stressées et nucléaire après activation (Wu 1995). Enfin, la régulation des HSF est sous la dépendance de signaux physiques et environnementaux et leur activité dépend de l'origine du tissu (Pirkkala et al. 2001). Par exemple, dans les

testicules ou dans les lymphocytes T de souris, la température requise pour activer HSF1 est inférieure à celle observée dans les autres tissus (Sarge 1995).

Il existe deux facteurs de liaison du HSE qui interviennent dans la régulation de l'activité des gènes codant pour les HSP, mais la phosphorylation semble être un des plus importants facteurs de régulation (Wu 1995). Les protéines HSP peuvent en effet être phosphorylées en réponse à des stimuli variés. Quatre isoformes de Hsp27 existent dont 3 peuvent être phosphorylées sur 1, 2, ou 3 sites (Landry et al. 1992). De nombreux agents peuvent provoquer cette phosphorylation, comme le choc thermique (Landry et al. 1992), l'arsénite de sodium ou encore l'eau oxygénée (Huot et al. 1996; Fauconneau et al. 2002). De nombreux facteurs physiologiques, plus spécialement ceux impliqués dans la prolifération cellulaire, peuvent également phosphoryler Hsp27. On peut ainsi citer la stimulation mitogénique (Zhou et al. 1993), le facteur de croissance des fibroblastes (FGF : fibroblast growth factor), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF : platelet derived growth factor) et la famille des 'Mitogen Activated Protein' (MAP)-kinases (Guay et al. 1997; Landry and Huot 1999). Il en est de même pour certains médiateurs de l'inflammation, tels que le facteur nécrosant tumoral (TNF : tumor necrosis factor) et l'interleukine 1 (Arrigo 1990; Saklatvala et al. 1991).

Rôle biologique face au stress

L'implication de Hsp27 dans la réponse au stress thermique est liée à son activité chaperone (Ellis 1990; Kregel 2002). L'activité chaperone consiste en une protection des protéines cellulaires par leur association, avec certaines HSP dont Hsp27 et un cortège de protéines partenaires, en particules spécifiques. Les particules protéosomales telle l'ubiquitine, impliquées dans la dégradation protéosomale en sont un exemple (Arrigo et al. 1988; Parcellier et al. 2003; Parcellier et al. 2006). Hsp27 et ses protéines associées empêchent l'agrégation des protéines ainsi protégées et facilitent leur restructuration fonctionnelle (van den et al. 1999; Clark and Muchowski 2000). Un choc thermique induira la dissociation des complexes Hsp / alpha-cristalline (Zantema et al. 1992), pour permettre l'action protectrice des deux types moléculaires.

Hsp27 fait partie intégrante des mécanismes de tolérance face à un choc thermique (Lavoie et al. 1993b). Ainsi, il a été montré qu'une sur-expression d'Hsp 27 protégeait les cellules cardiaques de rat *in vitro* et *in vivo* de l'apoptose couramment induite par un choc

thermique ou hypoxique (Brar et al. 1999; Wagstaff et al. 1999). La thermoprotection conférée par Hsp27 serait due à une stabilisation du réseau de microfilaments. La première démonstration du rôle de Hsp27 dans la transduction du signal aux microfilaments a été effectuée par la mise en évidence d'un facteur d'inhibition de la polymérisation de l'actine (Miron et al. 1991). Puis son implication au sein du cytosquelette, essentiellement dans les neurones, a été largement démontrée (Costigan et al. 1998; Williams et al. 2006). Ce rôle dans l'organisation des filaments est cependant dépendant de l'état de phosphorylation d'Hsp27, puisqu'il a été montré que le "pool" de filaments F-actine variait en fonction de la quantité et de la phosphorylation des Hsp27 présentes (Lavoie et al. 1993a). Les HSP peuvent aussi combiner une action antiprotéasique (Ortwerth and Olesen 1992; Voorter et al. 1994) à leur activité chaperone.

L'implication d'hsp27 dans la chimiorésistance a été suggérée par l'association de la présence d'Hsp27 dans des cellules en culture et de leur résistance à certains médicaments anticancéreux comme l'etoposide, le cycloheximide (Gibbons et al. 2000). Dans le cas du cisplatine cependant, l'acquisition de la résistance à ce médicament est associée à une diminution de l'expression de la protéine, tandis que le traitement continu par ce médicament augmente l'expression de Hsp 27 et son degré de phosphorylation (Hettinga et al. 1996).

Le niveau d'expression de Hsp 27 a été associé à plusieurs formes de cancers. Ainsi dans le cas du cancer du sein, les données sur la relation entre l'expression d'Hsp27 et le stade cancéreux sont contradictoires. Storm et al. (1996) indiquent que la sur-expression d'Hsp27 semble être corrélée avec des stades avancés, alors qu'il existerait une expression d'Hsp27 inverse à la prolifération tumorale d'après Ciocca et al. (1990) et Vargas-Roig et al. (1997). En revanche, il ne semble pas y avoir de colocalisation d'Hsp 27 avec les récepteurs à l'oestrogène (Ciocca et al. 1998).

Hsp27 est également associé à d'autres cancers tels celui de l'utérus et de l'estomac, ainsi que dans certaines leucémies (Ciocca et al. 1993). Le niveau d'expression de Hsp27 est ainsi positivement corrélé aux taux des hormones oestrogènes et de la progestérone dans les cancers de l'utérus, du cervix (Devaja et al. 1997) et de l'estomac.

Dans les leucémies lymphoblastiques aiguës, la présence de plusieurs isoformes de HSP 27 peut permettre d'envisager une utilisation thérapeutique par leur blocage sélectif (Strahler et al. 1991).

HSP 70 et protéines associées

Structure

Les protéines de choc thermique les plus étudiées sont HSC70 et HSP70, de poids moléculaire respectif 73 kDa et 72 kDa. La structure des protéines HSP 70 chez les eucaryotes est très voisine de celle de son équivalent procaryote (appelé DnaK) (Kelley 1999). Les deux types (HSP et DnaK) ont un domaine ATPase amino-terminal de 44-45 kDa qui a pour fonction d'activer la protéine Hsp (Sadis and Hightower 1992), un domaine de liaison au substrat de 15-18 kDa (Wang et al. 1993; Fouchaq et al. 1999; Hennessy et al. 2005) et un domaine carboxy-terminal d'environ 10 kDa dont la fonction n'est pas claire, mais semblerait stimuler la collaboration avec la co-chaperone Tim44 dans le cas de la Hsp70 mitochondriale (Krimmer et al. 2000).

Localisations

Hsp70 s'exprime à un faible niveau dans les cellules non stressées et dans de nombreux tissus dont la peau (Maytin 1995; Trautinger 2001) et le cerveau. Hsc70 et Hsp70 sont présentes au sein du système nerveux central où leur expression varie selon le stade de développement de l'organisme (D'Souza and Brown 1998; Loones et al. 2000). Cette famille est principalement localisée dans le cytoplasme. Un aspect important de cette localisation cellulaire d'Hsp70 et des protéines associées est celui de la translocation à travers la membrane mitochondriale et de la membrane du réticulum endoplasmique, ce qui permet le transport de polypeptides (Pilon and Schekman 1999). Parmi les HSP de ce groupe, la protéine BIP est associée à ce transport à travers le réticulum endoplasmique (Brodsky and Schekman 1993). Le peptide se lie à un complexe protéique accepteur et BIP, sans utilisation d'ATP. Puis, ce complexe se lie à une autre protéine acceptatrice de la membrane avec utilisation de l'ATP. Il y a ensuite libération du polypeptide dans le lumen du réticulum endoplasmique. D'autres liaisons avec des co-chaperones comme Tim44 (Krimmer et al. 2000) dans la mitochondrie, Hsp40 dans le cytoplasme (Yamane et al. 1995; Michels et al. 1997) ou encore avec CHIP (Kampinga et al. 2003; Petrucelli et al. 2004), impliquent que les Hsp70 ne peuvent pas agir seules en tant que chaperones, Enfin, Hsp70 est également

exprimée au niveau membranaire, permettant une participation à la présentation antigénique et donc à la réponse immunitaire (Multhoff 2002; Radons and Multhoff 2005).

Modulation de l'expression

La régulation de la synthèse de Hsp70 et Hsc70 implique des facteurs de transcription dont les facteurs HSF et HSE pour lesquels le rôle a été décrit précédemment dans le chapitre des petites HSP, ainsi que d'autres constituants cellulaires.

On peut cependant ajouter que l'activité des HSF est régulée par les HSP par un mécanisme de "feedback" : par exemple, la synthèse d'HSP 70 dans les cellules humaines en culture amène une diminution de l'activité de liaison à l'ADN du HSF1 humain (Wu 1995). Les HSP 70 ne sont pas seulement régulées par les HSF, il existe un autre élément régulateur le "constitutive heat shock element binding factor" (CHBF) (Liu et al. 1994; Chen et al. 1999) qui se lie au HSE en condition d'homéostasie.

Les MAP (mitogen activated proteins)-kinases sont induites par l'exposition des cellules aux facteurs qui produisent des radicaux libres comme les radiations ionisantes, H₂O₂, les ultraviolets, l'hypoxie et le choc thermique (Hibi et al. 1993). Elles sont également modulatrices de l'expression génique de HSP 70 (Mivechi and Giaccia 1995; Tang et al. 2001; Kim et al. 2005). On notera p38beta MAPK, ERK1 et ERK2 en principaux régulateurs.

Rôles biologiques face au stress

Basée sur leur capacité à se lier à une large gamme de substrats polypeptidiques non natifs, la participation des Hsp 70 au sein de la cellule est diverse, incluant la remise en forme et la translocation membranaire des protéines, la dégradation des protéines irréparables ainsi que d'autres processus régulatoires spécifiques (Craig et al. 1994).

La liaison et le détachement des substrats par les Hsp70 dépendent de la modulation de leur affinité intrinsèque pour les peptides, modulation qui se fait au gré de cycles liaison-hydrolyse de l'ATP régulés par les protéines partenaires de Hsp70.

Hsp70 agit selon deux états d'affinité pour les protéines malformées : la forme liée à l'ATP se fixe et relâche rapidement les peptides, alors que la forme liée à l'ADP se fixe et relâche lentement (Palleros et al. 1994; Schmid et al. 1994).

De par leurs actions dans de nombreuses organites cellulaires (le noyau, le réticulum endoplasmique, la mitochondrie, les chloroplastes), les Hsp70 portent de nombreuses casquettes, dont celle de transporteur de protéines à travers les membranes, plus communément appelée translocation membranaire. Cette action se déroule au niveau des membranes mitochondriales et du réticulum endoplasmique (RE). L'action au niveau de la mitochondrie se fait grâce à la liaison de Hsp70 mitochondriale (mtHsp70) aux intermédiaires de translocation franchissant les membranes mitochondriales. MIM44 est un des composants de la machinerie de translocation mitochondriale qui se lie spécifiquement à mtHsp70 (Kronidou et al. 1994; Rassow et al. 1994; Schneider et al. 1994). Dans le cas du RE, d'autres protéines sont impliquées; chez la levure *S.cerevisiae*, on trouve Sec63 en protéine de translocation se liant à Hsp70 présente dans la lumière du RE (Scidmore et al. 1993).

La présence des Hsp70 et plus précisément de Hsc70 a été détectée dans le noyau après choc thermique. Des complexes avec la topoisomérase 1 ont été détectés, montrant ainsi l'implication des Hsp70 dans la protection nucléaire et dans la protection des protéines induites par le choc et/ou dans leur réparation. Cette forte accumulation en Hsp70 permet donc une protection plus rapide (Ciavarra et al. 1994).

Les agents stressants sont très nombreux, mais tous induisent une batterie de protéines de défense. La forme inductible de Hsp70 est celle qui est la plus fréquemment rencontrée et qui intervient le plus souvent dans les processus de tolérance. La tolérance confère à la cellule une protection contre un second stress. Il a été notamment mis en évidence qu'Hsp70 était impliquée dans la thermo-tolérance (Krebs and Feder 1998; Zeise and Rensing 2002; Cornivelli et al. 2003), la chimiotolérance (Kudo et al. 1999; Moriyama-Gonda et al. 2000), la tolérance à l'ischémie (Chen et al. 1996; Kitagawa et al. 1996) et à l'oxydation (Liu et al. 1998). La protection que confèrent Hsp70 et les autres HSP impliquées dans la protection cellulaire se situe notamment dans le noyau (défense du matériel génétique) et partiellement dans le cytoplasme pour éviter l'aggrégation des protéines (Glover and Lindquist 1998).

Face aux stress viraux et bactériens, les cellules expriment à leur surface des Hsp70 qui induisent une réponse immunitaire par leur expression non usuelle (Multhoff et al. 1998).

De par sa présence dans une grande variété de types cellulaires, la famille Hsp70 représente un marqueur commun et même un bio-marqueur lors d'étude de toxicité. En effet,

Hsp70 est induite lors de nombreuses agressions parmi lesquelles certains traitements pharmaceutiques (Pedrycz and Brzeski 2006) et les polluants (Kilemade and Mothersill 2001; Hallare et al. 2005; Lee et al. 2006). Il a récemment été suggéré qu'Hsp70 serait aussi un biomarqueur de cancérogenèse (Khalil et al. 2006).

Les HSPs dans la peau

Il a été montré que lors de la stratification de l'épiderme, comme dans tout développement normal, des protéines sont exprimées comme des kératines qui induisent la différenciation des kératinocytes (Freedberg et al. 2001) ou bien réprimées. Des études ont permis d'identifier le rôle d'autres protéines dans cette différenciation, parmi lesquelles la protéine de choc thermique Hsp27 (Kindas-Mugge and Trautinger 1994; Trautinger et al. 1995; Jantschitsch et al. 1998) dont la surexpression est caractéristique de la différenciation épidermique. D'autres protéines HSPs interviennent dans le processus de cicatrisation et donc de stratification épidermique, notamment Hsp90 (Laplante et al. 1998). Quant à Hsp72, son implication dans la prolifération cellulaire a été démontrée (Laplante et al. 1998; Edwards et al. 1999), bien que son rôle essentiel, lié à son activité chaperone, soit la réponse au stress par (Zhou et al. 1998; Merwald et al. 2006).

Les HSPs dans le SNC

Au cours du développement cérébral (Figure 9), les HSPs jouent un rôle important (Walsh et al. 1997). En effet, les protéines Hsp90 sont exprimées constitutivement dans le cytosol des cellules nerveuses non stressées, et la protéine Hsc73 est normalement présente à de forts niveaux lors de la fermeture du tube neural et de la différenciation et prolifération du neuroectoderme.

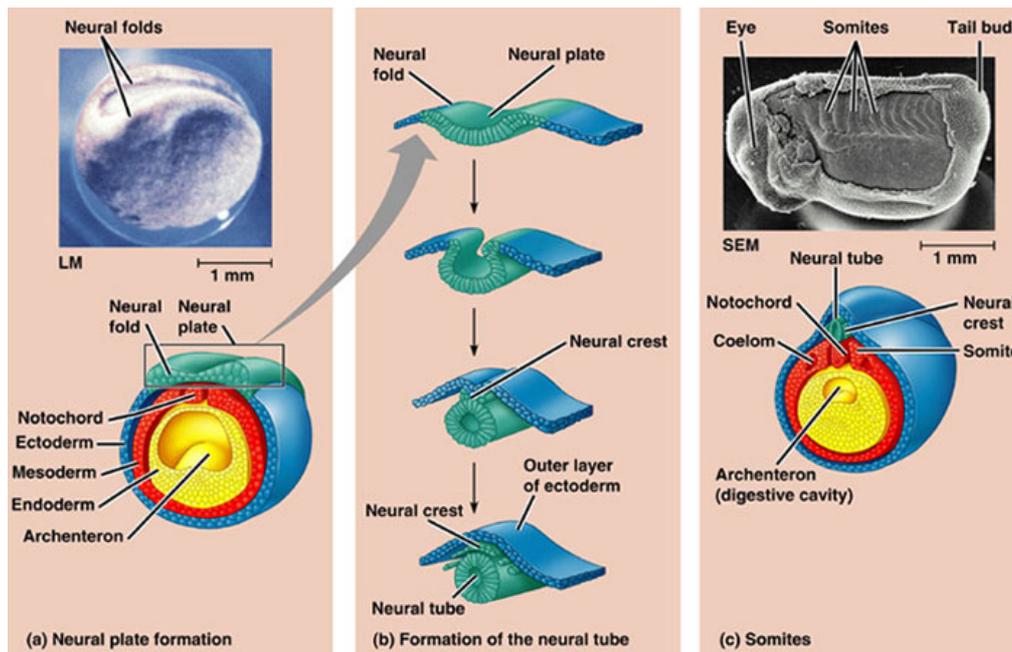


Figure 9 : Rappel sur le développement du système nerveux central, exemple chez la grenouille. Source : <http://fig.cox.miami.edu>

Hsp47 est exprimée dans le réticulum endoplasmique lors de la neurulation des cellules neuroectodermiques et mésodermiques. Pendant l'induction de la plaque neurale, Hsp47 est fortement associée à la synthèse de collagène IV et à la formation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire. Quant à Hsp27 elle est exprimée constitutivement et joue un rôle de chaperone, tout particulièrement au niveau du cytosquelette d'actine des cellules nerveuses.

D'autres travaux ont permis de mettre en évidence que la protéine Hsc73 était indispensable aux oligodendrocytes au cours de leur différenciation pour l'expression optimale de la myéline (Aquino et al. 1998).

Au stade adulte, les HSPs font également partie de la vie des cellules cérébrales. Ainsi Armstrong et al (2001) ont mis évidence les différences d'expression d'Hsp25 dans les souris entre les stades foetal et adulte, de même qu'entre cerveaux de rat et de souris. Chez la souris, au stade du développement cérébral, l'expression d'Hsp25 a été mise en évidence surtout dans le cerveau et peu dans la colonne vertébrale alors qu'au stade adulte, l'expression est plus importante dans les motoneurons de la moelle épinière. Entre rats et souris la différence a surtout été montrée au niveau du thalamus et du cervelet, structures qui expriment Hsp25 uniquement chez la souris adulte. Concernant Hsp70 son expression cérébrale est faible voire inexistante (D'Souza, 1998). Ainsi, des analyses immunohistologiques sur des cerveaux humains et de rats ont montré que la protéine la plus exprimée était Hsc70 par rapport à la

forme inductible Hsp70 et que sa localisation était essentiellement dans la matière blanche (Tytell et al, 1998).

Chez l'Homme, Hsp 27 est très peu ou pas exprimé dans les astrocytes cérébraux normaux, cependant, dans des tumeurs astrocytaires, le niveau d'expression a été montré caractéristique du phénomène de cancérisation (Assimakopoulou et al, 1997).

• *Partie 4 : Le Stress Cellulaire et la mort cellulaire*

Notions de mort cellulaire.

En condition physiologique, pathologique ou de stress, un développement et un fonctionnement harmonieux d'un organisme passent par un ensemble équilibré de processus cellulaires où la survie cellulaire coexiste avec la mort. La mort cellulaire peut être observée aussi bien chez l'embryon que chez l'adulte résultant d'un processus nécrotique (mort cellulaire passive ou accidentelle) ou apoptotique (mort cellulaire programmée) (Figure 10). Figure 10).

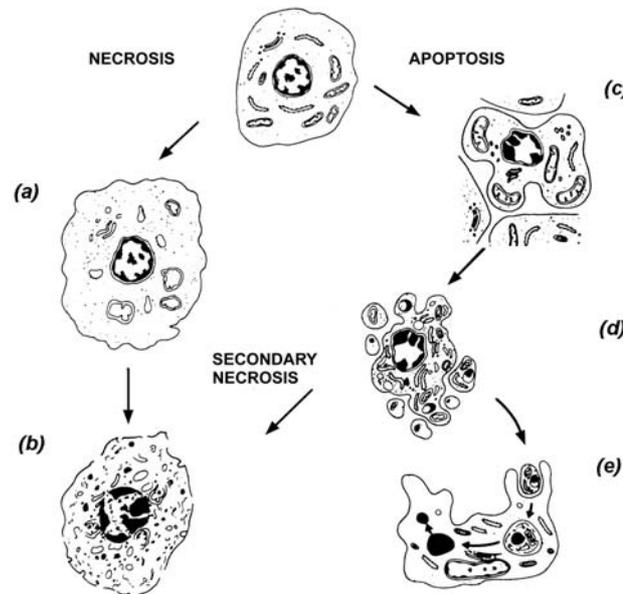


Figure 10 : Nécrose et apoptose, processus de mort cellulaire. Pendant la nécrose, des renflements apparaissent (a) puis la libération du contenu cytoplasmique se fait grâce à la perméabilisation de la membrane (b) conduisant à la réaction inflammatoire des tissus environnants. L'apoptose est caractérisée par de nombreux changements morphologiques et biochimiques différents de la nécrose. La cellule rétrécit, forme des renflements et se détache des cellules environnantes, alors que la membrane plasmique et les organites cellulaires restent intacts (c). Dans le noyau, la chromatine se condense à l'enveloppe nucléaire. Finalement, les cellules se désintègrent en corps apoptotiques (d) qui sont phagocytés par les cellules voisines (e). Source : www.imm.ki.se

La Nécrose

La nécrose ou mort cellulaire accidentelle survient lors d'une lésion tissulaire et implique un groupe de cellules. Elle se définit par un traumatisme important comme l'ischémie (arrêt ou diminution de la circulation sanguine au niveau d'un organe), une hyperthermie (élévation importante de la température), une intoxication par un produit chimique, ou des traitements anti-cancéreux (radiothérapie, chimiothérapie ou laser), etc...

La nécrose est considérée comme une mort cellulaire désordonnée. En effet, au cours de la nécrose, des modifications apparaissent au niveau du cytoplasme (il devient éosinophile et parfois vacuolaire) et au niveau du noyau qui peut se condenser et devenir très coloré (pycnose). Les cellules vont se gorger d'eau, entraînant une absence de régularisation des pressions régnant dans le compartiment intracellulaire, au point d'entraîner la lyse de la membrane plasmique. Les organites vont elles aussi avoir tendance à gonfler. L'ADN nucléaire va être dégradé de manière aléatoire (Bicknell and Cohen 1995) par des endonucléases activées notamment par des sérines protéases (Dong et al. 1997). Cette véritable explosion cellulaire conduit au relargage dans le milieu environnant du contenu cytoplasmique. La nécrose est à l'origine du processus inflammatoire.

Une des nécroses les plus connues est celle du myocarde. Elle se produit lors de l'infarctus (Frangogiannis et al. 2001) et correspond à un arrêt d'apport sanguin au niveau du muscle cardiaque par obstruction d'une artère coronaire. Les fibres musculaires sont alors détruites par nécrose puis remplacées par une réparation tissulaire conjonctive formée d'un tissu inerte, c'est-à-dire ne possédant pas les capacités de transmission de l'influx nerveux.

La nécrose doit être différenciée de l'apoptose, un mode de mort cellulaire programmé génétiquement.

L'Apoptose

Appelée aussi mort cellulaire programmée, l'apoptose est largement impliquée dans les processus physiologiques et pathologiques. Soumise à une régulation fine, elle diffère de la nécrose où la destruction de la cellule est brutale et toujours provoquée par des conditions anormales ou un agent toxique.

Sur le plan physiologique, l'apoptose correspond aux phénomènes qui conduisent à une destruction cellulaire ménagée, indispensable à l'équilibre (ou homéostasie) du corps pour

tenir compte du renouvellement des tissus. Elle est contrôlée par des oncogènes et des suppresseurs de tumeurs. L'apoptose est par exemple inhibée par le gène bcl-2 impliqué dans les lymphomes folliculaires et induite par la protéine p53, deux des principaux effecteurs de ce contrôle (Ryan et al. 1994; Chiarugi and Ruggiero 1996). Sur le plan pathologique, une apoptose insuffisante liée à une production accrue de cellules modifiées est souvent rapportée dans les cas de cancers. Aussi, certains traitements anticancéreux (Ding et al. 2002) ont été développés pour favoriser l'apoptose et éliminer ainsi des cellules en excès.

Très généralement, les cellules en apoptose vont s'isoler des autres cellules. Les événements morphologiques et biochimiques impliqués dans l'apoptose sont nombreux. L'une des modifications morphologiques caractéristiques de l'apoptose est l'importante condensation à la fois du noyau et du cytoplasme, ce qui induit une diminution significative du volume cellulaire. Les mitochondries de la cellule apoptotique vont subir des modifications majeures avec le relargage du cytochrome c dans le cytoplasme (Kluck et al. 1997; Yang et al. 1997) et la diminution du potentiel membranaire $\Delta\Phi_m$ et de la transition de la perméabilité mitochondriale qui permet l'ouverture de pores PT (pour transition de perméabilité) spécialisés (Marchetti et al. 1996; Petit et al. 1996; Zamzami et al. 1996). Le noyau se condense, puis la chromatine est clivée en fragments réguliers (Wyllie et al. 1984). La membrane plasmique va bourgeonner et conduire à la formation de corps apoptotiques renfermant une partie du cytoplasme de la cellule et phagocytés par les macrophages principalement, mais aussi par les cellules voisines. L'un des points majeurs de l'apoptose est que l'intégrité de la membrane plasmique n'est jamais altérée au cours du processus, ce qui permet d'éviter tout déversement du contenu cellulaire et ainsi prévenir toute lésion des tissus alentours. Afin de faciliter la reconnaissance des corps apoptotiques par les cellules phagocytaires, la cellule va signaler son état apoptotique à son environnement notamment grâce aux molécules de phosphatidylsérines membranaires qui passent d'une orientation cytoplasmique vers une orientation extracellulaire (Castedo et al. 1996).

L'élimination des cellules apoptotiques est primordiale, elle permet de ne laisser aucune trace dans le tissu où survient l'apoptose, en particulier, elle prévient toute nécrose secondaire qui aurait pour conséquence la libération aléatoire du contenu cellulaire. Ce processus d'élimination par phagocytose permet de limiter l'établissement d'une réaction inflammatoire par la libération de cytokines anti-inflammatoires telles que TGF-beta1 et PGE-2 dans l'environnement cellulaire (Maderna and Godson 2003).

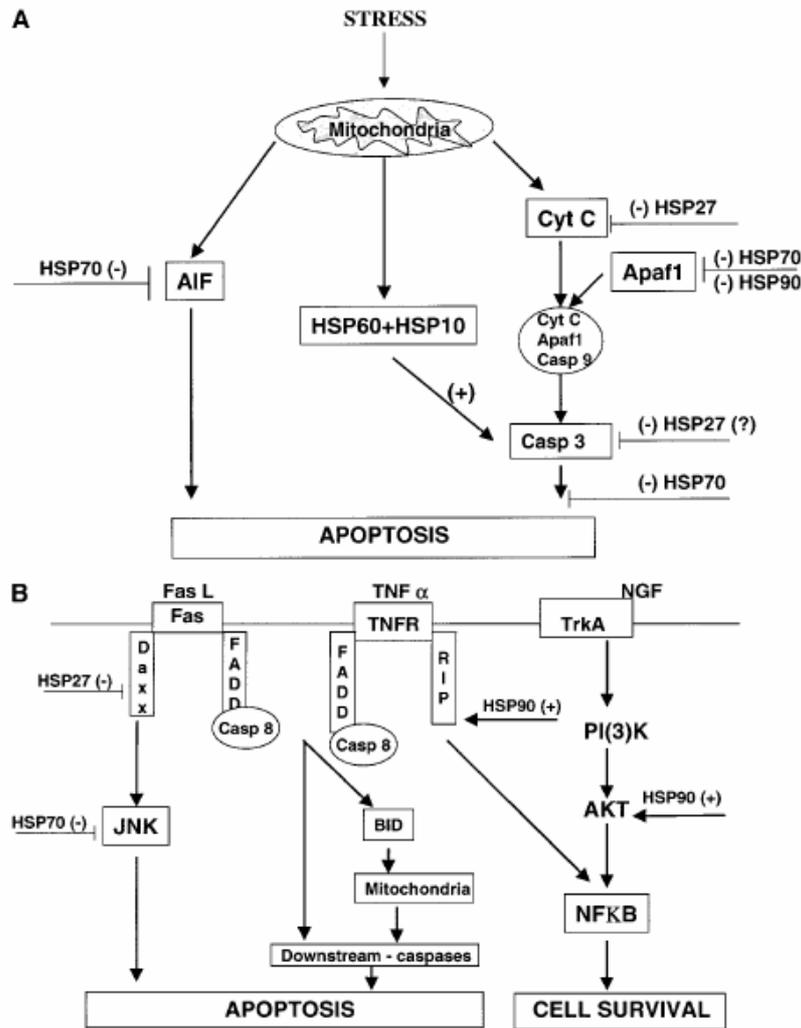


Figure 11 : Régulation de l'apoptose par les HSP d'après Garrido (Garrido et al. 2001). A : modulation par les HSP de la voie intrinsèque apoptotique. HSP27 se lie au cytochrome c (Cyt C), HSP70 et HSP90 se lient à Apaf1. Dans tous les cas cela résulte en l'inhibition de la formation de l'apoptosome et, par conséquent, en la prévention de la formation de la caspase 9 mature. Une influence négative complémentaire a été décrite pour HSP27 et 70, dans d'autres événements de la cascade apoptotique. B : modulation par les HSP de la voie extrinsèque apoptotique. HSP 27 interagit avec et inhibe la voie apoptotique Daxx alors que HSP70 se lie à JNK1 pour l'inactiver. Le signe (-) dénote une régulation négative, (+) une régulation positive et (?) représente des effets putatifs.

Le processus d'apoptose peut être médié suivant deux voies de signalisation. La première est induite par un stimulus passant par des récepteurs de mort cellulaire tel que le récepteur au Tumor Necrosis Factor alpha, $TNF\alpha$, etc. (pour revue Song and Steller, 1999). La seconde touche directement le métabolisme cellulaire et plus précisément le métabolisme mitochondrial avec la libération de cytochrome c par la mitochondrie (Bossy-Wetzel and Green 1999; Chen et al. 2000) et l'activation des caspases (Chang and Yang, 2000). On note cependant une convergence des deux voies vers une perturbation du métabolisme mitochondrial. En effet, de multiples facteurs sont capables d'induire l'apoptose, mais tous

aboutissent à une voie commune passant par la mitochondrie, la protéine Bcl-2 et les caspases.

Au niveau de la mitochondrie, l'ouverture des mégapores est stimulée sous l'effet de la disparition de l'effet protecteur de Bcl-2. Les protéines de la famille Bcl-2, (Bcl-2, Bax, Bad, etc) ont un effet régulateur permettant la fermeture ou l'ouverture de ces pores, et la libération des substances (cytochrome C notamment) qui activent des enzymes à activité cystéine protéase⁴, les caspases.

De nombreuses protéases, comme les polymérases, la topo-isomérase I ou la protéine kinase dépendante de l'ADN sont elles-mêmes modifiées par les caspases. Certaines modifications aboutissent à l'activation d'enzymes effectrices de l'apoptose et notamment des endonucléases qui agissent sur des sites exposés entre les nucléosomes.

Une régulation négative existe aussi pour ce processus de mort programmée. Parmi les régulateurs négatifs, on rencontre la très grande famille des HSP qui intervient quasiment à tous les niveaux de la signalisation apoptotique en inhibant ou en favorisant les chaînes de réaction (Figure 11) (Garrido et al. 2001). On notera parmi les Hsp anti-apoptotiques, les Hsp27 de la famille des petites Hsp et les Hsp70 qui interviennent dans les deux voies, intrinsèque et extrinsèque, de l'apoptose.

L'apoptose est un phénomène courant dans la peau. En effet, lors de la différenciation cellulaire des kératinocytes en cornéocytes, un processus apoptotique intervient, transformant les kératinocytes en cellules anuclées pourvues uniquement de kératines et destinées à la desquamation (Schroeder and Amstad-Jossi 1984; McCall and Cohen 1991; Nguyen et al. 2001). De plus, comme nous l'avons déjà évoqué, de fortes expositions aux ultraviolets induisent l'apoptose des kératinocytes appelés alors « sunburn cells » (Sheehan and Young 2002).

Au niveau du système nerveux central, l'apoptose est un processus courant pendant le développement (Raff et al. 1993; Kretschmar and Pflugfelder 2002). En effet, chez les vertébrés, il y a une sur-production de cellules neuronales dans les phases précoces de développement et le nombre approprié de cellules est établi grâce à la mort cellulaire programmée (Oppenheim 1989; Raff et al. 1993). La survie des neurones requiert des facteurs (mais ce n'est pas une condition irrévocable) tels que le NGF pour Nerve Growth Factor, le

⁴ Les protéines de type cystéine-protéases clivent les protéines spécifiquement au niveau d'un aspartate; on les appelle CASPASES (de l'anglais cysteinyl-aspartate-cleaving proteases).

CNTF pour Ciliary Neurotrophic Factor, qui sont en partie, produits par les cellules gliales (Travis 1994; Lindsay 1995). Les cellules gliales elles-mêmes, afin d'échapper à l'apoptose, ont besoin de facteurs produits par les autres types cellulaires (Barres et al. 1993). Il a été proposé que les oligodendrocytes du nerf optique du rat dépendaient des signaux provenant de son contact axonal et qu'ils mourraient en l'absence ou en cas de défaillance de ce contact (Barres and Raff 1994).

- *Partie 5 : La téléphonie mobile et la santé*

Le réseau de communication de téléphonie mobile

Un peu d'histoire...

A l'origine de la première tentative de transmission de la voix à distance, on trouve un moine de l'abbaye de Cîteaux, Dom Gauthey, qui vivait sous le règne de Louis XVI. Il proposa à l'Académie des sciences un système rapide pour converser à distance, au moyen d'un simple tube qui empêchait la dispersion des ondes sonores. L'expérience, contrôlée par le roi lui-même, sur une longueur de 780 m, se révéla concluante, mais les fonds furent refusés pour la tenter sur une plus grande distance.

L'évolution de la communication vocale à distance se poursuivit au XIXe siècle. On trouve l'Italien Guglielmo Marconi (1874-1937) qui entreprend, dès 1894, des essais à partir des expériences de Hertz et de Branly. En perfectionnant l'émetteur à étincelles et le récepteur correspondant, une grande antenne verticale tenue par un cerf-volant, il parvient à augmenter la portée. Empruntant au télégraphe de Morse l'interrupteur qu'il adapte à l'émetteur et l'imprimante qu'il adapte au récepteur, il réussit en 1895 à télégraphier sans fil sur une distance de près de 2,5 km. Peu pris au sérieux par le gouvernement italien auquel il propose son invention, il part s'établir à Londres, en 1896. Il dépose cette année-là son premier brevet. En 1897, il crée la Wireless Telegraph and Signal Company pour exploiter ses inventions. Avant cela, jusqu'en 1898, Marconi ne cesse d'améliorer son invention avec en parallèle la percée de Branly et de Ducretet avec la première transmission de T.S.F. sur 4 kilomètres entre la tour Eiffel et le Panthéon.

En 1899, Marconi et Branly réussissent la première transmission sans fil à travers la Manche, entre Douvres et Wimereux. Cette même année, Marconi présente son invention aux États-Unis où il équipe deux bateaux chargés de suivre les régates de la coupe de l'America. En 1901, jouant d'audace, il parvient à établir une liaison entre Poldhu (Cornouailles) et Terre-Neuve, à 3400 kilomètres de là. L'émetteur est alors actionné par un alternateur de 25 kilowatts.

Le XXe siècle a vu le passage du téléphone fixe actionné par une magnéto à l'apparition du téléphone mobile. Cependant, une telle évolution rapide a suscité des inquiétudes, du fait du manque de connaissances de la population sur le fonctionnement de tels appareils mobiles, de la proximité du terminal avec la tête et de l'apparition dans le paysage d'antennes relais (les stations de base).

Aussi, le développement des télécommunications a été suivi par celui de la recherche sur les effets des champs électromagnétiques radiofréquences sur les systèmes biologiques. Les premiers travaux avaient, de fait, débuté après la deuxième guerre mondiale, à cause du développement des radars. Depuis, l'activité de recherche a été relancée aux Etats-Unis, puis dans le monde entier, à partir d'une procédure judiciaire engagée en 1993 par un citoyen accusant le téléphone mobile d'être responsable du cancer du cerveau dont sa femme était décédée. La recherche a donc particulièrement porté sur ce type de pathologie et a tenté d'explorer les mécanismes biologiques qui pourraient relier l'exposition des tissus humains à ces champs, au développement des processus de cancérogenèse.

Le réseau de communication

Depuis une douzaine d'années, nous pouvons communiquer hors de nos domiciles et des cabines téléphoniques, grâce aux téléphones mobiles. Les premiers modèles étaient destinés à la clientèle d'affaires (radiotéléphones d'automobiles) mais depuis, les modèles sont devenus portables. Il y a actuellement plus d'un milliard et demi de téléphones mobiles en usage dans le monde. Ces téléphones sont également dits « cellulaires » car leur utilisation se fait dans des cellules géographiques (Figure 12) au milieu desquelles se trouvent les émetteurs /récepteurs que sont les stations de base.

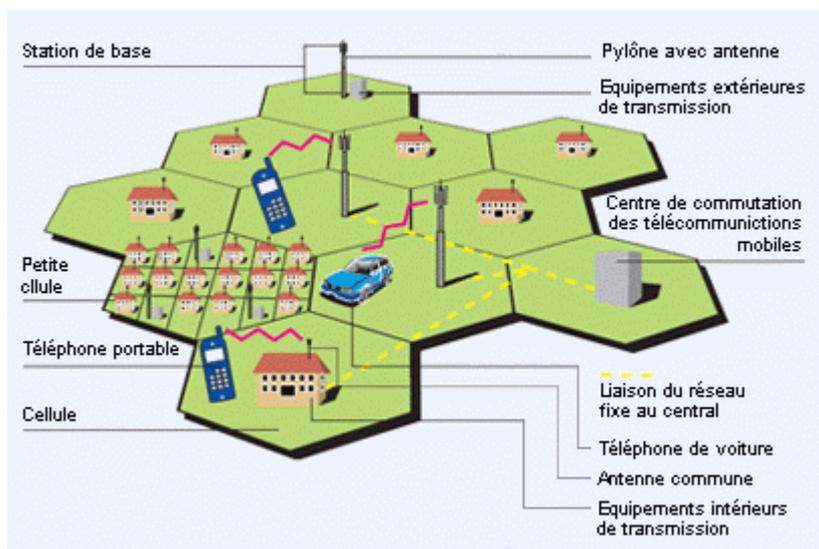


Figure 12 : Réseau cellulaire de téléphonie mobile. Source : www.swisscom-mobile.com

En Europe, les téléphones de type GSM (Global System for Mobile Communication), fonctionnent à deux fréquences centrées sur 900 et 1800 MHz. Les progrès en termes de types de signaux font que dorénavant d'autres signaux sont couramment utilisés : l'UMTS (Universal Mobile Telecommunications System) et le signal EDGE (Enhanced Data rates for GSM Evolution). Dans notre étude, nous avons travaillé avec les signaux GSM-900, GSM-1800 et UMTS.

La station de base (ou antenne relais)

Les stations de base sont des émetteurs-récepteurs dont le rôle dans les communications mobiles est indispensable, puisqu'elles servent à acheminer les appels du et vers le réseau auquel elles sont connectées dans la zone de couverture.

Vue de loin, une antenne de station de base se présente sous la forme d'un rectangle allongé en plastique, d'une hauteur variant typiquement entre 1,5 m et 3 m, à l'intérieur duquel se trouvent les éléments rayonnants. La forme allongée ainsi que les dimensions des antennes leur confèrent des propriétés de directivité (tilt de 6° environ vers le bas et latéralement couramment de 120°).

L'antenne est montée sur un pylône et orientée pour que le faisceau passe au-dessus des toits. Dans la direction du maximum de rayonnement, la puissance s'atténue de façon inversement proportionnelle au carré de la distance. À titre d'exemple, on peut citer le cas de la modélisation d'une antenne macrocellulaire à 900 MHz, rayonnant une puissance de 30 W

environ. Pour des antennes de ce type, d'une hauteur typique de 1,8 m, la distance au-delà de laquelle on peut considérer que le champ décroît de façon inversement proportionnelle à la distance est typiquement de l'ordre de 6 et 12 m, à 900 et 1800 MHz, respectivement. La connaissance de la puissance et du gain d'une antenne permet de calculer très simplement le niveau d'exposition en vue directe de l'antenne, qui peut ainsi être comparé aux niveaux de référence réglementaires. Le niveau de puissance correspondant à la limite d'exposition pour le public ($4,5 \text{ W/m}^2$ à 900 MHz) est atteint à un mètre environ en face de l'antenne.

Le téléphone mobile

Pour les téléphones mobiles, comme pour toutes les RF, c'est le Débit d'Absorption Spécifique (DAS) qui est utilisé pour quantifier le niveau d'exposition de l'utilisateur, exposition locale puisque seule une partie de la tête est exposée. Le DAS représente l'énergie absorbée par unité de temps et de masse de tissus (W/kg). C'est la recommandation européenne de juillet 1999 qui a servi de référence pour le décret français de mai 2002 stipulant que la valeur maximale du DAS intégré dans 10 g de tissus ne doit pas excéder 2 W/kg dans le cas d'expositions locales du public aux RF.

La valeur du DAS pour un mobile donné dépend en grande partie de son antenne qui est elle-même fortement couplée au corps du téléphone mobile, parfois même y est intégrée, mais également de la main et de la tête de l'utilisateur. En fait, le téléphone mobile, la main et la tête constituent une antenne complexe équivalente dont les propriétés sont très sensiblement différentes de celles du mobile isolé.

Actuellement, le DAS des téléphones mobiles du commerce s'échelonne typiquement entre 0,15 et 1,5 W/kg (moyenne de 0,7 W/kg). Des prélèvements périodiques sur les chaînes de fabrication permettent de contrôler que cette valeur est bien respectée d'un téléphone mobile à l'autre pour un modèle donné.

Notion de Débit d'Absorption Spécifique (DAS)

Des valeurs limites d'exposition des personnes aux champs électromagnétiques ont été proposées par l'ICNIRP (Commission Internationale de Protection Contre les Rayonnements Non Ionisants, www.icnirp.de) en 1998. L'ICNIRP est la commission scientifique internationale compétente dans le domaine des rayonnements non-ionisants reconnue par

l'Organisation Mondiale de la Santé. Ces valeurs limites ont été établies sur la base des effets biologiques considérés avec les seuils les plus bas chez l'animal de laboratoire et d'une analyse globale des connaissances scientifiques disponibles.

L'effet biologique observé chez l'animal au plus faible niveau d'exposition est un effet thermique se traduisant par une altération du comportement. De tels effets surviennent lorsque la puissance absorbée par le corps, qui se mesure par le débit d'absorption spécifique (DAS), dépasse la valeur de 4 W/kg.

Afin de tenir compte des éventuelles incertitudes et de disposer d'une marge de sécurité, un coefficient d'abattement de 50 est appliqué pour définir les valeurs limites d'exposition du public, soit 0,08 W/kg. Certaines parties du corps pouvant absorber localement des puissances pouvant être jusqu'à 25 fois supérieures, un DAS local a été établi. Celui-ci ne doit pas dépasser 2 W/kg pour la tête et le tronc et 4 W/kg pour les membres. Ces valeurs sont des restrictions de base qui ne doivent pas être dépassées. Cependant, le DAS est une grandeur physique qui n'est pas facilement mesurable. Des valeurs de champ électrique et magnétique, fonction de la fréquence et facilement mesurables, ont été établies. Ces valeurs sont dénommées « niveaux de référence ». Le respect des niveaux de référence garantit le respect des restrictions de base. Cependant, leur calcul étant basé sur des conditions de pire cas, le non-respect des niveaux de référence n'implique pas un dépassement des restrictions de base. Ceci introduit donc un facteur de sécurité supplémentaire.

Ces valeurs limites d'exposition ont été reprises dans la recommandation du Conseil de l'Union Européenne 1999/519/ CE du 12 juillet 1999 relative à l'exposition du public aux champs électromagnétiques et par la France dans le décret du 3 mai 2002. Les valeurs limites d'exposition professionnelle ont été établies sur les mêmes données, avec un facteur d'abattement moindre (10 à la place de 50) par la directive 2004/40/CE.

Ces propositions de l'ICNIRP, sur lesquelles est basée la réglementation européenne, sont réévaluées tous les 4 ans et rééditées si nécessaires.

Les signaux

Pour la téléphonie mobile, trois techniques sont envisageables pour faire passer plusieurs canaux sur la même fréquence porteuse : le multiplexage temporel (AMRT ou

TDMA pour "Time Division Multiple Access"), le multiplexage de fréquence (AMRF ou FDMA) et le multiplexage par code (AMRC ou CDMA pour "Code Division Multiple Access").

La norme GSM recourt à l'AMRT et la norme UMTS recourt à l'AMRC.

Le GSM

Deux types de réseaux sont développés en Europe

- Le GSM 900, qui utilise la bande 890-915 MHz pour l'envoi des données et la bande 935-960 MHz pour la réception des informations.
- Le GSM 1800, qui utilise la bande 1710-1785 MHz pour l'émission et la bande 1805-1880 MHz pour la réception.

Les appareils qui fonctionnent en 900 et 1800 sont appelés *GSM dual band* ou simplement *dual band*. Il s'agit de la majorité des téléphones vendus en France. Le GSM 1800 est également appelé DCS 1800 (*Digital Communication Systems*).

Le GSM utilise deux bandes de fréquences, l'une pour la voie montante, l'autre pour la voie descendante. Chaque porteuse comporte huit "time-slots" (TS). Ils durent 577 µs. Le débit utile est de 9,6 kbit/s.

Le signal UMTS

L'UMTS, "Universal Mobile Telecommunications System", est parfois aussi appelé 3G. L'UMTS repose sur la technique d'accès multiple W-CDMA, "Wideband Code Division Multiple Access" ou encore d'accès multiple à large spectre par répartition en code ou AMRC, qui est un système de codage utilisé en téléphonie mobile, particulièrement aux États-Unis. Les fréquences allouées pour l'UMTS sont de 1885-2025 MHz et 2110-2200 MHz.

L'UMTS permet théoriquement des débits de transfert de 1,92 Mbit/s, mais en pratique les débits offerts par les opérateurs dépassent rarement 384 kbit/s. Néanmoins, cette vitesse est nettement supérieure au débit de base GSM.

Grâce à sa vitesse accrue de la transmission des données, l'UMTS ouvre la porte à des applications et services nouveaux. L'UMTS permet en particulier de transférer, dans des

temps relativement courts, des contenus multimédia tels que des images, du son et de la vidéo. Il permet, entre autres, la vidéotéléphonie.

Les radiofréquences et la santé : état des lieux au début du projet.

Des avancées technologiques telles que la téléphonie mobile ne se font pas sans générer une crainte exprimée par le public. Pour s'assurer que les normes de sécurité sanitaire sont adéquates pour ce type de signaux radiofréquences (RF), des groupes de recherche se sont lancés dans la recherche d'éventuels effets non-thermiques induits par ces champs électromagnétiques.

Etudes *in vitro* et *in vivo* sur la peau

Lors d'une communication téléphonique, le premier organe qui absorbe les ondes RF est la peau. En effet, elle est en contact avec l'appareil. Ceci pourrait susciter des réactions physiologiques de défense au niveau de la peau et en particulier de l'épiderme, première barrière de protection du corps humain aux agressions environnementales.

Les études menées par Bernardi et al. (2001) ont apporté des données sur l'élévation de température au niveau de la peau au cours d'une conversation avec un téléphone portable. Ils ont montré, sur un modèle de tête humaine, que la simulation d'une communication avec un téléphone cellulaire entraîne une augmentation de température due aux ondes qui est maximale au niveau de l'oreille (+0,9°C) et décroît avec la profondeur (+0,01°C en périphérie du cerveau). Cette augmentation s'ajoute à celle résultant du contact de la peau avec le téléphone, qui est lui-même échauffé par sa batterie et la main de l'utilisateur. Cet échauffement minime ne peut donc pas provoquer d'effets thermiques. Lors d'une étude en laboratoire, Straume et al. (2005) ont observé, sur des volontaires, que l'utilisation d'un GSM 900 à 2 W/kg induisait une augmentation de température de 1,85°C au niveau de l'oreille, avec une décroissance rapide en fonction de la distance au téléphone (+0,65°C autour de l'oreille). Le fait d'appliquer simplement un téléphone éteint sur l'oreille induit une élévation de 1°C, ce qui est expliqué par le fait que les échanges entre la peau et l'air ne se font plus (Pina et al. 2000). Une élévation locale de température de l'ordre du degré Celsius dans la peau ne peut pas générer un effet de type hyperthermique. On peut cependant

raisonnablement émettre l'hypothèse que cette légère élévation peut être perçue comme un stress qui perturberait les cellules de la peau exposées aux radiofréquences.

Seuls quelques articles ont traité des effets des ondes millimétriques (Szabo et al. 2001) ou des micro-ondes sur les récepteurs cutanés, sur la sensibilité de la peau humaine, ou sur la perception cutanée (Adair et al. 1999 ; Adair et al. 2003) mais ceci sans rapport avec les radiotéléphones. Pacini et al. (2002) sont les seuls à avoir étudié l'effet du GSM-900 sur des cellules dermiques, des fibroblastes, et ont constaté des changements morphologiques ainsi que des changements d'expression génique après exposition d'une heure au DAS de 0,6 W/kg.

Il est donc évident que les connaissances sur les effets des RF de la téléphonie mobile sur la peau sont largement insuffisantes pour une évaluation correcte du risque.

Etudes in vitro et in vivo sur le SNC

Les recherches sur les effets des RF de la téléphonie mobile ont en revanche largement porté sur le cerveau et les organes proches comme l'oreille interne.

Les études sur le cerveau sont nombreuses, mais certaines sont contradictoires, en particulier celles qui portent sur la perméabilité de la barrière entre le sang et le cerveau appelée barrière hémato-encéphalique (BHE). La BHE est notamment constituée d'un endothélium très serré qui n'autorise le passage que de certaines molécules. Toute altération de la BHE peut donc entraîner des désordres au niveau des tissus cérébraux.

Fritze et al. (1997a) ont montré que chez des rats vigiles exposés durant 4 heures au signal GSM-900, la BHE n'était pas altérée à un DAS inférieur à 7,5 W/kg. Une étude similaire ne montre aucune altération de la BHE de souris exposées à un DAS de 4 W/kg pendant 1 heure (Finnie et al. 2001). Finnie et al. (2002) se sont ensuite intéressés à une exposition chronique au GSM-900, et concluent à un effet négligeable sur la BHE des souris exposées.

À l'inverse, Salford et al. ont rapporté qu'une exposition de 2 heures à un signal à 915 MHz, avec un DAS variant de 0,016 à 5 W/kg, entraîne une ouverture de la BHE dans près de la moitié des rats exposés anesthésiés (Salford et al. 1994). Une expérimentation concluant dans le même sens a été réalisée (mais non publiée à ce jour) par l'équipe de P. Aubineau à Bordeaux (Rapport 2002 du Sénat N° 52) dans le cadre du programme COMOBIO (Communications MObiles et BIOlogie, Réseau National de Recherche en

Télécommunications). En effet, après exposition de la tête de rats vigiles à un signal GSM-900, à un niveau de DAS de 3 W/kg moyenné sur le cerveau, une perméabilisation des vaisseaux sanguins dans la dure-mère et le cerveau était observée.

Cette contradiction dans les résultats des expérimentations ne concerne pas seulement les structures cérébrales, mais aussi l'expression de protéines les HSPs. L'effet d'un stress thermique sur l'expression des HSPs est bien caractérisé. Or, l'absorption de radiofréquences de forte puissance peut provoquer une élévation de température. Cependant, c'est un effet à faible niveau (non-thermique) qui a été récemment décrit, dans différents modèles, sur l'expression de cette famille de protéines.

En 1997, Fritze et al. montraient une induction précoce et transitoire de l'ARN messager hsp70 dans le cerveau de rats exposés localement pendant 4 heures, à un signal continu de fréquence 900 MHz et avec un DAS de 7,5 W/kg (Fritze et al. 1997b). L'expression d'Hsp70 retournait à son niveau de base 24 heures après la fin de l'exposition. La tête des animaux étant principalement exposée (exposition locale), aucune hyperthermie n'était attendue à ce niveau de DAS. Cependant, les auteurs n'ont pas cherché à déterminer si la variation en quantité d'ARN hsp70 était corrélée à une production accrue de la protéine Hsp70. De plus, dans les mêmes conditions, un signal GSM-900 à 0,3 et 1,5 W/kg ne perturbait aucunement le niveau d'hsp70. Enfin, aucune modification des ARN codant pour des gènes de réponse précoce (jun, fos, etc), codant pour GFAP et codant pour Krox20 et Krox24, n'était mise en évidence quelle que soit la condition d'exposition.

Stratégie d'étude

Des travaux sur des modèles autres que cutanés ou nerveux ont suggéré que les RF de la téléphonie mobile pouvaient être un agent de stress.

Ainsi, des études ont montré une variation d'expression du gène Hsp16 chez le vers nématode *Caenorhabditis elegans* exposé à un signal à 750 MHz (de Pomerai et al. 2000). On peut également citer l'étude utilisant des cellules endothéliales d'origine humaine Ea-hy926 surexprimant Hsp27 sous exposition à un signal GSM-900 (Leszczynski et al. 2002).

Il semblerait donc que des cellules d'origines diverses et certains organismes simples pourraient percevoir les RF, même à faible niveau, comme un stress. Les données actuelles suggèrent que cette réponse cellulaire est précoce et transitoire. En revanche, aucun élément

ne permet aujourd'hui de prévoir des conséquences physiopathologiques correspondantes. Des études à long terme pourraient apporter des réponses à ces questions en précisant si ces réactions sont assimilables à une réponse de défense ou une adaptation cellulaire efficace au stress, représenté ici par les radiofréquences.

Dans le cadre de nos études sur les effets biologiques des signaux de la téléphonie mobile, nous avons utilisé deux types de modèles : la peau⁵ et le système nerveux central, par l'utilisation de modèles cellulaires et animaux permettant d'approcher au mieux la réalité de l'exposition aux RF.

Des modèles de peau *in vitro* et *in vivo* ont donc été utilisés, avec, pour les premiers, des cultures primaires monocouches de kératinocytes et fibroblastes humains, des épidermes reconstruits avec des kératinocytes primaires humains, et pour les seconds, des rats Hairless (souche sans poils).

Pour le système nerveux central, les modèles d'étude choisis sont des cultures de lignées humaines de neuroblastome SH-SY5Y et de microglie CHME-5 *in vitro*, et des rats Sprague-Dawley *in vivo*.

Notre stratégie d'étude repose sur des expositions uniques ou chroniques et sur l'étude du stress cellulaire induit. Les réponses cellulaires au stress ont été mesurées consécutivement aux expositions par la recherche de l'induction de protéines de choc thermique, de cassures à l'ADN, d'inflammation et de l'apoptose.

⁵ études recommandées déjà dans le rapport de la DG XIII (McKinlay, 1996) qui figure dans les recommandations de recherche récentes de l'OMS, Organisation Mondiale de la Santé

Chapitre 2 : Conditions expérimentales d'exposition et interprétation des résultats

Étudier les effets biologiques des signaux de téléphonie mobile implique de connaître parfaitement les conditions d'exposition. Dans le cadre de cette thèse rédigée sur articles, la majorité des matériels et méthodes utilisés est détaillée dans les articles. Cependant, peu de détails sont attribués à l'explication des systèmes d'exposition. Or, dans le cadre de ce projet, différents modèles ont été étudiés *in vitro* et *in vivo*, et il était par conséquent nécessaire de construire des systèmes d'exposition adaptés aux conditions optimales de culture pour les cellules et permettant une exposition chez l'animal similaire à celle vécue par un être humain au cours d'une conversation téléphonique. Utiliser directement un téléphone mobile sur les animaux ou sur les boîtes de culture cellulaire s'avérait donc incohérent avec ces objectifs.

La construction d'un système d'exposition suit donc un cahier des charges non standardisé à ce jour (il existe encore des travaux réalisés avec du matériel d'exposition non caractérisé et non adapté) qui ne sera pas détaillé ici d'un point de vue physique, mais suffisamment pour saisir la complexité que représente la réalisation des expériences en bio-électromagnétisme.

- *Partie 1 : Systèmes d'exposition et conditions d'expérimentation*

Les expérimentations *in vitro*

Le système d'exposition pour le signal GSM-900.

Le signal GSM-900 issu de la téléphonie mobile a été reproduit, pour les expositions *in vitro*, à l'aide d'une antenne dite fil-plaque, développée à l'IRCOM⁶ (Laval L. et al, 2000) et reliée à un générateur de signal à 900 MHz (9 kHz – 2.2 GHz SML, Rohde & Schwarz, München, Allemagne) et couplé à un amplificateur (modèle 15100B, 500-1000MHz, EATON Corp., Moon Township, Pennsylvanie, USA).

⁶ IRCOM: Institut de Recherche en Communications Optiques et Micro-ondes UMR 6615 CNRS Université de Limoges, France

Ce système consiste en l'assemblage de deux plateaux (Figure 13) au centre desquels est placée une antenne coaxiale permettant un rayonnement à symétrie de révolution du signal à 900 MHz (Figure 14).

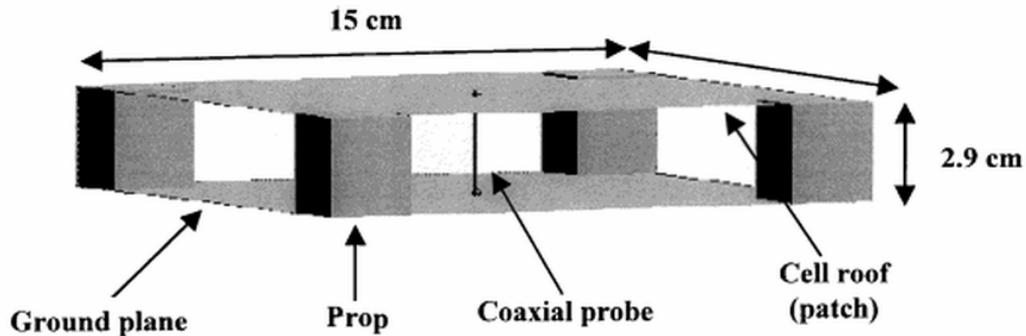


Figure 13 : Structure de l'antenne fil-plaque à 900 MHz, d'après Laval (Laval et al, 2000).

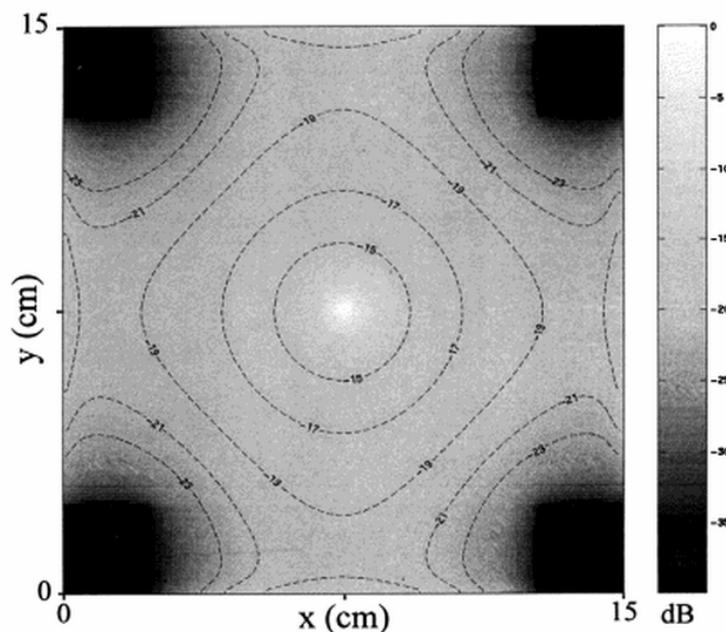


Figure 14 : Diffusion du champ électrique au sein de l'antenne fil-plaque. Au centre est positionnée l'antenne, représentée par la zone la plus élevée en champ ; aux quatre coins sont placés les pieds qui permettent la superposition des deux plateaux de la structure. D'après Laval (Laval et al, 2000).

Cette structure particulière permet de positionner deux niveaux de boîtes de culture pour ainsi exposer un total de huit boîtes de Pétri de 60 mm de diamètre (Figure 15).

Réaliser un système d'exposition pour étudier uniquement les effets des radiofréquences seules, c'est-à-dire sans la présence d'échauffement, a amené à repenser le support de culture des échantillons cellulaires. En effet, cultiver les cellules en boîtes de Pétri entraîne la formation, par le milieu de culture, d'un ménisque aux bords de la boîte. La conséquence en

est que les niveaux énergétiques mesurés dans une boîte de culture sont élevés et hétérogènes (Figure 16-A).

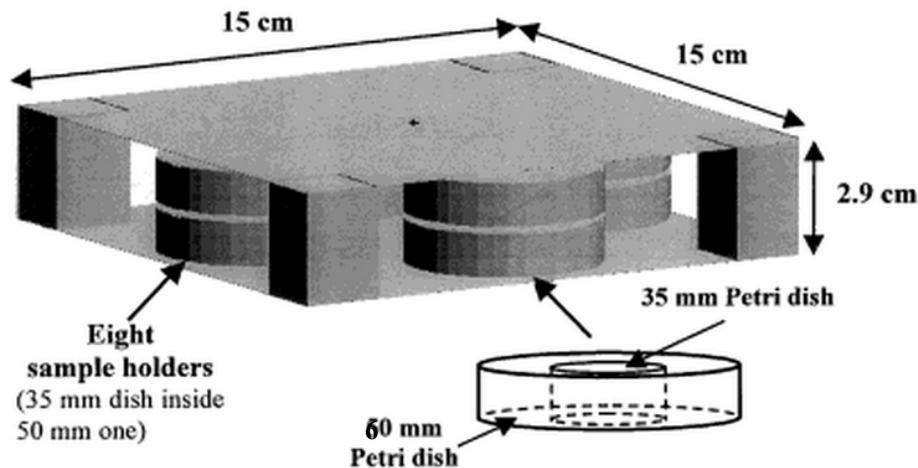


Figure 15 : Positionnement des boîtes de culture cellulaire à l'intérieur de l'antenne fil-plaque, d'après Laval (Laval et al, 2000).

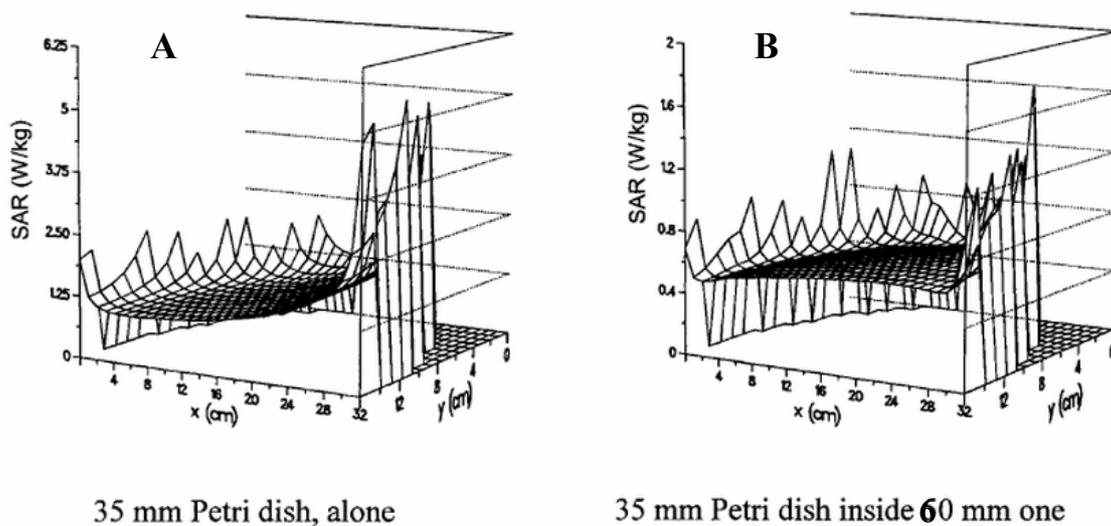


Figure 16 : Distribution du SAR (Specific Absorption Rate) ou DAS pour 1W incident dans une boîte de Pétri contenant 3,2 ml de milieu de culture. A : boîte de 60 mm de diamètre seule et B : boîte de 35 mm placée à l'intérieur d'une boîte de 60 mm de diamètre. Il est important de noter la différence d'échelle des deux cas. D'après Laval (Laval et al, 2000).

Pour remédier à cette hétérogénéité d'absorption, un anneau de garde a été ajouté en plaçant une boîte de Pétri de 35 mm de diamètre dans une boîte de Pétri de 60 mm de diamètre contenant 5 ml d'eau distillée. Cet anneau d'eau a permis d'obtenir une homogénéité d'absorption au niveau de la boîte intérieure et ainsi d'obtenir un effet de ménisque atténué (Figure 16-B).

Ce système d'exposition seul ne suffisant pas pour une exposition optimale des échantillons cellulaires, il a été placé dans un incubateur à CO₂, régulé à 5% de CO₂, en température et saturé en humidité. Afin d'éviter une éventuelle perturbation, par les ondes RF, des systèmes de régulation de l'incubateur (compatibilité électromagnétique), un anneau de mousse absorbante d'ondes est placé tout autour de l'antenne fil-plaque (Figure 17). Ce dernier protège les échantillons d'une éventuelle sur-exposition (due à la réverbération des ondes sur les parois en inox de l'incubateur), mais permet toujours le passage de l'air afin de conserver des conditions de culture optimales.

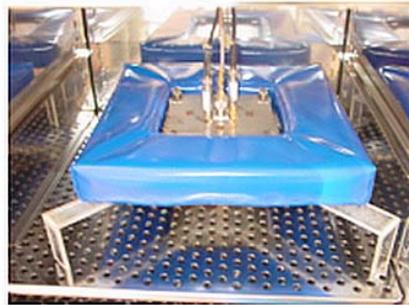


Figure 17 : Antenne fil-plaque placée au centre d'un incubateur à CO₂ et entourée d'un anneau absorbant (bleu) isolant les composants électroniques de l'incubateur des problèmes de compatibilité électromagnétique et les échantillons cellulaires d'une sur-exposition aux radiofréquences. Source : Photographie personnelle.

Le paramètre de température est également important. En effet, dans un milieu confiné et d'inertie thermique importante comme celui d'un incubateur de culture, les RF vont échauffer les milieux de culture. Ainsi, lors de la mise en marche de l'antenne, un échauffement de l'atmosphère dans l'enceinte a été mesuré, de l'ordre de 0,7°C pour un DAS de 2 W/kg. Pour y remédier, un réglage de la consigne de l'incubateur a été nécessaire et fixé à 36,3°C pour une condition optimale de culture à 37°C sous exposition RF. Malgré un certain nombre d'inconvénients (voir plus bas), cette solution a été préférée à un refroidissement par circulation d'eau qui aurait provoqué des différences de température locale au sein du milieu de culture.

Enfin, pour toute expérimentation, il est nécessaire de comparer la condition d'exposition que l'on teste avec une condition de référence, dite sham, pour laquelle l'échantillon est placé dans les mêmes contraintes d'exposition mais en l'absence d'exposition RF. Pour ce système d'exposition, il n'était pas possible de réaliser les deux conditions (exposition GSM-900 et exposition sham) dans le même incubateur en raison du choix de thermostatation. Par conséquent, un deuxième incubateur identique au premier a été mis à disposition pour les

expositions sham, contenant une antenne fil-plaque non alimentée et entourée d'un anneau absorbant.

Protocole expérimental à 900 MHz

Le DAS expérimenté avec le signal GSM 900 est de 2 W/kg. Il représente la valeur limite supérieure d'exposition locale autorisée par les autorités (décret **2002-775**). Nous nous plaçons donc dans une situation de pire cas.

Les cultures cellulaires sont placées dans les deux incubateurs (GSM-900 et Sham) et y sont maintenues pendant 3 heures avant l'exposition pour obtenir une température stable des cultures. Après une durée d'exposition de 48 heures, les échantillons cellulaires sont récupérés et codés par une tierce personne, puis traités en vue des différents paramètres étudiés.

Le système d'exposition pour le signal GSM-1800.

Pour étudier le signal à 1800 MHz, les contraintes de réalisation du système d'exposition étaient similaires à celles déjà évoquées, à savoir principalement:

- Des conditions optimales de culture cellulaire
- Un maximum d'échantillons à tester
- Un contrôle de la température
- Une exposition homogène des cultures cellulaires
- Un système non perturbateur pour un incubateur à CO₂
- La possibilité de travailler en aveugle, etc.

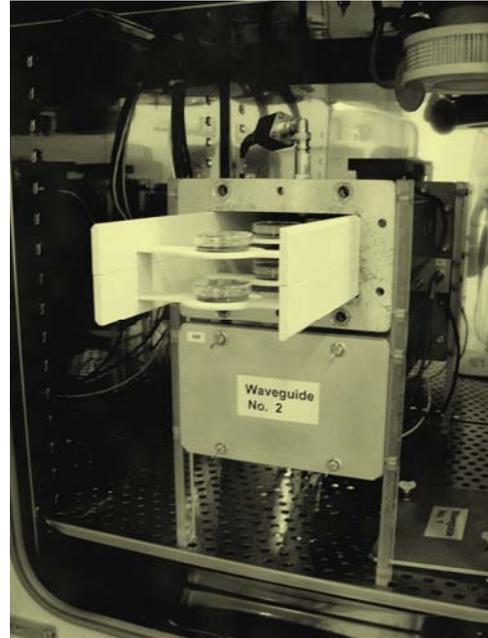
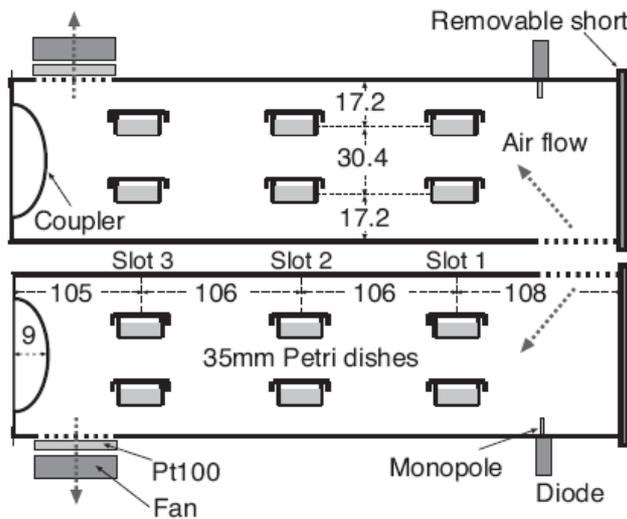


Figure 18 : Guides d'ondes du système d'exposition sXc1800. Chaque guide d'ondes est muni d'un chariot sur lequel sont disposées six boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre, et d'une porte entièrement mobile et imperméable aux ondes. Sur chaque guide est disposé un ventilateur en extérieur communiquant avec l'intérieur du guide pour aérer les cultures cellulaires afin de maintenir des conditions optimales de culture. Schéma d'après Handbook de IT'IS (Chapter 6 "In vitro setup for 1800 MHz", disponible par le lien http://www.itis.ethz.ch/index/index_sxc1800.html)

Le système d'exposition fut réalisé par IT'IS (IT'IS, Zurich, Suisse). Il est constitué de deux guides d'ondes jumeaux aérés par un système de ventilation propre (Figure 18) et pouvant contenir chacun six boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre. Le système entier (exposition GSM-1800 et exposition sham) est contenu dans un même incubateur à CO₂ sans nécessité de mousse absorbante. Le contrôle de la température est réalisé par un ventilateur.

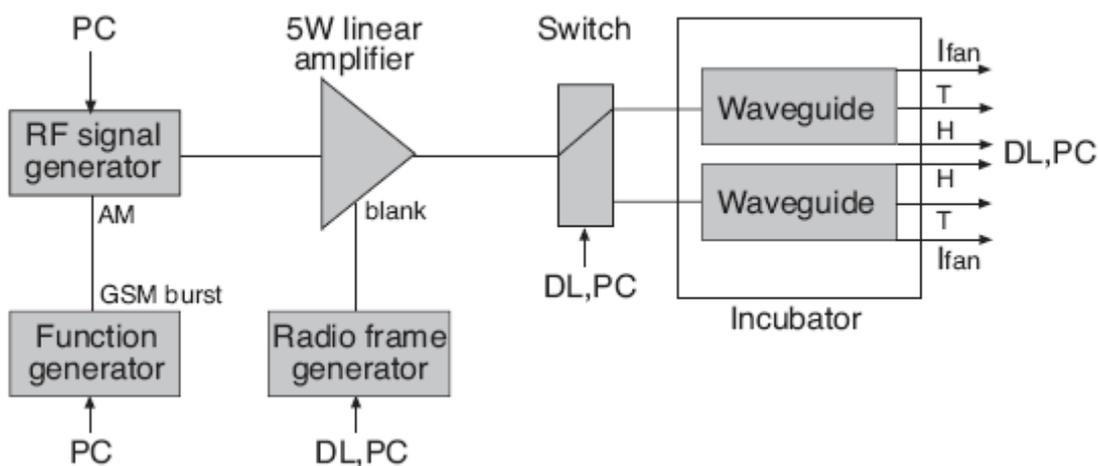


Figure 19 : Schéma du protocole d'exposition du sXc 1800, d'après HandBook de IT'IS. H : champ H, T : température, Ifan : courant conducteur du ventilateur, DL : carnet de données, PC : ordinateur, switch : interrupteur, Waveguide : guide d'ondes. D'après Handbook de IT'IS.

Les deux guides d'ondes sont reliés à un générateur (9 kHz – 2.2 GHz SML, Rohde & Schwarz, München, Allemagne) couplé à un amplificateur (1800 MHz, 5W, LS Elektronik AB, Spanga, Suède) avec, en intermédiaire, une commande d'interrupteur guidée par un générateur de fonction aléatoire (33120A, Agilent, Palo Alto, CA, USA) relié au logiciel sXc 1800 (Figure 19). La présence de cet interrupteur permet de déterminer aléatoirement un guide d'ondes GSM-1800 actif et un guide d'ondes inactif (Sham). Il est alors possible de travailler en condition aveugle par un codage des données sous un format informatique. Ce n'est qu'une fois les données analysées que la fondation IT'IS décode les expositions.

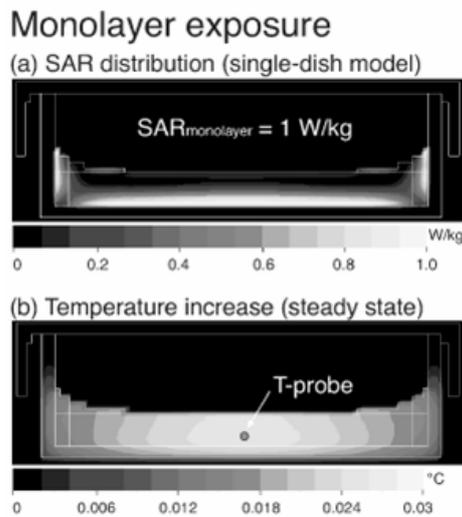


Figure 20 : Distribution du DAS (a) et de la température (b) dans une culture en monocouche dans une boîte de Pétri de 35 mm de diamètre, pour 1W incident. D'après Handbook de IT'IS.

La dosimétrie (Figure 20) réalisée sur ce système de guide d'ondes a montré une absorption énergétique homogène au niveau de la monocouche de cellules disposées en fond de boîte de Pétri, ainsi qu'une variation négligeable de température maximum de 0,02°C (à la puissance incidente de 1W).

Protocole expérimental à 1800 MHz

Le DAS expérimenté avec le signal GSM 1800 est de 2 W/kg. Tout comme pour le signal GSM-900, cette valeur correspondant à la limite autorisée pour l'exposition locale pour le public, nous nous plaçons en situation de pire cas.

Les cultures cellulaires sont placées dans les guides d'ondes installés dans l'incubateur et y sont maintenues pendant 3 heures avant l'exposition pour obtenir une température stable des

cultures. Les durées d'exposition testées varient entre 1 heure et 48 heures et les expositions ont été soit continues dans le temps, soit en intermittence 5 minutes ON et 10 minutes OFF. Les échantillons cellulaires codés sont récupérés en fin d'exposition puis traités en vue des différents paramètres étudiés.

Conditions d'exposition aux rayonnements UVB

Les expositions aux rayons UVB ont été réalisées à l'aide d'un « irradiateur » BioLink 312 nm (Fisher Bioblock, Illkirch, France). Les doses utilisées pour induire les divers processus cellulaires ont été les suivantes : 200, 300 et 600 mJ/cm² (la dose érythémale⁷ minimale étant de 33 mJ/cm²). Dans nos conditions, les cellules étaient exposées dans une boîte de Pétri de 35 mm de diamètre, fermée par un couvercle non scellé, remplie de 2 ml de PBS. L'irradiateur est conçu pour le séchage de gels en biologie moléculaire et ne permet pas de connaître la dose de rayonnement UVB reçue au niveau de la monocouche cellulaire. Il était donc important de réaliser des mesures à l'aide d'un radiomètre (Multi-Sense™ MS-100, Fisher Bioblock, Illkirch, France) dans les diverses conditions. Lors de l'exposition, les UVB atteignent la culture cellulaire après avoir traversé le couvercle et le PBS (Figure 21-A). La sonde de mesure étant placée sous la boîte de Pétri, la configuration la plus proche choisie pour les mesures est une boîte de Pétri sans couvercle contenant 2 ml de PBS (Figure 21-B). Les mesures obtenues étant données en mW/cm², nous avons converti ces valeurs en joules.

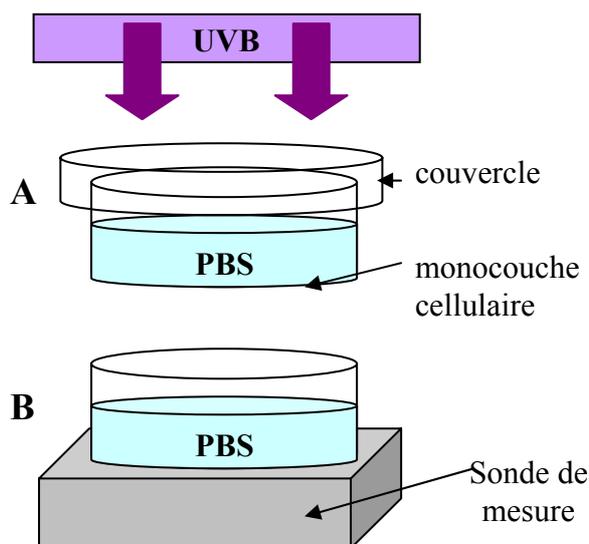


Figure 21 : Configurations d'exposition aux UVB.
A : en condition réelle d'exposition avec la culture cellulaire.
B : en condition de mesure de la dose UVB avec un radiomètre

⁷ dose érythémale minimale : quantité d'énergie à partir de laquelle apparaît un érythème

Les données mesurées et converties sont présentées dans le Tableau 2. Pour des raisons de reproductibilité, les doses indiquées dans les divers travaux correspondent aux doses de l'appareil et non à celles qui sont mesurées avec le radiomètre.

Tableau 2 : Mesures des doses UVB au niveau de la monocouche cellulaire en fonction de la dose de l'appareil et du temps d'exposition. Pour chaque dose, 3 mesures ont été réalisées.

	Dose appareil (mJ/cm ²)	Dose réelle moyenne ± sem (mJ/cm ²)
Cellule radiomètre + boite + PBS	600	336,6 ± 2,8
	300	170,7 ± 0,9
	200	117,0 ± 1,6
	100	64,6 ± 1,4

Les expérimentations *in vivo*

Le système d'exposition *in vivo* sera identique pour les études sur la peau et le cerveau, une seule distinction se fera quant au positionnement de l'antenne sur l'animal (Figure 22).

Le système d'exposition

Le système d'exposition locale *in vivo* utilisé est constitué de l'antenne-boucle émettant les RF et d'un système de contention de l'animal permettant un contrôle adéquat de l'exposition.

L'antenne-boucle est constituée d'une boucle en cuivre parcourue par un courant. Elle peut être positionnée pratiquement n'importe où sur le corps d'un animal, comme sur le flanc droit (études sur la peau) et au-dessus de la tête (études sur le cerveau). Ce système permet donc d'exposer des animaux de façon locale.

Le système de contention en plexiglas, appelé « fusée », est un anneau de plexiglas amovible sur lequel est placée l'antenne. Cette fusée de contention est faite de manière à ce que l'animal puisse respirer normalement (trous d'aération le long de la fusée avec ouverture au niveau buccal) et de manière à ce qu'il ne puisse pas se retourner afin d'obtenir une exposition locale stable et donc une dosimétrie correcte.

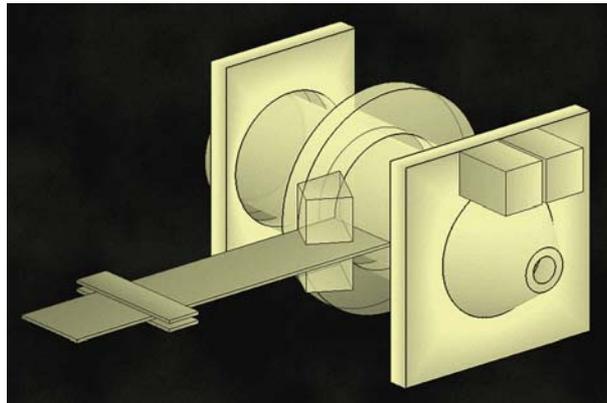


Figure 22 : Système d'exposition locale de la peau *in vivo*. Il est constitué d'une fusée de contention en plexiglass troué pour maintenir une aération constante et d'un anneau extérieur maintenant l'antenne boucle émettrice du signal GSM. Source : Ph. Lévêque, IXLIM, Limoges, image non publiée

Les animaux sont placés dans les fusées disposées dans une chambre anéchoïque. Cette dernière est constituée de parois recouvertes de matériau absorbant (blocs de mousse chargée de particules conductrices de carbone, de forme pyramidales). Elle contribue à minimiser voire annuler les réflexions sur les parois, et donc à éviter toute surexposition des animaux, ainsi que les éventuelles perturbations provenant de champs électromagnétiques environnants.

Deux types d'exposition sont réalisés, comme pour les cellules : l'une dite réelle avec alimentation des antennes, l'autre dite factice ou sham avec des antennes non alimentées. Les deux conditions sont placées dans la même chambre anéchoïque sans qu'il n'y ait perturbation entre les deux conditions. En effet, l'antenne-boucle a été conçue pour imiter au mieux une exposition à un téléphone mobile en terme de répartition de l'énergie absorbée (rapport entre la taille du téléphone et celle de la tête).

Dans le cas d'une exposition locale, le DAS maximal est obtenu à l'endroit placé devant l'antenne et le DAS correspondant considéré sur le corps entier est bien inférieur (si l'on compare avec une exposition corps entier, où le DAS est homogène sur le corps).

Protocole expérimental à 900 et 1800 MHz

Les signaux GSM sont réalisés grâce à une liaison de l'antenne à un générateur (RFS 1800-64, RFPA, Artigues-Près-Bordeaux, France), relié à un amplificateur (RF power amplifier, RF 1800-200, RFPA, Artigues-Près-Bordeaux, France), le tout placé hors de la chambre

anéchoïque pour ne pas perturber les antennes. Les effets de ces signaux GSM ont été étudiés sur la peau des rats. La distribution du DAS au niveau de la peau des animaux en fonction de la fréquence du signal GSM est donnée dans la Figure 23.

Après une semaine d'habitation progressive des animaux au système de contention, les animaux codés sont soumis soit à une exposition unique de 2 heures (appelée aussi exposition aiguë), soit à une exposition chronique, à raison de 2 heures quotidiennement sur 5 jours et sur une durée de 12 semaines. Des animaux sont exposés factivement dans les deux protocoles.

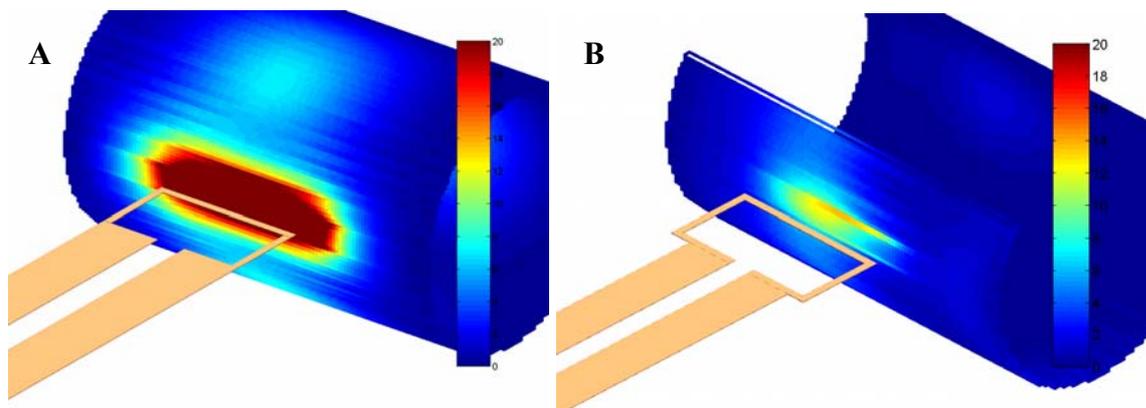


Figure 23 : Distribution du DAS sur la zone exposée du flanc de l'animal lors d'une exposition locale. A : signal GSM 900, B : signal GSM-1800. Source : Ph. Lévêque, IXLIM, Limoges, image non publiée

Les niveaux de DAS étudiés (DAS locaux) sont 0, 2,5 et 5 W/kg.

Les animaux sont sacrifiés immédiatement après la fin de l'exposition, dans le cas d'une exposition unique, ou 72 heures après dans le cas d'une exposition chronique. Sur chaque animal, un prélèvement cutané est réalisé sur le flanc exposé et sur le flanc opposé afin d'obtenir un contrôle interne. Les animaux étant codés, les prélèvements et les analyses consécutives sont réalisés en aveugle.

Protocole expérimental au signal UMTS

Le signal UMTS a été utilisé pour les études sur le cerveau. L'antenne-boucle est positionnée au-dessus de la tête de l'animal placé dans la fusée (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

Le générateur de signal UMTS (GUS 6960S, University of Wuppertal, Wuppertal, Allemagne) est couplé à un amplificateur (RF 14002600-10, RFPA, Artigues-Près-Bordeaux, France). Les deux appareils sont toujours placés en dehors de la chambre anéchoïque.

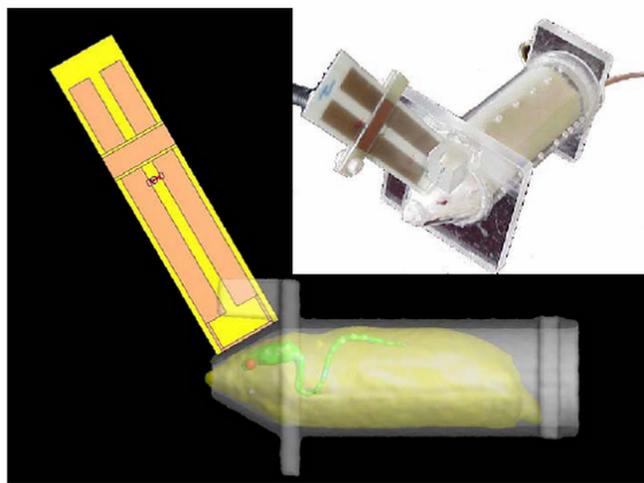


Figure 24 : Système d'exposition locale du cerveau *in vivo*. Positionnement de l'antenne au-dessus de la tête. D'après Lévêque (Lévêque et al. 2004)

Les animaux sont codés puis exposés 2 heures au signal UMTS ou sham-exposés, après une semaine d'habituation progressive au système de contention. Les niveaux de DAS étudiés sont 0, 2 et 10 W/kg. Immédiatement après l'exposition, les animaux sont sacrifiés. Les animaux étant codés, l'extraction du cerveau est réalisée en aveugle ainsi que le test consécutif à cette extraction.

- *Partie 2 : Interprétation des résultats : importance du choix du test statistique? (issu de www.cons-dev.org)*

L'utilisation des statistiques est primordiale pour aboutir à une bonne interprétation des résultats. Il n'est cependant pas évident de faire le bon choix de test statistique.

On dispose actuellement de nombreux tests statistiques différents qui peuvent être utilisés pour arriver à une décision concernant une hypothèse. Le choix doit se faire sur des bases et des critères rationnels :

- la façon dont l'échantillon a été réalisé,
- la nature de la population de laquelle a été tiré l'échantillon et
- la nature des mesures réalisées.

Il est donc très important de considérer la nature des données (observations) que l'on va tester. D'elle dépend la nature des opérations possibles et donc des statistiques utilisables dans chaque situation.

Les observations peuvent être soit quantitatives soit qualitatives.

Quantitatives

Les données quantitatives comprennent les dénombrements (ou comptages) et les mesures (ou mensurations) :

- Dans le cas des *dénombrements*, la caractéristique étudiée est une variable discrète ou discontinue, ne pouvant prendre que des valeurs entières non négatives (nombre de fruits par rameau, nombre de pétales par fleurs, nombre de tête de bétail..). Il suffit de compter le nombre d'individus affectés par chacune des valeurs (fréquences) de la variable.
- Dans le cas des *mesures*, la variable est de nature continue (hauteur, poids, surface, concentration, température..). Les valeurs possibles sont illimitées mais du fait des méthodes de mesures et du degré de précision de l'appareil de mesure, les données varient toujours de façon discontinue.

Les mensurations peuvent être réalisées dans deux échelles de mesure : *l'échelle de rapport* et *l'échelle d'intervalle*. Elles sont manipulables suivant les opérations de l'arithmétique:

- *L'échelle de rapport* est caractérisée par l'existence d'un zéro absolu et de distances de taille connue entre deux valeurs quelconque de l'échelle. C'est le cas de la mesure de la masse ou du poids. En effet, les échelles de mesure des poids en pounds ou en grammes ont toutes deux un zéro absolu et le rapport entre deux poids quelconque d'une échelle est indépendant de l'unité de mesure (le rapport des poids de deux objets mesurés en pounds et celui de ces mêmes objets mesurés en grammes sont identiques).
- Dans *l'échelle d'intervalle*, le point zéro et l'unité de mesure sont arbitraires mais les distances entre deux valeurs quelconques de l'échelle sont de taille connue. C'est le cas de la mesure de la température (échelle Fahrenheit ou Celsius).

Ces deux échelles sont compatibles avec l'utilisation de tests paramétriques.

Qualitatives

Les données qualitatives peuvent être assimilées au cas des variables discontinues, en supposant que les différentes variantes du caractère qualitatif sont rangées dans un ordre correspondant par exemple à la suite des nombres entiers positifs (différentes couleurs, différents degrés d'infection...).

Les données qualitatives peuvent être réalisées dans deux échelles de mesure : *l'échelle ordinale* et *l'échelle nominale*. Ces données ne sont pas manipulables par l'arithmétique :

- Dans *l'échelle ordinale* (de rangement), il existe une certaine relation entre les objets du type plus grand que, supérieur à, plus difficile que, préférée à.... Exemple : Les nombres de candidats à un examen obtenant les degrés A, B, C. Le degré A est meilleur que le degré B, lui-même meilleur que le degré C. Une transformation ne changeant pas l'ordre des objets est admissible. La statistique la plus appropriée pour décrire la tendance centrale des données est la médiane.
- Dans *l'échelle nominale*, les nombres ou symboles identifient les groupes auxquels divers objets appartiennent. C'est le cas des numéros d'immatriculation des voitures ou de sécurité sociale (chaînes de caractères). Le même nombre peut être donné aux différentes personnes habitant le même département ou de même sexe constituant des

sous-classes. Les symboles désignant les différentes sous-classes dans l'échelle nominale peuvent être modifiés sans altérer l'information essentielle de l'échelle. Les seules statistiques descriptives utilisables dans ce cas sont le mode, la fréquence... et les tests applicables seront centrés sur les fréquences des diverses catégories.

Ces deux dernières échelles ne permettent que l'utilisation de tests non paramétriques.

Une fois la nature précisée des observations, un panel de tests se présente avec des contraintes soit paramétriques soit non paramétriques.

Un test paramétrique requiert un modèle à fortes contraintes (normalité des distributions, homogénéité des variances) pour lequel les mesures doivent avoir été réalisées dans une échelle au moins d'intervalle. Ces hypothèses sont d'autant plus difficiles à vérifier que les effectifs étudiés sont plus réduits.

Un test non paramétrique est un test dont le modèle ne précise pas les conditions que doivent remplir les paramètres de la population dont a été extrait l'échantillon. Cependant certaines conditions d'application doivent être vérifiées. Les échantillons considérés doivent être aléatoires (lorsque tous les individus ont la même probabilité de faire partie de l'échantillon) et simples (tous les individus qui doivent former l'échantillon sont prélevés indépendamment les uns des autres), et éventuellement indépendants les uns des autres (emploi de tables de nombres aléatoires). Les variables aléatoires prises en considération sont généralement supposées continues.

On choisira les tests appropriés en fonction du type de mesure, de la forme de la distribution de fréquences et du nombre d'échantillons dont on dispose (Figure 25).

Nos travaux visent à déterminer l'effet des radiofréquences issues de la téléphonie mobile sur la peau et le cerveau en utilisant des modèles *in vitro* et *in vivo*.

Si nous reprenons les conditions d'expérimentation *in vitro* : 2 à 3 conditions indépendantes sont à considérer, l'échantillon sham et l'échantillon GSM avec le plus souvent l'échantillon contrôle positif.

Dans le cas des expérimentations *in vivo* : 4 à 5 conditions indépendantes sont à considérer, l'échantillon contrôle cage, l'échantillon sham, l'échantillon GSM ou UMTS 2 W/kg, l'échantillon GSM 4W/kg ou UMTS 10 W/kg avec parfois l'échantillon contrôle positif.

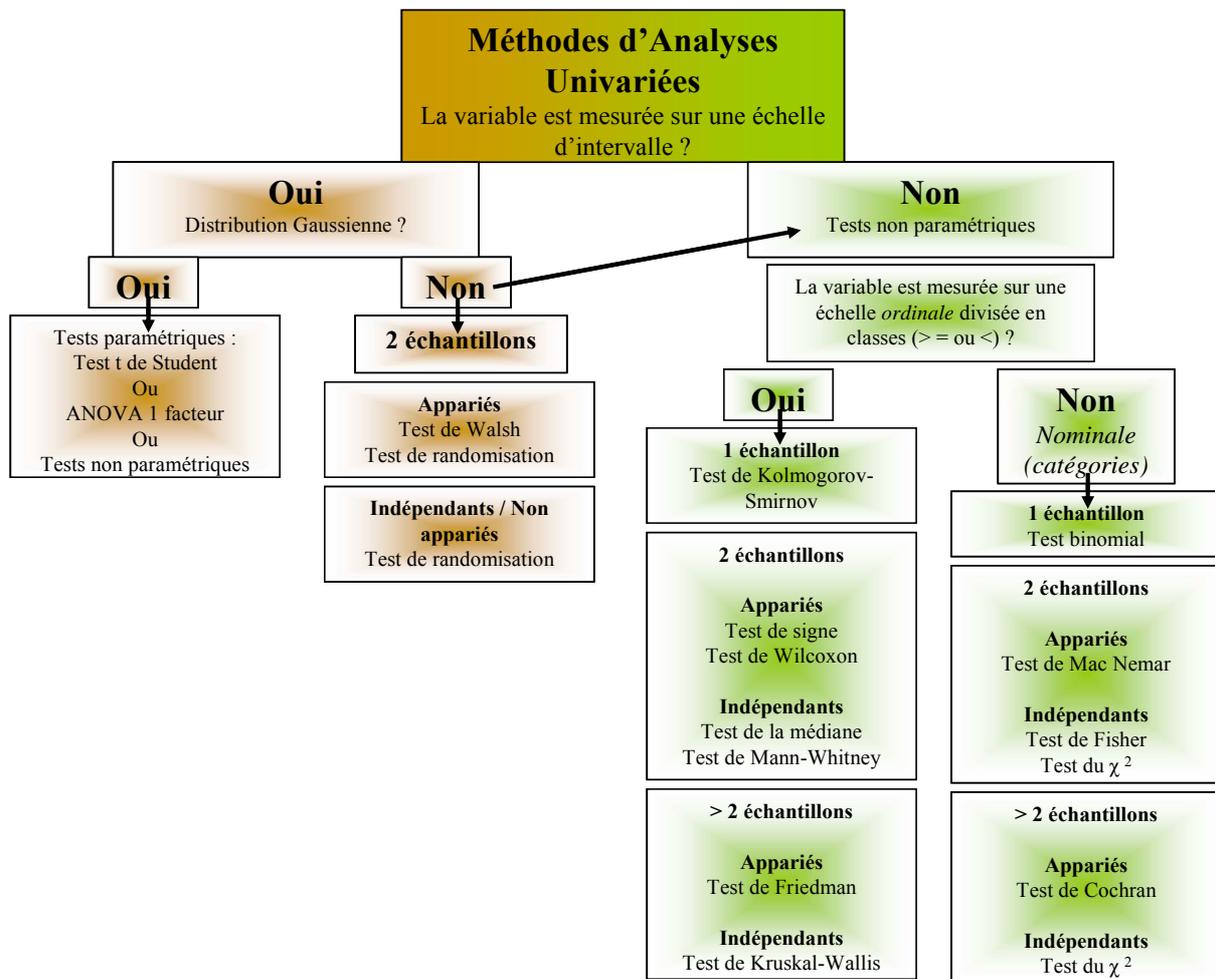


Figure 25 : Schéma de choix du test statistique en fonction des paramètres de mesures.

Les tests réalisés après exposition sont représentés par des mesures arbitraires ou réelles mais d'ordre quantitatif: expression des protéines de choc thermique en unité arbitraire (mesures semi-quantitatives par estimation de l'intensité de marquage), pourcentage d'apoptose induite, pourcentage d'ADN endommagé, épaisseur épidermique, prolifération cellulaire excessive (comptage du nombre de noyaux activés).

Il est estimé qu'une distribution se rapproche de la loi normale (distribution gaussienne ou courbe en cloche de la distribution) pour un minimum de $n=30$ en effectif par échantillon.

Nos expériences comptabilisent de 3 à 5 échantillons indépendants d'effectifs s'échelonnant de 3 à 15. Par rapport au diagramme de choix statistique, nos expériences se placent donc premièrement sur une échelle d'intervalle. Les différents échantillons ne sont pas caractérisés par une distribution gaussienne car la population dont ils sont issus est de distribution inconnue, et de plus, l'effectif des échantillons est de faible taille. Cependant, les différents

échantillons sont présumés suivre une échelle ordinale; en effet, si les contrôles positifs sont supposés être de classe supérieure aux contrôles factices (sham et/ou contrôle cage) et l'hypothèse de départ H_0 (test unilatéral à $p=0,05$) est l'induction d'un stress par les ondes, alors, l'échantillon exposé est supposé se situer entre sham et contrôle positif.

Dans notre expérimentation, le choix se porte donc sur un test non paramétrique. Pour un test avec 2 échantillons indépendants, le test choisi sera celui de Mann-Whitney, tandis que pour un tests avec plus de 2 échantillons indépendants, le test sera celui de Kruskal-Wallis. Il est cependant possible de réaliser des comparaisons entre deux échantillons provenant d'une expérience à plus de deux échantillons.

L'analyse statistique est avant tout une compréhension des données et de ce que l'on souhaite mettre en avant. Un rappel méthodologique permettant de cibler ce qui doit être important est présenté ici :

Avant tout traitement de données, se poser obligatoirement les questions suivantes :

- *Combien de variables (facteurs) à considérer (une, deux, plus)?*
- *Quel type de test : comparaison de moyennes, de variances, corrélation, ...?*
 - *Quel type d'échantillons : appariés ou indépendants?*
 - *Quel type de données (qualitative, quantitative, continue, etc.)?*
- *Quelle loi de distribution (normale ou non : tests paramétriques, non paramétriques)?*
 - *Quelles hypothèses H_0/H_1 (test uni ou bilatéral)?*
 - *Décision : utilisation du modèle statistique?*

Chapitre 3 : Travaux Personnels

- *Partie 1 : Approches in vitro*

Articles

ARTICLE 1 :

SANCHEZ S., MILOCHAU A., RUFFIE G., POULLETIER DE GANNES F., LAGROYE I., HARO E., SURLEVE-BAZEILLE JE, BILLAUDEL B., LASSEGUES M., VEYRET B..
Human skin cell stress response to GSM-900 mobile phone signals : an *in vitro* study on isolated primary cells and on reconstructed epidermis.

FEBS (accepté sous presse)

ARTICLE 2 :

SANCHEZ S., HARO E., RUFFIE G., VEYRET B. AND LAGROYE I.
In vitro study of the stress response of human skin cells to GSM-1800 mobile phone signals in comparison to UVB and heat shock

Radiation Research (accepté sous presse)

ARTICLE 3 :

SANCHEZ S., BALL, A.J., HARO E., RUFFIE G., VEYRET B., AND LAGROYE I..
Potential genotoxic effect of an *in vitro* exposure on human cutaneous (fibroblast) and nerve cells (SH-SY5Y, CHME-5) to GSM-1800 signal.

Mutation Research (soumis)

ARTICLE 1 : Human skin cell stress response to GSM-900 mobile phone signals : an *in vitro* study on isolated primary cells and on reconstructed epidermis.

SANCHEZ S., MILOCHAU A., RUFFIE G., POULLETIER DE GANNES F., LAGROYE I., HARO E., SURLEVE-BAZEILLE JE, BILLAUDEL B., LASSEGUES M., VEYRET B..
Human skin cell stress response to GSM-900 mobile phone signals : an *in vitro* study on isolated primary cells and on reconstructed epidermis.

FEBS, accepté, sous presse

Cet article traite des effets biologiques possibles du signal de téléphonie mobile GSM-900 sur la peau et plus précisément par le biais de l'étude du stress cellulaire. En effet, la peau, organe de protection de l'organisme, est la première cible d'agression environnementale et par là la première cible des ondes lors d'une communication téléphonique. Cet article présente les résultats d'expérimentations *in vitro* sur deux types de modèles cellulaires cutanés : des cellules primaires épidermiques (kératinocytes) et dermiques (deux sources de fibroblastes) et des modèles tridimensionnels d'épidermes reconstruits.

Le stress cellulaire se traduit par une réponse adaptée à une agression. Cette réponse peut être transitoire et suivant la gravité, irréversible, pouvant engendrer la mort cellulaire. Ici, nous avons supposé que le signal GSM-900 en exposition continue de 48 heures, au DAS de 2 W/kg, pouvait être un agent stressant et cette hypothèse a été testée par la détection de différents paramètres caractéristiques d'une réponse au stress : l'induction d'apoptose et la variation d'expression de protéines de choc thermique (HSP) pour les modèles de cultures en monocouche ; la variation d'expression d'HSP, l'épaisseur épidermique, la prolifération cellulaire pour les modèles tridimensionnels d'épidermes reconstruits.

Human skin cell stress response to GSM-900 mobile phone signals

In vitro study on isolated primary cells and reconstructed epidermis

Sandrine Sanchez¹, Alexandra Milochau², Gilles Ruffie¹, Florence Poulletier de Gannes¹, Isabelle Lagroye^{1,3}, Emmanuelle Haro¹, Jean-Etienne Surleve-Bazeille², Bernard Billaudel¹, Maguy Lassegues² and Bernard Veyret^{1,3}

¹ Bordeaux 1 University, Physics of Wave–Matter Interaction (PIOM) Laboratory, ENSCPB, Pessac, France

² Bordeaux 1 University, Laboratory of Cell Defence and Regulation Factors, EA1915, Talence, France

³ Bioelectromagnetics Laboratory, EPHE, ENSCPB, Pessac, France

Keywords

fibroblasts; keratinocytes; mobile phone signal; skin; 3D skin model

Correspondence

S. Sanchez, Physics of Wave–Matter Interaction (PIOM) Laboratory, ENSCPB, 16 Avenue Pey-Berland, F-33607 Pessac Cedex, France

Fax: +33 5 40 00 66 31

Tel: +33 5 40 00 69 65

E-mail: s.sanchez@enscpb.fr

(Received 31 July 2006, revised 10 October 2006, accepted 17 October 2006)

doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05541.x

In recent years, possible health hazards due to radiofrequency radiation (RFR) emitted by mobile phones have been investigated. Because several publications have suggested that RFR is stressful, we explored the potential biological effects of Global System for Mobile phone communication at 900 MHz (GSM-900) exposure on cultures of isolated human skin cells and human reconstructed epidermis (hRE) using human keratinocytes. As cell stress markers, we studied Hsc70, Hsp27 and Hsp70 heat shock protein (HSP) expression and epidermis thickness, as well as cell proliferation and apoptosis. Cells were exposed to GSM-900 under optimal culture conditions, for 48 h, using a specific absorption rate (SAR) of $2 \text{ W}\cdot\text{kg}^{-1}$. This SAR level represents the recommended limit for local exposure to a mobile phone. The various biological parameters were analysed immediately after exposure. Apoptosis was not induced in isolated cells and there was no alteration in hRE thickness or proliferation. No change in HSP expression was observed in isolated keratinocytes. By contrast, a slight but significant increase in Hsp70 expression was observed in hREs after 3 and 5 weeks of culture. Moreover, fibroblasts showed a significant decrease in Hsc70, depending on the culture conditions. These results suggest that adaptive cell behaviour in response to RFR exposure, depending on the cell type and culture conditions, is unlikely to have deleterious effects at the skin level.

Cell stress may be defined as a phenomenon involving a stress factor able to induce physiological changes and responses in cells. A single increase in temperature [1] or other more aggressive factors, such as chemical agents [2] and UV radiation [3], as well as some normal physiological conditions, such

as differentiation [4], induce complex stress responses. In view of the ubiquitous character of heat shock proteins (HSP; a large family of proteins of 15–110 kDa) and the fact that they are induced under various stress conditions, this protein family is a major component of the cell stress response. HSP

Abbreviations

ALI, air–liquid interface; ANX, annexin V; AU, arbitrary units; DDD, dead de-epidermised dermis; FITC, fluorescein isothiocyanate; GSM, global system for mobile communication; hFGF, human fibroblast growth factor; hRE, human reconstructed epidermis; Hsc70, heat shock cognate protein at 73 kDa; HSP, heat shock protein; Hsp27 or Hsp70, heat shock protein at 27 or 72 kDa; NHDFc, normal human dermal fibroblasts from Cambrex; NHDFe, extracted normal human dermal fibroblasts; NHEK, normal human epidermal keratinocytes; PI, propidium iodide; RFR, radiofrequency field radiation; SAR, specific absorption rate.

expression under stress conditions has been reported in a number of cell types, including skin cells. The major HSPs expressed in the skin [5] are Hsp70 (both cognate and inducible forms) [6] and Hsp27 (expressed in a constitutive way as a function of cell differentiation status) [7,8].

The stress response in skin cells also involves inflammatory processes (cytokine release) [9], irreversible changes at the molecular level (misfolded proteins, DNA breaks) [10], leading to apoptotic (i.e. sunburn cells or apoptotic keratinocytes in skin after high UV exposure) or necrotic pathways [11,12] and, in the worst case, to neoplastic transformed cells (i.e. melanoma) [13,14].

In recent years, possible health hazards due to radio-frequency radiation (RFR) emitted by mobile phones have been under debate. Because of the very fast development of this new technology (over one billion users worldwide in 2006), public concern has grown rapidly. In Europe, the main technology is the Global System for Mobile communication (GSM), operating with carrier frequencies of 900 and 1800 MHz. During a phone call, the mobile phone is placed on the ear and, thus, on the skin. Maximum energy absorption takes place in the skin (half of the energy emitted by the phone) and decreases rapidly with depth. Phone use is associated with a slight temperature increase ($\sim 1^\circ\text{C}$ in the skin of the pinna) [15]. However, this is mainly due to heating by the phone battery and not to absorbed RFR [15]. In this research, we focused solely on the effects of RFR and temperature was maintained at $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ during exposure.

The skin is subjected to various environmental factors, including electromagnetic fields, e.g. GSM-900 radiation and RFR from television and radio broadcasting and mobile telephones. Although the effects of UV have been widely investigated, very little is known about the biological effects of RFR on the skin. In this study, we investigated the potential cell stress induced in skin cells by exposure to GSM-900 signals.

The skin is a complex structure consisting of several cell types. The superficial layer, or epidermis, is composed of keratinocytes (95%) and melanocytes (5%), whereas the deeper layer, or dermis, contains mainly fibroblasts. Toxicological studies on the skin are mainly carried out using keratinocytes and fibroblasts *in vitro*. Over the last 30 years, human reconstructed epidermis (hRE) has been a well-established model of a 3D structure with characteristics known to be similar to real epidermis [16]. It is used for repairing burned skin (autograft) [17], in dermatological investigations of skin diseases [18,19] and UV damage [20], or for testing the efficacy of new

sunscreens [21]. Absorption of RFR emitted by mobile telephones is stronger in the skin than in the brain, as Keshvari *et al.* demonstrated on child and adult heads [22] and, thus, the epidermal 3D model is a relevant skin cellular model, complementary to isolated cells.

In this study, we used human cutaneous cells and hRE to test the hypothesis that exposure to RFR results in cell stress response. The modulatory effect of GSM-900 exposure on apoptosis induction, epidermis thickening, cell proliferation and HSP expression was analysed. We observed that, although RFR exposure did not induce apoptosis, cell overproliferation and inflammation, it did affect HSP expression in fibroblasts and hRE.

Results

Human skin cells

GSM-900 signal did not induce apoptosis or affect HSP expression in normal human epidermal keratinocytes

As shown in Fig. 1A, in normal human epidermal keratinocytes (NHEK), the percentage of viable, apoptotic and necrotic cells did not vary ($n = 5$), irrespective of exposure condition (RFR or sham exposure). By contrast, UVB irradiation induced apoptosis ($n = 3$).

Four independent experiments tested for the presence of Hsc70, Hsp70 and Hsp27. As shown in Fig. 2A,B,D,E, NHEK cells expressed Hsc70 in a constitutive way, mainly in the cytoplasm, with some nuclear granules. This specific expression was unchanged by GSM-900 exposure (Figs 2B,E and 5A), in contrast to UVB, which induced a strong cytoplasmic expression without nuclear granules (Fig. 2C,F).

Hsp27 expression had a different pattern (Fig. 3). It was mainly cytoplasmic and nuclear (Fig. 3A,B,D,E) and remained unchanged after GSM-900 exposure (Fig. 5A), in contrast to UVB, which induced strong expression in all compartments.

Hsp70 was expressed in NHEK at a basal level, as shown in Fig. 4. The keratinocytes expressed Hsp70 in their cytoplasm and nucleus, both under sham and GSM-exposure conditions (Fig. 5A), whereas UVB induced a weak cytoplasmic and a strong nuclear expression, with some granules.

In our study, the $2\text{ W}\cdot\text{kg}^{-1}$ GSM-900 signal did not induce phosphatidylserine translocation in NHEK cells and therefore did not trigger apoptosis. Moreover, no alteration in HSP expression was observed. Thus, GSM-900 did not induce cell stress in human primary epidermal keratinocytes.

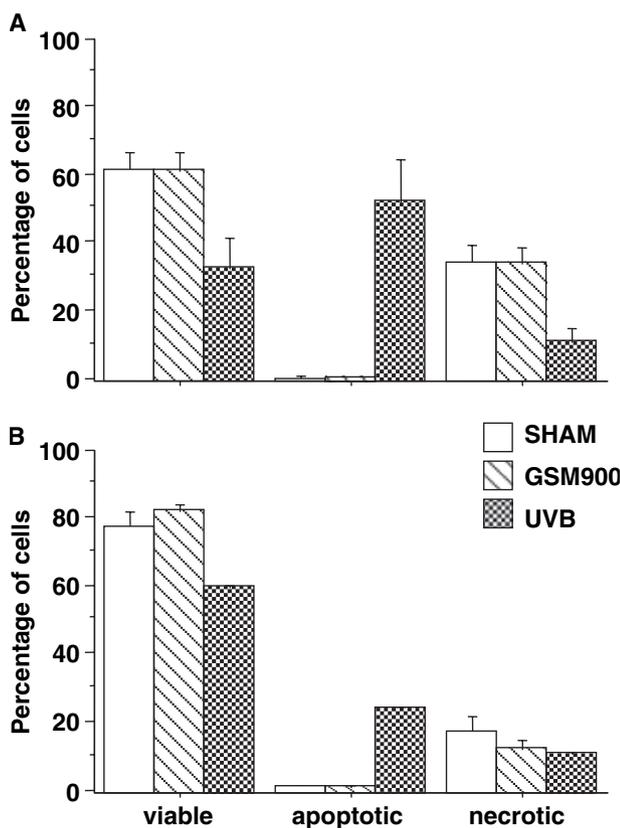


Fig. 1. Apoptosis detection in human primary epidermal and dermal cells. Cells were analysed by flow cytometry using ANX-FITC/PI. The percentage of viable, apoptotic and necrotic cells was determined by quadrant analysis. (A) Keratinocytes exposed to GSM-900 ($2 \text{ W}\cdot\text{kg}^{-1}$, 48 h, $n = 5$); keratinocytes irradiated with UVB ($600 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ single dose $n = 3$); (B) fibroblasts exposed to GSM-900 ($2 \text{ W}\cdot\text{kg}^{-1}$, 48 h, $n = 5$), fibroblasts irradiated with UVB ($600 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ single dose, $n = 2$). The data are presented as the mean \pm SEM. The Mann-Whitney unpaired test was used for each cell type with a minimum of three independent experiments were carried out.

GSM-900 did not induce apoptosis or affect Hsp27 and Hsp70 expression, but it did modify Hsc70 expression in extracted normal human dermal fibroblasts

As shown in Fig. 1B, the percentage of apoptotic extracted normal human dermal fibroblast (NHDFc) cells after GSM-900 exposure did not vary compared with sham-exposed cells. Similar results were obtained for the percentage of necrotic versus viable cells ($n = 5$). UVB radiation induced a strong effect as shown by a 10-fold increase in the percentage of apoptotic cells ($n = 3$).

Hsp expression was studied in each independent experiment ($n = 3$). Hsc70 expression was essentially cytoplasmic (Fig. 2G–L) and a significant decrease in

labelling intensity was observed after GSM exposure (Fig. 5B): 3.5 ± 0.1 arbitrary units (AU) for sham condition versus 2.1 ± 0.3 AU for GSM condition ($P = 0.05$). After UVB exposure, a stronger Hsc70 expression was noticed in the cytoplasm with perinuclear aggregation.

Hsp27 expression was only cytoplasmic and remained unchanged after GSM exposure (Figs 3G,H,I,K and 5B), whereas it was expressed in both cytoplasm and nucleus in NHDFc human fibroblasts after UVB treatment (Fig. 3L).

A very low cytoplasmic Hsp70 level (Fig. 4G,H,I,K) was observed in NHDFc and remained unchanged after GSM exposure (Fig. 5B). By contrast, UVB treatment induced strong Hsp70 expression in both cytoplasm and nucleus.

Finally, we did not observe apoptotic induction in NHDFc, or any alteration in Hsp27 and Hsp70 expression, whereas Hsc70 expression decreased. Thus the GSM-900 signal apparently interacted with Hsc70 in NHDFc human primary dermal fibroblasts.

The effect on Hsc70 in NHDFc observed after GSM-900 exposure was not observed in NHDFc

In order to confirm this decrease in Hsc70 in fibroblasts, we used another source of normal human cells: NHDFc were purchased from Cambrex (Verviers, Belgium) and cultured using fibroblast growth medium different to that used for NHDFc. The three HSP were assayed after five independent experiments.

As shown in Fig. 6, the HSP expression pattern was different in NHDFc as compared with NHDFc. In particular, Hsc70 (Fig. 6A–C) was mainly expressed in the nuclei of control NHDFc. This expression pattern was not affected by GSM-900 exposure (Fig. 6J), whereas after UVB irradiation, strongly fluorescent Hsc70 aggregates appeared in the NHDFc nuclei.

Hsp27 was strongly expressed in the cytoplasm of control NHDFc (Fig. 6D), whereas it was found essentially in the nucleus and not in the whole cell after UVB exposure (Fig. 6F). By contrast, GSM-900 did not alter Hsp27 expression (Fig. 6J).

In the case of Hsp70 (Fig. 6G–I), instead of being expressed only in the cytoplasm as in NHDFc, it was also expressed in the nucleus. UVB exposure induced a slight increase in Hsp70 expression, with a more perinuclear pattern. No change in expression was observed for this HSP after GSM exposure, as shown in Fig. 6J.

In contrast to the case of NHDFc cells, exposure to GSM-900 did not induce cell stress in NHDFc cells.

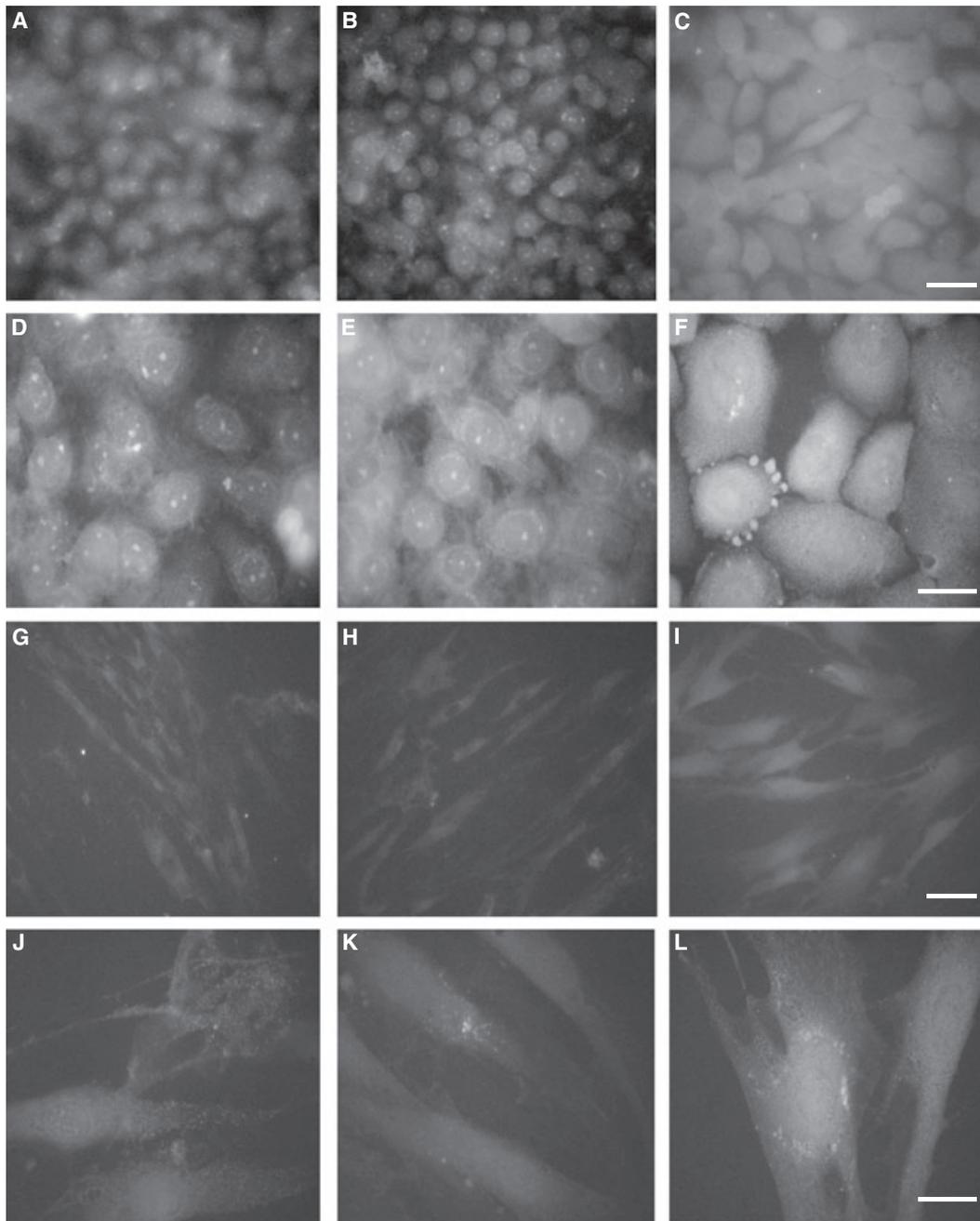


Fig. 2. Hsc70 expression in human primary epidermal and dermal cells. Hsc 70 was immunodetected with FITC-labelled antibodies. (A–F) Hsc70 expression in NHEK; (G–L) Hsc70 expression in NHDFe. (A–C, G–I) Views of Hsc70 expression at $\times 400$ magnification; (A, G) sham exposure; (B, H) GSM-900 exposure ($2 \text{ W}\cdot\text{kg}^{-1}$, 48 h); (C, I) UVB irradiation ($200 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ single dose, 4 h post exposure). Scale bar: $50 \mu\text{m}$. (D–F, J–L) Views of Hsc70 expression at $\times 1000$ magnification. (D, J) Sham exposure; (E, K) GSM-900 exposure; (F, L) for UVB irradiation ($200 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ single dose, 4 h post exposure). Scale bar: $25 \mu\text{m}$.

Human reconstructed epidermis

GSM-900 did not induce an inflammatory process in hRE

In these experiments using haematoxylin/eosin-stained reconstructed epidermis (Fig. 7), we noticed that skin

thickness increased with time of culture, indicating a differentiation process of the epidermis. This thickening was observed under RFR exposure as well as sham conditions, without any significant difference [in both conditions, $n = 7$ hRE at the air–liquid interface (ALI) after 2 weeks in culture, $n = 4$ at ALI after 3 weeks

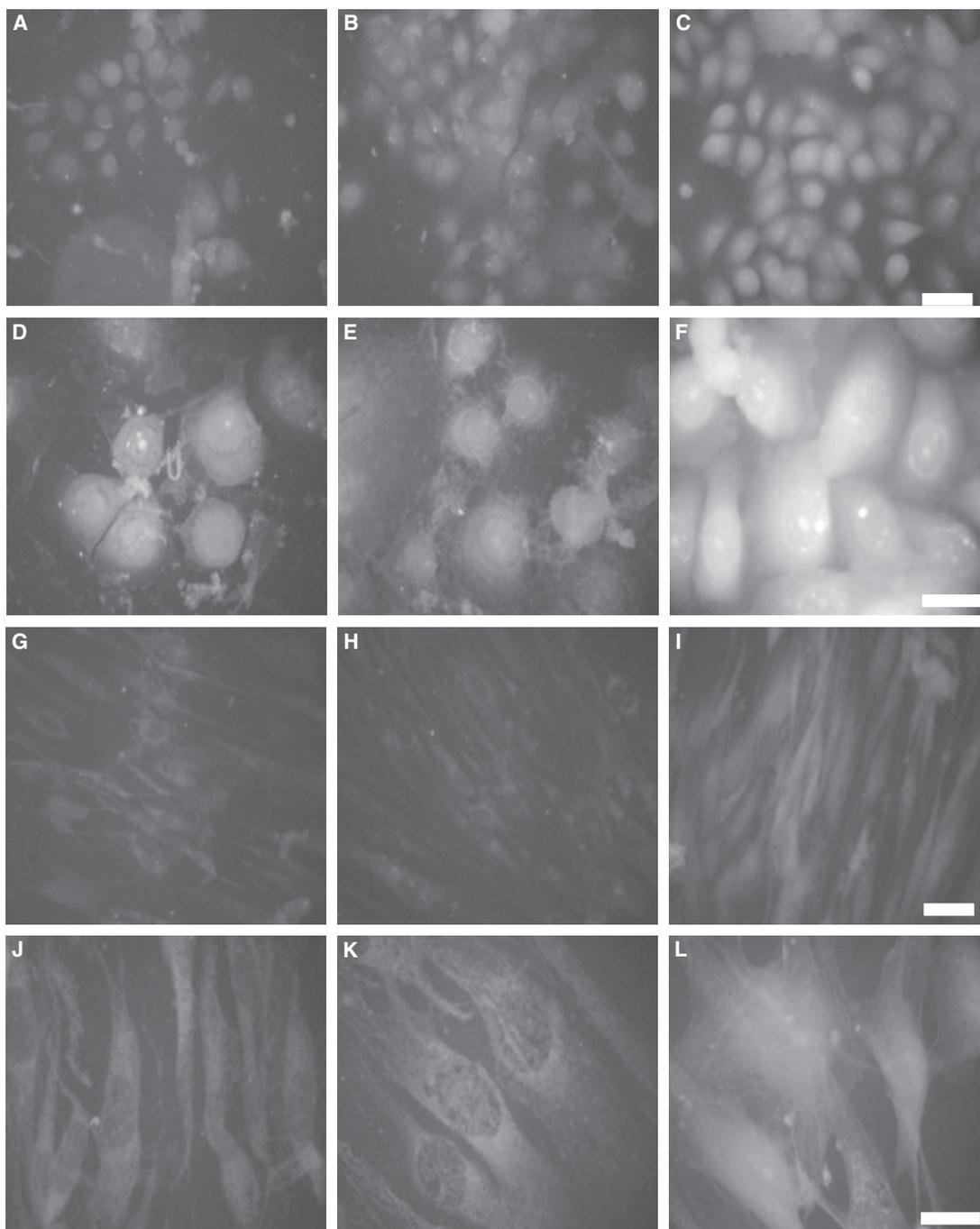


Fig. 3. Hsp27 expression in human primary epidermal and dermal cells. Hsp27 was immunodetected with FITC-labelled antibodies. (A–F) Hsp27 expression in NHEK; (G–L) Hsp27 expression in NHDfE. (A–C, G–I) Views of Hsp27 expression at $\times 400$ magnification; (A, G) sham exposure; (B, H) GSM-900 exposure ($2 \text{ W}\cdot\text{kg}^{-1}$, 48 h); (C, I) UVB irradiation ($200 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ single dose, 4 h post exposure). Scale bar: $50 \mu\text{m}$. (D–F, J–L) Views of Hsp27 expression at $\times 1000$ magnification; (D, J) sham exposure; (E, K) GSM-900 exposure ($2 \text{ W}\cdot\text{kg}^{-1}$, 48 h); (F, L) UVB irradiation ($200 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ single dose, 4 h post exposure). Scale bar: $25 \mu\text{m}$.

and $n = 6$ at ALI after 5 weeks]. Epidermal thicknesses measured in ALI cultures under sham and GSM-900 exposure were, respectively: 41.5 ± 8.7 and $37.9 \pm 6.8 \mu\text{m}$ after 2 weeks, 56.6 ± 9.9 and

$45.0 \pm 8.1 \mu\text{m}$ after 3 weeks and 57.4 ± 1.2 and $54.3 \pm 1.5 \mu\text{m}$ after 5 weeks. No epidermal lesions were observed. Thus GSM-900 signals did not induce inflammation or hyperplastic effects.

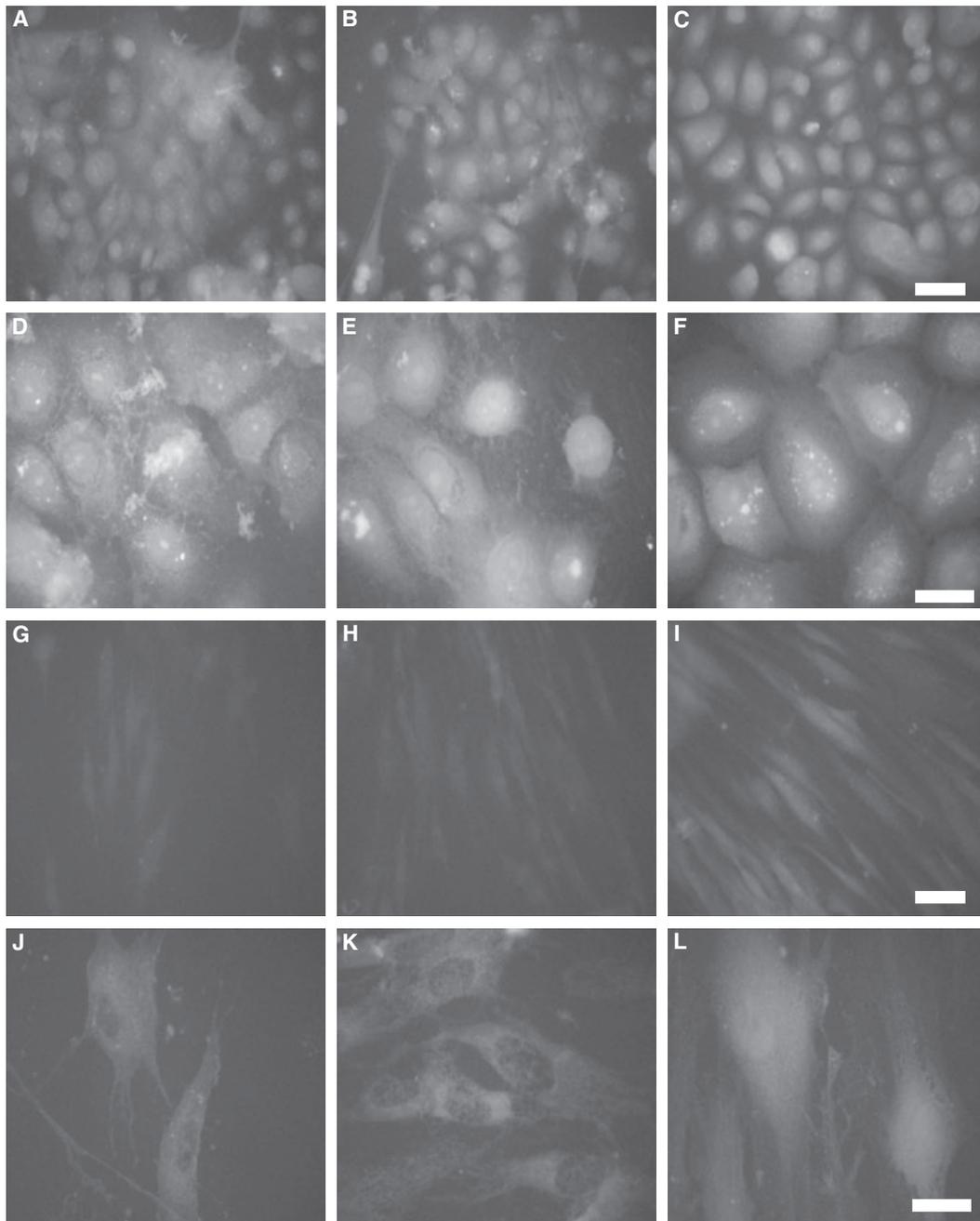


Fig. 4. Hsp70 expression on human primary epidermal and dermal cells. Hsp70 was immunodetected with FITC-labelled antibodies. (A–F) Expression in NHEK; (G–L) expression in NHDFe. (A–C, G–I) Enlarged views of Hsp70 expression at $\times 400$ magnification; (A, G) sham exposure; (B, H) GSM-900 exposure ($2 \text{ W}\cdot\text{kg}^{-1}$, 48 h); (C, I) UVB irradiation ($200 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ single dose, 4 h post exposure). Scale bar: $50 \mu\text{m}$. (D–F, J–L) Enlargements of Hsp70 expression at $\times 1000$ magnification; (D, J) sham exposure; (E, K) GSM-900 exposure ($2 \text{ W}\cdot\text{kg}^{-1}$, 48 h); (F, L) UVB irradiation ($200 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ single dose, 4 h post exposure). Scale bar: $25 \mu\text{m}$.

GSM-900 signal did not induce overproliferation in hRE

Ki-67-positive cells showed brown nuclei (Fig. 8A). Quantification of activated nuclei in control (sham-

exposed) reconstructed epidermis showed a basal expression in the number of activated nuclei as well as a decreasing trend over time in culture. This decrease was consistent with the fact that there was no cell renewal in the basal layer in this limited 3D model.

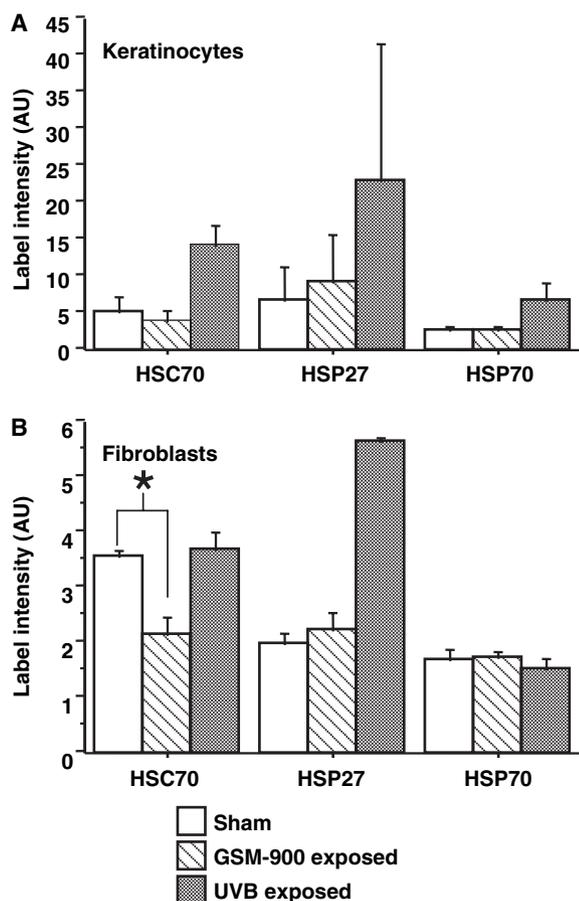


Fig. 5. HSP expression in human primary epidermal and dermal cells. Expression of Hsc70, Hsp27 and Hsp70 was semiquantified using APHELION® image analysis software. (A, B) HSP expression was expressed as the mean fluorescence intensity (AU; mean \pm SEM). (A) Keratinocytes ($n = 4$ independent experiments); (B) fibroblasts NHDFe ($n = 3$ independent experiments). The Mann-Whitney unpaired test was used for statistical comparison.

The number of activated nuclei did not vary significantly between RFR- and sham-exposed samples, as shown in Fig. 8B. The number of Ki-67-positive cells for sham versus GSM was, respectively: 4.4 ± 0.9 versus 3.2 ± 0.9 nuclei after 2 weeks in ALI culture ($n = 7$ hRE); 2.0 ± 0.7 versus 1.2 ± 0.3 nuclei after 3 weeks in ALI culture ($n = 4$ hRE) and 0.6 ± 0.2 versus 1.5 ± 0.9 nuclei after 5 weeks in ALI culture ($n = 6$ hRE). Thus, GSM-900 exposure did not induce any lesions or cell overproliferation in hRE.

GSM-900 enhanced Hsp70 expression in aged hRE

As shown in Fig. 9, expression of the various HSPs was specifically localized. Hsc70 was mainly expressed in the basal layer with a gradual decrease towards the cornified

layer. Hsp27 was expressed in all layers except the prickly and cornified layers. Hsp70 was very weakly expressed and mainly located in the basal layers, but not in the cornified layer. The cornified layer is characterized by the presence of dead cells; as the fate of these cells is desquamation, only their keratinized cytoplasm can be observed. Statistical analysis (Fig. 10) showed that Hsc70 expression was not altered by GSM-900 exposure but varied with the age of the culture. Indeed, there was a significant decrease ($P = 0.039$) in Hsp70 expression under sham conditions between 2 and 5 weeks in culture ($n = 7$ hRE at 2 weeks ALI, $n = 4$ hRE at 3 weeks ALI and $n = 6$ hRE at 5 weeks ALI). Hsp70 expression was identical for both exposure conditions after 2 weeks in culture, but expression decreased in the sham-exposed samples and remained constant under GSM-900 exposure after 3 weeks (sham = 51.4 ± 0.8 AU, GSM = 56.4 ± 1.3 AU; $P = 0.02$) and 5 weeks (sham = 53.45 ± 0.51 AU, GSM = 56.24 ± 0.47 AU; $P = 0.004$). However, no change in Hsp27 expression was observed. Thus, $2 \text{ W} \cdot \text{kg}^{-1}$ GSM-900 exposure for 48 h altered Hsp70 expression in hRE after a long culture period.

Discussion

We tested the possible induction of cell stress in the skin by $2 \text{ W} \cdot \text{kg}^{-1}$ GSM-900 exposure for 48 h.

No apoptosis was induced in either skin cell type, in agreement with reports of other *in vitro* studies concluding that mobile phone signals did not affect apoptosis in various cell systems [35–37]. However, it is known from the literature that apoptosis may be inhibited by proteins, such as HSPs, at various stages in this process [38,39]. Therefore, we investigated HSP expression in skin cells, combined with apoptosis detection. No induction or variation in HSP expression was detected in epidermal cells. Moreover, 48 h exposure to GSM-900 had no effect on Hsp27 or Hsp70 expression in NHDFe human primary dermal fibroblasts (isolated in the laboratory). However, a significant decrease in Hsc70 expression was seen in these dermal cells after exposure to GSM-900, whereas UVB exposure had the opposite effect.

Analysis of the role of Hsc70 in cell physiology and the possible impact of a high constitutive or decreased expression may help us to understand the effects seen in this study.

Although Hsc70 is usually considered to be a constitutive protein, it may be induced following mitogenic activation or stress [40]. This was confirmed by our data for Hsc70 after UVB radiation. The major role of Hsc70 is to chaperone misfolded proteins resulting

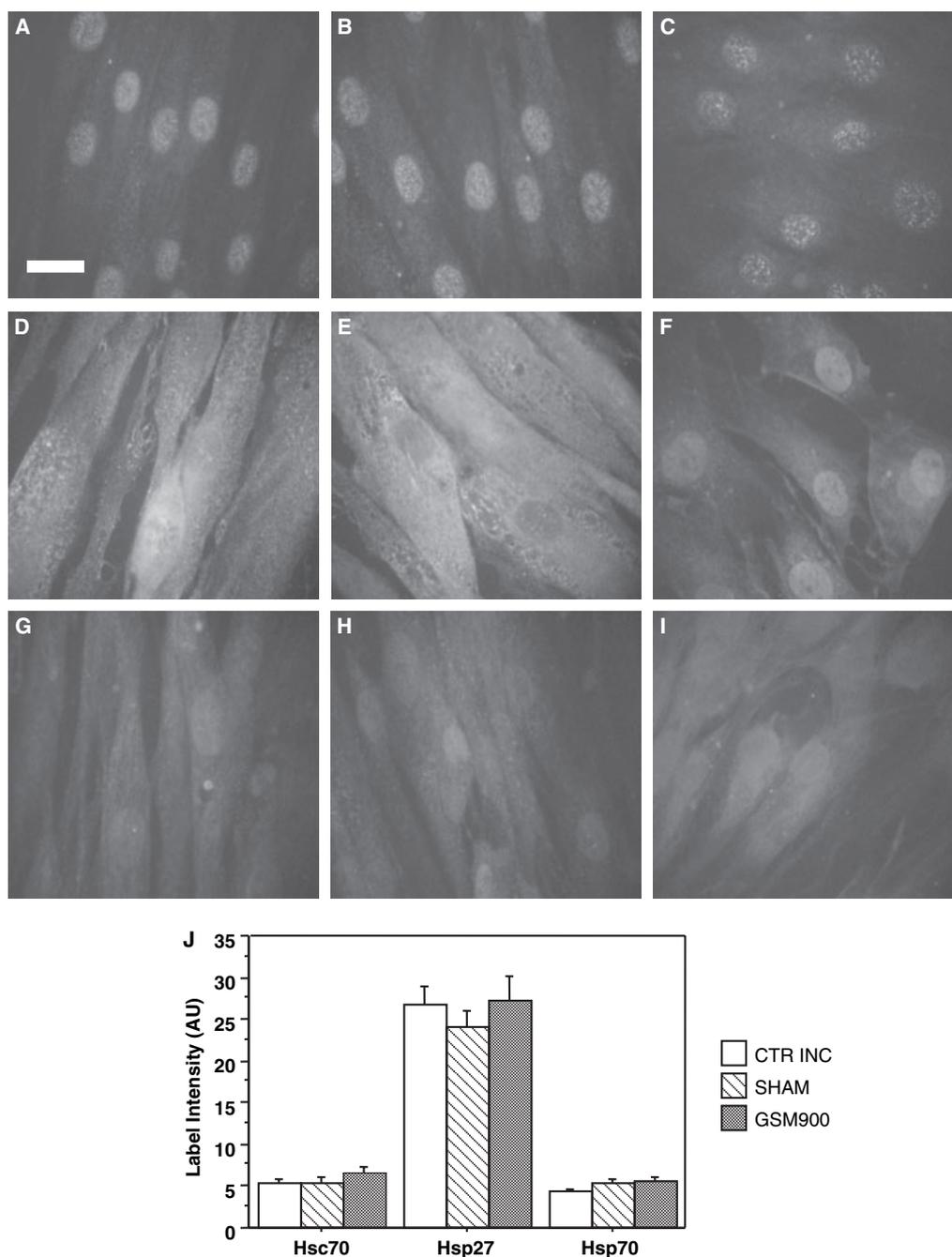


Fig. 6. HSP expression in human primary dermal cells NHDFc. Hsc70, Hsp27 and Hsp70 were immunodetected with FITC-labelled antibodies. (A–C) Hsc70 expression; (D–F) Hsp27 expression; (G–I) Hsp70 expression, all at the $\times 1000$ magnification (Scale bar: 25 μm). (J) Semi-quantification of the expression of Hsc70, Hsp27 and Hsp70 in NHDFc after image analysis of five independent experiments. HSP expression was expressed as the mean fluorescence intensity (AU; mean \pm SEM). The Mann–Whitney unpaired test was used for statistical comparison.

from a wrong translation or the action of a stress factor [41]. This chaperoning function causes the unfolded proteins to be refolded or eliminated. In the latter case, Hsc70 is involved in transporting the unfolded proteins to the lysosoma [42,43]. The destruction of nonfunc-

tional proteins is common to every cell type, to avoid protein aggregation and involves several processes, including lysosoma, heterophagy (endocytosis), macroautophagy (phagosoma) and proteosoma [44]. Lysosoma activity is essential for cells. For keratinocytes, the

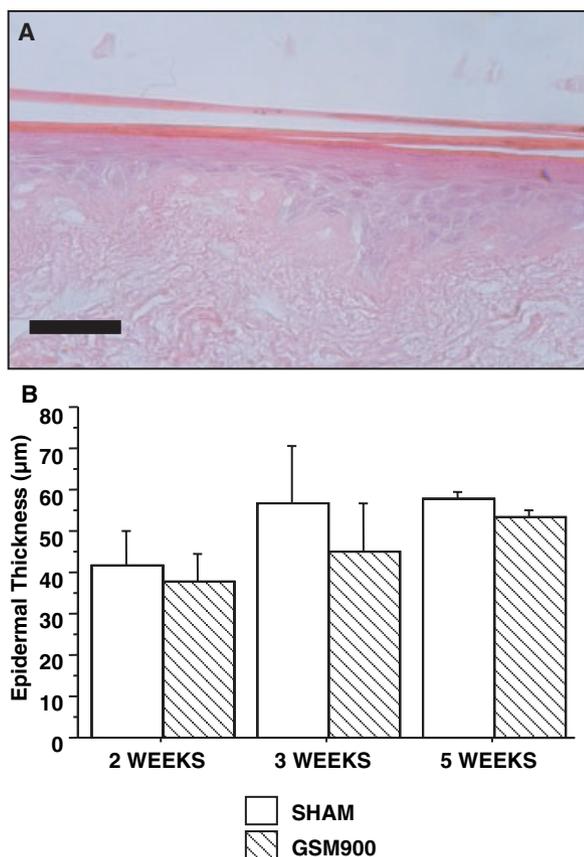


Fig. 7. hRE thickness. Thickness was measured on haematoxylin/eosin-stained slices. (A) hRE stained with haematoxylin/eosin; (B) histogram represents hRE thickness in μm (mean \pm SEM) according to the treatment (GSM-900, SHAM or UVB) and time in culture. The number of hRE per condition (GSM or SHAM) was seven after 2 weeks in ALI culture, four after 3 weeks in ALI culture and six after 5 weeks in ALI culture. The Mann-Whitney unpaired test was used for statistical comparison.

increase in this activity seems to be involved in cellular differentiation to corneocytes [44a,44b]. On the contrary, for fibroblasts, a decrease of lysosomal activity appears to be characteristic of cell senescence [44c] both increase and decrease participate in cell death of epidermal and dermal cells.

Previous research on fibroblasts has shown that low-level Hsc73 expression in hepatic fibroblasts from old rats was linked to decreased lysosomal activity [45], but this was not the case with hepatic fibroblast from young animals. This difference was not reflected in human fibroblasts. Other results [46] have shown that HSP levels increased (Hsp27, 70, 90 and Hsc70) in late-passage senescent human fibroblasts, indicating an adaptive response to cumulative intracellular stress during ageing. Thus, the role of Hsc70 activity in senescent mammalian cells is not clear. It is difficult to

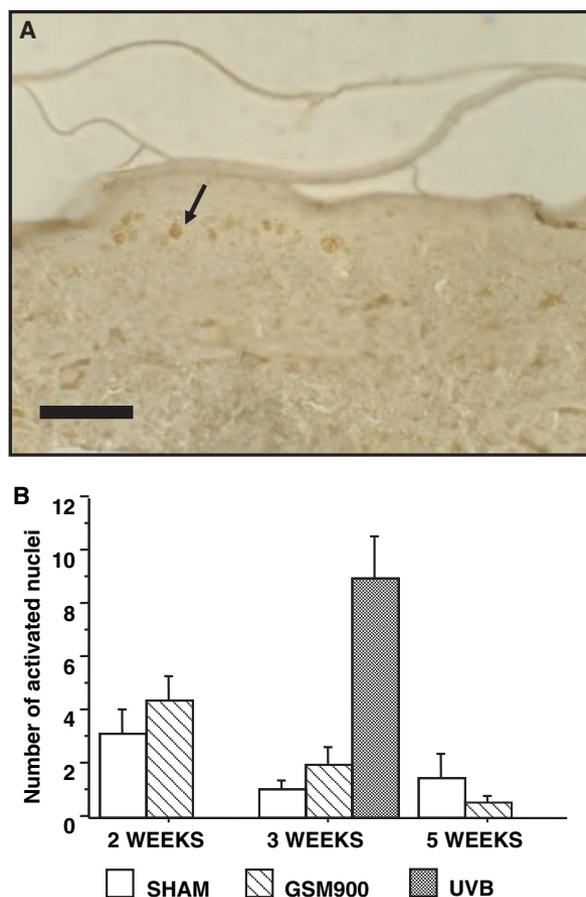


Fig. 8. Cell proliferation in hRE. Proliferation was measured by counting the number of activated nuclei labelled with the Ki-67 marker in hRE (immunodetection by peroxidase/3,3'-diaminobenzidine staining). (A) Activated nuclei (Ki-67 positive nuclei) are stained by a strong brown colour (black arrow); (B) histogram (mean \pm SEM) representing the number of activated nuclei as a function of treatment (GSM-900, SHAM or UVB) and time in culture. The number of hRE per condition (GSM $2 \text{ W}\cdot\text{kg}^{-1}$, 48 h or SHAM) was seven after 2 weeks in ALI culture, four after 3 weeks ALI and six after 5 weeks ALI. The Mann-Whitney unpaired test was used for statistical comparison.

understand the role of this protein as HSP expression patterns vary from one cell type to another [47].

Cell senescence does not provide a possible explanation for the effects observed in our study, as the donors were aged 20–50 years and we observed the same trend towards a decrease in Hsc70 following exposure to RFR in every single experiment using NHDFe (data not shown). Moreover, the failure in induction of cell death after GSM-900 exposure did not support the cell senescence characteristics.

Another event that may explain a decrease in Hsc70 expression in NHDFe is the thermotolerance phenomenon. Inducible HSP forms are synthesized and accumulated within 6 h after heat shock [48,49]. If a

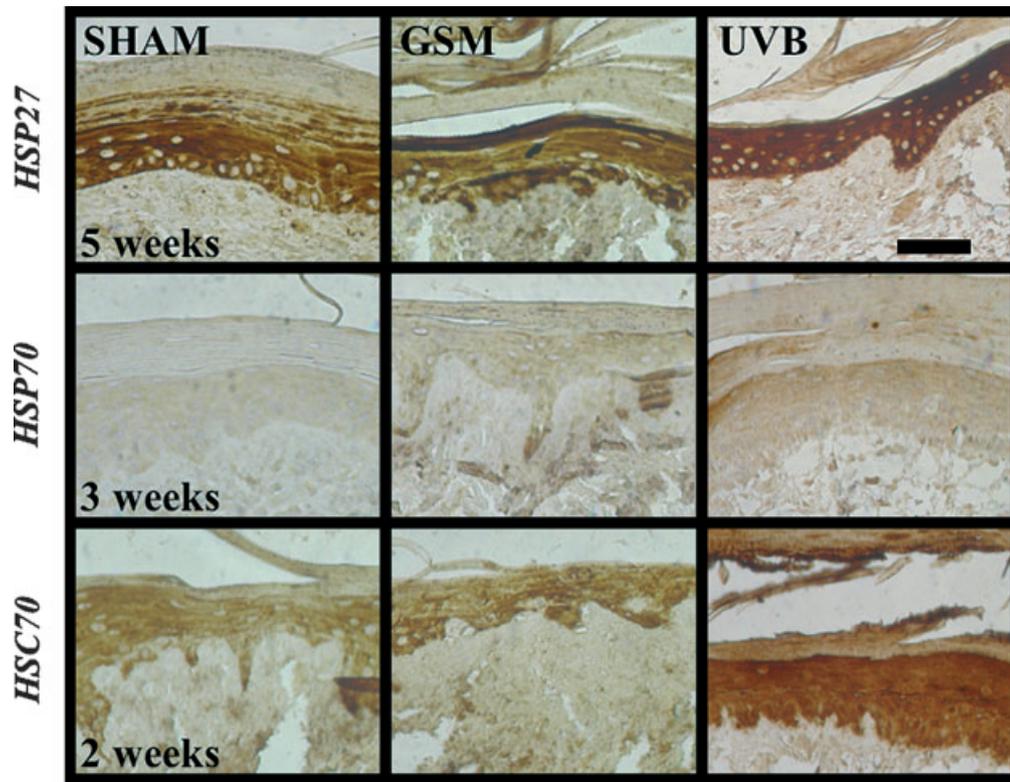


Fig. 9. HSP expression pattern in hRE. This was measured as the labelling intensity for each HSP using APHELION® image analysis software. Hsp27, Hsp70 and Hsc70 were detected with immunodetection (peroxidase/3,3'-diaminobenzidine staining) in sham, GSM-900 ($2 \text{ W}\cdot\text{kg}^{-1}$, 48 h) or UVB ($200 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$, 48 h recovery time) conditions and according to time in culture.

second heat shock occurs after that period, the amount of HSP expressed during the first shock is sufficient to protect the cells during the second shock, so they do not need to synthesize more HSP. Data obtained in rainbow trout fibroblasts [50] during 24 h continuous heat-shock exposure showed this tolerance phase, with a decrease in HSP expression, ultimately decreasing to below the basal level (under physiological conditions). On the basis of these earlier findings, we hypothesize that a 48 h GSM-900 exposure induces RFR tolerance in the NHDFe human fibroblasts, with a possible early increase in Hsc70 expression (not measured), followed by a return to a level below the nominal base line. This type of adaptation has been described as a normal response to thermal and chemical stress (i.e. thermotolerance and chemotolerance), but has never been considered to be damaging to cells.

In the second phase, a series of experiments using NHDFc was performed to confirm the effect of RFR exposure on Hsc70. On the one hand, the Hsc70 expression pattern was different and, on the other hand, RFR exposure had no effect on Hsc70 expression in NHDFc. It is, however, not clear why NHDFe and NHDFc react differently to RFR exposure. One

possible explanation for this behaviour is a change in cell-culture protocol: the NHDFc culture medium was supplemented with insulin and human fibroblast growth factor (hFGF) mitogen. It is conceivable that the proliferation rates of NHDFe and NHDFc were different, thus causing the difference in Hsc70 expression. We also noticed that subculturing was less frequent for NHDFe than NHDFc (data not shown). Moreover, previous *in vitro* experiments with different cell types showed that some HSP, including Hsc70, were involved in cell growth [51,52]. More recently, Diehl *et al.* [53] showed that Hsc70 was involved in the cell cycle, by associating with cyclin D1 to regulate its accumulation. Thus, the differences in Hsc70 expression between NHDFe and NHDFc after GSM-900 exposure observed in this study may be caused by the presence of hFGF mitogen in the NHDFc culture medium. Furthermore, heat shock did not induce HSP overexpression, i.e. new protein synthesis of Hsp27, Hsp70 and Hsp90, in mitotic CHO cells [54]. Taken together, these observations suggest that a large proportion of NHDFc cells may be in the mitotic phase, in contrast to NHDFe, which would explain why the RFR effects were not observed in NHDFc.

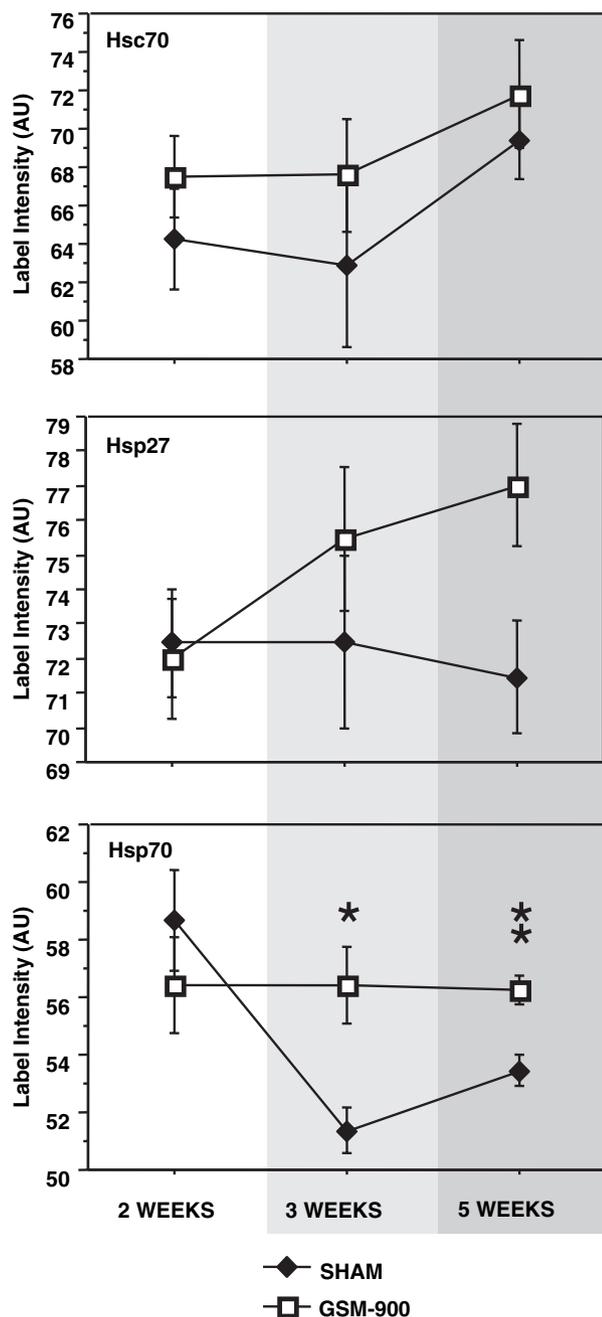


Fig. 10. HSP expression in hRE depending on treatment and time in culture. HSP expression was calculated as the percentage of HSP in UVB-exposed hRE ($200 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$, 48 h recovery time). Data are presented as mean \pm SEM of number of hRE per condition. The number of hRE per condition (GSM-900 $2 \text{ W}\cdot\text{kg}^{-1}$ or SHAM) was seven after 2 weeks in ALI culture, four after 3 weeks in ALI culture and six after 5 weeks in ALI culture. The Mann-Whitney unpaired test was used for statistical comparison.

GSM-900 exposure had no effect on overproliferation or layer thickness in hRE. Previous studies have underlined that inducible Hsp72 (or Hsp70) expression is

restricted to the basal layer of the epidermis [6,55]. This was confirmed during wound healing in murine epidermis, as strong Hsp70 expression around the wound promoted the healing process [56]. It is also known that Hsp70 may be overexpressed after heat shock in this model [57]. In the 3D model, we observed a slight but significant increase in Hsp70 occurring in 3- to 5-week ALI cultures after exposure. We did not obtain such results in isolated keratinocytes, possibly because of a lack of cell differentiation in cell layers. The relevance of this 3D model in approaching the real organ in phototoxicity responses [20], led us to believe that this observation is more representative of organ than monolayer cells. Although, the range of variation of Hsp70 is small and negligible compared with UVB induction, an effect of GSM-900 on cell proliferation cannot be ruled out. However, as we did not detect any overproliferation or increase in thickness in this model, we suggest that the slight increase in Hsp70 seen in hRE does not translate into functional effects.

To date, few studies have focused on the effects of mobile phone-related RFR on the skin. Previous experiments studying the biological effects of RFR exposure on the skin or skin cells did not use the same endpoints. For instance, *in vitro* exposure at 900 or 1800 MHz was found to affect gene expression and induce DNA damage in a fibroblastic cell line and human fibroblast primary cells, respectively [58,59]. In our study, the effects of GSM-900 exposure on human skin cells were investigated at the cellular rather than DNA level and did not reveal any damage in human cutaneous cells or reconstructed epidermis.

In vivo, oxidative stress and fibrosis were induced in rat skin after RFR exposure [60]. Other work by our group did not, however, show any effect on proliferation, epidermis thickness or cell structures in rat skin after a single 2 h exposure to GSM-900 or GSM-1800 [60a] or a chronic study up to 12 weeks of exposure [60b].

Our findings thus indicate that human cutaneous cells react to GSM-900 exposure by modulating the expression of some HSPs, depending on the cell model. These phenomena are, however, unlikely to cause deleterious effects at the skin level.

However, further experiments on NHDfE cells within the recovery time after GSM-900 exposure could be valuable and help understand if this effect is transient or persistent. In the latter case, it would be possible to look at a possible early senescent cell status induced by exposure.

Moreover, it has been shown previously that keratinocytes expressed HSPs differently, depending on the stress [60c]. Maytin demonstrated that there is a

relationship between the pattern of expression of HSPs and the tolerance phenomenon induced by heat shock and not related to UV. It would be interesting to perform the same experiments on both cell types, testing the synergetic effect of an increase in temperature and RFR, versus heat shock alone.

Experimental procedures

Isolated human cutaneous primary cells

Normal human epidermal keratinocytes (NHEK)

Cells were extracted from mammary skin biopsies from human plastic surgery (generous gifts from A. Taïeb, University V. Ségalen, Dermatology Unit & INSERM E 0217, Bordeaux, France). Biopsies were cut into small pieces (5×2 mm) and the dermis discarded, as much as possible. Skin samples were placed overnight in a trypsin/EDTA (0.25 : 0.04% v/v) solution, at 4 °C. The epidermis was gently scraped using a scalpel to remove epidermal cells. After centrifugation (120 g, 10 min) the cells were counted and seeded at 7.5×10^6 cells in 75 cm² culture flasks (Nunc®, Dominique Dutscher, Brumath, France). Until the first passage in coculture, NHEK were cultured in complete MCDB 153 (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) [23,24] with $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ insulin, $1.4 \mu\text{M}$ hydrocortisone, $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ epidermal growth factor, $70 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ bovine pituitary extract and penicillin/streptomycin, at 37 °C, 5% CO₂, in a humidified atmosphere. At the first passage, NHEK cells were separated from the other skin cells as much as possible: 1/10 diluted trypsin/EDTA solution was added and cell detachment was monitored under the microscope to discriminate between melanocyte and keratinocyte detachment. This method produced enriched NHEK (NHEKe) cultures. The culture medium was changed every two days. The cells were used from passage 2–6.

Normal human dermal fibroblasts (NHDF)

There were two sources of fibroblast cells: primary human dermal fibroblasts cultured from human biopsies and commercially available primary human dermal fibroblasts.

Normal human dermal fibroblast enriched cultures (NHDFe) were obtained from abdominal biopsies, as described by Gontier *et al.* [25]. Pieces of dermis were cultured in Petri dishes in a complete Dulbecco's modified Eagle's medium with $4.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ glucose (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) (with 10% decomplemented fetal bovine serum and penicillin/streptomycin) and the cells were allowed to leave the dermis. Cells were then cultured in complete Dulbecco's modified Eagle's medium at 37 °C, 5% CO₂, in a humidified atmosphere. The culture medium was changed every two days. The cells were used from passage 2–6.

The second cell type was normal human dermal fibroblasts purchased from Cambrex (Verviers, Belgium), referred to as NHDFc (CC-2511). They were cultured in fibroblast growth medium as recommended by the manufacturer: fibroblast basal medium supplemented with 2% fetal bovine serum, $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ bovine insulin, $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ hFGF and gentamycin/amphotericin-B. Cells were fed every two days and used from passage 2–4.

Human reconstructed epidermis

These were prepared with NHEK following the method described by Prunieras *et al.* [26]. Briefly, NHEK extracted from skin biopsies (human plastic surgery), were cultured in complete MCDB 153, at 37 °C, 5% CO₂, in a humidified atmosphere. The reconstructed epidermis support was a de-epidermized dead dermis (DDD) extracted from skin biopsies, conserved in Hank's buffer with penicillin/streptomycin/amphotericin and kept frozen until use. A seeding cylinder was placed on a thawed DDD (in a 35 mm diameter Petri dish) and 2×10^5 keratinocytes were seeded and incubated for 24 h in a small volume of complete Iscove's modified Dulbecco's medium (Sigma) containing decomplemented fetal bovine serum (5%), complete MCDB 153 medium (1/4 final volume) and penicillin/streptomycin, so that only the DDD was wet. The cylinder was then removed and the DDD immersed in complete Iscove's modified Dulbecco's medium for 24 h (proliferation phase). Finally, the DDD was placed on a sterile plastic grid and incubated in complete Iscove's modified Dulbecco's medium, to keep the reconstructed epidermis at the ALI so that the differentiation phase could occur. The medium was changed every 2 days and the reconstructed epidermis culture maintained for a maximum of 5 weeks (no cell renewal on the basal layer). For GSM-900 exposure, the reconstructed epidermis was used from week 2–5 in ALI culture.

GSM-900 exposure system

The exposure system was the wire-patch antenna, designed and built at the Institut de Recherche en Communications Optiques et Microondes (IRCOM, Limoges, France). This antenna was surrounded by a foam-rubber ring and placed in a cell-culture incubator. This prevented electromagnetic interference with the surrounding electrical equipment inside the incubator. The signal was emitted with a carrier frequency of 900 MHz, modulated at 217 Hz (GSM protocol). The antenna contained eight 35-mm diameter Petri dishes filled with 3.2 mL medium, each placed at the centre of a 60 mm diameter Petri dish filled with 5 mL water. Dosimetry was carried out at the IRCOM and PIOM laboratories [27] and was fully characterized. Briefly, the specific absorption rate (SAR)

values were calculated from temperature measurements in the culture medium under 1 min off then on continuous wave exposure. The temperature was measured using a Vitek® temperature probe, connected to a Hewlett Packard® multimeter linked to a computer. This probe was placed inside the culture medium in the Petri dish culture system. SAR values were calculated as $SAR = c \Delta T / \Delta t$, where c is the calorific capacity of the medium, T the temperature in Kelvin and t the time in seconds. In line with the International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection guidelines for local exposure limits, cells were exposed for 2 h at $2 \text{ W}\cdot\text{kg}^{-1}$, corresponding to the 'worst case' for mobile phone exposure. The peak SAR corresponding to $2 \text{ W}\cdot\text{kg}^{-1}$ in the medium under GSM-900 protocol (1/8 time slot) was $16 \text{ W}\cdot\text{kg}^{-1}$. Exposure took place at $37 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$ with continuous temperature recording in the incubator. A twin incubator with an inactive antenna was used for sham exposure. Samples were coded before transfer from the standard culture incubator to the RFR dedicated incubators.

Positive controls

UVB radiation was used as a positive control to ascertain that our *in vitro* culture models could undergo apoptosis or express HSPs. UVB (312 nm) radiation was used. A $600 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ single dose was chosen and used to induce apoptosis in the various cell types and a $200 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ single dose to induce HSP expression in the various cell types and in the hRE.

Briefly, the cultures (primary cells or hRE) were washed once with NaCl/P_i without calcium/magnesium ($\text{W/O Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$). As the culture medium may be cell toxic once exposed to UV, owing to the presence of photosensitive elements in the medium, our cultures were exposed in NaCl/P_i (1 mL in 40 mm diameter Petri dishes, 0.5 mL in 24-well plates). Moreover, to avoid contamination in our cellular cultures, we kept the plastic cover (polystyrene) over the culture dishes during UVB exposure. After exposure, NaCl/P_i $\text{W/O Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ was removed, replaced with fresh culture medium and the cellular models were put in the culture incubator to recover for up to 24 (hRE) or 48 h (hRE and cells).

UVB source

UVB irradiation was delivered using a Vilbert Lourmat Bio-Link BLX-E312 (Fisher Bioblock, Illkirch, France). This apparatus is composed of a closed cavity ($14.5 \times 33 \times 26 \text{ cm}$) with six 8 W UV lamps at 312 nm, placed at the ceiling of the cavity. The dose absorbed by the irradiated object is constantly measured by a radiometer present in the apparatus, the measurement depending on the ageing of the lamp. The Petri dishes or 24-well plates were always placed at the centre of the cross-linker at a

distance of 13.5 cm (minus the height of the culture dish) from the UV lamp. The apparatus calculates the duration of exposure as a function of the desired dose.

Tests on isolated human primary cutaneous cells

Detection of apoptosis

Apoptosis induction is often associated with cell stress. This type of cell death occurs in several stages. In the early phase, this phenomenon is characterized by several organelle changes (e.g. decrease in mitochondria potential) and in the second phase, by a translocation of the phosphatidylserines at the membrane surface [28]. Both phases occur before the appearance of apoptotic bodies [29].

Apoptosis was detected using flow cytometry (FACScan®, Becton Dickinson, Erembodegem, Belgium). Apoptosis was measured using two markers: annexin V–fluorescein isothiocyanate (ANX–FITC) and propidium iodide (PI) (ApopTEST™, Dako France, Trappes, France). The ANX marker detects phosphatidylserine translocation, as mentioned above. PI is a DNA intercalator, which can only enter the permeabilized necrotic cells. Using double staining, it was thus possible to discriminate between viable, apoptotic and necrotic cells within a given population.

After GSM-900 or sham exposure, the cells were immediately treated with trypsin/EDTA, centrifuged, resuspended in NaCl/P_i , centrifuged again and counted.

Cells (10^6) were washed in NaCl/P_i , centrifuged and resuspended in $96 \mu\text{L}$ cold kit buffer with $1.5 \mu\text{L}$ ANX–FITC ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$) solution and $2 \mu\text{L}$ PI solution ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$), then incubated for 15 min in the dark, on ice. Flow cytometry analysis was done within the hour.

For positive controls, cells were harvested 48 h after UVB irradiation and handled as above for apoptosis detection.

Detection of HSP

Human primary keratinocytes and fibroblasts were cultured on glass strips (12 mm diameter) in 24-well plates. After GSM or sham exposure, cells were fixed with paraformaldehyde (4%), washed three times in NaCl/P_i and maintained in NaCl/P_i at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ until immunolabelling. The positive control cells were fixed at 2, 4, 6, 24 and 48 h after heat shock.

Fixed cells were permeabilized using NaCl/P_i –TritonX100 (0.3%). Nonspecific sites were saturated by incubation with NaCl/P_i –20% horse serum at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ for 1 h. Cells were then incubated with the 1/200 diluted anti-Hsp serum (mouse anti-Hsp27 and anti-Hsp70 mAb, rat anti-Hsc 70 mAb; Stressgen, Tebu, Le Perray en Yvelines, France) at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ for 1 h. After NaCl/P_i washing, cells were incubated at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ for 1 h with FITC anti-mouse or FITC anti-rat serum at 1/150 and 1/320 dilution, respectively (Sigma). A labelling control consisted of leaving out the

specific anti-Hsp sera. The glass strips were then mounted on glass slides using Mowiol (Calbiochem, VWR, Fontenay sous Bois, France). HSP expression was analysed by fluorescence detection under a microscope. Four pictures were taken for each strip and analysed for fluorescence intensity using APHELION® image analysis software (ADCIS, Hérouville Saint-Clair, France). A mean intensity was calculated for each strip under each condition (GSM-900, sham, positive and labelling controls). Data were expressed as mean intensity values minus labelling control value.

Tests on reconstructed epidermis

Following exposure, hRE were fixed in 4% paraformaldehyde solution (24 h), dehydrated (successive gradient alcohol baths) and included in paraffin. Then 5 µm hRE slices were prepared using a microtome (RM2135, Leica, Rueil-Malmaison, France). Slices were harvested on glass slides coated with bovine serum albumin (Sigma) for histochemistry or poly(L-lysine) (Sigma) for immunocytochemistry.

Measurements of epidermis thickness

Inflammatory processes in the skin produce lesions and thickening of the epidermis [30–32]. We therefore used epidermis thickness measurements in hRE slices as a marker for inflammation.

hRE paraffined slices were deparaffined using toluene, then rehydrated (successive gradient alcohol baths) and treated with a basic haematoxylin/eosin histochemical staining to differentiate between reconstructed and dead dermis. After staining, the slices were dehydrated and mounted on glass slides using Eukitt® (Sigma). Digital images were taken under a microscope with a video camera (CCD 4912, COHU, San Diego, CA) and analysed for thickness using APHELION® image analysis software. The mean thickness was calculated along the whole length of the photographed area, based on three areas per hRE slice.

Detection of proliferation

Ki-67 is a cell proliferation marker, used mainly for cancer diagnosis, by detecting cells in the G₁, S or G₂ phases, or in mitosis [33,34]. In healthy epidermis, Ki-67-positive cells are present in the basal layer, whereas in the case of burns or other injuries, or cancer processes that induce serious epidermal lesions, there may be cell overproliferation in suprabasal layers.

hRE paraffined slides were deparaffined and rehydrated (as previously described), treated for antigen retrieval by citrate buffer (pH 6) at 98 °C, then immunolabelled with mouse anti-(Ki-67) mAb (Dako France) and revealed using the EnVision™ + System horseradish peroxidase (3,3'-diaminobenzidine) kit (anti-mouse, Dako France). Labelled

slices were dehydrated and mounted using Eukitt®. Three digital images were taken for each hRE and the number of activated nuclei (i.e. Ki-67-positive cells) was counted along the whole length of the photographed area. Proliferation was detected 24 h after UVB exposure for the positive controls and immediately after GSM or sham exposure.

Detection of HSP

HSP was detected 48 h after UVB exposure and immediately after GSM or sham exposure.

HSPs were immunolabelled using a protocol similar to that used for Ki-67 detection. Anti-mouse secondary sera were used for Hsp27 and 70 detection (Mouse, Envision™ kit, Dako France) and anti-rat secondary sera for Hsc70 (Dako France) prior to detection (Rabbit Envision™ kit, Dako France). The labelled slices were dehydrated and mounted using Eukitt®. Three digital images were taken for each hRE. HSP expression (labelling intensity) in samples was analysed as a percentage of HSP expression in the positive controls using APHELION® image analysis software.

Statistical analysis

The nonparametric Mann–Whitney unpaired test was used.

Acknowledgements

This work was supported by the CNRS, the Aquitaine Council for research and France Telecom R & D. We wish to thank Professor Taïeb and his team from the Dermatological Unit, University of Bordeaux 2, for their generous gift of the human skin biopsies.

References

- 1 Bowman PD, Schuschereba ST, Lawlor DF, Gilligan GR, Mata JR & DeBaere DR (1997) Survival of human epidermal keratinocytes after short-duration high temperature: synthesis of HSP70 and IL-8. *Am J Physiol* **272**, C1988–C1994.
- 2 Applegate LA, Luscher P & Tyrrell RM (1991) Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells. *Cancer Res* **51**, 974–978.
- 3 Zhou X, Tron VA, Li G & Trotter MJ (1998) Heat shock transcription factor-1 regulates heat shock protein-72 expression in human keratinocytes exposed to ultraviolet B light. *J Invest Dermatol* **111**, 194–198.
- 4 Trautinger F, Kindas-Mügge I, Dekrout B, Knobler RM & Metze D (1995) Expression of the 27-kDa heat shock protein in human epidermis and in epidermal

- neoplasms: an immunohistological study. *Br J Dermatol* **133**, 194–202.
- 5 Wilson N, McArdle A, Guerin D, Tasker H, Wareing P, Foster CS, Jackson MJ & Rhodes LE (2000) Hyperthermia to normal human skin *in vivo* upregulates heat shock proteins 27, 60, 72i and 90. *J Cutan Pathol* **27**, 176–182.
 - 6 Boehncke WH, Dahlke A, Zollner TM & Sterry W (1994) Differential expression of heat shock protein 70 (HSP70) and heat shock cognate protein 70 (HSC70) in human epidermis. *Arch Dermatol Res* **287**, 68–71.
 - 7 Jantschitsch C, Kindas-Mügge I, Metze D, Amann G, Micksche M & Trautinger F (1998) Expression of the small heat shock protein HSP27 in developing human skin. *Br J Dermatol* **139**, 247–253.
 - 8 Jonak C, Metze D, Traupe H, Happle R, König A & Trautinger F (2005) The expression of the 27-kd heat shock protein in keratinization disorders: an immunohistological study. *Hum Pathol* **36**, 686–693.
 - 9 Brink N, Szamel M, Young AR, Wittern KP & Bergemann J (2000) Comparative quantification of IL-1beta, IL-10, IL-10r, TNFalpha and IL-7 mRNA levels in UV-irradiated human skin *in vivo*. *Inflamm Res* **49**, 290–296.
 - 10 Ichihashi M, Ueda M, Budiyo A, Bito T, Oka M, Fukunaga M, Tsuru K & Horikawa T (2003) UV-induced skin damage. *Toxicology* **189**, 21–39.
 - 11 Aragane Y, Kulms D, Metze D, Wilkes G, Pöppelmann B, Luger TA & Schwarz T (1998) Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L. *J Cell Biol* **140**, 171–182.
 - 12 Schwarz A, Bhardwaj R, Aragane Y, Mahnke K, Riemann H, Metze D, Luger TA & Schwarz T (1995) Ultraviolet-B-induced apoptosis of keratinocytes: evidence for partial involvement of tumor necrosis factor-alpha in the formation of sunburn cells. *J Invest Dermatol* **104**, 922–927.
 - 13 Buckman SY, Gresham A, Hale P, Hruza G, Anast J, Masferrer J & Pentland AP (1998) COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: implications for the development of skin cancer. *Carcinogenesis* **19**, 723–729.
 - 14 Cleaver JE & Crowley E (2002) UV damage, DNA repair and skin carcinogenesis. *Front Biosci* **7**, 1024–43.
 - 15 Straume A, Oftedal G & Johnsson A (2005) Skin temperature increase caused by a mobile phone: a methodological infrared camera study. *Bioelectromagnetics* **26**, 510–519.
 - 16 Vicanová J, Mommaas AM, Mulder AA, Koerten HK & Ponc M (1996) Impaired desquamation in the *in vitro* reconstructed human epidermis. *Cell Tissue Res* **286**, 115–122.
 - 17 Dvoránková B, Smetana K, Königová R, Singerová H, Vacík J, Jelínková M, Kapounková Z & Zahradník M (1998) Cultivation and grafting of human keratinocytes on a poly(hydroxyethyl methacrylate) support to the wound bed: a clinical study. *Biomaterials* **19**, 141–146.
 - 18 Bessou S, Gauthier Y, Surlève-Bazeille JE, Pain C & Taïeb A (1997) Epidermal reconstructs in vitiligo: an extrinsic factor is needed to trigger the disease. *Br J Dermatol* **137**, 890–897.
 - 19 Bernerd F, Asselineau D, Frechet M, Sarasin A & Magagnolo T (2005) Reconstruction of DNA repair-deficient xeroderma pigmentosum skin *in vitro*: a model to study hypersensitivity to UV light. *Photochem Photobiol* **81**, 19–24.
 - 20 Cario-André M, Bessou S, Gontier E, Maresca V, Picardo M & Taïeb A (1999) The reconstructed epidermis with melanocytes: a new tool to study pigmentation and photoprotection. *Cell Mol Biol (Noisy-le-Grand)* **45**, 931–942.
 - 21 Cario-André M, Briganti S, Picardo M, Nikaido O, Gall Y, Ginestar J & Taïeb A (2002) Epidermal reconstructs: a new tool to study topical and systemic photoprotective molecules. *J Photochem Photobiol* **B68**, 79–87.
 - 22 Keshvari J & Lang S (2005) Comparison of radio frequency energy absorption in ear and eye region of children and adults at 900, 1800 and 2450 MHz. *Phys Med Biol* **50**, 4355–4369.
 - 23 Boisseau AM, Donatien P, Surlève-Bazeille JE, Amédée J, Harmand MF, Bézian JH, Maleville J & Taïeb A (1992) Production of epidermal sheets in a serum free culture system: a further appraisal of the role of extracellular calcium. *J Dermatol Sci* **3**, 111–120.
 - 24 Donatien P, Surlève-Bazeille JE, Thody AJ & Taïeb A (1993) Growth and differentiation of normal human melanocytes in a TPA-free, cholera toxin-free, low-serum medium and influence of keratinocytes. *Arch Dermatol Res* **285**, 385–392.
 - 25 Gontier E, Cario-André M, Lepreux S, Vergnes P, Bizik J, Surlève-Bazeille JE & Taïeb A (2002) Dermal nevus cells from congenital nevi cannot penetrate the dermis in skin reconstructs. *Pigment Cell Res* **15**, 41–48.
 - 26 Prunieras M, Regnier M & Schlotterer M (1979) New procedure for culturing human epidermal cells on allogenic or xenogenic skin: preparation of recombined grafts. *Ann Chir Plast* **24**, 357–362.
 - 27 Laval L, Leveque P & Jecko B (2000) A new *in vitro* exposure device for the mobile frequency of 900 MHz. *Bioelectromagnetics* **21**, 255–263.
 - 28 Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H & Reutelingsperger C (1995) A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *J Immunol Methods* **184**, 39–51.
 - 29 Halicka HD, Bedner E & Darzynkiewicz Z (2000) Segregation of RNA and separate packaging of DNA and RNA in apoptotic bodies during apoptosis. *Exp Cell Res* **260**, 248–256.

- 30 Park KS, Kim HJ, Kim EJ, Nam KT, Oh JH, Song CW, Jung HK, Kim DJ, Yun YW, Kim HS *et al.* (2002) Effect of glycolic acid on UVB-induced skin damage and inflammation in guinea pigs. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* **15**, 236–245.
- 31 Strange P, Skov L, Lisby S, Nielsen PL & Baadsgaard O (1996) Staphylococcal enterotoxin B applied on intact normal and intact atopic skin induces dermatitis. *Arch Dermatol* **132**, 27–33.
- 32 van der Vleuten CJ, Snijders CG, de Jong EM & van de Kerkhof PC (1996) Effects of calcipotriol and clobetasol-17-propionate on UVB-irradiated human skin: an immunohistochemical study. *Skin Pharmacol* **9**, 355–365.
- 33 Vogt T, Zipperer KH, Vogt A, Hölzel D, Landthaler M & Stolz W (1997) p53-protein and Ki-67-antigenexpression are both reliable biomarkers of prognosis in thick stage I nodular melanomas of the skin. *Histopathology* **30**, 57–63.
- 34 Shimizu T, Oga A, Murakami T & Muto M (1999) Overexpression of p53 protein associated with proliferative activity and histological degree of malignancy in solar keratosis. *Dermatology* **199**, 113–118.
- 35 Capri M, Scarcella E, Bianchi E, Fumelli C, Mesirca P, Agostini C, Remondini D, Schuderer J, Kuster N, Franceschi C *et al.* (2004) 1800 MHz radiofrequency (mobile phones, different Global System for Mobile communication modulations) does not affect apoptosis and heat shock protein 70 level in peripheral blood mononuclear cells from young and old donors. *Int J Radiat Biol* **80**, 389–397.
- 36 Capri M, Scarcella E, Fumelli C, Bianchi E, Salvioli S, Mesirca P, Agostini C, Antolini A, Schiavoni A, Castellani G *et al.* (2004) *In vitro* exposure of human lymphocytes to 900 MHz CW and GSM modulated radiofrequency: studies of proliferation, apoptosis and mitochondrial membrane potential. *Radiat Res* **162**, 211–218.
- 37 Adlkofer F, Tauber R, Rüdiger HW, Wobus AM, Trillo A, Leszczynski D, Kolb HA, Lagroye I, Bersani F, Kuster N *et al.* (2005) Risk evaluation of potential environmental hazards from low energy electromagnetic field exposure using sensitive *in vitro* methods. http://www.verum-foundation.de/www2004/html/pdf/euprojekte01/REFLEX_Final%20Report_Part%201.pdf.
- 38 Beere HM (2004) 'The stress of dying': the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J Cell Sci* **117**, 2641–2651.
- 39 Morimoto RI (2002) Dynamic remodeling of transcription complexes by molecular chaperones. *Cell* **110**, 281–284.
- 40 Hansen LK, Houchins JP & O'Leary JJ (1991) Differential regulation of HSC70, HSP70, HSP90 alpha, and HSP90 beta mRNA expression by mitogen activation and heat shock in human lymphocytes. *Exp Cell Res* **192**, 587–596.
- 41 McDonough H & Patterson C (2003) CHIP: a link between the chaperone and proteasome systems. *Cell Stress Chaperones* **8**, 303–308.
- 42 Terlecky SR, Chiang HL, Olson TS & Dice JF (1992) Protein and peptide binding and stimulation of *in vitro* lysosomal proteolysis by the 73-kDa heat shock cognate protein. *J Biol Chem* **267**, 9202–9209.
- 43 Agarraberes FA & Dice JF (2001) A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *J Cell Sci* **114**, 2491–2499.
- 44 Ward WF (2000) The relentless effects of the aging process on protein turnover. *Biogerontology* **1**, 195–199.
- 44a Tanabe H, Kumagai N, Tsukahara T, Ishiura S, Komimami E, Nishina H & Sugita H (1991) Changes of lysosomal proteinase activities and their expression in rat cultured keratinocytes during differentiation. *Biochim Biophys Acta* **1094**, 281–287.
- 44b Sarafian V, Jans R & Poumay Y (2006) Expression of lysosome-associated membrane protein 1 (Lamp-1) and galectins in human keratinocytes is regulated by differentiation. *Arch Dermatol Res* **298**, 73–81.
- 44c Cristofalo VJ, Pignolo RJ & Rotenberg MO (1992) Molecular changes with *in vitro* cellular senescence. *Ann N Y Acad Sci* **663**, 187–194.
- 45 Cuervo AM & Dice JF (2000) Age-related decline in chaperone-mediated autophagy. *J Biol Chem* **275**, 31505–31513.
- 46 Fonager J, Beedholm R, Clark BF & Rattan SI (2002) Mild stress-induced stimulation of heat-shock protein synthesis and improved functional ability of human fibroblasts undergoing aging *in vitro*. *Exp Gerontol* **37**, 1223–1228.
- 47 Hang H & Fox MH (1996) Levels of 70-kDa heat shock protein through the cell cycle in several mammalian cell lines. *Cytometry* **25**, 367–373.
- 48 Kregel KC (2002) Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol* **92**, 2177–2186.
- 49 Samali A, Holmberg CI, Sistonen L & Orrenius S (1999) Thermotolerance and cell death are distinct cellular responses to stress: dependence on heat shock proteins. *FEBS Lett* **461**, 306–310.
- 50 Mosser DD & Bols NC (1988) Relationship between heat-shock protein synthesis and thermotolerance in rainbow trout fibroblasts. *J Comp Physiol [B]* **158**, 457–467.
- 51 Haire RN, Peterson MS & O'Leary JJ (1988) Mitogen activation induces the enhanced synthesis of two heat-shock proteins in human lymphocytes. *J Cell Biol* **106**, 883–891.
- 52 Wu BJ & Morimoto RI (1985) Transcription of the human *hsp70* gene is induced by serum stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **A82**, 6070–6074.

- 53 Diehl JA, Yang W, Rimerman RA, Xiao H & Emili A (2003) Hsc70 regulates accumulation of cyclin D1 and cyclin D1-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol* **23**, 1764–1774.
- 54 Borrelli MJ, Stafford DM, Karczewski LA, Rausch CM, Lee YJ & Corry PM (1996) Thermotolerance expression in mitotic CHO cells without increased translation of heat shock proteins. *J Cell Physiol* **169**, 420–428.
- 55 Edwards MJ, Nazmi N, Mower C & Daniels A (1999) Hsp72 antigen expression in the proliferative compartment of involved psoriatic epidermis. *J Cutan Pathol* **26**, 483–489.
- 56 Laplante AF, Moulin V, Auger FA, Landry J, Li H, Morrow G, Tanguay RM & Germain L (1998) Expression of heat shock proteins in mouse skin during wound healing. *J Histochem Cytochem* **46**, 1291–1301.
- 57 Bowers W, Blaha M, Alkhyat A, Sankovich J, Kohl J, Wong G & Patterson D (1999) Artificial human skin: cytokine, prostaglandin, Hsp70 and histological responses to heat exposure. *J Dermatol Sci* **20**, 172–182.
- 58 Pacini S, Ruggiero M, Sardi I, Aterini S, Gulisano F & Gulisano M (2002) Exposure to global system for mobile communication (GSM) cellular phone radiofrequency alters gene expression, proliferation, and morphology of human skin fibroblasts. *Oncol Res* **13**, 19–24.
- 59 Diem E, Schwarz C, Adlkofer F, Jahn O & Rüdiger H (2005) Non-thermal DNA breakage by mobile-phone radiation (1800 MHz) in human fibroblasts and in transformed GFSH-R17 rat granulosa cells in vitro. *Mutat Res* **583**, 178–183.
- 60 Ayata A, Mollaoglu H, Yilmaz HR, Akturk O, Ozguner F & Altuntas I (2004) Oxidative stress-mediated skin damage in an experimental mobile phone model can be prevented by melatonin. *J Dermatol* **31**, 878–883.
- 60a Masuda H, Sanchez S, Dulou PE, Haro E, Anane R, Billaudel B, Leveque P & Veyret B (2006) Effect of GSM-900 and -1800 signals on the skin of hairless rats. I: 2-hour acute exposures. *Int J Radiat Biol* **82**, 669–674.
- 60b Sanchez S, Masuda H, Billaudel B, Haro E, Anane R, Leveque P, Ruffie G, Lagroye I & Veyret B (2006) Effect of GSM-900 and -1800 signals on the skin of hairless rats. II: 12-week chronic exposures. *Int J Radiat Biol* **82**, 675–680.
- 60c Maytin EV (1992) Differential effects of heat shock and UVB light upon stress protein expression in epidermal keratinocytes. *J Biol Chem* **267**, 23189–23196.

ARTICLE 2 : In vitro study of the stress response of human skin cells to GSM-1800 mobile phone signals in comparison to UVB and heat shock

SANCHEZ S., HARO E., RUFFIE G., VEYRET B. AND LAGROYE I.

In vitro study of the stress response of human skin cells to GSM-1800 mobile phone signals in comparison to UVB and heat shock

Radiation Research (accepté, sous presse)

L'article 2 traite des effets biologiques possibles du signal de téléphonie mobile GSM-1800 sur les cellules de la peau, en comparaison aux effets des rayons ultraviolets UVB et d'un choc thermique. Le signal GSM-1800 étant plus élevé en fréquence que le GSM-900, l'absorption d'énergie lors d'une communication devient alors plus superficielle, l'hypothèse d'une action plus prononcée au niveau de la peau s'avance. Cet article présente les résultats d'expérimentations in vitro sur deux types de modèles cellulaires cutanés cultivés en monocouches : des cellules primaires épidermiques (kératinocytes) et dermiques (fibroblastes).

Nous avons supposé que le signal GSM-1800 en exposition continue (2 W/kg, 48 heures) pouvait être un agent stressant et cette hypothèse a été testée par la détection de différents paramètres caractéristiques d'une réponse au stress : l'induction d'apoptose (détection de phosphatidylsérines membranaires par un marquage Annexine V) et la variation d'expression de protéines de choc thermique (HSP, Hsc70, Hsp27 et Hsp70) en comparaison à une exposition aux UVB ou à un choc thermique.

RADIATION RESEARCH 167, 000–000 (2007)
0033-7587/07 \$15.00
© 2007 by Radiation Research Society.
All rights of reproduction in any form reserved.

In Vitro Study of the Stress Response of Human Skin Cells to GSM-1800 Mobile Phone Signals Compared to UVB Radiation and Heat Shock

S. Sanchez,¹ E. Haro, G. Ruffié, B. Veyret and I. Lagroye

PIOM, Laboratory of Bioelectromagnetics, UMR 5501 CNRS, ENSCPB, Pessac, France

Sanchez, S., Haro, E., Ruffié, G., Veyret, B. and Lagroye, I. *In Vitro* Study of the Stress Response of Human Skin Cells to GSM-1800 Mobile Phone Signals Compared to UVB Radiation and Heat Shock. *Radiat. Res.* 167, 000–000 (2007).

The evolution of mobile phone technology is toward an increase of the carrier frequency up to 2.45 GHz. Absorption of radiofrequency (RF) radiation becomes more superficial as the frequency increases. This increasingly superficial absorption of RF radiation by the skin, which is the first organ exposed to RF radiation, may lead to stress responses in skin cells. We thus investigated the expression of three heat-shock proteins (HSP70, HSC70, HSP27) using immunohistochemistry and induction of apoptosis by flow cytometry on human primary keratinocytes and fibroblasts. A well-characterized exposure system, SXC 1800, built by the IT'IS foundation was used at 1800 MHz, with a 217 Hz modulation. We tested a 48-h exposure at an SAR of 2 W/kg (ICNIRP local exposure limit). Skin cells were also irradiated with a 600 mJ/cm² single dose of UVB radiation and subjected to heat shock (45°C, 20 min) as positive controls for apoptosis and HSP expression, respectively. The results showed no effect of a 48-h GSM-1800 exposure at 2 W/kg on either keratinocytes or fibroblasts, in contrast to UVB-radiation or heat-shock treatments, which injured cells. We thus conclude that the GSM-1800 signal does not act as a stress factor on human primary skin cells *in vitro*. © 2007 by Radiation Research Society

INTRODUCTION

Environmental exposure to low-level radiofrequency (RF) fields has increased very rapidly with the development of mobile phone communications. The use of RF fields in daily life has greatly increased, from the first generation of GSM (Global System for Mobile communication) signals using a carrier frequency of 900 MHz to the new UMTS (Universal Mobile Telephone Signal) signal with a carrier frequency of about 2000 MHz. As a consequence of the frequency increase, absorption of RF radiation is becoming

more superficial. Consequently, the skin is the most exposed organ.

Various laboratory studies have been performed to investigate the possible biological effects of these RF fields. Previous *in vitro* studies have demonstrated that, in various human cells (from embryonic cells to brain or fibroblast cells), mobile phone signals (835–2450 MHz) induced changes in gene expression (1–4) even without altering cell physiology (4) or in protein expression, including expression of heat-shock proteins (HSPs) (5–8). Other studies have shown that RF-field exposure affected cell proliferation, cell cycle or cell growth in various cell types, but only at high SARs (9, 10). In contrast, other *in vitro* studies found no significant biological effects after RF-field exposure at the genomic (11–13), genotoxic (14–18), and proteomic levels (19–24), even at high SAR (25), or on cell physiology (26).

The aim of the present study was to test the hypothesis that mobile phone RF fields act as a stressor for cutaneous cells. These cells show a stress response to ultraviolet (UV) light (27–30), but the interaction process is different: UV radiation induces photochemical damage to skin cells, such as mutations (31) and the formation of pyrimidine dimers. The response of the injured epidermis to UV radiation is manifold: Melanocytes produce melanin for the protection of adjacent cells (32–34); the inflammatory response leads to the release of cytokines and proteins, including heat-shock proteins (35–37); DNA repair and apoptosis are induced under extreme conditions such as sunburn (38, 39).

We investigated the stress response of human primary epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts after exposure to GSM-1800 signals by assessing HSP expression and induction of apoptosis in these cells.

HSPs are 15–110-kDa proteins. In the skin, the major HSPs are HSP70 (cognate and inducible forms) (37, 40, 41) and HSP27 (expressed in a constitutive way and involved in cell differentiation) (42, 43). Other HSPs, however, such as the 90-kDa form (44), are expressed in the skin and have a role in protein folding. The ubiquitous character of these HSPs and the fact that they are induced after stress make HSPs good markers for the evaluation of the

¹ Address for correspondence: PIOM Laboratory, ENSCPB, 16, avenue Pey-Berland, F-33607 PESSAC, France; e-mail: s.sanchez@enscpb.fr.

stress response. Programmed cell death or apoptosis is also a well-known stress end point (33, 45–47). We focused our work on one stage of apoptosis, i.e. the asymmetrical expression of phosphatidylserine proteins at the membrane level, characterizing the process of apoptosis from early to late stages (47–49).

In this work, we tested the hypothesis that a 48-h GSM-1800 exposure could be an environmental stressor for human epidermal and dermal cells, like known stressors such as heat shock or UVB radiation.

MATERIALS AND METHODS

Human Cutaneous Primary Isolated Cells

Human normal epidermal keratinocytes (NHEK) and dermal fibroblasts (NHDF) were purchased from Cambrex (Verviers, Belgium).

Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air/5% CO₂, and the culture medium was changed every 2 days. NHEK cells were grown in keratinocyte growth medium (KGM, Cambrex) and NHDF cells were cultured in fibroblast growth medium (FGM, Cambrex). All cells were used between the second and sixth passage. Experiments were performed at the same time for the different groups: GSM-exposed/sham-exposed, UVB-exposed/incubator control, and heat-shock-exposed/incubator control cells.

SXC-1800 Exposure System

The exposure system was the SXC-1800 waveguide (IT'IS-Foundation, Zürich, Switzerland). In this setup, R18 hollow rectangular waveguides operating at a frequency of 1800 MHz were used. On one side of the waveguide is a coupler with a tuner; a shortcut is on the other side. For loading the setup, the shortcut can be removed easily and the whole cell dish holder can be placed inside. Six petri dishes can be exposed simultaneously at the H-field maxima. Two waveguides (exposed, sham-exposed) are placed inside a commercial incubator to ensure constant environmental conditions (37°C, 95% air/5% CO₂, 95% humidity). The temperature and SAR are monitored at the location of the dishes during exposure (50, 51). In these experiments, the temperature difference between the two waveguides never exceeded 0.1°C. To enable blind exposures, the computer randomly determined which of the two waveguides was exposed. The electric field was monitored continuously. All experiments were performed at a carrier frequency of 1800 MHz with continuous exposure. The signal consisted of rectangular pulses with a repetition frequency of 217 Hz and a duty cycle of 1:8, yielding frames 4.61 ms long, each including a 576- μ s burst. Since every 26th frame is idle, an 8 Hz modulation component is integrated in the signal.

An average specific absorption rate (SAR) of 2 W/kg was selected, corresponding to the local exposure limit of ICNIRP (52, 53).

GSM-1800 Exposure Conditions

Cell cultures that were at least 80% confluent were exposed. The petri dishes were placed in the waveguides at least 2 h before the start of exposure. The cells were exposed at 2 W/kg for 48 h. After exposure, the cells were detached with trypsin/EDTA (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and suspended in cold fresh PBS without Ca²⁺ and Mg²⁺ (Invitrogen) for the apoptosis assay or fixed immediately with 4% paraformaldehyde (Sigma, St. Quentin Fallavier, France) for the HSP assay.

Positive Controls

To ascertain that the *in vitro* culture models we used could undergo apoptosis or overexpress HSPs, positive controls were included in the experiment.

Ultraviolet radiation. UV B-radiation exposure was used as the positive control for apoptosis induction in skin cells (320 nm, 600 mJ/cm² single dose, Bio-Link BLX-E, Vilbert Lourmat, Fisher Bioblock, Illkirch, France). Briefly, cells were washed once with PBS without Ca²⁺/Mg²⁺, then exposed to UVB radiation in the same buffer. After exposure, PBS without Ca²⁺/Mg²⁺ was removed and replaced with fresh culture medium, and cells were replaced in the culture incubator for 48 h.

Heat shock. Heat (45°C in a water bath, for 20 min) was used as the positive control for HSP expression in skin cells. Briefly, cultures were washed once with PBS without Ca²⁺/Mg²⁺. A volume of fresh culture medium supplemented with 10 μ M Hepes (Invitrogen) was placed in a water bath at 45°C before the heat shock. Then the culture medium was removed from the petri dishes and replaced with the warm Hepes culture medium. The petri dishes were immediately placed in the water bath for 20 min. After the heat shock, the Hepes medium was removed and replaced with fresh normal culture medium and the cells were replaced in the culture incubator for 2, 4, 6, 24 or 48 h.

Detection of Apoptosis

Apoptosis was detected using flow cytometry (FACScan, Becton Dickinson, Erembodegem, Belgium) and two markers: Annexin V-FITC (green fluorescence) and propidium iodide (PI, red fluorescence) (ApopTEST[®], Dako, Trappes, France). Annexin V detects the phosphatidylserine externalization at the membrane level. PI intercalates in the DNA molecule, entering only permeabilized, i.e. necrotic, cells. We were thus able to discriminate the apoptotic cells from the necrotic and viable cells.

More specifically, PI-negative/Annexin V-negative cells were considered to be viable cells, while the PI-negative/Annexin V-positive population was considered apoptotic, and all PI-positive cells were considered to be necrotic.

After treatment (GSM-1800 and sham exposures), the cells were treated immediately with trypsin/EDTA, centrifuged, suspended in PBS, centrifuged again and counted.

Briefly, 10⁶ cells were washed with PBS without Ca²⁺/Mg²⁺, centrifuged and suspended in 96 μ l cold kit buffer with 1.5 μ l Annexin V-FITC solution (25 μ g/ml) and 2 μ l PI solution (250 μ g/ml) and incubated on ice in the dark for 15 min. Flow cytometry analysis took place within the next hour.

HSP Detection

NHEK and NHDF were cultured on glass strips (14 mm ϕ) in 24-well plates.

After GSM-1800 or sham exposure, the cells were fixed with paraformaldehyde (4%), washed three times with PBS without Ca²⁺/Mg²⁺, and maintained at 4°C in PBS without Ca²⁺/Mg²⁺ until immunolabeling.

HSPs were assayed in cells fixed in paraformaldehyde (4%) and permeabilized with PBS-Triton X100 (0.3%) (Sigma, St Quentin Fallavier, France). Non-specific loci were saturated by incubating the cells with PBS-20% horse serum at 37°C for 1 h. Then the cells were incubated at 37°C for 1 h with primary anti-HSP antibodies diluted 1/200 (mouse anti-HSP27 and anti-HSP70 monoclonal antibody, rat anti-HSC70 monoclonal antibody, Stressgen, Tebu, Le Perray en Yvelines, France). After the cells were washed with PBS without Ca²⁺/Mg²⁺, they were incubated at 37°C for 1 h with either anti-mouse/FITC secondary antibody diluted 1/150 (Sigma) or anti-rat/FITC secondary antibody diluted 1/320 (Sigma). The glass strips were then mounted on glass slides with Mowiol (Calbiochem, VWR, Fontenay sous Bois, France). Labeling controls without the first anti-HSP antibody were included. HSP expression was analyzed by detecting fluorescence under a microscope. Four pictures were taken for each strip, and the fluorescence intensity was analyzed using Aphelion[®] image analysis software (ADCIS, Hérouville Saint-Clair, France). Mean fluorescence intensity (arbitrary units) was calculated for each strip in each condition (GSM-1800, sham and label or positive control).

GSM-1800 AND CELL STRESS RESPONSE IN THE SKIN

Statistical Analysis

The non-parametric Mann-Whitney unpaired test was performed on decoded data using Statview® software once all complete analyses were available. All *P* values <0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Exposure to UVB Radiation, Heat Shock or GSM-1800 Basic Signal and Stress Response in Human Epidermal Cells

Keratinocytes are the main cell type in the epidermis and the first to be injured when exposed to an environmental stress such as UVB radiation. They react to stress in different ways, including the expression of several cytokines and proteins such as HSPs, and they can ultimately undergo apoptosis. As shown in Fig. 1A, flow cytometry analysis showed significant changes in the frequency of apoptotic cells after UV irradiation: 48 h after exposure, a single 600 mJ/cm² UVB-radiation exposure induced a large and significant increase in the frequency of apoptotic cells (53 ± 13% for UVB radiation compared to 16 ± 4% for incubator control cells; *n* = 3, *P* = 0.03) and an increased but non-significant frequency of necrotic keratinocytes (13 ± 4% for UVB radiation compared to 5 ± 4% for incubator control cells, *P* = 0.15). A corresponding significant decrease in cell viability was observed (34 ± 9% and 79 ± 2%, for UVB irradiation and incubator controls, respectively, *P* = 0.03). In contrast, the percentage of the different keratinocyte populations (viable, apoptotic and necrotic cell populations) did not vary after a 48-h GSM-1800 exposure compared to sham conditions (viable cells, *P* = 0.74; apoptotic cells, *P* = 0.42; and necrotic cells, *P* = 0.87 for GSM-1800 compared to sham and six independent experiments).

Heat shock altered the expression of HSPs (three to six independent experiments). In Fig. 1B, we observed no difference in HSP expression between incubator controls and sham-exposed cells (*P* = 0.72 for HSC70, *P* = 0.72 for HSP27, *P* = 0.13 for HSP70). However, HSP70 was the only protein whose expression was significantly affected from 2 to 48 h after exposure. Hence the fluorescence quantification gave 3.5 ± 0.2 arbitrary units for the HSP70 expression in sham conditions compared to 8.3 ± 1.7 arbitrary units in heat shock + 2 h cells (*P* = 0.004), 7.1 ± 0.6 arbitrary units in heat shock + 4 h cells (*P* = 0.002), 8.8 ± 1.7 arbitrary units in heat shock + 6 h cells (*P* = 0.006), and 11.6 ± 1.3 arbitrary units in heat shock + 48 h cells (*P* = 0.014). Fluorescence analysis of HSP labeling did not show any significant changes in HSC70 and HSP27 expression after heat shock compared to sham conditions (HSC70, *P* = 0.92; HSP27, *P* = 0.6; HSP70, *P* = 0.83). However, we found that patterns of HSC70 and HSP27 expression (Fig. 2A and B) were different after heat shock. In the case of HSC70, the basal expression was both cytoplasmic and nuclear, while it was essentially nuclear 2 h after heat shock. HSC70 expression became more intense at the nuclear level at 6 h after heat shock, while expression

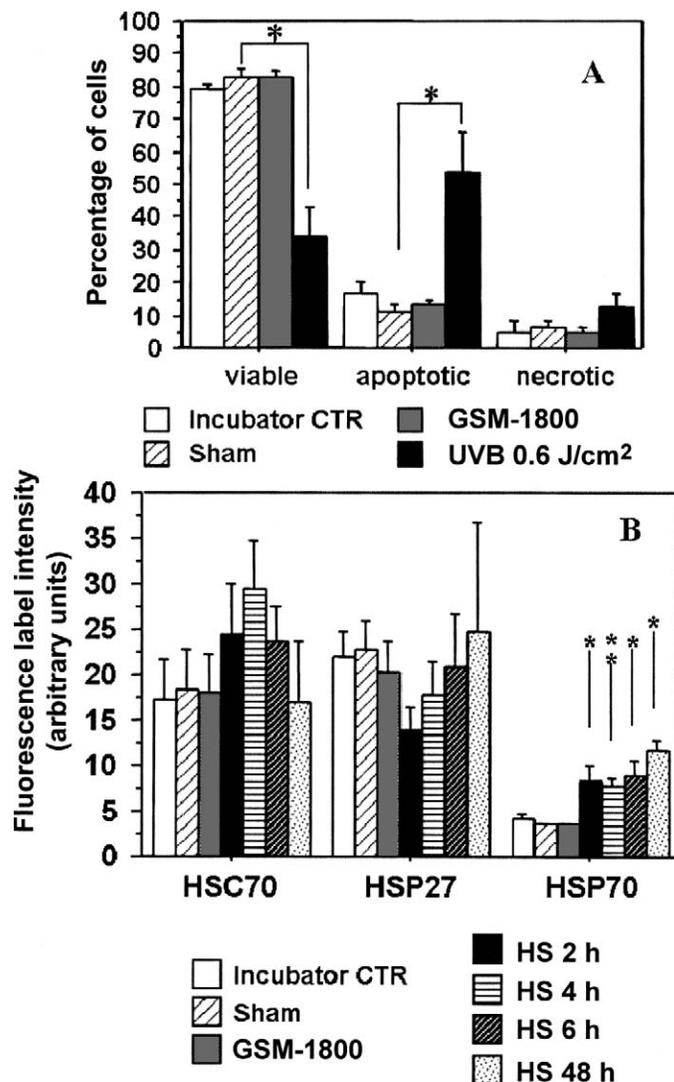


FIG. 1. Panel A: Detection of apoptosis in NHEK cells. Viable, apoptotic and necrotic cells were detected by flow cytometry after exposure to 2 W/kg GSM-1800 for 48 h (six independent experiments, each containing sham- and GSM-exposed groups). The positive controls for apoptosis used a single UVB-radiation exposure at 600 mJ/cm², apoptosis was assayed 48 h after exposure [three independent experiments each containing incubator control (incubator CTR) and UVB-radiation-exposed groups]. Panel B: HSP detection in NHEK cells. HSC70, HSP27 and HSP70 were detected by immunofluorescence and image analysis after exposure to 2 W/kg GSM-1800 for 48 h (eight independent duplicate experiments). The positive controls for HSP induction used a single heat shock (45°C, 20 min). HSP expression was assayed up to 48 h after exposure (three to six independent duplicate experiments).

became weaker and returned to a back nucleo-cytoplasmic pattern after 48 h. HSP27 localization was also modified as it moved from a cytoplasmic to a perinuclear/nuclear localization 4 h after heat shock. After 48 h, the fluorescence was back in the cytoplasm and seemed to be even more intense when it reached the nucleus. It is notable that keratinocytes are able to differentiate from basal keratinocytes to corneocytes, which are dead keratinized cells. This differentiation involves numerous cell processes, such as

SANCHEZ ET AL.

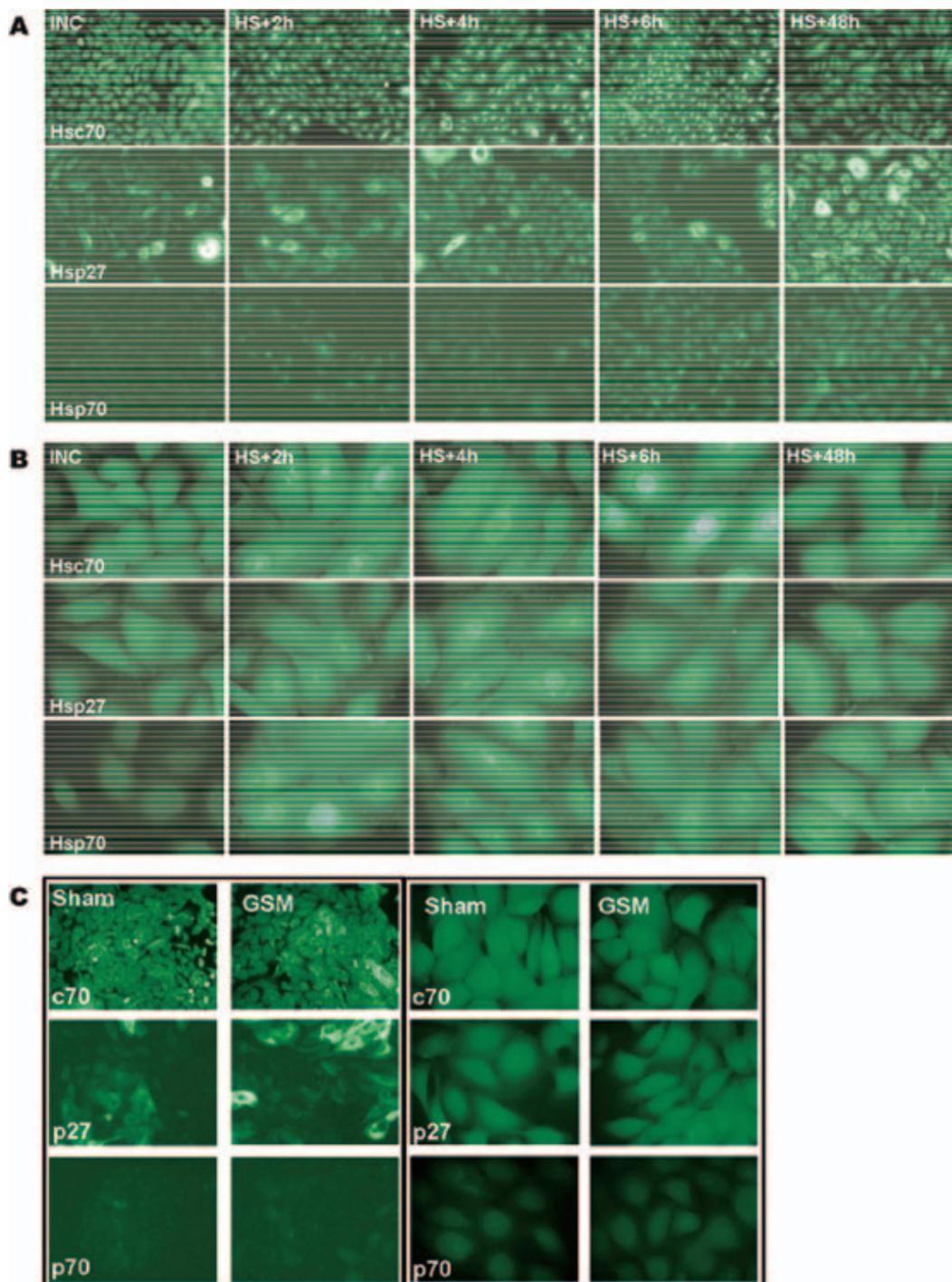


FIG. 2. HSP patterns of expression in NHEK. Panel A: Heat-shock (HS) treatment. INC: Control incubator cells (without any treatment), HS+“x”h: heat-shocked cells and allowed to recover “x” h after heat shock; original magnification 200 \times . Panel B: Heat-shock treatment; original magnification 1000 \times . Panel C: GSM-1800 exposure. GSM: cells exposed in the active waveguide (2 W/kg, 37.0 \pm 0.1 $^{\circ}$ C, 48 h). Sham: cells placed in the non-active waveguide (0 W/kg, 37.0 \pm 0.1 $^{\circ}$ C, 48 h). Left panel: original magnification 200 \times , right panel: original magnification 1000 \times .

lengthening, enlarging and expression of some proteins such as HSP27. In our images, some differentiating cells were present and showed a strong HSP27 labeling with a specific morphological shape. However, we only focused on proliferating keratinocytes in the present study.

After GSM-1800 exposure (Fig. 1B), the level of HSP

expression in epidermal cells did not vary. Figure 2C shows that whatever the exposure condition (control incubator cells, sham or GSM-1800) and whatever the protein, the localization of HSPs was similar. No alteration in the HSP expression pattern was thus observed in human keratinocytes and fibroblasts after GSM-1800 exposure.

GSM-1800 AND CELL STRESS RESPONSE IN THE SKIN

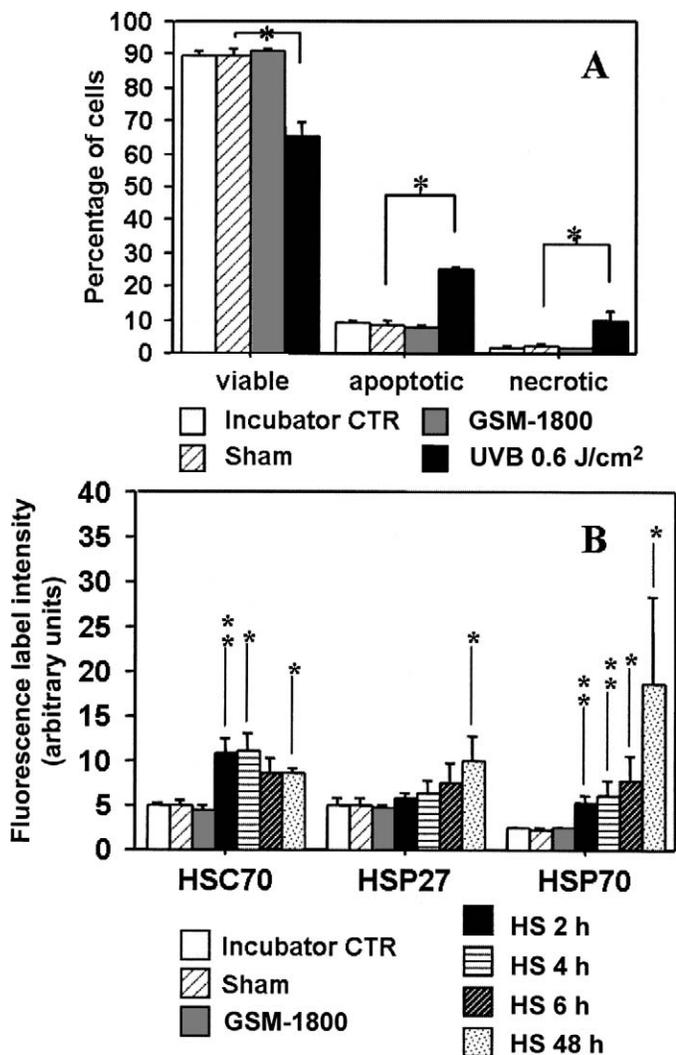


FIG. 3. Panel A: Detection of apoptosis in NHDF cells. Viable, apoptotic and necrotic NHDF cells were detected by flow cytometry after exposure to 2 W/kg GSM-1800 for 48 h (six independent experiments, each containing sham- and GSM-exposed groups). The positive controls for apoptosis were obtained using a single UVB-radiation exposure at 600 mJ/cm², apoptosis was assayed 48 h after exposure [three independent experiments each containing incubator control (Incubator CTR) and UVB-irradiated groups]. Panel B: HSP detection in NHDF cells. HSC70, HSP27 and HSP70 were detected by immunofluorescence and image analysis in NHDF cells after exposure to 2 W/kg GSM-1800 for 48 h (six independent duplicate experiments). The positive controls for HSP induction used a single heat shock (45°C, 20 min). HSP expression was assayed up to 48 h after exposure (three to six independent duplicate experiments).

Exposure to UVB Radiation, Heat Shock or GSM-1800 Basic Signal and Stress Response in Human Dermal Cells

The fibroblasts are the main cell type in the dermis and, due to their distribution in the skin, are injured at a delayed stage.

As shown in Fig. 3A, a significant increase was seen in the frequency of apoptotic ($25.0 \pm 0.9\%$ UVB radiation compared to $8.8 \pm 1.2\%$ incubator control cells, $P = 0.02$) and necrotic cells ($9.7 \pm 3.1\%$ UVB radiation compared to

$1.4 \pm 0.3\%$ incubator control cells, $P = 0.02$) 48 h after a single UVB-radiation exposure. Concomitantly, a significant decrease was obtained in the frequency of viable cells ($65 \pm 4\%$ UVB radiation compared to $80 \pm 1\%$ incubator control cells, $P = 0.02$). In contrast, a 48-h GSM-1800 exposure did not induce apoptotic or necrotic processes in fibroblasts compared to sham-exposed cells (viable cells, $P = 0.87$; apoptotic cells, $P = 0.75$; necrotic cells, $P > 0.99$).

The fluorescence analysis of HSP expression after heat shock showed a significant overexpression of all HSPs in fibroblasts. As shown in Fig. 3B, no difference in HSP expression was observed in incubator control and sham-exposed cells ($P = 0.75$ for Hsc70, $P = 0.75$ for Hsp27, $P > 0.99$ for Hsp70). In contrast, overexpression was seen for each HSP up to 48 h after heat shock. For instance, after 48 h of recovery, the level of HSC70 expression was 8.6 ± 0.7 arbitrary units for heat-shock conditions compared to 5.0 ± 0.7 arbitrary units for sham conditions ($P = 0.02$). The level of HSP27 expression was 10.1 ± 2.6 arbitrary units 48 h after heat shock compared to 5.0 ± 0.8 arbitrary units in sham-exposed samples ($P = 0.04$), and the HSP70 level was 18.6 ± 9.6 and 2.3 ± 0.1 arbitrary units in cells that recovered for 48 h after heat shock and in sham-exposed samples, respectively ($P = 0.02$). Moreover, increases in HSP expression were coupled with changes in expression patterns. Figure 4A shows HSP expression in normal conditions (incubator control cells) and up to 48 h after heat shock. We observed (Fig. 4B) that the cytoplasmic and perinuclear basal expression of HSC70 was coupled with a more intense nuclear signal 2 to 6 h after heat shock with some specific granules in the nucleus. Although the expression went back to basal levels 48 h after heat shock, the signal was higher than under normal conditions. The cytoplasmic and perinuclear pattern of HSP27 observed in keratinocytes was also noted in untreated fibroblasts; however, the pattern was stronger and more nuclear 4 h after heat shock and reached a perinuclear expression at 6 h of recovery. After 48 h of recovery, the HSP27 expression pattern went back to normal, with a strong labeling as compared to untreated cells. A very weak HSP70 expression could be seen in untreated cells. Two hours after heat shock, however, HSP70 was expressed in the cytoplasm and was significantly overexpressed after 48 h with a strong nuclear pattern.

GSM-1800 exposure did not affect HSP expression in human dermal cells, as shown by the fluorescence analysis (Fig. 3B). We also observed that the expression pattern of each HSP did not vary in cells exposed to GSM-1800 compared to sham-exposed cells (Fig. 4C).

In summary, a 48-h exposure of human primary skin cells to GSM-1800 did not have any effect comparable to that of a 20-min heat shock.

DISCUSSION

In our study, the stress induced by a GSM-1800 signal in skin cells was investigated and compared to the stress

SANCHEZ ET AL.

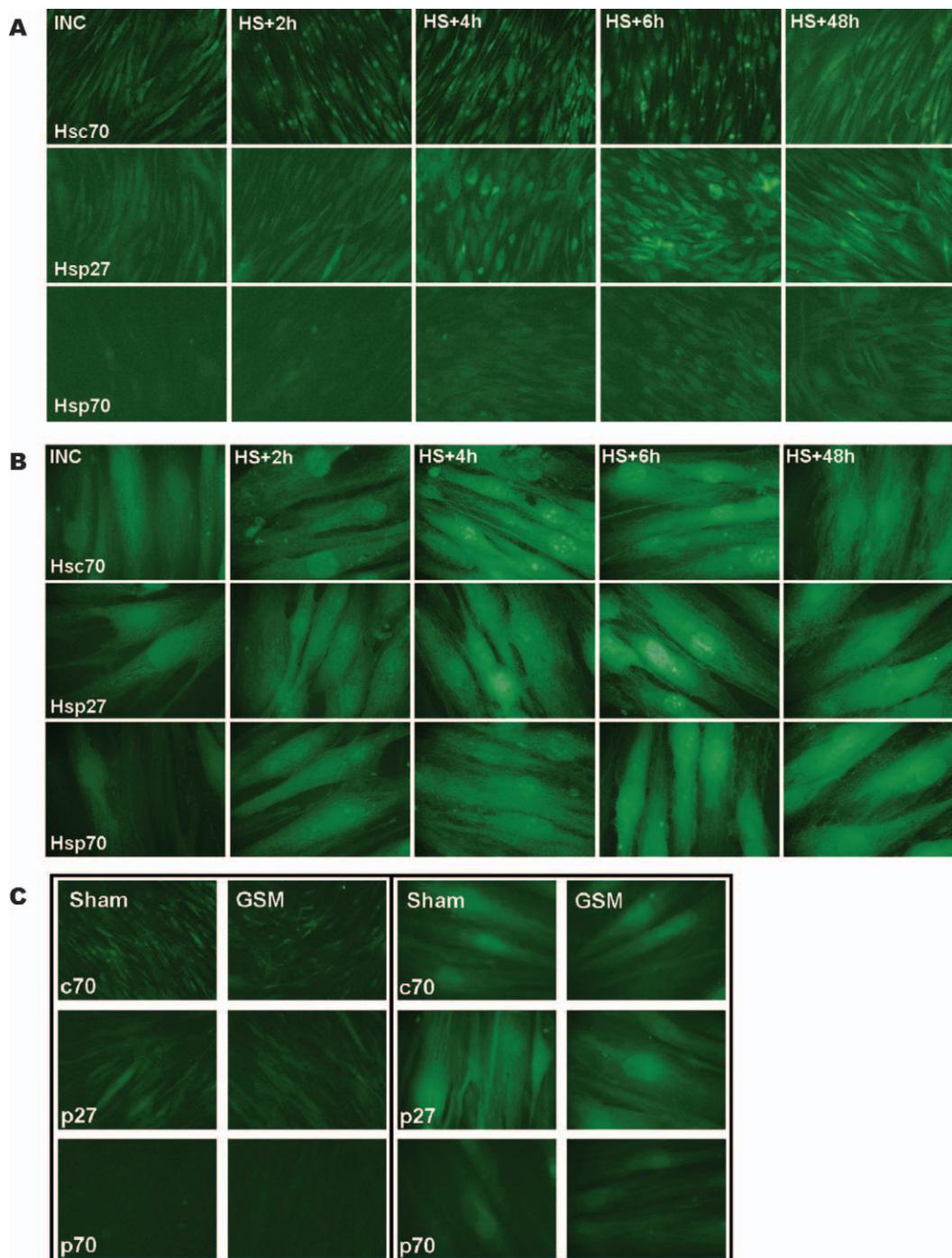


FIG. 4. patterns HSP of expression in NHDF cells. Panel A: Heat-shock (HS) treatment. INC: Incubator control cells (without any treatment), HS+“x”h: heat-shocked cells allowed to recover “x” h after heat shock; original magnification 200 \times . Panel B: Heat-shock treatment, original magnification 1000 \times . Panel C: GSM-1800 exposure. GSM: cells exposed in the active waveguide (2 W/kg, $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$, 48 h), Sham: cells placed in the non-active waveguide (0 W/kg, $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$, 48 h). Left panel: original magnification 200 \times ; right panel: original magnification 1000 \times .

experienced after UVB irradiation and heat-shock treatment.

We found that human primary skin cells did not undergo apoptosis after exposure to the GSM-1800 mobile phone signal. Most of the work published previously reported that RF radiation from mobile communications did not lead to cell apoptosis. The only report available on the effects of

intermittent 1800 MHz signals (GSM basic and transmission or talk modulations) on apoptosis *in vitro* showed no induction of apoptosis after a 44-h exposure to GSM-1800 or combined exposure to the apoptosis-inducing agent 2-deoxy-D-ribose and GSM-1800 in human peripheral blood cells at 1.4 and 2.0 W/kg (54).

The effects on apoptosis of low-level RF radiation at

GSM-1800 AND CELL STRESS RESPONSE IN THE SKIN

different frequencies have also been published. Very recently, no significant induction of apoptosis was observed in human IMR-90 fibroblasts (isolated from fetal lungs) and human glioblastoma A172 cells exposed to modulated or CW RF fields at 1.425 GHz for up to 48 h (55). Gurisik *et al.* (56) did not observe any effects on gene expression (microarrays), on heat-shock protein levels, on cell cycle distributions, and on apoptosis in cells of the neuroblastoma cell line SK-N-SH exposed to a GSM-900 signal at 0.2 W/kg. Moreover, they did not find any changes in cell viability and cell cycle in cells of the macrophage U937 cell line under the same exposure conditions.

Another group found no apoptosis, as detected with DAPI and TUNEL staining and caspase 3 activity, in SH-SY5Y human neuroblastoma cells exposed for 24 h to GSM-900 (2 W/kg CW; 0.25 W/kg GSM) (57).

Recently, a slight increase in one of the parameters of apoptosis tested (phosphatidylserine pool on outer plasma membrane) was reported in human lymphocytes exposed to GSM-modulated fields but not to continuous-wave fields at 900 MHz (58). Other groups used neuroblastoma cells (5) or Molt-4 lymphoblastoid cells (15) and found no pro-apoptosis effects of GSM-900 exposure.

In contrast, induction of apoptosis was found in human epidermoid cancer KB cells exposed to a 3.6 W/kg 1.95 GHz signal for 3 h (60) and in mutant yeast exposed to a combination of UVB radiation and amplitude-modulated 835 MHz and 900 MHz RF fields (3 and 0.4 W/kg, respectively) (61). Therefore, further investigations of (isothermal) exposure levels above 2 W/kg and on synergistic effects is warranted.

Apoptosis is known as a highly regulated process and involves a number of factors. For instance, HSP proteins such as HSP70 may be pro- or anti-apoptosis, depending on the cell type (62–66). Therefore, in parallel with detection of apoptosis, the present study also focused on HSP expression in skin cells.

Our results showed that the HSP expression pattern was altered after heat shock: A nuclear translocation of HSPs was seen starting 2 h after exposure and for up to 48 h. In contrast, we did not observe any change in HSP patterns after a 48-h exposure to GSM-1800.

Increases in HSP expression were reported in the literature in other cell types or in non-mammalian animal models after exposure to mobile phone signals (8, 67–70). However, the previously reported induction of HSP16 in a transgenic worm system after exposure to low-intensity microwaves (67) was recently demonstrated to be linked to a slight temperature rise in the exposure system (71). The threshold for HSP induction as a response to RF fields was found at 7.5 W/kg SAR in the rat brain (68) and 20 W/kg in MO54 cells (8); these effects are thus probably linked to a thermal effect. In contrast, most of the recent papers reported negative results on the effects of RF fields on different cell types (5, 11, 20, 23, 54, 58), in agreement with our findings. Moreover, our results on human primary

skin cells are in agreement with those showing no alteration of rat skin after a single or repetitive local exposure to GSM-1800 *in vivo* (72, 73).

It is worth emphasizing that in this study, we used primary cells (from second to the sixth passage); these cells are isolated directly from human samples and are therefore closer to the actual skin metabolism than skin cell lines. For instance, primary keratinocytes are able to differentiate and their time in culture is therefore short compared to cell lines. Apoptosis is a known reaction of skin primary cells exposed to UV radiation, and it was found to be altered in cell lines, where enhancement as well as inhibition of the process of apoptosis were described (74, 75).

In the present work, we studied the potential biological effects of a GSM-1800 signal on normal primary skin cells. Based on our results on apoptosis and HSP expression, we found no evidence for the existence of a stress response in normal human skin cells after GSM-1800 exposure under our exposure conditions (2 W/kg, 37.0 ± 0.1°C, 48 h).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the CNRS, the Aquitaine Council for Research, France Telecom R&D and Bouygues Telecom.

Received: August 15, 2006; accepted: November 13, 2006

REFERENCES

1. J. Czyz, K. Guan, Q. Zeng, T. Nikolova, A. Meister, F. Schonborn, J. Schuderer, N. Kuster and A. M. Wobus, High frequency electromagnetic fields (GSM signals) affect gene expression levels in tumor suppressor p53-deficient embryonic stem cells. *Bioelectromagnetics* **25**, 296–307 (2004).
2. P. C. Goswami, L. D. Albee, A. J. Parsian, J. D. Baty, E. G. Moros, W. F. Pickard, J. L. Roti Roti and C. R. Hunt, Proto-oncogene mRNA levels and activities of multiple transcription factors in C3H 10T^{1/2} murine embryonic fibroblasts exposed to 835.62 and 847.74 MHz cellular phone communication frequency radiation. *Radiat. Res.* **151**, 300–309 (1999).
3. S. Lee, D. Johnson, K. Dunbar, H. Dong, X. Ge, Y. C. Kim, C. Wing, N. Jayathilaka, N. Emmanuel, C. Q. Zhou and S. M. Wang, 2.45 GHz radiofrequency fields alter gene expression in cultured human cells. *FEBS Lett.* **579**, 4829–4836 (2005).
4. T. Nikolova, J. Czyz, A. Rolletschek, P. Blyszczuk, J. Fuchs, G. Jovtchev, J. Schuderer, N. Kuster and A. M. Wobus, Electromagnetic fields affect transcript levels of apoptosis-related genes in embryonic stem cell-derived neural progenitor cells. *FASEB J.* **19**, 1686–1688 (2005).
5. J. Miyakoshi, K. Takemasa, Y. Takashima, G. R. Ding, H. Hirose and S. Koyama, Effects of exposure to a 1950 MHz radio frequency field on expression of Hsp70 and Hsp27 in human glioma cells. *Bioelectromagnetics* **26**, 251–257 (2005).
6. R. Nylund and D. Leszczynski, Proteomics analysis of human endothelial cell line EA.hy926 after exposure to GSM 900 radiation. *Proteomics* **4**, 1359–1365 (2004).
7. S. Pacini, M. Ruggiero, I. Sardi, S. Aterini, F. Gulisano and M. Gulisano, Exposure to global system for mobile communication (GSM) cellular phone radiofrequency alters gene expression, proliferation, and morphology of human skin fibroblasts. *Oncol. Res.* **13**, 19–24 (2002).
8. F. Tian, T. Nakahara, K. Wake, M. Taki and J. Miyakoshi, Exposure to 2.45 GHz electromagnetic fields induces hsp70 at a high SAR of

SANCHEZ ET AL.

- more than 20 W/kg but not at 5 W/kg in human glioma MO54 cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **78**, 433–440 (2002).
9. Y. Takashima, H. Hirose, S. Koyama, Y. Suzuki, M. Taki and J. Miyakoshi, Effects of continuous and intermittent exposure to RF fields with a wide range of SARs on cell growth, survival, and cell cycle distribution. *Bioelectromagnetics* **27**, 392–400 (2006).
 10. S. Velizarov, P. Raskmark and S. Kwee, The effects of radiofrequency fields on cell proliferation are non-thermal. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **48**, 177–180 (1999).
 11. V. Chauhan, A. Mariampillai, P. V. Bellier, S. S. Qutob, G. B. Gajda, E. Lemay, A. Thansandote and J. P. McNamee, Gene expression analysis of a human lymphoblastoma cell line exposed *in vitro* to an intermittent 1.9 GHz pulse-modulated radiofrequency field. *Radiat. Res.* **165**, 424–429 (2006).
 12. S. S. Qutob, V. Chauhan, P. V. Bellier, C. L. Yauk, G. R. Douglas, L. Berndt, A. Williams, G. B. Gajda, E. Lemay and J. P. McNamee, Microarray gene expression profiling of a human glioblastoma cell line exposed *in vitro* to a 1.9 GHz pulse-modulated radiofrequency field. *Radiat. Res.* **165**, 636–644 (2006).
 13. T. D. Whitehead, B. H. Brownstein, J. J. Parry, D. Thompson, B. A. Cha, E. G. Moros, B. E. Rogers and J. L. Roti Roti, Expression of the proto-oncogene *Fos* after exposure to radiofrequency radiation relevant to wireless communications. *Radiat. Res.* **164**, 420–430 (2005).
 14. K. S. Bisht, E. G. Moros, W. L. Straube, J. D. Baty and J. L. Roti Roti, The effect of 835.62 MHz FDMA or 847.74 MHz CDMA modulated radiofrequency radiation on the induction of micronuclei in C3H 10T^{1/2} cells. *Radiat. Res.* **157**, 506–515 (2002).
 15. G. J. Hook, P. Zhang, I. Lagroye, L. Li, R. Higashikubo, E. G. Moros, W. L. Straube, W. F. Pickard, J. D. Baty and J. L. Roti Roti, Measurement of DNA damage and apoptosis in Molt-4 cells after *in vitro* exposure to radiofrequency radiation. *Radiat. Res.* **161**, 193–200 (2004).
 16. J. P. McNamee, P. V. Bellier, G. B. Gajda, B. F. Lavallee, E. P. Lemay, L. Marro and A. Thansandote, DNA damage in human leukocytes after acute *in vitro* exposure to a 1.9 GHz pulse-modulated radiofrequency field. *Radiat. Res.* **158**, 534–537 (2002).
 17. J. P. McNamee, P. V. Bellier, G. B. Gajda, S. M. Miller, E. P. Lemay, B. F. Lavallee, L. Marro and A. Thansandote, DNA damage and micronucleus induction in human leukocytes after acute *in vitro* exposure to a 1.9 GHz continuous-wave radiofrequency field. *Radiat. Res.* **158**, 523–533 (2002).
 18. Vijayalaxmi, B. Z. Leal, M. L. Meltz, W. F. Pickard, K. S. Bisht, J. L. Roti Roti, W. L. Straube and E. G. Moros, Cytogenetic studies in human blood lymphocytes exposed *in vitro* to radiofrequency radiation at a cellular telephone frequency (835.62 MHz, FDMA). *Radiat. Res.* **155**, 113–121 (2001).
 19. V. Chauhan, A. Mariampillai, G. B. Gajda, A. Thansandote and J. P. McNamee, Analysis of proto-oncogene and heat-shock protein gene expression in human derived cell-lines exposed *in vitro* to an intermittent 1.9 GHz pulse-modulated radiofrequency field. *Int. J. Radiat. Biol.* **82**, 347–354 (2006).
 20. M. Lantow, M. Lupke, J. Frahm, M. O. Mattsson, N. Kuster and M. Simko, ROS release and Hsp70 expression after exposure to 1,800 MHz radiofrequency electromagnetic fields in primary human monocytes and lymphocytes. *Radiat. Environ. Biophys.* **45**, 55–62 (2006).
 21. A. Laszlo, E. G. Moros, T. Davidson, M. Bradbury, W. Straube and J. Roti Roti, The heat-shock factor is not activated in mammalian cells exposed to cellular phone frequency microwaves. *Radiat. Res.* **164**, 163–172 (2005).
 22. H. B. Lim, G. G. Cook, A. T. Barker and L. A. Coulton, Effect of 900 MHz electromagnetic fields on nonthermal induction of heat-shock proteins in human leukocytes. *Radiat. Res.* **163**, 45–52 (2005).
 23. M. Simko, C. Hartwig, M. Lantow, M. Lupke, M. O. Mattsson, Q. Rahman and J. Rollwitz, Hsp70 expression and free radical release after exposure to non-thermal radio-frequency electromagnetic fields and ultrafine particles in human Mono Mac 6 cells. *Toxicol. Lett.* **161**, 73–82 (2006).
 24. H. Tuschl, W. Novak and H. Molla-Djafari, *In vitro* effects of GSM modulated radiofrequency fields on human immune cells. *Bioelectromagnetics* **27**, 188–196 (2006).
 25. S. F. Cleary, G. Cao, L. M. Liu, P. M. Egle and K. R. Shelton, Stress proteins are not induced in mammalian cells exposed to radiofrequency or microwave radiation. *Bioelectromagnetics* **18**, 499–505 (1997).
 26. R. B. Stagg, W. J. Thomas, R. A. Jones and W. R. Adey, DNA synthesis and cell proliferation in C6 glioma and primary glial cells exposed to a 836.55 MHz modulated radiofrequency field. *Bioelectromagnetics* **18**, 230–236 (1997).
 27. Z. Assefa, M. Garmyn, A. Vantieghem, W. Declercq, P. Vandennebe, J. R. Vandennebe and P. Agostinis, Ultraviolet B radiation-induced apoptosis in human keratinocytes: Cytosolic activation of procaspase-8 and the role of Bcl-2. *FEBS Lett.* **540**, 125–132 (2003).
 28. Z. Assefa, A. Van Laethem, M. Garmyn and P. Agostinis, Ultraviolet radiation-induced apoptosis in keratinocytes: On the role of cytosolic factors. *Biochim. Biophys. Acta* **1755**, 90–106 (2005).
 29. T. Schmidt-Rose, D. Pollet, K. Will, J. Bergemann and K. P. Wittern, Analysis of UV-B-induced DNA damage and its repair in heat-shocked skin cells. *J. Photochem. Photobiol. B* **53**, 144–152 (1999).
 30. R. Takasawa, H. Nakamura, T. Mori and S. Tanuma, Differential apoptotic pathways in human keratinocyte HaCaT cells exposed to UVB and UVC. *Apoptosis* **10**, 1121–1130 (2005).
 31. G. P. Pfeifer, Y. H. You and A. Besaratinia, Mutations induced by ultraviolet light. *Mutat. Res.* **571**, 19–31 (2005).
 32. J. Bologna, M. Murray and J. Pawelek, UVB-induced melanogenesis may be mediated through the MSH-receptor system. *J. Invest. Dermatol.* **92**, 651–656 (1989).
 33. L. Marrot, J. P. Belaidi, C. Jones, P. Perez and J. R. Meunier, Molecular responses to stress induced in normal human Caucasian melanocytes in culture by exposure to simulated solar UV. *Photochem. Photobiol.* **81**, 367–375 (2005).
 34. C. Romero-Graillet, E. Aberdam, N. Biagoli, W. Massabni, J. P. Ortonne and R. Ballotti, Ultraviolet B radiation acts through the nitric oxide and cGMP signal transduction pathway to stimulate melanogenesis in human melanocytes. *J. Biol. Chem.* **271**, 28052–28056 (1996).
 35. A. Pisarchik, J. Wortsman and A. Slominski, A novel microarray to evaluate stress-related genes in skin: Effect of ultraviolet light radiation. *Gene* **341**, 199–207 (2004).
 36. F. Trautinger, I. Kindas-Mugge, B. Barlan, P. Neuner and R. M. Knobler, 72-kD heat shock protein is a mediator of resistance to ultraviolet B light. *J. Invest. Dermatol.* **105**, 160–162 (1995).
 37. X. Zhou, V. A. Tron, G. Li and M. J. Trotter, Heat shock transcription factor-1 regulates heat shock protein-72 expression in human keratinocytes exposed to ultraviolet B light. *J. Invest. Dermatol.* **111**, 194–198 (1998).
 38. F. Bernerd, A. Sarasin and T. Magnaldo, Galectin-7 overexpression is associated with the apoptotic process in UVB-induced sunburn keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11329–11334 (1999).
 39. J. Yamaoka, S. Kawana and Y. Miyachi, Nitric oxide inhibits ultraviolet B-induced murine keratinocyte apoptosis by regulating apoptotic signaling cascades. *Free Radic. Res.* **38**, 943–950 (2004).
 40. F. Trautinger, Heat shock proteins in the photobiology of human skin. *J. Photochem. Photobiol. B* **63**, 70–77 (2001).
 41. F. Trautinger, I. Trautinger, I. Kindas-Mugge, D. Metzger and T. A. Luger, Human keratinocytes *in vivo* and *in vitro* constitutively express the 72-kD heat shock protein. *J. Invest. Dermatol.* **101**, 334–338 (1993).
 42. C. Jonak, G. Klosner, G. Kokesch, D. Fodinger, H. Honigsmann and F. Trautinger, Subcorneal colocalization of the small heat shock protein, hsp27, with keratins and proteins of the cornified cell envelope. *Br. J. Dermatol.* **147**, 13–19 (2002).
 43. I. Kindas-Mugge and F. Trautinger, Increased expression of the M(r) 27,000 heat shock protein (hsp27) in *in vitro* differentiated normal human keratinocytes. *Cell Growth Differ.* **5**, 777–781 (1994).
 44. R. Zhao and W. A. Houry, Hsp90: A chaperone for protein folding and gene regulation. *Biochem. Cell Biol.* **83**, 703–710 (2005).

GSM-1800 AND CELL STRESS RESPONSE IN THE SKIN

45. C. Jolly and R. I. Morimoto, Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 1564–1572 (2000).
46. L. Marrot, J. P. Belaidi, C. Jones, P. Perez, L. Riou, A. Sarasin and J. R. Meunier, Molecular responses to photogenotoxic stress induced by the antibiotic lomefloxacin in human skin cells: From DNA damage to apoptosis. *J. Invest. Dermatol.* **121**, 596–606 (2003).
47. P. Mass, K. Hoffmann, T. Gambichler, P. Altmeyer and H. G. Mannherz, Premature keratinocyte death and expression of marker proteins of apoptosis in human skin after UVB exposure. *Arch. Dermatol. Res.* **295**, 71–79 (2003).
48. D. L. Bratton, V. A. Fadok, D. A. Richter, J. M. Kailey, L. A. Guthrie and P. M. Henson, Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J. Biol. Chem.* **272**, 26159–26165 (1997).
49. S. J. Martin, C. P. Reutelingsperger, A. J. McGahon, J. A. Rader, R. C. van Schie, D. M. LaFace and D. R. Green, Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: Inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.* **182**, 1545–1556 (1995).
50. F. Schonborn, K. Pokovic, M. Burkhardt and N. Kuster, Basis for optimization of *in vitro* exposure apparatus for health hazard evaluations of mobile communications. *Bioelectromagnetics* **22**, 547–559 (2001).
51. J. Schuderer and N. Kuster, Effect of the meniscus at the solid/liquid interface on the SAR distribution in Petri dishes and flasks. *Bioelectromagnetics* **24**, 103–108 (2003).
52. International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection, Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic, and electromagnetic fields (up to 300 GHz). *Health Phys.* **74**, 494–522 (1998).
53. *Non-Ionizing Radiation, Part 1: Static and Extremely Low-Frequency (ELF) Electric and Magnetic Fields*. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 80, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2002.
54. M. Capri, E. Scarcella, E. Bianchi, C. Fumelli, P. Mesirca, C. Agostini, D. Remondini, J. Schuderer, N. Kuster and F. Bersani, 1800 MHz radiofrequency (mobile phones, different global system for mobile communication modulations) does not affect apoptosis and heat shock protein 70 level in peripheral blood mononuclear cells from young and old donors. *Int. J. Radiat. Biol.* **80**, 389–397 (2004).
55. H. Hirose, N. Sakuma, N. Kaji, T. Suhara, M. Sekijima, T. Nojima and J. Miyakoshi, Phosphorylation and gene expression of p53 are not affected in human cells exposed to 2.1425 GHz band CW or W-CDMA modulated radiation allocated to mobile radio base stations. *Bioelectromagnetics* **27**, 494–504 (2006).
56. E. Gurisik, K. Warton, D. K. Martin and S. M. Valenzuela, An *in vitro* study of the effects of exposure to a GSM signal in two human cell lines: Monocytic U937 and neuroblastoma SK-N-SH. *Cell Biol. Int.* **30**, 793–799 (2006).
57. V. Joubert, P. Leveque, A. Rametti, A. Collin, S. Bourthoumieu and C. Yardin, Microwave exposure of neuronal cells *in vitro*: Study of apoptosis. *Int. J. Radiat. Biol.* **82**, 267–275 (2006).
58. M. Capri, E. Scarcella, C. Fumelli, E. Bianchi, S. Salvioli, P. Mesirca, C. Agostini, A. Antolini, A. Schiavoni and C. Franceschi, *In vitro* exposure of human lymphocytes to 900 MHz CW and GSM modulated radiofrequency: Studies of proliferation, apoptosis and mitochondrial membrane potential. *Radiat. Res.* **162**, 211–218 (2004).
59. P. Merola, C. Marino, G. A. Lovisolò, R. Pinto, C. Laconi and A. Negroni, Proliferation and apoptosis in a neuroblastoma cell line exposed to 900 MHz modulated radiofrequency field. *Bioelectromagnetics* **27**, 164–171 (2006).
60. M. Caraglia, M. Marra, F. Mancinelli, G. D'Ambrosio, R. Massa, A. Giordano, A. Budillon, A. Abbruzzese and E. Bismuto, Electromagnetic fields at mobile phone frequency induce apoptosis and inactivation of the multi-chaperone complex in human epidermoid cancer cells. *J. Cell Physiol.* **204**, 539–548 (2005).
61. A. Markkanen, P. Penttinen, J. Naarala, J. Pelkonen, A. P. Sihvonen and J. Juutilainen, Apoptosis induced by ultraviolet radiation is enhanced by amplitude modulated radiofrequency radiation in mutant yeast cells. *Bioelectromagnetics* **25**, 127–133 (2004).
62. H. M. Beere, “The stress of dying”: The role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J. Cell Sci.* **117**, 2641–2651 (2004).
63. S. K. Calderwood, M. A. Khaleque, D. B. Sawyer and D. R. Ciocca, Heat shock proteins in cancer: Chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 164–172 (2006).
64. C. Garrido, S. Gurbuxani, L. Ravagnan and G. Kroemer, Heat shock proteins: Endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286**, 433–442 (2001).
65. A. Parcellier, S. Gurbuxani, E. Schmitt, E. Solary and C. Garrido, Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**, 505–512 (2003).
66. M. Vayssier and B. S. Polla, Heat shock proteins chaperoning life and death. *Cell Stress Chaperones* **3**, 221–227 (1998).
67. D. de Pomerai, C. Daniells, H. David, J. Allan, I. Duce, M. Mutwakil, D. Thomas, P. Sewell, J. Tattersall and P. Candido, Non-thermal heat-shock response to microwaves. *Nature* **405**, 417–418 (2000).
68. K. Fritze, C. Wiessner, N. Kuster, C. Sommer, P. Gass, D. M. Hermann, M. Kiessling and K. A. Hossmann, Effect of global system for mobile communication microwave exposure on the genomic response of the rat brain. *Neuroscience* **81**, 627–639 (1997).
69. D. Leszczynski, S. Joenvaara, J. Reivinen and R. Kuokka, Non-thermal activation of the hsp27/p38MAPK stress pathway by mobile phone radiation in human endothelial cells: Molecular mechanism for cancer- and blood-brain barrier-related effects. *Differentiation* **70**, 120–129 (2002).
70. D. Weisbrot, H. Lin, L. Ye, M. Blank and R. Goodman, Effects of mobile phone radiation on reproduction and development in *Drosophila melanogaster*. *J. Cell. Biochem.* **89**, 48–55 (2003).
71. A. S. Dawe, B. Smith, D. W. Thomas, S. Greedy, N. Vasic, A. Gregory, B. Loader and D. I. de Pomerai, A small temperature rise may contribute towards the apparent induction by microwaves of heat-shock gene expression in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Bioelectromagnetics* **27**, 88–97 (2006).
72. H. Masuda, S. Sanchez, P. Dulou, E. Haro, R. Anane, B. Billaudel, P. Lévêque and B. Veyret, Effect of GSM-900 and -1800 signals on the skin of hairless rats. I: 2-hour acute exposures. *Int. J. Radiat. Biol.* **82**, 669–674 (2006).
73. S. Sanchez, H. Masuda, P. Dulou, E. Haro, R. Anane, B. Billaudel, P. Lévêque and B. Veyret, Effect of GSM-900 and -1800 signals on the skin of hairless rats. II: 12-week chronic exposures. *Int. J. Radiat. Biol.* **82**, 675–680 (2006).
74. N. Fabre-Jonca, S. Gonin, C. Diaz-Latoud, J. P. Rouault and A. P. Arrigo, Thermal sensitivity in NIH 3T3 fibroblasts transformed by the v-fos oncogene. Correlation with reduced accumulation of 68-kDa and 25-kDa stress proteins after heat shock. *Eur. J. Biochem.* **232**, 118–128 (1995).
75. C. M. Simbulan-Rosenthal, V. Trabosh, A. Velarde, F. P. Chou, A. Daher, F. Tenzin, T. Tokino and D. S. Rosenthal, Id2 protein is selectively upregulated by UVB in primary, but not in immortalized human keratinocytes and inhibits differentiation. *Oncogene* **24**, 5443–5458 (2005).

ARTICLE 3 : Potential genotoxic effect of an *in vitro* exposure on human cutaneous (fibroblast) and nerve cells (SH-SY5Y, CHME-5) to GSM-1800 signal

SANCHEZ S., BALL, A.J., HARO E., RUFFIE G., VEYRET B., AND LAGROYE I..

Potential genotoxic effect of an *in vitro* exposure on human cutaneous (fibroblast) and nerve cells (SH-SY5Y, CHME-5) to GSM-1800 signal.

Mutation Research (soumis)

L'article 3 traite des effets génotoxiques potentiels du signal GSM-1800 sur la peau et le système nerveux central. La génotoxicité des ondes électromagnétiques est une question de plus en plus récurrente et de nombreuses publications ont déjà abordé le sujet sur différents modèles cellulaires notamment sur des souches lymphocytaires. Ici, l'approche *in vitro* a consisté à étudier des cellules primaires humaines dermique de peau (fibroblastes) et des lignées humaines nerveuses provenant de neuroblastome, SH-SY5Y et de gliome, CHME-5. Nous avons supposé dans cette étude que le signal GSM-1800, au DAS de 2 W/kg, pouvait être un agent stressant et génotoxique et cette hypothèse a été testée sur deux modes d'exposition : continu et intermittent (5 min ON / 10 min OFF) sur des temps d'exposition variant de 1 heure à 48 heures. La génotoxicité a été évaluée par le test alcalin de comètes qui détecte les cassures simples et doubles brins de l'ADN. La mise en évidence de lésions sérieuses de l'ADN dans les modèles cellulaires testés a été réalisée par le biais d'exposition aux UVB pour les fibroblastes et de traitement au Tert-Butyl peroxyde pour les cellules nerveuses. Les analyses ont été réalisées sur deux lames contenant deux cercles de dépôt par échantillon. L'analyse des comètes a été faite sur au moins 100 cellules à l'aide du logiciel CometScore.

Article title:

No DNA damage in human primary fibroblasts and human brain cell lines exposed to intermittent and continuous GSM-1800 mobile phone signals

Authors:

Sandrine Sanchez ^{1*},

Amanda Jane Ball ²,

Emmanuelle Haro ¹,

Gilles Ruffié ¹,

Bernard Veyret ¹,

Isabelle Lagroye ¹.

Affiliation:

¹ PIOM, Bioelectromagnetics Laboratory, Ecole Pratique des Hautes Etudes, UMR 5501 CNRS, ENSCPB, 16 avenue Pey-Berland, 33607, Pessac, France.

² Liverpool School of Tropical Medicine, Pembroke Place, Liverpool L3 5QA, United Kingdom.

* Corresponding author:

Phone number: +33 5 40 00 69 65

Fax number: +33 5 40 00 66 31

e-mail: s.sanchez@enscpb.fr

Abstract:

There is still some debate about potential DNA damages caused by radiofrequency radiation (RFR) emitted by mobile phones, particularly with intermittent exposure. We therefore investigated *in vitro* the potential genotoxic effects of continuous or intermittent GSM-1800 exposure at 2 W/kg during 1 to 48 hours. Human primary dermal fibroblasts and human brain cell lines, CHME-5 and SH-SY5Y, were exposed and DNA single-strand breaks were detected using the alkaline comet assay. Human cells were exposed to GSM-1800 under blind conditions using the SXC-1800 system built at IT'IS, and to ultraviolet radiation or Tert-butyl hydroxperoxide used as positive controls. Immediately after exposure, the cells were treated for the comet assay. At least hundred comets per exposure condition were analyzed, using the CometScore™ software. Two parameters, i.e. the percentage of DNA in the tail of comets and the Olive moment were considered in the analysis. Our results showed that exposure to continuous or intermittent GSM-1800 did not result in induction of DNA damage whatever the exposure duration and the cellular type.

Key Words: GSM-1800, intermittent exposure, continuous exposure, human cells, DNA damage.

1- Introduction

Exposure of mammalian cells to genotoxic stress activates an intricate network of processes collectively known as DNA damage response [Stergiou and Hengartner, 2004] with three main components: (i) processes that sense, signal and repair DNA damage are activated following exposure to DNA damaging agents; the function of these processes is to restore the integrity and accuracy of the DNA sequence; (ii) molecules that sense and signal DNA damage are linked with cell-cycle checkpoint mechanisms; the function of resulting cell-cycle blocks is to allow repair events to take place; (iii) some of the above mechanisms are linked to the control of apoptosis and cells with irreparable DNA damage are stimulated to enter the apoptotic pathways.

DNA damaging agents are numerous in the environment (e.g., UV radiation, heavy metals, chemicals), but the effects of radiofrequency radiation (RFR) emitted by mobile phones is still under debate. The increase in carrier frequency of mobile telephony signals (from 900 to 2000 MHz) causes a more superficial absorption [Keshvari and Lang, 2005]. Consequently, during mobile phone use, the skin is the organ that is most exposed.

Some recent *in vitro* work has shown that exposing lymphocytes to 900 MHz mobile phone signals could be deleterious to DNA [Marinelli et al., 2004; Tice et al., 2002], while most other studies concluded in the absence of genotoxic effects [Hook et al., 2004; Li et al., 2001; Malyapa et al., 1997; Scarfi et al., 2006; Stronati et al., 2006; Zeni et al., 2003; Zeni et al., 2005]. To date, only two published papers have dealt with genotoxic effects of 1800-MHz RFR exposure [Diem et al., 2005; Tice et al., 2002]. It has been suggested that intermittent exposures or modulated signals could affect cells more than continuous exposures or non-modulated signals [Diem et al., 2005; Pacini et al., 2002]. Clarifying these contradictory results is warranted before concluding about *in vitro* genotoxic effects of RFR exposure.

With the aim of testing the hypothesis that RFR induce genotoxic damage, we investigated DNA damage in human primary dermal fibroblasts and human brain cell lines, CHME-5 (microglial cells) and SH-SY5Y (neuroblastoma cells), after 1- to 48-hour GSM-1800 exposure at 2 W/kg – the Specific Absorption Rate (SAR) limit recommended in the 1998 ICNIRP guidelines for public local exposure limits) [ICNIRP, 1998] - with or without intermittence (5 minutes ON / 10 minutes OFF), and a comparison was made with the effects of UVB exposure or chemical treatment with Tert-Butyl hydroxyperoxide. Two parameters were calculated: the percentage of DNA in the tail of the comets and the Olive moment. Both were obtained using the CometScore™ comet scoring software.

By using human skin and nerve cells one may approach the real conditions of public exposure to mobile communication sources. In this work, we screened DNA damage in cells using the alkaline comet assay to increase the knowledge on potential genotoxic effects *in vitro* of continuous or intermittent GSM-1800 signal.

2- Materials and Methods

Unless stated otherwise, all chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

Cells

All cells were cultured at 37°C, 5% CO₂, in a humidified atmosphere in a culture incubator with a renewal of medium every two days.

Normal human primary dermal fibroblasts (NHDF) extracted from adult skin biopsies were purchased from Cambrex (Verviers, Belgium). They were allowed to grow in Fibroblasts

Growth Medium (FGM, Cambrex, Verviers, Belgium). Cells came from female donors aged from 29 to 58 years and were used in experiments from the second to the sixth passage.

The CHME-5 human microglial cell line was obtained after transfection with the T-antigen of the SV-40 virus of human embryonic microglial cells [Peudenier et al., 1991]. Cells were cultured in MEM medium (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 20 mM glucose, 4 mM glutamine, 44 mM sodium bicarbonate, 10% foetal calf serum and antibiotics.

The SH-SY5Y human neuroblastoma cell line was purchased from ECACC (N°94030304, Sigma, Bornem, Belgium). Cells were cultured in Ham-F12 medium (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 15% fetal calf serum, 1% non-essential amino acids and antibiotics.

GSM-1800 exposure system

The exposure system named SXC-1800, was built and maintained by the IT'IS-Foundation (Foundation for information Technologies in Society, Zürich, Switzerland). In this setup, R18 hollow rectangular waveguides operating at 1800 MHz are used. On one side of the waveguide is a coupler with a tuner, on the other side is a shortcut. For loading the setup, the shortcut can be removed and the whole Petri dish holder is placed inside. Six dishes can be exposed simultaneously. Petri dishes are placed at the H-field maxima. Two waveguides (exposed and sham-exposed) are placed inside a commercial incubator to ensure constant environmental conditions (37 °C, 5% CO₂, 95% humidity). In addition, the temperature and the SAR are monitored at the location of the dishes during exposure [Schonborn et al., 2001; Schuderer and Kuster, 2003]. The temperature difference between the chambers did not exceed 0.1°C. To enable blind exposure, a computer determined randomly which of the two waveguides was exposed. The fields as well as all other parameters were continuously monitored. All experiments were performed at a carrier frequency of 1800 MHz with

continuous exposure. The applied field was an amplitude-modulated signal with GSM rectangular pulses with a repetition frequency of 217 Hz and a duty cycle of 1:8, yielding frames of a length of 4.61 ms each including a 576 μ s burst. An averaged SAR of 2 W/kg was chosen, as it is the local exposure limit recommended by ICNIRP [ICNIRP, 1998].

RFR exposure conditions

Cell cultures with at least 80% confluence were exposed. The Petri dishes were placed in the waveguides at least 2 hours before the start of exposure. The cells were exposed during 1, 24, or 48 hours at a SAR of 2 W/kg, under blind conditions. The exposure was continuous or intermittent (5 minutes ON – 10 minutes OFF). After exposure, the cells were detached with trypsin/EDTA (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) on ice and treated for the comet assay.

Positive controls

Ultraviolet B (UVB) radiation

Ultraviolet B exposures were used to provide positive controls for NHDF (320 nm, Vilbert Lourmat Bio-Link BLX-E, single dose of 300 mJ/cm²). Briefly, cells were washed once with PBS without calcium and magnesium (w/o Ca²⁺/Mg²⁺). Then, cells were exposed to UVB in PBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺. After exposure, the PBS was removed and replaced with fresh culture medium and cells were replaced in the culture incubator to recover for 4 hours. The cells were extracted using a trypsin/EDTA treatment on ice and treated for the comet assay.

Tert-butyl hydroperoxide (CAS N°75-91-2)

CHME-5 cultures were treated for 8 minutes with 37.5 μ M tert-butyl hydroperoxide to induce DNA damage. Immediately after treatment, cells were removed from the dishes using Trypsin/EDTA treatment and then treated for the comet assay.

Alkaline comet assay

To detect single strand DNA damages in cells, the alkaline comet assay was used following the R&D System's protocol (Abingdon, United Kingdom). Briefly, once the cells were extracted, they were pelleted and resuspended in cold PBS W/O $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$. Ten hundred cells were melted with 1% low-melting point agarose and placed onto Trevigen[®] CometSlide[™] (R&D System, Abingdon, United Kingdom) with a two-ring hydrophobic barrier allowing to process two different samples on one slide. After gelling in the dark at 4°C for 20 minutes, slides were placed in lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris Base, 1% sodium lauryl sarcosinate, and 1% Triton X-100) for 1 hour. Then, the slides were washed with distilled water and placed in alkaline buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA pH 10, pH>13) for DNA linearization at room temperature in the dark for 30 minutes and finally placed in the electrophoresis apparatus containing electrophoresis buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA pH 8, pH >13). DNA migration occurred at 4°C, using 300 mA and 1 V/cm during 30 minutes. The slides were then washed with distilled water and placed in 70° alcohol for 5 minutes. Finally, slides were allowed to dry at room temperature in the dark and stored at room temperature until analysis.

For comet analysis, slides were rehydrated in a solution containing 5% sucrose, 10 mM NaHPO_4 , and 5% DMSO for 10 minutes and stained with 1 μM YOYO-1 iodide (Molecular Probes, Invitrogen, Cergy Pontoise, France). One hundred pictures per slide were taken. Each picture was analyzed using the comet CometScore[™] scoring software (http://autocomet.com/products_cometscore.php). At least 100 comets were analyzed for percentage of DNA in the tail and the Olive moment (defined as to the summation of tail intensity profile values multiplied by their relative distances to the head center, divided by the total comet intensity), for each tested condition. We took care to not score comets from

apoptotic cells, which are represented by totally damaged cells with only a small amount of DNA remaining in the comet head and most of the DNA in the comet tail, All data are represented as histograms, as the mean of n experiments \pm standard error of the mean (SEM).

Statistical analysis

The Mann-Whitney unpaired test was used for assessing statistical significance, once completed analyses had been decoded.

3- Results

Potential DNA damage in various types of human cells after continuous or intermittent exposure to GSM-1800 were assessed using an alkaline comet assay looking for the presence of single-strand DNA breaks.

Figure 1 presents the DNA percentage in the comet tail and the Olive moment measured in normal human dermal fibroblasts after GSM-1800 or sham exposure. As shown in the histograms, the DNA percentage in the comet tail (Figure 1A) did not vary between either continuous or intermittent GSM-1800 and sham groups. Moreover, genotoxic damage did not occur as a function of exposure duration (1, 24, to 48 hours). The Olive moment histograms (Figure 1B) confirmed the above results, showing a lack of genotoxic effect. By contrast, a single dose of UVB (300 mJ/cm^2) induced a high level of DNA breaks: $29.5 \pm 7.4\%$ of DNA in the tail of UVB-irradiated cells versus $6.2 \pm 0.9\%$ in control cells. The difference was found statistically significant for both comet parameters ($p < 0.05$ for both DNA in the tail and Olive moment).

As shown in Figure 2, no variations in the percentage of DNA in the comet tail (2A), or in the Olive moment (2B) were observed in CHME-5 human brain cells after GSM-1800 exposure, whatever the type and duration of exposure. By contrast, the positive control Tert-Butyl hydroxyperoxide (37.5 μ M) induced significant genotoxic effects ($p=0.021$) as shown in both DNA damage metrics.

The results obtained in SH-SY5Y human brain cells (Figure 3) showed that these cells were not affected by either continuous or intermittent exposure to GSM-1800 signal.

We however noted a difference in the background amount of DNA damage in the cells tested: the percent DNA in the tail of control NHDF comets was found up to 4 fold higher as compared to that of control brain cells comets. Beside the cell type, the use of primary cells and cell lines could explain the difference. Although apoptotic cells were not analyzed and counted in our analysis, we noted the presence of more apoptotic cells in primary cells than in brain cell lines (data not shown).

4- Discussion

A number of papers have been published on the genotoxic effects of mobile phone-related RFR giving mixed results (see review by Vijayalaxmi and Obe, 2004). GSM-900 and American as well as Japanese signals have been studied. By contrast, only few data are available on the genotoxic effects of GSM-1800. Pacini et al. [2002] showed that a 24-hour exposure to 0.6 W/kg GSM-1800 induced alteration at the molecular level in human fibroblasts. Expression of genes involved in mitogenic signal transduction (e.g., MAP kinase kinase 3, G2/mitotic-specific cyclin G1), cell growth inhibitors (e.g., transforming growth factor-beta), and control of apoptosis (e.g., bax) was found altered. Genotoxic effects of GSM-1800 in fibroblasts and granulosa cells were also described in a previous paper: Diem et

al. [2005] reported DNA single- and double-strand breaks following continuous or intermittent exposure to GSM-1800 at 1.2 or 2.0 W/kg (during 4 to 24 hours) with a larger effect with intermittent exposure.

In the present study, a background for DNA damage was observed in both skin and brain cells. As suggested by Vijayalaxmi et al. [2006], S-phase cells that can be found in a non-synchronized cell population possibly interfere with the quantification of comets through the action on DNA of specific nuclear enzymes, topoisomerases (I and II). These enzymes facilitate the unwinding of chromosomes by cutting supercoiled DNA strands just before replication and therefore DNA can be expected in the comet tails of control skin and brain cells.

When exposed to low-level RFR, these cells however showed no difference in the comet parameters as compared to their respective controls. We thus were especially not able to confirm that exposure to 2 W/kg continuous or intermittent GSM-1800 induced genotoxic damage in human skin fibroblasts. This discrepancy could, in part, be explained by the use of a different protocol for comet analysis. Vijayalaxmi et al. [2005] emphasized that the accuracy of the treated data could depend on the comet images analysis, using either eye scoring (Diem et al. 2005) or computer analysis (our study) of comets. Such discrepancy was also reported for the study of the genotoxic effects of 50 Hz electromagnetic field using eye or computer scoring [Ivancsits et al., 2002 and Scarfi et al., 2005, respectively].

Moreover, an increase in DNA damage in primary cells under GSM-1800 exposure would also have been indicative of human skin primary cell senescence. Ageing of primary cells is characterized by phenomena such as alteration of chromosomal stability.

Chromosomal stability is physiologically controlled by telomeres [Mathieu et al., 2004; Slijepcevic and Al-Wahiby, 2005], which are specialized structures at chromosomal ends. The loss or lack of telomere induces the instability of the chromosomes and finally the arrest of

the cell cycle, and apoptosis if it is not repaired [von Zglinicki et al., 2005]. During replication, the extremities of DNA might not be replicated completely, causing a progressive shortening of the telomeres and progressive DNA breaks. Cell division could continue until the cells become unable to multiply. This is the case of normal fibroblasts which are able to divide hundred times and then die [Harley et al., 1990]. This phenomenon could, in part, explain the higher background DNA damage we observed in control skin primary cells, as compared to control brain cell lines. It is thus important to consider these cellular processes that affect the interpretation of comet data and may explain the presence of background comet tails.

No detectable difference was seen in the percentage of DNA in the tail, or in the Olive moment in both nerve cell lines we studied. To our knowledge, this is the first report on possible genotoxic effects of GSM-1800 mobile phone signal on brain cells *in vitro*. However, a recent work reported that long-term exposure (2 hours per day, 5 days per week, 2 years) to GSM-900 signal at average whole-body SARs of 0.3 or 0.9 W/kg did not increase the genotoxicity of the mutagen and carcinogen 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone in brain cells of female rats [Verschaeve et al., 2006].

In summary, no genotoxic effects were detected after continuous or intermittent exposure to 2 W/kg GSM-1800 for up to 48 hours in any of the cell types tested. Our results suggest that GSM-1800 signal from mobile phones do not represent a stress factor for human dermal and brain cells *in vitro*.

Acknowledgements

This work was supported by the CNRS, the Aquitaine Council for research, France Telecom R&D and Bouygues Telecom, We wish to thank Niels Kuster and Albert Romann from IT'IS foundation for their contribution to blind experiments.

4- References

- Diem E, Schwarz C, Adlkofer F, Jahn O, Rudiger H. 2005. Non-thermal DNA breakage by mobile-phone radiation (1800 MHz) in human fibroblasts and in transformed GFSH-R17 rat granulosa cells in vitro. *Mutat Res* 583(2):178-83.
- Harley CB, Futcher AB, Greider CW. 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345(6274):458-60.
- Hook GJ, Zhang P, Lagroye I, Li L, Higashikubo R, Moros EG, Straube WL, Pickard WF, Baty JD, Roti Roti JL. 2004. Measurement of DNA damage and apoptosis in Molt-4 cells after in vitro exposure to radiofrequency radiation. *Radiat Res* 161(2):193-200.
- ICNIRP. 1998. Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic, and electromagnetic fields (up to 300 GHz). International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection. *Health Phys* 74(4):494-522.
- Ivancsits S, Diem E, Pilger A, Rudiger HW, Jahn O. 2002. Induction of DNA strand breaks by intermittent exposure to extremely-low-frequency electromagnetic fields in human diploid fibroblasts. *Mutat Res* 519(1-2):1-13.
- Keshvari J, Lang S. 2005. Comparison of radio frequency energy absorption in ear and eye region of children and adults at 900, 1800 and 2450 MHz. *Phys Med Biol* 50(18):4355-69.
- Li L, Bisht KS, LaGroye I, Zhang P, Straube WL, Moros EG, Roti Roti JL. 2001. Measurement of DNA damage in mammalian cells exposed in vitro to radiofrequency fields at SARs of 3-5 W/kg. *Radiat Res* 156(3):328-32.
- Malyapa RS, Ahern EW, Straube WL, Moros EG, Pickard WF, Roti Roti JL. 1997. Measurement of DNA damage after exposure to electromagnetic radiation in the cellular phone communication frequency band (835.62 and 847.74 MHz). *Radiat Res* 148(6):618-27.
- Marinelli F, La Sala D, Ciccotti G, Cattini L, Trimarchi C, Putti S, Zamparelli A, Giuliani L, Tomassetti G, Cinti C. 2004. Exposure to 900 MHz electromagnetic field induces an unbalance between pro-apoptotic and pro-survival signals in T-lymphoblastoid leukemia CCRF-CEM cells. *J Cell Physiol* 198(2):324-32.
- Mathieu N, Pirzio L, Freulet-Marriere MA, Desmaze C, Sabatier L. 2004. Telomeres and chromosomal instability. *Cell Mol Life Sci* 61(6):641-56.
- Pacini S, Ruggiero M, Sardi I, Aterini S, Gulisano F, Gulisano M. 2002. Exposure to global system for mobile communication (GSM) cellular phone radiofrequency alters gene expression, proliferation, and morphology of human skin fibroblasts. *Oncol Res* 13(1):19-24.
- Peudenier S, Hery C, Montagnier L, Tardieu M. 1991. Human microglial cells: characterization in cerebral tissue and in primary culture, and study of their susceptibility to HIV-1 infection. *Ann Neurol* 29(2):152-61.
- Scarfi MR, Fresegna AM, Villani P, Pinto R, Marino C, Sarti M, Altavista P, Sannino A, Lovisolo GA. 2006. Exposure to radiofrequency radiation (900 MHz, GSM signal) does not affect micronucleus frequency and cell proliferation in human peripheral blood lymphocytes: an interlaboratory study. *Radiat Res* 165(6):655-63.
- Scarfi MR, Sannino A, Perrotta A, Sarti M, Mesirca P, Bersani F. 2005. Evaluation of genotoxic effects in human fibroblasts after intermittent exposure to 50 Hz electromagnetic fields: a confirmatory study. *Radiat Res* 164(3):270-6.

- Schonborn F, Pokovic K, Burkhardt M, Kuster N. 2001. Basis for optimization of in vitro exposure apparatus for health hazard evaluations of mobile communications. *Bioelectromagnetics* 22(8):547-59.
- Schuderer J, Kuster N. 2003. Effect of the meniscus at the solid/liquid interface on the SAR distribution in Petri dishes and flasks. *Bioelectromagnetics* 24(2):103-8.
- Slijepcevic P, Al-Wahiby S. 2005. Telomere biology: integrating chromosomal end protection with DNA damage response. *Chromosoma* 114(4):275-85.
- Stergiou L, Hengartner MO. 2004. Death and more: DNA damage response pathways in the nematode *C. elegans*. *Cell Death Differ* 11(1):21-8.
- Stronati L, Testa A, Moquet J, Edwards A, Cordelli E, Villani P, Marino C, Fresegna AM, Appolloni M, Lloyd D. 2006. 935 MHz cellular phone radiation. An in vitro study of genotoxicity in human lymphocytes. *Int J Radiat Biol* 82(5):339-46.
- Tice RR, Hook GG, Donner M, McRee DI, Guy AW. 2002. Genotoxicity of radiofrequency signals. I. Investigation of DNA damage and micronuclei induction in cultured human blood cells. *Bioelectromagnetics* 23(2):113-26.
- Verschaeve L, Heikkinen P, Verheyen G, Van Gorp U, Boonen F, Vander Plaetse F, Maes A, Kumlin T, Maki-Paakkanen J, Puranen L and others. 2006. Investigation of co-genotoxic effects of radiofrequency electromagnetic fields in vivo. *Radiat Res* 165(5):598-607.
- Vijayalaxmi, McNamee JP, Scarfi MR. 2006. Comments on: "DNA strand breaks" by Diem et al. [*Mutat. Res.* 583 (2005) 178-183] and Ivancsits et al. [*Mutat. Res.* 583 (2005) 184-188]. *Mutat Res* 603(1):104-6; author reply 107-9.
- Vijayalaxmi, Obe G. 2004. Controversial cytogenetic observations in mammalian somatic cells exposed to radiofrequency radiation. *Radiat Res* 162(5):481-96.
- von Zglinicki T, Saretzki G, Ladhoff J, d'Adda di Fagagna F, Jackson SP. 2005. Human cell senescence as a DNA damage response. *Mech Ageing Dev* 126(1):111-7.
- Zeni O, Chiavoni AS, Sannino A, Antolini A, Forigo D, Bersani F, Scarfi MR. 2003. Lack of genotoxic effects (micronucleus induction) in human lymphocytes exposed in vitro to 900 MHz electromagnetic fields. *Radiat Res* 160(2):152-8.
- Zeni O, Romano M, Perrotta A, Lioi MB, Barbieri R, d'Ambrosio G, Massa R, Scarfi MR. 2005. Evaluation of genotoxic effects in human peripheral blood leukocytes following an acute in vitro exposure to 900 MHz radiofrequency fields. *Bioelectromagnetics* 26(4):258-65.

Figure 1: DNA damage in normal human dermal fibroblasts after continuous (CONT) or intermittent (INT) exposure to the GSM-1800 signal as compared to control cells (CTR) and UVB exposed cells. All data are presented as mean \pm standard error of n=4 independent experiments for 1 h CONT, n=5 independent experiments for 1 h INT, n=7 independent experiments for 24 h CONT, n=7 independent experiments for 24 h INT, n=6 independent experiments for 48 h INT, n=3 independent experiments for control cells (CTR) and UVB treated cells (UVB). **1A** shows the percentage of DNA measured in the tail of comets; **1B** shows the Olive moment measured in the comets. The Mann-Whitney statistical test was performed on our data.

Figure 2: DNA damage in CHME-5, a human microglial cell line after continuous (CONT) or intermittent (INT) exposure to the GSM-1800 signal. All data are presented as mean \pm standard error of n=8 independent experiments for 1 h CONT, n=4 independent experiments for 1 h INT, n=2 independent experiments for 24 h CONT, n=4 independent experiments for 24 h INT, n=8 independent experiments for 48 h INT, n=4 independent experiments for control cells (CTR) and Tert-Butyl peroxide (TERT BUTYL) treated cells. **2A** shows the percentage of DNA measured in the tail of comets; **2B** shows the Olive moment measured in the comets. The Mann-Whitney test was performed on our data.

Figure 3: DNA damage in SH-SY5Y, a human neuroblastoma cell line after continuous (CONT) or intermittent (INT) exposure to the GSM-1800 signal. All data are presented as mean \pm standard error of n=7 independent experiments for 1 h CONT, n=7 independent experiments for 1 h INT, n=5 independent experiments for 24 h CONT, n=7 independent experiments for 24 h INT, n=6 independent experiments for 48 h INT. **3A** shows the

SHAM
24HINT

percentage of DNA measured in the tail of comets; **3B** shows the Olive moment measured in the comets. The Mann-Whitney test was performed on our data.

|

Figure1

[Click here to download high resolution image](#)

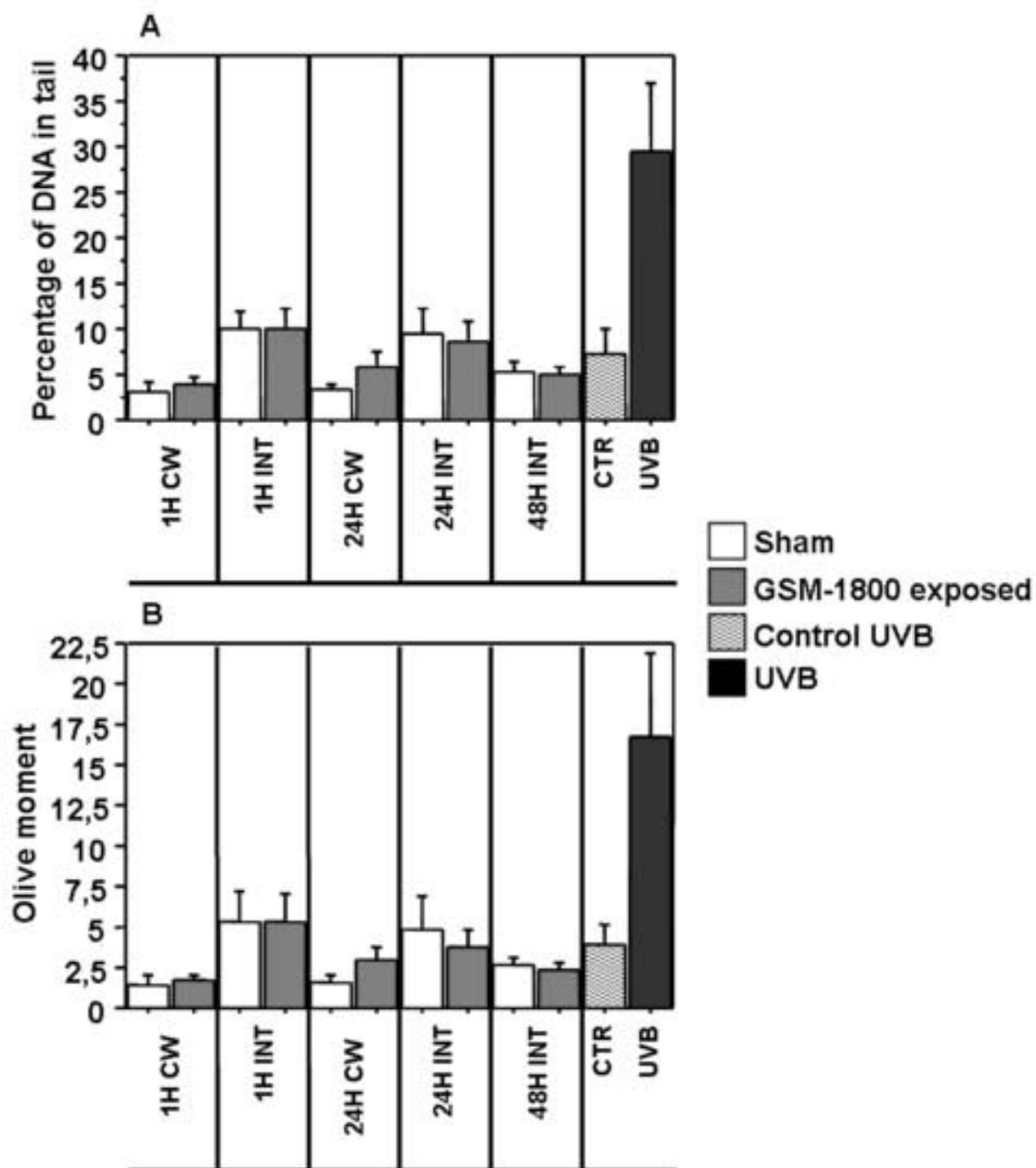


Figure2

[Click here to download high resolution image](#)

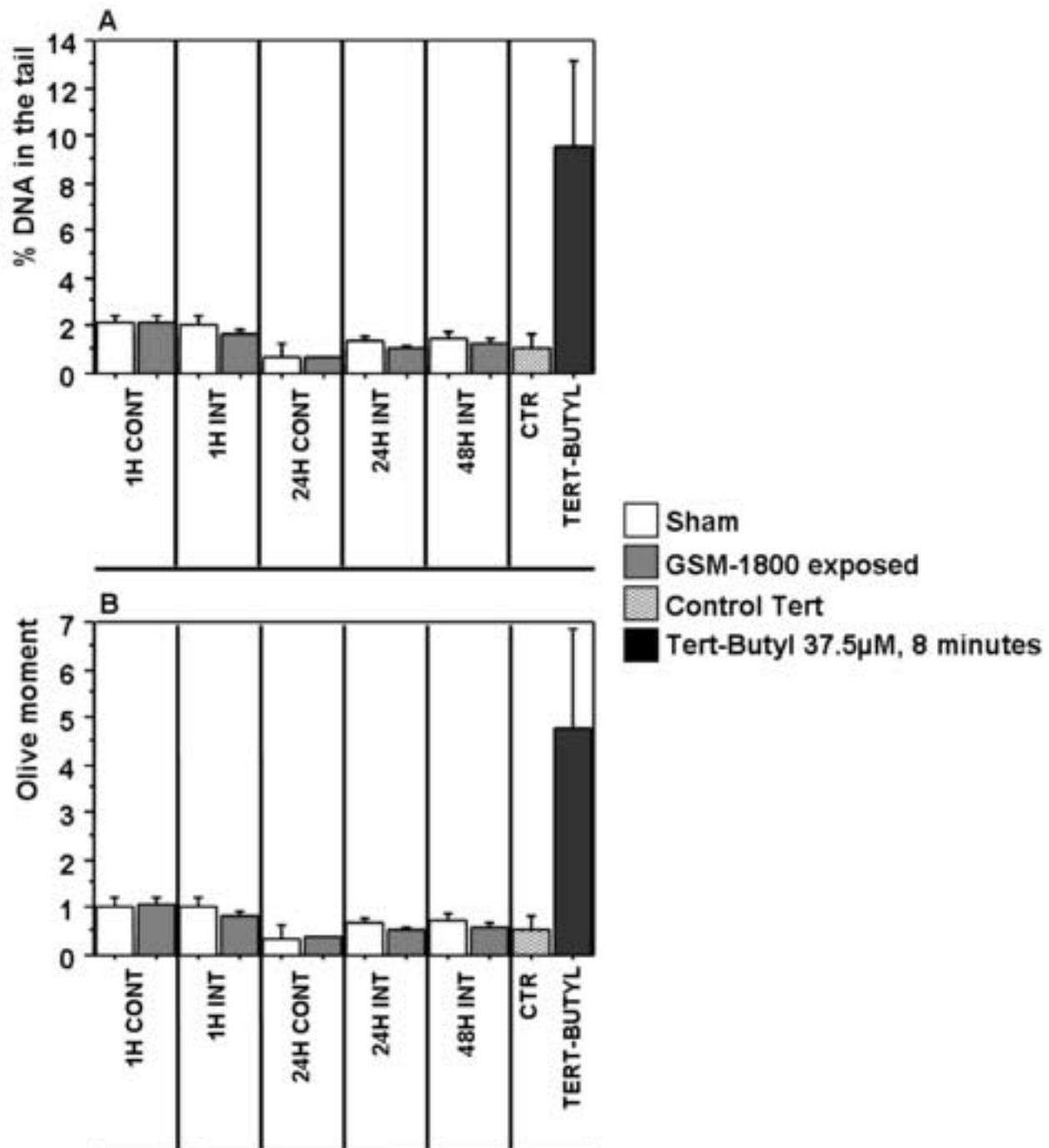
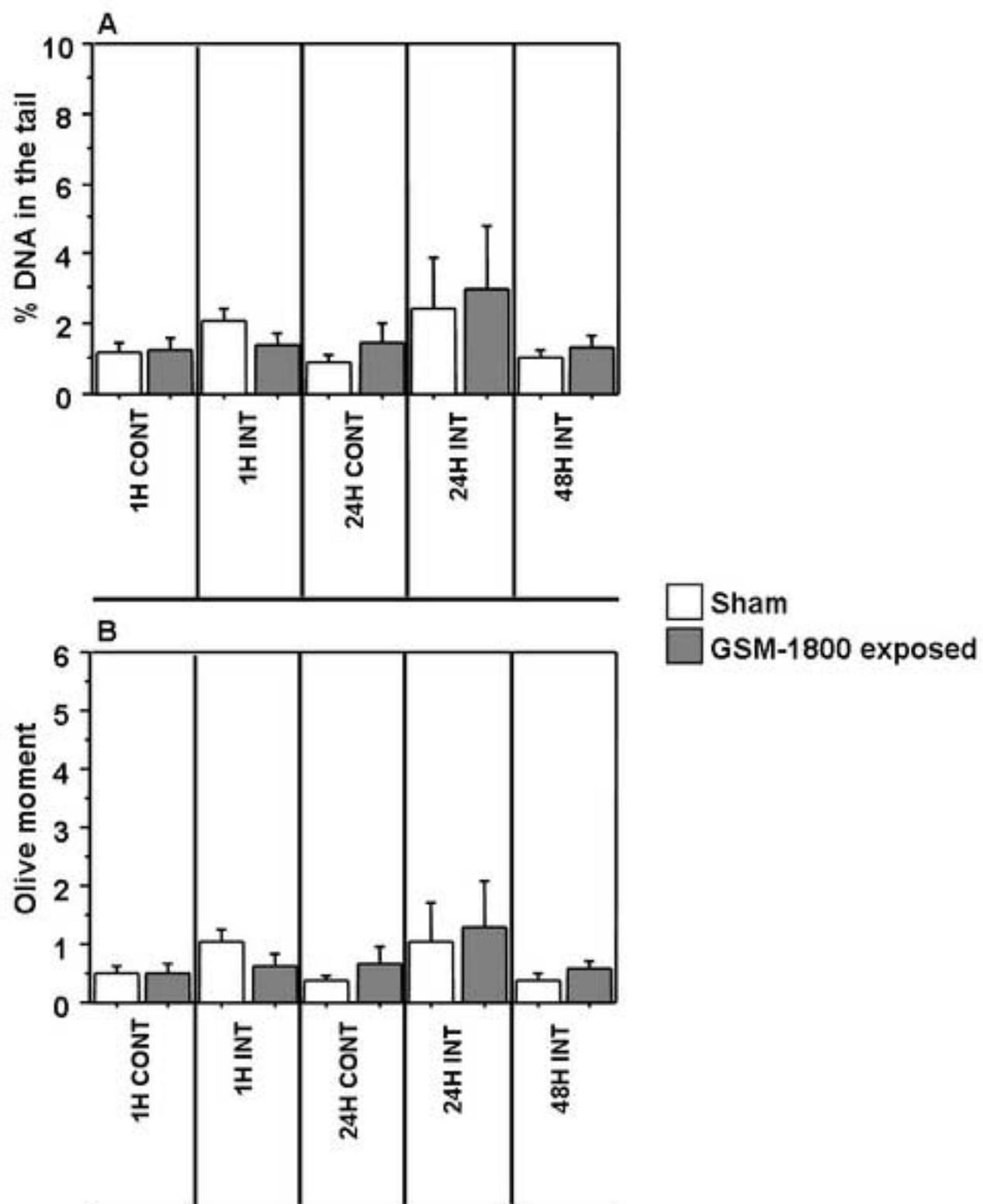


Figure3
[Click here to download high resolution image](#)



Résultats complémentaires

Kératinocytes primaires humains épidermiques

Des expériences complémentaires ont été réalisées pour détecter les cassures à l'ADN de kératinocytes épidermiques humains primaires (Cambrex, Verviers, Belgique).

Ces expériences ont concerné des expositions au GSM-1800 en continu et en intermittence 5 minutes ON / 10 minutes OFF sur des durées de 1 heure ou 24 heures.

Les analyses par test alcalin de comètes ont donné les résultats résumés dans la Figure 26 :

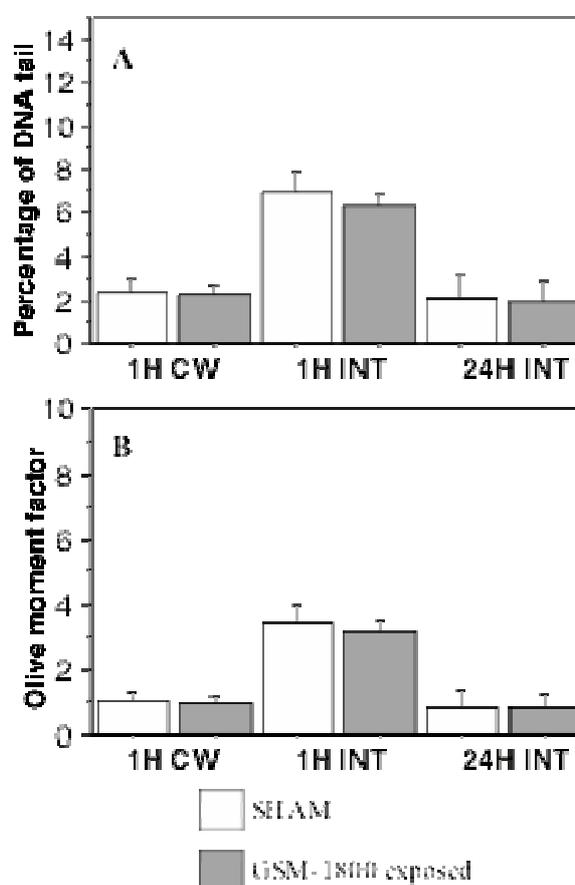


Figure 26 : Test des comètes sur des kératinocytes primaires humains exposés en continu ou en intermittence (5 minutes ON, 10 minutes OFF) au signal GSM-1800. Au moins 100 comètes ont été analysées par condition et par expérience. A : Pourcentage d'ADN dans la queue moyenné (moyenne \pm erreur standard à la moyenne) des comètes analysées. B : Moment d'Olive (moyenne \pm erreur standard à la moyenne). n=6 expériences indépendantes pour les expositions continues et intermittentes d'1 heure, n=3 expériences indépendantes pour les expositions de 24 heures. (Données non publiées)

Nous avons pu observer qu'une exposition continue de 1 heure au signal GSM-1800 n'induisait pas d'augmentation du pourcentage d'ADN dans la queue des comètes et, par conséquent, pas de variation du moment d'Olive. Ainsi, nous avons obtenu $2,24\% \pm 0,43\%$

d'ADN dans les queues de comètes des cellules exposées au GSM-1800 contre 2,41% ± 0,59% dans la condition Sham. Nous n'avons donc constaté aucune cassure significative à l'ADN dans les kératinocytes humains après une exposition continue d'1 heure en comparaison à la condition d'exposition factice et ce, pour six expériences indépendantes. De même, une exposition intermittente (5 min ON/ 10 min OFF) sur une durée de 1 ou 24 heures n'entraîne pas de cassures à l'ADN dans 6 ou 3 expériences indépendantes, respectivement. Nous notons cependant des différences de pourcentages d'ADN ou de moment d'Olive que l'on peut attribuer à des différences de cultures. En effet, les kératinocytes utilisés lors des d'exposition intermittente d'une heure, étaient situés entre les passages 3 et 4 avec une proportion plus grande de cellules en 4ème passage, alors que celles utilisées pour les autres expériences variaient entre les passages 2 et 4 avec une forte proportion de cellules en passage 2 et 3. Le temps de culture des cellules est un facteur important pour des cellules primaires qui, n'étant pas transformées, ne survivent que peu de temps et vieillissent plus vite. Ceci explique l'observation de cellules contrôles endommagées en plus grande quantité dans les expériences utilisant des cellules à haut passage.

Fibroblastes primaires humains dermiques et lignées de cellules nerveuses

Des expériences complémentaires ont été réalisées pour détecter les cassures à l'ADN de fibroblastes primaires humains dermiques (Cambrex) et de lignées de cellules nerveuses (CHME-5 et SH-SY5Y) lors d'expositions intermittentes de 15 minutes ON – 30 minutes OFF sur une durée de 24 heures uniquement.

Les analyses par test alcalin de comètes ont donné les résultats résumés dans la Figure 27. Nous avons tout d'abord validé nos contrôles positifs. Comme le montre la Figure 27, le TertButyl-H₂O₂ est un bon inducteur de lésions de l'ADN puisque, par exemple, le pourcentage d'ADN endommagé dans les cellules CHME-5 représente près de 10 fois celui des cellules contrôles.

De la même manière, les contrôles positifs réalisés sur les fibroblastes NHDF sont présentés dans l'article 3. Les effets induits sur l'ADN par les UVB montrent 4 fois plus de cassures que ceux constatés en condition de contrôle.

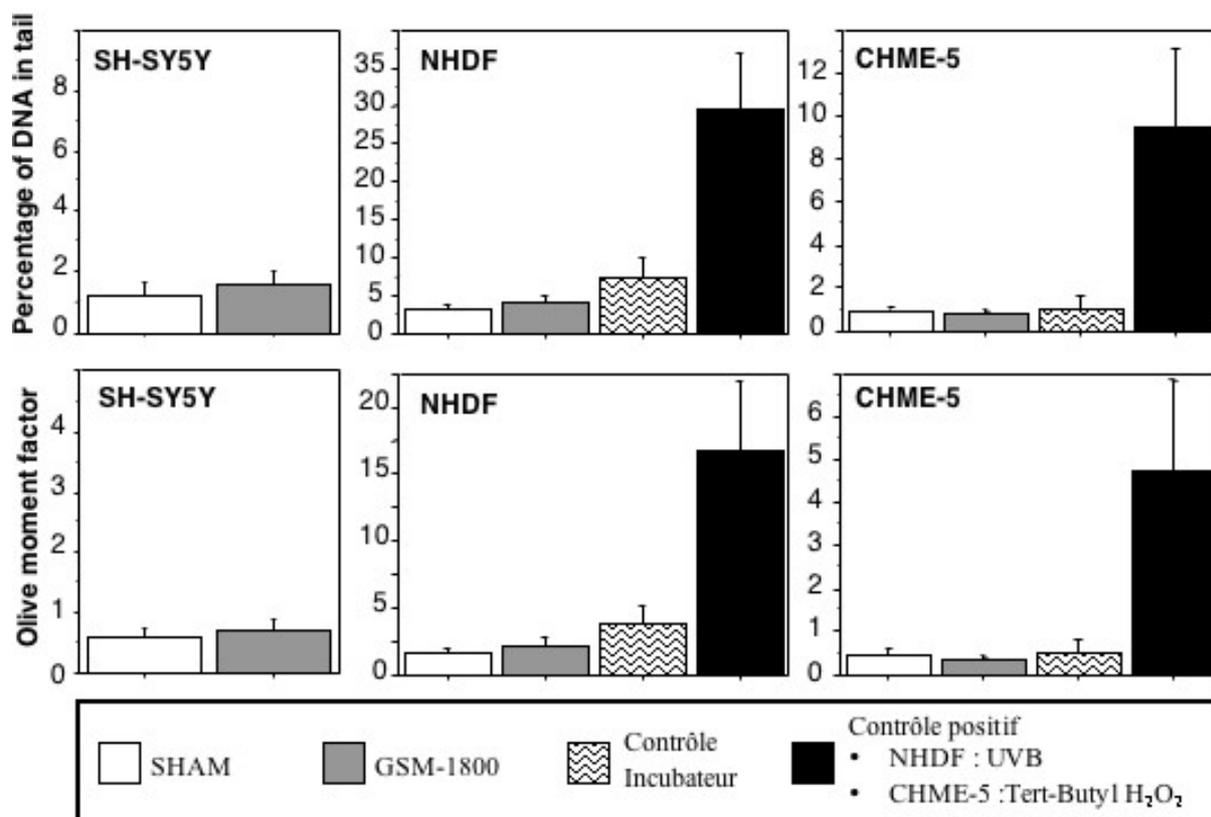


Figure 27 : Test des comètes sur des fibroblastes primaires humains (NHDF), sur des cellules microgliales humaines (CHME-5) et sur des cellules de neuroblastome humain (SH-SY5Y) exposés 24 heures en intermittence (15 minutes ON, 30 minutes OFF) au signal GSM-1800. Au moins 100 comètes ont été analysées par condition et par expérience. Histogrammes du haut : Pourcentage d'ADN dans la queue moyenné (moyenne \pm erreur standard à la moyenne) des comètes analysées. Histogrammes du bas : Moment d'Olive (moyenne \pm erreur standard à la moyenne). n=6 expériences indépendantes pour les SH-SY5Y ; n=6 expériences indépendantes pour les CHME-5 et n=4 expériences indépendantes pour les contrôles positifs au Tert-Butyl hydroxyperoxyde ; n=5 expériences indépendantes pour les NHDF et n=3 expériences indépendantes pour les contrôles positifs aux UVB. (Données non publiées)

Nous avons constaté d'autre part que les mesures de pourcentage d'ADN dans la queue des comètes analysées étaient faibles dans les deux types de cellules nerveuses, de l'ordre de 1-1,5%, équivalant à des moments d'Olive d'environ 0,5. Une analyse statistique des données issues des cellules nerveuses par le biais d'un test de Mann-Whitney non apparié n'a pas démontré de différence significative entre les groupes de cellules exposées 24 heures par intermittence 15/30 au GSM-1800 et celles exposées facticement. On obtient $p=0,32$ dans les deux mesures pour 6 expériences indépendantes sur les cellules SH-SY5Y. Dans le cas des cellules CHME-5 et pour 5 expériences indépendantes, on obtient $p=0,17$ pour le % ADN et $p=0,34$ pour les moments d'Olive. Les contrôles positifs présentés sur l'histogramme des cellules CHME-5 sont identiques à ceux présentés dans l'article 3 : ils ont été réédités ici dans le but de comparer les effets du Tert-Butyl peroxyde avec ceux du GSM-1800.

De plus, une exposition intermittente 15/30 de 24 heures au signal GSM-1800 n'entraîne pas de variation significative de cassures à l'ADN dans les NHDF en comparaison aux cellules exposées facticement. Ainsi, le pourcentage d'ADN lésé a été mesuré à $4,16 \pm 0,81\%$ dans la condition d'exposition réelle contre $3,29 \pm 0,60\%$ dans la condition d'exposition factice ($p=0,52$; 6 expériences indépendantes).

Comme pour les kératinocytes et l'article 3, on peut constater que les lésions mesurées dans les NHDF en conditions de référence (SHAM ou contrôle incubateur) sont plus élevées que celles mesurées dans les lignées cellulaires. Nous attribuons cette différence au fait que nous travaillons avec des cellules primaires donc rapidement sénescents.

Résumé

L'étude d'induction de stress cellulaire lors d'une exposition continue ou intermittente aux signaux GSM-900 ou GSM-1800 a été réalisée sur 5 types cellulaires et sur un modèle en trois dimensions d'épiderme reconstruit. Pour une meilleure lisibilité, les données résultant de l'étude sont présentées dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Résumé de l'étude du stress cellulaire *in vitro* induit par les signaux GSM-900 et GSM-1800 dans les cellules de la peau. Les cases jaunes représentent les résultats significatifs, les cases contenant "ns" représentent des résultats non significatifs.

Signaux étudiés, 2W/kg→		GSM-900	GSM-1800						
Types cellulaires	Paramètre étudié	48 heures continu	1 heure continu	1 heure int. 5/10	24 heures continu	24 heures int. 5/10	24 heures int. 15/30	48 heures continu	48 heures Int. 5/10
NHEK	Apoptose	ns						ns	
	HSP	ns						ns	
	Cassures ADN		ns	ns	ns	ns			ns
NHDFe	Apoptose	ns						ns	
	HSP	↓ Hsc70						ns	
NHDFc (Cambrex)	Apoptose	ns							
	HSP	ns							
	Cassures ADN		ns	ns	ns	ns	ns		ns
Epidermes Reconstitués Humains	Epaisseur	ns							
	Ki-67	ns							
	HSP	↑ Hsp70 3 et 5 sem.							
SH-SY5Y	Cassures ADN		ns	ns	ns	ns	ns		ns
CHME-5	Cassures ADN		ns	ns	ns	ns	ns		ns

De cette étude *in vitro* portant sur les effets des signaux GSM-900 et GSM-1800 au DAS de 2 W/kg (valeur limite d'exposition locale pour le public) sur l'induction de stress cellulaire dans les cellules de la peau ou du système nerveux central, nous avons pu mettre en évidence que :

1. Une exposition **continue** de 1 heure, 24 heures ou 48 heures :
 - N'affectait pas certains mécanismes amenant à la mort cellulaire programmée dans les cellules de la peau : kératinocytes épidermiques primaires humains NHEK, fibroblastes primaires humains dermiques NHDFe et NHDFc.
 - N'induisait pas de cassures simples brins dans tous les types cellulaires.
 - N'induisait de variation d'expression des protéines de choc thermique Hsc70, Hsp27 et Hsp70 dans les kératinocytes.
 - Induisait, après 48 heures d'exposition, une diminution d'expression de la protéine Hsc70 dans les fibroblastes NHDFe isolés au laboratoire, mais pas dans les fibroblastes NHDFc provenant de Cambrex. Les autres Hsp n'ont pas été affectées suite à l'exposition dans les deux types de fibroblastes.
 - Induisait une augmentation d'expression d'Hsp70 dans les stades tardifs de développement des épidermes reconstruits, à 3 et 5 semaines de culture.

2. Une exposition **intermittente** 5 minutes ON / 10 minutes OFF de 1 heure, 24 heures ou 48 heures n'induisait pas de cassure de l'ADN dans les cellules de la peau et du système nerveux central.

3. Une exposition **intermittente** 15 minutes ON / 30 minutes OFF de 24 heures n'induisait pas de cassure à l'ADN dans les cellules de la peau et du système nerveux central.

Nous avons donc suggéré, à partir de ces travaux, des différences de comportement cellulaire. D'un côté, il existerait des différences entre systèmes cellulaires en monocouche et systèmes cellulaires en trois dimensions. En effet, les NHEK isolés ne sur-expriment pas d'Hsp en condition d'exposition, alors qu'en modèle 3D dans lequel ils ont pu se différencier, ils sur-expriment Hsp70 à 3 et 5 semaines de développement épidermique.

D'un autre côté, des différences de comportement existeraient entre les deux types de fibroblastes dermiques primaires utilisés. En effet, les fibroblastes isolés au laboratoire montraient une diminution d'expression de Hsc70 après exposition au GSM, alors que ceux

provenant du fournisseur Cambrex ne montraient pas de changement dans l'expression des Hsp. L'utilisation d'un milieu de culture avec mitogènes pour la culture des NHEFc paraît être l'explication la plus plausible pour cette différence de comportement, puisque la prolifération cellulaire est un processus qui nécessite l'induction de protéines de choc thermique dont Hsc70. Par conséquent, l'expression de Hsc70 étant constitutive mais aussi induite de façon stable par la présence de mitogènes, le comportement cellulaire s'en est probablement trouvé changé.

Une suggestion plausible pour expliquer la diminution d'Hsc70 observée dans les NHDFe (en ne considérant que ces cellules) serait une tolérance acquise aux radiofréquences. Considérons le modèle de tolérance thermique: les cellules soumises à un choc thermique produisent un certain pool de protéines de stress, dont les HSP, qui s'accumulent dans le temps. Si ces cellules subissent un deuxième choc, alors le pool existant suffit à protéger la cellule de ce deuxième choc, sans production supplémentaire de protéines. En revanche, si un choc thermique (non léthal) est appliqué en continu, alors l'accumulation initiale des protéines est suivie d'une élimination de ce pool jusqu'à atteindre le niveau basal d'expression, voire même un niveau inférieur. C'est dans ce dernier cas de figure que nous émettons notre hypothèse de radiofréquence-tolérance pour les NHDFe, puisque l'exposition aux RF dure 48 heures.

Une différence de comportement entre les cellules primaires humaines et les lignées de cellules humaines s'est également dégagée de cette étude. L'observation de forts pourcentages de cassures de l'ADN dans les cellules primaires en comparaison à ceux observés dans les lignées cellulaires, pourrait être expliquée par le vieillissement rapide des cellules primaires, contrairement aux lignées cellulaires qui prolifèrent à l'infini.

- *Partie 2 : Approches in vivo*

Articles

ARTICLE 4 :

MASUDA H., **SANCHEZ S.**, DULOU P.E., HARO E., ANANE R.,
BILLAUDEL B., LEVEQUE P. AND VEYRET B..
Effect of a 2-hour acute exposure to GSM-900 or -1800 microwaves
on the skin of "hairless"
rats.

International Journal of Radiation Biology, vol. 82, 669-674

ARTICLE 5 :

SANCHEZ S., MASUDA H., BILLAUDEL B., HARO E., ANANE R.,
LEVEQUE P., RUFFIE G., LAGROYE I. AND VEYRET B..
Effect of chronic exposure to GSM-900 or -1800 microwaves on the
skin of "hairless" rats.

IJRB, vol. 82, 675-680

ARTICLE 6 :

SANCHEZ S., MASUDA H., RUFFIE G., POULLETIER DE GANNES
F., BILLAUDEL B., HARO E., LEVEQUE P., LAGROYE I. AND
VEYRET B..

No effect of single or chronic exposure to GSM-900 and -1800 mobile
phone signals on HSP expression in the skin of hairless rats.

Cell Stress & Chaperones, soumis

ARTICLE 7 :

SANCHEZ S., LAGROYE I., POULLETIER DE GANNES F., HARO
E., BILLAUDEL B., AND VEYRET B..

No genotoxic effects of UMTS mobile phone signals on Sprague-
Dawley rat brains.

Radiation Research, soumis

ARTICLE 4 : Effect of a 2-hour acute exposure to GSM-900 or -1800 microwaves on the skin of "hairless"rats.

MASUDA H., **SANCHEZ S.**, DULOU P.E., HARO E., ANANE R., BILLAUDEL B., LEVEQUE P. AND VEYRET B..

Effect of a 2-hour acute exposure to GSM-900 or -1800 microwaves on the skin of "hairless" rats.

IJRB, vol. 82, 669-674

L'article 4 traite des effets aigus in vivo des signaux GSM-900 et GSM-1800 sur la peau. Des approches histologiques et immunohistologiques ont été empruntées pour étudier les éventuels effets de 2 heures d'exposition aux radiofréquences sur des composants cellulaires spécifique de la peau : épaisseur épidermique, prolifération cellulaire, localisation de la filaggrine, du collagène et de l'élastine. Le modèle animal choisi est la souche de rat Hairless, sans poil. Le DAS étudié pour chaque signal est de 5 W/kg. Des contrôles positifs UVB ont été employés pour mettre en évidence les changements cellulaires attendus. L'analyse des différents paramètres histologiques a été réalisée sous microscopie par un laboratoire indépendant (Eurotest).

Effect of GSM-900 and -1800 signals on the skin of hairless rats. I: 2-hour acute exposures

H. MASUDA¹, S. SANCHEZ², P. E. DULOU², E. HARO², R. ANANE², B. BILLAUDEL²,
P. LÉVÊQUE³ & B. VEYRET²

¹Department of Environmental Health, National Institute of Public Health, Saitama, Japan, ²PIOM Laboratory Centre National Recherche Scientifique (CNRS)-ENSCP, University of Bordeaux, Pessac, France, and ³IRCOM (Institut de Recherche en Communications Optiques et Microondes), Limoges, France

(Received 23 November 2005; revised 6 February 2006; accepted 23 July 2006)

Abstract

Purpose: The acute influence on the skin of non-ionizing electromagnetic fields in the radiofrequency (RF) range used in mobile telephony has not been widely studied to date. The purpose of this work was to determine whether the cells of hairless rat skin are affected by acute local exposure to Global System for Mobile Communication: GSM-900 or -1800 RadioFrequency Radiation (RFR).

Materials and methods: Hairless female rats were exposed or sham-exposed for 2 h to GSM-900 or -1800 signals, using a loop-antenna located on the right part of the rats' back. The local Specific Absorption rate (SAR) at skin level was *ca.* 5 W/kg (5.8 ± 0.4 and 4.8 ± 0.4 W/kg at 900 and 1800 MHz, respectively). A skin biopsy was done at the end of the experiment not only at the location of exposure, but also on the symmetrical part of the back.

Results: Analysis of skin sections using Hematoxylin Eosin Saffron (HES) coloration showed no difference in skin thickness or apparent cell toxicity (with no sign of cellular necrosis) among the animal groups. Histological analysis of the epidermis showed that the ratio between cells expressing the antigen Ki-67 (cellular proliferation marker) and the total number of cells remained within the range of normal proliferation ratio for the exposed side of the animal. No Ki-67 labelling was observed at the dermis level. Results on filaggrin, collagen and elastin levels also showed an insignificant influence of RFR.

Conclusions: These results do not demonstrate any major physical and histological variations at skin level induced by RFR used in mobile telephony.

Keywords: Hairless rat, GSM-900 or -1800, skin, histology, cellular proliferation

Introduction

Excessive exposure to UV (International Commission on Non-Ionising Radiation Protection [ICNIRP] 1998) and ionizing radiation (Greenlee et al. 2000) are the most important predisposing factors for skin cancer. However, the influence on the skin of other types of radiation, such as electromagnetic fields, has not been widely studied to date. Some contradictory results have been reported using extremely-low-frequency magnetic fields, describing either modest increased tumour development (Kumlin et al. 1998) or no incidence whatsoever on cancer initiation (Sasser et al. 1998). However, recent results sug-

gested that electromagnetic fields may act as tumor promoters (Sommer et al. 2004, Hardell et al. 2003). RadioFrequency Radiation (RFR) used in mobile telephony has not been widely studied on the skin. One experimental result reported the *in vitro* effect of human skin fibroblast exposure to a mobile phone (GSM-900), but the dosimetry of this system was not well defined (Pacini et al. 2002). *In vivo* experiments, using 900 MHz radiation emitted by mobile phones was described to cause electromagnetic fields-mediated histopathologic skin changes (Ozguner et al. 2004). The purpose of this work was to determine whether the cellular components of hairless rat skin are immediately affected after a 2-h acute local

exposure to GSM-900 or -1800 signals at a relatively high Specific Absorption Rate (SAR *ca.* 5 W/kg).

Material and methods

Animals

Ten-week-old hairless female rats (IFFA CREDO, L'Arbresle, France) were used. The animals were housed under controlled temperature (22°C) and lighting conditions (monitored light-dark cycles 08:00–20:00 h), and supplied with water and food *ad libitum* (UAR 04, SAFE, Les Tremblats, 89290-Augy, France). The rats were kept for one week in the laboratory before the start of the experiment. All recommendations of the CNRS regarding animal care and handling were followed.

Chemicals

Unless other stated, all chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, F-38297, St Quentin Fallavier, France.

Experimental protocol

Animals were gradually accustomed to the exposure set-up (rocket-type) over two weeks, in parallel to a cage-control group (8 animals). Thereafter, the habituated animals were exposed or sham-exposed for 2 h to GSM-900 or -1800 signals using a loop-antenna. Eight rats were randomly distributed in each group. Immediately at the end of the experiment, rats were sacrificed using a lethal intraperitoneal injection of urethane (3 mg/ml) and a skin biopsy was done, not only at the location of exposure, but also on the symmetrical part of the back in order to get an internal control.

Exposure setup and dosimetry

Animals were placed in rockets and exposed to GSM-900 or -1800 signals using a loop-antenna (Leveque et al. 2004) located at a selected location on the right part of the rat back (Figure 1a and 1b). The objective was to get a local SAR of *ca.* 5 W/kg at skin level. A series of measurements was done using a Vitek temperature probe using a gel phantom to estimate the SAR distribution in the skin of the animals placed inside the rocket right underneath the loop (1 × 3 cm). These experiments done at various depths (1, 3, 7 mm), gave estimates at the skin level (1 mm depth) of the SAR of 5.8 ± 0.4 and 4.8 ± 0.4 (mean ± SD, *n* = 3) at 900 and 1800 MHz, respectively. These references levels are termed 5 W/kg thereafter in this paper and the companion paper. SAR levels on the contralateral side were negligible

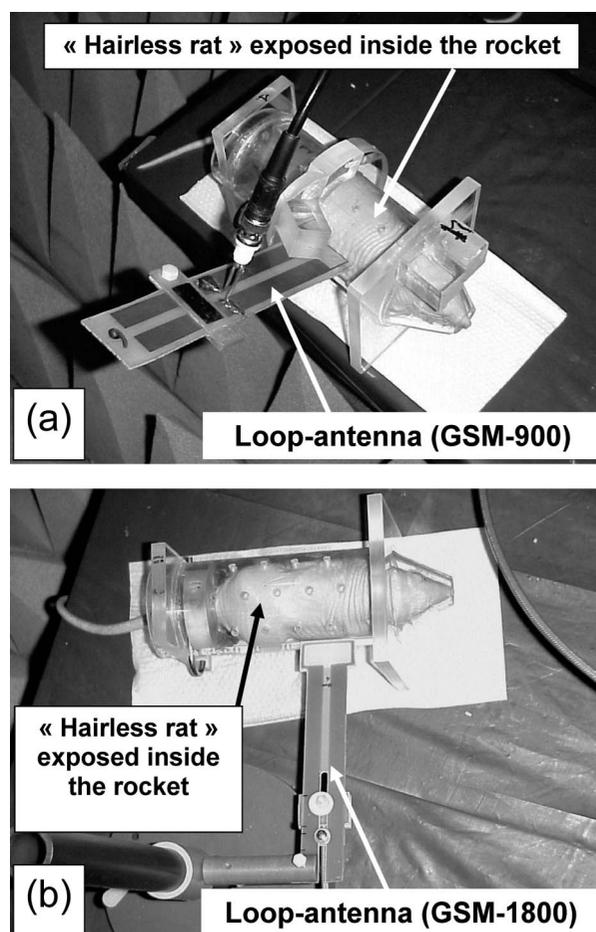


Figure 1. RF Exposure set-up used for Hairless rats: (a) loop antenna adapted for GSM-900 exposure, (b) loop antenna adapted for GSM-1800 exposure.

(10^{-3} W/kg). The uncertainty includes errors in SAR measurements in the gel and uncertainty on the actual position of the rat skin within the rocket with respect to the loop antenna. The efficiency of the two types of antennas was 11.8 and 10.3 W/kg/W, at 900 and 1800 MHz, respectively.

Histological study

The studied parameters were epidermis thickness, skin irritation, and histological analysis using various biomarkers (Hematoxylin Eosin Saffron (HES), Ki-67, filaggrin, collagen, and elastin). The analysis was performed in a blind manner in an outside laboratory (Eurotest, Pessac, France) on skin biopsies, fixed using 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Paraffin-embedded blocks were cut into 5 μm thick sections and deparaffined using toluene before rehydration. The different staining methods were then applied as follows:

Epidermal thickness determination. HES staining: Haematoxylin was used for nucleus staining, eosin

for cytoplasm staining and saffron for collagen staining. Epidermal hyperplasia was determined by assessing vertical epidermal thickness using an ocular micrometer. Fifty measurements ($\times 400$ magnification) of epidermal thickness were recorded in each sample and analysed using an unpaired t-test.

Cellular proliferation detection. Slices of skin were used for immunohistochemistry to detect Ki-67 antigen. Inhibition of endogenous peroxidase activity was accomplished by incubation in H_2O_2 . Ki-67 immunohistochemistry using the monoclonal antibody MIB-5 (DAKO France, F-78196 Trappes, France) and LSAB (labelled streptavidin biotin) kit (DAKO) was performed according to the manufacturer's instructions following anti-gene retrieval by heating. Cut sections were then immunostained with MIB-5 (diluted 1/50) for 1 h at room temperature. For staining visualization, sections were incubated with biotinylated rabbit anti-mouse secondary antibody (DAKO) diluted 1/50, followed by incubation with streptavidin/HRP (DAKO) diluted 1/300 and

staining with 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride solution (DAKO) as chromogen. The Ki-67 labelling index was expressed as the number of positive cells $\times 100$ /total number of basal epidermal cells. Nuclear staining from these cells of the epidermis was evaluated on ten $150 \mu m$ long fields in each sample ($\times 400$ magnification).

Filaggrin and Collagen localization. Paraformaldehyde Acid Schiff (PAS) staining with Hematoxylin counter staining were used ($\times 400$ magnification). This method enabled detection of carbohydrates either free or bound to others molecules as glycoproteins. Glycoaminoglycans, particularly collagen appeared with a pink-red staining. A counter staining revealed kerato-hyalin granules containing filaggrin with a dark blue staining.

Elastin staining. Rabbit antibody to rat elastin from rat aorta was used. Elastin detection was done using a polyclonal antibody with amplification of signal using avidine/streptavidine/biotine complex, followed by peroxidase revelation.

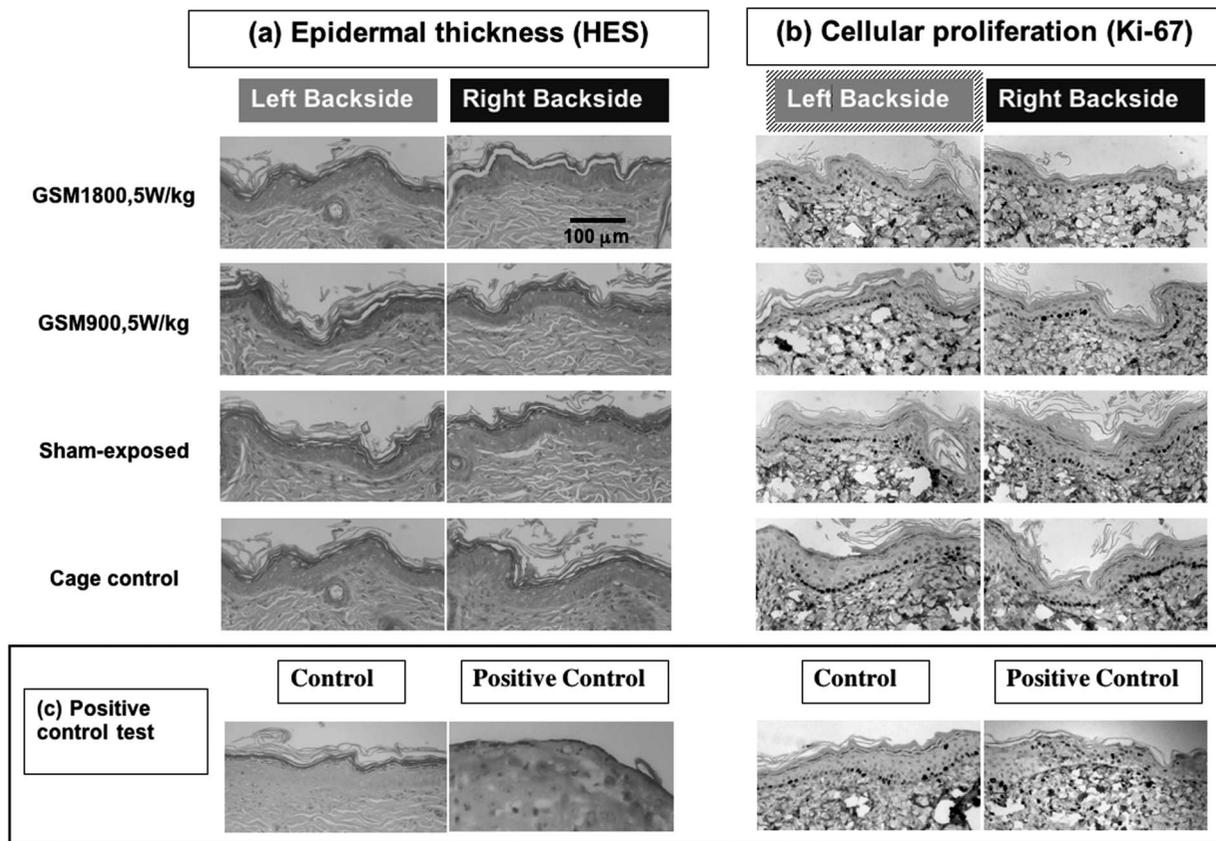


Figure 2. Determination of epidermal thickness and cellular proliferation. (a) Typical slices corresponding to HES staining of hairless rat skin sections from the left (unexposed) or right (RF- or sham-exposed, and cage control) sides of the back. Haematoxylin was used for nucleus staining, eosin for cytoplasm staining and saffron for collagen staining. (b) Typical slices corresponding to Ki-67 immuno-detection on hairless rat skin sections from the left (unexposed) or right (RF- or sham-exposed, and cage control) backsides. (c) Histological positive control tests: The right side of the backs of Hairless rats were exposed to a single dose of UVB radiation (400 mJ/cm^2), whereas the contralateral left sides were used as control. Different specific staining (HES, Ki-67) was used 24 h after the end of the UV exposure period.

Positive controls

The right backs of Hairless rats ($n = 2$) were exposed to UVB irradiation (400 mJ/cm^2) using a UV exposure system (UV BIO-SPECTRA, Vilbert Lourmat, Torcy, France, 280–320 nm); 24 h later, exposed and contra-lateral skin biopsies were fixed. The same histological tests as used with RFR exposure were performed (Figure 2c).

Statistical analysis

Inter-group statistical analysis was done using the unpaired Student *t*-test. Values were normalized as mean percentage \pm standard error of the mean (SEM) and *p* values < 0.05 were considered significant.

Results

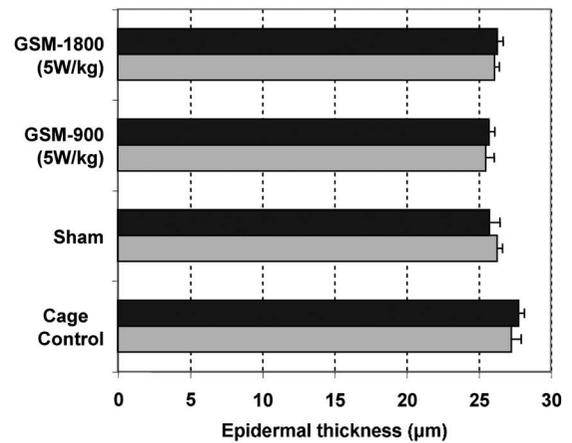
The body weight, which served as an indirect evaluation of the overall health status, was not different among the various groups of animals throughout the habituation period before exposure (Control cage = $163.0 \pm 1.5 \text{ g}$, Sham-exposed = $157.5 \pm 1.9 \text{ g}$, GSM-900 = $162.5 \pm 1.2 \text{ g}$, GSM-1800 = $155.8 \pm 1.9 \text{ g}$).

Histological analysis

Epidermal thickness. (see Figure 2a). Analysis of skin sections using HES staining (Figure 3a) showed no difference of skin thickness ($n = 8$): Control = $27.8 \pm 0.4 \mu\text{m}$, sham = $25.4 \pm 0.7 \mu\text{m}$, GSM-900 = $25.7 \pm 0.4 \mu\text{m}$, GSM-1800 = $26.3 \pm 0.4 \mu\text{m}$. On the contra-lateral unexposed back, similar observations were made (respectively 27.3 ± 0.7 , 26.3 ± 0.4 , 25.5 ± 0.6 , and $26.1 \pm 0.3 \mu\text{m}$). The epidermis part of the UVB exposed skin (Figure 2c) revealed hypertrophy, hyperplasia and oedema.

Cellular proliferation detection. (see Figure 2b). Histological analysis of the epidermis of the RF-exposed side (Figure 3b) showed that the ratio between cells expressing Ki-67 (cellular proliferation marker) and basal cell number (measured on $150 \mu\text{m}$ long sections) remained within the range of normal proliferation ratio ($< 5\%$), whereas the epidermis part of the UVB exposed skin (Figure 2c) was much higher (60% of labelled cells) with KI-67 labelling dispersed over the whole epidermis thickness. For the right backside, results ($n = 8$) were as follows: Control = $3.44 \pm 0.17\%$, Sham = $3.05 \pm 0.24\%$, GSM-900 = $3.10 \pm 0.15\%$, GSM-1800 = $3.21 \pm 0.18\%$. On the non-exposed side, a similar observation was made (respectively 3.13 ± 0.138 , 3.25 ± 0.10 , 3.14 ± 0.20 , and $3.21 \pm 0.18\%$).

(a) Epidermal Thickness (HES staining)



(b) Cellular proliferation (Ki-67 staining)

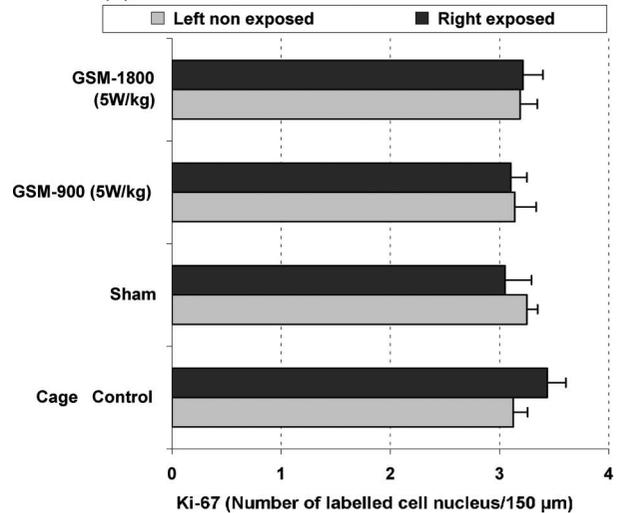


Figure 3. (Numerical analysis of Figure 2 represented as the mean \pm SEM). (a) Results analysis ($n = 8$) of RF exposure on 50 epidermal thickness measurements along one slice. (b) Results analysis ($n = 8$) of RF exposure on cellular proliferation expressed as the number of positive cells $\times 100$ /total number of basal epidermal cells (nuclear staining from these cells of the epidermis was evaluated on ten $150 \mu\text{m}$ long fields in each sample).

Filaggrin and Collagen density. (see Figure 4a). The PAS staining revealed filaggrin as dark blue colour and collagen as pink red. Blind analysis of digital pictures using the Aphelion image analysis software (ADCIS-ADvanced Concepts in Imaging Software-, Hérouville Saint-Clair, France) did not revealed any significant histological variations concerning filaggrin and collagen density. This fact was observed among the different studied groups, comparing the ratio between the exposed right back versus the non-exposed contra-lateral ones (Figure 5a and 5b).

Elastin staining. (see Figure 4b). Blind digital analysis of pictures as previously reported for filaggrin

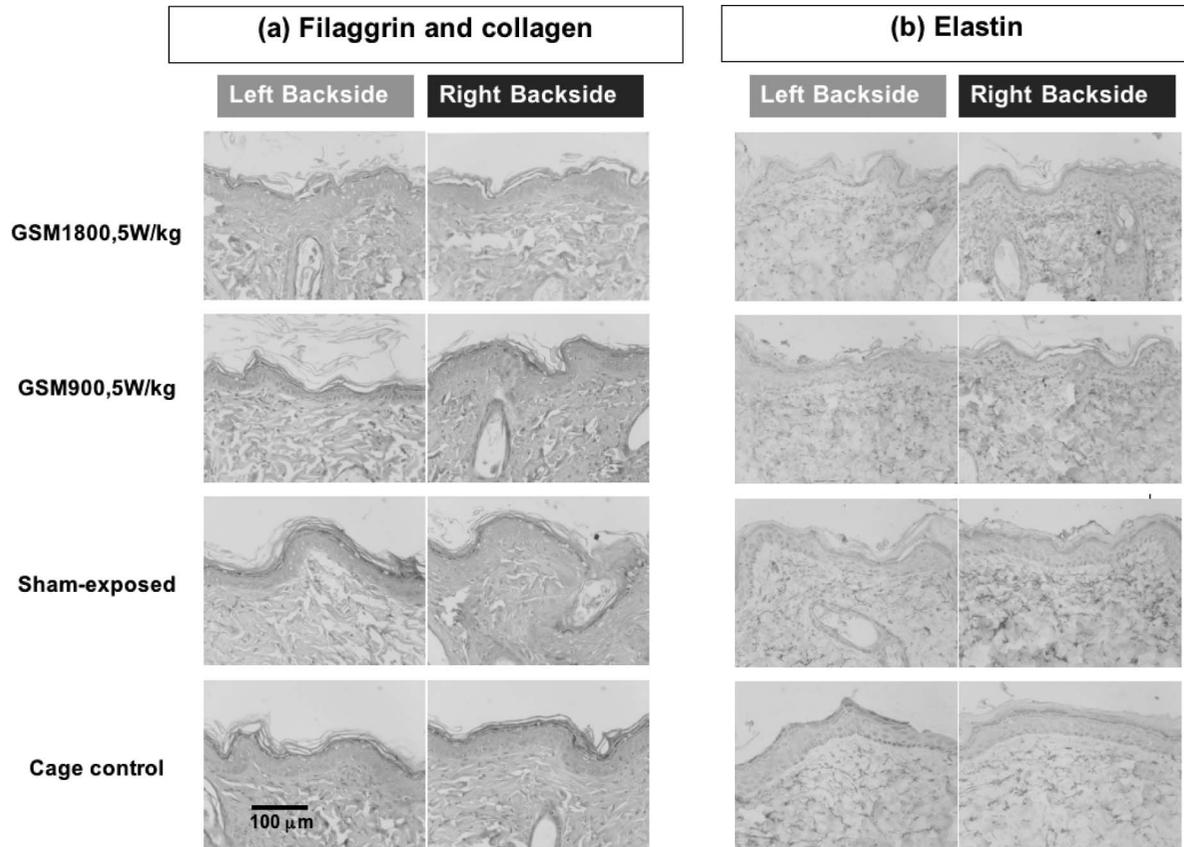


Figure 4. Determination of filaggrin/collagen and elastin localization. (a) Typical slices corresponding to filaggrin and collagen localization using PAS staining of hairless rat skin sections ($n=8$ in each case) from the left (unexposed) or right (RF- or sham-exposed, and cage control) backsides. Kerato-hyalin granules containing filaggrin appeared with a dark blue staining and collagen appeared with a pink-red staining. (b) Elastin localization using immunological detection from the left (unexposed) or right (RF- or sham-exposed, and cage control) backsides. Elastin appeared as a brown staining.

and collagen, did not revealed any variation for elastin localization and ratio between the exposed right back vs. the non-exposed contra-lateral ones (Figure 5c).

Discussion

As the epidermis is the human organ most exposed to mobile telephones, this work focused on the potential health hazards of acute local exposure of hairless rat skin to GSM-900 and -1800 RFR using a well-defined exposure system (loop-antenna). Under these experimental conditions, no important modification was observed on histological skin components, which were tested immediately after 2-h exposure to GSM signals (*ca.* 5 W/kg at the skin level). The biological tested parameters (epidermal thickness, cellular proliferation, or collagen, filaggrin and elastin) were not significantly modified after the exposure period, but it should be kept in mind that a complete renewal of the epidermis cellular layer took at least 4–6 weeks (Melissopoulos & Levacher 1998). This result does not agree with a recent *in vitro* study describing significant

biological effect of GSM-900 (0.6 W/kg) after 1-h exposure of human skin fibroblasts (Pacini et al. 2002). The authors observed alterations in cell morphology associated with increased expression of mitogenic signal transduction genes, cell growth inhibitors, and genes controlling apoptosis. The reasons for this discrepancy might be related to different exposure systems (mobile phone vs. local antenna loop), cellular lines (human fibroblasts vs. hairless rat skin), and biological endpoints (gene expression vs. cellular proliferation). On the other hand, skin of normal rats exposed *in vivo* to GSM-900 signals for 10 days (Ozguner et al. 2004) showed increased thickness of stratum corneum, atrophy of epidermis, papillomatosis, basal cell proliferation, increased granular cell layer (hypergranulosis) in epidermis and capillary proliferation, impairment in collagen tissue distribution. Moreover, separation of collagen bundles in dermis were observed compared to the control group. Our results using a shorter exposure time do not revealed similar observations, so longer exposure time might be useful to confirm these positive experiments.

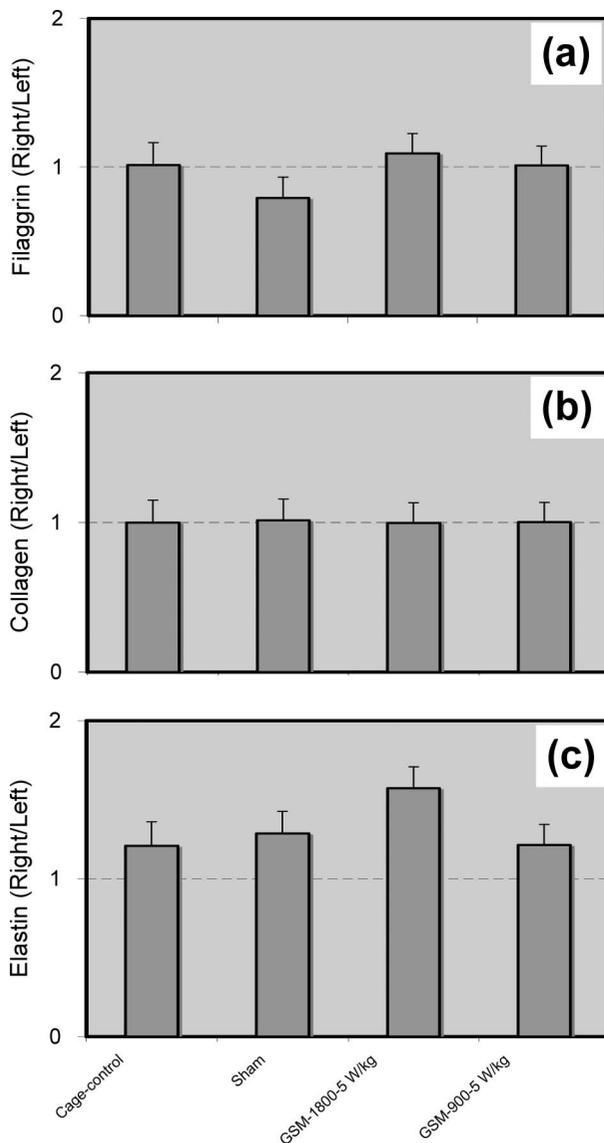


Figure 5. (Numerical analysis of Figure 2 represented as the mean \pm SEM of the ratio from the right (RF- or sham-exposed, and cage control) backsides to the left unexposed backside). (a) Filaggrin ($n=8$), (b) Collagen ($n=8$), (c) Elastin ($n=8$).

Conclusions

No major histological alterations were observed on the studied cellular parameters immediately after the 2-h local exposure of hairless rat skin to GSM-900- or -1800 (*ca.* 5 W/kg) using a loop-antenna. No difference in epidermis thickness was detected among the animal groups using analysis by HES coloration of skin sections. RF exposure did not affect cellular proliferation estimated using Ki-67 labelling. Filaggrin, collagen, and elastin were not modified by exposure to GSM-900 or -1800 signals. In the

laboratory, a preliminary 4-week GSM-900 experiment (2 h/day, 5 days per week at SAR of 1, 2, and 4 W/kg) showed no significant sub-chronic modification of similar endpoints (unpublished results).

However, these results do not preclude any potential influence of these RFR during a chronic study allowing measurements throughout a complete skin-cell regenerating cycle, i.e., at least 7–8 weeks. Therefore, a 3-month chronic experiment using similar exposure conditions was performed and is reported in the companion paper.

Acknowledgements

This work was supported by France Telecom R & D (France) under grant No. 01 1B, the CNRS and the Aquitaine Research Council.

References

- Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. 2000. Cancer statistics, 2000. CA: a Cancer Journal for Clinicians 50:7–33.
- Hardell L, Mild KH, Carlberg M. 2003. Further aspects on cellular and cordless telephones and brain tumours. International Journal of Oncology 22:399–407.
- International Commission on Non-Ionising Radiation Protection (ICNIRP). 1998. Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic and electromagnetic fields (up to 300 GHz). The journal of Health Physics and Radiation Protection 74:494–522.
- Kumlin T, Alhonen L, Jänne J, Lang S, Kosma VM, Juutilainen J. 1998. Epidermal ornithine decarboxylase and polyamines in mice exposed to 50 Hz magnetic fields and UV radiation. Bioelectromagnetics 19:388–391.
- Leveque P, Dale C, Veyret B, Wiart J. 2004. Dosimetric analysis of a local exposure system for rat operating at 900 MHz. Institute of Electrical and Electronics Engineers Transactions on Microwave Theory and Techniques 52:2067–2075.
- Melissopoulos A, Levacher C. 1998. La peau. Structure et physiologie. Editions Médicales Internationales, Allée de la Croix Bossée, F-94234 Cachan cedex, Tec et doc, Paris. p 11.
- Ozguner F, Aydin G, Mollaoglu H, Gökalp O, Koyu A, Cesur G. 2004. Prevention of mobile phone induced skin tissue changes by melatonin in rat: An experimental study. Toxicology and Industrial Health 20:133–139.
- Pacini S, Ruggiero M, Sardi I, Aterini S, Gulisano F, Gulisano M. 2002. Exposure to global system for mobile communication (GSM) cellular phone radiofrequency alters gene expression, proliferation, and morphology of human skin fibroblasts. Oncology Research 13:19–24.
- Sasser LB, Anderson LE, Morris JE, Miller DL, Walborg EF, Kavet R, Johnston DA, DiGiovanni J. 1998. Lack of a co-promoting effect of a 60 Hz magnetic field on skin tumorigenesis in SENCAR mice. Carcinogenesis 19:1617–1621.
- Sommer AM, Streckert J, Bitz AK, Hansen VW, Lerchl A. 2004. No effect of GSM-modulated 900 MHz electromagnetic fields on survival rate and spontaneous development of lymphoma in female AKR/J mice. BMC Cancer 4:77–89.

ARTICLE 5 : Effect of chronic exposure to GSM-900 or -1800 microwaves on the skin of "hairless" rats

SANCHEZ S., MASUDA H., BILLAUDEL B., HARO E., ANANE R., LEVEQUE P., RUFFIE G., LAGROYE I. AND VEYRET B..

Effect of chronic exposure to GSM-900 or -1800 microwaves on the skin of "hairless" rats.

IJRB, vol. 82, 675-680

L'article 5 traite des effets chroniques in vivo des signaux GSM-900 et GSM-1800 sur la peau. Des approches histologiques et immunohistologiques ont été utilisées pour étudier les éventuels effets de 2 heures d'exposition par jour, 5 jours par semaine, sur un total de 12 semaines, aux radiofréquences sur des composants cellulaires spécifique de la peau : épaisseur épidermique, prolifération cellulaire, localisation de la filaggrine, du collagène et de l'élastine. Le modèle animal choisi est la souche de rat Hairless, sans poil. Les DAS étudiés sont 2,5 et 5 W/kg. Des contrôles positifs UVB ont été employés pour mettre en évidence les changements cellulaires attendus. L'analyse des différents paramètres histologiques a été réalisée sous microscopie par un laboratoire indépendant (Eurotest).

Effect of GSM-900 and -1800 signals on the skin of hairless rats. II: 12-week chronic exposures

S. SANCHEZ¹, H. MASUDA², B. BILLAUDEL¹, E. HARO¹, R. ANANE¹, P. LÉVÊQUE³, G. RUFFIE¹, I. LAGROYE¹ & B. VEYRET¹

¹PIOM Laboratory CNRS-ENSCP, University of Bordeaux, Pessac, France, ²Department of Environmental Health, National Institute of Public Health, Saitama, Japan, and ³IRCOM, Limoges, France

(Received 23 November 2005; revised 20 July 2006; accepted 27 July 2006)

Abstract

Purpose: The purpose of this work was to determine whether the cellular components of Hairless-rat skin are affected by a chronic local exposure to non-ionizing radiations of Global Mobile Phone System: GSM-900 or -1800 radiations at specific absorption rate (SAR) 2.5 and 5 W/kg.

Materials and methods: A selected part of the right back of five-week old female hairless rats was exposed or sham exposed ($n=8$) for 2 h per day, 5 days a week, for 12 weeks to GSM-900 or -1800 signals using a loop-antenna. At the end of the experiment, skin biopsies were taken.

Results: Analyses of skin sections using hematoxylin eosin saffron (HES) coloration showed no significant difference in skin thickness among the groups. Immunohistochemical analysis of basal lamella cells in radiofrequency radiation (RFR)-exposed epidermis showed that the ratio of the antigen Ki-67 (cellular proliferation marker) positive cells to total lamella cells remained within the range of the normal proliferation ratio. No significant differences in the level of filaggrin, collagen, and elastin were observed among the different groups.

Conclusions: The results of this 12-week chronic study do not demonstrate major histological variations in the skin of hairless rats exposed to RFR used in mobile telephony (GSM-900 or -1800).

Keywords: Hairless rats, mobile phone signals, chronic effect, skin

Introduction

Following the work described in the companion paper, we have investigated the effects of chronic exposure to mobile phone signals on the skin. We had already performed a 4-week sub-chronic preliminary study (unpublished results), which did not demonstrate any major physical and histological variations (as measured 72 h after the last exposure) in the skin of hairless rats exposed to GSM-900 at three specific absorption rate (SAR) levels. However, this work called for an extension of these biological measurements during a whole skin-cell regenerating cycle, i.e., at least 6–7 weeks (Melissopoulos & Levacher 1998). Thus the purpose of the present work was to determine whether the cellular structures of hairless rat skin are affected during a 12-week chronic local exposure to GSM-900 and -1800 at around the

two highest levels previously used of *ca.* 2 and 4 W/kg.

Material and methods

Animals

Five-week-old hairless female rats (IFFA CREDO, L'Arbresle, France) were used so that animals in the acute and chronic studies had the same age at the end of the study. The animals were housed under controlled temperature (22°C) and lighting conditions (monitored light-dark cycles 08:00–20:00 h), and supplied with water and food *ad libitum* (UAR 04, SAFE, Les Tremblats, 89290- Augy, France). The animals were kept for one week in the laboratory before starting the treatment. French regulations (Decree 87-848) regarding animal care, animal handling, and experiments on live animals were followed.

Chemicals

Unless otherwise stated, all chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, F-38297, St Quentin Fallavier, France.

Experimental protocol

Eight rats, randomly distributed in each experimental group, were gradually accustomed to the rocket-type exposure set-up over one week (except control cage animals). This rocket type system consisted of a plastic tube-like structure which could be equipped with a loop antenna placed on the right back of the animal. This loop antenna could be moved as the rat was growing. Thereafter, rocket-habituated animals were exposed or sham-exposed for 2 h per day, 5 days a week, for 12 weeks to GSM-900 or -1800 signals (ca. 2.5 or 5 W/kg SAR at skin level) using a loop-antenna (cf. the dosimetry section in the companion paper). The animals were sacrificed, using a lethal intra-peritoneal injection of urethane (3 mg/ml), 72 h after the last exposure, in order to observe stable chronic processes only. A skin biopsy was done not only at the selected location of the exposed backside, but also on the symmetrical part of the back in order to obtain an internal control.

Histological study

The measured parameters were: Body weight, epidermis thickness, skin irritation, and histology using various biomarkers (hematoxylin eosin saffron (HES), Ki-67, filaggrin, collagen and elastin). Analysis of skin biopsies fixed using 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin were performed in a blind manner by an independent laboratory (Eurotest, F-33607, Pessac, France).

Paraffin-embedded blocks were cut into 5 μ m thick sections and deparaffined with toluene before rehydration. The different staining methods were then applied as follows:

Epidermal thickness determination. HES staining: Haematoxylin was used for nucleus staining, eosin for cytoplasm staining, and saffron for collagen staining. Epidermal hyperplasia was determined by assessing vertical epidermal thickness. Fifty measurements ($\times 400$ magnification) of epidermal thickness were recorded in each sample using an ocular micrometer.

Cellular proliferation detection. Slices of skin were used for immunohistochemistry to detect Ki-67 antigen (protein expressed during the cellular cycle, except the G0 phase). Inhibition of endogenous peroxidase activity was accomplished by incubation

in H_2O_2 -Ki-67 immunohistochemistry using the monoclonal antibody MIB-5 (DAKO France, F-78196 Trappes, France) and a LSAB (labelled streptavidin biotin) kit (DAKO) was performed according to the manufacturer's instructions following antigen retrieval with heating. Cut sections were then immunostained with MIB-5 (diluted 1/50) for 1 h at room temperature. For staining visualisation, sections were incubated with biotinylated rabbit anti-mouse secondary antibody (DAKO) diluted 1/50, followed by incubation with streptavidin/HRP (DAKO) diluted 1/300, and 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride solution (DAKO) as chromogen. The Ki-67 labelling index was expressed as the number of positive cells $\times 100$ / total number of basal epidermal cells. Only nuclear staining from basal lamella cells of the epidermis was evaluated. Ten 150 μ m long fields were recorded under high magnification ($\times 400$) in each sample.

Filaggrin and collagen localization. Paraformaldehyde Acid Schiff (PAS) staining with Hematoxylin counter-staining were used, enabling detection of carbohydrates that were either free or bound to other molecules as glycoproteins. Glycoaminoglycans, as collagen appeared with a pink-red stain. A counter-staining revealed keratoyalin granules containing filaggrin with a dark blue stain.

Elastin localization. Rabbit antibody to rat elastin from rat aorta was used. Elastin detection was done using a polyclonal antibody with signal amplification using avidine/streptavidine/biotine complex followed by peroxidase revelation.

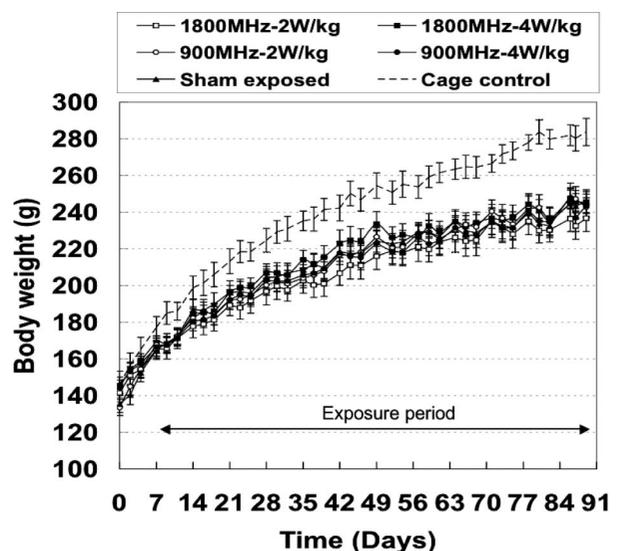


Figure 1. Comparative evolution of hairless rat body weight during 1-week habituation followed by 12-week radiofrequency local exposure to GSM-900 or -1800 (SAR = 2.5 or 5 W/kg). The data are represented as the mean \pm SEM.

Positive controls

The right backs of the Hairless rats ($n=2$) were exposed to UVB irradiation (400 mJ/cm^2) using an UV exposure system (UV BIO-SPECTRA, Vilbert Lourmat, Torcy, France, 280–320 nm). Figure 1 exposed and contralateral skin biopsies were fixed 24 h later. The same histological studies as for experimental hairless rats were performed.

Statistical analysis

Inter-group statistical analysis was made using the unpaired Student t -test and p value <0.05 was considered significant.

Results

Body weight

Animal weight was used as an indirect evaluation of the overall health status. The body-weight/time profile was not dramatically different among the various groups of animals throughout the experimental period. However, it should be noted that the body weight profile of “cage control” rats was slightly higher at the end of the experimental period ($p < 0.01$, $n=8$) than all other groups of animals submitted to exposure restraint.

Histological analysis

Epidermal thickness. (see Figure 2a). Analysis of skin sections ($n=8$) using HES coloration (Figure 3a)

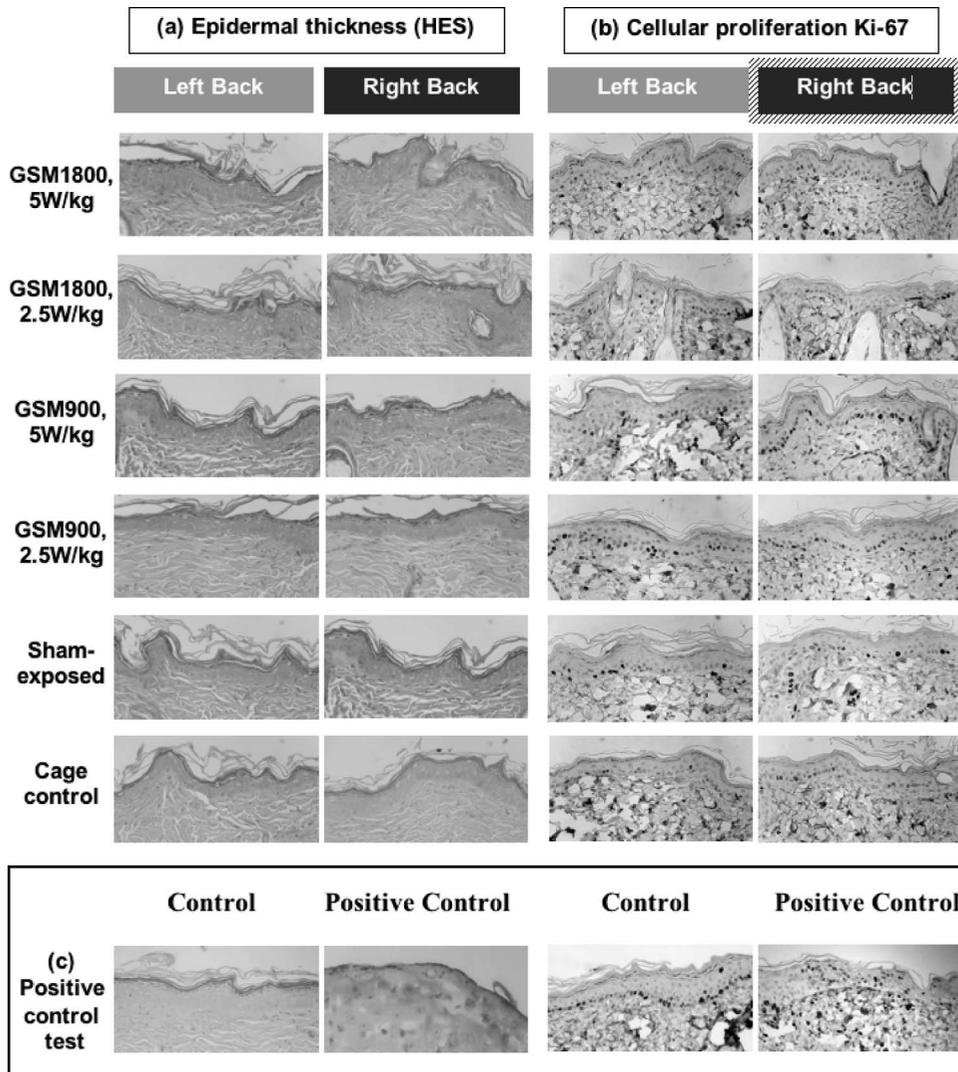


Figure 2. Determination of epidermal thickness and cellular proliferation. Typical slices corresponding to (a) HES staining and, (b) Ki-67 immuno-detection on hairless rat skin sections from the left (unexposed) or right (RF- or sham-exposed, and cage control) backsides. (c) Histological positive control tests: The right side of the backs of Hairless rats were exposed to a single dose of UV-B radiation (400 mJ/cm^2), whereas the contra-lateral left sides were used as control. Different specific stains (HES, Ki-67) were used 24 h after the end of the UV exposure period (Magnification $\times 200$).

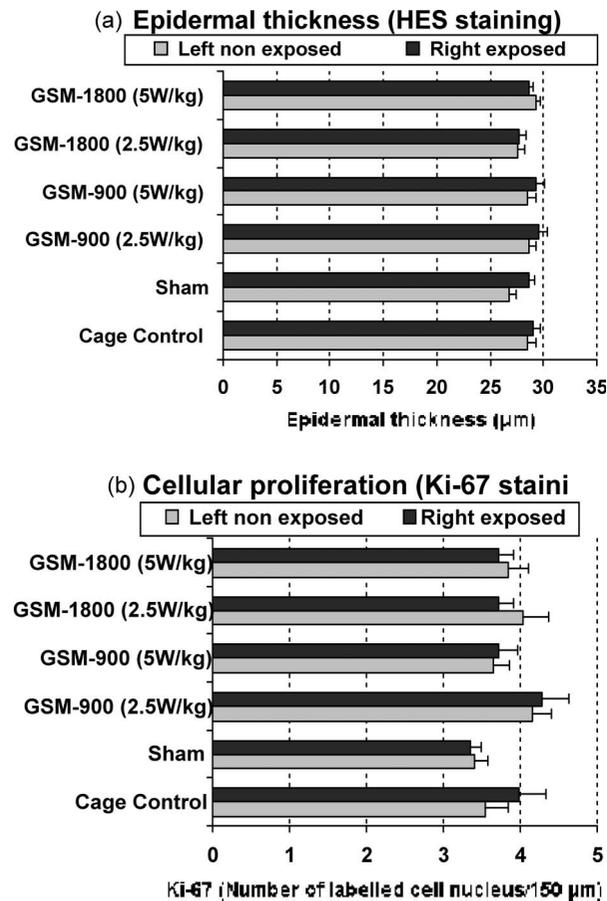


Figure 3. Numerical analysis of Figure 2 represented as the mean \pm SEM. (a) Results of analysis ($n = 8$) of RF exposure on 50 epidermal thickness measurements along one slice. (b) Results of analysis ($n = 8$) of RF exposure on cellular proliferation expressed as the number of positive cells \times 100/total number of basal epidermal cells (nuclear staining of these cells of the epidermis was evaluated on ten 150 μ m long fields in each sample).

showed no difference in skin thickness: control cage = $29.0 \pm 0.7 \mu\text{m}$, sham-exposed = $28.6 \pm 0.6 \mu\text{m}$, GSM-900- (2.5 W/kg) = $29.5 \pm 0.8 \mu\text{m}$, GSM-900- (5 W/kg) = $29.4 \pm 0.8 \mu\text{m}$, GSM-1800- (2.5 W/kg) = $27.7 \pm 0.7 \mu\text{m}$, and GSM-1800- (5 W/kg) = $28.6 \pm 0.4 \mu\text{m}$. Similar observations were made (respectively 28.5 ± 0.5 , 26.8 ± 0.6 , 28.6 ± 0.3 , 28.5 ± 0.6 , 27.5 ± 0.7 and $29.4 \pm 0.8 \mu\text{m}$) on the contra-lateral non-exposed back.

Cellular proliferation detection. (see Figure 2b). Histological analysis of the epidermis of the radio frequency (RF)-exposed side of the animal showed that the mean ratio between cells expressing Ki-67 (cellular proliferation marker) and basal lamella cell number (measured on 150 μm sections) remained within the range of normal the proliferation ratio ($< 5\%$) (Figure 3b), whereas the epidermis of the UVB exposed skin was much higher (60% of labelled cells) (Figure 2c).

Results ($n = 8$ in each case) were as follows: Control cage = $3.99 \pm 0.35\%$, sham-exposed = $3.35 \pm 0.15\%$, GSM-900- (2.5 W/kg) = $4.29 \pm 0.34\%$, GSM-900- (5 W/kg) = $3.71 \pm 0.25\%$, GSM-1800- (2.5 W/kg) = $3.71 \pm 0.20\%$, and GSM-1800- (5 W/kg) = $3.73 \pm 0.18\%$. On the non-exposed backside, a similar observation was made (respectively 3.54 ± 0.31 , 3.40 ± 0.17 , 4.16 ± 0.25 , 3.65 ± 0.20 , 4.04 ± 0.34 , and $3.84 \pm 0.27\%$). No Ki-67 labelling was observed at the dermis level.

Filaggrin and collagen density. (see Figure 4a). The PAS staining revealed filaggrin as a dark blue colour and collagen as a pink red one. Analysis of digital pictures using the Aphilion (ADCIS-ADvanced Concepts in Imaging Software-, Hérouville Saint-Clair, France) image analysis software (Figure 5a and 5b) did not reveal any significant histological variations concerning filaggrin and collagen density in a blind fashion. This was also the case comparing the same part of the back among the different groups studied by comparison of the ratio of exposed right sides of the back to the non-exposed contra-lateral ones.

Elastin staining density. (see Figure 4b). Analysis, as previously reported for filaggrin and collagen, did not reveal any specific immunohistological variation for elastin localization among the different groups studied in a blind fashion (Figure 5c).

Discussion

As the epidermis is the human organ most exposed to mobile phones, this work focused on the potential health hazards of 12-week chronic local exposure of hairless rat skin to GSM-900 and -1800 radiations using a well-defined exposure system (loop-antenna). A dosimetric study allowed a precise determination for SAR repartition within different skin layers (epidermis and dermis).

Under these experimental conditions, no important modification was observed on histological skin measurements tested 72 h after 12-week exposure to GSM-900 and -1800 signals, whatever the value of SAR (*ca.* 2.5 or 5 W/kg at skin level). The tested biological parameters (epidermal thickness, cell proliferation, or collagen, filaggrin and elastin density) were not significantly modified after this 12-week exposure. This lag period was maintained in order to avoid acute potential effect of RFR, which were planned as the endpoint with other experiments (Masuda et al. 2005).

Concerning the health status of the animals, a higher body weight in the cage control group never submitted to exposure restraint was noticed in the results section. The observation of lower body weight

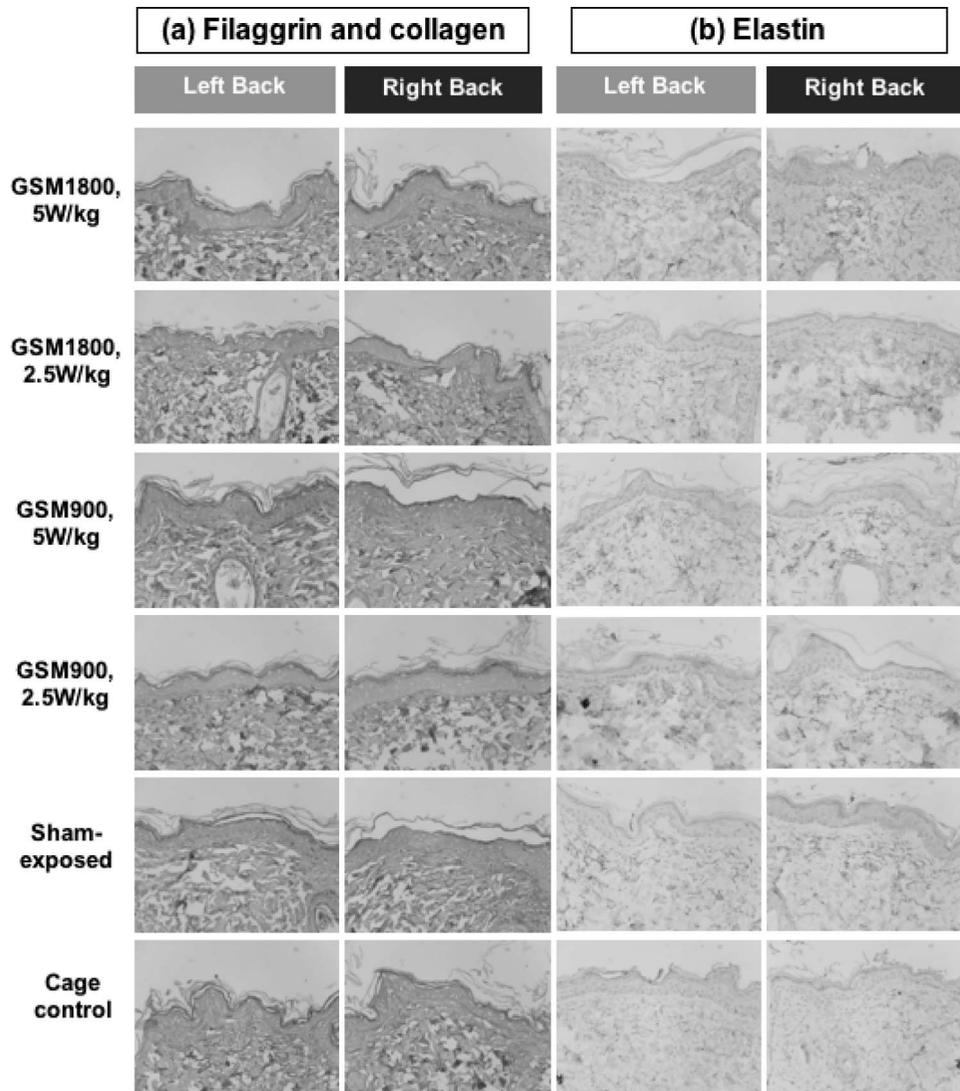


Figure 4. Determination of filaggrin/collagen and elastin localisation. Typical slices corresponding to (a) filaggrin and collagen localisation using PAS staining of hairless rat skin sections and (b) elastin localisation using immunological detection from the unexposed (left) or RF-exposed, sham-exposed or cage control backsides (right) with $n = 8$ in each case (Magnification $\times 200$).

gain in restraint rats versus cage-control ones was related to restraint stress as previously reported in the literature (Rybkin et al. 1997).

This observation had also been reported in other experiments using such a restraining system (Anane et al. 2003), but it should be kept in mind that RF-exposed animals must first be compared to sham control ones presenting the same body weight evolution profile. Independently of the inter-group epidermis thickness or cellular proliferation comparison, the right-vs.-left back ratio expression of results was also important, as it eliminated individual variations. Using this type of calculation, no significant influence of RF exposure was noticed between the left and right sides (data not reported).

One other aspect of this experiment involves the exposure of animals to two different GSM frequencies (900 and 1800 MHz). The biological results are

quite similar and no quantitative difference was observed between these two different signals. The choice of SAR values was determined, first by using 2.5 W/kg slightly above the maximum power deposition accepted during the functioning of commercial mobile phones (ICNIRP 1998), and second by using 5 W/kg to obtain information of the potential adverse influence of SAR values higher than the 2 W/kg limit.

Conclusions

The results of this 12-week study do not demonstrate any major histological variations in the measured skin cellular parameters after local exposure using a loop antenna to GSM-900 or -1800 (2.5 or 5 W/kg). Analysis of skin sections using HES staining showed no difference in skin thickness between the different

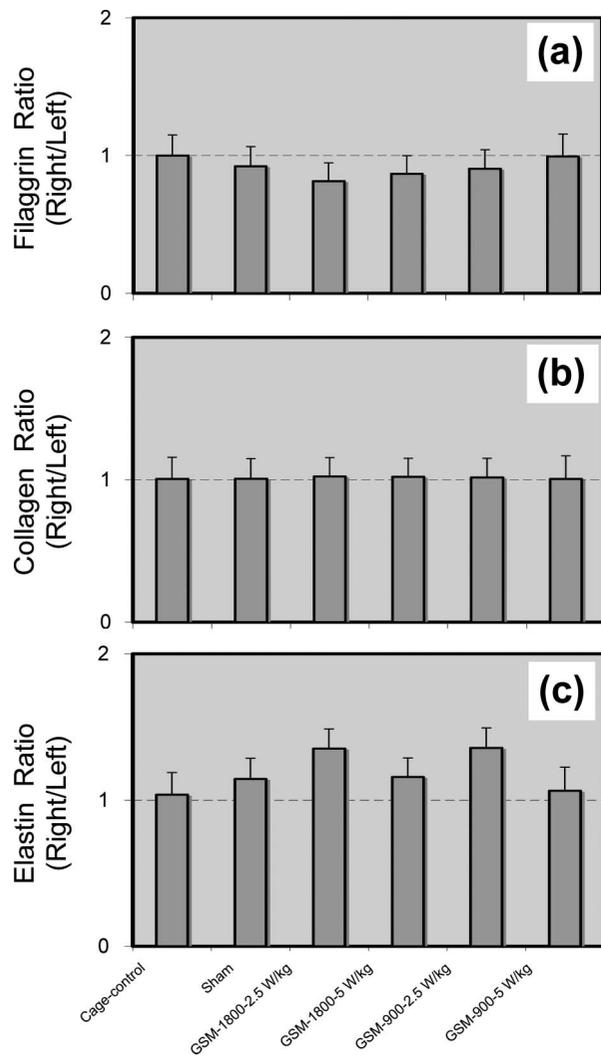


Figure 5. Numerical analysis of Figure 2 represented as the mean \pm SEM of the ratio from the RF-exposed, sham-exposed or cage control backsides (right) to the unexposed backside (left) for (a) Filaggrin ($n = 8$), (b) Collagen ($n = 8$) and (c) Elastin ($n = 8$).

animal groups. Cellular proliferation (estimated using Ki67 labelling) was not affected by RF exposure. Filaggrin, collagen, and elastin detection were not modified by exposure to GSM signals.

Acknowledgements

This work is supported by France Telecom R & D (France) under grant No. 01 1B, the CNRS and the Aquitaine Research Council for support.

References

- Anane R, Dulou PE, Taxile M, Geffard M, Crespeau FL, Veyret B. 2003. Effects of GSM-900 microwaves on DMBA-induced mammary gland tumors in female Sprague-Dawley rats. *Radiation Research* 160:492–497.
- International Commission on Non-Ionising Radiation Protection. 1998. Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic and electromagnetic fields (up to 300 GHz). *The Journal of Health Physics and Radiation Protection* 74:494–522.
- Masuda H, Sanchez S, Ruffie G, Haro E, Anane R, Billaudel B, Veyret B. 2005. Effect of 2-hour acute exposure to GSM-900 or -1800 signals on the skin of “hairless” rats. (IJRB companion paper).
- Melissopoulos A, Levacher C. 1998. *La peau. Structure et physiologie*. Editions Médicales Internationales, Allée de la Croix Bossée, F-94234 Cachan cedex, Tec et doc, Paris, p 11.
- Rybkin I, Zhou Y, Volaufova J, Smagin G, Ryan D, Harris R. 1997. Effect of restraint stress on food intake and body weight is determined by time of day. *American Journal of Physiology* 273 (Regulatory Integrative Comparative Physiology 42):R1612–R1622.

ARTICLE 6 : No effect of single or chronic exposure to GSM-900 and -1800 mobile phone signals on HSP expression in the skin of hairless rat

SANCHEZ S., MASUDA H., RUFFIE G., POULLETIER DE GANNES F., BILLAUDEL B., HARO E., LEVEQUE P., LAGROYE I. AND VEYRET B..

No effect of single or chronic exposure to GSM-900 and -1800 mobile phone signals on HSP expression in the skin of hairless rats.

Cell Stress & Chaperones, soumis

Cet article traite des effets aigus et chroniques in vivo des signaux GSM-900 et GSM-1800 sur la peau. Le but dans cette étude est de mettre en évidence l'induction de stress cellulaire dans l'épiderme de rats Hairless, suite à une exposition continue aigue (2 heures) ou chronique (2 heures par jour, 5 jours par semaine, sur 12 semaines) aux radiofréquences GSM et aux DAS de 2,5 et 5 W/kg. Le stress cellulaire a été étudié par le biais de trois protéines de choc thermique : Hsc70, Hsp25 et Hsp70. Des contrôles positifs UVB ont été employés pour mettre en évidence les changements cellulaires attendus. L'expression épidermique de ces HSP a été mise en évidence par une technique d'immunohistochimie et la quantification de cette expression a été réalisée grâce au logiciel de traitement d'images Aphelion™.

**No effect of single or chronic exposure to GSM-900 and -1800 mobile phone signals
on HSP expression in the skin of hairless rats.**

Sandrine SANCHEZ^a, Hiroshi MASUDA^b, Gilles RUFFIÉ^a, Florence POULLETIER DE GANNES^a, Bernard BILLAUDEL^a, Emmanuelle HARO^a, Philippe LÉVÊQUE^c, Isabelle LAGROYE^{a, d}, Bernard VEYRET^{a, d}.

^a University of Bordeaux 1, PIOM Laboratory Centre National Recherche Scientifique (CNRS)-ENSCP, Pessac, France,

^b Department of Environmental Health, National Institute of Public Health, Saitama, Japan,

^c OSA Department, XLIM - UMR 6172 CNRS, Limoges, France

^d Bioelectromagnetics laboratory, Ecole Pratique des Hautes Etudes (EPHE), Paris, France

Running title:

HSP expression in skin and GSM exposure in vivo

Corresponding author:

Sandrine SANCHEZ

PIOM Laboratory, UMR-5501 CNRS

ENSCP

16 avenue Pey-Berland

33607 PESSAC – FRANCE

Phone number: +33 5 40 00 69 65

Fax number: +33 5 40 00 66 31

E-mail address: sandrinesanchez@free.fr

Abstract:

As the skin is the first organ exposed during mobile phone use, we studied the potential induction of cell stress in this organ. Cell stress response is characterized by several processes and heat shock proteins are actors in many cell types. Data have been obtained *in vitro* on the effects of mobile phone radiofrequency radiation (RFR) on the heat-shock protein (HSP) family. Due to the limitations of *in vitro* studies for health risk assessment, it is extremely important to study the potential impact of RFR, such as GSM signals, *in vivo*. Our work dealt with the effects of GSM-900 and -1800 signals on heat shock protein expression in the skin of hairless rats. The HSPs studied were the cognate and constitutive Hsc70, as well as the inducible forms, Hsp25 and Hsp70. Rat skin was locally exposed using loop antennae and restraint rockets as the exposure system to test several Specific Absorption Rates (SARs) and exposure durations: (i) single exposure: 2 hours at 0 and 5 W/kg; (ii) chronic exposure: 2 hours per day, 5 days per week, for 12 weeks, at 0, 2.5, and 5 W/kg. HSP expression was detected on skin slices using immunolabeling in the epidermal area. Our results indicated that neither acute nor chronic exposures altered HSP expression in rat skin, irrespective of the RFR signal or SAR considered. As such, under our experimental conditions (SAR < 5 W/kg), there is no evidence that GSM signals alter HSP expression in rat skin.

Introduction

The mobile phone communication network has developed very rapidly and the debate continues as to whether radiofrequency radiation (RFR) emitted by mobile phones is stressful for humans. Moreover, the carrier frequency has increased from 900 MHz in the first generation of GSM (Global System for Mobile communication) to the UMTS (Universal Mobile Telecommunication System) at 2000 MHz. As the depth of RFR absorption decreases with frequency, RFR absorption is becoming increasingly superficial (Keshvari and Lang 2005). Consequently, the skin is the organ the most exposed to RFR in mobile phone users.

The skin is constituted by three major cell types: epidermal keratinocytes and melanocytes, and dermal fibroblasts. The skin is known to respond to stress injuries. It is damaged by exposure to ultraviolet radiation (UVR), temperature changes, mechanical pressure, chemical contact, etc. , The biological response depends on the nature and amplitude of the injury: skin cells adapt their reaction to the stress. For instance, when exposed to low level UVR, melanocytes protect the epidermis by producing melanin (Gilchrest et al 1996; Virador et al 2002). When exposed to high UVR doses, the skin cell response ranges from an inflammatory process with release of cytokines, repair processes with up-regulation of specific proteins, such as HSPs or cell cycle proteins, to cell death (i.e. sunburn cells) (Kwon et al 2002; Maytin 1992; Urbanski et al 1990; Walsh 1995).

Heat shock proteins (HSPs), also known as stress proteins, have molecular weights ranging from 15 to 110 kDa and are found in all cells of living organisms. HSPs are induced in cells that undergo various types of environmental stresses, such as temperature variations (Lepock 2005), heavy metals (Boone and Vijayan 2002; Deane and Woo 2006; Nordlind 2002), and oxygen deprivation (Dillmann 1999; Yenari et al 2005), or during repair processes, such as wound healing in the skin (Laplante et al 1998). Moreover some HSPs are constitutive and play a physiological role in cells (Gupta 1990; Mehlen et al 1995; O'Neill and

Noble 2004). Their principal role is as ‘chaperones’, ensuring that cell proteins have the right structure and are in the right place at the right time (Nollen and Morimoto 2002; Sun and MacRae 2005). For instance, HSPs help new or distorted proteins fold into shape, which is essential for their function (Connell et al 2001; Marques et al 2006). They also shuttle proteins from one cell compartment to another and transport old proteins to ‘garbage disposals’ inside the cell (Massey et al 2004; Massey et al 2006). Heat shock proteins are also believed to play a role in the presentation of pieces of proteins (or peptides) on the cell surface to help the immune system recognize diseased cells (Moseley 2000; Multhoff 2006). The major HSP types in the skin are: Hsc70, Hsp25 or 27 (depending on the organism), Hsp70, and Hsp90 (Jonak et al 2005; Kowal-Vern et al 2000; Nordlind 2002).

Previous *in vitro* studies produced contradictory results on HSP expression on exposure to RFR. HSP expression was reported to be affected (Caraglia et al 2005; Di Carlo et al 2002; Leszczynski et al 2002; Miyakoshi et al 2005), but sometimes only at high SARs (> 50 W/kg) (Wang et al 2006). Other authors concluded that HSP expression, structure, and activity were unaffected (as measured by the amount of phosphorylated HSPs) (Capri et al 2004; Hirose et al 2006; Lantow et al 2006a; Lantow et al 2006b; Lee et al 2006; Lim et al 2005).

In view of such contradictory data on HSP expression following *in vitro* exposure to RFR and the paucity of *in vivo* studies on skin, we designed *in vivo* investigations for a detailed study of the potential impact of these signals on skin. To test the hypothesis that RFR is a source of stress for exposed tissues, we assayed the expression of Hsp25, Hsc70, and Hsp70 *in vivo* after single or chronic exposure of the skin of hairless rats to GSM-900 or -1800 signals. This report focuses on the epidermal compartment.

Materials and Methods

Animals

Ten week-old hairless female rats (IFFA CREDO, L'Arbresle, France) were housed under controlled temperature (22°C) and lighting conditions (monitored light-dark cycles 07:00-19:00) and supplied with water and food *ad libitum* (UAR 04, SAFE, Augy, France). The rats were kept for one week in the laboratory before the start of habituation. All recommendations of the National Centre of Scientific Research (CNRS) regarding animal care and handling were followed.

Chemicals

Unless otherwise stated, all chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France.

Experimental protocol

Eight rats were randomly distributed in each experimental group: cage-control, sham-exposure, GSM-900 exposure, and GSM-1800 exposure. Animals were gradually accustomed to the exposure setup (rocket-type) over two weeks.

- Single exposure

The animals trained to the rocket were exposed at 5 W/kg or sham-exposed to GSM-900 or -1800 signals for two hours, using a loop-antenna. Immediately after exposure, rats were sacrificed using a lethal intra-peritoneal urethane injection (1.5 g/kg) and 2 x 4 cm skin samples were removed at the exposure site.

- Chronic exposure

After training to the rocket, animals were exposed at 2.5 or 5 W/kg or sham-exposed to GSM-900 or -1800 signals for two hours per day, 5 days per week, for 12 weeks using a loop-antenna. Skin biopsies were taken as previously at the exposure site (exposed side) 72 hours after the last exposure, to detect a potential persistent or cumulative effect.

Exposure setup and dosimetry

Animals were placed in rockets and exposed to GSM-900 or –1800 signals using a loop-antenna (Leveque et al 2004) located on the right part of the rat back. The objective was to set the local SAR at skin level to ca. 5 W/kg. A series of measurements were carried out using a Vitek temperature probe placed in a gel phantom to estimate the SAR distribution in the skin of animals placed inside the rocket directly underneath the loop (1x3 cm). Measurements at various depths (1, 3, and 7 mm) gave 5.8 ± 0.4 and 4.8 ± 0.4 (mean \pm SEM, n = 3) for SAR at skin level (1 mm depth) at 900 and 1800 MHz, respectively. These levels are referred to as 5 W/kg for convenience. SAR levels on the opposite side of the rat back were negligible ($< 10^{-3}$ W/kg). The reported uncertainty includes errors in SAR measurements in the gel and uncertainty as to the actual position of the rat skin within the rocket in relation to the loop antenna. The efficiency of the two types of antennas was 11.8 and 10.3 W/kg/W at 900 and 1800 MHz, respectively.

Immunohistological study

The expression of three heat shock proteins, Hsc70 (73 kDa), Hsp25 (25 kDa), and Hsp70 (72 kDa) was assessed in the epidermis. Coded skin biopsies were fixed in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, and analyzed blind.

Paraffin-embedded blocks were cut into 5 μ m sections, deparaffined using toluene before rehydration, and then stained. Briefly, an immunohistochemical stain using DAB - peroxidase reaction was performed on skin slices using a Rabbit or Mouse Envision Kit (DAKO France, Trappes, France) as per the manufacturer's instructions. The slices were then counterstained with Haematoxylin to visualise the nuclei, fixed, and mounted using Eukitt® mounting medium. Three randomized microscopic photographs per labeled skin slice and per animal

were taken using a Digital Still Camera (SONY, DSC-S75 Cyber-Shot) mounted with an adapter ring (SONY, VAD-S70) on a Zeiss microscope, Axiovert 40C (all equipment purchased from Fisher Bioblock, Illkirch, France).

From these photographs, the labeling intensity of each HSP was quantified using Aphelion[®] image analysis software (ADCIS, Hérouville Saint-Clair, France). The mean intensity of HSP expression was calculated for each photograph, under each exposure condition (GSM-900, GSM-1800, sham), and compared with the mean intensity of positive- and label-control photographs. Labeling controls were obtained by leaving out the primary anti-Hsp antibody.

Positive controls

The right backs of hairless rats ($n = 2$) were exposed to UVB radiation (400 mJ/cm^2) using a UV exposure system (UV BIO-SPECTRA, Vilbert Lourmat, Torcy, France, 280-320 nm). Twenty-four hours later, exposed skin biopsies were fixed. Samples were handled as above for RFR exposures.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SEM; significant differences between group data were evaluated using the unpaired non-parametric Mann-Whitney test, and $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Single exposure to RFR

Figure 1 shows HSP expression in hairless rat epidermis after a single exposure to GSM signals. There was a basal level of expression for all HSPs under control conditions (cage control and sham-exposed).

Hsc70 expression was homogenous across the epidermis and dermis, and appeared to be both cytoplasmic and nuclear. Exposure to UVB induced expression in the epidermis.

Hsp25 exhibited a clear suprabasal expression in the epidermal area, down to the desquamated layer. Moreover, it was expressed essentially in the cell nuclei. UVB exposure induced Hsp25 expression down to the basal layer.

Basal Hsp70 expression was very weak in the epidermis and dermis under all conditions, while UVB exposure increased expression slightly.

Figure 2 shows an attempt to quantify HSP expression by measuring labeling intensity after image analysis. We then calculated HSP expression as a percentage of positive control values. We observed that the expression of Hsc70, hsp25, and Hsp70 were unaffected after a single 2-hour GSM-900 or -1800 exposure at 5 W/kg.

Chronic exposure to RFR

In these experiments, we noticed that HSP expression and distribution in the skin of control rats was similar to those in the single-exposure experiments (data not shown).

After chronic exposure to GSM-900 or -1800, at 2.5 W/kg or 5 W/kg, Hsc70, Hsp25, and Hsp70 expression was unaffected in the epidermis of exposed rats, as compared to the sham-exposed group (Figure 3).

Discussion

Indirect immunocytochemistry on paraffin-embedded skin sections was used to monitor Hsc70, Hsp25, and Hsp70 expression in hairless rat skin. All Hsps showed a specific constitutive expression pattern in normal epidermis. These patterns were affected in UVB-exposed epidermis, while no change in HSP expression was detected after single (2 hours, 5 W/kg) or chronic exposure (2 hours/day, 5 days/week, 12 weeks, 2.5 W/kg or 5 W/kg) to GSM-900 or GSM-1800.

Other published data on rodent skin exposed to RFR were contradictory. Our group (Masuda et al 2006; Sanchez et al 2006) previously reported that no inflammatory process or cell over-proliferation occurred in skin after exposure conditions similar to those used in this work. In a Korean study, mobile phone signals (849 or 1763 MHz) did not promote tumor development in the skin of mice with DMBA-induced tumors (Huang et al 2005). However, in other studies (Ayata et al 2004; Ozguner et al 2004) 10-day GSM-900 exposure induced various changes in rat skin, such as an increase in the thickness of the *stratum corneum*, atrophy of the epidermis, basal cell and capillary proliferation, and separation of collagen bundles in the dermis. However, these latter reports did not give details of the exposure system and dosimetry, the blind character of the experiments, and the relevance of using eye scoring in the hematoxylin-eosin assay. The conclusions of these authors on cutaneous damage are, thus, not well-founded as other histological techniques would have been necessary to support their conclusions, e.g., Paraformaldehyde Acid Schiff (PAS) labeling, specific to collagen, and fillagrin localization and structure.

Few studies have described experiments on skin and on HSP expression. However, our data on HSP expression *in vivo* following exposure to RFR are in agreement with other *in vivo* results, such as those of the Lee group (Lee et al 2005). These authors showed that subchronic exposure of hsp70.1-deficient mice to 849 or 1763 MHz RFR (2x45 min. at 15

min intervals, 5 days/week, 10 weeks, at 0.4 W/kg) did not alter HSP expression, in all their histological assays, although these transgenic mice are known to be particularly sensitive to stress agents.

An earlier study of hsp70 expression at the mRNA and protein levels in the brains of rats exposed to a GSM-900 signal at levels ranging from 0.3 to 7.5 W/kg (Fritze et al 1997) only detected changes in mRNA levels at the highest SAR.

The threshold for HSP induction in mammalian tissue may thus range from 5 to 7.5 W/kg. Other works used non-mammalian animal models: In *C. Elegans*, previous findings reported an increase in hsp16 levels when these nematodes were exposed overnight to 750 MHz RFR at an estimated SAR of 0.001 W/kg (Daniells et al 1998; de Pomerai et al 2000). These effects were not reproduced in a recent work by the same group and the authors concluded that they were probably caused by a temperature increase (Dawe et al 2006). In drosophila, a 10-hour exposure to GSM signals (multiband 900 and 1900 MHz, estimated SAR of 1.4 W/kg) showed increased HSP RNA [Weisbrot et al., 2003]. However, the experiments used genuine mobile phones and no robust dosimetry was described, making this work difficult to interpret.

In summary, there are few *in vivo* experiments studying the effects of RFR signals, such as those emitted in mobile telephony, on HSPs in skin. This work on HSP expression did not detect any acute or accumulative induction of stress response in the skin of hairless rats after exposure to either GSM-900 or GSM-1800 at local SARs up to 5 W/kg. Obviously, further research into the *in vivo* effects of low-level RFR on HSP expression is warranted.

Moreover, as emerging new wireless signals use higher frequencies, from 1800 to 2450 MHz, RFR absorption is becoming increasingly superficial. The skin is, therefore, an important experimental model for investigating the biological effects of these signals.

Acknowledgements:

This work was supported by France Telecom R & D, under grant 01-1B, the CNRS and the Aquitaine Research Council.

References

- Ayata A, Mollaoglu H, Yilmaz HR, Akturk O, Ozguner F, Altuntas I. 2004. Oxidative stress-mediated skin damage in an experimental mobile phone model can be prevented by melatonin. *J Dermatol* 31: 878-883.
- Boone AN, Vijayan MM. 2002. Constitutive heat shock protein 70 (HSC70) expression in rainbow trout hepatocytes: effect of heat shock and heavy metal exposure. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 132: 223-233.
- Capri M, Scarcella E, Bianchi E, et al. 2004. 1800 MHz radiofrequency (mobile phones, different Global System for Mobile communication modulations) does not affect apoptosis and heat shock protein 70 level in peripheral blood mononuclear cells from young and old donors. *Int J Radiat Biol* 80: 389-397.
- Caraglia M, Marra M, Mancinelli F, et al. 2005. Electromagnetic fields at mobile phone frequency induce apoptosis and inactivation of the multi-chaperone complex in human epidermoid cancer cells. *J Cell Physiol* 204: 539-548.
- Connell P, Ballinger CA, Jiang J, Wu Y, Thompson LJ, Hohfeld J, Patterson C. 2001. The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat Cell Biol* 3: 93-96.
- Daniells C, Duce I, Thomas D, Sewell P, Tattersall J, de Pomerai D. 1998. Transgenic nematodes as biomonitors of microwave-induced stress. *Mutat Res* 399: 55-64.
- Dawe AS, Smith B, Thomas DW, Greedy S, Vasic N, Gregory A, Loader B, de Pomerai DI. 2006. A small temperature rise may contribute towards the apparent induction by microwaves of heat-shock gene expression in the nematode *Caenorhabditis Elegans*. *Bioelectromagnetics* 27: 88-97.
- de Pomerai D, Daniells C, David H, et al. 2000. Non-thermal heat-shock response to microwaves. *Nature* 405: 417-418.

Deane EE, Woo NY. 2006. Impact of heavy metals and organochlorines on hsp70 and hsc70 gene expression in black sea bream fibroblasts. *Aquat Toxicol* 79: 9-15.

Di Carlo A, White N, Guo F, Garrett P, Litovitz T. 2002. Chronic electromagnetic field exposure decreases HSP70 levels and lowers cytoprotection. *J Cell Biochem* 84: 447-454.

Dillmann WH. 1999. Heat shock proteins and protection against ischemic injury. *Infect Dis Obstet Gynecol* 7: 55-57.

Fritze K, Wiessner C, Kuster N, Sommer C, Gass P, Hermann DM, Kiessling M, Hossmann KA. 1997. Effect of global system for mobile communication microwave exposure on the genomic response of the rat brain. *Neuroscience* 81: 627-639.

Gilchrest BA, Park HY, Eller MS, Yaar M. 1996. Mechanisms of ultraviolet light-induced pigmentation. *Photochem Photobiol* 63: 1-10.

Gupta RS. 1990. Microtubules, mitochondria, and molecular chaperones: a new hypothesis for in vivo assembly of microtubules. *Biochem Cell Biol* 68: 1352-1363.

Hirose H, Sakuma N, Kaji N, Nakayama K, Inoue K, Sekijima M, Nojima T, Miyakoshi J. 2006. Mobile phone base station-emitted radiation does not induce phosphorylation of Hsp27. *Bioelectromagnetics*

Huang TQ, Lee JS, Kim TH, Pack JK, Jang JJ, Seo JS. 2005. Effect of radiofrequency radiation exposure on mouse skin tumorigenesis initiated by 7,12-dimethylbenz[alpha]anthracene. *Int J Radiat Biol* 81: 861-867.

Jonak C, Metze D, Traupe H, Happle R, Konig A, Trautinger F. 2005. The expression of the 27-kd heat shock protein in keratinization disorders: an immunohistological study. *Hum Pathol* 36: 686-693.

Keshvari J, Lang S. 2005. Comparison of radio frequency energy absorption in ear and eye region of children and adults at 900, 1800 and 2450 MHz. *Phys Med Biol* 50: 4355-4369.

Kowal-Vern A, Goral J, Gamelli RL, McGill V, Clancy J. 2000. hsp70, hsp32, and grp78 are increased in thermally injured skin with and without antithrombin(human) concentrate infusion. *J Burn Care Rehabil* 21: 213-219.

Kwon SB, Young C, Kim DS, et al. 2002. Impaired repair ability of hsp70.1 KO mouse after UVB irradiation. *J Dermatol Sci* 28: 144-151.

Lantow M, Lupke M, Frahm J, Mattsson MO, Kuster N, Simko M. 2006a. ROS release and Hsp70 expression after exposure to 1,800 MHz radiofrequency electromagnetic fields in primary human monocytes and lymphocytes. *Radiat Environ Biophys* 45: 55-62.

Lantow M, Schuderer J, Hartwig C, Simko M. 2006b. Free radical release and HSP70 expression in two human immune-relevant cell lines after exposure to 1800 MHz radiofrequency radiation. *Radiat Res* 165: 88-94.

Laplante AF, Moulin V, Auger FA, Landry J, Li H, Morrow G, Tanguay RM, Germain L. 1998. Expression of heat shock proteins in mouse skin during wound healing. *J Histochem Cytochem* 46: 1291-1301.

Lee JS, Huang TQ, Kim TH, Kim JY, Kim HJ, Pack JK, Seo JS. 2006. Radiofrequency radiation does not induce stress response in human T-lymphocytes and rat primary astrocytes. *Bioelectromagnetics* 27: 578-588.

Lee JS, Huang TQ, Lee JJ, Pack JK, Jang JJ, Seo JS. 2005. Subchronic exposure of hsp70.1-deficient mice to radiofrequency radiation. *Int J Radiat Biol* 81: 781-792.

Lepock JR. 2005. How do cells respond to their thermal environment? *Int J Hyperthermia* 21: 681-687.

Leszczynski D, Joenvaara S, Reivinen J, Kuokka R. 2002. Non-thermal activation of the hsp27/p38MAPK stress pathway by mobile phone radiation in human endothelial cells: molecular mechanism for cancer- and blood-brain barrier-related effects. *Differentiation* 70: 120-129.

Leveque P, Dale C, Veyret B, Wiart J. 2004. Dosimetric analysis of a local exposure system for rat operating at 900 MHz. *Institute of Electrical and Electronics Engineers Transactions on Microwave Theory and Techniques* 52: 2067-2075.

Lim HB, Cook GG, Barker AT, Coulton LA. 2005. Effect of 900 MHz electromagnetic fields on nonthermal induction of heat-shock proteins in human leukocytes. *Radiat Res* 163: 45-52.

Marques C, Guo W, Pereira P, Taylor A, Patterson C, Evans PC, Shang F. 2006. The triage of damaged proteins: degradation by the ubiquitin-proteasome pathway or repair by molecular chaperones. *Faseb J* 20: 741-743.

Massey A, Kiffin R, Cuervo AM. 2004. Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 2420-2434.

Massey AC, Zhang C, Cuervo AM. 2006. Chaperone-mediated autophagy in aging and disease. *Curr Top Dev Biol* 73: 205-235.

Masuda h, Sanchez S, Dulou P, Haro E, Anane R, Billaudel B, Lévêque P, Veyret B. 2006. Effect of GSM-900 and -1800 signals on the skin of hairless rats. I: 2-hour acute exposures. *Int J Radiat Biol* 82: 669-674.

Maytin EV. 1992. Differential effects of heat shock and UVB light upon stress protein expression in epidermal keratinocytes. *J Biol Chem* 267: 23189-23196.

Mehlen P, Preville X, Chareyron P, Briolay J, Klemenz R, Arrigo AP. 1995. Constitutive expression of human hsp27, Drosophila hsp27, or human alpha B-crystallin confers resistance to TNF- and oxidative stress-induced cytotoxicity in stably transfected murine L929 fibroblasts. *J Immunol* 154: 363-374.

Miyakoshi J, Takemasa K, Takashima Y, Ding GR, Hirose H, Koyama S. 2005. Effects of exposure to a 1950 MHz radio frequency field on expression of Hsp70 and Hsp27 in human glioma cells. *Bioelectromagnetics* 26: 251-257.

- Moseley P. 2000. Stress proteins and the immune response. *Immunopharmacology* 48: 299-302.
- Multhoff G. 2006. Heat shock proteins in immunity. *Handb Exp Pharmacol* 279-304.
- Nollen EA, Morimoto RI. 2002. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *J Cell Sci* 115: 2809-2816.
- Nordlind K. 2002. Expression of heat shock proteins in heavy metal-provoked inflamed human skin. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 24: 383-394.
- O'Neill DE, Noble EG. 2004. Constitutive expression of inducible Hsp70 is linked to natural shifts in skeletal muscle phenotype. *Acta Physiol Scand* 181: 35-41.
- Ozguner F, Aydin G, Mollaoglu H, Gokalp O, Koyu A, Cesur G. 2004. Prevention of mobile phone induced skin tissue changes by melatonin in rat: an experimental study. *Toxicol Ind Health* 20: 133-139.
- Sanchez S, Masuda H, Dulou P, Haro E, Anane R, Billaudel B, Lévêque P, Veyret B. 2006. Effect of GSM-900 and -1800 signals on the skin of hairless rats. II: 12-week chronic exposures. *Int J Radiat Biol* 82: 675-680.
- Sun Y, MacRae TH. 2005. Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function. *Cell Mol Life Sci* 62: 2460-2476.
- Urbanski A, Schwarz T, Neuner P, Krutmann J, Kirnbauer R, Kock A, Luger TA. 1990. Ultraviolet light induces increased circulating interleukin-6 in humans. *J Invest Dermatol* 94: 808-811.
- Virador VM, Muller J, Wu X, et al. 2002. Influence of alpha-melanocyte-stimulating hormone and ultraviolet radiation on the transfer of melanosomes to keratinocytes. *Faseb J* 16: 105-107.
- Walsh LJ. 1995. Ultraviolet B irradiation of skin induces mast cell degranulation and release of tumour necrosis factor-alpha. *Immunol Cell Biol* 73: 226-233.

Wang J, Koyama S, Komatsubara Y, Suzuki Y, Taki M, Miyakoshi J. 2006. Effects of a 2450 MHz high-frequency electromagnetic field with a wide range of SARs on the induction of heat-shock proteins in A172 cells. *Bioelectromagnetics* 27: 479-486.

Yenari MA, Liu J, Zheng Z, Vexler ZS, Lee JE, Giffard RG. 2005. Antiapoptotic and anti-inflammatory mechanisms of heat-shock protein protection. *Ann N Y Acad Sci* 1053: 74-83.

Figure 1:

Pattern of Hsc70, Hsp25, and Hsp70 expression in the epidermis of hairless rats after a 2-hour acute exposure to GSM-900 or GSM-1800. UVB single exposure (400 mJ/cm²) was done on positive control rats.

Length of bar = 50 μm.

Figure 2:

Acute exposure of hairless rats to GSM-900 and GSM-1800: comparison among groups. HSP expression is expressed as percentage of UVB positive control. Data are presented as mean of 8 animals per group ± SEM.

Figure 3:

Chronic exposure of hairless rats to GSM-900 or GSM-1800: comparison among groups. HSP expression was expressed as percentage of UVB positive control. Data are presented as mean of 8 animals per group ± SEM.

Figure 1

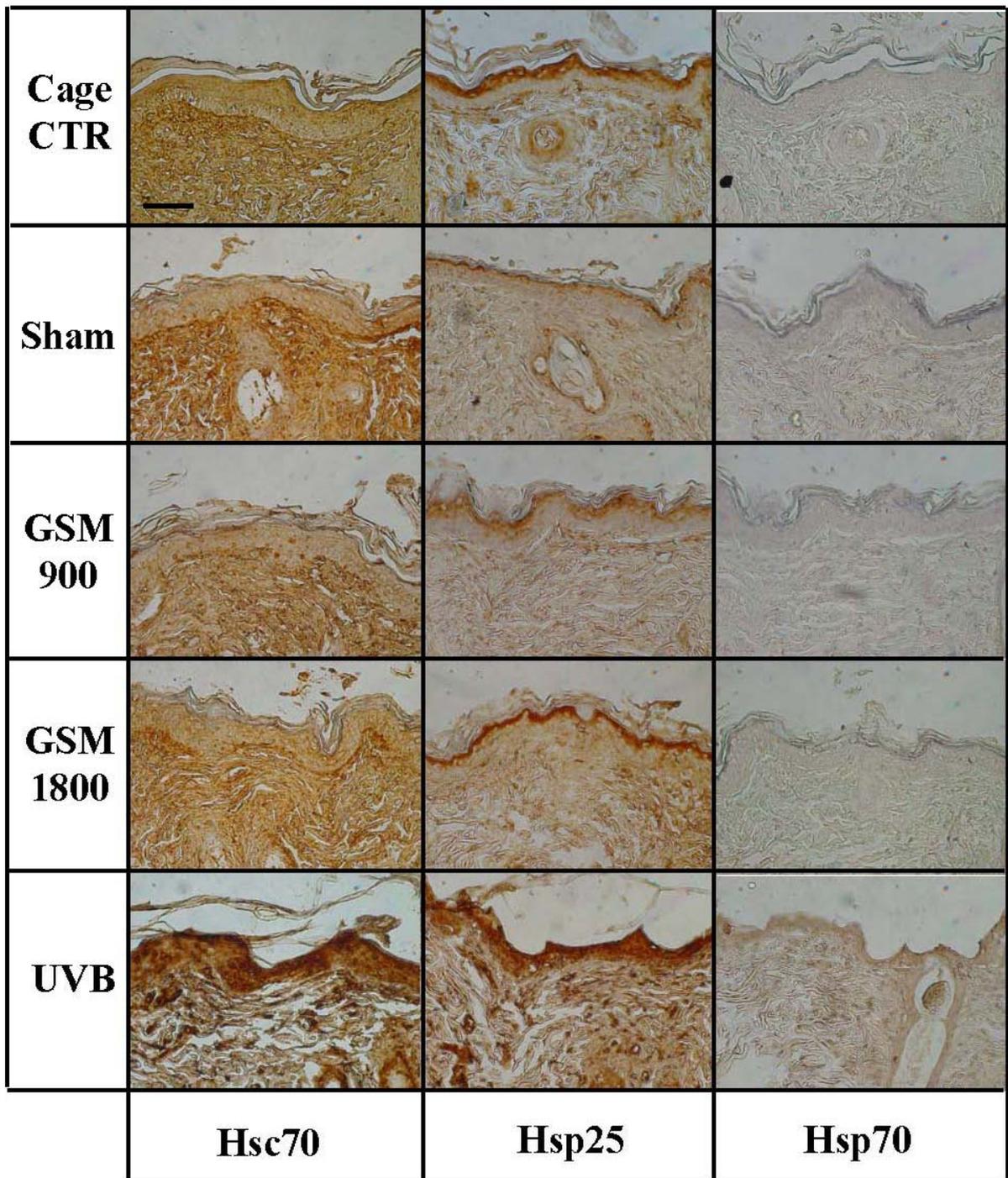


Figure 2

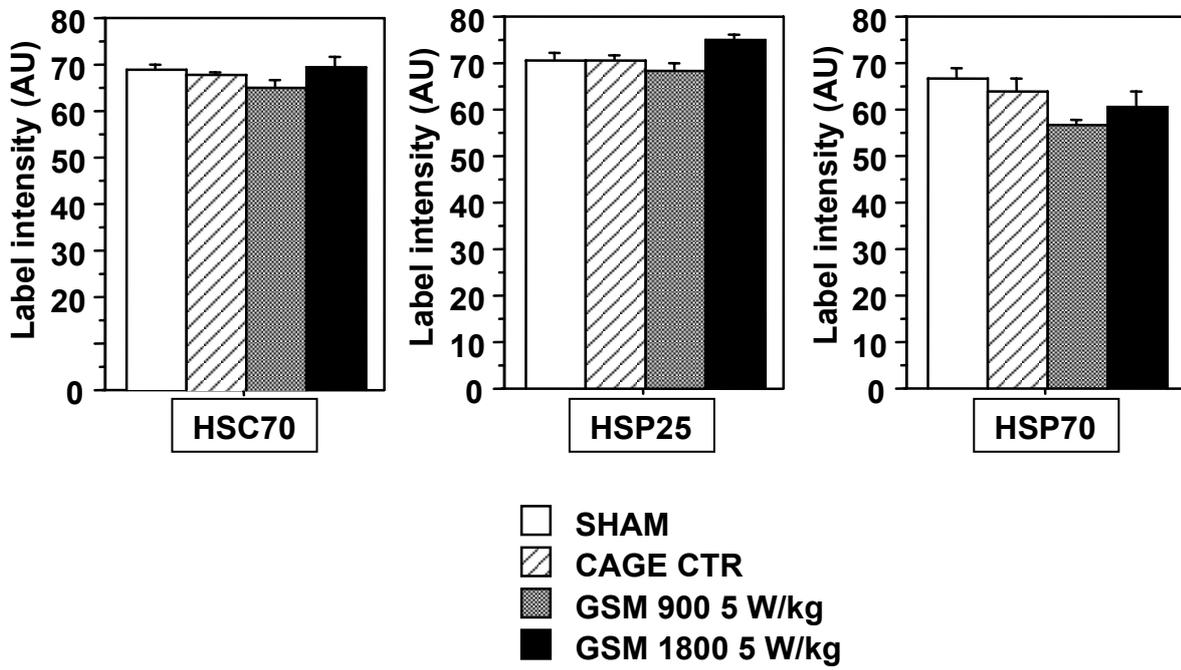
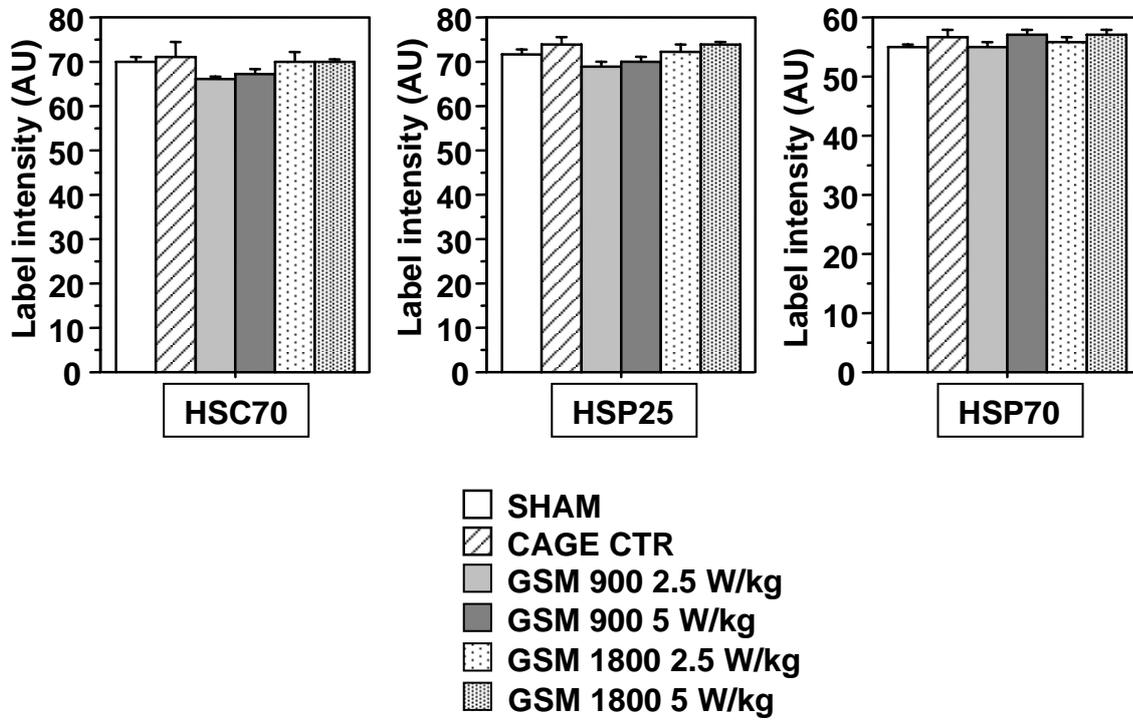


Figure 3



ARTICLE 7 : No genotoxic effects of UMTS mobile phone signals on Sprague-Dawley rat brains

SANCHEZ S., LAGROYE I., POULLETIER DE GANNES F., HARO E., BILLAUDEL B., AND VEYRET B..

No genotoxic effects of UMTS mobile phone signals on Sprague-Dawley rat brains.

Radiation Research, soumis

L'article 7 traite des effets génotoxiques sur le cerveau de rats Sprague Dawley d'une exposition aigue au signal UMTS. Les conditions d'exposition étudiées sont 2 heures d'exposition continue aux DAS de 2.5 ou 13 W/kg. La génotoxicité a été étudiée par le biais de cassures à l'ADN sur un homogénat cérébral. La génotoxicité a été évaluée par le test alcalin de comètes qui détecte les cassures simples et doubles brins de l'ADN. La mise en évidence de lésions sérieuses de l'ADN in vivo a été réalisée par le biais d'un traitement chimique d'animaux à l'Ethyl Methyl Sulfonate. Les paramètres de lésion ont été mesurés grâce au logiciel CometScore.

No genotoxic effects of UMTS mobile phone signals on Sprague-Dawley rat brains

Sanchez, S., Poullotier de Gannes, F., Haro, E., Billaudel, B., Veyret, B. and Lagroye, I.

University of Bordeaux 1, Physics of Wave-Matter Interaction (PIOM) laboratory, EPHE
Bioelectromagnetics Laboratory, Pessac, France

Corresponding author:

Sandrine SANCHEZ

Physics of Wave-Matter Interaction (PIOM) Laboratory
ENSCP

16 avenue Pey-Berland
F-33607 PESSAC CEDEX
FRANCE

Phone: +33 5 40 00 69 65

Fax: +33 5 40 00 66 31

E-mail address: s.sanchez@enscpb.fr

Running Title:

DNA damage in UMTS exposed rat brains

Sanchez, S., Poullotier de Gannes, F., Haro, E., Billaudel, B., Veyret, B. and Lagroye, I. No genotoxic effects of UMTS mobile phone signals on Sprague-Dawley rat brains. *Radiat.Res.*

The biological effects of the new UMTS (Universal Mobile Telecommunications System) mobile telephony signal were investigated in light of reports of non-thermal effects on the brain of animals exposed to radiofrequency field radiation (RFR). We thus performed *in vivo* experiments using male Sprague-Dawley rats and the well-characterized loop-antenna exposure system, at specific absorption rates (SAR) of 0, 2.5, and 13.0 W/kg (average brain SAR) at 1960 MHz. Animals were acutely exposed for 2 hours and immediately sacrificed. Positive controls were obtained using ethyl-methyl sulfonate (EMS). DNA damage was analyzed on homogenates of entire brain using the alkaline comet assay. There was no increase in the amount of DNA damage in rat brain cells exposed to UMTS at all SAR levels.

Introduction:

In view of the proximity of mobile phones to the head, a number of studies have been performed on the non thermal effects of radiofrequency radiation (RFR) on rodent brains.

The Salford group reported increases in blood-brain barrier (BBB) permeability in the brains of rats exposed to 900 MHz RFR with an SAR threshold as low as 0.002 (1, 2).

However, other authors reported much higher thresholds (e.g., 7.5 W/kg, 3). For instance, no alteration of BBB was observed in rat or mouse brains after GSM-900 exposure(4-6).

At the molecular level, in the central nervous system (CNS), exposure to 2.45 GHz RFR resulted in depressed protein kinase C activities in rat brain cells (7) and a selective decrease in GABA in the Purkinje cell layer after exposure to pulsed RFR at 900 MHz (8). However, no behavioral alteration was observed in these animals. Structural and genomic changes have been reported in the brain and testes of rats exposed at 2.45 GHz (9). Genotoxic effects, measured using the comet assay, have also been reported in the brain cells of rats exposed to low-level 2.45 GHz RFR (10). However, these findings have not been reproduced (11).

Genotoxicity of mobile-phone-related RFR has mainly been investigated using *in vitro* systems. To date, no data have been published on the genotoxic effects of exposure to UMTS signals. We thus report here on the potential genotoxic effects of low-level UMTS exposure in Sprague-Dawley rat brain cells after *in vivo* exposure. DNA damage was assessed using the alkaline comet assay.

Material and methods:

All chemicals were purchased from Sigma (Saint-Louis, MI, USA).

Animals:

All recommendations of the CNRS regarding animal care and handling were followed.

Animal housing conditions

Male Sprague-Dawley rats were purchased from Janvier (Le Genest-St-Isle, France).

Animals were received at 4 weeks old, placed randomly in cages with a maximum of 4 animals per cage, with food and drink *ad libitum* (UAR 04, SAFE, Augy, France). The cages were stored in the animal facility at $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ with a light period of 12 hours from 7 am to 7 pm. Upon receipt, rats were kept for one week before the start of the experiment. Each experimental group (RFR and sham exposed) consisted of 15 rats with 8 rats in the positive control and cage control groups.

Habituation

The animals were gradually habituated to the exposure system over one week (restrain rockets, see below) from 15 minutes to 2 hours per day.

Rats were exposed when 6 weeks old.

Experiments

Exposure system

As shown in figure 1, the exposure setup consisted of a Plexiglass contention rocket where the rat was placed to ensure more accurate dosimetry of the exposure. A loop antenna was placed over the rat head.

The 1960 MHz UMTS signal was produced using a GUS 6960S generator (University of Wuppertal, Wuppertal, Germany) coupled to a 14002600-10 amplifier (RFPA S.A., Artigues-près-Bordeaux, France). In the sham-exposure condition, animals were placed in rockets without the antenna. RFR and sham exposure took place in the same anechoic chamber to

avoid interference from the external environment. The setups were placed a sufficient distance apart to avoid inter-antenna interference.

Dosimetry

The brain-average SAR (BASAR) was determined in the following way: temperatures were measured on a gel phantom using a Vitek thermistor probe. An SAR value of 6.0 ± 0.6 W/kg/W was derived at a specific reference location inside the gel (on the axis of the rocket, 13 mm from the inner wall, under the loop antenna). In parallel, FDTD calculations were carried out on a homogeneous phantom at the point of reference (10.9 ± 0.5 W/kg/W). This was used to calibrate the numerical SAR determination. Finally, the FDTD approach was used on a 7-tissue numerical phantom to derive the BASAR. This process gave a BASAR of 7.9 ± 1.6 W/kg/W.

Exposure conditions

Absorption of RFR by the tissues is expressed as the Specific Absorption Rate (SAR), in W/kg. In this study, three SAR levels were tested: 0, 2.5, and 13.0 W/kg. Animals were exposed to the UMTS signal for 2 hours. Exposure was blind (coded animals). Immediately after exposure, the animals were ethically sacrificed.

Positive control

Ethyl methyl sulfonate (EMS) was used to induce DNA damage in rat brains . A single 250 mg/kg dose was injected i.p. and the animals were ethically sacrificed 30 minutes after injection.

Brain extraction and sample preparation

After exposure or chemical treatment, animals were anesthetized under 2% isoflurane (v/v air) for up to 5 minutes, then guillotined and the entire brain removed. To remove red blood cells, brains were thoroughly washed with an excess of ice-cold PBS without calcium or magnesium, containing 200 mM of N-1-butyl-a-phenylnitrone. The tissues were immersed in PBS and minced quickly into approximately 1-mm³ pieces, using a TissuePress™ (BioSpec Product, Inc., Bartlesville, OK, USA) (12). After washing four more times in PBS, the pieces were dispersed into a single-cell suspension using a 5-ml pipette in a 50 ml polypropylene centrifuge tube containing 5 ml ice-cold PBS. The cell dispersion was then filtered using a 40 µm cell trainer.

Alkaline comet assay

DNA damage in the brain cells, especially single-strand breaks, was detected using the alkaline comet assay, according to the manufacturer's instructions (R&D System, Abingdon, United Kingdom).

A small volume (10 µl) of the brain-cell suspension was mixed with 0.2 ml 1% Low Melting Point agarose, maintained at 37°C, and 80 µl of this mixture was pipetted onto two Trevigen® CometSlides™ (R&D System, Abingdon, United Kingdom), i.e., on the two circled clear areas. Slides were placed in an ice-cold steel tray at 4°C, in the dark, for 20 min to allow the agarose to gel. They were then immersed in an ice-cold lysing solution (2.5 M NaCl, 1% sodium N-lauroyl sarcosinate, 100 mM EDTA, 10 mM Tris base, and 1% Triton-X 100, pH 10) for one hour. Then, slides were washed with distilled water and placed in alkaline buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA pH 10, pH>13) at room temperature in the dark for 30 minutes for DNA unwinding. They were then put on the horizontal slab of an electrophoretic assembly. One liter of electrophoretic buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA pH 8, pH >13)

was gently poured into the assembly to cover the slides (about 6 mm above the surface). DNA migration took place at 4°C, 300 mA and 1 Volt/cm for 30 minutes. The slides were then washed with distilled water and placed in 70° alcohol for 5 minutes. Finally, they were dried at room temperature in the dark and stored until analysis. For the comet analysis, slides were rehydrated with a solution containing 5% sucrose, 10 mM NaHPO₄, and 5% DMSO for 10 minutes and stained with 1 μM YOYO-1 (Molecular Probes, Invitrogen, Cergy Pontoise, France). At this step, some samples were lost due to agarose gel detachment during electrophoresis. Consequently data are reported for 14 to 15 experimental animals and 7 to 8 cage control and positive control rats. A hundred pictures were taken per sample and each picture was analyzed using CometScore™ software. For each animal, at least 100 comets were analyzed for two comet parameters: the percentage DNA in the tail and the Olive moment. The Olive moment is expressed in arbitrary units (AU) and is the sum of the tail intensity profile values multiplied by their relative distances to the head center, divided by total comet intensity. The mean was calculated for each animal and parameter. All data are represented on histograms as mean ± standard error for each experimental group.

Statistical analysis:

Once the analyses were completed, samples were decoded. The non parametric Mann-Whitney unpaired test was used for statistical analysis.

Results

DNA single-strand breaks were assessed using the alkaline comet assay. All results are summarized in Figure 2.

The percentages of DNA in the comet tail (2A) were $1.43 \pm 0.38\%$ in cage-control rats and $0.98 \pm 0.23\%$ in sham-exposed rats. The Olive moment data (2B) confirmed those obtained with the DNA tail percentage: 0.53 ± 0.15 AU and 0.36 ± 0.11 AU in the cage-control and sham-exposed groups, respectively.

A 2-hour exposure at 2.6 W/kg did not increase the DNA tail percentage ($1.1 \pm 0.26\%$) or the Olive moment (0.42 ± 0.12 AU) in either the sham-exposed or cage-control groups. However, at 13.0 W/kg, a non-statistically significant increase in both comet parameters was observed: hence, the percentage of DNA in the comets tail was $2.39 \pm 0.72\%$ and the Olive moment was 1.0 ± 0.32 AU. In contrast, our positive control groups treated with EMS (250 mg/kg) showed a significant increase in both parameters: $3.1 \pm 1.48\%$ DNA tail percentage ($p=0.037$) and 1.36 ± 0.71 Olive moment in the EMS group ($p=0.021$).

Discussion

Several publications have addressed the *in vitro* and *in vivo* genotoxic effects of RFR.

It is indeed valid to consider *in vivo* data together with *in vitro* results concerning RFR effects on the brain. For instance, Cemeli et al, comparing the responses of cells freshly dissociated from mouse brain and cultured brain cells (primary and cell line astrocytes), concluded that oxidative DNA damage was similar in both models (13).

An *in vitro* work on U87MG brain cells (human glioblastoma cells) showed that exposure to 2.45-GHz RFR at 0.6 W/kg for up to 24 hours did not induce any DNA damage (14, 15). More recently, no evidence was found of damage to gene expression in U87MG cells following exposure to 1.9-GHz pulse-modulated RFR at 0.1, 1.0, and 10.0 W/kg for 4 h

(16). These *in vitro* data on brain cells support the conclusion that RFR in the 900-2450 MHz range has no genotoxic effects.

Lai et al demonstrated that a 2-hour exposure to pulsed or continuous 2.45-GHz signals at 1.2 W/kg induced single- and double-strand breaks in the DNA of rat brain cells up to 4 hours after exposure (17, 18). However, a later study failed to confirm these findings (11).

Higashikubo et al implanted Fischer 344 rats with various concentrations of 9L gliosarcoma cells and exposed them to 835.62 MHz frequency-modulated continuous wave (FMCW) and 847.74 MHz code division multiple access (CDMA) signals (19). The progression of brain tumors was not affected under those conditions.

Most of the recent studies have reported negative findings. Lagroye et al. reported no DNA damage in rat brain cells following 2-hour exposures of rats to 2450 MHz pulsed microwaves at 1.2 W/kg (20). Verschaeve et al., administered 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX), a mutagen and carcinogen, to rats and whole-body exposed them to GSM-900 (0.3 and 0.9 W/kg) for 2 years (21). No synergistic action of long-term exposure to RFR was observed on MX genotoxicity in rat brains. All these data are in agreement with rodent bioassays demonstrating the non-carcinogenicity or/and -cocarcinogenicity of low level RFR (Adey et al, 1999, 2000; Zook and Simmens 2001, Dasenbrock for review 2005) However, a 35-day exposure to 2.45 to 16.5 GHz signals at power densities of 0.34 and 1.0 mW/cm² was found to induce DNA single-strand breaks in rat brain cells (22). The reason for this discrepancy remains unclear.

In this study, we report on the genotoxic effects of exposure to UMTS mobile telephony signals in the brain cells of Sprague-Dawley rats, exposed locally for 2 hours at two SAR levels: 2.5 and 13 W/kg. Using the alkaline comet assay, we found no difference between

exposed and sham-exposed groups in terms of percentage of DNA in the comet tail or the Olive moment, while these comet parameters increased in the chemical positive controls. However, a doubling of DNA damage in the brain cells was noted at 13 W/kg. Although this increase was not significant, it may indicate that a threshold was reached, possibly related to a superficial temperature increase. It is difficult to compare our results with others, but we concluded that UMTS signals did not have any detectable genotoxic effects on rat brain cells following in vivo exposure up to 13 W/kg.

References

1. L. G. Salford, A. Brun, K. Sturesson, J. L. Eberhardt and B. R. Persson, Permeability of the blood-brain barrier induced by 915 MHz electromagnetic radiation, continuous wave and modulated at 8, 16, 50, and 200 Hz. *Microsc Res Tech* **27**, 535-542 (1994).
2. L. G. Salford, A. E. Brun, J. L. Eberhardt, L. Malmgren and B. R. Persson, Nerve cell damage in mammalian brain after exposure to microwaves from GSM mobile phones. *Environ Health Perspect* **111**, 881-883; discussion A408 (2003).
3. K. Fritze, C. Sommer, B. Schmitz, G. Mies, K. A. Hossmann, M. Kiessling and C. Wiessner, Effect of global system for mobile communication (GSM) microwave exposure on blood-brain barrier permeability in rat. *Acta Neuropathol (Berl)* **94**, 465-470 (1997).
4. B. Cosquer, A. P. Vasconcelos, J. Frohlich and J. C. Cassel, Blood-brain barrier and electromagnetic fields: effects of scopolamine methylbromide on working memory after whole-body exposure to 2.45 GHz microwaves in rats. *Behav Brain Res* **161**, 229-237 (2005).
5. J. W. Finnie, P. C. Blumbergs, J. Manavis, T. D. Utteridge, V. Gebiski, R. A. Davies, B. Vernon-Roberts and T. R. Kuchel, Effect of long-term mobile communication microwave exposure on vascular permeability in mouse brain. *Pathology* **34**, 344-347 (2002).
6. J. W. Finnie, P. C. Blumbergs, J. Manavis, T. D. Utteridge, V. Gebiski, J. G. Swift, B. Vernon-Roberts and T. R. Kuchel, Effect of global system for mobile communication (gsm)-like radiofrequency fields on vascular permeability in mouse brain. *Pathology* **33**, 338-340 (2001).
7. R. Paulraj and J. Behari, Radio frequency radiation effects on protein kinase C activity in rats' brain. *Mutat Res* **545**, 127-130 (2004).

8. A. L. Mausset, R. de Seze, F. Montpeyrroux and A. Privat, Effects of radiofrequency exposure on the GABAergic system in the rat cerebellum: clues from semi-quantitative immunohistochemistry. *Brain Res* **912**, 33-46 (2001).
9. S. Sarkar, S. Ali and J. Behari, Effect of low power microwave on the mouse genome: a direct DNA analysis. *Mutat Res* **320**, 141-147 (1994).
10. H. Lai and N. P. Singh, Melatonin and a spin-trap compound block radiofrequency electromagnetic radiation-induced DNA strand breaks in rat brain cells. *Bioelectromagnetics* **18**, 446-454 (1997).
11. R. S. Malyapa, E. W. Ahern, C. Bi, W. L. Straube, M. LaRegina, W. F. Pickard and J. L. Roti Roti, DNA damage in rat brain cells after in vivo exposure to 2450 MHz electromagnetic radiation and various methods of euthanasia. *Radiat Res* **149**, 637-645 (1998).
12. N. Singh and H. Lai, 60 Hz magnetic field exposure induces DNA crosslinks in rat brain cells. *Mutat Res* **400**, 313-320 (1998).
13. E. Cemeli, I. F. Smith, C. Peers, J. Urenjak, O. V. Godukhin, T. P. Obrenovitch and D. Anderson, Oxygen-induced DNA damage in freshly isolated brain cells compared with cultured astrocytes in the Comet assay. *Teratog Carcinog Mutagen Suppl* **2**, 43-52 (2003).
14. R. S. Malyapa, E. W. Ahern, W. L. Straube, E. G. Moros, W. F. Pickard and J. L. Roti Roti, Measurement of DNA damage after exposure to electromagnetic radiation in the cellular phone communication frequency band (835.62 and 847.74 MHz). *Radiat Res* **148**, 618-627 (1997).
15. R. S. Malyapa, E. W. Ahern, W. L. Straube, E. G. Moros, W. F. Pickard and J. L. Roti Roti, Measurement of DNA damage after exposure to 2450 MHz electromagnetic radiation. *Radiat Res* **148**, 608-617 (1997).

16. S. S. Qutob, V. Chauhan, P. V. Bellier, C. L. Yauk, G. R. Douglas, L. Berndt, A. Williams, G. B. Gajda, E. Lemay, et al., Microarray gene expression profiling of a human glioblastoma cell line exposed in vitro to a 1.9 GHz pulse-modulated radiofrequency field. *Radiat Res* **165**, 636-644 (2006).
17. H. Lai and N. P. Singh, Acute low-intensity microwave exposure increases DNA single-strand breaks in rat brain cells. *Bioelectromagnetics* **16**, 207-210 (1995).
18. H. Lai and N. P. Singh, Single- and double-strand DNA breaks in rat brain cells after acute exposure to radiofrequency electromagnetic radiation. *Int J Radiat Biol* **69**, 513-521 (1996).
19. R. Higashikubo, V. O. Culbreth, D. R. Spitz, M. C. LaRegina, W. F. Pickard, W. L. Straube, E. G. Moros and J. L. Roti, Radiofrequency electromagnetic fields have no effect on the in vivo proliferation of the 9L brain tumor. *Radiat Res* **152**, 665-671 (1999).
20. I. Lagroye, R. Anane, B. A. Wettring, E. G. Moros, W. L. Straube, M. Laregina, M. Niehoff, W. F. Pickard, J. Baty and J. L. Roti, Measurement of DNA damage after acute exposure to pulsed-wave 2450 MHz microwaves in rat brain cells by two alkaline comet assay methods. *Int J Radiat Biol* **80**, 11-20 (2004).
21. L. Verschaeve, P. Heikkinen, G. Verheyen, U. Van Gorp, F. Boonen, F. Vander Plaetse, A. Maes, T. Kumlin, J. Maki-Paakkanen, et al., Investigation of co-genotoxic effects of radiofrequency electromagnetic fields in vivo. *Radiat Res* **165**, 598-607 (2006).
22. R. Paulraj and J. Behari, Single strand DNA breaks in rat brain cells exposed to microwave radiation. *Mutat Res* **596**, 76-80 (2006).

Figure 1

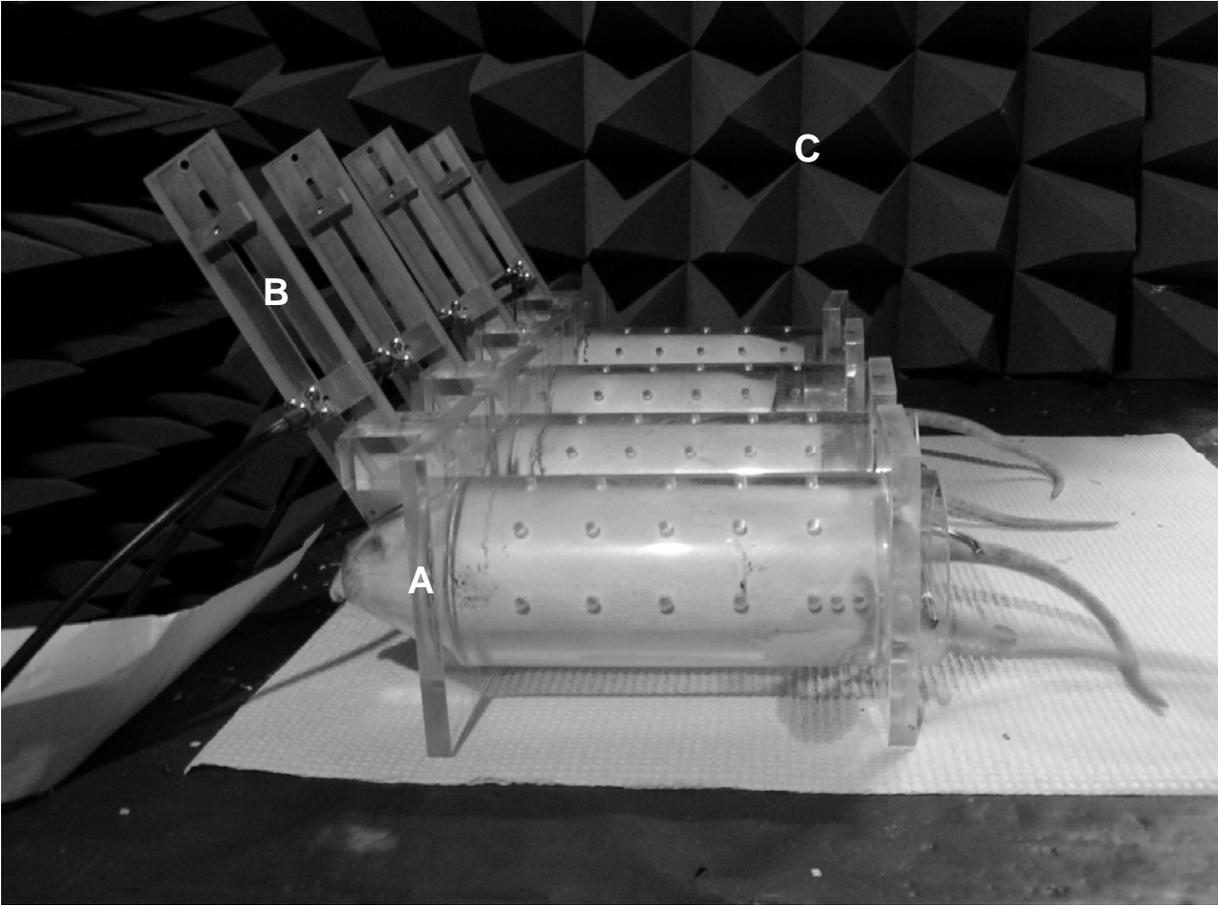


Figure 2

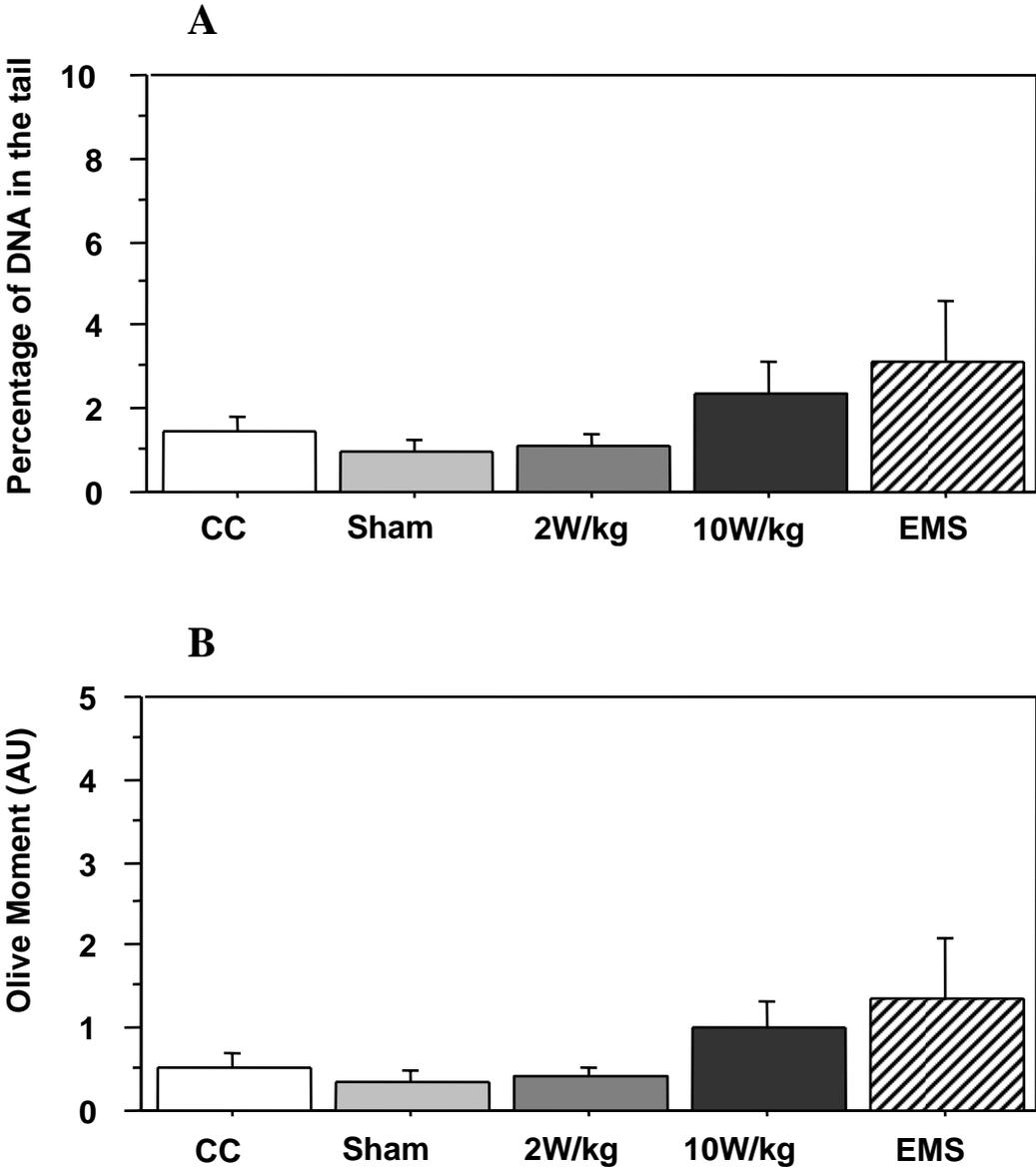


Figure 1:

UMTS exposure system. It consists of a Plexiglass contention rocket (A) coupled to a loop antenna (B). All rockets were placed in an anechoic chamber (C).

Figure 2:

DNA damage in Sprague-Dawley rat brains following 2-hour exposure to UMTS signals. A minimum of 100 comets were analyzed for each animal. The mean was calculated from the percentage of DNA in the tail and the Olive moment.

A represents the mean (\pm standard error) of the percentage DNA in the tail in a given group. B represents the mean (\pm standard error) of the Olive moment measured in comets in a given group. Cage control: 8 animals, Sham-exposed: 14 animals, UMTS 2.6 W/kg: 15 animals, UMTS 13.0 W/kg: 14 animals, and ethyl methyl sulfonate (EMS): 7 animals.

Résumé

L'étude d'induction de stress cellulaire dans la peau ou dans le système nerveux central lors d'une exposition continue unique ou chronique aux signaux GSM-900, GSM-1800 ou UMTS a été réalisée sur 2 souches de rats. Pour une meilleure lisibilité, les données résultant de l'étude sont présentées dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Résumé de l'étude du stress cellulaire induit par les signaux GSM-900, GSM-1800 et UMTS *in vivo* dans la peau ou le système nerveux central. Les cases jaunes représentent les résultats significatifs ($p < 0,05$), les cases contenant "ns" représentent des résultats non significatifs.

Signaux étudiés →		GSM-900			GSM-1800			UMTS	
Souche	Paramètre étudié	Unique 5 W/kg	Chronique 2,5 W/kg	Chronique 5 W/kg	Unique 5 W/kg	Chronique 2,5 W/kg	Chronique 5 W/kg	Unique 2 W/kg	unique 10 W/kg
Hairless	Epaisseur épiderme	ns	ns	ns	ns	ns	ns		
	Filaggrine, Elastine, Collagène	ns	ns	ns	ns	ns	ns		
	Prolifération cellulaire	ns	ns	ns	ns	ns	ns		
	HSP	ns	ns	ns	ns	ns	ns		
Sprague-Dawley	Cassure ADN							ns	ns

Il est donc ressorti de cette étude *in vivo* que les signaux GSM-900 et GSM-1800 n'induisaient pas de stress cellulaire dans la peau des rats Hairless, que ce soit en condition d'exposition unique de 2 heures ou en condition chronique avec des expositions répétées de 2 heures par jour sur 5 jours consécutifs par semaine et sur une durée totale de 12 semaines. Dans cette étude, différents DAS ont été étudiés : de 0 W/kg pour la condition de référence plus communément appelée SHAM, en passant par 2,5 W/kg qui représente un DAS tout juste supérieur à la norme supérieure d'exposition locale pour le public, et jusqu'à 5 W/kg pour les signaux GSM qui sont les doses les plus élevées établies au laboratoire.

L'étude des lésions de l'ADN réalisée sur le cerveau de rats Sprague-Dawley a montré que le nouveau signal de téléphonie UMTS n'était pas inducteur de cassures simples brins à la dose de 2 W/kg et sur un temps d'exposition de 2 heures. Les expériences réalisées à 10 W/kg (dose la plus élevée établie au laboratoire) n'ont pas montré d'effet génotoxique significatif

de l'UMTS, mais il faut noter une forte tendance à l'augmentation du pourcentage d'ADN endommagé.

Chapitre 4 : Discussion et conclusion générale - Perspectives

- *Partie 1 - Discussion*

Etat des lieux en fin de projet :

La téléphonie mobile a subi un essor considérable depuis sa commercialisation dans le grand public. La fréquence des signaux n'a fait qu'augmenter afin de donner de plus grandes fonctions aux communications : de la simple communication « voix » à la communication visuelle ainsi que l'accès internet. Les signaux couramment utilisés à ce jour sont les signaux GSM (900 et 1800 MHz), le signal EDGE (1800 MHz), l'UMTS (2000 MHz) pour la téléphonie mobile européenne. Cette augmentation en fréquence entraîne une pénétration moindre des ondes dans les tissus et favorise donc une absorption plus superficielle par l'organisme soumis à cette émission. Nous avons donc focalisé nos recherches sur le modèle de peau qui est l'organe cible majeur des radiofréquences de la téléphonie mobile. Ce modèle, bien connu pour ses réponses au stress d'une exposition aux rayons ultraviolets, nous a permis d'étudier différentes étapes de la réponse au stress :

- (i) l'expression des principales protéines cutanées (filaggrine, collagène et élastine), ainsi que des HSP, à la prolifération cellulaire et la mesure de l'inflammation cellulaire, dans un modèle cellulaire 3D d'épiderme humain et *in vivo* dans l'épiderme de rats Hairless,
- (ii) l'expression de protéines de choc thermique (HSP) aux cassures simples brins de l'ADN et jusqu'à la mort cellulaire, dans des modèles cellulaires.

La peau : cible des radiofréquences issues de la téléphonie mobile ?

Les deux signaux GSM-900 et GSM-1800 ont été étudiés aux DAS de 0 - 2 - 2,5 - 5 W/kg, sur des durées d'exposition de 1 à 48 heures *in vitro* (articles 1, 2, 3) ou de 2 heures à 12 semaines (à raison de 2 heures par jour) *in vivo* (articles 4, 5 et 6).

La majorité de nos expériences a montré l'absence de réponse de stress ou d'effet génotoxique dans les modèles cutanés après exposition aux radiofréquences. Les différents paramètres mesurés, pertinents vis-à-vis du stress cellulaire, nous ont donc amené à infirmer notre

hypothèse de départ où l'on associait les radiofréquences à un facteur de stress similaire à celui des rayonnements ultraviolets.

Nos recherches nous ont cependant permis d'observer des différences de comportement cellulaire après exposition au GSM-900 (article 1). Nous avons notamment observé (i) une diminution d'expression d'Hsc70 dans les fibroblastes primaires humains NHDFe, non retrouvée dans les fibroblastes primaires humains NHDFc, et (ii) une augmentation d'expression d'Hsp70 dans les épidermes reconstruits avec des kératinocytes humains uniquement, à 3 et 5 semaines de culture, non retrouvée dans les kératinocytes en monocouche. Ces différences obtenues *in vitro* n'ont pas été retrouvées *in vivo* dans les épidermes de rats Hairless, que ce soit en condition d'exposition unique ou chronique (article 4).

Dans nos conditions d'expérimentations, aucune différence de comportement, n'a été notée dans nos divers modèles cutanés exposés au signal GSM-1800, que ce soit *in vitro* (articles 2 et 3) ou *in vivo* (article 4 à 6).

Peu d'études à ce jour concernent les effets des RF sur la peau et, surtout, aucune n'associe des travaux *in vitro* à des travaux *in vivo* réalisés au sein d'un même laboratoire.

Les seuls travaux concernant la peau et la téléphonie mobile *in vitro* portent sur des fibroblastes (Li et al. 1999; Pacini et al. 2002; Desta et al. 2003; Diem et al. 2005). Ainsi, un signal à 837 MHz, à un DAS de 0,9 ou 9,0 W/kg n'induit pas de variation d'expression du suppresseur de tumeur TP53 dans des fibroblastes normaux humains (Li et al. 1999) et l'activité de l'ornithine décarboxylase n'est pas affectée dans des fibroblastes L929 de souris exposés à un signal à 835 MHz et à des DAS allant à 1 W/kg à 15 W/kg (Desta et al. 2003). En revanche, des changements dans l'expression génique, la prolifération et dans la morphologie de fibroblastes dermiques humains ont été montrés après une exposition au GSM-900 à un DAS de 0,6 W/kg (Pacini et al. 2002). Enfin, des cassures simple(s) ou double(s) brin(s) de l'ADN ont été observées dans des fibroblastes diploïdes humains après une exposition continue ou intermittente au signal GSM-1800 à des DAS n'excédant pas 2 W/kg (Diem et al. 2005). Nos résultats contredisent ces dernières observations, de même que les données récemment publiées par un groupe allemand (Speit et al. 2006).

Les études *in vivo* sur la peau sont, quant à elles, plus nombreuses et variées.

Sur le rat ou la souris, elles ont porté soit sur l'impact sur la peau uniquement, soit sur un effet de type inducteur ou promoteur tumoral ou génotoxique (Heikkinen et al. 2003; Ayata et al. 2004; Ozguner et al. 2004; Gorlitz et al. 2005 ; articles 4 et 5).

Nos travaux n'ont montré aucune variation d'expression de filaggrine, d'élastine ou de collagène dans la peau de rats Hairless exposés de façon aiguë ou chronique aux signaux GSM-900 ou GSM-1800. De plus, aucune prolifération cellulaire excessive ou inflammation cellulaire n'a été observée (articles 4 et 5). En revanche, deux travaux turcs ont montré qu'un signal GSM-900 à un DAS de 2 W/kg était capable d'induire chez le rat Wistar, après 10 jours d'exposition, une augmentation de l'épaisseur du *stratum corneum*, une atrophie de l'épiderme, une papillomatose, une prolifération cellulaire basale, une fibrose et de la peroxydation lipidique et, enfin, la mélatonine permettait d'inhiber tous ces phénomènes (Ozguner et al. 2004; Ayata et al. 2004). Cependant, l'absence de dosimétrie, d'animaux sham-exposés, et la mesure des différents paramètres histologiques à l'œil sur des coupes non spécifiquement colorées à l'hématoxyline-éosine, affaiblissent la portée de ces travaux.

D'autre part, il a été montré qu'une exposition aux signaux DAMPS (pour Digital Advanced Mobile Phone System) ou GSM au DAS de 0,5 W/kg ne favorisait pas la genèse de tumeurs dans la peau de souris normales ou transgéniques pour le gène de l'ornithine décarboxylase (Heikkinen et al. 2003). Enfin, après exposition de 1 ou 6 semaines de souris B6C3F1 aux signaux GSM-900 ou DCS1800 à des DAS pouvant atteindre 33 W/kg, aucune lésion génotoxique n'a été mise en évidence dans des kératinocytes de queue de souris (Gorlitz et al. 2005).

En plus des études animales, quelques travaux cliniques sur l'homme ont été réalisés sur interactions téléphonie mobile et peau. Ainsi des études ont été réalisées en se focalisant sur l'activité électro-dermique, la vasodilatation locale, la facilitation d'apparition de plaques allergiques chez des individus allergiques à la poussière et/ou au pollen de cèdre, ou encore le développement de plaques eczémateuses ou dermatitiques chez les individus sujets à ces maladies de peau (Paredi et al. 2001; Kimata 2002, 2003, 2004; Esen and Esen 2006). Les cas de syndrome atopique de type eczéma/dermatite sont considérés comme dépendant du stress psychologique de l'individu, puisque la plupart des crises sont constatées en état de stress (Kimata 2002, 2003, 2004). Il a été montré dans ces études que les radiofréquences de la téléphone mobile, tout comme les jeux vidéos, favorisaient ces crises. L'activité électro-dermique a été étudiée pendant une communication téléphonique, afin de constater les

activités neuronales associées dans le système nerveux central et de conclure sur les risques d'affection des fonctions motrices et donc des réflexes moteurs, notamment lors de la conduite d'un véhicule (Eses and Esen, 2006). Enfin, le signal GSM-900 induit une augmentation de température dans la peau qui est accompagnée d'une vasodilatation au niveau du nez (Paredi et al 2001).

En conclusion, peu de comparaisons peuvent être faites, puisque chaque publication utilise une condition, un signal et un modèle différents.

Deux groupes (turc : Ozguner et al 2004; Ayata et al 2004; et français : Masuda et al, 2006 ; Sanchez et al, 2006) ont montré des résultats totalement opposés sur les paramètres histologiques de la peau après exposition au signal GSM-900, et il semble difficile de donner une conclusion claire à ce jour. Il est important cependant de rappeler que, comparé au GSM-900, une exposition au signal GSM-1800 entraîne une absorption du DAS plus superficielle et expose donc davantage la peau (Keshvari and Lang 2005). Or, dans nos expériences *in vivo*, nous n'avons pas obtenu de différence lorsque les animaux étaient exposés au GSM-900 ou au GSM-1800. De plus, nous avons utilisé un niveau de DAS deux fois supérieur à celui utilisé par les chercheurs turcs.

Enfin, les effets génotoxiques du GSM-1800 sur des fibroblastes primaires humains démontrés par un groupe autrichien (Diem et al 2005) n'ont pas pu être reproduits dans deux laboratoires différents, y compris le nôtre.

A la lueur de ces résultats, il semble raisonnable de conclure que les radiofréquences des signaux GSM-900 ou -1800 ne sont pas inducteurs de stress cellulaire pour la peau normale, que ce soit *in vivo* ou *in vitro*.

Le système nerveux central: cible des radiofréquences issues de la téléphonie sans fil ?

Le deuxième modèle mis en œuvre a concerné le système nerveux central (SNC). Le SNC a fait très souvent l'objet de travaux de recherche puisqu'il représente, avec la peau, l'une des cibles des radiofréquences de la téléphonie mobile. Dans notre projet, nous avons utilisé un modèle cellulaire, avec des cellules de neuroblastome humain SH-SY5Y et cellules microgliales humaines transformées CHME-5, ainsi que le modèle animal de rats Sprague-Dawley.

Deux signaux GSM-1800 et UMTS (1970 MHz) ont été étudiés aux DAS respectifs de 0 – 2,5 – 5 et de 0 – 2 – 10 W/kg, sur des durées pouvant varier de 1 à 48 heures *in vitro* (article 3) et de 2 heures *in vivo* (article 7).

Nos expériences nous ont permis de conclure à l'absence d'effet génotoxique significatif dans les modèles de SNC après exposition aux radiofréquences (dans les conditions pré-citées). L'absence de cassures à l'ADN, pertinent vis-à-vis du stress cellulaire, nous a donc amené à infirmer notre hypothèse de départ où l'on associait les radiofréquences issues de GSM-1800 ou UMTS à des facteurs de stress au niveau du SNC.

Des publications existent sur l'étude d'effets biologiques sur le cerveau du signal GSM-1800, qui a précédé l'UMTS (Franke et al. 2005a; Xu et al. 2006). Ainsi, il a été démontré qu'une exposition chronique au GSM-1800 de 15 minutes par jour sur 8 jours au DAS de 2 ou 4 W/kg pouvait réduire l'activité excitatrice synaptique, ainsi que le nombre de synapses dans des neurones primaires hippocampiques de rat *in vitro* (Xu et al. 2006). Par ailleurs, des cellules de la barrière hémato-encéphalique de porc ne montrent pas d'altération au niveau de la fonction de barrière lors d'une exposition continue de 1 à 5 jours au DAS de 0,3 W/kg (Franke et al. 2005a).

Les autres publications sur le signal GSM-1800 sont quant à elles plus diversifiées : ainsi on trouve des études *in vitro* sur des lymphocytes (d'Ambrosio et al. 2002 ; Capri et al. 2004) qui, une fois exposés (à 2 ou 5 W/kg) ne présentent pas de cassure à l'ADN, ni de variation d'expression d'Hsp70 ou encore d'induction d'apoptose. Des expérimentations sur des myocytes exposés jusqu'à 880 W/kg, ne présentent pas de dysfonctionnement des paramètres électrophysiologiques étudiés (potentiel d'action, flux calcique, etc.) (Linz et al. 1999). Des cellules souches (Czyz et al. 2004) ont également été exposées dans des travaux étudiant les effets du GSM-1800 sur la différenciation cellulaire et le cycle cellulaire et n'ont pas montré d'affection, sous signal continu ou mode voix. On notera également les résultats sur des glandes pinéales isolées, (Sukhotina et al. 2006) exposées jusqu'à 2,7 W/kg pendant 7 heures au signal modulé GSM-1800 ou non, où la production de mélatonine n'est augmentée qu'à faible DAS (800 mW/kg), avec une variation dépendante du signal à fort DAS. Hormis cette dernière étude, il semblerait que le GSM-1800 ne soit pas délétère, mais il reste cependant à éclaircir ces résultats par des répliques.

Deux publications hongroises récentes sur un modèle de souris (Forgacs et al. 2005; Forgacs et al. 2006) ont cependant montré des effets consécutifs à des expositions de 2 heures, répétées 10 fois sur 2 semaines, au GSM-1800 à des DAS de 0.018-0.023 W/kg. Une augmentation du taux de testostérone sanguin ainsi que de l'hématocrite a été observée, mais sans effet sur les organes.

Des études chez l'homme ont également été réalisées principalement sur l'impact du signal GSM-1800 sur les implants de pacemakers ou encore de stimulateurs cérébraux (Geller et al. 2001; Trigano et al. 2005) et ont conclu qu'il n'y avait aucun risque direct. Les auteurs préfèrent cependant se référer au principe de précaution qui précise que le téléphone doit être tenu le plus éloigné possible de l'implant. Une autre étude portant sur les processus de mémorisation chez la femme (Hinrichs and Heinze 2004) n'a rapporté qu'un changement de latence au niveau de l'encodage des informations (test de reconnaissance de mots précédemment présentés et mélangés avec des mots nouveaux) sans répercussions sur le comportement.

Les travaux sur les effets biologiques de l'UMTS sont moins nombreux. A ce jour, en effet, seulement deux articles ont été publiés. L'un concerne une étude sur la perception visuelle chez l'homme (Schmid et al. 2005), et l'autre concerne un modèle de barrière hémato-encéphalique (BHE) *in vitro* (Franke et al. 2005b).

Le travail sur les perceptions visuelles chez l'homme a testé deux conditions d'exposition, l'une dite élevée (DAS de 0,37 W/kg) et l'autre faible (DAS de 0,037 W/kg). Sur la base de quatre tests reconnus en diagnostic clinique, répétés trois fois, les auteurs montrent que la chaîne comprenant la perception visuelle, et les processus cérébraux n'est pas affectée.

Les travaux *in vitro* sur la BHE ont permis de montrer qu'une exposition de 84 heures au DAS de 1,8 W/kg n'affectait pas la morphologie des cellules endothéliales micro-vasculaires de cerveau de porc, PBEC, ni les jonctions serrées (Occludine et ZO1) ou les processus de transport au travers de la barrière.

À ce jour, il n'apparaît donc pas, malgré la faible quantité de données, que le signal de troisième génération UMTS soit nocif pour l'organisme, et, d'après nos résultats, qu'il soit génotoxique sur le cerveau de rat. Cependant, nous avons pu constater qu'un DAS de 10 W/kg paraissait être la limite de génotoxicité pour le signal UMTS. En effet, bien que non

statistiquement significatifs, les lésions de l'ADN mesurées dans le cerveau des rats à ce niveau de DAS se rapprochaient des valeurs obtenues avec l'EMS. Un DAS de 10 W/kg étant une valeur 5 fois plus importante que celle recommandée en exposition locale pour le public, il est rassurant que cette limite soit éloignée mais il faut rappeler que l' « effet critique » est situé à 100 W/kg.

En conclusion, nos travaux *in vitro* et *in vivo* (articles 3 et 5) sur les lésions génotoxiques dans le système nerveux central après une exposition au GSM-1800 ou à l'UMTS sont originaux. Ils permettent de compléter les autres travaux, notamment en précisant qu'à la norme d'exposition locale pour le public de 2 W/kg, aucune lésion de l'ADN n'a été induite, en condition d'exposition aiguë ou chronique sur des cellules nerveuses humaines en culture ou d'exposition unique dans le cerveau du rat Sprague-Dawley.

Les HSPs et les RF

De Pomerai et al. ont montré que chez des vers nématodes du genre *Caenorhabditis elegans* transfectés avec une construction comprenant un promoteur du gène Hsp16, une exposition de dix-huit heures à des radiofréquences de 750 MHz à 0,001 W/kg, augmentait l'expression de cette protéine (de Pomerai et al. 2000). Pour comparaison, l'amplitude de cette réponse était similaire à celle obtenue pour une augmentation de température de 3°C, et ce, en l'absence d'échauffement dans les conditions d'exposition. Une réplique réalisée par la même équipe a finalement infirmé leurs précédents résultats, en constatant une augmentation de température due au système d'exposition et causant les observations au niveau protéique (Dawe et al, 2006)

Par ailleurs, Leszczynski et son équipe ont récemment publié (Leszczynski et al. 2002) sur les effets d'un signal GSM-900, à un DAS de 2 W/kg sur des cellules endothéliales d'origine humaine Ea.hy-926. Après une heure d'exposition, le profil de l'expression protéique était modifié, avec des augmentations, diminutions, apparitions ou disparitions de diverses protéines. Parmi les protéines dont l'expression était augmentée, Hsp 27 fut identifiée. De plus, la phosphorylation des protéines était sensiblement affectée. Dans le cas d'Hsp 27, l'exposition aux RF entraînait une augmentation de la forme phosphorylée, ce qui correspond à son activation. En revanche, aucun effet d'une exposition RF similaire n'a pu être mis en évidence sur l'apoptose de ces cellules ou leur cycle cellulaire, paramètres sur lesquels Hsp 27 phosphorylée est susceptible d'agir. Néanmoins, dans cette étude, la présence

probable de gradients de température au cours de l'exposition, du fait de l'utilisation de la thermostatisation du système, pourrait être à l'origine des effets observés. A l'encontre de ces résultats viennent ceux des travaux de Poulletier de Gannes (BEMS meeting, Washington, 2004) qui, en répliquant ces expériences avec les mêmes cellules, n'a pas retrouvé les effets sur Hsp27. A ce jour, l'équipe de Leszczynski a poursuivi leurs expérimentations avec Ea.hy-926 et ont poussé leurs analyses en protéomique et génomique, et ont également obtenus des effets à ces niveaux (Nylund and Leszczynski, 2004 ; Nylund and Leszczynski, 2006). Ils ont cependant étudié les effets du GSM-900 sur deux souches de Ea.hy-926 différentes génétiquement et ont constaté que les variations observées dans l'une n'étaient pas répliquées dans l'autre et que donc la composante génomique et protéomique était importante à considérer.

D'autres études portant sur la détection d'apoptose dans des cellules nerveuses humaines SH-SY5Y (Joubert et al, 2006), n'ont pas décelé de variation de mort cellulaire suite à une exposition au GSM-900.

A ces résultats viennent s'ajouter nos travaux qui confirment l'absence d'apoptose et de cassures simples brins à l'ADN (articles 1 à 3 et 6 et 7) dans les cellules cutanées et nerveuses après exposition aux signaux GSM-900, GSM-1800 et UMTS. Dans la plupart des modèles étudiés, l'expression des HSPs n'a pas été affectée à la suite de l'exposition RF, exception faite pour les fibroblastes humains dermiques isolés dans notre laboratoire et les épidermes reconstruits, chez qui Hsc70 et Hsp70 ont été affectés. Ces variations d'expression, dépendantes du mode de culture cellulaire, semblent correspondre à une adaptation cellulaire aux conditions d'exposition aux RF, dont l'amplitude n'atteint pas celle des effets des UV.

Il semble donc difficile à ce jour de conclure sur le pouvoir stressant des radiofréquences issues de la téléphonie mobile et notamment du signal GSM-900, bien que la majorité des données sur l'induction de réponse cellulaire au stress soient négatives.

Méthodes de toxicologie en bio-électromagnétisme

La littérature en bio-électromagnétisme est riche d'études *in vitro*, notamment ciblant des types cellulaires d'organes cibles spécifiques et de défense immunitaire. On trouve ainsi de nombreuses d'études utilisant des cellules nerveuses, telles neuroblastomes, astrocytes primaires, etc., ainsi que des cellules fibroblastiques... mais aussi des cellules lymphocytaires, des macrophages, etc. D'un autre côté, de nombreux travaux *in vivo* ont

impliqué des animaux normaux ou transgéniques : des rats, des souris, des porcs. Il existe finalement une grande diversité de modèles *in vitro* et *in vivo* et le choix de cibler des fonctions vitales (i.e. cerveau et système immunitaire) est volontaire et pertinent. Depuis longtemps les chercheurs ont tenté de travailler avec des modèles animaux ou cellulaires pertinents, pour comprendre les différents mécanismes engagés dans telle ou telle maladie ou dans tel ou tel processus physiologique ou du développement et notamment en recherche fondamentale.

En bio-électromagnétisme, les travaux de recherche sont quant à eux appliqués aux champs électromagnétiques et par conséquent le but premier est de comprendre l'action des RF sur le modèle considéré pour savoir si les ondes peuvent modifier un modèle sain ou pathologique. Le choix du modèle semble donc important.

Choix des modèles cellulaires

Nous avons noté des différences d'état basal entre cellules primaires mais aussi entre cellules primaires et lignées cellulaires. Ainsi, en fonction du milieu de culture, des cellules primaires d'une même origine peuvent avoir un état homéostatique différent ; de plus, le vieillissement précoce des cellules primaires (différenciation et mort cellulaire) en comparaison aux lignées cellulaires (immortelles) est un paramètre important à prendre en compte notamment lorsqu'il s'agit de génotoxicité. Nombreux, sont les travaux qui présentent des différences dépendant de l'origine cellulaire : cellules normales, primaires, transformées ou immortalisées, lignées de cellules, cellules tumorales.

Un énoncé non exhaustif de travaux *in vitro* montre à quel point l'utilisation de modèles cellulaires peut être utile en recherche fondamentale, mais reste très controversée lorsque l'on parle de toxicité.

Comparaison *in vivo/in vitro*

On notera tout d'abord, que certains modèles cellulaires primaires sont en adéquation avec leurs homologues *in vivo* ; ainsi des macrophages péritonéaux de poulet répondent de façon identique à un choc thermique que ce soit *in vitro* ou *in vivo* (Miller and Qureshi 1992). De la même manière, des cellules immortalisées de la thyroïde HTori3 répondent au stress

d'hyperthermie, tout comme le font les cellules primaires issues du même organe (Youde et al. 1998).

Les modèles en trois dimensions, notamment d'épiderme, sont de bons modèles cellulaires et très proches du modèle vivant. La recherche sur l'élaboration de modèles susceptibles de remplacer les études animales, voire cliniques par des études *in vitro*, est grandissante dans ce domaine de la dermatologie, et des modèles complexes permettant l'étude de la pigmentation ont vu le jour (Bessou et al. 1995; Limat et al. 1999; Cario-Andre et al. 2000; Duval et al. 2001; Duval et al. 2002), de même que des modèles permettant d'étudier l'immunité cutanée (Regnier et al. 1997; Facy et al. 2005). On notera ainsi que des modèles d'épidermes reconstruits avec des kératinocytes et fibroblastes présentent des réponses identiques aux rayonnements UV que la peau *in vivo*. Il en est de même avec des modèles constitués de kératinocytes, mélanocytes et cellules de Langerhans (Duval et al. 2003) qui peuvent par conséquent être utilisés pour l'évaluation d'écrans solaires et autres études de toxicité (Faller et al. 2002 ; Ponc 2002). Cependant, il est important de préciser que ces modèles sont réalisés avec des cellules primaires et que des tentatives de reconstruction avec des lignées cellulaires ne se comportent pas comme leurs sœurs primaires (Lee et al. 2001).

Cas des cellules transformées

L'immortalisation des cellules n'est pas un processus anodin. En effet, on notera tout d'abord que ce processus, principalement utilisé pour immortaliser une souche cellulaire, est aussi utilisé couramment pour sur-exprimer une protéine et mieux comprendre ainsi son rôle au sein d'une cellule. Il peut, cependant, entraîner des comportements cellulaires différents de la cellule originelle en plus de la sur-expression voulue initialement.

La discussion ci-dessous porte en particulier sur l'influence de l'immortalisation sur l'expression des protéines de choc thermique.

Omar and Lanks (1984) ont montré qu'à la suite d'un choc thermique, des cellules d'embryons de souris transformées au Simian Virus-40 (SV-40) exprimaient plus fortement les protéines de stress, Hsp70 et Hsp85, que les cellules non-transformées, de même qu'en condition non stressante. Cependant, les cellules transformées mouraient plus rapidement que les autres à la suite du choc thermique. Cette faculté à mourir a été explicitée une dizaine d'années plus tard par une redistribution cytoplasmique plus rapide des HSPs nucléaires en « post-choc », induisant une protection diminuée dans le temps du noyau et donc du métabolisme cellulaire (Fabre-Jonca et al. 1995).

L'augmentation de la synthèse des HSPs est également plus rapide dans les cellules transformées (Richter and Issinger 1986; Fabre-Jonca et al. 1995). L'expression des protéines de stress peut à l'inverse, être moindre que dans les cellules normales. En effet, on peut constater une diminution voire aucune variation d'expression dans des cellules transformées. Ainsi, la phosphorylation et la synthèse de la protéine ribosomale S6 sont augmentées dans des fibroblastes ainsi que dans des cellules primaires tumorales humaines après addition de TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate), alors que les mêmes cellules transformées à l'aide du virus SV-40 ne voient ni le niveau basal ni la phosphorylation de S6 augmenter (Rance et al. 1985). Il en est de même pour l'expression et la phosphorylation de Hsp27 de fibroblastes transformés (Sakaguchi et al. 2001).

Des cellules fraîchement prélevées ou cultivées, humaines et de singe, provenant du réseau trabéculaire (zone cible du glaucome) transformées à l'aide du SV-40 voient leur expression constitutive d'alpha B-crystalline s'annuler en condition non stressante en comparaison avec leurs homologues non transformées, avec une infime synthèse après choc thermique (Tamm et al. 1996).

Selon le stress, les réponses sont aussi divergentes. Ainsi des fibroblastes 3T3 (Borghetti et al. 1986) transformés ne répondent pas si le stress induit est hyper-osmolaire alors que les cellules non transformées expriment une réponse au stress.

D'autres caractéristiques cellulaires propres aux cellules transformées ont été constatées, notamment, le changement morphologique en réponse à un stress (Rance et al. 1985 ; Richter and Issinger 1986). Des différences plus subtiles existent comme des variations de structure, comme dans le cas de la protéine Hsp68 qui est modifiée dans les astrocytes transformés de rat. Pour preuve, l'anticorps reconnaissant l'Hsp68 (qui est celui d'Hsp70) des cellules transformées reconnaît celui des cellules non transformées, alors que l'inverse n'est pas vrai (Nishimura et al. 1992).

La transformation permet également d'entraîner des variations génétiques. Ainsi, des cellules issues d'embryons de souris Balb-c présentent, à plusieurs stades de développement, certains gènes qui ne sont plus exprimés dès le 18^{ème} jour de gestation, alors que des cellules transformées (par SV-40 ou polyome) provenant d'espèces variées dont la souris, présentent une réactivation de ce pool de gènes qui est identique dans des cellules humaines, de Hamster, de rat ou de singe (Gerhards and Mehnert 1986).

À la vue de ces différences entre cellules « normales » et « transformées », on peut se poser la question de savoir si les effets que l'on peut obtenir sur telle ou telle lignée cellulaire transformée sont pertinents quand on parle d'effet toxique et de santé publique.

D'autres travaux sur des lignées de même origine, comme celles provenant de mélanomes, ne réagissent pas toutes de la même façon face au stress. Ceci a été montré en comparant les réponses de lignées humaines et murines face à un stress alcoolique, de température ou chimique (Mattei et al. 1986). L'expression des protéines de stress est donc dépendante du stress inducteur mais aussi du contenu génétique des cellules. Ceci a été confirmé, dix ans plus tard, en comparant les réponses au choc thermique de plusieurs lignées mélanomateuses humaines (Delpino et al. 1996). On comprend aisément les difficultés rencontrées pour la recherche de molécules anti-cancéreuses.

Une autre caractéristique des cellules tumorales (qui sont par essence des cellules immortalisées) a été récemment découverte. Il s'est avéré que les tumeurs exprimaient certes un pool de HSPs en réponse à un stress tout comme les cellules normales — et la plupart du temps de façon constitutive, les rendant résistantes aux traitements anti-cancéreux — mais qu'il existait également une expression membranaire d'Hsp72 spécifique de ces cellules tumorales et non retrouvée dans des cellules primaires ou transformées (Multhoff et al. 1995).

En conclusion, il est difficile de considérer, dans les études de toxicité, la réponse d'un type cellulaire comme représentative du comportement des cellules d'un organisme entier et de prétendre ensuite extrapoler à la santé. En toxicologie "classique", ce sont des batteries de tests qui sont utilisées, avec différents types cellulaires et différents tests.

Radiofréquences et types cellulaires

En se penchant sur les différents travaux *in vitro* portant sur les effets délétères cellulaires dus aux signaux de téléphonie mobile, on se rend compte que la plupart ont utilisé des lignées cellulaires et une seule des cellules transformées. Ainsi, nous pouvons citer Velizarov et al (Velizarov et al. 1999) qui trouvaient que le signal GSM à 960 MHz induisait une variation dans la prolifération cellulaire de la lignée transformée épithéliale de l'amnios (AMA). D'autres travaux comme ceux de l'équipe de Leszczynski (Leszczynski et al. 2002; Nylund and Leszczynski 2006) ont obtenu des variations d'ordre génomique et protéomique dans une lignée endothéliale Ea.hy926 exposée au signal GSM-900. Ces cellules sont en fait un hybride

de cellules humaines endothéliales de veine ombilicale avec la lignée humaine A549 hypotriploïde avec un nombre de chromosomes modaux de 12 (Edgell et al. 1983). Dans le cas de cette lignée, l'origine cellulaire ne correspond pas à un environnement *in vivo*, mais, par contre, elle est un très bon modèle sur-exprimant l'antigène du facteur VIII impliqué dans les processus de coagulation sanguine. Est-il alors raisonnable et justifié d'extrapoler, comme le montre la Figure 28, la capacité d'un signal GSM-900 à induire la phosphorylation et l'expression (20%) transitoire d'Hsp27 dans ces cellules endothéliales humaines (ne présentant pas les caractéristiques de la BHE), à sa capacité à altérer la BHE et induire des cancers (Leszczynski et al. 2002) ?

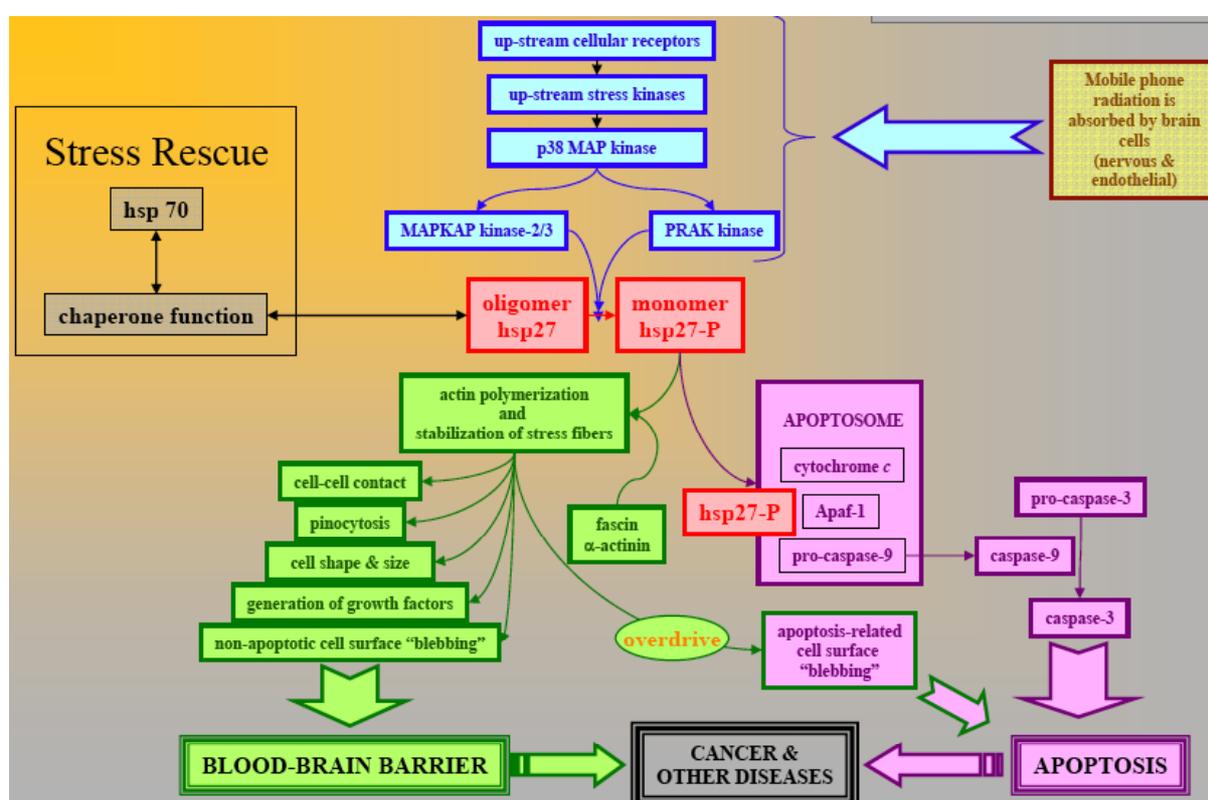


Figure 28 : Extrapolation, à partir de l'augmentation de l'expression et de la phosphorylation d'Hsp27 (rectangles rouges) dans une lignée de cellules endothéliales, non spécifiques de la BHE, des conséquences possibles au niveau de la santé. D'après Leszczynski (Leszczynski et al. 2002)

Il a également été rapporté que des lignées issues de tumeurs humaines, comme la lignée MO54 issue de gliomes humains (Miyakoshi et al. 2005), et la lignée KB, issue d'un carcinome épidermoïde oropharyngial (Caraglia et al. 2005), étaient affectées par les signaux de la téléphonie mobile à 1950 MHz. Ces altérations sont respectivement une inhibition de la phosphorylation d'Hsp27, sans effet sur la prolifération cellulaire et sur l'expression des protéines Hsp27 ou Hsp70, et une augmentation d'apoptose induite. Il a également été montré

qu'une exposition au GSM-1800 induisait des cassures à l'ADN dans des cellules transformées GFSH R-17 de granulosa de rat (Diem et al. 2005). Enfin, des cellules souches embryonniques transformées $p53^{-/-}$ de souris montraient des variations d'expression d'ARNm après une exposition au signal GSM-1800, contrairement aux cellules souches embryonnaires sauvages pour le gène $p53$ (Czyz et al. 2004).

En résumé, dans ces travaux sur les effets des RF sur des lignées cellulaires ou tumorales ou transformées, sauf exception, aucune comparaison n'a été faite avec des cellules normales. Pour autant, les auteurs concluent quand même à dire des effets toxicologiques, délétères, des RF. Peut-être faut-il voir dans ces résultats l'opportunité d'utiliser de telles radiofréquences pour lutter contre les tumeurs, puisque les RF semblent capables d'induire des changements métaboliques et même la mort cellulaire dans des cellules immortalisées ou transformées ?

Par ces constatations, qui n'apportent rien de vraiment nouveau sur les comparaisons entre cellules primaires et en lignées, il était intéressant d'apporter une critique sur le choix des modèles cellulaires pour évaluer la toxicité des RF. Les modèles de lignées immortalisées ou transformées apparaissent comme utilisés abusivement dans cette thématique.

Il est bien évident que ce sont des modèles « pratiques » par leur simplicité de mise en œuvre, le gain de temps et le nombre d'expériences possibles, mais sont-ils réellement pertinents pour des études de toxicité en dehors de leur utilité en recherche fondamentale ?

Choix des types cellulaires dans notre étude

Dans nos travaux, nous avons également utilisé des cellules transformées humaines microgliales CHME-5 issues de gliome, ainsi qu'une lignée cellulaire issue de neuroblastome humain SH-SY5Y pour détecter des effets génotoxiques éventuels dus à une exposition au signal GSM-1800. Nous n'avons pas observé d'effets génotoxiques, mais cela est peut-être dû au choix du modèle cellulaire en rapport avec le système nerveux central humain ?

Des travaux ont montré que la protéine lactoferrine (se liant au fer) était présente *in vivo* dans des petites cellules améboïdes, c'est-à-dire la microglie activée (Fillebeen et al. 2001). Une étude *in vitro* a montré qu'après un stress inflammatoire ou oxydatif, la lignée CHME produisait la lactoferrine, alors qu'à l'état non stressé, elle ne la produisait pas. Une autre étude portant sur une autre lignée microgliale HMO6, a montré que cette lignée répondait de

façon identique à un traitement à l'amyloïde-beta que des cellules primaires humaines (Nagai et al. 2001).

Tout laisse donc à penser que, dans le cas de cette lignée CHME-5, les réactions cellulaires sont représentatives de celles observées *in vivo*. Une comparaison avec des cellules primaires humaines serait cependant l'idéal, mais encore faudrait-il que de telles cellules soient disponibles. En attendant, l'utilisation de cellules primaires de rat ou de souris peut suffire pour une première approche.

Choix des modèles animaux

L'évaluation toxicologique "classique" combine les études cellulaires avec les études animales. Cette composante de l'évaluation est très importante puisque l'on a affaire à des organismes entiers. Les modèles animaux peuvent aller d'organismes simples, non mammifères comme la drosophile ou le ver de terre, à des organismes mammifères évolués, comme le singe ; la majorité des études cependant utilise des organismes mammifères de type rongeurs.

Cependant, on doit garder en mémoire que même entre mammifères, il existe des différences. Par exemple, entre les deux espèces proches que sont l'homme et le singe, l'alpha B-crystalline présente dans les yeux est de taille différente, puisqu'elle compte deux isoformes chez l'homme contre une seule chez le singe (Tamm et al. 1996). Entre souris et rats, il existe des différences de réponses génotoxiques aux produits chimiques carcinogènes (Sekihashi et al. 2002). Ainsi, un même chimique induit des micronoyaux différemment chez le rat et la souris (Morita et al. 1997; Wakata et al. 1998). En effet, les souris semblent plus sensibles au o-aminoazotoluène et à la benzidine que les rats, tandis que les rats sont plus sensibles à l'azobenzène et au Sudan I que les souris. Il faut noter par ailleurs que ces mêmes produits sont positifs au test de comète dans au moins un des organes des deux espèces. Sur les 30 produits chimiques testés dans cette étude, 50% induisent des lésions dans le cerveau des souris, mais peu d'entre elles altèrent le cerveau des rats. La sensibilité des organes de souris et de rats face à la génotoxicité de certains produits n'est pas en concordance avec les différences de carcinogénicité.

En conclusion, il est donc recommandé d'après Sekihashi et al (2002), d'utiliser les deux espèces dans les études de génotoxicité de produits chimiques.

Radiofréquences et choix du type animal

On notera que près de la moitié des publications en bioélectromagnétisme concernent l'étude d'effets génotoxiques ou cancérigènes (induction de cancer) *in vivo* des RF seules (Chou et al. 1992; Lai and Singh 1995; Lai and Singh 1996; Lai and Singh 1997; Malyapa et al. 1998; Adey et al. 1999; Adey et al. 2000; Trosic et al. 2002; Bakos et al. 2003; La Regina et al. 2003; Demsia et al. 2004; Finnie et al. 2006a; Finnie et al. 2006b). Elles ont porté principalement sur des modèles de rats : Sprague-Dawley, Fisher 344, Wistar. Un seul groupe a travaillé sur des souris BALB-C (Finnie et al. 2006a; Finnie et al. 2006b).

D'autres travaux ont été réalisés sur le long terme (jusqu'à deux ans d'exposition) et ont eu pour but de mettre en évidence l'effet promoteur de tumeur après induction des tumeurs par administration de cancérigènes (Imaida et al. 1998; Chagnaud et al. 1999; Bartsch et al. 2002; Anane et al. 2003; Verschaeve et al. 2006; Yu et al. 2006) ou par injection de cellules tumorales (Santini et al. 1988; Higashikubo et al. 1999) ou dans des souches d'animaux sensibles (Repacholi et al. 1997; Vijayalaxmi et al. 1997; Frei et al. 1998; Frei et al. 1998; Vijayalaxmi et al. 1998; Utteridge et al. 2002; Anane et al. 2003). Finalement, aucune de ces auteurs ne conclue à des effets inducteurs ou promoteurs des RF *in vivo* (900 MHz - 2,45 GHz). En revanche, plusieurs équipes montrent des effets génotoxiques à 900 ou 2450 MHz avec induction de cassures à l'ADN ou encore de micronoyaux (Lai and Singh 1995; Lai and Singh 1996; Lai and Singh 1997; Vijayalaxmi et al. 1998; Trosic et al. 2002; Demsia et al. 2004) dans le cerveau ou la moelle osseuse.

En conclusion, les principaux modèles utilisés sont des souris et des rats, mais aucune étude publiée n'a porté, au sein d'un même laboratoire, sur les deux espèces. Seule, la grande étude Européenne PerformA, dont les résultats ne sont pas encore connus, regroupe les expériences de plusieurs laboratoires sur la carcinogenèse et co-carcinogenèse des RF de la téléphonie mobile chez différentes souches de rats et de souris (Dasenbrock, 2005). Les comités d'éthique encourageant à la réduction des études animales, il peut apparaître, à ce jour, qu'expérimenter sur deux espèces peut représenter un abus d'expérimentation. Mais alors, peut-on, à partir d'expérimentations sur une espèce, conclure sur des effets génotoxiques des RF ? Peut-on, en l'absence d'induction ou de promotion de processus cancéreux, penser que les effets génotoxiques obtenus soient si toxiques qu'ils paraissent l'être ? Cette absence de cohérence dans les résultats est difficile à comprendre et rend plus difficile encore l'évaluation du risque lié à l'exposition aux RF.

Choix des techniques de détection

Test des cassures simples brins à l'ADN : Le test des comètes en milieu alcalin

Ce test, intéressant pour sa sensibilité à détecter des lésions immédiates à l'ADN cellulaire, a été développé dans les années 1980. Il a ensuite été repris dans différents groupes (Olive et al.; Singh et al.) qui l'ont amélioré en apportant diverses modifications. Aussi, à ce jour, différents protocoles sont disponibles dans la littérature pour le test des comètes en milieu alcalin.

Une intéressante publication de réplique de l'une des études de Lai (1995) s'est avérée négative (Malyapa et al. 1998) et a permis de mettre en évidence que la réalisation de l'homogénéat cérébral après exposition est une étape primordiale et nécessite une rigueur de gestion du temps pour obtenir des conditions similaires dans tous les groupes expérimentaux. La validité des versions différentes du test utilisé par les deux équipes a été débattue. De ces études ressort l'importance du choix du protocole. Pour le test des comètes, un guide a été publié par Tice et al (2000) qui présente un schéma de protocole clair (Figure 29), mais la description qui reprend un grand nombre de publications, ne tranche pas sur le choix du temps d'électrophorèse ou de la concentration en agarose, etc.

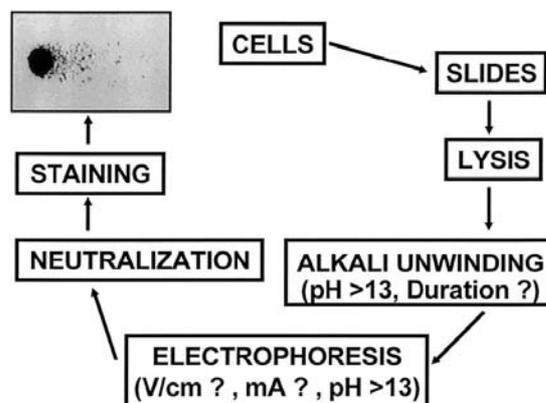


Figure 29 : D'après Tice (Tice et al, 2000). Schéma des étapes d'un protocole de test alcalin de comètes.

Une homogénéité des protocoles apparaît donc une bonne chose pour permettre la comparaison entre les publications. L'utilisation d'un guide standard et précis, et non seulement une simple revue des différentes façons de procéder pour un test de comètes (Olive ou Singh) serait d'une aide précieuse. L'OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development, <http://www.oecd.org>) met à disposition des protocoles standards (guidelines) en ligne pour étudier l'effet de produits chimiques par exemple, par le biais de détection de micronoyaux de mammifère *in vivo* (n°474). Ce guide donne des lignes de conduite,

d'expérimentation, fait référence à des travaux précédents, mais on peut regretter l'absence de d'un descriptif complet et détaillé du protocole de micronoyaux. Ainsi, le rapport final de test des micronoyaux pourra être identique pour tous, mais avec des méthodes différentes. Il est bien évident que pour un échantillon provenant de sang périphérique ou de moelle osseuse, la technique est différente, mais pourquoi ne pas rédiger un protocole détaillé pour chaque condition ?

D'autre part, le guide de tests de micronoyaux (OECD guideline 474) précise que, si des effets sont trouvés *in vivo*, alors l'atteinte d'un organe ou de la circulation générale de l'organisme par le produit testé devrait être discuté (Alinea 31). Or, certaines études concluent que les RF sont toxiques ou délétères pour l'organisme et essaient d'entrevoir les éventuelles conséquences, mais aucune publication n'explique les mécanismes qui sont à l'origine de tels effets. Certes, les ondes ne sont pas des molécules qui circuleraient par voie sanguine et qui resteraient bloquées dans un organe ou un tissu en particulier ! La seule action connue est la relaxation diélectrique en présence d'un champ RF apportant chaleur aux tissus.

A bas niveau d'énergie, comme dans le cas des RF de la téléphonie mobile, certaines hypothèses ont été émises pour des mécanismes non thermiques comme l'interaction du champ avec les charges (Panagopoulos et al, 2002). D'après cet auteur, le mécanisme se trouverait dans une vibration forcée des ions en surface des cellules causée par le champ vibrant environnant. À ce jour, aucune hypothèse n'a été validée.

Choix des tests statistiques

Il en est de même pour le choix du ou des test(s) statistique(s) utilisé(s) pour traiter les données. Comme l'ont très bien décrit Duez et al (Duez et al. 2003), nombreuses sont les publications qui utilisent des tests paramétriques (du type « t » de Student), avec un nombre de données faibles et surtout sans avoir pris soin de vérifier la distribution normale des échantillons.

En conclusion, il serait très profitable de mettre en accord les techniques et ainsi permettre des rassemblements et comparaisons de données. Or, à ce jour, nous ne trouvons que des données multiples et finalement, nous nous trouvons dans l'incapacité de répondre clairement aux questions que se pose la population.

- *Partie 2 - Conclusion-Perspectives*

Ce projet, qui a été réalisé en cinq ans (diplôme EPHE, puis Thèse Bordeaux 1), avait pour but de répondre à la question suivante : les radiofréquences issues de la téléphonie mobile peuvent-elles induire un stress cellulaire au niveau de la peau et du système nerveux central ? À cette question, nous apportons un certain nombre de réponses rapportées ci-dessous.

Sur la base des résultats obtenus *in vitro*, les réponses que nous apportons sont:

1- l'absence d'induction de mort cellulaire programmée dans les cellules primaires épidermiques ou dermiques,

2- l'absence de lésion de l'ADN (cassures simples brins) dans les cellules cutanées et du système nerveux central,

3- l'absence de variation d'expression des protéines de choc thermique Hsc70, Hsp27 et Hsp70 dans les cellules épidermiques,

4- l'absence de processus d'inflammation ni de sur-prolifération cellulaire au niveau d'épidermes reconstruits humains,

5- l'existence d'une réponse d'adaptation des fibroblastes humains primaires isolés au laboratoire soumis à une exposition au signal GSM-900, caractérisée par une diminution d'expression de Hsc70; cette variation n'étant pas observée dans des fibroblastes cultivés en condition de prolifération optimale.

6- l'existence d'une réponse d'adaptation du modèle 3D d'épidermes reconstruits en fin de culture, soumis à une exposition au signal GSM-900, caractérisée par une augmentation d'expression de Hsp70; cette variation n'étant pas observée dans des kératinocytes humains primaires cultivés en monocouche.

Nous avons complété par des études *in vivo* sur des rats Hairless (articles 4, 5 et 6) et sur des rats Sprague-Dawley (article 7) :

1- l'absence de processus d'inflammation, de sur-prolifération cellulaire, et de variation dans la présence et la distribution des protéines de maintien de la peau.

2- l'absence de variation d'expression des protéines de choc thermique Hsc70, Hsp25 et Hsp70 dans l'épiderme,

3- l'absence de cassure à l'ADN dans les cellules cérébrales.

Nos conclusions ne permettent donc pas d'affirmer que, dans nos conditions d'expérimentation, les signaux GSM-900, GSM-1800 et UMTS sont des facteurs de stress pour les modèles de peau et de système nerveux central étudiés.

Les progrès de la recherche sur les effets sanitaires des radiofréquences des nouveaux signaux de communication, permettent à ce jour de tendre vers des conclusions plutôt rassurantes. Nos résultats sur l'impact des radiofréquences sur la peau et le système nerveux central se sont ajoutés utilement au corpus de connaissances dans ce domaine.

Il reste cependant à compléter nos recherches sur la peau qui ne sont pas exhaustives : d'une part, le travail *in vitro* sur les épidermes reconstruits soumis au GSM-1800 doit être poursuivi, de même que celui utilisant des cellules isolées par nos mains et cultivées dans des conditions normales, c'est-à-dire non sur-proliférantes. La limitation de cette perspective est la difficulté d'accès à des biopsies humaines. D'autre part, il serait intéressant d'étudier les effets du signal UMTS sur la peau *in vivo*, de même qu'*in vitro* sur des épidermes reconstruits. L'augmentation en fréquence induisant une absorption plus superficielle, il serait pertinent de poursuivre, dans un but comparatif, l'étude *in vivo* en exposition locale de la peau, d'autant que les derniers signaux développés sont ceux de l'internet sans fil, WiFi et WiMax, dont la fréquence atteint 2450 MHz. Le souci actuel pour réaliser ce genre d'expériences est l'acquisition de rats Hairless, qui ne peut se faire que des Etats-Unis, ce qui rend le coût de telles expériences très élevé.

De façon plus générale, en bioélectromagnétisme, il serait souhaitable d'uniformiser les expériences, les protocoles, mais aussi d'amplifier les projets à grande échelle (regroupement de plusieurs laboratoires), pour ainsi amener des quantités de données et des conclusions plus rapidement et peut-être mieux suivre la progression constante des signaux de communication. En effet, des téléphones cellulaires de première génération aux téléphones de troisième génération, le bond de technologie est majeur : d'une communication uniquement par la voix, nous pouvons aujourd'hui communiquer en voyant notre interlocuteur. Les organes et tissus exposés aux ondes changent ; si la peau reste toujours la cible première puisque la main tiendra toujours le téléphone, la tête s'éloigne de la source RF.

Quels seront donc les prochains signaux et les prochaines cibles ? Devons-nous croire que de futurs dispositifs de communication seront des implants, tout comme les réalisateurs le montrent dans leurs films de science-fiction ?

La population se préoccupe des ondes de téléphonie mobile, de plus en plus présentes dans notre environnement. Devant la multiplication des sources d'émission RF, dont la puissance restera faible et en considérant que toute la population est exposée, il est important de faire une évaluation du risque avec de telles études de toxicité, et de comprendre l'action de ces ondes non-ionisantes.

De plus, il faut également relativiser l'impact réel de telles ondes par rapport aux pollutions industrielles, au développement des nanoparticules, aux pollutions humaines et à la destruction de la couche d'ozone, etc.

Tout en restant vigilant, peut-être devrions-nous affronter les dangers potentiels en leur affectant des priorités...

Chapitre 5 : Valorisation des compétences

- *Partie 1 : Cadre général et enjeux de la thèse*

Présentation succincte

Ces trois dernières années de recherche scientifique se sont déroulées au sein du laboratoire CNRS de Physique des Interactions Ondes-Matières ou PIOM et plus précisément au sein du groupe de bioélectromagnétisme affilié à l'Ecole Pratique des Hautes Etudes (EPHE) et dirigé par le Dr. Veyret. Les travaux effectués ont consisté en l'étude des effets des radiofréquences de la téléphonie mobile sur la peau. Pourquoi la téléphonie mobile ? Tout simplement en réponse aux inquiétudes grandissantes du public. Et pourquoi la peau ? Car la peau représente la première « cible » des radiofréquences issues de la téléphonie mobile. Il faut savoir en effet, que sur 100% de signal émis par le téléphone, 50% sont absorbés par l'organisme de façon locale dont 25% par les couches les plus superficielles représentées par la peau. Cette étude a été menée grâce à un contrat de recherche avec l'industrie et plus précisément avec les opérateurs France Telecom Recherche & Développement et Bouygues Telecom.

Le but de ce travail était de chercher de manière pertinente les éventuels effets des radiofréquences et, dans cette perspective, nous nous sommes dirigés vers le stress cellulaire. De façon générale, on peut définir un stress cellulaire comme une réponse de l'organisme à une agression externe (rayonnement ultraviolet par exemple) ou interne (pathologique tels que bactérie, virus...). Dans le cas d'un stress cellulaire, les conséquences sont variables et d'impact différent, mais les cellules répondent de façon assez similaire pour se défendre, par la surexpression de protéines, la réparation de protéines ou de l'ADN et parfois si les lésions sont trop importantes, les cellules sont capables de se "suicider" pour éviter ainsi l'induction de cancer. J'ai donc étudié ces paramètres sur deux modèles de recherche, d'une part sur des cellules humaines et d'autre part sur des rats de laboratoire. Ces trois années ont donc permis de montrer que, dans les limites d'exposition autorisées pour le public, les radiofréquences du signal GSM-1800 de téléphonie mobile n'induisait pas de stress cellulaire néfaste sur la peau que ce soit *in vitro* ou *in vivo*.

Thèse dans son contexte

L'équipe de bio-électromagnétisme étudie l'impact des champs électromagnétiques de basses fréquences, comme ceux utilisés pour le transport d'électricité EDF, mais aussi de hautes fréquences, comme ceux utilisés par les télécommunications. Les recherches sont essentiellement appliquées et concernent en majeure partie les effets sur le cerveau. Des recherches en vue thérapeutique sont de plus en plus présentes par l'utilisation de champs magnétiques intenses en basse fréquence similaires à ceux utilisés pour le traitement de la dépression mentale.

Le sujet sur la peau est un additif original aux études des radiofréquences sur le cerveau et permet d'élargir la thématique du groupe. Il représente une contribution et un intérêt importants du point de vue national et international, puisque peu d'études portent sur les interactions radiofréquences – peau.

Différentes collaborations ont été mises en place pour ce projet, certaines déjà existantes (IRCOM-XLIM, Limoges), France Telecom R&D et la fondation IT'IS (Zurich, Suisse), d'autres que j'ai moi-même sollicitées et mises en place, en particulier pour les cultures de cellules de peau humaine (Unité de Dermatologie du Pr Taïeb, Université Bordeaux 2 ; Laboratoire FDRC du Pr Lassègues, Université Bordeaux 1). Ces collaborations ont donc été établies au niveau local, national et international.

Comme indiqué précédemment, le groupe de bio-électromagnétisme est aussi le laboratoire de bioélectromagnétisme rattaché à l'Ecole Pratique des Hautes Etudes⁸. Il fait partie intégrante du PIOM, UMR CNRS localisée au sein de l'Ecole Nationale de Chimie et de Physique de Bordeaux (ENSCP). Ce groupe est dirigé par le Dr. Bernard Veyret, directeur de recherche au CNRS et directeur cumulant EPHE, qui est expert auprès de l'Organisation Mondiale de la Santé, de la Commission internationale de protection contre les rayonnements non-ionisants (ICNIRP) et de l'agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail. Il interagit fréquemment avec les personnes compétentes en matière d'environnement/santé du gouvernement et participe à de nombreux projets européens et internationaux. Par conséquent, la place de cette équipe de recherche dans la communauté scientifique du bio-électromagnétisme est importante et reconnue.

⁸ L'école pratique des hautes études est un établissement de l'éducation nationale habilité à délivrer son propre diplôme (Diplôme EPHE).

Pourquoi une thèse ?

Tout d'abord, ce n'était pas un rêve d'adolescente que d'être chercheur. Cette envie est venue de façon progressive avec l'avancée dans les études universitaires et ma progression dans les différents stages. Avec l'acquisition d'indépendance et d'autonomie dans le travail, la perspective de pouvoir travailler librement selon ses idées se projetait de plus en plus concrètement dans mes projets d'avenir et m'ont donc amenée à la réalisation d'un doctorat. Je ne manquerai pas d'ajouter que la part d'encouragement par mes proches, même indirectement, a grandement joué dans ce choix.

Quant au sujet proprement dit, j'ai réalisé après ma Maîtrise, un Diplôme EPHE pendant 2 ans au sein du laboratoire PIOM. Le travail portait sur ce sujet des radiofréquences et de la peau. A la fin de cette étude, des travaux supplémentaires étaient demandés suite à la modernisation des réseaux de communication (nouveaux signaux) et l'opportunité de poursuivre sur un doctorat se profilait alors.

- *Partie 2 : Déroulement, gestion et coût du projet*

Préparation et cadrage du projet.

Tout d'abord, ce projet ne représente pas seulement un travail de recherche de 3 ans mais de 5 ans. En effet, l'étude des effets de la téléphonie mobile sur la peau initialement de 2 ans, dans le cadre du diplôme EPHE, s'est prolongée à 5 ans avec l'utilisation de nouveaux signaux et en étendant l'étude au système nerveux central.

Le projet visant à étudier les effets des signaux de la téléphonie mobile sur la peau a été établi en 2001, en partenariat avec France Telecom Recherche & Développement, et a démarré en septembre de cette même année. Une clause de confidentialité a été signée pour ce projet, concernant l'originalité du sujet. L'extension de ce projet à l'étude des nouveaux signaux sur la peau et le système nerveux central a été proposée en 2003. Le projet a démarré en janvier 2004 pour 3 ans en partenariat avec France Telecom R&D et Bouygues Telecom. Le Dr Rachid Anane est à l'origine de cette étude, puisque ses précédents travaux avaient été menés sur la peau. L'évaluation des risques *in vitro* et *in vivo* a par conséquent été réalisée avec le plus de pertinence possible. J'ai pris ce projet en main lors de mon Diplôme EPHE, équivalent Master 2. Les modèles d'extraction cellulaire et de reconstruction en trois dimensions d'épiderme reconstruit n'étaient pas pratiqués au laboratoire. Il a donc été

nécessaire d'établir des collaborations avec des laboratoires compétents en recherche dermatologique afin d'acquérir les techniques adéquates. J'ai alors collaboré avec deux équipes par l'intermédiaire du Dr Jean-Etienne Surlève-Bazeille : tout d'abord l'Unité de dermatologie INSERM du Pr Taïeb, à l'Université de Bordeaux 2, qui m'a fourni des échantillons de peau humaine issus de chirurgie esthétique ; et d'autre part le Laboratoire des Facteurs de Défense et de Régulation Cellulaire, EA 1915, du Pr. Lassègues, à l'Université de Bordeaux1, lieu d'apprentissage des techniques de cultures cellulaires avec l'aide du Dr Alexandra Milochau. Afin de pallier les manques de biopsies de peau humaines, j'ai fait appel au fournisseur Cambrex de cellules primaires humaines extraites de peau. Une collaboration avec le Dr Philippe Lévêque du laboratoire IRCOM-XLIM (Limoges) et le Pr Kuster de la fondation IT'IS (Suisse) a porté sur le suivi et la caractérisation des systèmes et le décodage des données.

La partie *in vivo* nécessitait la présence au laboratoire de personnel qualifié pour l'expérimentation animale, effective dès le début de mon projet en les personnes du Dr Bernard Billaudel et du Dr Isabelle Lagroye. J'ai plus tard réalisé moi-même une formation de niveau 1 d'expérimentateur sur animaux (enregistrée sous le numéro N°30 00046), dispensée par l'EPHE, afin d'acquérir toutes les compétences nécessaires à la réalisation de ce projet tout en respectant les consignes d'éthiques. Ainsi, j'ai participé activement à la rédaction de saisines en vue d'expérimenter sur les animaux qui ont été soigneusement adressées au Comité régional d'éthique pour l'expérimentation animale, section Aquitaine et Poitou-Charentes. Ces dossiers sont en attente, pour leur évaluation, du résultat de la demande d'agrément que nous avons déposée pour notre animalerie.

En étroite collaboration, il y a eu l'apport scientifique sur les protéines de choc thermique par le Dr Florence Poulletier-De-Gannes post-doctorante au PIOM et l'aide incontestée du post-doctorant japonais, le Dr Hiroshi Masuda, qui a permis de mener à bout les expérimentations *in vivo* de ce projet en un an, lesquelles ont été finalisées par deux articles acceptés à ce jour.

Avec une périodicité de 5 à 6 semaines, j'ai présenté l'avancement de ces travaux au sein du laboratoire PIOM au cours des réunions du groupe de bio-électromagnétisme, pendant lesquelles un état des lieux de tous les projets était présenté. Le suivi a donc été régulier au sein même du laboratoire, avec de nombreuses opportunités de présentations en congrès.

Le partenariat avec les industriels France Telecom R&D et Bouygues Telecom nécessitait la communication d'un rapport d'activité annuel, leur permettant de suivre

l'avancement du projet. Les systèmes d'exposition utilisés pour ce projet pour permettre une exposition aux signaux de téléphonie mobile correctement caractérisée en termes de dosimétrie, autant in vitro qu'in vivo, ont été manufacturés à la demande. La fourniture des systèmes d'exposition ou de leur dosimétrie a présenté assez régulièrement des retards de livraison, différant la réalisation des expériences. Une demande d'avenant au projet a été formulée et a permis de compenser les retards.

J'ai donc fait progresser ce projet dans un environnement de recherche adapté, autant du point de vue matériel que personnel, avec des collaborateurs compétents. Je ne manquerai pas de citer Emmanuelle Haro, ingénieur d'étude au PIOM et la participation de personnes d'origine étrangère comme le Dr Masuda et Amanda Jane Ball a été très enrichissante autant sur le point scientifique que linguistique et relationnel.

L'évaluation et la prise en charge de ce projet

Cette évaluation est détaillée dans le Tableau 5 et pour la période de 3 ans de travaux de recherche pour le doctorat.

Tableau 5 : Calcul du coût environné du projet de thèse sur 3 ans, d'après le modèle de calcul de coût de contrat disponible en ligne sur le site de l'Université Louis-Pasteur de Strasbourg (<http://ulpindustrie.u->

<i>Salaires des personnes recrutées pour ce projet</i>				coût en Euros
		Temps		85000
S.Sanchez		100%		
I.Lagroye		30%		
B.Veyret		10%		
B.Billaudel		40%		
G.Ruffié		40%		
F.Poullétier		30%		
<i>Déplacements en congrès et formations</i>				
Erice 04	poster			6500
Nottingham 04	stage			
BioEM 05	oral			
Erice 05				
BSID 06				
IRPA 06	poster			
ESDR 06	poster			
<i>Investissement matériel</i>				
Systèmes d'exposition				3700
GSM-1800, UMTS, WiFi				
Gros matériel, achat				2600
Microscope				
Biolink UV				
Microtome				
Congélateur-80°C, N2liquide				
Electrophorèse				
Entretien matériel				
Cytomètre de flux				
Hotte à flux laminaire				
Incubateurs culture				
Machine à glace				
Centrifugeuses				
Pipette-men ou pro-pipettes				
Réfrigérateurs				
Congélateurs -20°C				7300
Matériel biologique				21600
Cellules primaires				
Animaux				
Elimination déchets				1100
Consommables				3000
<i>Frais d'environnement</i>				
Electricité, eau, cartouches d'imprimante, papiers...				37000
TOTAL SUR 3 ANS				167800

Compétences, savoir-faire, qualités professionnelles et personnelles

Cette expérience professionnelle au sein du PIOM m'a apporté autant en technique qu'en théorie. Tout d'abord, je maîtrise des techniques de culture cellulaires, de reconstruction cellulaire ou génie tissulaire et de biologie moléculaire qui me permettent de m'adapter à de nombreuses thématiques. J'ai, de plus, grâce à un stage à Nottingham au sein du laboratoire FRAME du Pr Richard Clothier, acquis des techniques supplémentaires de génie tissulaire (modèle de cornée et de peau) qui complètent parfaitement mes compétences en ingénierie tissulaire.

La veille technologique réalisée par le biais de Pubmed, ScienceDirect ou encore Scopus, pendant ces 5 ans, m'a amenée à acquérir de solides connaissances en biologie de la peau et en compréhension des mécanismes du stress cellulaire. J'ai aussi, par le suivi des avancées en bio-électromagnétisme, pu m'assurer au fur et à mesure du temps de l'originalité de mes travaux. La dissémination des résultats au cours de ces années a été réalisée essentiellement lors de congrès nationaux et internationaux, avec de nombreuses présentations en anglais, mettant ainsi en avant mes compétences d'analyse et de synthèse de mes travaux. La rédaction de ma thèse se faisant sur articles, j'ai donc pu mettre à profit mes compétences scientifiques et linguistiques écrites. Mon projet de carrière étant de poursuivre en ingénierie tissulaire de la peau, mon directeur de thèse m'a permis de participer à deux congrès en dermatologie (BSID et ESDR). Grâce à ces accès, j'ai pu élargir mon réseau professionnel du bio-électromagnétisme à la recherche dermatologique.

Dans ce projet, des savoir-faire de gestion de projet et de laboratoire ont été nécessaires. En effet, j'ai tout d'abord pris part à l'organisation des différentes tâches affectées à mon projet, ainsi qu'à l'élaboration des rapports aux industriels et à la mise en place du projet avenant à la première étude. J'ai également été fortement impliquée dans la vie et la gestion du matériel de laboratoire par la réalisation de devis, d'entretiens avec les représentants des différents fournisseurs, par la réalisation de commandes et au suivi du service après-vente. De plus, j'ai participé à la mise en place du matériel neuf, ainsi qu'à la vulgarisation des modes d'emplois et entretien des appareils. La vie du laboratoire, c'est aussi les différents stagiaires universitaires et étrangers. Les diriger dans le laboratoire et les

intégrer dans l'équipe de recherche a également fait parti des atouts nécessaires à l'organisation du laboratoire.

- *Partie 3 : Résultats, impact de la thèse*

Ces travaux sur les effets des radiofréquences issues de la téléphonie mobile sur la peau et le système nerveux central ont permis d'apporter des réponses et notamment de préciser qu'il n'y avait pas d'induction concrète de stress cellulaire caractérisé par l'expression de protéines de choc thermique, des cassures simples brins de l'ADN ou encore par la mort cellulaire programmée dite apoptose, au niveau de nos modèles de peau et de système nerveux central et dans nos conditions d'expérimentations. Ainsi il a été apporté la notion d'adaptation cellulaire non nocive, en raison de variations visibles dans les modèles cellulaires et absente des modèles animaux. Les résultats ont ainsi conforté l'idée émanant régulièrement des papiers de bio-électromagnétisme qui suggèrent des réponses ou bien des sensibilités spécifiques aux modèles cellulaires.

Cette expérience professionnelle de 5 ans a apporté par un nombre total de 7 articles et une grande quantité de présentations en congrès, une reconnaissance scientifique de ce projet et donc du laboratoire, importante au sein de la communauté de bio-électromagnétisme. Ces travaux cellulaires et animaux contribuent à répondre de manière non exhaustive aux inquiétudes du public vis-à-vis des téléphones portables, sans toutefois pouvoir extrapoler à l'Homme.

Du point de vue personnel, j'ai acquis beaucoup de choses et dans beaucoup de domaines. Le travail d'équipe a été une des premières sources d'enrichissement puis le travail personnel. Il est je crois important de parler de relationnel, car au final c'est ce qui fait tout dans la gestion d'un projet. Les pistes professionnelles qui ressortent de cette analyse de thèse sont conséquentes aux relations établies. En effet, si je souhaite vraiment basculer du bio-électromagnétisme vers l'ingénierie tissulaire en recherche dermatologique, c'est grâce à toutes les opportunités de rencontre qui m'ont été offertes par mes dirigeants de thèse. Ainsi, par ce projet, j'ai collaboré avec deux groupes de recherche dermatologique, puis j'ai eu la chance d'effectuer un stage de recherche dans un laboratoire d'ingénierie tissulaire anglais (FRAME laboratory, Nottingham) et enfin, la participation à deux congrès de dermatologie.

Tout cela a conforté, consolidé mon projet de carrière, même si il n'est pas évident de rejoindre un tel monde sans « bagages » de dermatologiste...

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe, M., Kurosawa, M., et al. (2000). "Influence of IgE-mediated activation of cultured human mast cells on proliferation and type I collagen production by human dermal fibroblasts." J Allergy Clin Immunol **106**(1 Pt 2): S72-7.
- Adair, E. R., Cobb, B. L., et al. (1999). "Human exposure at two radio frequencies (450 and 2450 MHz): similarities and differences in physiological response." Bioelectromagnetics Suppl **4**: 12-20.
- Adair, E. R., Mylacraine, K. S., et al. (2003). "Thermophysiological consequences of whole body resonant RF exposure (100 MHz) in human volunteers." Bioelectromagnetics **24**(7): 489-501.
- Adey, W. R., Byus, C. V., et al. (2000). "Spontaneous and nitrosourea-induced primary tumors of the central nervous system in Fischer 344 rats exposed to frequency-modulated microwave fields." Cancer Res **60**(7): 1857-63.
- Adey, W. R., Byus, C. V., et al. (1999). "Spontaneous and nitrosourea-induced primary tumors of the central nervous system in Fischer 344 rats chronically exposed to 836 MHz modulated microwaves." Radiat Res **152**(3): 293-302.
- Albers, G. W., Amarenco, P., et al. (2004). "Antithrombotic and thrombolytic therapy for ischemic stroke: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy." Chest **126**(3 Suppl): 483S-512S.
- Aloisi, F. (2001). "Immune function of microglia." Glia **36**(2): 165-79.
- Anane, R., Dulou, P. E., et al. (2003a). "Effects of GSM-900 microwaves on DMBA-induced mammary gland tumors in female Sprague-Dawley rats." Radiat Res **160**(4): 492-7.
- Anane, R., Geffard, M., et al. (2003b). "Effects of GSM-900 microwaves on the experimental allergic encephalomyelitis (EAE) rat model of multiple sclerosis." Bioelectromagnetics **24**(3): 211-3.
- Ansel, J., Perry, P., et al. (1990). "Cytokine modulation of keratinocyte cytokines." J Invest Dermatol **94**(6 Suppl): 101S-107S.
- Aquino, D. A., Peng, D., et al. (1998). "The constitutive heat shock protein-70 is required for optimal expression of myelin basic protein during differentiation of oligodendrocytes." Neurochem Res **23**(3): 413-20.
- Armstrong, C. L., Krueger-Naug, A. M., et al. (2001). "Constitutive expression of heat shock protein HSP25 in the central nervous system of the developing and adult mouse." J Comp Neurol **434**(3): 262-74.
- Arrigo, A. P. (1990). "Tumor necrosis factor induces the rapid phosphorylation of the mammalian heat shock protein hsp28." Mol Cell Biol **10**(3): 1276-80.
- Arrigo, A. P. and Ahmad-Zadeh, C. (1981). "Immunofluorescence localization of a small heat shock protein (hsp 23) in salivary gland cells of *Drosophila melanogaster*." Mol Gen Genet **184**(1): 73-9.

- Arrigo, A. P., Suhan, J. P., et al. (1988). "Dynamic changes in the structure and intracellular locale of the mammalian low-molecular-weight heat shock protein." Mol Cell Biol **8**(12): 5059-71.
- Arrigo, A. P. and Welch, W. J. (1987). "Characterization and purification of the small 28,000-dalton mammalian heat shock protein." J Biol Chem **262**(32): 15359-69.
- Assimakopoulou, M., Sotiropoulou-Bonikou, G., et al. (1997). "Prognostic significance of Hsp-27 in astrocytic brain tumors: an immunohistochemical study." Anticancer Res **17**(4A): 2677-82.
- Avalos-Diaz, E., Alvarado-Flores, E., et al. (1999). "UV-A irradiation induces transcription of IL-6 and TNF alpha genes in human keratinocytes and dermal fibroblasts." Rev Rhum Engl Ed **66**(1): 13-9.
- Ayata, A., Mollaoglu, H., et al. (2004). "Oxidative stress-mediated skin damage in an experimental mobile phone model can be prevented by melatonin." J Dermatol **31**(11): 878-83.

B

- Baba, H., Nakahira, K., et al. (1997). "GFAP gene expression during development of astrocyte." Dev Neurosci **19**(1): 49-57.
- Bakos, J., Kubinyi, G., et al. (2003). "GSM modulated radiofrequency radiation does not affect 6-sulfatoxymelatonin excretion of rats." Bioelectromagnetics **24**(8): 531-4.
- Bardella, L. and Comolli, R. (1994). "Differential expression of c-jun, c-fos and hsp 70 mRNAs after folic acid and ischemia-reperfusion injury: effect of antioxidant treatment." Exp Nephrol **2**(3): 158-65.
- Barres, B. A. and Raff, M. C. (1994). "Control of oligodendrocyte number in the developing rat optic nerve." Neuron **12**(5): 935-42.
- Barres, B. A., Schmid, R., et al. (1993). "Multiple extracellular signals are required for long-term oligodendrocyte survival." Development **118**(1): 283-95.
- Bartsch, H., Bartsch, C., et al. (2002). "Chronic exposure to a GSM-like signal (mobile phone) does not stimulate the development of DMBA-induced mammary tumors in rats: results of three consecutive studies." Radiat Res **157**(2): 183-90.
- Benveniste, E. N. (1992). "Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function, and mechanism of action." Am J Physiol **263**(1 Pt 1): C1-16.
- Berendes, H. D. and Boyd, J. B. (1969). "Structural and functional properties of polytene nuclei isolated from salivary glands of *Drosophila hydei*." J Cell Biol **41**(2): 591-9.
- Bernardi, P., Cavagnaro, M., et al. (2001). Temperature elevation in the ead of a cellular phone user: effect of SAR and of the contact with the phone. Twenty-third Annual Technical Meeting of the Bioelectromagnetics Society, St Paul, USA.
- Bessou, S., Surleve-Bazeille, J. E., et al. (1995). "Ex vivo reconstruction of the epidermis with melanocytes and the influence of UVB." Pigment Cell Res **8**(5): 241-9.
- Bicknell, G. R. and Cohen, G. M. (1995). "Cleavage of DNA to large kilobase pair fragments occurs in some forms of necrosis as well as apoptosis." Biochem Biophys Res Commun **207**(1): 40-7.
- Borghetti, A. F., Petronini, P. G., et al. (1986). "Induction of stress proteins by hyperosmolarity in normal and transformed cells." Toxicol Pathol **14**(4): 411-4.

- Borrelli, M. J., Bernock, L. J., et al. (2002). "Stress protection by a fluorescent Hsp27 chimera that is independent of nuclear translocation or multimeric dissociation." Cell Stress Chaperones **7**(3): 281-96.
- Bossy-Wetzel, E. and Green, D. R. (1999). "Caspases induce cytochrome c release from mitochondria by activating cytosolic factors." J Biol Chem **274**(25): 17484-90.
- Braathen, L. R. (1987). "The role of human epidermal Langerhans cells in skin immunity." Derm Beruf Umwelt **35**(2): 58-61.
- Brar, B. K., Stephanou, A., et al. (1999). "Heat shock proteins delivered with a virus vector can protect cardiac cells against apoptosis as well as against thermal or hypoxic stress." J Mol Cell Cardiol **31**(1): 135-46.
- Brodsky, J. L. and Schekman, R. (1993). "A Sec63p-BiP complex from yeast is required for protein translocation in a reconstituted proteoliposome." J Cell Biol **123**(6 Pt 1): 1355-63.
- Bykov, V. J., Jansen, C. T., et al. (1998). "High levels of dipyrimidine dimers are induced in human skin by solar-simulating UV radiation." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **7**(3): 199-202.

C

- Cambray-Deakin, M., Pearce, B., et al. (1988). "Effects of neurotransmitters on astrocyte glycogen stores in vitro." J Neurochem **51**(6): 1852-7.
- Capri, M., Scarcella, E., et al. (2004). "1800 MHz radiofrequency (mobile phones, different Global System for Mobile communication modulations) does not affect apoptosis and heat shock protein 70 level in peripheral blood mononuclear cells from young and old donors." Int J Radiat Biol **80**(6): 389-97.
- Caraglia, M., Marra, M., et al. (2005). "Electromagnetic fields at mobile phone frequency induce apoptosis and inactivation of the multi-chaperone complex in human epidermoid cancer cells." J Cell Physiol **204**(2): 539-48.
- Cario-Andre, M., Pain, C., et al. (2000). "Studies on epidermis reconstructed with and without melanocytes: melanocytes prevent sunburn cell formation but not appearance of DNA damaged cells in fair-skinned caucasians." J Invest Dermatol **115**(2): 193-9.
- Carper, S. W., Rocheleau, T. A., et al. (1997). "Heat shock protein 27 stimulates recovery of RNA and protein synthesis following a heat shock." J Cell Biochem **66**(2): 153-64.
- Castedo, M., Hirsch, T., et al. (1996). "Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis." J Immunol **157**(2): 512-21.
- Chagnaud, J. L., Moreau, J. M., et al. (1999). "No effect of short-term exposure to GSM-modulated low-power microwaves on benzo(a)pyrene-induced tumours in rat." Int J Radiat Biol **75**(10): 1251-6.
- Chang, H. Y. and Yang, X. (2000). "Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases." Microbiol Mol Biol Rev **64**(4): 821-46.
- Chen, H. W., Chou, F. P., et al. (1999). "Evidence of multi-step regulation of HSP72 expression in experimental sepsis." Shock **12**(1): 63-8.
- Chen, J., Graham, S. H., et al. (1996). "Stress proteins and tolerance to focal cerebral ischemia." J Cereb Blood Flow Metab **16**(4): 566-77.

- Chen, Q., Gong, B., et al. (2000). "Distinct stages of cytochrome c release from mitochondria: evidence for a feedback amplification loop linking caspase activation to mitochondrial dysfunction in genotoxic stress induced apoptosis." *Cell Death Differ* **7**(2): 227-33.
- Chen, T. C., Persons, K., et al. (1995). "The antiproliferative and differentiative activities of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ are potentiated by epidermal growth factor and attenuated by insulin in cultured human keratinocytes." *J Invest Dermatol* **104**(1): 113-7.
- Chiarugi, V. and Ruggiero, M. (1996). "Role of three cancer "master genes" p53, bcl2 and c-myc on the apoptotic process." *Tumori* **82**(3): 205-9.
- Chou, C. K., Guy, A. W., et al. (1992). "Long-term, low-level microwave irradiation of rats." *Bioelectromagnetics* **13**(6): 469-96.
- Ciavarra, R. P., Goldman, C., et al. (1994). "Heat stress induces hsc70/nuclear topoisomerase I complex formation in vivo: evidence for hsc70-mediated, ATP-independent reactivation in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(5): 1751-5.
- Ciocca, D. R. and Calderwood, S. K. (2005). "Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications." *Cell Stress Chaperones* **10**(2): 86-103.
- Ciocca, D. R., Green, S., et al. (1998). "Heat shock proteins hsp27 and hsp70: lack of correlation with response to tamoxifen and clinical course of disease in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer (a Southwest Oncology Group Study)." *Clin Cancer Res* **4**(5): 1263-6.
- Ciocca, D. R., Oesterreich, S., et al. (1993). "Biological and clinical implications of heat shock protein 27,000 (Hsp27): a review." *J Natl Cancer Inst* **85**(19): 1558-70.
- Ciocca, D. R., Stati, A. O., et al. (1990). "Colocalization of estrogen and progesterone receptors with an estrogen-regulated heat shock protein in paraffin sections of human breast and endometrial cancer tissue." *Breast Cancer Res Treat* **16**(3): 243-51.
- Clark, J. I. and Muchowski, P. J. (2000). "Small heat-shock proteins and their potential role in human disease." *Curr Opin Struct Biol* **10**(1): 52-9.
- Cornivelli, L., Zeidan, Q., et al. (2003). "HSP70 interacts with ribosomal subunits of thermotolerant cells." *Shock* **20**(4): 320-5.
- Costigan, M., Mannion, R. J., et al. (1998). "Heat shock protein 27: developmental regulation and expression after peripheral nerve injury." *J Neurosci* **18**(15): 5891-900.
- Craig, E. A., Weissman, J. S., et al. (1994). "Heat shock proteins and molecular chaperones: mediators of protein conformation and turnover in the cell." *Cell* **78**(3): 365-72.
- Csermely, P., Schnaider, T., et al. (1998). "The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review." *Pharmacol Ther* **79**(2): 129-68.
- Cuadros, M. A., Rodriguez-Ruiz, J., et al. (1997). "Microglia development in the quail cerebellum." *J Comp Neurol* **389**(3): 390-401.
- Czyz, J., Guan, K., et al. (2004). "High frequency electromagnetic fields (GSM signals) affect gene expression levels in tumor suppressor p53-deficient embryonic stem cells." *Bioelectromagnetics* **25**(4): 296-307.

D

- d'Ambrosio, G., Massa, R., et al. (2002). "Cytogenetic damage in human lymphocytes following GSMK phase modulated microwave exposure." *Bioelectromagnetics* **23**(1): 7-13.

- D'Souza, S. M. and Brown, I. R. (1998). "Constitutive expression of heat shock proteins Hsp90, Hsc70, Hsp70 and Hsp60 in neural and non-neural tissues of the rat during postnatal development." *Cell Stress Chaperones* **3**(3): 188-99.
- Dasenbrock, C. (2005). "Animal carcinogenicity studies on radiofrequency fields related to mobile phones and base stations." *Toxicol Appl Pharmacol* **207**(2 Suppl): 342-6.
- Dawe, A. S., Smith, B., et al. (2006). "A small temperature rise may contribute towards the apparent induction by microwaves of heat-shock gene expression in the nematode *Caenorhabditis Elegans*." *Bioelectromagnetics* **27**(2): 88-97.
- de Jong, W. W., Caspers, G. J., et al. (1998). "Genealogy of the alpha-crystallin--small heat-shock protein superfamily." *Int J Biol Macromol* **22**(3-4): 151-62.
- de Pomerai, D., Daniells, C., et al. (2000). "Non-thermal heat-shock response to microwaves." *Nature* **405**(6785): 417-8.
- Delpino, A., Mileo, A. M., et al. (1996). "Characterization of a new high-temperature-induced 66-kDa heat-shock protein, antigenically related to heat-shock protein 72." *J Cell Biochem* **63**(1): 51-60.
- Demsia, G., Vlastos, D., et al. (2004). "Effect of 910-MHz electromagnetic field on rat bone marrow." *ScientificWorldJournal* **4 Suppl 2**: 48-54.
- Depledge, M. H. (1994). "Genotypic toxicity: implications for individuals and populations." *Environ Health Perspect* **102 Suppl 12**: 101-4.
- Desta, A. B., Owen, R. D., et al. (2003). "Non-thermal exposure to radiofrequency energy from digital wireless phones does not affect ornithine decarboxylase activity in L929 cells." *Radiat Res* **160**(4): 488-91.
- Devaja, O., King, R. J., et al. (1997). "Heat-shock protein 27 (HSP27) and its role in female reproductive organs." *Eur J Gynaecol Oncol* **18**(1): 16-22.
- Dhawan, J. and Farmer, S. R. (1990). "Regulation of alpha 1 (I)-collagen gene expression in response to cell adhesion in Swiss 3T3 fibroblasts." *J Biol Chem* **265**(16): 9015-21.
- Diem, E., Schwarz, C., et al. (2005). "Non-thermal DNA breakage by mobile-phone radiation (1800 MHz) in human fibroblasts and in transformed GFSH-R17 rat granulosa cells in vitro." *Mutat Res* **583**(2): 178-83.
- Ding, X. Z., Smallridge, R. C., et al. (1996). "Increases in HSF1 translocation and synthesis in human epidermoid A-431 cells: role of protein kinase C and [Ca²⁺]_i." *J Investig Med* **44**(4): 144-53.
- Ding, Y., Wen, Y., et al. (2002). "Proapoptotic and antitumor activities of adenovirus-mediated p202 gene transfer." *Clin Cancer Res* **8**(10): 3290-7.
- Doerwald, L., Onnekink, C., et al. (2003). "Translational thermotolerance provided by small heat shock proteins is limited to cap-dependent initiation and inhibited by 2-aminopurine." *J Biol Chem* **278**(50): 49743-50.
- Doerwald, L., van Genesen, S. T., et al. (2006). "The effect of alphaB-crystallin and Hsp27 on the availability of translation initiation factors in heat-shocked cells." *Cell Mol Life Sci* **63**(6): 735-43.
- Dong, Z., Saikumar, P., et al. (1997). "Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases." *Am J Pathol* **151**(5): 1205-13.
- Drouin, R. and Therrien, J. P. (1997). "UVB-induced cyclobutane pyrimidine dimer frequency correlates with skin cancer mutational hotspots in p53." *Photochem Photobiol* **66**(5): 719-26.
- Duez, P., Dehon, G., et al. (2003). "Statistics of the Comet assay: a key to discriminate between genotoxic effects." *Mutagenesis* **18**(2): 159-66.

- Duval, C., Regnier, M., et al. (2001). "Distinct melanogenic response of human melanocytes in mono-culture, in co-culture with keratinocytes and in reconstructed epidermis, to UV exposure." *Pigment Cell Res* **14**(5): 348-55.
- Duval, C., Schmidt, R., et al. (2003). "The use of reconstructed human skin to evaluate UV-induced modifications and sunscreen efficacy." *Exp Dermatol* **12 Suppl 2**: 64-70.
- Duval, C., Smit, N. P., et al. (2002). "Keratinocytes control the pheo/eumelanin ratio in cultured normal human melanocytes." *Pigment Cell Res* **15**(6): 440-6.

E

- Edgell, C. J., McDonald, C. C., et al. (1983). "Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization." *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(12): 3734-7.
- Edwards, M. J., Marks, R., et al. (1991). "Heat shock proteins in cultured human keratinocytes and fibroblasts." *J Invest Dermatol* **96**(3): 392-6.
- Edwards, M. J., Nazmi, N., et al. (1999). "Hsp72 antigen expression in the proliferative compartment of involved psoriatic epidermis." *J Cutan Pathol* **26**(10): 483-9.
- Ellis, R. J. (1990). "The molecular chaperone concept." *Semin Cell Biol* **1**(1): 1-9.
- Elmets, C. A., Bergstresser, P. R., et al. (1982). "Differential distribution of Langerhans cells in organ culture of human skin." *J Invest Dermatol* **79**(5): 340-5.
- Esen, F. and Esen, H. (2006). "Effect of electromagnetic fields emitted by cellular phones on the latency of evoked electrodermal activity." *Int J Neurosci* **116**(3): 321-9.

F

- Fabre-Jonca, N., Gonin, S., et al. (1995). "Thermal sensitivity in NIH 3T3 fibroblasts transformed by the v-fos oncogene. Correlation with reduced accumulation of 68-kDa and 25-kDa stress proteins after heat shock." *Eur J Biochem* **232**(1): 118-28.
- Facy, V., Flouret, V., et al. (2005). "Reactivity of Langerhans cells in human reconstructed epidermis to known allergens and UV radiation." *Toxicol In Vitro* **19**(6): 787-95.
- Faller, C., Bracher, M., et al. (2002). "Predictive ability of reconstructed human epidermis equivalents for the assessment of skin irritation of cosmetics." *Toxicol In Vitro* **16**(5): 557-72.
- Fan, L., Busser, B. W., et al. (2003). "Antigen presentation by keratinocytes directs autoimmune skin disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(6): 3386-91.
- Fauconneau, B., Petegnief, V., et al. (2002). "Induction of heat shock proteins (HSPs) by sodium arsenite in cultured astrocytes and reduction of hydrogen peroxide-induced cell death." *J Neurochem* **83**(6): 1338-48.
- Fazio, M. J., Olsen, D. R., et al. (1988). "Isolation and characterization of human elastin cDNAs, and age-associated variation in elastin gene expression in cultured skin fibroblasts." *Lab Invest* **58**(3): 270-7.
- Feder, M. E. and Hofmann, G. E. (1999). "Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology." *Annu Rev Physiol* **61**: 243-82.

- Ferguson, P. C., Boynton, E. L., et al. (1999). "Intradermal injection of autologous dermal fibroblasts improves wound healing in irradiated skin." *J Surg Res* **85**(2): 331-8.
- Fernandes, M., Xiao, H., et al. (1994). "Fine structure analyses of the *Drosophila* and *Saccharomyces* heat shock factor--heat shock element interactions." *Nucleic Acids Res* **22**(2): 167-73.
- Fillebeen, C., Ruchoux, M. M., et al. (2001). "Lactoferrin is synthesized by activated microglia in the human substantia nigra and its synthesis by the human microglial CHME cell line is upregulated by tumor necrosis factor alpha or 1-methyl-4-phenylpyridinium treatment." *Brain Res Mol Brain Res* **96**(1-2): 103-13.
- Fink, S. L., Chang, L. K., et al. (1997). "Defective herpes simplex virus vectors expressing the rat brain stress-inducible heat shock protein 72 protect cultured neurons from severe heat shock." *J Neurochem* **68**(3): 961-9.
- Finnie, J. W., Blumbergs, P. C., et al. (2006a). "Effect of mobile telephony on blood-brain barrier permeability in the fetal mouse brain." *Pathology* **38**(1): 63-5.
- Finnie, J. W., Cai, Z., et al. (2006b). "Expression of the immediate early gene, c-fos, in fetal brain after whole of gestation exposure of pregnant mice to global system for mobile communication microwaves." *Pathology* **38**(4): 333-5.
- Finnie, J. W., Blumbergs, P. C., et al. (2002). "Effect of long-term mobile communication microwave exposure on vascular permeability in mouse brain." *Pathology* **34**(4): 344-7.
- Finnie, J. W., Blumbergs, P. C., et al. (2001). "Effect of global system for mobile communication (gsm)-like radiofrequency fields on vascular permeability in mouse brain." *Pathology* **33**(3): 338-40.
- Fouchaq, B., Benaroudj, N., et al. (1999). "Oligomerization of the 17-kDa peptide-binding domain of the molecular chaperone HSC70." *Eur J Biochem* **259**(1-2): 379-84.
- Forgacs, Z., Kubinyi, G., et al. (2005). "Effects of 1800 MHz GSM-like exposure on the gonadal function and hematological parameters of male mice." *Magy Onkol* **49**(2): 149-51.
- Forgacs, Z., Somosy, Z., et al. (2006). "Effect of whole-body 1800MHz GSM-like microwave exposure on testicular steroidogenesis and histology in mice." *Reprod Toxicol* **22**(1): 111-7.
- Franke, H., Ringelstein, E. B., et al. (2005a). "Electromagnetic fields (GSM 1800) do not alter blood-brain barrier permeability to sucrose in models in vitro with high barrier tightness." *Bioelectromagnetics* **26**(7): 529-35.
- Franke, H., Streckert, J., et al. (2005b). "Effects of Universal Mobile Telecommunications System (UMTS) electromagnetic fields on the blood-brain barrier in vitro." *Radiat Res* **164**(3): 258-69.
- Frangiannis, N. G., Mendoza, L. H., et al. (2001). "Induction and suppression of interferon-inducible protein 10 in reperfused myocardial infarcts may regulate angiogenesis." *Faseb J* **15**(8): 1428-30.
- Freedberg, I. M., Tomic-Canic, M., et al. (2001). "Keratins and the keratinocyte activation cycle." *J Invest Dermatol* **116**(5): 633-40.
- Frei, M. R., Berger, R. E., et al. (1998a). "Chronic exposure of cancer-prone mice to low-level 2450 MHz radiofrequency radiation." *Bioelectromagnetics* **19**(1): 20-31.
- Frei, M. R., Jauchem, J. R., et al. (1998b). "Chronic, low-level (1.0 W/kg) exposure of mice prone to mammary cancer to 2450 MHz microwaves." *Radiat Res* **150**(5): 568-76.
- Friedrich, K. L., Giese, K. C., et al. (2004). "Interactions between small heat shock protein subunits and substrate in small heat shock protein-substrate complexes." *J Biol Chem* **279**(2): 1080-9.

- Fritze, K., Sommer, C., et al. (1997)a. "Effect of global system for mobile communication (GSM) microwave exposure on blood-brain barrier permeability in rat." Acta Neuropathol (Berl) **94**(5): 465-70.
- Fritze, K., Wiessner, C., et al. (1997)b. "Effect of global system for mobile communication microwave exposure on the genomic response of the rat brain." Neuroscience **81**(3): 627-39.

G

- Gandarillas, A. (2000). "Epidermal differentiation, apoptosis, and senescence: common pathways?" Exp Gerontol **35**(1): 53-62.
- Gandarillas, A., Goldsmith, L. A., et al. (1999). "Evidence that apoptosis and terminal differentiation of epidermal keratinocytes are distinct processes." Exp Dermatol **8**(1): 71-9.
- Ganea, E. (2001). "Chaperone-like activity of alpha-crystallin and other small heat shock proteins." Curr Protein Pept Sci **2**(3): 205-25.
- Garrido, C., Gurbuxani, S., et al. (2001). "Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death." Biochem Biophys Res Commun **286**(3): 433-42.
- Geller, L., Thuroczy, G., et al. (2001). "[In vitro and in vivo study of electromagnetic compatibility of cellular phones and pacemakers]." Orv Hetil **142**(36): 1963-70.
- Gerhards, R. E. and Mehnert, F. E. (1986). "A set of stage-dependent embryonic antigens expressed in cell cultures of BALB/c mouse embryos and in transformed cell lines." J Cell Biochem **31**(1): 27-39.
- Gernold, M., Knauf, U., et al. (1993). "Development and tissue-specific distribution of mouse small heat shock protein hsp25." Dev Genet **14**(2): 103-11.
- Gibbons, N. B., Watson, R. W., et al. (2000). "Heat-shock proteins inhibit induction of prostate cancer cell apoptosis." Prostate **45**(1): 58-65.
- Glover, J. R. and Lindquist, S. (1998). "Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins." Cell **94**(1): 73-82.
- Goodson, M. L. and Sarge, K. D. (1995). "Heat-inducible DNA binding of purified heat shock transcription factor 1." J Biol Chem **270**(6): 2447-50.
- Gorlitz, B. D., Muller, M., et al. (2005). "Effects of 1-week and 6-week exposure to GSM/DCS radiofrequency radiation on micronucleus formation in B6C3F1 mice." Radiat Res **164**(4 Pt 1): 431-9.
- Goulet, F., Poitras, A., et al. (1996). "Stimulation of human keratinocyte proliferation through growth factor exchanges with dermal fibroblasts in vitro." Burns **22**(2): 107-12.
- Grandjean-Laquerriere, A., Le Naour, R., et al. (2003). "Differential regulation of TNF-alpha, IL-6 and IL-10 in UVB-irradiated human keratinocytes via cyclic AMP/protein kinase A pathway." Cytokine **23**(4-5): 138-49.
- Guay, J., Lambert, H., et al. (1997). "Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27." J Cell Sci **110** (Pt 3): 357-68.

H

- Hachem, J. P., Crumrine, D., et al. (2003). "pH directly regulates epidermal permeability barrier homeostasis, and stratum corneum integrity/cohesion." J Invest Dermatol **121**(2): 345-53.
- Hallare, A. V., Pagulayan, R., et al. (2005). "Assessing water quality in a tropical lake using biomarkers in zebrafish embryos: developmental toxicity and stress protein responses." Environ Monit Assess **104**(1-3): 171-87.
- Haseloff, R. F., Krause, E., et al. (2006). "Differential protein expression in brain capillary endothelial cells induced by hypoxia and posthypoxic reoxygenation." Proteomics **6**(6): 1803-9.
- Hashikawa, N. and Sakurai, H. (2004). "Phosphorylation of the yeast heat shock transcription factor is implicated in gene-specific activation dependent on the architecture of the heat shock element." Mol Cell Biol **24**(9): 3648-59.
- Hatayama, T., Kano, E., et al. (1991). "Role of heat-shock proteins in the induction of thermotolerance in Chinese hamster V79 cells by heat and chemical agents." Int J Hyperthermia **7**(1): 61-74.
- Heikkinen, P., Kosma, V. M., et al. (2003). "Effects of mobile phone radiation on UV-induced skin tumorigenesis in ornithine decarboxylase transgenic and non-transgenic mice." Int J Radiat Biol **79**(4): 221-33.
- Hennessy, F., Nicoll, W. S., et al. (2005). "Not all J domains are created equal: implications for the specificity of Hsp40-Hsp70 interactions." Protein Sci **14**(7): 1697-709.
- Hettinga, J. V., Lemstra, W., et al. (1996). "Heat-shock protein expression in cisplatin-sensitive and -resistant human tumor cells." Int J Cancer **67**(6): 800-7.
- Hibi, M., Lin, A., et al. (1993). "Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain." Genes Dev **7**(11): 2135-48.
- Higashikubo, R., Culbreth, V. O., et al. (1999). "Radiofrequency electromagnetic fields have no effect on the in vivo proliferation of the 9L brain tumor." Radiat Res **152**(6): 665-71.
- Hinrichs, H. and Heinze, H. J. (2004). "Effects of GSM electromagnetic field on the MEG during an encoding-retrieval task." Neuroreport **15**(7): 1191-4.
- Holick, M. F. (1981). "The cutaneous photosynthesis of previtamin D3: a unique photoendocrine system." J Invest Dermatol **77**(1): 51-8.
- Huot, J., Houle, F., et al. (1996). "HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress." Cancer Res **56**(2): 273-9.

I

- Imaida, K., Taki, M., et al. (1998). "Lack of promoting effects of the electromagnetic near-field used for cellular phones (929.2 MHz) on rat liver carcinogenesis in a medium-term liver bioassay." Carcinogenesis **19**(2): 311-4.

IT'IS Handbook. Chapter 6 "In vitro setup for 1800 MHz"
disponible par le lien http://www.itis.ethz.ch/index/index_sxc1800.html

J

- Jantschitsch, C., Kindas-Mugge, I., et al. (1998). "Expression of the small heat shock protein HSP 27 in developing human skin." *Br J Dermatol* **139**(2): 247-53.
- Jolly, C. and Morimoto, R. I. (2000). "Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death." *J Natl Cancer Inst* **92**(19): 1564-72.
- Jonak, C., Metze, D., et al. (2005). "The expression of the 27-kd heat shock protein in keratinization disorders: an immunohistological study." *Hum Pathol* **36**(6): 686-93.
- Joubert, V., Leveque, P., et al. (2006). "Microwave exposure of neuronal cells in vitro: Study of apoptosis." *Int J Radiat Biol* **82**(4) 267-75.

K

- Kampinga, H. H., Kanon, B., et al. (2003). "Overexpression of the cochaperone CHIP enhances Hsp70-dependent folding activity in mammalian cells." *Mol Cell Biol* **23**(14): 4948-58.
- Kanitakis, J. (2002). "Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin." *Eur J Dermatol* **12**(4): 390-9; quiz 400-1.
- Kaundal, R. K., Shah, K. K., et al. (2006). "Neuroprotective effects of NU1025, a PARP inhibitor in cerebral ischemia are mediated through reduction in NAD depletion and DNA fragmentation." *Life Sci.* **79**(24):2293-302.
- Kawagoe, J., Abe, K., et al. (1992). "Distributions of heat shock protein-70 mRNAs and heat shock cognate protein-70 mRNAs after transient global ischemia in gerbil brain." *J Cereb Blood Flow Metab* **12**(5): 794-801.
- Kawagoe, J., Abe, K., et al. (1992). "Distributions of heat shock protein (HSP) 70 and heat shock cognate protein (HSC) 70 mRNAs after transient focal ischemia in rat brain." *Brain Res* **587**(2): 195-202.
- Kelley, P. M. and Schlesinger, M. J. (1978). "The effect of amino acid analogues and heat shock on gene expression in chicken embryo fibroblasts." *Cell* **15**(4): 1277-86.
- Kelley, W. L. (1999). "Molecular chaperones: How J domains turn on Hsp70s." *Curr Biol* **9**(8): R305-8.
- Kelly, S. and Yenari, M. A. (2002). "Neuroprotection: heat shock proteins." *Curr Med Res Opin* **18 Suppl 2**: s55-60.
- Keshvari, J. and Lang, S. (2005). "Comparison of radio frequency energy absorption in ear and eye region of children and adults at 900, 1800 and 2450 MHz." *Phys Med Biol* **50**(18): 4355-69.
- Khalil, S., Luciano, J., et al. (2006). "Dynamic regulation and involvement of the heat shock transcriptional response in arsenic carcinogenesis." *J Cell Physiol* **207**(2): 562-9.

- Kiang, J. G., Marotta, D., et al. (2002). "External bioenergy increases intracellular free calcium concentration and reduces cellular response to heat stress." J Investig Med **50**(1): 38-45.
- Kiang, J. G. and Tsokos, G. C. (1998). "Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology." Pharmacol Ther **80**(2): 183-201.
- Kilemade, M. and Mothersill, C. (2001). "Heat shock protein 70 levels in rainbow trout primary epidermal cultures in response to 2,4-dichloroaniline exposure: a novel in vitro aquatic toxicity marker." Environ Toxicol **16**(3): 253-9.
- Kimata, H. (2002). "Enhancement of allergic skin wheal responses by microwave radiation from mobile phones in patients with atopic eczema/dermatitis syndrome." Int Arch Allergy Immunol **129**(4): 348-50.
- Kimata, H. (2003). "Enhancement of allergic skin wheal responses in patients with atopic eczema/dermatitis syndrome by playing video games or by a frequently ringing mobile phone." Eur J Clin Invest **33**(6): 513-7.
- Kimata, H. (2004). "Laughter counteracts enhancement of plasma neurotrophin levels and allergic skin wheal responses by mobile phone-mediated stress." Behav Med **29**(4): 149-52.
- Kim, S. A., Yoon, J. H., et al. (2005). "Polo-like kinase 1 phosphorylates heat shock transcription factor 1 and mediates its nuclear translocation during heat stress." J Biol Chem **280**(13): 12653-7.
- Kindas-Mugge, I. and Trautinger, F. (1994). "Increased expression of the M(r) 27,000 heat shock protein (hsp27) in in vitro differentiated normal human keratinocytes." Cell Growth Differ **5**(7): 777-81.
- Kitagawa, K., Matsumoto, M., et al. (1996). "Ischemic tolerance in moderately symptomatic gerbils after unilateral carotid occlusion." Brain Res **716**(1-2): 39-46.
- Klemenz, R., Andres, A. C., et al. (1993). "Expression of the murine small heat shock proteins hsp 25 and alpha B crystallin in the absence of stress." J Cell Biol **120**(3): 639-45.
- Kluck, R. M., Bossy-Wetzel, E., et al. (1997). "The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis." Science **275**(5303): 1132-6.
- Krebs, R. A. and Feder, M. E. (1998). "Hsp70 and larval thermotolerance in *Drosophila melanogaster*: how much is enough and when is more too much?" J Insect Physiol **44**(11): 1091-1101.
- Kregel, K. C. (2002). "Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance." J Appl Physiol **92**(5): 2177-86.
- Kretzschmar, D. and Pflugfelder, G. O. (2002). "Glia in development, function, and neurodegeneration of the adult insect brain." Brain Res Bull **57**(1): 121-31.
- Kreutzberg, G. W. (1996). "Microglia: a sensor for pathological events in the CNS." Trends Neurosci **19**(8): 312-8.
- Krimmer, T., Rassow, J., et al. (2000). "Mitochondrial protein import motor: the ATPase domain of matrix Hsp70 is crucial for binding to Tim44, while the peptide binding domain and the carboxy-terminal segment play a stimulatory role." Mol Cell Biol **20**(16): 5879-87.
- Kronidou, N. G., Oppliger, W., et al. (1994). "Dynamic interaction between Isp45 and mitochondrial hsp70 in the protein import system of the yeast mitochondrial inner membrane." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(26): 12818-22.
- Krutmann, J. (2000). "Phototherapy for atopic dermatitis." Clin Exp Dermatol **25**(7): 552-8.
- Kudo, M., Naito, Z., et al. (1999). "Effects of quercetin and sunphenon on responses of cancer cells to heat shock damage." Exp Mol Pathol **66**(1): 66-75.

L

- La Regina, M., Moros, E. G., et al. (2003). "The effect of chronic exposure to 835.62 MHz FDMA or 847.74 MHz CDMA radiofrequency radiation on the incidence of spontaneous tumors in rats." *Radiat Res* **160**(2): 143-51.
- Labat-Robert, J. (2003). "Age-dependent remodeling of connective tissue: role of fibronectin and laminin." *Pathol Biol (Paris)* **51**(10): 563-8.
- Lai, H. and Singh, N. P. (1995). "Acute low-intensity microwave exposure increases DNA single-strand breaks in rat brain cells." *Bioelectromagnetics* **16**(3): 207-10.
- Lai, H. and Singh, N. P. (1996). "Single- and double-strand DNA breaks in rat brain cells after acute exposure to radiofrequency electromagnetic radiation." *Int J Radiat Biol* **69**(4): 513-21.
- Lai, H. and Singh, N. P. (1997). "Melatonin and a spin-trap compound block radiofrequency electromagnetic radiation-induced DNA strand breaks in rat brain cells." *Bioelectromagnetics* **18**(6): 446-54.
- Landry, J., Lambert, H., et al. (1992). "Human HSP27 is phosphorylated at serines 78 and 82 by heat shock and mitogen-activated kinases that recognize the same amino acid motif as S6 kinase II." *J Biol Chem* **267**(2): 794-803.
- Landry, J. and Huot, J. (1999). "Regulation of actin dynamics by stress-activated protein kinase 2 (SAPK2)-dependent phosphorylation of heat-shock protein of 27 kDa (Hsp27)." *Biochem Soc Symp* **64**: 79-89.
- Laplante, A. F., Moulin, V., et al. (1998). "Expression of heat shock proteins in mouse skin during wound healing." *J Histochem Cytochem* **46**(11): 1291-301.
- Laval, L., Leveque, P., et al. (2000). "A new in vitro exposure device for the mobile frequency of 900 MHz." *Bioelectromagnetics* **21**(4): 255-63.
- Lavoie, J. N., Hickey, E., et al. (1993)a. "Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27." *J Biol Chem* **268**(32): 24210-4.
- Lavoie, J. N., Gingras-Breton, G., et al. (1993)b. "Induction of Chinese hamster HSP27 gene expression in mouse cells confers resistance to heat shock. HSP27 stabilization of the microfilament organization." *J Biol Chem* **268**(5): 3420-9.
- Lee, D. Y., Park, K. C., et al. (2001). "In a skin equivalent HaCaT cells have a preserved capacity to receive melanosomes but melanocytes do not remain in the basal location." *Arch Dermatol Res* **293**(5): 268-72.
- Lee, S. M., Lee, S. B., et al. (2006). "Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: A potential biomarker of freshwater monitoring." *Chemosphere* **65**(6):1074-81.
- Lee, Y. J. and Dewey, W. C. (1987). "Effect of cycloheximide or puromycin on induction of thermotolerance by sodium arsenite in Chinese hamster ovary cells: involvement of heat shock proteins." *J Cell Physiol* **132**(1): 41-8.
- Leenders, H. J. and Beckers, P. J. (1972). "The effect of changes in the respiratory metabolism upon genome activity. A correlation between induced gene activity and an increase in activity of a respiratory enzyme." *J Cell Biol* **55**(2): 257-65.
- Leicht, B. G., Biessmann, H., et al. (1986). "Small heat shock proteins of *Drosophila* associate with the cytoskeleton." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(1): 90-4.

- Leong, S. K. and Ling, E. A. (1992). "Amoeboid and ramified microglia: their interrelationship and response to brain injury." Glia **6**(1): 39-47.
- Leszczynski, D., Joenvaara, S., et al. (2002). "Non-thermal activation of the hsp27/p38MAPK stress pathway by mobile phone radiation in human endothelial cells: molecular mechanism for cancer- and blood-brain barrier-related effects." Differentiation **70**(2-3): 120-9.
- Lévêque, P., Dale, C., Veyret, B., and Wiart, J. (2004). "Dosimetric Analysis of a local exposure system for rat operating at 900 MHz". IEEE Transactions on microwave theory and techniques **52**(8): 2076-2083
- Levinson, W., Oppermann, H., et al. (1980). "Transition series metals and sulfhydryl reagents induce the synthesis of four proteins in eukaryotic cells." Biochim Biophys Acta **606**(1): 170-80.
- Li, G. C. and Laszlo, A. (1985). "Amino acid analogs while inducing heat shock proteins sensitize CHO cells to thermal damage." J Cell Physiol **122**(1): 91-7.
- Li, J., Farthing, P. M., et al. (1996). "Cytokine regulation of major histocompatibility complex antigen expression by human oral and skin keratinocytes." Arch Oral Biol **41**(6): 533-8.
- Li, J. R., Chou, C. K., et al. (1999). "TP53 tumor suppressor protein in normal human fibroblasts does not respond to 837 MHz microwave exposure." Radiat Res **151**(6): 710-6.
- Limat, A., Salomon, D., et al. (1999). "Human melanocytes grown in epidermal equivalents transfer their melanin to follicular outer root sheath keratinocytes." Arch Dermatol Res **291**(6): 325-32.
- Lindner, R. A., Carver, J. A., et al. (2000). "Mouse Hsp25, a small shock protein. The role of its C-terminal extension in oligomerization and chaperone action." Eur J Biochem **267**(7): 1923-32.
- Lindner, R. A., Kapur, A., et al. (1998). "Structural alterations of alpha-crystallin during its chaperone action." Eur J Biochem **258**(1): 170-83.
- Lindsay, R. M. (1995). "Neuron saving schemes." Nature **373**(6512): 289-90.
- Linz, K. W., von Westphalen, C., et al. (1999). "Membrane potential and currents of isolated heart muscle cells exposed to pulsed radio frequency fields." Bioelectromagnetics **20**(8): 497-511.
- Liu, A. Y., Bae-Lee, M. S., et al. (1989a). "Heat shock induction of HSP 89 is regulated in cellular aging." Biochem Biophys Res Commun **162**(3): 1302-10.
- Liu, A. Y., Lin, Z., et al. (1989b). "Attenuated induction of heat shock gene expression in aging diploid fibroblasts." J Biol Chem **264**(20): 12037-45.
- Liu, H., Miller, E., et al. (1998). "Endoplasmic reticulum stress proteins block oxidant-induced Ca²⁺ increases and cell death." J Biol Chem **273**(21): 12858-62.
- Liu, R. Y., Corry, P. M., et al. (1994). "Regulation of chemical stress-induced hsp70 gene expression in murine L929 cells." J Cell Sci **107** (Pt 8): 2209-14.
- Liu, X. D., Liu, P. C., et al. (1997). "Conservation of a stress response: human heat shock transcription factors functionally substitute for yeast HSF." Embo J **16**(21): 6466-77.
- Loones, M. T., Chang, Y., et al. (2000). "The distribution of heat shock proteins in the nervous system of the unstressed mouse embryo suggests a role in neuronal and non-neuronal differentiation." Cell Stress Chaperones **5**(4): 291-305.
- Love, S. (1999). "Oxidative stress in brain ischemia." Brain Pathol **9**(1): 119-31.
- Luger, T. A., Bhardwaj, R. S., et al. (1996). "Regulation of the immune response by epidermal cytokines and neurohormones." J Dermatol Sci **13**(1): 5-10.

M

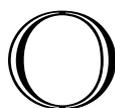
- Maderna, P. and Godson, C. (2003). "Phagocytosis of apoptotic cells and the resolution of inflammation." *Biochim Biophys Acta* **1639**(3): 141-51.
- Magistretti, P. J. (2006). "Neuron-glia metabolic coupling and plasticity." *J Exp Biol* **209**(Pt 12): 2304-11.
- Magistretti, P. J. and Pellerin, L. (1996). "Cellular mechanisms of brain energy metabolism. Relevance to functional brain imaging and to neurodegenerative disorders." *Ann N Y Acad Sci* **777**: 380-7.
- Magistretti, P. J., Sorg, O., et al. (1993). "Neurotransmitters regulate energy metabolism in astrocytes: implications for the metabolic trafficking between neural cells." *Dev Neurosci* **15**(3-5): 306-12.
- Malyapa, R. S., Ahern, E. W., et al. (1998). "DNA damage in rat brain cells after in vivo exposure to 2450 MHz electromagnetic radiation and various methods of euthanasia." *Radiat Res* **149**(6): 637-45.
- Marchetti, P., Castedo, M., et al. (1996). "Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis." *J Exp Med* **184**(3): 1155-60.
- Marin-Teva, J. L., Dusart, I., et al. (2004). "Microglia promote the death of developing Purkinje cells." *Neuron* **41**(4): 535-47.
- Mattei, E., Delpino, A., et al. (1986). "Induction of stress proteins in murine and human melanoma cell cultures." *Tumori* **72**(2): 129-34.
- Maytin, E. V. (1992). "Differential effects of heat shock and UVB light upon stress protein expression in epidermal keratinocytes." *J Biol Chem* **267**(32): 23189-96.
- Maytin, E. V. (1995). "Heat shock proteins and molecular chaperones: implications for adaptive responses in the skin." *J Invest Dermatol* **104**(4): 448-55.
- McCall, C. A. and Cohen, J. J. (1991). "Programmed cell death in terminally differentiating keratinocytes: role of endogenous endonuclease." *J Invest Dermatol* **97**(1): 111-4.
- McLaughlin, B., Hartnett, K. A., et al. (2003). "Caspase 3 activation is essential for neuroprotection in preconditioning." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(2): 715-20.
- Mercier, P. A., Winegarden, N. A., et al. (1999). "Human heat shock factor 1 is predominantly a nuclear protein before and after heat stress." *J Cell Sci* **112** (Pt 16): 2765-74.
- Merwald, H., Kokesch, C., et al. (2006). "Induction of the 72-kilodalton heat shock protein and protection from ultraviolet B-induced cell death in human keratinocytes by repetitive exposure to heat shock or 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2." *Cell Stress Chaperones* **11**(1): 81-8.
- Michels, A. A., Kanon, B., et al. (1997). "Hsp70 and Hsp40 chaperone activities in the cytoplasm and the nucleus of mammalian cells." *J Biol Chem* **272**(52): 33283-9.
- Miller, A. L. (2005). "Epidemiology, etiology, and natural treatment of seasonal affective disorder." *Altern Med Rev* **10**(1): 5-13.
- Miller, L. and Qureshi, M. A. (1992). "Heat-shock protein synthesis in chicken macrophages: influence of in vivo and in vitro heat shock, lead acetate, and lipopolysaccharide." *Poult Sci* **71**(6): 988-98.
- Miron, T., Vancompernelle, K., et al. (1991). "A 25-kD inhibitor of actin polymerization is a low molecular mass heat shock protein." *J Cell Biol* **114**(2): 255-61.

- Mivechi, N. F. and Giaccia, A. J. (1995). "Mitogen-activated protein kinase acts as a negative regulator of the heat shock response in NIH3T3 cells." Cancer Res **55**(23): 5512-9.
- Miyakoshi, J., Takemasa, K., et al. (2005). "Effects of exposure to a 1950 MHz radio frequency field on expression of Hsp70 and Hsp27 in human glioma cells." Bioelectromagnetics **26**(4): 251-7.
- Monastirli, A., Vourekas, A., et al. (2005). "Hsp27 expression coincides with epidermal stratification during human epidermal morphogenesis." Acta Derm Venereol **85**(5): 389-93.
- Morano, K. A. and Thiele, D. J. (1999). "Heat shock factor function and regulation in response to cellular stress, growth, and differentiation signals." Gene Expr **7**(4-6): 271-82.
- Morita, T., Asano, N., et al. (1997). "Evaluation of the rodent micronucleus assay in the screening of IARC carcinogens (groups 1, 2A and 2B) the summary report of the 6th collaborative study by CSGMT/JEMS MMS. Collaborative Study of the Micronucleus Group Test. Mammalian Mutagenicity Study Group." Mutat Res **389**(1): 3-122.
- Moriyama-Gonda, N., Igawa, M., et al. (2000). "Heat-induced cellular damage and tolerance in combination with adriamycin for the PC-3 prostate cancer cell line: relationships with cytotoxicity, reactive oxygen species and heat shock protein 70 expression." Eur Urol **38**(2): 235-40.
- Morley, N., Curnow, A., et al. (2003). "N-acetyl-L-cysteine prevents DNA damage induced by UVA, UVB and visible radiation in human fibroblasts." J Photochem Photobiol B **72**(1-3): 55-60.
- Mosser, D. D., Caron, A. W., et al. (1997). "Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis." Mol Cell Biol **17**(9): 5317-27.
- Moulin, V., Castilloux, G., et al. (1998). "Modulated response to cytokines of human wound healing myofibroblasts compared to dermal fibroblasts." Exp Cell Res **238**(1): 283-93.
- Multhoff, G. (2002). "Activation of natural killer cells by heat shock protein 70." Int J Hyperthermia **18**(6): 576-85.
- Multhoff, G., Botzler, C., et al. (1998). "The role of heat shock proteins in the stimulation of an immune response." Biol Chem **379**(3): 295-300.
- Multhoff, G., Botzler, C., et al. (1995). "A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells." Int J Cancer **61**(2): 272-9.

N

- Nagai, A., Nakagawa, E., et al. (2001). "Generation and characterization of immortalized human microglial cell lines: expression of cytokines and chemokines." Neurobiol Dis **8**(6): 1057-68.
- Nagy, J. I., Ochalski, P. A., et al. (1997). "Evidence for the co-localization of another connexin with connexin-43 at astrocytic gap junctions in rat brain." Neuroscience **78**(2): 533-48.
- Narasimhan, P., Fujimura, M., et al. (2003). "Role of superoxide in poly(ADP-ribose) polymerase upregulation after transient cerebral ischemia." Brain Res Mol Brain Res **113**(1-2): 28-36.

- Narisawa, Y., Hashimoto, K., et al. (1992). "Biological significance of dermal Merkel cells in development of cutaneous nerves in human fetal skin." J Histochem Cytochem **40**(1): 65-71.
- Nguyen, V. T., Ndoye, A., et al. (2001). "Programmed cell death of keratinocytes culminates in apoptotic secretion of a humectant upon secretagogue action of acetylcholine." J Cell Sci **114**(Pt 6): 1189-204.
- Nishigori, C., Yarosh, D. B., et al. (1996). "Evidence that DNA damage triggers interleukin 10 cytokine production in UV-irradiated murine keratinocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(19): 10354-9.
- Nishimura, R. N., Dwyer, B. E., et al. (1992). "Characterization of the major 68 kDa heat shock protein in a rat transformed astroglial cell line." Brain Res Mol Brain Res **12**(1-3): 203-8.
- Nover, L. and Hightower, L. (1991). "Heat shock and development. Introduction." Results Probl Cell Differ **17**: 1-4.
- Noz, K. C., Roza, L., et al. (1994). "UV induction of cyclobutane thymine dimers in the DNA of cultured melanocytes from foreskin, common melanocytic nevi and dysplastic nevi." Photochem Photobiol **59**(5): 534-40.
- Nylund, R. and Leszczynski, D. (2004). "Proteomics analysis of human endothelial cell line EA.hy926 after exposure to GSM 900 radiation." Proteomics **4**(5): 1359-65.
- Nylund, R. and Leszczynski, D. (2006). "Mobile phone radiation causes changes in gene and protein expression in human endothelial cell lines and the response seems to be genome- and proteome-dependent." Proteomics **6**(17):4769-80



- Omar, R. A. and Lanks, K. W. (1984). "Heat shock protein synthesis and cell survival in clones of normal and simian virus 40-transformed mouse embryo cells." Cancer Res **44**(9): 3976-82.
- Oppenheim, R. W. (1989). "The neurotrophic theory and naturally occurring motoneuron death." Trends Neurosci **12**(7): 252-5.
- Orosz, A., Wisniewski, J., et al. (1996). "Regulation of Drosophila heat shock factor trimerization: global sequence requirements and independence of nuclear localization." Mol Cell Biol **16**(12): 7018-30.
- Ortonne, J. P. (2002). "From actinic keratosis to squamous cell carcinoma." Br J Dermatol **146 Suppl 61**: 20-3.
- Ortwerth, B. J. and Olesen, P. R. (1992). "Characterization of the elastase inhibitor properties of alpha-crystallin and the water-insoluble fraction from bovine lens." Exp Eye Res **54**(1): 103-11.
- Ozguner, F., Aydin, G., et al. (2004). "Prevention of mobile phone induced skin tissue changes by melatonin in rat: an experimental study." Toxicol Ind Health **20**(6-10): 133-9.

P

- Pacini, S., Ruggiero, M., et al. (2002). "Exposure to global system for mobile communication (GSM) cellular phone radiofrequency alters gene expression, proliferation, and morphology of human skin fibroblasts." *Oncol Res* **13**(1): 19-24.
- Palleros, D. R., Shi, L., et al. (1994). "hsp70-protein complexes. Complex stability and conformation of bound substrate protein." *J Biol Chem* **269**(18): 13107-14.
- Papaconstantinou, A. D., Brown, K. M., et al. (2003). "Mercury, cadmium, and arsenite enhance heat shock protein synthesis in chick embryos prior to embryotoxicity." *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* **68**(6): 456-64.
- Parcellier, A., Brunet, M., et al. (2006). "HSP27 favors ubiquitination and proteasomal degradation of p27Kip1 and helps S-phase re-entry in stressed cells." *Faseb J* **20**(8): 1179-81.
- Parcellier, A., Schmitt, E., et al. (2003). "HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaBalpha proteasomal degradation." *Mol Cell Biol* **23**(16): 5790-802.
- Paredi, P., Kharitonov, S. A., et al. (2001). "Local vasodilator response to mobile phones." *Laryngoscope* **111**(1): 159-62.
- Pedrycz, A. and Brzeski, Z. (2006). "L-arginine decreases heat shock protein 70 (marker of environmental stress) expression in kidney cells of rat fetuses during apoptosis--Late effect of Adriamycin action." *Ann Agric Environ Med* **13**(1): 129-32.
- Perfetto, B., Donnarumma, G., et al. (2003). "Bacterial components induce cytokine and intercellular adhesion molecules-1 and activate transcription factors in dermal fibroblasts." *Res Microbiol* **154**(5): 337-44.
- Petit, P. X., Susin, S. A., et al. (1996). "Mitochondria and programmed cell death: back to the future." *FEBS Lett* **396**(1): 7-13.
- Petrucelli, L., Dickson, D., et al. (2004). "CHIP and Hsp70 regulate tau ubiquitination, degradation and aggregation." *Hum Mol Genet* **13**(7): 703-14.
- Pilon, M. and Schekman, R. (1999). "Protein translocation: how Hsp70 pulls it off." *Cell* **97**(6): 679-82.
- Pina, G., Malzac, P., et al. (2000). Temporal skin warming during exposure to cellular telephones. Third International Conference on Bioelectromagnetism, Slovenia.
- Pirkkala, L., Nykanen, P., et al. (2001). "Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond." *Faseb J* **15**(7): 1118-31.
- Ponec, M. (2002). "Skin constructs for replacement of skin tissues for in vitro testing." *Adv Drug Deliv Rev* **54 Suppl 1**: S19-30.
- Poullietier de Gannes, F., Lagroye, I., et al. (2004). Effect of GSM-900 exposure on Hsp27 expression in Ea-Hy926 endothelial cells. BEMS, Washington.

R

- Radons, J. and Multhoff, G. (2005). "Immunostimulatory functions of membrane-bound and exported heat shock protein 70." *Exerc Immunol Rev* **11**: 17-33.
- Raff, M. C., Barres, B. A., et al. (1993). "Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system." *Science* **262**(5134): 695-700.

- Rallu, M., Loones, M., et al. (1997). "Function and regulation of heat shock factor 2 during mouse embryogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(6): 2392-7.
- Rance, A. J., Thonnes, M., et al. (1985). "Ribosomal protein S6 phosphorylation and morphological changes in response to the tumour promoter 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate in primary human tumour cells, established and transformed cell lines." Biochim Biophys Acta **847**(1): 128-31.
- Rassow, J., Maarse, A. C., et al. (1994). "Mitochondrial protein import: biochemical and genetic evidence for interaction of matrix hsp70 and the inner membrane protein MIM44." J Cell Biol **127**(6 Pt 1): 1547-56.
- Regnier, M., Staquet, M. J., et al. (1997). "Integration of Langerhans cells into a pigmented reconstructed human epidermis." J Invest Dermatol **109**(4): 510-2.
- Repacholi, M. H., Basten, A., et al. (1997). "Lymphomas in E mu-Pim1 transgenic mice exposed to pulsed 900 MHZ electromagnetic fields." Radiat Res **147**(5): 631-40.
- Richter, W. W. and Issinger, O. G. (1986). "Differential heat shock response of primary human cell cultures and established cell lines." Biochem Biophys Res Commun **141**(1): 46-52.
- Ritossa, F. (1996). "Discovery of the heat shock response." Cell Stress Chaperones **1**(2): 97-8.
- Robert, C., Lesty, C., et al. (1988). "Ageing of the skin: study of elastic fiber network modifications by computerized image analysis." Gerontology **34**(5-6): 291-6.
- Rosenbloom, J., Bashir, M., et al. (1991). "Regulation of elastin gene expression." Ann N Y Acad Sci **624**: 116-36.
- Rossi, J. M. and Lindquist, S. (1989). "The intracellular location of yeast heat-shock protein 26 varies with metabolism." J Cell Biol **108**(2): 425-39.
- Ryan, J. J., Prochownik, E., et al. (1994). "c-myc and bcl-2 modulate p53 function by altering p53 subcellular trafficking during the cell cycle." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(13): 5878-82.

S

- Sadis, S. and Hightower, L. E. (1992). "Unfolded proteins stimulate molecular chaperone Hsc70 ATPase by accelerating ADP/ATP exchange." Biochemistry **31**(39): 9406-12.
- Sakaguchi, M., Miyazaki, M., et al. (2001). "Identification of a phosphoprotein that is downregulated in immortalized human fibroblasts." Electrophoresis **22**(1): 155-60.
- Saklatvala, J., Kaur, P., et al. (1991). "Phosphorylation of the small heat-shock protein is regulated by interleukin 1, tumour necrosis factor, growth factors, bradykinin and ATP." Biochem J **277** (Pt 3): 635-42.
- Salford, L. G., Brun, A., et al. (1994). "Permeability of the blood-brain barrier induced by 915 MHz electromagnetic radiation, continuous wave and modulated at 8, 16, 50, and 200 Hz." Microsc Res Tech **27**(6): 535-42.
- Santini, R., Hosni, M., et al. (1988). "B16 melanoma development in black mice exposed to low-level microwave radiation." Bioelectromagnetics **9**(1): 105-7.
- Sarge, K. D. (1995). "Male germ cell-specific alteration in temperature set point of the cellular stress response." J Biol Chem **270**(32): 18745-8.
- Sarge, K. D., Murphy, S. P., et al. (1993). "Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of DNA-binding activity, and

- nuclear localization and can occur in the absence of stress." Mol Cell Biol **13**(3): 1392-407.
- Sasaki, T., Hori, H., et al. (1996). "Effects of a factor derived from polymorphonuclear leukocytes on the growth and collagen metabolism in normal and scleroderma skin fibroblast cultures." J Dermatol Sci **11**(1): 10-18.
- Schipper, H. M. (2000). "Heme oxygenase-1: role in brain aging and neurodegeneration." Exp Gerontol **35**(6-7): 821-30.
- Schirmer, E. C., Lindquist, S., et al. (1994). "An Arabidopsis heat shock protein complements a thermotolerance defect in yeast." Plant Cell **6**(12): 1899-909.
- Schmid-Wendtner, M. H. and Korting, H. C. (2006). "The pH of the Skin Surface and Its Impact on the Barrier Function." Skin Pharmacol Physiol **19**(6): 296-302.
- Schmid, G., Sauter, C., et al. (2005). "No influence on selected parameters of human visual perception of 1970 MHz UMTS-like exposure." Bioelectromagnetics **26**(4): 243-50.
- Schmid, D., Baici, A., et al. (1994). "Kinetics of molecular chaperone action." Science **263**(5149): 971-3.
- Schmidt-Rose, T., Pollet, D., et al. (1999). "Analysis of UV-B-induced DNA damage and its repair in heat-shocked skin cells." J Photochem Photobiol B **53**(1-3): 144-52.
- Schneider, H. C., Berthold, J., et al. (1994). "Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import." Nature **371**(6500): 768-74.
- Schothorst, A. A., Evers, L. M., et al. (1991). "Pyrimidine dimer induction and repair in cultured human skin keratinocytes or melanocytes after irradiation with monochromatic ultraviolet radiation." J Invest Dermatol **96**(6): 916-20.
- Schroeder, H. E. and Amstad-Jossi, M. (1984). "Type and variability of the stratum corneum in normal and diseased human oral stratified epithelia." J Biol Buccale **12**(2): 101-16.
- Schwarz, T. and Luger, T. A. (1989). "Effect of UV irradiation on epidermal cell cytokine production." J Photochem Photobiol B **4**(1): 1-13.
- Scidmore, M. A., Okamura, H. H., et al. (1993). "Genetic interactions between KAR2 and SEC63, encoding eukaryotic homologues of DnaK and DnaJ in the endoplasmic reticulum." Mol Biol Cell **4**(11): 1145-59.
- Sekihashi, K., Yamamoto, A., et al. (2002). "Comparative investigation of multiple organs of mice and rats in the comet assay." Mutat Res **517**(1-2): 53-75.
- Sheehan, J. M. and Young, A. R. (2002). "The sunburn cell revisited: an update on mechanistic aspects." Photochem Photobiol Sci **1**(6): 365-77.
- Sistonen, L., Sarge, K. D., et al. (1994). "Human heat shock factors 1 and 2 are differentially activated and can synergistically induce hsp70 gene transcription." Mol Cell Biol **14**(3): 2087-99.
- Song, Z. and Steller, H. (1999). "Death by design: mechanism and control of apoptosis." Trends Cell Biol **9**(12): M49-52.
- Sorger, P. K. and Pelham, H. R. (1987). "Purification and characterization of a heat-shock element binding protein from yeast." Embo J **6**(10): 3035-41.
- Speit, G., Schutz, P., Hoffmann, H. (2006) "Genotoxic effects of exposure to radiofrequency electromagnetic fields (RF-EMF) in cultured mammalian cells are not independently reproducible." Mutat Res. Online since 22nd September.
- Steinman, R., Hoffman, L., et al. (1995). "Maturation and migration of cutaneous dendritic cells." J Invest Dermatol **105**(1 Suppl): 2S-7S.
- Storm, F. K., Gilchrist, K. W., et al. (1995). "Distribution of Hsp-27 and HER-2/neu in in situ and invasive ductal breast carcinomas." Ann Surg Oncol **2**(1): 43-8.
- Storm, F. K., Mahvi, D. M., et al. (1996). "Lack of association between tumor necrosis and hsp-27 expression in primary breast cancer." J Surg Oncol **61**(1): 14-6.

- Strahler, J. R., Kuick, R., et al. (1991). "Diminished phosphorylation of a heat shock protein (HSP 27) in infant acute lymphoblastic leukemia." Biochem Biophys Res Commun **175**(1): 134-42.
- Straume, A., Oftedal, G., et al. (2005). "Skin temperature increase caused by a mobile phone: a methodological infrared camera study." Bioelectromagnetics **26**(6): 510-9.
- Sukhotina, I., Streckert, J. R., et al. (2006). "1800 MHz electromagnetic field effects on melatonin release from isolated pineal glands." J Pineal Res **40**(1): 86-91.
- Szabo, C., Zingarelli, B., et al. (1996). "DNA strand breakage, activation of poly (ADP-ribose) synthetase, and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity of macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(5): 1753-8.
- Szabo, I., Rojavin, M. A., et al. (2001). "Reactions of keratinocytes to in vitro millimeter wave exposure." Bioelectromagnetics **22**(5): 358-64.

T

- Tabibzadeh, S., Kong, Q. F., et al. (1996). "Heat shock proteins in human endometrium throughout the menstrual cycle." Hum Reprod **11**(3): 633-40.
- Tajima, S., Akagi, A., et al. (2000). "Expression of type XVI collagen in cultured skin fibroblasts is related to cell growth arrest." FEBS Lett **469**(1): 1-4.
- Tamm, E. R., Russell, P., et al. (1996). "Human and monkey trabecular meshwork accumulate alpha B-crystallin in response to heat shock and oxidative stress." Invest Ophthalmol Vis Sci **37**(12): 2402-13.
- Tang, D., Xie, Y., et al. (2001). "Repression of the HSP70B promoter by NFIL6, Ku70, and MAPK involves three complementary mechanisms." Biochem Biophys Res Commun **280**(1): 280-5.
- Tice, R. R., Agurell, E., et al. (2000). "Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing." Environ Mol Mutagen **35**(3): 206-21.
- Trautinger, F. (2001). "Heat shock proteins in the photobiology of human skin." J Photochem Photobiol B **63**(1-3): 70-7.
- Trautinger, F., Kindas-Mugge, I., et al. (1995). "72-kD heat shock protein is a mediator of resistance to ultraviolet B light." J Invest Dermatol **105**(2): 160-2.
- Trautinger, F., Kindas-Mugge, I., et al. (1995). "Expression of the 27-kDa heat shock protein in human epidermis and in epidermal neoplasms: an immunohistological study." Br J Dermatol **133**(2): 194-202.
- Travis, J. (1994). "Glia: the brain's other cells." Science **266**(5187): 970-2.
- Trigano, A., Blandeau, O., et al. (2005). "Reliability of electromagnetic filters of cardiac pacemakers tested by cellular telephone ringing." Heart Rhythm **2**(8): 837-41.
- Trosic, I., Busljeta, I., et al. (2002). "Micronucleus induction after whole-body microwave irradiation of rats." Mutat Res **521**(1-2): 73-9.
- Turner, C. P., Panter, S. S., et al. (1999). "Anti-oxidants prevent focal rat brain injury as assessed by induction of heat shock proteins (HSP70, HO-1/HSP32, HSP47) following subarachnoid injections of lysed blood." Brain Res Mol Brain Res **65**(1): 87-102.

Tytell, M., Brown, W. R., et al. (1998). "Immunohistochemical assessment of constitutive and inducible heat-shock protein 70 and ubiquitin in human cerebellum and caudate nucleus." Mol Chem Neuropathol **35**(1-3): 97-117.

U

Utteridge, T. D., Gebiski, V., et al. (2002). "Long-term exposure of E-mu-Pim1 transgenic mice to 898.4 MHz microwaves does not increase lymphoma incidence." Radiat Res **158**(3): 357-64.

V

- Valentim, L. M., Geyer, A. B., et al. (2001). "Effects of global cerebral ischemia and preconditioning on heat shock protein 27 immunocontent and phosphorylation in rat hippocampus." Neuroscience **107**(1): 43-9.
- van den, I. P., Norman, D. G., et al. (1999). "Molecular chaperones: small heat shock proteins in the limelight." Curr Biol **9**(3): R103-5.
- van den, I. P. R., Overkamp, P., et al. (1994). "Alpha A-crystallin confers cellular thermoresistance." FEBS Lett **355**(1): 54-6.
- Van Rijn, J., Wiegant, F. A., et al. (2000). "Heat shock response by cells treated with azetidine-2-carboxylic acid." Int J Hyperthermia **16**(4): 305-18.
- Van Why, S. K., Hildebrandt, F., et al. (1992). "Induction and intracellular localization of HSP-72 after renal ischemia." Am J Physiol **263**(5 Pt 2): F769-75.
- Vargas-Roig, L. M., Fanelli, M. A., et al. (1997). "Heat shock proteins and cell proliferation in human breast cancer biopsy samples." Cancer Detect Prev **21**(5): 441-51.
- Velizarov, S., Raskmark, P., et al. (1999). "The effects of radiofrequency fields on cell proliferation are non-thermal." Bioelectrochem Bioenerg **48**(1): 177-80.
- Verschaeve, L., Heikkinen, P., et al. (2006). "Investigation of co-genotoxic effects of radiofrequency electromagnetic fields in vivo." Radiat Res **165**(5): 598-607.
- Vijayalaxmi, Frei, M. R., et al. (1997). "Frequency of micronuclei in the peripheral blood and bone marrow of cancer-prone mice chronically exposed to 2450 MHz radiofrequency radiation." Radiat Res **147**(4): 495-500.
- Vijayalaxmi, Frei, M. R., et al. (1998). "Correction of an error in calculation in the article "Frequency of micronuclei in the peripheral blood and bone marrow of cancer-prone mice chronically exposed to 2450 MHz radiofrequency radiation" (Radiat. Res. **147**, 495-500, 1997)." Radiat Res **149**(3): 308.
- Voorter, C. E., de Haard-Hoekman, W., et al. (1994). "Elastase inhibition by the C-terminal domains of alpha-crystallin and small heat-shock protein." Biochim Biophys Acta **1204**(1): 43-7.

W

- Wagner, M., Hermanns, I., et al. (1999). "Induction of stress proteins in human endothelial cells by heavy metal ions and heat shock." Am J Physiol **277**(5 Pt 1): L1026-33.
- Wagstaff, M. J., Collaco-Moraes, Y., et al. (1999). "Protection of neuronal cells from apoptosis by Hsp27 delivered with a herpes simplex virus-based vector." J Biol Chem **274**(8): 5061-9.
- Wakata, A., Miyamae, Y., et al. (1998). "Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Environmental Mutagen Society of Japan. Mammalian Mutagenicity Study Group." Environ Mol Mutagen **32**(1): 84-100.
- Walsh, D., Li, Z., et al. (1997). "Heat shock and the role of the HSPs during neural plate induction in early mammalian CNS and brain development." Cell Mol Life Sci **53**(2): 198-211.
- Wang, T. F., Chang, J. H., et al. (1993). "Identification of the peptide binding domain of hsc70. 18-Kilodalton fragment located immediately after ATPase domain is sufficient for high affinity binding." J Biol Chem **268**(35): 26049-51.
- Williams, K. L., Rahimtula, M., et al. (2006). "Heat shock protein 27 is involved in neurite extension and branching of dorsal root ganglion neurons in vitro." J Neurosci Res **84**(4): 716-23.
- Wu, C. (1995). "Heat shock transcription factors: structure and regulation." Annu Rev Cell Dev Biol **11**: 441-69.
- Wyllie, A. H., Morris, R. G., et al. (1984). "Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis." J Pathol **142**(1): 67-77.

X

- Xia, C. H., Liu, H., et al. (2006). "Arginine 54 and Tyrosine 118 residues of {alpha}A-crystallin are crucial for lens formation and transparency." Invest Ophthalmol Vis Sci **47**(7): 3004-10.
- Xu, S., Ning, W., et al. (2006). "Chronic exposure to GSM 1800-MHz microwaves reduces excitatory synaptic activity in cultured hippocampal neurons." Neurosci Lett **398**(3): 253-7.

Y

- Yamamoto, T., Eckes, B., et al. (2001). "Effect of interleukin-10 on the gene expression of type I collagen, fibronectin, and decorin in human skin fibroblasts: differential

- regulation by transforming growth factor-beta and monocyte chemoattractant protein-1." Biochem Biophys Res Commun **281**(1): 200-5.
- Yamane, M., Hattori, H., et al. (1995). "Cotranslocation and colocalization of hsp40 (DnaJ) with hsp70 (DnaK) in mammalian cells." Cell Struct Funct **20**(2): 157-66.
- Yang, J., Liu, X., et al. (1997). "Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked." Science **275**(5303): 1129-32.
- Youde, S. J., Mower, J., et al. (1998). "Stress protein expression in primary and immortalized cultures of human thyroid cells: a model system for the study of stress proteins in the pathogenesis of autoimmune thyroid disease." Cell Stress Chaperones **3**(2): 89-93.
- Young, A. R., Potten, C. S., et al. (1998). "Human melanocytes and keratinocytes exposed to UVB or UVA in vivo show comparable levels of thymine dimers." J Invest Dermatol **111**(6): 936-40.
- Yu, D., Shen, Y., et al. (2006). "Effects of 900 MHz GSM wireless communication signals on DMBA-induced mammary tumors in rats." Radiat Res **165**(2): 174-80.

Z

- Zamzami, N., Marchetti, P., et al. (1996). "Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis." FEBS Lett **384**(1): 53-7.
- Zantema, A., Verlaan-De Vries, M., et al. (1992). "Heat shock protein 27 and alpha B-crystallin can form a complex, which dissociates by heat shock." J Biol Chem **267**(18): 12936-41.
- Zeise, E. and Rensing, L. (2002). "Hyperthermic pre-treatment protects rat IPC-81 leukaemia cells against heat- and hydrogen peroxide-induced apoptosis." Int J Hyperthermia **18**(4): 344-60.
- Zhou, M., Lambert, H., et al. (1993). "Transient activation of a distinct serine protein kinase is responsible for 27-kDa heat shock protein phosphorylation in mitogen-stimulated and heat-shocked cells." J Biol Chem **268**(1): 35-43.
- Zhou, X., Tron, V. A., et al. (1998). "Heat shock transcription factor-1 regulates heat shock protein-72 expression in human keratinocytes exposed to ultraviolet B light." J Invest Dermatol **111**(2): 194-8.

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Publications acceptées:

MASUDA H., SANCHEZ S., DULOU P.E., HARO E., ANANE R., BILLAUDEL B., AND VEYRET B.. 2006. *Effect of GSM-900 and -1800 signals on the skin of hairless rats. I: 2-hours acute exposures.* International Journal of Radiation Biology (IJRB), 82: 669-674

SANCHEZ S., MASUDA H., DULOU P.E., HARO E., ANANE R., BILLAUDEL B., AND VEYRET B.. 2006. *Effect of GSM-900 and -1800 signals on the skin of hairless rats. II: 12-weeks chronic exposures.* IJRB, 82 : 675-680

SANCHEZ S., MILOCHAU A., RUFFIE G., POULLETIER DE GANNES F., LAGROYE I., HARO E., SURLEVE-BAZEILLE JE, BILLAUDEL B., LASSEGUES M., VEYRET B.. 2006. *Human skin cell stress response to GSM-900 mobile phone radiation: an in vitro study on isolated primary cells and on reconstructed epidermis.* FEBS Journal, 273 : 5491-5507

SANCHEZ S., LAGROYE I., HARO E., BILLAUDEL B., AND VEYRET B.. 2006. *Stress cellular response in human skin cells to GSM-1800 mobile phone radiation in comparison to UVB radiation or heat shock: an in vitro study.* Radiation Research. Under press.

Publications soumises:

SANCHEZ S., BALL A.J., LAGROYE I., HARO E., BILLAUDEL B., AND VEYRET B.. 2006. *DNA damage in human primary fibroblasts and in human brain cell lines after a GSM-1800 mobile phone radiation: a study of intermittent and continuous exposure.* Mutation Research. Submitted on September, the 21th, 2006

SANCHEZ S., MASUDA H., RUFFIE G., POULLETIER DE GANNES F., BILLAUDEL B., HARO E., LEVEQUE P., LAGROYE I. AND VEYRET B.. 2006. *No effect of single or chronic exposure to GSM-900 and -1800 mobile phone signals on HSP expression in the skin of hairless rats.* Cell Stress & Chaperones. Submitted on October, the 26th, 2006

SANCHEZ S., RUFFIE G., POULLETIER DE GANNES F., HARO E., BILLAUDEL B., LEVEQUE P., VEYRET B., AND LAGROYE I. *No genotoxic effects of UMTS mobile phone signals on Sprague-Dawley rat brain.* Radiation Research. Submitted on November, the 14th, 2006

Communications Scientifiques (oral / poster)

SANCHEZ S., POULLETIER DE GANNES F., RUFFIE G., LAGROYE I., BILLAUDEL B., VEYRET B..
Skin stress response to exposure to GSM-1800 mobile phone signal, ESDR meeting, Paris, France. (poster) (September, 6-10th, 2006)

SANCHEZ S., POULLETIER DE GANNES F., RUFFIE G., LAGROYE I., BILLAUDEL B., VEYRET B..
Potential genotoxic effects of mobile phone signals on the brain: in vitro and in vivo studies, BEMS meeting, Cancun, Mexico. (Poster) (June, 11-16th, 2006)

SANCHEZ S., POULLETIER DE GANNES F., RUFFIE G., LAGROYE I., BILLAUDEL B., VEYRET B..

Potential genotoxic effects of mobile phone signals on human cutaneous and nerve cells. IRPA, Paris, France. (Poster) (May, 15-19th, 2006)

SANCHEZ S., POULLETIER DE GANNES F., HARO E., RUFFIE G., LAGROYE I., BILLAUDEL B., VEYRET B.. GSM-1800 frame signal: effect on human skin cells, BioEM, Dublin, Ireland. (Oral) (June 2005)

SANCHEZ S., HARO E..

Are there any biological effect of GSM exposure on the human skin: an in vitro study using GSM-900 signal. International School of Bioelectromagnetics A. Chiabrera, Erice, Sicilia, Italy. (poster, price of the best poster) (April 2004)

POULLETIER DE GANNES F, SANCHEZ S., LAGROYE I., HARO E., BILLAUDEL B., VEYRET.B.

Effects of GSM-900 microwave exposure on heat shock proteins: in vitro and in vivo studies at the PIOM laboratory. Workshop "Influence of RF field on the expression of stress proteins", Helsinki, Finland. (April 2004) (oral)

SANCHEZ S., BILLAUDEL B., MILOCHAU A., LAGROYE I., LASSEGUES M., POULLETIER DE GANNES F., SURLÈVE-BAZEILLE J.E., AND VEYRET B. HSPs Expression In Human Skin Cells After Exposure To GSM-900. 6th International Congress of the Bioelectromagnetics Association (EBEA), Budapest, Hungary. (poster) (13–15 November 2003)

MASUDA H., TAXILE M., BILLAUDEL B., SANCHEZ S., DULOU P., HARO, E., LAGROYE I. AND VEYRET B. Ornithine Decarboxylase (ODC) activity in skin Keratinocytes after exposure to GSM Signals of Hairless Rats. 6th International Congress of the Bioelectromagnetics Association (EBEA), Budapest, Hungary. (13–15 November 2003)

LAGROYE I., E. HARO, F. POULLETIER DE GANNES, R. ANANE, P.E. DULOU, BILLAUDEL B., SANCHEZ S., M. TAXILE, LE DIRAISON M., AND VEYRET B.. Biologic effect of GSM-900 radiofrequency: cellular and animal studies performed at PIOM laboratory. 17th International Colloque " Dielectric and Hertzian Optic", Calais, France (Oral) (September 2003)

MASUDA H., SANCHEZ S., DULOU P.E., HARO E., ANANE R., BILLAUDEL B., AND VEYRET B..

Effect of 2-hour acute exposure to GSM-900 or -1800 microwaves on the skin of "hairless" rats. Twenty-five Annual Technical Meeting of the Bioelectromagnetics Society, Maui, Hawaiï, USA. (Poster) (20-27 June 2003)

SANCHEZ S., LAGROYE I., POULLETIER DE GANNES F., HARO E., BILLAUDEL B., DULOU P.E., AND VEYRET B..

Apoptosis in human skin cells after exposure to GSM-900. Twenty-five Annual Technical Meeting of the Bioelectromagnetics Society, Maui, Hawaiï, USA. (Poster) (20-27 June 2003)

MASUDA H., SANCHEZ S., DULOU P.E., HARO E., ANANE R., BILLAUDEL B., AND VEYRET B..

Effect of 12-week chronic exposure to GSM-900 or -1800 microwaves on the skin of "hairless" rats. Twenty-five Annual Technical Meeting of the Bioelectromagnetics Society, Maui, Hawaiï, USA. (Oral) (June 20-27th 2003)

SANCHEZ S., MILOCHAU A., BILLAUDEL B., SURLÈVE-BAZEILLE J.E., LAGROYE I., POULLETIER DE GANNES F., HARO E., DULOU P.E., LASSEGUES M., and VEYRET B.

Effect evaluation of a GSM-900 signal exposure on skin. National Congress of Radioprotection SFRP, Montpellier, France. (Oral) (June, 11-13th, 2003)

BILLAUEDEL B., DULOU P.-E., HARO E., LAGROYE I., POULLETIER DE GANNES F., SANCHEZ S., TAXILE M., AND VEYRET B..

In vitro Studies Related to Mobile Telephony, performed at the PIOM Laboratory in Bordeaux, France. 3rd International EMF Seminar. Meeting of Guilin, China. (Poster) (April, 18-22nd, 2003)

BILLAUEDEL B., SANCHEZ S., MASUDA H., DULOU P.E., HARO E., ANANE R. AND VEYRET B..

Effect of GSM-900 microwaves on the skin of hairless rats (a preliminary study). Twenty-four Annual Technical Meeting of the Bioelectromagnetics Society, Québec, Canada. (Poster) (June, 27-30th, 2002)

Résumé

Le téléphone mobile est actuellement le moyen de communication le plus courant et il émet des ondes électromagnétiques radiofréquences (RF). Lors d'une communication, l'absorption de l'énergie RF dans les tissus se fait au niveau de la peau et des tissus cérébraux. Elle diminue en fonction de la distance par rapport au téléphone. Notre travail porte sur l'évaluation d'effets biologiques des RF de la téléphonie mobile sur la peau, organe représentant la première barrière de protection de l'organisme et sur le cerveau absorbant chacun environ 25% de l'énergie émise par un téléphone. Nous avons cherché à caractériser une réponse de stress cellulaire au niveau de la peau et du cerveau après exposition aux RF de type GSM-900, GSM-1800 et UMTS. Nous avons utilisé des modèles cellulaires et animaux de la peau (kératinocytes et fibroblastes primaires humains, épidermes reconstruits (ER), rats Hairless) et du cerveau (lignées humaines SH-SY5Y et CHME-5, rats Sprague-Dawley). Le stress cellulaire a été caractérisé par la recherche de l'expression de certaines protéines de choc thermique HSP (Hsc70, Hsp25 ou Hsp27 et Hsp70), de lésions de l'ADN, de surprolifération et d'apoptose cellulaires. Différents temps et niveaux d'exposition ont été étudiés. Nos travaux ne montrent aucun effet du GSM-1800 et de l'UMTS sur les modèles de peau et de cerveau. Les seuls effets détectés sont une diminution d'Hsc70 dans les fibroblastes et une augmentation d'Hsp70 dans les ER après exposition au GSM-900. En l'absence d'effets sur les autres paramètres cellulaires et chez l'animal, ces données suggèrent une adaptation cellulaire non délétère.

Mots-clés: téléphonie mobile, radiofréquences, peau, système nerveux central, stress cellulaire, protéines de choc thermique, lésions de l'ADN, apoptose

Abstract

Mobile telephony is currently the most common way of wireless communication. It uses Radiofrequency Fields (RFR). During a mobile phone call, absorption of RFR energy occurs in skin and cerebral tissues. It decreases according to the distance with regard to the phone. This PhD work dealt with investigations of biologic effects of various mobile phone RFR signals on the skin and brain. Each organ absorbs approximately 25 % of the total energy emitted by a phone. We investigated the cellular stress response after exposure to GSM-900, GSM-1800 and UMTS signals. We used cellular and animal models for the skin (primary human keratinocytes and fibroblasts, reconstructed epidermis ER, Hairless rats) and for the brain (human cell lines SH-SY5Y and CHME-5, and Sprague-Dawley rats). Cellular stress was characterized by heat shock proteins (HSPs) expression (Hsc70, Hsp25 or Hsp27 and Hsp70), and DNA damage, cellular over-proliferation and apoptosis. Various exposure durations and levels (up to 13 W/kg) were used. There was no effect of GSM-1800 and UMTS exposure on the skin and brain models. The only effects reported were a decreased expression of Hsc70 in fibroblasts and an increased expression of Hsp70 in ER after exposure to GSM-900. As no other effects on cellular biological parameters and on animals were detected, these data suggest cell adaptation without deleterious effects.

Keywords: mobile phone, radiofrequencies, skin, central nervous system, cellular stress, heat shock proteins, DNA damage, apoptosis

Discipline: Biologie Cellulaire et Moléculaire

Laboratoire d'accueil:

Laboratoire PIOM
Groupe de Bioélectromagnétisme EPHE
16 avenue Pey-Berland
33607 PESSAC Cedex